



**VNIVERSIDAD
D SALAMANCA**

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

**Desarrollo de métodos rápidos de análisis basados
en espectrometría de masas con ionización por
electrospray para la determinación de compuestos
de interés clínico en matrices biológicas**

*Development of rapid methods of analysis based on
electrospray ionization mass spectrometry for the
determination of compounds of clinical interest in
biological matrices*

María Teresa Fernández del Campo García

2022



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

**Desarrollo de métodos rápidos de análisis basados
en espectrometría de masas con ionización por
electrospray para la determinación de compuestos
de interés clínico en matrices biológicas**

*Development of rapid methods of analysis based on
electrospray ionization mass spectrometry for the
determination of compounds of clinical interest in
biological matrices*

Memoria que para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca
presenta María Teresa Fernández del Campo García.

Salamanca, 30 de junio de 2022

Fdo.: María Teresa Fernández del Campo García

Dña. Encarnación Rodríguez Gonzalo, Catedrática de Química Analítica de la Universidad de Salamanca, y Dña. Ana María Casas Ferreira, Profesora Titular de Química Analítica de la Universidad de Salamanca, ambas directoras del trabajo “Desarrollo de métodos rápidos de análisis basados en espectrometría de masas con ionización por electrospray para la determinación de compuestos de interés clínico en matrices biológicas”, realizado por María Teresa Fernández del Campo García para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, autorizan la presentación del mismo al considerar que se han alcanzado los objetivos inicialmente previstos.

Salamanca, 30 de junio de 2022

Fdo.: Encarnación Rodríguez Gonzalo Fdo.: Ana María Casas Ferreira

Deseo expresar mi agradecimiento a la Universidad de Salamanca por la concesión de una ayuda para la Formación de Personal Investigador cofinanciada por el Banco Santander (Convocatoria 2016).

El trabajo realizado ha sido financiado por los proyectos del Ministerio de Economía y Competitividad CTQ2017-87886-P/BQU y por los proyectos de la Junta de Castilla y León SA055P17 y SA111P20.

GRACIAS...

...A las directoras de esta Tesis Doctoral, Encarnación Rodríguez Gonzalo y Ana María Casas Ferreira, por todos los conocimientos que me habéis transmitido y todo lo que me habéis enseñado para realizar con éxito todos los trabajos. Gracias por confiar en mí, guiarme y apoyarme durante todos estos años. Trabajar a vuestro lado ha sido muy satisfactorio.

...A Bernardo Moreno Cordero por ser mi director de Tesis en mi primer año como doctoranda. Gracias por tener siempre una sonrisa y una palabra amable con la que hacer más amenos los días de trabajo.

...A todas las personas que forman parte del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, por estar siempre dispuestos a ayudar en todo lo necesario, por tener siempre una palabra de apoyo y darme ánimos en los momentos más bajos.

...A todos los compañeros que han pasado por “la zona de abajo”. Cuando llegué nueva al laboratorio noté la cercanía y el apoyo de todos ellos. Gracias a todos (a los que se han ido y a los que están) por mostrarme los entresijos del laboratorio, por los cafés y las conversaciones que ayudan a desconectar un ratito. Siempre voy a tener un buen recuerdo de todos vosotros. Gracias especialmente a Patri, nos conocemos desde pequeñas y al final hemos acabado trabajando juntas. Gracias por estar siempre ahí cuando te he necesitado tanto profesional como personalmente.

...A mis amigas, que siempre se han preocupado por mí y me han mostrado todo su apoyo en los buenos y en los malos momentos.

...A mi familia, por vuestro apoyo incondicional no solo durante esta etapa sino siempre. Gracias por hacerme más fácil todos los días de mi vida, sin vosotros esto no habría sido posible. Gracias por estar siempre a mi lado

ayudándome en todo, dándome ánimos y sacándome una sonrisa siempre que lo he necesitado. Espero que siempre estéis orgullosos de mí. Muchas gracias por todo, os quiero.

...A Miguel y Alba, el motor de mi vida. Miguel gracias por tu apoyo, comprensión y amor. Alba, hija mía, todavía eres muy pequeña para entender lo importante que eres para mí, eres la fuerza que me impulsa cada mañana a seguir adelante. Gracias a los dos por esta pequeña familia que estamos formando, os quiero mucho.

Esta Tesis Doctoral se presenta como compendio de las publicaciones especificadas a continuación:

1. Development of a screening and confirmatory method for the analysis of polar endogenous compounds in saliva based on a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric system.

María Teresa Fernández del Campo García, Ana María Casas Ferreira, Encarnación Rodríguez Gonzalo, Bernardo Moreno Cordero, José Luis Pérez Pavón

Journal of Chromatography A 1590 (2019) 88-95

2. Development of a fast and reliable methodology for the determination of polyamines in urine by using a guard column as a low-resolution fractioning step prior to mass spectrometry. Comparison with flow injection-mass spectrometry analysis.

María Teresa Fernández del Campo García, Ana María Casas Ferreira, Encarnación Rodríguez Gonzalo, Bernardo Moreno Cordero, José Luis Pérez Pavón

Microchemical Journal 158 (2020) 105223

3. Rapid and reliable analysis of underivatized amino acids in urine using tandem mass spectrometry.

María Teresa Fernández del Campo García, Ana María Casas Ferreira, Encarnación Rodríguez Gonzalo, Bernardo Moreno Cordero, José Luis Pérez Pavón.

Microchemical Journal 172 (2022) 106914

4. Orbitrap-high resolution mass spectrometry (HRMS) with the use of a guard column (gC) for the determination of compounds of clinical interest in urine.

María Teresa Fernández del Campo García, Ana María Casas Ferreira, Encarnación Rodríguez Gonzalo, José Luis Pérez Pavón.

Pendiente de publicación

ÍNDICE

SIGLAS Y ACRÓNIMOS	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	5
1. Estructura y Objeto de la Tesis	7
1.1. Estructura de la Tesis Doctoral	9
1.2. Introducción	10
1.3. Objetivos e hipótesis de trabajo	12
1.4. Metodología	14
2. Espectrometría de masas	17
2.1. Ionización por electrospray (<i>ESI, ElectroSpray Ionization</i>)	23
2.2. Analizador de triple cuadrupolo (QqQ)	27
2.3. Analizador de masas Orbitrap.....	32
3. Métodos rápidos de análisis basados en espectrometría de masas	39
3.1. Estrategias no separativas	42
3.2. Estrategias basadas en el uso de precolumnas de protección.....	47
4. Compuestos biológicos de interés clínico	51
4.1. Poliaminas	53
4.2. Aminoácidos	59
5. Muestras biológicas no invasivas	65
5.1. Saliva	68
5.1.1.Métodos analíticos propuestos para la determinación de poliaminas y aminoácidos	70
5.2. Orina	72
5.2.1.Métodos analíticos propuestos para la determinación de poliaminas y aminoácidos	76

6. Configuraciones instrumentales	83
6.1. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con un analizador triple cuadrupolo (LC-QqQ)	85
6.1.1. Cromatógrafo de líquidos (LC)	85
6.1.2. Fuente de ionización por electrospray (ESI)	86
6.1.3. Analizador de triple cuadrupolo (QqQ)	86
6.2. Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UHPLC) acoplada a espectrometría de masas con un analizador de masas Orbitrap	87
6.2.1. Cromatógrafo de líquidos de ultra alta eficiencia (UHPLC)	87
6.2.2. Fuente de ionización por electrospray (ESI)	88
6.2.3. Analizador de masas Orbitrap	89
6.3. Aplicaciones de las configuraciones	89

CAPÍTULO I. Estrategias no separativas..... 93

I.1. Artículo de investigación: Desarrollo de un método de cribado- confirmación para el análisis de compuestos endógenos polares en saliva basado en un sistema de cromatografía líquidos-espectrometría de masas en tándem	
• Resumen	95
• Journal of Chromatography A 1590 (2019) 88-95.....	105

CAPÍTULO II. Estrategias basadas en el uso de precolumnas de protección..... 115

II.1. Precolumnas de protección acopladas a espectrometría de masas con un analizador de triple cuadrupolo.....	117
II.2.1. Artículo de investigación: Desarrollo de un método rápido y fiable para la determinación de poliaminas en orina utilizando un precolumna de protección para un fraccionamiento de baja	

resolución como paso previo a la espectrometría de masas. Comparación con análisis por inyección en flujo-espectrometría de masas	
• Resumen	119
• Microchemical Journal 158 (2020) 105223	129
II.2.2. Artículo de investigación: Rapid and reliable analysis of underivatized amino acids in urine using tandem mass spectrometry	
• Resumen	149
• Microchemical Journal 172 (2022) 106914	159
II.2. Precolumnas de protección acopladas a espectrometría de masas con un analizador Orbitrap	189
II.3.1. Artículo de revisión: Orbitrap-espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) con el uso de precolumnas de protección (gC) para la determinación de compuestos de interés clínico en orina	
• Resumen	191
• Trabajo pendiente de publicación	201
CONCLUSIONES GENERALES	243

SIGLAS Y ACRÓNIMOS

APCI	Ionización química a presión atmosférica <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
CAD	Disociación activada por colisión <i>Collision Activated Dissociation</i>
CE	Electroforesis capilar <i>Capillary Electrophoresis</i>
CID	Disociación inducida por colisión <i>Collision Induced Dissociation</i>
DAD	Detector de diodos <i>Diode Array Detection</i>
DIA	Adquisición independiente de datos <i>Data-Independent Acquisition</i>
DI-MS	Inyección directa-espectrometría de masas <i>Direct Infusion Mass Spectrometry</i>
ESI	Ionización por electro spray <i>ElectroSpray Ionization</i>
FIA	Análisis por inyección en flujo <i>Flow Injection Analysis</i>
Full MS	Barrido de espectrometría de masas completo <i>Full Scan Mass Spectrometry</i>
Full MS/dd-MS²	Barrido de espectrometría de masas completo seguido de un conjunto de barridos dependientes de datos con una energía de fragmentación determinada <i>Full Scan Mass Spectrometry followed by Data-Dependent Mass Spectrometry</i>
FT-ICR	Resonancia ion ciclotrón con transformada de Fourier <i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i>
FWHM	Anchura del pico a la mitad de la altura máxima <i>Full Width at Half Maximum</i>

gC	Precolumna de protección <i>guard Column</i>
GC	Cromatografía de gases <i>Gas Chromatography</i>
H-ESI	Ionización por electrospray calentado <i>Heated Electrospray Ionization</i>
HCD	Disociación inducida por colisión de alta energía <i>Higher Energy Collisional Dissociation</i>
HILIC	Cromatografía de interacciones hidrofílicas <i>Hydrophilic Interaction Chromatography</i>
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución <i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
HS	Espacio de cabeza <i>HeadSpace</i>
IEM	Errores congénitos del metabolismo <i>Inborn Errors of Metabolism</i>
IMMS	Movilidad iónica-espectrometría de masas <i>Ion Mobility Mass Spectrometry</i>
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IT	Trampa iónica <i>Ion Trap</i>
LC	Cromatografía líquida <i>Liquid Chromatography</i>
LLE	Extracción líquido-líquido <i>Liquid-Liquid Extraction</i>
LOD	Límite de detección <i>Limit Of Detection</i>
LOQ	Límite de cuantificación <i>Limit Of Quantification</i>

MEPS	Microextracción con sorbentes empaquetados <i>MicroExtraction by Packed Sorbents</i>
MIMS	Introducción directa en la fuente de ionización del espectrómetro de masas a través de membranas <i>Membrane Introduction Mass Spectrometry</i>
MRM	Seguimiento de reacción múltiple <i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	Espectrometría de masas <i>Mass Spectrometry</i>
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem <i>Tandem mass spectrometry</i>
PEEK	Poliéter eter cetonas <i>PolyEther Ether Ketones</i>
PRM	Seguimiento de reacción en paralelo <i>Parallel Reaction Monitoring</i>
PTR-MS	Reacción de transferencia de protones-espectrometría de masas <i>Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry</i>
Q	Cuadropolo <i>Quadrupole</i>
QqQ	Triple cuadropolo <i>Triple quadrupole</i>
RSD	Desviación estándar relativa <i>Relative Standard Deviation</i>
SALLE	Extracción líquido-líquido asistida por sales <i>Salting-out Assisted Liquid-Liquid Extraction</i>
SESI-MS	Ionización por electrospray secundario-espectrometría de masas <i>Secondary Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
SIFT-MS	Tubo de selección de iones con flujo-espectrometría de masas <i>Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry</i>

SPE	Extracción en fase sólida <i>Solid Phase Extraction</i>
SPME	Microextracción en fase sólida <i>Solid Phase Microextraction</i>
SRM	Seguimiento de reacción seleccionada <i>Selected Reaction Monitoring</i>
TOF	Tiempo de vuelo <i>Time Of Flight</i>
UHPLC	Cromatografía de líquidos de ultra alta eficiencia <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.

ESTRUCTURA Y OBJETO DE LA TESIS

1.1. Estructura de la Tesis Doctoral

A fin de cumplir los requisitos para la presentación de la Tesis Doctoral en el formato compendio de artículos, esta memoria se ha estructurado en varios apartados. En primer lugar, la Tesis consta de una introducción general que pone de manifiesto la coherencia y relación directa entre los artículos incluidos. En la misma, se muestra la estructura y objeto de la Tesis Doctoral. Además, se incluye una descripción general de la espectrometría de masas y de las metodologías rápidas basadas en espectrometría de masas descritas hasta el momento, y se describen los compuestos objeto de estudio, las muestras biológicas y las configuraciones utilizadas.

Después de esta parte de introducción general, se expone el contenido de la Tesis. Este está estructurado en dos capítulos generales (capítulo I y II) diferenciados según la metodología rápida desarrollada. En estos capítulos se incluyen las copias completas de los artículos originales precedidas de un resumen en castellano con los objetivos concretos, la metodología empleada, los resultados y las conclusiones.

En el capítulo I se desarrolla una metodología que permite realizar, utilizando la misma configuración instrumental, un análisis rápido para el cribado de muestras y un análisis de confirmación de resultados, en caso de ser necesario. Esta metodología se ha aplicado a la determinación de poliaminas y aminoácidos sin derivatizar en muestras de saliva.

El capítulo II se centra en el desarrollo de metodologías rápidas basadas en el uso de precolumnas de protección acopladas directamente al espectrómetro de masas. La precolumna de protección actúa como etapa de limpieza y fraccionamiento de baja resolución previa a la introducción de la muestra en el espectrómetro de masas. Este capítulo II consta de tres apartados. En los dos primeros se utiliza un espectrómetro de masas con un analizador de triple cuadrupolo para la determinación de compuestos endógenos polares (poliaminas

y compuestos relacionados) y aminoácidos sin derivatizar en muestras de orina. El tercer apartado se centra en la determinación de aminoácidos en orina, utilizando un espectrómetro de masas con un analizador de masas Orbitrap.

1.2. Introducción

Esta Tesis Doctoral está enfocada al desarrollo de métodos analíticos rápidos basados en espectrometría de masas (*MS, Mass Spectrometry*) con ionización por electrospray (*ESI, ElectroSpray Ionization*) para la determinación de compuestos de interés clínico en matrices biológicas. En los últimos años ha habido un gran interés en el desarrollo de este tipo de metodologías que permiten la determinación simultánea de un gran número de compuestos en tiempos de análisis cortos. Estas estrategias rápidas pueden utilizarse en el ámbito clínico como etapa de cribado para obtener información clínica relevante mediante el análisis de diversos biomarcadores presentes en muestras biológicas en un corto periodo de tiempo. Posteriormente, solo para aquellos casos en que se presenten compuestos con valores anómalos, se requeriría una etapa de confirmación con otras metodologías de mayor complejidad, que impliquen mayores tiempos de análisis. Debido a la necesidad de obtener resultados fiables, la espectrometría de masas es la técnica más adecuada, por su elevada sensibilidad, selectividad y capacidad de identificación. En esta Tesis Doctoral se utilizan dos analizadores de masas diferentes: un analizador de triple cuadrupolo (*QqQ, triple quadrupole*) y un analizador de masas Orbitrap.

Como se ha indicado previamente, esta memoria se ha estructurado en dos partes diferenciadas en función de la metodología rápida desarrollada. En la primera parte de la Tesis se propone una estrategia basada en la introducción directa de la muestra en el espectrómetro de masas, como etapa de cribado, con la posibilidad de llevar a cabo, en la misma configuración instrumental, el análisis confirmatorio utilizando una técnica de separación. Para ello, se utiliza un

cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas donde se mantiene la columna cromatográfica en el sistema. La utilización de una fase móvil con un alto poder de elución elimina la capacidad separativa de la columna, permitiendo la introducción directa de la muestra en el equipo de MS. Con un cambio en la composición de la fase móvil es posible la separación cromatográfica de los compuestos.

En la segunda parte de la Tesis se proponen diversas metodologías basadas en el acoplamiento de precolumnas de protección (*gC*, *guard column*) a un espectrómetro de masas. La inclusión de estas precolumnas permite solucionar problemas de sensibilidad y morfología de pico deficiente que se observan para algunos compuestos con las metodologías no separativas. Estas mejoras se consiguen sin un incremento significativo del tiempo de análisis, que se mantienen entre 1 y 3 min.

Para confirmar los resultados obtenidos con los métodos rápidos desarrollados, en esta Tesis también se han propuesto métodos basados en cromatografía líquida-espectrometría de masas (*LC-MS*, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) adecuados para cada grupo de compuestos.

Las metodologías desarrolladas han sido aplicadas a la determinación y cuantificación de compuestos de interés clínico, como son las poliaminas y los aminoácidos, en muestras de saliva y orina. Estos compuestos están implicados en una gran diversidad de procesos biológicos y se ha asociado la alteración de su concentración en distintas muestras biológicas con diferentes patologías. Considerando su importancia clínica, es de gran interés el desarrollo de métodos que permitan su determinación fiable en un periodo corto de tiempo. Estos métodos podrían utilizarse para el diagnóstico temprano de diferentes enfermedades.

Respecto al pretratamiento de muestra, en esta Tesis Doctoral se han utilizado procedimientos sencillos para muestras de saliva y orina con una mínima manipulación, evitando procedimientos laboriosos y reacciones de derivatización.

1.3. Objetivos e hipótesis de trabajo

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es la puesta a punto de metodologías analíticas rápidas basadas en espectrometría de masas con una fuente de ionización por electrospray orientadas a la determinación y cuantificación de compuestos de interés clínico en muestras biológicas no invasivas. La espectrometría de masas permite simplificar de forma significativa los procedimientos analíticos debido a la enorme cantidad de datos que proporciona, consiguiendo en muchos casos la obtención de información cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa para resolver el problema analítico planteado.

La hipótesis de partida es la viabilidad de utilizar la introducción directa de la muestra a un espectrómetro de masas con una fuente de ionización por electrospray en la modalidad análisis por inyección en flujo (*FIA-MS, Flow Injection Analysis-Mass Spectrometry*), o bien utilizando precolumnas de protección como etapa de limpieza y fraccionamiento previo a la detección por espectrometría de masas para la determinación de forma rápida de poliaminas y aminoácidos en muestras de orina y saliva.

El objetivo concreto de la primera parte de esta Tesis es el desarrollo y la validación de un método de cribado (no separativo) y de confirmación (separativo), ambos basados en la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-ESI-MS/MS), utilizando la misma configuración instrumental. Este objetivo se plantea a partir de trabajos previos

en los cuales se han desarrollado métodos no separativos basados en el acoplamiento de un inyector de temperatura programada a un cromatógrafo de gases y un espectrómetro de masas, eliminando la capacidad separativa de la columna manteniéndola a una temperatura elevada. En nuestro caso, se plantea la eliminación de la capacidad separativa de la columna mediante la utilización de fases móviles con un alto poder de elución. Una vez desarrollada y validada la metodología, se aplicará a la determinación de los compuestos de interés, poliaminas, compuestos relacionados con las poliaminas y aminoácidos, en muestras de saliva.

La segunda parte de la Tesis se centra en el desarrollo de métodos rápidos de análisis utilizando precolumnas de protección de forma previa a la detección por espectrometría de masas (gC-ESI-MS). Se plantean diferentes objetivos dentro de la misma. El primero de ellos consiste en el desarrollo de métodos basados en el acoplamiento de precolumnas de protección a espectrometría de masas en tándem (gC-ESI-MS/MS) para la determinación de poliaminas y compuestos relacionados en muestras de orina. El segundo objetivo se basa en la utilización de esa misma metodología para la determinación de aminoácidos en orina. En ambos casos se propone utilizar un analizador de triple cuadrupolo. Los resultados obtenidos se comparan con los obtenidos utilizando la modalidad FIA-MS/MS con objeto de evaluar las mejoras alcanzadas al introducir la precolumna de protección en la configuración instrumental. De forma simultánea, se desarrollarán métodos basados en cromatografía de líquidos para confirmar los resultados obtenidos con las metodologías rápidas. Debido a la alta polaridad de los compuestos objeto de estudio, se plantea la necesidad de añadir un par iónico a la fase móvil. Una vez desarrolladas y validadas las diferentes metodologías, se plantea la determinación de los analitos, poliaminas y aminoácidos, en diferentes sujetos para evaluar la existencia de diferencias significativas entre diferentes grupos como, por ejemplo, hombres y mujeres.

El último de los estudios abordados en esta segunda parte de la Tesis se centra en la utilización de precolumnas de protección acopladas a un espectrómetro de masas de alta resolución (Orbitrap). Este objetivo deriva de uno de los problemas asociados al uso de analizadores de baja resolución como es el analizador de triple cuadrupolo, esto es, la presencia de interferencias isobáricas que dificultan la determinación de los compuestos de interés. Se espera que con la utilización de un analizador de masas Orbitrap, con su alto poder de resolución, se pueda minimizar esta problemática. Además, se plantea la evaluación de distintas precolumnas de protección con diferentes materiales de relleno de diferente naturaleza química (fase inversa, interacciones hidrofílicas, intercambio catiónico e intercambio aniónico). La metodología desarrollada y validada se aplica a la determinación de aminoácidos en orina de individuos sanos.

1.4. Metodología

La metodología seguida para el desarrollo de los diferentes apartados de esta Tesis Doctoral consta de cuatro etapas, que se describen a continuación.

1. Etapa de pretratamiento de muestra

Las muestras biológicas son, por lo general, matrices bastante complejas. El desarrollo de métodos rápidos, donde se elimina la etapa de separación cromatográfica, presenta la problemática de supresión iónica, así como de presencia de compuestos de la matriz que puedan interferir en el análisis. Por ello, en todos los casos, la etapa de pretratamiento de muestra propuesta ha sido optimizada con el objetivo de minimizar estos problemas.

2. Desarrollo y optimización de la metodología propuesta

Tanto en los métodos basados en FIA-MS como gC-ESI-MS y LC-MS se han optimizado las condiciones que permiten obtener los resultados más adecuados en cada caso como, por ejemplo, composición de la fase móvil o fase

portadora, velocidad de flujo, volumen de inyección, el tiempo de análisis, etc. Debido a la alta polaridad de los analitos objeto de estudio, se propone la utilización de pares iónicos con objeto de aumentar su retención tanto cuando se utilizan precolumnas de protección como a la hora de desarrollar los métodos separativos. Respecto al espectrómetro de masas, es necesaria la optimización de las condiciones de operación de los analizadores utilizados (triple cuadrupolo y Orbitrap) como el modo de adquisición, voltaje de cono, la energía de colisión y el tiempo de registro de cada ion. En los modos de adquisición que implican la utilización de iones producto, es necesario seleccionar las transiciones adecuadas para cada analito para obtener la mayor selectividad posible.

3. Validación de los métodos propuestos

Los métodos propuestos han sido validados en términos de linealidad, límites de detección y cuantificación, reproducibilidad, repetibilidad y exactitud, utilizando matrices sintéticas cuando ha sido posible y la propia matriz de análisis. También se ha evaluado la existencia de efecto de matriz, ya que el resultado de dicho estudio determinará la estrategia de calibración que se debe utilizar.

4. Aplicación al análisis de muestras biológicas

Se ha procedido a la determinación y cuantificación de los compuestos de interés en muestras de orina y saliva de individuos sanos utilizando las estrategias desarrolladas. Además, se ha evaluado la concordancia de los resultados obtenidos mediante las metodologías rápidas propuestas y los correspondientes métodos de confirmación.

2.

ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas (*MS, Mass Spectrometry*) es una técnica analítica que produce iones en fase gaseosa, que son separados, detectados y caracterizados de acuerdo a su relación masa/carga (m/z). Las muestras son introducidas en una fuente de ionización donde las moléculas o átomos son ionizados. Los iones generados en fase gaseosa son transferidos a un entorno de alto vacío donde son separados en un analizador de masas en función de su relación masa/carga (m/z) mediante la aplicación de campos eléctricos y/o magnéticos. Por último, un detector transforma la corriente iónica en una señal eléctrica, la cual puede ser medida por el sistema¹.

Esta técnica analítica presenta una elevada sensibilidad y selectividad, así como una alta velocidad de análisis. Tiene la capacidad de identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos conocidos y determinar la estructura de diferentes moléculas. Todas estas características la hacen una técnica muy atractiva para los distintos campos de la ciencia y sus aplicaciones son muy diversas^{1,2}.

Se han utilizado diferentes fuentes de ionización para la obtención de los iones en fase gaseosa. La ionización electrónica y la ionización química son modalidades de ionización adecuadas para compuestos con suficiente volatilidad y térmicamente estables. Para compuestos no volátiles y térmicamente lábiles se han desarrollado otros sistemas de ionización capaces de generar iones en fase gaseosa a partir de una fase condensada. Entre estos sistemas de ionización, los más utilizados actualmente son la ionización por electrospray (*ESI, ElectroSpray Ionization*) y la ionización química a presión atmosférica (*APCI, Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), en el caso de muestras líquidas¹.

¹ De Hoffman E, Stroobant V, *Mass spectrometry: Principles and Applications*, 3ª Edición, John Wiley & Son, Ltd, 2013

² Watson JT, Sparkman OD, *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation*, 4ª Edición, John Wiley & Son, Ltd, 2007, <https://doi.org/10.1002/9780470516898.ch3>

El analizador de masas es la parte del espectrómetro de masas donde se produce la separación de los iones generados, en función de su relación masa/carga (m/z). Su funcionamiento se basa en el uso campos eléctricos estáticos o dinámicos y campos magnéticos que pueden ser aplicados de forma única o combinada. La mayoría de las diferencias básicas entre los analizadores de masas más habituales recaen en la manera en que se aplican estos campos para conseguir la separación iónica.

Las características de un analizador de masas pueden evaluarse en base a diversos parámetros como son el rango de masas (es decir, intervalo de valores m/z que el analizador puede medir), la velocidad de análisis, la transmisión (o relación entre el número de iones que alcanzan el detector con respecto a los iones que entran en el analizador), la exactitud de masa y la resolución. Sin embargo, son estos dos últimos parámetros los que marcan, de una forma práctica, la principal diferencia de funcionamiento de los distintos tipos de analizadores.

La exactitud de masa (*mass accuracy*) hace referencia a la exactitud del valor m/z que proporciona el analizador de masas. Se expresa como la diferencia entre el valor de m/z experimental $(m/z)_{exp}$ y verdadero $(m/z)_{ver}$ (ecuación 1) y habitualmente se expresa en miliunidades de masa o en partes por millón (ppm)¹.

$$\frac{(m/z)_{exp} - (m/z)_{ver}}{(m/z)_{ver}} \times 10^6 \quad (1)$$

La resolución en espectrometría de masas hace referencia a la capacidad de un analizador para distinguir las señales de dos iones que presentan valores de m/z muy próximos. Hay dos términos, resolución y poder de resolución, que a

menudo se usan indistintamente y cuya definición exacta es uno de los aspectos más confusos en la terminología de espectrometría de masas^{3,4}.

Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (*IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry*), la resolución en un espectro de masas corresponde a la relación entre el valor m/z determinado y la menor diferencia, $\Delta(m/z)$, entre valores de m/z para que dos iones puedan estar separados, esto es $(m/z) / \Delta(m/z)$, donde la definición y la forma de medir $\Delta(m/z)$ debe especificarse³.

Para un pico aislado, el valor de $\Delta(m/z)$ puede evaluarse utilizando la anchura de pico a un determinado porcentaje de la altura máxima de pico. Habitualmente este porcentaje se establece en el 50%, por lo que el valor de $\Delta(m/z)$ corresponde a la anchura de pico a la mitad de la altura máxima (*FWHM, Full Width at Half Maximum*). Además de esta definición de resolución en función de la anchura de pico (*peak width definition o FWHM definition*), la IUPAC establece una definición alternativa aplicable a dos picos adyacentes de igual intensidad, separados por un valle que es 10% de la altura de pico. En esta situación, el valor de $\Delta(m/z)$ que aparece en la expresión $(m/z) / \Delta(m/z)$ se define como la separación entre los valores de m/z de los dos picos considerados, siendo el numerador, el valor de m/z del primero de los picos. A esta definición se denomina “resolución para un valle del 10%” (*10% valley definition*)³.

Según la IUPAC, el término “poder de resolución” se define como “la medida de la capacidad de un espectrómetro de masas para proporcionar un valor específico de resolución de masas”³.

³ Murray KK, Boyd RK, Eberlin MN, John Langley G, Li L, Naito Y, *Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013)*, Pure Appl Chem. 85 (2013) 1515-609, <https://doi.org/10.1351/PAC-REC-06-04-06>

⁴ Urban J, Afseth NK, Štys D, *Fundamental definitions and confusions in mass spectrometry about mass assignment, centroiding and resolution*, TrAC - Trends Anal Chem. 53 (2014) 126-36, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.07.010>

En la práctica común, el término más frecuentemente utilizado para caracterizar un analizador de masas es el de “poder de resolución” expresado como $R = m/\Delta m$, calculado a partir de un único pico o dos picos adyacentes.

Según su poder de resolución los analizadores pueden agruparse en dos categorías: analizadores de baja y alta resolución. Se consideran analizadores de baja y alta resolución a aquellos con un poder de resolución menor o mayor a aproximadamente 10000 (FWHM), respectivamente^{1,5}. Como analizadores de baja resolución están el analizador de cuadrupolo (*Q*, *Quadrupole*) y la trampa de iones (*IT*, *Ion Trap*). Entre los dispositivos de alta resolución están los analizadores de resonancia ion-ciclotrón con transformada de Fourier (*FT-ICR*, *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*), los analizadores de tiempo de vuelo (*TOF*, *Time-Of-Flight*) y el Orbitrap.

Por último, la corriente de iones obtenida en los diferentes analizadores se dirige a un sistema de detección, que convierte ese haz de iones en una señal eléctrica que puede ser procesada y almacenada. Existen distintos dispositivos de detección de iones, aunque los más utilizados son la copa de Faraday y los multiplicadores de electrones. La copa de Faraday está basada en la medida de la corriente de carga que se produce cuando un ion golpea una superficie metalizada y es neutralizado. Por su parte, los multiplicadores de electrones se basan en la transferencia de energía cinética de iones incidentes por colisión con una superficie que a su vez genera electrones secundarios, los cuales son amplificados para generar una corriente electrónica. En cambio, la detección de iones en los analizadores de resonancia ion ciclotrón con transformada de Fourier (FT-ICR) y Orbitrap es característicamente distinta, ya que los iones son detectados por la corriente imagen que generan en un circuito dentro de la zona del analizador de masas¹.

⁵ Xian F, Hendrickson CL, Marshall AG, *High Resolution Mass Spectrometry*, Mass Spectrom Rev. 84 (2012) 708-19, <https://doi.org/10.1021/ac203191t>

En esta Tesis Doctoral se han utilizado dos equipos de espectrometría de masas: un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo (*QqQ*, *triple quadrupole*) y un Orbitrap, ambos equipados con una fuente de ionización por electrospray. El dispositivo de detección que utiliza el QqQ es un multiplicador de electrones, mientras que en el caso del Orbitrap, como ya se ha indicado, la detección forma parte del propio analizador.

2.1. Ionización por electrospray (*ESI*, *ElectroSpray Ionization*)

La ionización por electrospray o electronebulización es una modalidad de ionización a presión atmosférica para muestras en estado líquido adecuada para compuestos con un amplio rango de masas moleculares. Esta técnica de ionización se basa en la generación, a partir de una fase líquida, de una nube de gotas cargadas eléctricamente, que es sometida a la acción de un fuerte campo eléctrico. ESI es una técnica de ionización suave, ya que en el proceso de ionización las moléculas o no sufren fragmentación o tiene lugar una pequeña fragmentación de las mismas en la fuente (*in-source dissociation*)⁶. En la figura 1 se muestra un esquema general del proceso ESI⁷.

⁶ Konermann L, Ahadi E, Rodriguez AD, Vahidi S, *Unraveling the mechanism of electrospray ionization*, Anal Chem. 85 (2013) 2-9, <https://doi.org/10.1021/ac302789c>

⁷ Banerjee S, Mazumdar S, *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte*, Int J Anal Chem. 2012 (2012) 282574, <https://doi.org/10.1155/2012/282574>

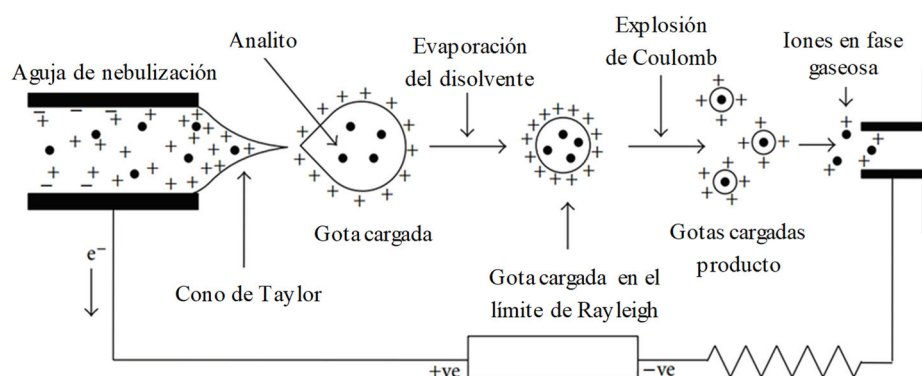


Figura 1. Esquema general del proceso ESI ⁷

El mecanismo por el que se produce la nebulización y la ionización en el electrospray está en continua investigación. Para explicar los fenómenos que tienen lugar en la formación del electrospray existen dos modelos en constante controversia: el modelo de carga residuales de Dole⁸ y el modelo de evaporación de iones de Iribarne y Thomson⁹. En ambos modelos el primer paso consiste en la nebulización del líquido para la generación de la nube de gotas cargadas eléctricamente. Para ello se aplica una elevada diferencia de potencial (2–6 kV) entre el extremo de la aguja de nebulización (por donde fluye la muestra líquida) y el contraelectrodo situado en la entrada del analizador. La solución líquida que contiene los analitos se distorsiona a la salida de la aguja de nebulización, debido a la acción del campo eléctrico impuesto, y forma los que conoce como el “cono de Taylor” emitiéndose así la nube de gotas cargadas. Este proceso suele estar asistido por un flujo de gas coaxial, normalmente de nitrógeno, que mejora la nebulización y la posterior evaporación de las gotas. A continuación, las gotas cargadas disminuyen su tamaño debido a la evaporación, con el consecuente aumento de carga eléctrica en la superficie de la gota, dando lugar a la

⁸ Dole M, Mack LL, Hines RL, Chemistry DO, Mobley RC, Ferguson LD, et al. *Molecular beams of macroions*, J Chem Phys. 49 (1968) 2240-9, <https://doi.org/10.1063/1.1670391>

⁹ Iribarne J V., Thomson BA. *On the evaporation of small ions from charged droplets*, J Chem Phys. 64 (1976) 2287-94, <https://doi.org/10.1063/1.432536>

ionización^{6,10}. En los fenómenos que ocurren en las últimas etapas del ciclo de vida de las gotas cargadas es donde difieren los dos modelos. En la figura 2 se muestra la generación de los iones en fase gaseosa según los dos modelos propuestos.

- En el modelo de evaporación (figura 2.A), la evaporación preferencial del disolvente de la gota conduce a densidades de carga crecientes que causan inestabilidad de Rayleigh y fisión de la gota (explosión de Coulomb), generando así gotas más pequeñas con proporciones de carga-masa más altas que sus precursores. En este modelo, se propone que la evaporación de iones tiene lugar cuando las gotitas adquieren un campo eléctrico lo suficientemente grande como para elevar los iones a la fase gaseosa¹⁰.
- En el modelo de cargas residuales (figura 2.B), se propone que la fisión de las gotas causada por la inestabilidad de Rayleigh (explosión de Coulomb) se repite secuencialmente hasta que las gotas contienen solo una molécula de analito, que se convierte en un ion en fase gaseosa tras la evaporación de todas las moléculas de disolvente¹⁰.

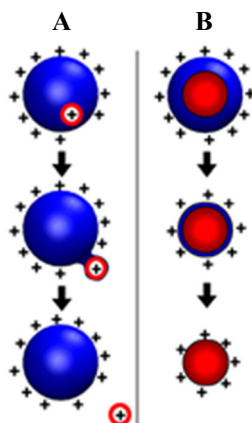


Figura 2. A) modelo de Ibarne y Thomson y B) modelo de Dole⁶

¹⁰ Wang G, Cole RB. *Mechanistic Interpretation of the Dependence of Charge State Distributions on Analyte Concentrations in Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, Anal Chem. 67 (1995) 2892-900, <https://doi.org/10.1021/ac00113a025>

Actualmente, ambos modelos son aceptados dependiendo de los analitos. En el caso de compuestos de alto peso molecular, como las proteínas, el modelo de Dole es considerado adecuado. En cambio, para compuestos de bajo peso molecular el modelo más aceptado es el de evaporación de Iribarne y Thomson^{6,7}. En la práctica, el proceso de ionización puede tener lugar por mecanismos más complejos, debido a las reacciones ión-molécula que pueden ocurrir en fase gaseosa.

En la figura 1 se muestra esquemáticamente el proceso de ionización ESI en la configuración donde la aguja de nebulización está alineada con el orificio de entrada del analizador. Actualmente, lo que se utiliza es la configuración *Z-spray*, en la que la aguja de nebulización está situada en la dirección ortogonal al orificio de entrada del analizador. Con esta configuración se reduce la entrada de componentes no ionizables y poco volátiles de la matriz.

Por último, respecto al transporte de los iones desde la fuente de ionización (presión atmosférica) hasta el analizador (alto vacío), este es realizado a través de un cono de muestreo o de un capilar. El capilar puede ser calentado a alta temperatura dando lugar a la desolvatación completa de los iones que pasan a través de él⁷.

2.2. Analizador de triple cuadrupolo (QqQ)

El primer dispositivo de cuadrupolo triple utilizado como analizador de masas se desarrolló en la Universidad de Michigan por Enke y Yost a finales de los años 70¹¹. Este sistema está constituido por tres cuadrupolos en serie. El primer y tercer cuadrupolo actúan como analizadores de masas (MS1 y MS2) y pueden combinar corriente continua y radiofrecuencia, mientras que el cuadrupolo intermedio actúa como celda de colisión y solo trabaja con radiofrecuencias¹². Aunque se continúa utilizando el término de triple cuadrupolo (QqQ), la celda colisión a menudo es un hexapolo u octapolo, ya que estos mejoran el confinamiento y transporte de los iones. Todos los dispositivos que conforman el equipo se encuentran en alto vacío.

La principal característica de este analizador es la posibilidad de llevar a cabo espectrometría de masas en tándem (MS/MS) que consiste en la realización de análisis de masas consecutivos entre los cuales se intercala una etapa de fragmentación. En la figura 3 se muestra esquemáticamente un proceso general de MS/MS. Las fuentes de ionización a presión atmosférica, como ESI, son fuentes blandas, lo que equivale a que para la gran mayoría de los analitos se genera un único ion, correspondiente al ion quasimolecular ($[M+H]^+$ o $[M-H]^+$) o aductos como $[M+Na]^+$. Al no haber fragmentación, se obtiene información útil sobre la masa del compuesto, pero existe una carencia de información estructural para la correcta identificación del analito, es decir, para poder asegurar que la señal obtenida corresponde a un cierto analito y no a otro compuesto isobárico que podría contener la muestra analizada. Para obtener dicha información y aumentar la especificidad de las determinaciones cuantitativas se pueden utilizar

¹¹ R.A. Yost RA, Enke CG, *Triple Quadrupolo Mass Spectrometry for Direct Mixture Analysis And Structure Elucidation*, Anal Chem. 51 (1979) 1251-1264, <https://doi.org/10.1021/ac50048a002>

¹² De Hoffmann E, *Tandem mass spectrometry: A primer*, J Mass Spectrom. 31 (1996) 129-37, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(199602\)31:2<129::AID-JMS305>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(199602)31:2<129::AID-JMS305>3.0.CO;2-T)

con estas fuentes de ionización análisis MS/MS mediante la combinación de varios analizadores de masas.

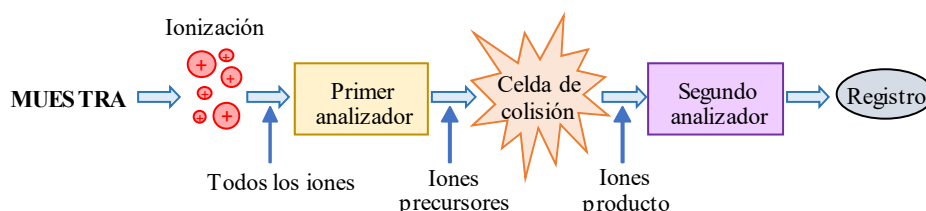


Figura 3. Esquema espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

En MS/MS se combinan dos analizadores de masas junto con una celda de colisión utilizada para la fragmentación. Todos los iones generados en la fuente de ionización se conducen al primer analizador de masas que puede realizar un barrido completo de iones o seleccionar los iones precursores deseados. Posteriormente, estos pasan a la celda de colisión donde son fragmentados, generando los iones producto (fragmentos de los iones precursores) que son posteriormente separados en el segundo analizador para ser, finalmente, detectados y registrados en el detector¹.

Para la fragmentación, a los iones que alcanzan la celda de colisión se les suministra energía por colisión con átomos o moléculas neutras, por absorción de radiación o por transferencia o captura de electrones. El método más habitual, denominado disociación inducida por colisión (*CID*, *Collision Inducted Dissociation*) o disociación activada por colisión (*CAD*, *Collision Activated Dissociation*), conlleva la colisión del ion con un átomo o molécula neutra en fase gaseosa (nitrógeno, argón, etc.), lo que provoca la ruptura del ion¹.

En cuanto a la instrumentación en MS/MS pueden distinguirse dos grandes grupos de equipos¹:

- Los equipos en los que se realizan las diferentes etapas con elementos individuales: el primer analizador, la celda de colisión y el segundo analizador son dispositivos instrumentales separados en el espacio.

- Los equipos en los que se realizan las diferentes etapas en un único dispositivo: el primer analizador, la celda de colisión y el segundo analizador son un único sistema que separa las etapas en el tiempo.

El analizador de triple cuadrupolo es el equipo de masas en tándem en el espacio más habitual y sencillo. En un QqQ, inicialmente, los iones generados en la fuente de ionización son dirigidos hasta el primer cuadrupolo mediante un sistema de óptica iónica. Este primer cuadrupolo es el primer analizador de masas (MS1) y selecciona uno o varios iones según su relación m/z , sirviendo como filtro, o hace un barrido de todos los iones procedentes de la fuente; estos iones, denominados precursores, son dirigidos a la celda de colisión (q) donde son fragmentados por colisión con un gas, y los iones producto así generados, pasan al tercer cuadrupolo que actúa como segundo analizador (MS2), que, como el primero, selecciona uno o varios iones o hace un barrido de todos ellos. En el cuadrupolo intermedio se lleva a cabo la fragmentación de los iones mediante disociación inducida por colisión (CID), para lo que se utiliza un gas inerte como helio, argón o nitrógeno, que actúa como gas de colisión y un determinado voltaje. En la figura 4 se muestra un esquema de un analizador QqQ.

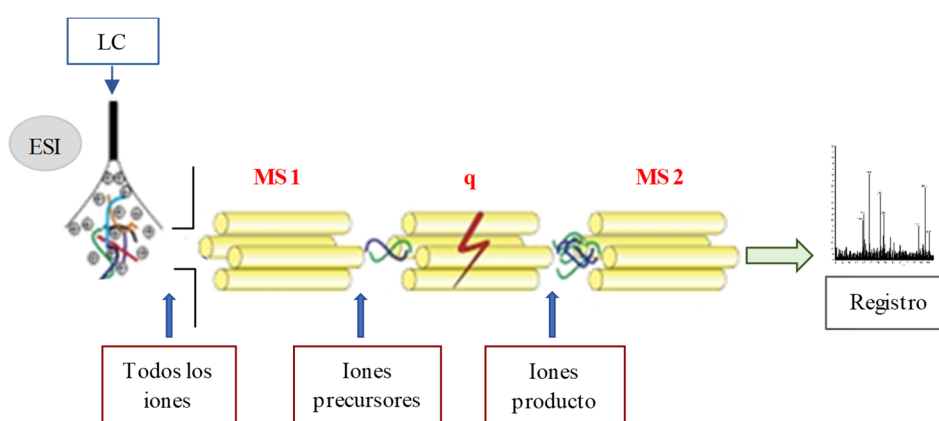


Figura 4. Esquema de un analizador de triple cuadrupolo (QqQ)

La adquisición de datos mediante un QqQ ofrece una gran versatilidad, ya que se puede modificar la modalidad con la que se trabaja con cada uno de los analizadores (MS1 y MS2). Permite realizar cualquiera de las modalidades de MS/MS existentes, todas ellas limitadas a una única etapa de fragmentación (MS²). Los diferentes modos de adquisición de MS/MS que permite este analizador son^{1,13} (figura 5):

- Barrido de iones producto (*product ion scan*): el primer analizador (MS1) selecciona uno o varios iones precursores, con determinada relación m/z y, tras la fragmentación en la celda de colisión, el segundo analizador registra todos los iones producto del ion o iones precursores seleccionados. Esta configuración se utiliza habitualmente para identificar las transiciones que presenta el analito (análisis de confirmación y cuantificación).

- Barrido de iones precursores (*precursor ion scan*): en este modo adquisición, el primer analizador hace un barrido de todos los iones precursores en un intervalo de relaciones m/z, mientras que ahora es el segundo analizador el que permanece constante seleccionando un solo ion producto con una determinada relación m/z.

- Barrido de pérdidas de moléculas neutras (*neutral loss scan*): tanto el primer analizador como el segundo realizan un barrido de todas las masas, pero en este caso sólo se registran las señales que corresponden a pérdidas de masas predeterminadas entre el primer y el segundo analizador. Esta modalidad se utiliza para la identificación selectiva de compuestos estructuralmente relacionados.

¹³ Grebe SK, Singh RJ, *LC-MS/MS in the Clinical Laboratory - Where to From Here?*, Clin Biochem Rev. 32 (2011) 5-31, PMID: 21451775 , PMCID: PMC3052391

- Seguimiento de reacción múltiple (*MRM, Multiple Reaction Monitoring* o *SRM, Selected Reaction Monitoring*): ambos términos, MRM y SRM, se emplean para denominar la misma modalidad de trabajo. En este caso, tanto el primer como el segundo analizador seleccionan un predeterminado par de iones precursor y producto (transición). De esta forma se consigue un análisis muy selectivo que permite incrementar la sensibilidad.

Aunque en bibliografía se pueden encontrar los dos términos, MRM y SRM, la IUPAC recomienda utilizar SRM para la medida de un ion producto procedentes de un ion precursor. En la práctica, el término MRM se emplea cuando se mide más de una transición (ion precursor \rightarrow ion producto) en un único análisis.

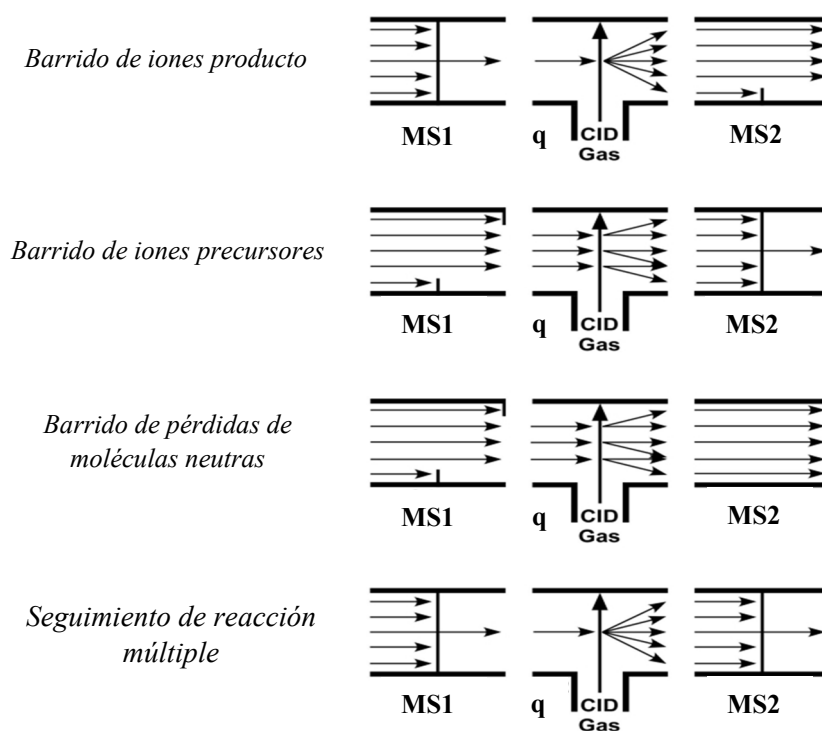


Figura 5. Modos de adquisición de datos de MS/MS en un analizador de QqQ¹³

2.3. Analizador de masas Orbitrap

El analizador de masas Orbitrap es un analizador de alta resolución. Algunos de estos analizadores pueden llegar a un poder de resolución máximo de 1000000 FWHM a m/z 200 y una exactitud de masa inferior a 1 ppm¹⁴.

El analizador de masas Orbitrap fue desarrollado por Makarov¹⁵ en el año 2000 como una variación de las trampas iónicas ya existentes. El diseño de Makarov y col^{16,17} consta de tres electrodos: dos electrodos exteriores que están enfrentados formando una especie de barril y un electrodo central con forma de huso. Los iones son inyectados tangencialmente, a través de una ranura existente en uno de los electrodos externos, en el volumen que queda entre los electrodos externos y el electrodo interno que constituyen el Orbitrap. A continuación, debido a la generación de un campo eléctrico entre los electrodos, y sin necesidad de un campo magnético, los iones quedan atrapados por la atracción electrostática del electrodo interno, compensada por la fuerza centrífuga. Al mismo tiempo, el campo eléctrico axial causado por la forma cónica especial de los electrodos externos empuja los iones hacia la parte más ancha del dispositivo iniciándose así oscilaciones axiales armónicas de los mismos. De esta forma, los iones adquieren una trayectoria de hélice en el eje z que solo depende de su relación m/z y es independiente de su velocidad. Los iones con diferente m/z oscilan a diferentes frecuencias. Para la detección, los electrodos externos actúan como placas receptoras de la corriente imagen de las oscilaciones axiales de los diferentes iones. Para obtener los espectros de masas, a esas señales obtenidas se le aplica

¹⁴ Kaufmann A, *The current role of high-resolution mass spectrometry in food analysis*, Anal Bioanal Chem. 403 (2012) 1233-49, <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5629-4>

¹⁵ Makarov A, *Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis*, Anal Chem. 72 (2000) 1156-62, <https://doi.org/10.1021/ac991131p>

¹⁶ Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Cooks RG, *The Orbitrap: A new mass spectrometer*, J Mass Spectrom. 40 (2005) 430-43, <https://doi.org/10.1002/jms.856>

¹⁷ Zubarev RA, Makarov A, *Orbitrap mass spectrometry*, Anal Chem. 85 (2013) 5288-96, <https://doi.org/10.1021/ac4001223>

la transformada de Fourier. En la figura 6 se muestra un esquema general del interior del Orbitrap.

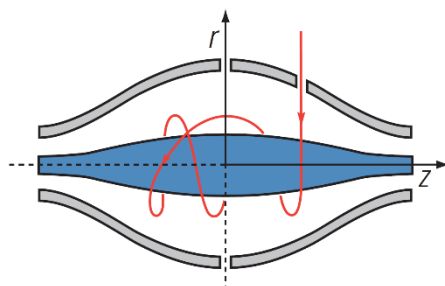


Figura 6. Esquema general interior Orbitrap¹⁸

En esta Tesis Doctoral el analizador de masas Orbitrap utilizado es el modelo Q Exactive Focus de la casa comercial Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) cuyo esquema aparece en la figura 7.

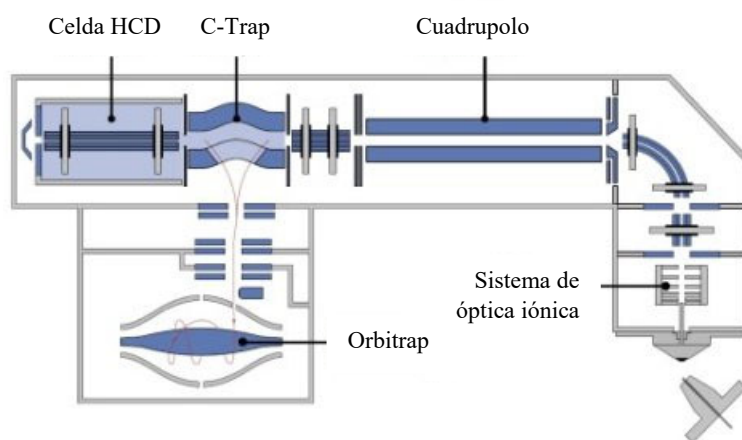


Figura 7. Esquema del equipo Q Exactive Focus¹⁸

El trayecto que siguen los iones en este equipo es el siguiente¹⁸. Inicialmente, un capilar de transferencia dirige los iones generados en la fuente de ionización hacia el interior del equipo. Posteriormente, un sistema de óptica

¹⁸ *Operating Manual Exactive Series*, Thermo Fisher Scientific, Revision A, April 2017

iónica dirige los iones hasta un cuadrupolo. Este cuadrupolo actúa como un dispositivo de transmisión de iones con la posibilidad de filtrar los iones transmitidos de acuerdo con su relación m/z (masa nominal). Tras este cuadrupolo, un conjunto de lentes enfoca los iones hacia un multipolo de transferencia. Este multipolo de transferencia actúa como dispositivo de transmisión hacia una trampa lineal curva, denominada comúnmente C-Trap. En la C-Trap, los iones pierden su energía cinética mediante colisiones con un gas inerte y se acumulan en la misma. A continuación, se lleva a cabo la extracción de los iones en paquetes pulsados de la C-Trap hacia el analizador Orbitrap donde oscilan a diferentes frecuencias según su relación m/z y se lleva a cabo su detección.

Tras la C-Trap, se sitúa una celda de colisión denominada celda HCD (*HCD, Higher Energy Collisional Dissociation*). En esta celda, mediante un proceso de disociación inducida por colisión de alta energía empleando un gas de colisión como el nitrógeno, se realizan fragmentaciones de los diferentes iones, lo que permite realizar espectrometría de masas en tándem con CID. Tras la fragmentación en la celda HCD, los iones producto generados se transfieren nuevamente a la C-Trap, desde donde se inyectan al analizador de masas Orbitrap para su detección.

Los modos de adquisición que permite este equipo se describen a continuación¹⁹. En aquellos casos en los que se incluye una figura explicativa, el eje x representa la trayectoria de los iones en los distintos elementos del equipo y el eje y representa el tiempo al cual tiene lugar los distintos eventos. En el caso del cuadrupolo, el área sombreada corresponde al intervalo o relaciones m/z seleccionadas que se utiliza en cada modo de adquisición. Todo lo que corresponde a procesos donde los iones no han sido fragmentados se representa

¹⁹ Kaufmann A, *Selecting the best Q Exactive Orbitrap mass spectrometer scan mode for your application*, Thermo Fisher Scientific, 2018

en color azul, mientras que aquello que corresponde a iones producto se ha representado en color rojo¹⁹.

- Barrido de MS completo (Full MS): En este modo de adquisición se lleva a cabo un barrido de todos los iones generados en la fuente de ionización. Los iones que llegan a la C-Trap son inyectados directamente en el analizador Orbitrap, sin selección o filtrado de iones en el cuadrupolo ni fragmentación en la celda HCD. Se puede establecer un intervalo de relaciones m/z definido, en el cual se puede extraer cualquier valor de m/z deseado después de que se haya completado la adquisición de datos. En la figura 8 se muestra un esquema de este modo adquisición.

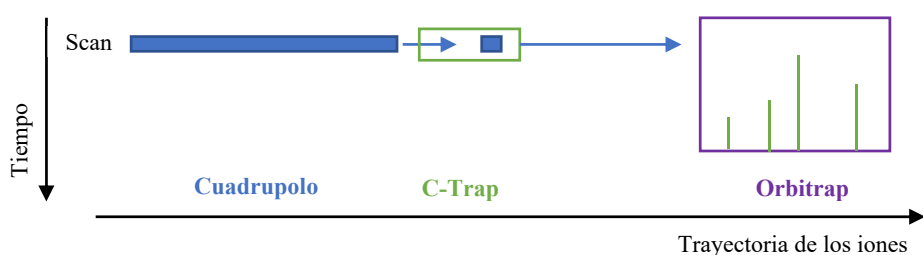


Figura 8. Modo de adquisición *Full MS*

- Barrido de MS completo seguido de un análisis de fragmentación de todos los iones (Full MS/ All Ion Fragmentation): el instrumento realiza continuamente dos barridos de MS completos diferentes. En el primer barrido, los iones se inyectan directamente desde la C-Trap al Orbitrap. En el segundo barrido, los iones se transfieren en conjunto a la celda HCD, donde fragmentan. Los iones producto resultantes, así como los restos de los iones precursores, se devuelven a la C-Trap y se inyectan posteriormente en el Orbitrap. Con el primer barrido se observan los iones precursores, mientras que con el segundo barrido se observan los iones producto resultantes de la fragmentación de todos los iones precursores que entran en la celda HCD.

- Seguimiento dirigido de iones seleccionados (*Targeted-SIM*): en este modo de adquisición se realiza el seguimiento selectivo de determinados iones característicos de los compuestos presentes en la muestra. En el cuadrupolo se seleccionan iones específicos de los compuestos de interés. Los iones seleccionados pasan directamente de la C-Trap al Orbitrap sin fragmentación en la celda HCD.

- Seguimiento de reacción en paralelo (*PRM, Parallel Reaction Monitoring*): adquiere un barrido de iones producto basado en una lista de inclusión especificada previamente por el usuario donde se incluyen los iones precursores de interés. En este modo de adquisición, en un primer momento, los iones precursores de interés son seleccionados en el cuadrupolo. Posteriormente, estos iones son fragmentados en la celda HCD y los iones producto resultantes son transferidos a la C-Trap, desde donde son inyectados en el Orbitrap. El modo PRM corresponde a un barrido de iones producto en un QqQ. Sin embargo, este modo de adquisición produce una selectividad significativamente más alta debido a la selección de precursores, combinada con el barrido de alta resolución de los iones producto. En la figura 9 se muestra un esquema de este modo de adquisición.

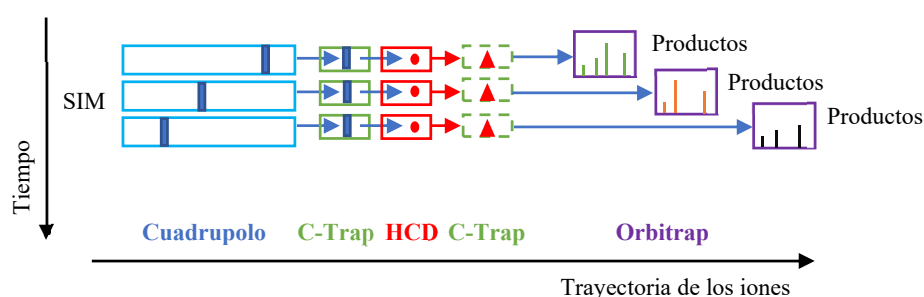


Figura 9. Modo de adquisición *PRM*

- Barrido de MS completo seguido de un conjunto de barridos dependientes de datos (dd) con una energía de fragmentación determinada (*Full MS/dd-MS²*): el equipo realiza un barrido completo de todas las relaciones m/z en un intervalo establecido (*Full Scan*). A continuación, selecciona los iones con las relaciones m/z más intensas (Top N, análisis no dirigido) según unos parámetros establecidos y los transfiere a la celda HCD donde fragmentan a diferentes energías de colisión (*ddMS²*). Posteriormente, los iones productos obtenidos se devuelven a la C-Trap, desde donde se inyectan al Orbitrap. Se pueden establecer listas de inclusión donde se incluyan determinados iones según su m/z (análisis dirigido) y si estos iones presentan una adecuada intensidad, según los parámetros establecidos por el equipo, son incluidos en los análisis. Por otra parte, también se pueden establecer listas de exclusión donde se incluyan los iones que se desean excluir de los análisis. En la figura 10 se muestra un esquema de este modo adquisición.

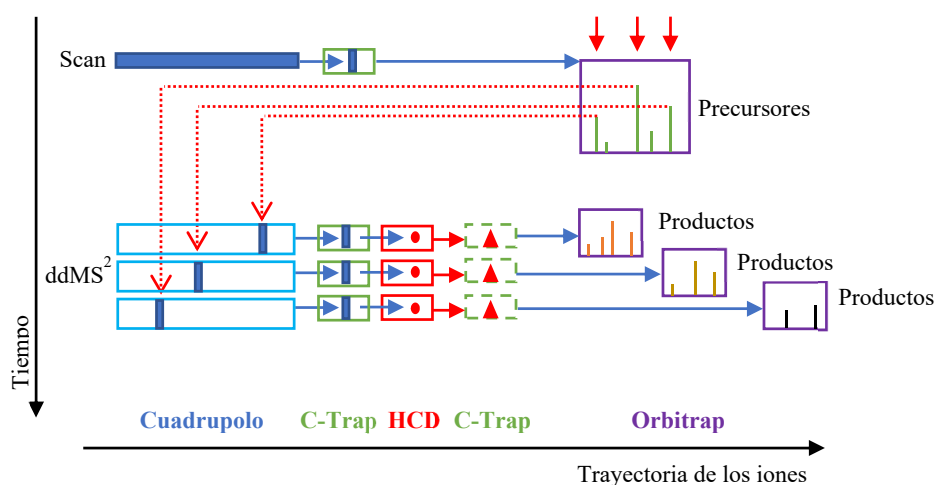


Figura 10. Modo de adquisición *Full MS/dd-MS²*

- Adquisición independiente de datos (DIA, *Data-Independent Acquisition*): en este modo adquisición se establece un determinado intervalo de relaciones m/z objeto de estudio, el cual es dividido en intervalos más estrechos. Para cada rango

estrecho seleccionado en el cuadrupolo, los iones presentes en los mismos se dirigen a la celda HCD donde fragmentan. Los fragmentos obtenidos de los iones de cada intervalo se introducen en el Orbitrap. Comparado con el modo de adquisición PRM, los espectros de iones fragmento obtenidos pertenecen a un rango de masa más amplio definido por el usuario en lugar de precursores de masa unitaria aislados.

3.

**MÉTODOS RÁPIDOS DE ANÁLISIS BASADOS
EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

En los últimos años se ha incrementado notablemente el interés por el desarrollo de estrategias rápidas de análisis capaces de abordar simultáneamente la determinación específica de un elevado número de compuestos en muestras complejas^{1,2}. La finalidad de este tipo de metodologías no es únicamente la reducción efectiva del tiempo de análisis, lo que incide positivamente en el número de muestras que es posible analizar por unidad de tiempo, sino que, además, deben permitir la determinación cuantitativa fiable de los compuestos de interés. Debido a su elevada sensibilidad, selectividad y capacidad de identificación, la espectrometría de masas es la técnica de análisis más adecuada para el desarrollo de este tipo de metodologías dirigidas a abordar análisis altamente específicos de un elevado número de compuestos en matrices complejas.

En los laboratorios clínicos, donde se llevan a cabo análisis de rutina de una gran cantidad de muestras, tienen un gran interés este tipo de metodologías. La detección y cuantificación de ciertos compuestos endógenos en una muestra biológica, como orina o saliva, ha adquirido un gran interés por su potencial utilidad como método no invasivo de diagnóstico precoz, para el seguimiento de determinadas patologías, o, en general, para el conocimiento y el control de la salud humana.

En esta Tesis Doctoral se aborda el desarrollo y la validación de métodos rápidos de análisis basados en MS con fuente de ionización por electrospray. Las metodologías aquí estudiadas se basan en dos tipos de estrategias: (i) desarrollo de métodos de análisis en los cuales no hay separación previa de los analitos antes

¹ Elpa DP, Prabhu GRD, Wu SP, Tay KS, Urban PL, *Automation of mass spectrometric detection of analytes and related workflows: A review*, *Talanta*. 208 (2019) 120304, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120304>

² Nanita SC, Kaldon LG. *Emerging flow injection mass spectrometry methods for high-throughput quantitative analysis*, *Anal Bioanal Chem*. 408 (2016) 23-33, <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9193-1>

de su introducción en el equipo de MS, y (ii) configuraciones basadas en la incorporación de una precolumna de protección previa al análisis mediante MS.

Con objeto de confirmar los resultados obtenidos, se han desarrollado métodos de separación basados en cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) como estrategias de confirmación.

3.1. Estrategias no separativas

Las estrategias no separativas, en las cuales la muestra se introduce directamente en el espectrómetro de masas son una opción muy atractiva para el desarrollo de métodos rápidos de análisis. El uso de este tipo de procedimientos permite acortar notablemente los tiempos de análisis comparados con aquellos que implican una etapa de separación, cromatográfica o electroforética, previa al análisis por MS. De esta forma es posible realizar, en corto tiempo, el análisis de un número elevado de muestras, lo que es un aspecto importante en laboratorios de rutina^{3,4}.

Para la determinación de compuestos volátiles, se ha propuesto la espectrometría de masas como técnica base para el desarrollo de métodos no separativos aplicados a un gran número de analitos en distintos campos de interés^{3,5,6}. Mayoritariamente, estas estrategias para compuestos volátiles se basan

³ Pérez Pavón JL, Del Nogal Sánchez M, Pinto CG, Fernández Laespada ME, Cordero BM, Peña AG, *Strategies for qualitative and quantitative analyses with mass spectrometry-based electronic noses*, TrAC - Trends Anal Chem.25 (2006) 257-66, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2005.09.003>

⁴ González-Domínguez R, Sayago A, Fernández-Recamales Á, *Direct infusion mass spectrometry for metabolomic phenotyping of diseases*, Bioanalysis. 9 (2017) 131-48, <https://doi.org/10.4155/bio-2016-0202>

⁵ Casas-Ferreira AM, Del Nogal-Sánchez M, Pérez-Pavón JL, Moreno-Cordero B, *Non-separative mass spectrometry methods for non-invasive medical diagnostics based on volatile organic compounds: A review*, Anal Chim Acta. 1045 (2019) 10-22, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.07.005>

⁶ Sgorbini B, Bicchi C, Cagliero C, Cordero C, Liberto E, Rubiolo P. *Herbs and spices: Characterization and quantitation of biologically-active markers for routine quality control by*

en la utilización de ionización electrónica o de ionización química, aunque en menor medida también se han propuesto otras alternativas basadas en ionización por electrospray. En el primero de los casos, hay que resaltar la utilización de “narices electrónicas” basadas en el acoplamiento directo de un generador de espacio de cabeza (*HS, Headspace*) a un espectrómetro de masas^{7,8,9}. También se han descrito otras alternativas basadas en la utilización de membranas para la introducción directa en la fuente de ionización del espectrómetro de masas (*MIMS, Membrane Introduction Mass Spectrometry*)^{10,11}, en el uso de un tubo de selección de iones con flujo y detección por espectrometría de masas (*SIFT-MS, Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry*)^{12,13} o en una reacción de transferencia de protones acoplada a espectrometría de masas (*PTR-MS,*

multiple headspace solid-phase microextraction combined with separative or non-separative analysis, J Chromatogr A.1376 (2015) 9-17, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.12.007>

⁷ García Ramos ÁG, Pérez Antón A, del Nogal Sánchez M, Pérez Pavón JL, Moreno Cordero BM, *Urinary volatile fingerprint based on mass spectrometry for the discrimination of patients with lung cancer and controls, Talanta.174 (2017) 158-64, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.003>*

⁸ Pérez Antón A, García Ramos Á, del Nogal Sánchez M, Pérez Pavón JL, Moreno Cordero B, Crisolino Pozas Á, *Headspace-programmed temperature vaporization-mass spectrometry for the rapid determination of possible volatile biomarkers of lung cancer in urine, Anal Bioanal Chem. 408 (2016) 5239-46, <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9618-5>*

⁹ Del Nogal Sánchez M, Callejo Gómez PÁ, Pérez Pavón JL, Moreno Cordero B, Crisolino Pozas ÁP, Sánchez Rodríguez Á, *Sensitivity enhancement in the determination of volatile biomarkers in saliva using a mass spectrometry-based electronic nose with a programmed temperature vaporizer, Anal Chem. 86 (2014) 7890-8, <https://doi.org/10.1021/ac501917a>*

¹⁰ Lauritsen FR, Nielsen K, *Fast and direct recognition of the active ingredients in tablets using hot cell membrane inlet mass spectrometry, Int J Mass Spectrom. 295 (2010) 119-23, <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2010.03.010>*

¹¹ Giannoukos S, Brkić B, Taylor S, France N, *Membrane inlet mass spectrometry for Homeland security and forensic applications, J Am Soc Mass Spectrom. 26 (2015) 231-9, <https://doi.org/10.1007/s13361-014-1032-7>*

¹² Batty CA, Cauchi M, Lourenço C, Hunter JO, Turner C, *Use of the analysis of the volatile faecal metabolome in screening for colorectal cancer, PLoS ONE.10 (2015) 1-14, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130301>*

¹³ Turner C, *Techniques and issues in breath and clinical sample headspace analysis for disease diagnosis, Bioanalysis. 8 (2016) 677–90, <https://doi.org/10.4155/bio.16.22>*

Proton Transfer Reaction Mass Spectrometry)^{14,15}. Con respecto a metodologías basadas en la introducción directa en una fuente de ionización por electrospray, se ha propuesto el uso de electrospray secundario (*SESI-MS, Secondary Electrospray Ionization Mass Spectrometry*)¹⁶ y de movilidad iónica acoplada a espectrometría de masas (*IMMS, Ion Mobility Mass Spectrometry*)¹⁷.

Por otra parte, para la determinación de compuestos de baja volatilidad o no volátiles, la inyección directa de la muestra líquida en la fuente de ionización por electrospray del equipo de espectrometría de masas (*DI-MS, Direct Infusion Mass Spectrometry*) ha sido propuesta para lograr análisis rápidos y de alto rendimiento¹⁸. También, una opción interesante es el análisis por inyección en flujo acoplado a espectrometría de masas (*FIA-MS, Flow Injection Analysis Mass Spectrometry*) en la que un flujo continuo de fase portadora conduce la muestra líquida desde el inyector a la fuente de ionización^{2,19,20}. En esta metodología se

¹⁴ Fernández del Río R, O'Hara ME, Holt A, Pemberton P, Shah T, Whitehouse T, Mayhew, *Volatile biomarkers in breath associated with liver cirrhosis-Comparisons of Pre- and Post-liver transplant breath samples*, EBioMedicine. 2 (2015) 1243-50, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.07.027>

¹⁵ Zhan X, Duan J, Duan Y, *Recent developments of proton-transfer reaction mass spectrometry (PTR-MS) and its applications in medical research*, Mass Spectrom Rev. 32 (2013) 143-65, <https://doi.org/10.1002/mas.21357>

¹⁶ Martínez-Lozano P, De La Mora JF, *Direct analysis of fatty acid vapors in breath by electrospray ionization and atmospheric pressure ionization-mass spectrometry*, Anal Chem. 80 (2008) 8210-5, <https://doi.org/10.1021/ac801185e>

¹⁷ Reynolds JC, Blackburn GJ, Guallar-Hoyas C, Moll VH, Bocos-Bintintan V, Kaur-Atwal G, et al., *Detection of volatile organic compounds in breath using thermal desorption electrospray ionization-ion mobility-mass spectrometry*, Anal Chem. 82 (2010) 2139-44, <https://doi.org/10.1021/ac9027593>

¹⁸ González-Domínguez R, Castilla-Quintero R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL, *Development of a metabolomic approach based on urine samples and direct infusion mass spectrometry*. Anal Biochem. 465 (2014) 20-7, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.07.016>

¹⁹ González-Domínguez R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL, *Application of a novel metabolomic approach based on atmospheric pressure photoionization mass spectrometry using flow injection analysis for the study of Alzheimer's disease*, Talanta.131 (2015) 480-9, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.075>

²⁰ Casas-Ferreira AM, del Nogal-Sánchez M del, Rodríguez-Gonzalo E, Moreno-Cordero B, Pérez-Pavón JL, *Determination of leucine and isoleucine/allo-isoleucine by electrospray ionization-tandem mass spectrometry and partial least square regression: Application to saliva samples*, Talanta. 21 (2020) 120811, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120811>

puede emplear el sistema de inyección automático de un cromatógrafo de líquidos (en el cual se elimina la columna cromatográfica) conectando un tubo de poliéter éter cetonas (*PEEK, polyether ether ketones*) directamente del inyector a la fuente de ionización del espectrómetro de masas, lo que permite la inyección automatizada de las muestras. Las ventajas de FIA-MS, en comparación con LC-MS, son la elevada capacidad de análisis y la simplicidad del método, así como la posibilidad de utilizar disolventes no compatibles con las columnas cromatográficas, siempre que sí lo sean con MS. Sin embargo, FIA-MS sacrifica algunas de las ventajas proporcionadas por la separación cromatográfica de los componentes de la muestra, como la separación y aislamiento de los analitos y la eliminación/disminución de efectos de matriz². Por lo tanto, las respuestas de la señal del espectrómetro de masas obtenidas por FIA-MS a menudo fluctúan mucho debido a interferencias de co-elución, lo que puede afectar en gran medida la exactitud del análisis. Por lo tanto, FIA-MS se admite cada vez más como una tecnología adecuada para aplicaciones cualitativas y semicuantitativas que requieren una detección rápida y fiable. Sin embargo, su aplicación con fines cuantitativos es todavía limitada.

Para lograr una cuantificación precisa en matrices complejas basada en FIA-MS se han propuesto diferentes alternativas, como el uso de patrones internos marcados isotópicamente o el desarrollo de etapas eficaces de tratamiento de muestra que permitan el aumento de la selectividad y sensibilidad del análisis, así como la reducción o incluso eliminación de los efectos de matriz. Dentro de estas estrategias se ha propuesto la simple dilución e inyección de la muestra ("*dilute-and-shoot*"), la extracción líquido-líquido (*LLE, Liquid-Liquid Extraction*) o la extracción líquido-líquido asistida por sales (*SALLE, Salting-out Assisted Liquid-Liquid Extraction*), entre otras².

Otra alternativa para la introducción de muestras líquidas en la fuente ESI consiste en el desarrollo de etapas eficaces de extracción-preconcentración que permitan su acoplamiento directo al espectrómetro de masas, como, por ejemplo,

la microextracción en fase sólida acoplada a espectrometría de masas (*SPME-MS, Solid Phase Microextraction-Mass Spectrometry*)²¹.

Hay otro aspecto de interés a la hora de abordar el desarrollo de metodologías rápidas y es su potencial utilidad en el desarrollo de estrategias combinadas de cribado-confirmación. En este sentido, los métodos rápidos no separativos podrían ser utilizados para un cribado rápido inicial de muestras, mientras que metodologías con separación, que implican mayor tiempo de análisis, serían utilizadas principalmente con fines de confirmación, únicamente en aquellas muestras que dieran un resultado positivo en el cribado inicial. Habitualmente, en esta modalidad de trabajo, los métodos empleados para la etapa de cribado y los utilizados en la etapa de confirmación emplean técnicas analíticas muy diferentes^{22,23}. Una alternativa muy interesante es la que se basa en el desarrollo de metodologías en las cuales la etapa de cribado, empleando estrategias no separativas, y la etapa de confirmación, utilizando estrategias separativas, se realizan con la misma configuración instrumental, basada en cromatografía de gases-espectrometría de masas^{7,8,9,24}. Para la etapa de cribado, se elimina la capacidad separativa de la columna cromatográfica, trabajando a una elevada temperatura, de forma que los analitos son transferidos al espectrómetro de masas sin separación mientras que para la etapa de

²¹ Gómez-Ríos GA, Reyes-Garcés N, Bojko B, Pawliszyn J. *Biocompatible Solid-Phase Microextraction Nanoelectrospray Ionization: An Unexploited Tool in Bioanalysis*, Anal Chem. 88 (2016) 1259-65, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03668>

²² Van Den Hauwe O, Schneider M, Sahin A, Van Peteghem CH, Naegeli H, *Immunochemical screening and liquid chromatographic-tandem mass spectrometric confirmation of drug residues in edible tissues of calves injected with a therapeutic dose of the synthetic glucocorticoids dexamethasone and flumethasone*, J Agric Food Chem. 51 (2003) 326-30, <https://doi.org/10.1021/jf020533m>

²³ Rojano-Delgado AM, Priego-Capote F, Luque De Castro MD, De Prado R, *Screening and confirmatory analysis of glyoxylate: A biomarker of plants resistance against herbicides*, Talanta. 82 (2010) 1757-62, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.07.068>

²⁴ Casas Ferreira AM, Moreno Cordero B, Pérez Pavón JL. *Use of microextraction by packed sorbent directly coupled to an electron ionization single quadrupole mass spectrometer as an alternative for non-separative determinations*, J. Chromatogr. B 1043 (2017) 74-80, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.07.052>

confirmación se emplea un método separativo aplicando una rampa de temperatura adecuada en la columna cromatográfica para la separación de los compuestos de interés^{7,8,9,24}.

3.2. Estrategias basadas en el uso de precolumnas de protección

Como se indica anteriormente, el uso de configuraciones no separativas basadas en la introducción directa de la muestra en el espectrómetro de masas presenta varios inconvenientes. Entre ellos cabe destacar los efectos de matriz debido a la ausencia de un paso previo de separación, la supresión iónica causada por la matriz de la muestra o la presencia de interferencias isobáricas que podrían dificultar la cuantificación de los analitos de interés si estos no presentan patrones de fragmentación específicos^{2,18,20}. Se han propuestos diferentes procedimientos para aliviar estos inconvenientes, como son el uso de diferentes técnicas de tratamiento de muestra¹⁸, la derivatización de los compuestos de interés²⁵ o el uso de equipamientos no convencionales²⁶.

²⁵ Rebolledo-Fernandez MM, Castiñeiras DE, Dolores Bóveda M, Luz Couce M, Cocho JA, Fraga JM. *Development of electrospray ionization tandem mass spectrometry methods for the study of a high number of urine markers of inborn errors of metabolism*, Rapid Commun Mass Spectrom, 26 (2012) 2131-44, <https://doi.org/10.1002/rcm.6325>

²⁶ Xu N, Zhu ZQ, Yang SP, Wang J, Gu HW, Zhou Z, Chen HW, *Direct detection of amino acids using extractive electrospray ionization tandem mass spectrometry*, Chin J Anal Chem.41 (2013) 523-8, [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(13\)60643-X](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(13)60643-X)

El uso de precolumnas de protección es una práctica habitual en Química Analítica para la protección de las columnas cromatográficas^{27,28,29}, como etapa de limpieza previa de las muestras^{30,31} o para la preconcentración de los analitos³². También se han desarrollado métodos donde la separación de los compuestos de interés se hace en un precolumna de protección que sustituye a la columna cromatográfica convencional, lo que reduce notablemente los tiempos de análisis^{32,33,34}. Se ha propuesto un método ultrarrápido de cromatografía líquida

²⁷ Pistos C, Stewart JT. *Direct injection HPLC method for the determination of selected benzodiazepines in plasma using a Hisep column*. J Pharm Biomed Anal.33 (2003) 1135-42, [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00426-6](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00426-6)

²⁸ Milanetti E, Carlucci G, Olimpieri PP, Palumbo P, Carlucci M, Ferrone V, *Correlation analysis based on the hydrophobic properties of non-steroidal anti-inflammatory drugs in solid-phase extraction (SPE) and reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) with photodiode array detection and their applications to bio*, J Chromatogr A. 1605 (2019) 360351, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.07.005>

²⁹ Malvar JL, Santos JL, Martín J, Aparicio I, Alonso E, *Simultaneous pressurized liquid extraction and clean-up for the determination of metabolites in complex environmental solid matrices*, Microchemical J. 152 (2020) 104370, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104370>

³⁰ Boppana VK, Miller-Stein C, Schaefer WH, *Direct plasma liquid chromatographic-tandem mass spectrometric analysis of granisetron and its 7-hydroxy metabolite utilizing internal surface reversed-phase guard columns and automated column switching devices*, J Chromatogr B. 678 (1996) 227-36, [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00480-7](https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00480-7)

³¹ Huang JZ, Lin S, Huang Z, Bolgar MS, *Enablement of the direct analysis of excipients in monoclonal antibody formulations through the incorporation of a wide pore C18 protein trap with hydrophilic interaction liquid chromatography*, J Chromatogr B. 1068-1069 (2017) 131-5, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.10.034>

³² Fagan P, Wijesundera C, *Liquid chromatographic analysis of milk phospholipids with on-line pre-concentration*, J Chromatogr A. 1054 (2004) 241-9, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.04.051>

³³ Chen K, Hsu I, Sun Y, *Determination of methylmercury and inorganic mercury by coupling short-column ion chromatographic separation, on-line photocatalyst-assisted vapor generation, and inductively coupled plasma mass spectrometry*, J Chromatogr A. 1216 (2009) 8933-8, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.10.061>

³⁴ Youngvises N, Chaida T, Khonyoung S, Kupphayanant N, Tiyapongpattana W, Itharat A, Jakmunee, *Greener liquid chromatography using a guard column with micellar mobile phase for separation of some pharmaceuticals and determination of parabens*, Talanta. 106 (2013) 350-9, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.12.040>

acoplada a MS, en el cual se utiliza una precolumna de protección como paso separativo para el análisis de fármacos terapéuticos en muestras de plasma³⁵.

En esta Tesis Doctoral, se han explorado ambas opciones en el desarrollo de métodos rápidos como alternativa a los métodos separativos para el análisis de compuestos biológicos de interés clínico. Primeramente, se aborda un procedimiento de cribado-confirmación basado en la introducción directa de una muestra líquida en un sistema FIA-MS. En segundo lugar, se estudian las posibilidades analíticas de la utilización de precolumnas de protección como etapa previa al espectrómetro de masas. La precolumna actúa como etapa de limpieza y como etapa de fraccionamiento de baja resolución, debido a que las señales aparecen agrupadas según similitud en las propiedades fisicoquímicas de los diferentes compuestos analizados.

³⁵ Couchman L, Fisher DS, Subramaniam K, Handley SA, Boughtflower RJ, Benton CM, Flanagan RJ, *Ultra-fast LC-MS/MS in therapeutic drug monitoring: Quantification of clozapine and norclozapine in human plasma*, Drug Test Anal. 10 (2018) 323-9, <https://doi.org/10.1002/dta.2223>

4.

COMPUESTOS BIOLÓGICOS DE INTERÉS
CLÍNICO

Los compuestos de interés clínico son aquellos cuya presencia en distintas muestras biológicas (sangre, saliva, orina, fluido cerebroespinal, heces, etc.) permite determinar el estado fisiológico y patológico de los distintos individuos. Esta Tesis se ha centrado en el desarrollo de metodologías rápidas para la determinación de este tipo de compuestos en matrices biológicas. En concreto, los compuestos biológicos de interés clínico evaluados han sido las poliaminas (PAs) y los aminoácidos (AAs).

4.1. Poliaminas

Las poliaminas (PAs) son un conjunto de compuestos químicos de bajo peso molecular y elevada polaridad que se encuentran de forma natural en el organismo. Su estructura consiste en cadenas de carbono alifáticas con varios grupos amino en diferentes posiciones (figura 1), lo que les permite interactuar con otras biomoléculas mediante diferentes tipos de enlaces. Los grupos amino normalmente están protonados al pH fisiológico, pudiendo establecer enlaces polares con diferentes aniones presentes en los organismos, como ADN, ARN, proteínas ácidas y fosfolípidos, entre otros^{1,2}. Todas estas posibilidades de interacción implican que las PAs participen en muchos procesos biológicos esenciales para la vida^{1,2,3,4}.

¹ Sánchez-Jiménez F, Medina MÁ, Villalobos-Rueda L, Urdiales JL, *Polyamines in mammalian pathophysiology*, Cell Mol Life Sci. 76 (2019) 3987-4008, <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03196-0>

² Park MH, Igarashi K, *Polyamines and their metabolites as diagnostic markers of human diseases*, Biomol Ther. 21 (2013) 1-9, <https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.097>

³ Casero RA, Murray Stewart T, Pegg AE, *Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities*, Nat Rev Cancer. 18 (2018) 681-95, <http://dx.doi.org/10.1038/s41568-018-0050-3>

⁴ Cervelli M, Pietropaoli S, Signore F, Amendola R, Mariottini P, *Polyamines metabolism and breast cancer: state of the art and perspectives*, Breast Cancer Res Treat. 148 (2014) 233-48, <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3156-7>

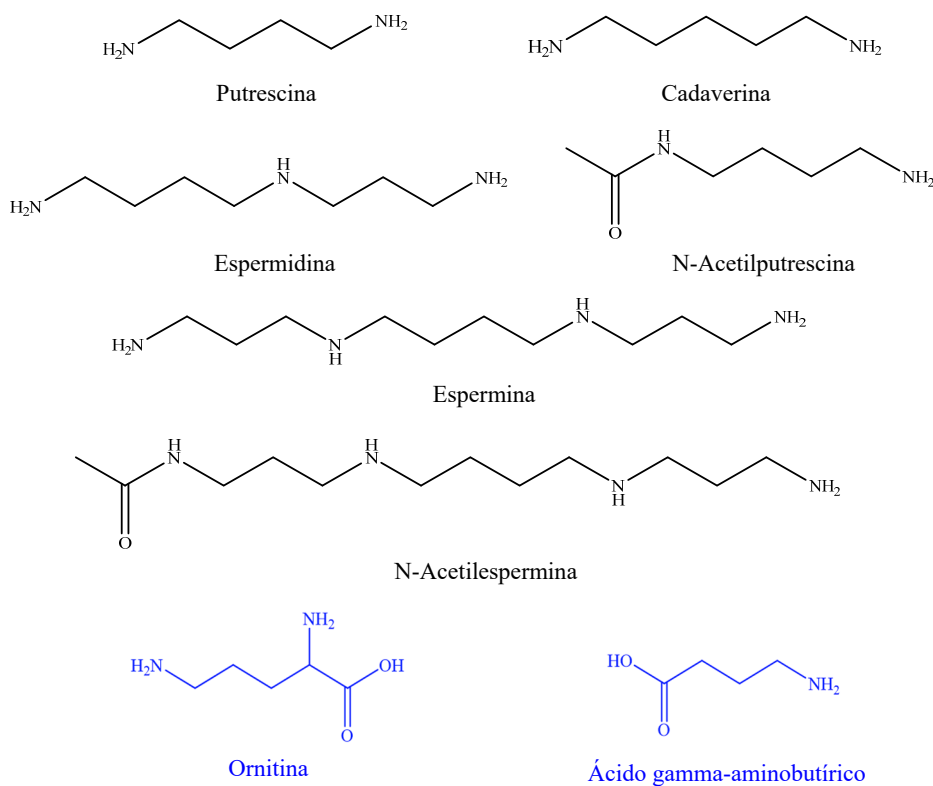


Figura 1. Estructura química de las poliaminas objeto de estudio, ornitina y ácido gamma-aminobutírico

Las poliaminas presentes en los organismos provienen de la síntesis endógena y de la alimentación⁵. Las células de mamíferos sintetizan principalmente putrescina, espermidina y espermina. La cantidad que procede de la alimentación es difícil de estimar debido a que estas sufren varios procesos de degradación en el estómago, intestino e hígado¹.

Estos compuestos se han relacionados con importantes procesos fisiológicos, como la proliferación y viabilidad celular, la nutrición y la

⁵ Hussain T, Tan B, Ren W, Rahu N, Dad R, Kalhoro DH, Yin Y, *Polyamines: therapeutic perspectives in oxidative stress and inflammatory diseases*, Amino Acids. 49 (2017) 1457-68, <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2447-9>

fertilidad^{1,3,5,6}. También han sido vinculadas con el sistema nervioso en el cual son abundantes, y se ha sugerido que pueden actuar como neurotransmisores⁷. En el sistema inmunológico, también se ha asociado a las PAs con funciones inmunoestimuladoras relevantes en la diferenciación, activación y reclutamiento de células inmunes⁸. Además, estos compuestos desempeñan un papel importante en la modulación de las reacciones inflamatorias^{2,5,9} y se han planteado diferentes mecanismos por los que pueden ejercer funciones antiinflamatorias^{1,5}.

Teniendo en cuenta la importancia de estos compuestos en todos estos procesos biológicos, la alteración de su metabolismo puede tener como resultado diferentes patologías^{2,3,7}, aunque la alteración de sus niveles también se ha asociado con el envejecimiento¹⁰. Los cambios en su metabolismo pueden producirse por causas exógenas y/o endógenas. Tanto una deficiencia como un exceso de PAs en los organismos pueden tener efectos perjudiciales^{1,5}. Algunas enfermedades con las que se han sido vinculadas son cáncer, arteriosclerosis, accidentes cerebrovasculares, insuficiencia renal, diabetes, pancreatitis, enfermedades mentales y enfermedades digestivas, entre otras^{1,2,5}. Se han asociado alteraciones de los niveles de poliaminas en el organismo con diferentes tipos de cáncer, como son el cáncer de páncreas, el cáncer de próstata, el cáncer de colon, el cáncer de mama y el melanoma, entre otros^{1,4,9,11}. Ya en las décadas

⁶ Lefèvre PLC, Palin MF, Murphy BD, *Polyamines on the reproductive landscape*, *Endocr Rev.* 32 (2011) 694-712, <https://doi.org/10.1210/er.2011-0012>

⁷ Limon A, Mamdani F, Hjelm BE, Vawter MP, Sequeira A, *Targets of polyamine dysregulation in major depression and suicide: Activity-dependent feedback, excitability, and neurotransmission*, *Neurosci Biobehav Rev.* 66 (2016) 80-9. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.04.010>

⁸ Phanstiel O, *An overview of polyamine metabolism in pancreatic ductal adenocarcinoma*, *Int J Cancer.*, 142 (2018) 1968-76, <https://doi.org/10.1002/ijc.31155>

⁹ Gerner EW, Bruckheimer E, Cohen A, *Cancer pharmacoprevention: Targeting polyamine metabolism to manage risk factors for colon cancer*, *J Biol Chem.* 293 (2018) 18770-8, <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.003343>

¹⁰ Minois N, Carmona-Gutierrez D, Madeo F, *Polyamines in aging and disease*, *Aging (Albany NY)* 3 (2011) 716-32., <https://doi.org/10.18632/aging.100361>

¹¹ Gerner EW, Meyskens FL, *Polyamines and cancer: Old molecules, new understanding*, *Nat Rev Cancer.* 4 (2004) 781-92, <https://doi.org/10.1038/nrc1454>

de los 70 y 80 hubo investigaciones que pusieron de manifiesto concentraciones elevadas de PAs en pacientes con cáncer metastásico^{12,13}. La disponibilidad de estos compuestos en el organismo de individuos con cáncer mejora la capacidad de las células tumorales para invadir y hacer metástasis en nuevos tejidos, disminuyendo a su vez las funciones inmunitarias antitumorales de las células inmunes⁸. Desde entonces, diferentes estudios han mostrado que su concentración es elevada en pacientes con esta patología^{4,5,9}.

Las poliaminas también se han vinculado con diferentes enfermedades neurológicas, como la enfermedad de Huntington, la enfermedad del Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la enfermedad del Alzheimer^{1,5}. Se han relacionado las alteraciones en su homeostasis o la falta de un intercambio adecuado de las mismas dentro del sistema nervioso central con enfermedades mentales, como trastornos psiquiátricos, depresión, ansiedad, esquizofrenia, fisiopatologías del suicidio y otros trastornos del estado de ánimo^{1,5,7}. También se han asociado con síndromes que provocan retraso mental, como el Síndrome de Down, algunas enfermedades raras, como el síndrome de Snyder-Robinson o el lupus eritematoso sistémico^{1,2}. Actualmente, la relación de las PAs con las enfermedades neurológicas, mentales y enfermedades raras sigue requiriendo mucha investigación¹.

Teniendo en cuenta la cantidad de procesos en los que están involucradas y el número de patologías que se han relacionado con su alteración, el desarrollo de fármacos dirigidos a sus rutas metabólicas ha sido y continúa siendo investigado. Estas investigaciones son realizadas con el fin de desarrollar terapias complementarias a las ya aplicadas para las diferentes patologías³.

¹² Russell DH, *Clinical relevance of polyamines as biochemical markers of tumor kinetics*, Clin Chem. 23 (1977) 22-7, PMID: 318939

¹³ Russell D, Snyder SH, *Amine synthesis in rapidly growing tissues: ornithine decarboxylase activity in regenerating rat liver, chick embryo, and various tumors*, Proc Natl Acad Sci U S A. 60 (1968) 1420-7, <https://doi.org/10.1073/pnas.60.4.1420>

Estos compuestos han sido propuestos como posibles biomarcadores de las diferentes enfermedades con las que han sido relacionados y, en particular, como posibles biomarcadores del cáncer^{3,12}. Su análisis en distintos fluidos biológicos, como orina, suero o saliva, puede proporcionar información útil sobre el tipo de cáncer, el estadio de progresión de la enfermedad o la efectividad del tratamiento clínico aplicado¹⁴. La orina ha sido una de las principales matrices biológicas en las que han sido analizados como posibles biomarcadores^{15,16,17,18,19}.

Dada la importancia de estos compuestos para la vida humana, la gran cantidad de patologías que se han relacionado con ellos y su potencial como biomarcadores, hay un gran interés en el desarrollo de métodos analíticos rápidos y fiables para determinar su concentración en diferentes muestras biológicas.

¹⁴ Önal A. *Current status of polyamine and polyamine analogs analysis in cancer research*, Crit Rev Anal Chem. 40 (2010) 60-7, <https://doi.org/10.1080/10408340903018486>

¹⁵ Samejima K, Hiramatsu K, Takahashi K, Kawakita M, Kobayashi M, Tsumoto H, Kohda K, *Identification and determination of urinary acetylpolyamines in cancer patients by electrospray ionization and time-of-flight mass spectrometry*, Anal Biochem. 401 (2010) 22–9, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.02.022>

¹⁶ Casas Ferreira AM, Moreno Cordero B, Crisolino Pozas AP, Pérez Pavón JL, *Use of microextraction by packed sorbents and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of polyamines and related compounds in urine*, J Chromatogr A. 1444 (2016) 32-41, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.03.054>

¹⁷ Naccarato A, Elliani R, Cavaliere B, Sindona G, Tagarelli A., *Development of a fast and simple gas chromatographic protocol based on the combined use of alkyl chloroformate and solid phase microextraction for the assay of polyamines in human urine*, J Chromatogr A. 1549 (2018) 1-13, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.03.034>

¹⁸ Shamsipur M, Naseri MT, Babri M, *Quantification of candidate prostate cancer metabolite biomarkers in urine using dispersive derivatization liquid-liquid microextraction followed by gas and liquid chromatography-mass spectrometry*, J Pharm Biomed Anal. 81-82 (2013) 65-75, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.03.019>

¹⁹ Liu R, Jia Y, Cheng W, Ling J, Liu L, Bi K, Li Q, *Determination of polyamines in human urine by precolumn derivatization with benzoyl chloride and high-performance liquid chromatography coupled with Q-time-of-flight mass spectrometry*, Talanta. 83 (2011) 751-6 <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.10.039>

En esta Tesis Doctoral se propone el desarrollo de métodos rápidos y fiables para la determinación de estos compuestos, en concreto putrescina, cadaverina, espermidina, espermina, N-acetilputrescina y N-acetilespermina (figura 1) en saliva y orina. También se han incluido en los estudios otros compuestos relacionados con las PAs, como son la Ornitina y el ácido gamma-aminobutírico (GABA). Estos compuestos están involucrados en las rutas metabólicas de las poliaminas. La biosíntesis de poliaminas en células de mamíferos comienza con la producción de putrescina a partir de L-ornitina (por acción de la ornitina descarboxilasa), un aminoácido que no se encuentra en las proteínas y que se produce como parte del ciclo de la urea. La putrescina es el precursor utilizado en la biosíntesis de espermidina y espermina, mientras que la cadaverina se produce por la descarboxilación de la lisina^{16,20}. Por otra parte, GABA se genera mediante el catabolismo de la putrescina²¹. En la figura 2 se muestra el metabolismo de estos compuestos.

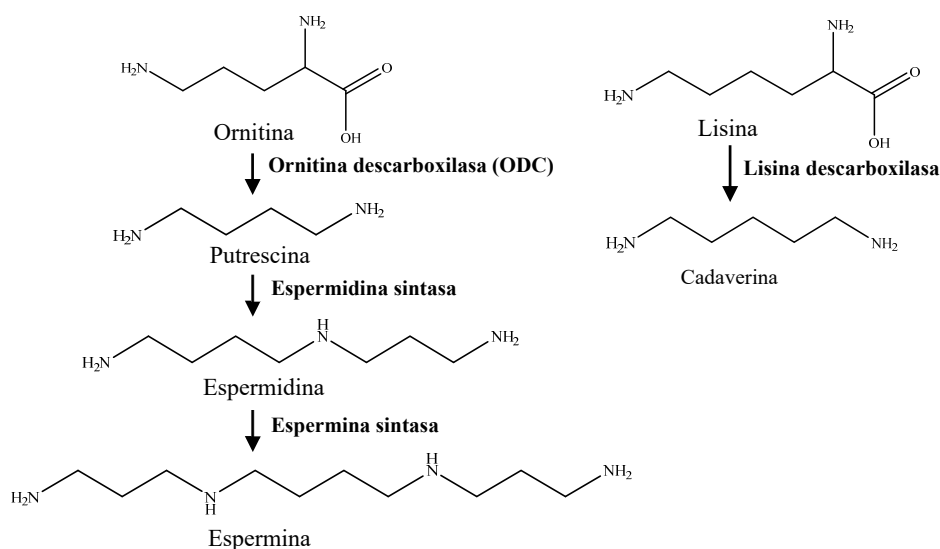


Figura 2. Metabolismo general de las poliaminas²⁰

²⁰ KEGG PATHWAY Database, <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>, acceso 05/05/2022

²¹ Seiler N, *Catabolism of polyamines*, Amino Acids. 26 (2004) 217-33, <https://doi.org/10.1007/s00726-004-0070-z>

4.2. Aminoácidos

Los aminoácidos (AAs) son compuestos de gran importancia en el cuerpo humano, siendo las unidades estructurales básicas que componen las proteínas y, además, intermedios en diferentes procesos metabólicos. Por ello, su determinación es de gran interés ya que pueden aportar información acerca del estado de salud del individuo.

Estos compuestos presentan un grupo carboxilo (-COOH), un grupo amino (-NH₂), una cadena lateral variable (-R) y un hidrógeno unidos a un mismo átomo de carbono. El carbono central al cual se encuentran unidos todos estos sustituyentes se denomina carbono α , siendo este quiral cuando la cadena lateral no es un hidrógeno, dando lugar a dos estereoisómeros (D y L)^{22,23}. Los AAs relevantes biológicamente existen en configuración L, aunque también pueden encontrarse pequeñas cantidades en forma D en los organismos²². La cadena lateral (-R) que presentan los diferentes AAs es la que proporciona propiedades y funciones bioquímicas notablemente diferentes entre ellos²³.

Estos compuestos pueden ser clasificados en dos grupos: proteinogénicos y no proteinogénicos. Los aminoácidos proteinogénicos son aquellos que son unidades estructurales básicas de las proteínas. Por otro lado, los aminoácidos no proteinogénicos son los que no forman parte de las proteínas, pero participan en otras funciones biológicas relevantes. Ambos grupos tienen funciones esenciales en los organismos, como la provisión de energía, la formación de importantes biomoléculas (hormonas, lípidos o ácidos nucleicos, entre otros) y participan en un elevado número de procesos metabólicos^{22,23}. Algunos AAs regulan rutas

²² Ayon NJ, *Features, roles and chiral analyses of proteinogenic amino acids*, AIMS Mol Sci. 7 (2020) 229-68, <https://doi.org/10.3934/molsci.2020011>

²³ Wu G, *Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition*, Amino Acids. 37 (2009) 1-17, <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0269-0>

metabólicas claves que son necesarias para el mantenimiento, el crecimiento, la reproducción y la inmunidad de los organismos²³.

Los aminoácidos proteínogénicos son 20 y se clasifican en dos grupos: esenciales y no esenciales. Los aminoácidos esenciales son aquellos que no pueden ser sintetizados por el organismo y proceden, por lo tanto, de fuentes exógenas. Estos son: metionina, valina, treonina, lisina, histidina, leucina, isoleucina, fenilalanina y triptófano (figura 3). En cambio, aquellos AAs que puede ser sintetizados en el propio organismo se denominan aminoácidos no esenciales e incluyen a la glicina, alanina, serina, prolina, cisteína, glutamina, asparagina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutámico y arginina (figura 3).

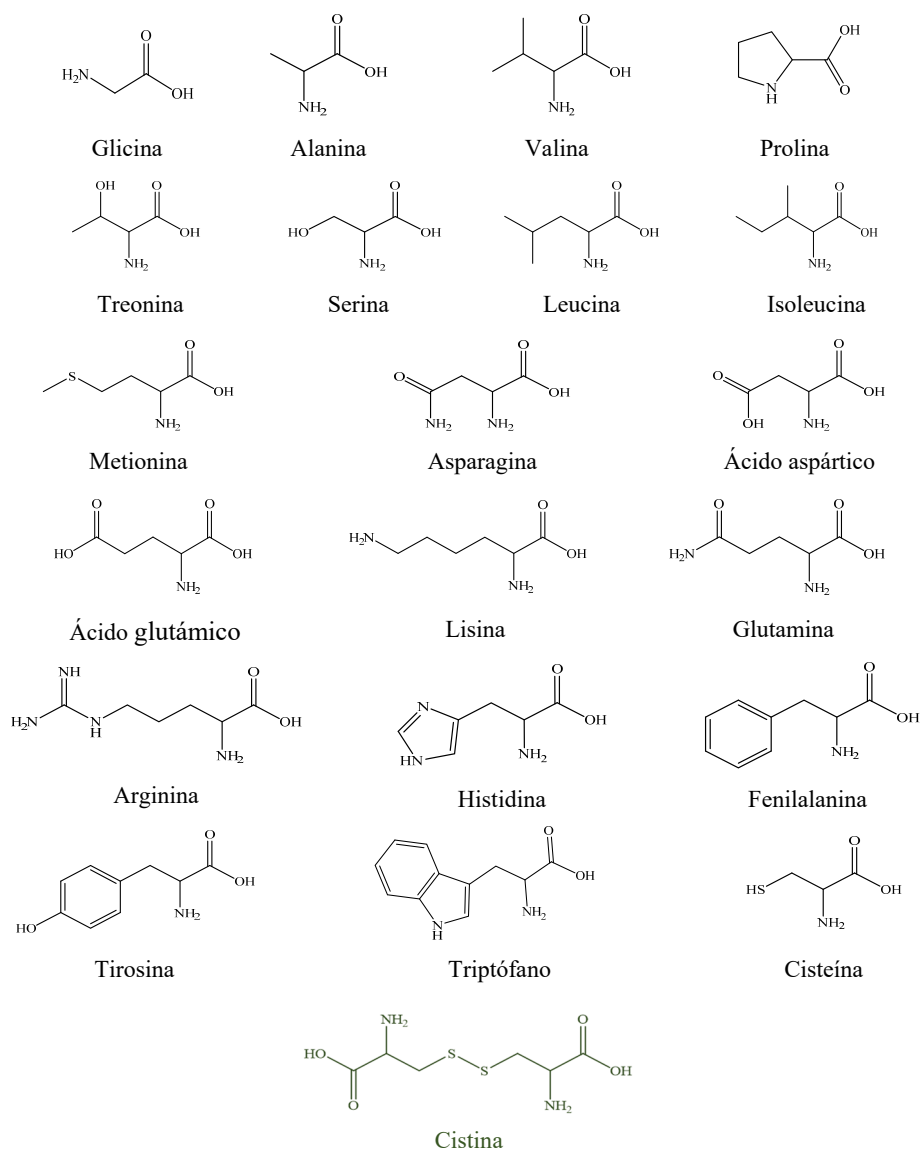


Figura 3. Estructura química de los aminoácidos proteinogénicos. También se incluye la cistina

Se ha asociado la alteración de los niveles de concentración de estos compuestos con diferentes enfermedades tales como cáncer o enfermedades metabólicas, entre otras^{22, 24, 25,26}.

Los AAs han mostrado estar involucrados en los diferentes procesos celulares que ocurren en el inicio y desarrollo de distintos tipos de cáncer (páncreas, próstata o mama, entre otros)^{24,27,28,29}. Algunas de las enfermedades metabólicas que se han vinculado con la alteración de sus concentraciones han sido la histidinemia³⁰ o la homocistinuria³¹, entre otras. Dentro de estas enfermedades metabólicas se incluyen las conocidas como errores congénitos del metabolismo (*IEM, Inborn Errors of Metabolism*)^{32,33}. Un diagnóstico temprano de este tipo de enfermedades en recién nacidos es de gran importancia para evitar

²⁴ Strmiska V, Michalek P, Eckschlagler T, Stiborova M, Adam V, Krizkova S, Heger Z, *Prostate cancer-specific hallmarks of amino acids metabolism: Towards a paradigm of precision medicine*, BiochimBiophys ActaRevCancer 1871(2019)248-58, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.01.001>

²⁵ Fernández-Ochoa Á, Quirantes-Piné R, Borrás-Linares I, Gemperline D, Alarcón Riquelme ME, Beretta L, Segura-Carretero A, *Urinary and plasma metabolite differences detected by HPLC-ESI-QTOF-MS in systemic sclerosis patients*, J Pharm Biomed Anal. 162 (2019) 82-90, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.09.021>

²⁶ Kimura T, Hamase K, Miyoshi Y, Yamamoto R, Yasuda K, Mita M, Rakugi H, Hayashi T, Isaka Y, *Chiral amino acid metabolomics for novel biomarker screening in the prognosis of chronic kidney disease*, Sci Rep. 6 (2016) 1-7, <https://doi.org/10.1038/srep26137>

²⁷ Lieu EL, Nguyen T, Rhyne S, Kim J, *Amino acids in cancer*, Exp Mol Med.52 (2020) 15-30, <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0375-3>

²⁸ Choi BH, Coloff JL, *The diverse functions of non-essential amino acids in cancer*, Cancers 11 (2019) 675-92, <https://doi.org/10.3390/cancers11050675>

²⁹ Miyagi Y, Higashiyama M, Gochi A, Akaike M, Ishikawa T, Miura T, et al., *Plasma free amino acid profiling of five types of cancer patients and its application for early detection*, PLoS ONE. 6 (2011) 1-12, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024143>

³⁰ Attia MS, *Nano optical probe samarium tetracycline complex for early diagnosis of histidinemia in new born children*, BiosensBioelectro 94 (2017) 81-6, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.02.018>

³¹ De Biase I, Gherasim C, La'ulu SL, Asamoah A, Longo N, Yuzyuk T, *Laboratory evaluation of homocysteine remethylation disorders and classic homocystinuria: Long-term follow-up using a cohort of 123 patients*, ClinChimActa 509(2020)126-34, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.06.014>

³² Piraud M, Ruet S, Boyer S, Acquaviva C, Clerc-Renaud P, Cheillan D, Via.ney-Saban C, *Amino acid profiling for the diagnosis of inborn errors of metabolism*, Methods Mol Biol. 708 (2011) 25-53, https://doi.org/10.1007/978-1-61737-985-7_2

³³ Wilcken B, Wiley V, Hammond J, Carpenter K, *Screening Newborns for Inborn Errors of Metabolism by Tandem Mass Spectrometry*, N Engl J Med 348 (2003) 2304-12, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa025225>

complicaciones futuras. Con objetivo de diagnosticar alteraciones de estos compuestos, diferentes procedimientos han sido y son utilizados, como es el cribado neonatal conocido como prueba del talón. Otras enfermedades que han sido relacionadas con la alteración de los niveles de aminoácidos en los organismos han sido enfermedades neurológicas como Parkinson o Alzheimer^{34,35} y enfermedades mentales como autismo^{36,37} o depresión³⁸. Además, diferentes estudios han mostrado que una deficiencia de AAs en la alimentación afecta a la función inmunológica y hace a los individuos más susceptibles a las enfermedades infecciosas³⁹.

Considerando la importancia biológica de estos compuestos, se han reportado numerosas aplicaciones terapéuticas de los mismos en muchos procesos fisiológicos²². Hay evidencias que muestran que una suplementación dietética de AAs específicos en animales y humanos con desnutrición y enfermedades infecciosas mejora su estado inmunológico^{39,40}. También, han mostrado potencial terapéutico frente al cáncer²⁷.

³⁴ Li N jing, Liu W tao, Li W, Li S qi, Chen X hui, Bi K shun, He P, *Plasma metabolic profiling of Alzheimer's disease by liquid chromatography/mass spectrometry*, Clin Biochem. 43 (2010) 992-7, <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.04.072>

³⁵ Figura M, Kuśmierska K, Bucior E, Szlufik S, Koziarowski D, Jamrozik Z, Janik P, *Serum amino acid profile in patients with Parkinson's disease*, PLoS ONE. 13 (2018) 1-12, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191670>

³⁶ Li C, Shen K, Chu L, Liu P, Song Y, Kang X, *Decreased levels of urinary free amino acids in children with autism spectrum disorder*, J Clin Neurosci. 54 (2018) 45-9, <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2018.05.001>

³⁷ Smith AM, King JJ, West PR, Ludwig MA, Elizabeth LR, Burrier RE, Amaral DG, *Amino acid dysregulation metabolites: potential biomarkers for diagnosis and individualized treatment for subtypes of autism spectrum disorder*, Biol Psychiatry. 85 (2019) 345-54, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.08.016>

³⁸ Baranyi A, Amouzadeh-Ghadikolai O, Von Lewinski D, Rothenhäusler HB, Theokas S, Robier C, et al., *Branched-chain amino acids as new biomarkers of major depression - A novel neurobiology of mood disorder*, PLoS ONE. 11 (2016) 1-10, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160542>

³⁹ Li P, Yin YL, Li D, Kim WS, Wu G, *Amino acids and immune function*, Br J Nutr. 98 (2007) 237-52, <https://doi.org/10.1017/S000711450769936X>

⁴⁰ Canfield CA, Bradshaw PC. *Amino acids in the regulation of aging and aging-related diseases*, Transl Med Aging. 3 (2019) 70-89, <https://doi.org/10.1016/j.tma.2019.09.001>

Estos compuestos se han propuesto como posibles biomarcadores de diferentes patologías²². Diferentes métodos analíticos, mediante los cuales se ha determinado la concentración de estos compuestos en distintos fluidos biológicos, han permitido obtener información útil para el diagnóstico y tratamiento de diferentes enfermedades^{25, 29, 34,35,36,41}.

En esta Tesis se han desarrollado métodos rápidos para la detección y cuantificación fiable de aminoácidos en muestras de orina y de saliva. Los aminoácidos determinados han sido los aminoácidos proteinogénicos (figura 3). En el caso de la cisteína, está no es estable en los fluidos biológicos evaluados, ya que se oxida fácilmente y sufre un proceso de dimerización a cistina⁴² (figura 3). Por esta razón, es la cistina la que ha sido analizada con los métodos desarrollados en esta Tesis Doctoral.

⁴¹ Gałęzowska G, Ratajczyk J, Wolska L, *Determination of amino acids in human biological fluids by high-performance liquid chromatography: critical review*, Amino Acids 53 (.2021) 993-1009, <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03002-x>

⁴² Gray N, Plumb RS, Wilson ID, Nicholson JK, *A validated UPLC-MS/MS assay for the quantification of amino acids and biogenic amines in rat urine*, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 1106-1107 (2019) 50-7, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.12.028>

5.

MUESTRAS BIOLÓGICAS NO INVASIVAS

Según el *Instituto Nacional del Cáncer de los Institutos Nacionales de la Salud de EEUU*, una muestra biológica es una muestra de material como orina, sangre, tejido, células, ADN, ARN o proteínas de seres humanos, animales o plantas¹. Las muestras biológicas pueden ser obtenidas de los seres humanos mediante procedimientos invasivos y no invasivos. Los procedimientos de toma de muestra invasivos deben realizarse por un profesional de la medicina e implican penetrar en el cuerpo mediante una incisión en la piel o introducir en él un instrumento o material extraño al organismo. Ejemplos de muestras invasivas son sangre, suero o tejido, entre otras. Los procedimientos no invasivos no involucran instrumentos que rompan la piel o penetren físicamente en el cuerpo. Muestras no invasivas son orina, saliva, pelo o uñas, entre otras.

Las muestras biológicas no invasivas tienen varias ventajas sobre las de tipo invasivo. Las muestras no invasivas implican un menor estrés para los individuos, ya que en su obtención no se requieren punciones ni incisiones, no es necesario personal médico cualificado para su obtención y su recolección es más económica y fácil de realizar, debido a que en la mayoría de los casos solo es necesario un recipiente para su recolección, sin necesidad de utilizar agujas ni otros instrumentos que sí son requeridos para muestras de tipo invasivo, como la sangre^{2,3}.

En esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo la determinación de poliaminas y compuestos relacionados, así como aminoácidos en muestras biológicas no invasivas, en concreto, en saliva y orina.

¹<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/muestra-biologica>, acceso 20/05/2022

² Liu J, Duan Y, *Saliva: A potential media for disease diagnostics and monitoring*, Oral Oncol. 48 (2012) 569-77, <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2012.01.021>

³ Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C, *Diagnostic potential of saliva: Current state and future applications*, Clin Chem. 57 (2011) 675-87, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.153767>

5.1. Saliva

En los seres humanos la saliva es producida por tres pares de glándulas salivales principales (glándulas parótidas, sublinguales y submandibulares) y numerosas glándulas más pequeñas que secretan la saliva en la cavidad bucal⁴. Un adulto sano produce entre 0.5-1.5 L de saliva a lo largo del día. Este fluido biológico tiene un papel muy importante para el organismo, ya que es responsable de la lubricación de la cavidad oral, participa en la digestión de los alimentos, protege la cavidad bucal de los microorganismos y regula el pH⁵.

El componente más abundante de la saliva es el agua, aproximadamente un 99%². El 1% restante está constituido por una gran variedad de electrolitos (calcio, magnesio, sodio, potasio, etc.), diferentes proteínas (mucinas, inmunoglobulinas, citoquinas, etc.), productos de putrefacción (putrescina y cadaverina), lípidos (colesterol y ácidos grasos), productos de deshecho del metabolismo (amoníaco, ácido úrico, urea, creatinina, etc.), glucosa, ácidos nucleicos y hormonas, entre otros^{2,3}. El pH normal de la saliva es 6-7⁶.

Diferentes investigaciones han demostrado que muchos de los compuestos presentes en la sangre también están presentes en saliva^{3,6}. Esto se debe a que una fina capa de células epiteliales separa los conductos salivales de la circulación sistémica permitiendo la transferencia de sustancias a la saliva mediante transporte activo, difusión pasiva a través de un gradiente de concentración o difusión a través de la membrana celular^{2,5}. Sin embargo, los diferentes compuestos encontrados han mostrado una concentración 1000 veces menor en

⁴ Lui Y, Yang M, Zhu J, Zhang H, Duan Z, Wang S, et al. *Developments in diagnostic applications of saliva in human organ diseases*, Medicine in Novel Technology and Devices. 13 (2022) 100115, <https://doi.org/10.1016/j.medntd.2022.100115>

⁵ Dame ZT, Aziat F, Mandal R, Krishnamurthy R, Bouatra S, Borzouie S, et al., *The human saliva metabolome*, Metabolomics.11 (2015) 1864-83, <https://doi.org/10.1007/s11306-015-0840-5>

⁶ Niu Z, Zhang W, Yu C, Zhang J, Wen Y, *Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques*. TrAC - Trends Anal Chem. 102 (2018) 123-46, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.02.005>

saliva que en sangre³. La concentración de los componentes orgánicos e inorgánicos presentes en saliva varía no sólo entre los diferentes seres humanos en general sino en cada individuo en particular a lo largo del día^{2,4}. Esta variación se produce en respuesta a diferentes estados fisiológicos, estímulos, agresiones y/o factores estresantes^{3,5}.

La saliva se puede recolectar de forma fácil y rápida a través de procedimientos no invasivos, de manera no estimulada o estimulada. Este fluido biológico se obtiene de manera no estimulada cuando el individuo está despierto y en reposo, la estimulación glandular es mínima o no existen estímulos exógenos. La saliva obtenida mediante este procedimiento se denomina saliva total no estimulada, saliva basal o de reposo. Por otra parte, la saliva se obtiene de manera estimulada al excitar o inducir la secreción de las glándulas salivales mediante mecanismos externos como la masticación o mediante el gusto⁷. Bajo condiciones normales, el flujo de secreción de la saliva total no estimulada es de 0.3 mL/min mientras que la saliva estimulada presenta un flujo de 7 mL/min⁶

Desde el punto de vista clínico, la saliva tiene gran importancia ya que puede ser utilizada para el diagnóstico y seguimiento de diferentes patologías^{2,3}. Una de las principales razones por las cuales este fluido biológico se puede considerar como muestra potencial para el diagnóstico es por su intercambio de sustancias con la sangre, como ya se ha comentado anteriormente^{2,5}. La saliva presenta algunas ventajas como muestra para el diagnóstico frente a la sangre. Una de estas ventajas es que su matriz contiene menor cantidad de proteínas. Además, la saliva requiere menor tratamiento antes de su análisis, ya que su matriz es menos compleja². Por otra parte, como ya se indicó en el inicio de este apartado, este tipo de muestra se puede obtener mediante procedimientos no invasivos, con las ventajas que esto implica.

⁷ Priya KY, Prathibha KM, *Methods of collection of saliva-A Review*, Int J Oral Health Dent. 3 (2017) 149-53, <https://doi.org/10.18231/2395-499X.2017.0032>

A pesar a de los aspectos positivos de la utilización de muestras de saliva con fines diagnósticos, estas no han sido tan utilizadas en los análisis clínicos como la sangre debido a que su composición exacta no es bien conocida y varía ampliamente por diferentes factores³. Además, debido a que la concentración de compuestos en saliva es muy inferior que en sangre, los métodos analíticos que se requieren para estas muestras deben tener una mayor sensibilidad^{3,4}.

5.1.1. Métodos analíticos propuestos para la determinación de poliaminas y aminoácidos

Respecto a los compuestos analizados en esta Tesis Doctoral, se han propuesto diferentes métodos analíticos para su determinación en saliva, como la electroforesis capilar (CE, *Capillary Electrophoresis*)^{8,9}, la cromatografía líquida (LC, *Liquid Chromatography*)^{10,11,12,13,14} o la cromatografía de gases (GC, *Gas*

⁸ Tseng HM, Li Y, Barrett DA, *Profiling of amine metabolites in human biofluids by micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection*, Anal Bioanal Chem. 388 (2007) 433-9, <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1239-6>

⁹ Igarashi K, Ota S, Kaneko M, Hirayama A, Enomoto M, Katumata K, et al., *High-throughput screening of salivary polyamine markers for discrimination of colorectal cancer by multisegment injection capillary electrophoresis tandem mass spectrometry*, J Chromatogr A. 1652 (2021) 462355, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462355>

¹⁰ Venza M, Visalli M, Ciccio' D, Teti D, *Determination of polyamines in human saliva by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*, J Chromatogr B 757 (2001) 111-7, [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00130-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00130-X)

¹¹ Álvarez-Sánchez B, Priego-Capote F, Luque de Castro MD, *Study of sample preparation for metabolomic profiling of human saliva by liquid chromatography-time of flight/mass spectrometry*, J Chromatogr A. 1248 (2012) 178-81, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.029>

¹² Tsutsui H, Mochizuki T, Inoue K, Toyama T, Yoshimoto N, Endo Y, et al., *High-throughput LC-MS/MS based simultaneous determination of polyamines including N-acetylated forms in human saliva and the diagnostic approach to breast cancer patients*, Anal Chem. 85 (2013) 11835-42, <https://doi.org/10.1021/ac402526c>

¹³ Takayama T, Tsutsui H, Shimizu I, Toyama T, Yoshimoto N, Endo Y, et al., *Diagnostic approach to breast cancer patients based on target metabolomics in saliva by liquid chromatography with tandem mass spectrometry*, Clin Chim Acta. 452 (2016) 18-26, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.10.032>

¹⁴ Tomita A, Mori M, Hiwatari K, Yamaguchi E, Itoi T, Sunamura M, et al., *Effect of storage conditions on salivary polyamines quantified via liquid chromatography-mass spectrometry*, Sci Re. 8 (2018) 1-9, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30482-x>

Chromatography)^{15,16,17}, fundamentalmente con detección por espectrometría de masas^{9, 11-17} y fluorescencia^{8,10}. También se han descrito métodos no separativos basados en MS, aunque en menor medida¹⁸.

Los tratamientos de muestra aplicados a la saliva difieren según el método analítico utilizado posteriormente para su análisis. Para la eliminación de las proteínas presentes en esta matriz se han empleado diferentes procedimientos como la hidrólisis¹¹, la precipitación con disolventes orgánicos^{8,10} o la congelación/descongelación/centrifugación de la muestra¹²⁻¹⁵. Para la extracción y preconcentración de poliaminas y aminoácidos en saliva, se ha propuesto la LLE^{8,16,18}, la extracción en fase sólida (*SPE, Solid Phase Extraction*)¹⁷ y la microextracción con sorbentes empaquetados (*MEPS, Microextraction by a packed sorbent*)¹⁵, entre otros.

Debido a la alta polaridad, baja volatilidad y deficiente sensibilidad en algunos sistemas de detección que presentan estos compuestos, se han propuesto diferentes reactivos para su derivatización como o-ftaldialdehído (OPA)¹⁰, 4-(N,N-dimetilaminosulfonil)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazol (DBD-F)^{12,13}, 4-fluoro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3 -diazol (NBD-F)⁸, cloroformiatos de alquilo^{15,17,18} y cloruro de benzoilo¹⁶. También se ha propuesto la determinación de estos compuestos sin

¹⁵ Peña J, Casas-Ferreira AM, Morales-Tenorio M, Moreno-Cordero B, Pérez-Pavón JL, *Determination of polyamines and related compounds in saliva via in situ derivatization and microextraction by packed sorbents coupled to GC-MS*. J Chromatogr B. 1129 (2019) 121821, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121821>

¹⁶ Peña J, Fernández Laespada ME, García Pinto C, Pérez Pavón JL, *Development of a method for the determination of polyamines including N-acetylated forms in human saliva via benzylation and gas chromatography-mass spectrometry*, J Chromatogr A 1651 (2021) 462278, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462278>

¹⁷ Kim KR, Paik MJ, Kim JH, Dong SW, Jeong DH, *Rapid gas chromatographic profiling and screening of biologically active amines*, J Pharm Biomed Anal. 15 (1997) 1309-18, [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(96\)02048-1](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(96)02048-1)

¹⁸ Santos-Martin PM, del Nogal-Sánchez, Pérez-Pavón JL, Moreno-Cordero B, *Non-separative method based on a single quadrupole mass spectrometer for the semi-quantitative determination of amino acids in saliva samples. A preliminary study*, Talanta. 208 (2020) 120381, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120381>

derivatizar mediante cromatografía de líquidos o electroforesis capilar con espectrometría de masas^{9,14}.

5.2. Orina

Los seres humanos producen la orina en los riñones mediante la filtración de sustancias no deseadas del torrente sanguíneo. En la formación de la orina ocurren principalmente tres procesos: filtración glomerular, reabsorción y secreción¹⁹. Estos procesos garantizan que solo los residuos y el exceso de agua se eliminen del cuerpo. Un adulto sano produce entre 1.5-2 L de orina al día²⁰. Este fluido biológico es expulsado del cuerpo humano a través de la uretra mediante la micción.

La orina está compuesta principalmente por agua (95%). El resto de compuestos que presenta son urea, creatinina, ácido úrico, iones inorgánicos (sodio, cloruro, potasio, magnesio, sulfatos, fosfatos, etc.), ácidos orgánicos, proteínas, hormonas, carbohidratos, productos de desecho del metabolismo y toxinas solubles en agua, entre otros^{20,21}. Los productos de degradación metabólica que presenta proceden de la dieta, medicamentos, contaminantes ambientales, metabolitos de desecho endógenos y subproductos bacterianos. Este fluido es un portador clave de productos de desecho hidrofílicos. Presenta una química compleja que ha hecho que su conocimiento completo sea complicado debido a que posee una matriz con una gran diversidad de compuestos²⁰. El pH

¹⁹ Edwards JG, *The formation of urine*, Arch Intern Med (Chic). 65 (1940) 800–24, <https://doi.org/10.1001/archinte.1940.00190100141006>

²⁰ Bouatra S, Aziat F, Mandal R, Guo AC, Wilson MR, Knox C, et al., *The Human Urine Metabolome*, PLoS ONE. 8 (2013) 1-28, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073076>

²¹ Fernández-Peralbo MA, Luque de Castro MD, *Preparation of urine samples prior to targeted or untargeted metabolomics mass-spectrometry analysis*, TrAC – Trends Anal Chem. 41 (2012) 75-85, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.08.011>

de este fluido biológico en adultos sanos varía entre 4.5 y 8²². Su composición puede variar por diferentes factores como la edad, la alimentación, la medicación o el ejercicio²³. Aunque su composición varía entre los diferentes seres humanos, hay cierta relación que se mantiene entre el contenido mineral y la materia orgánica que presenta. La alteración de esa proporción puede indicar la presencia de una patología²⁴.

Varias investigaciones han puesto de manifiesto que todos los compuestos que están presentes en esta matriz también están presentes en la sangre. Sin embargo, se han identificado compuestos en orina que no han sido observados en sangre, pudiendo ocurrir esto porque los riñones son capaces de concentrar ciertos metabolitos de la sangre. Otra razón por la cual hay compuestos que no han sido detectados en sangre, pero sí en orina, puede deberse a que los límites de detección de los métodos analíticos empleados para su determinación en sangre no son lo suficientemente bajos. Hay compuesto que han mostrado estar 1000 veces más concentrados en orina que en sangre²⁰. En comparación con las muestras de saliva, la orina presenta una matriz más compleja debido a la gran cantidad de productos metabólicos de deshecho que contiene. Por esta razón, su análisis es más complicado.

Respecto a la recolección de las muestras, el principal procedimiento empleado es la micción en un recipiente. De manera general, estas muestras pueden ser obtenidas como muestras aleatorias o muestras cronometradas. Las muestras aleatorias se obtienen de una única micción en cualquier momento del día. Por otra parte, las muestras cronometradas se obtienen de varias micciones realizadas en un determinado periodo de tiempo. En estas últimas se prefiere la

²² Cook JD, Strauss KA, Caplan YH, LoDico CP, Bush DM, *Urine pH: The effects of time and temperature after collection*. J Anal Toxicol. 31 (2007) 486-96, <https://doi.org/10.1093/jat/31.8.486>

²³ Sarigul N, Korkmaz F, Kurultak I, *A New Artificial Urine Protocol to Better Imitate Human Urine*, Sci Rep. 9 (2019) 1-11, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56693-4>

²⁴ *Composition of urine*, BMJ. 1 (1872) 133, <https://www.jstor.org/stable/25231362>, acceso 26/05/2022

recolección durante 24 horas para eliminar la gran variabilidad en los perfiles de los diferentes compuestos en períodos de recolección más cortos. En la práctica clínica, las muestras obtenidas con mayor frecuencia son porciones del chorro medio o muestras de orina limpia de la primera orina de la mañana. La porción de orina obtenida del chorro medio minimiza la presencia de elementos contaminantes^{6,21}.

Un aspecto a tener en cuenta en el análisis de este fluido biológico es que la concentración de los compuestos presentes en él puede variar ampliamente entre diferentes individuos o en un mismo individuo cuya orina es obtenida en diferentes períodos de tiempo, como ya se ha indicado anteriormente. Esta variación de concentración puede ser debida a que el volumen de orina producido por el cuerpo varía según el consumo de agua y otros factores fisiológicos. Por esta razón, la corrección de volumen es necesaria cuando se lleva a cabo el análisis de diferentes compuestos en esta matriz. Las estrategias que se han empleado para esta corrección han sido la normalización al volumen de orina excretado, a la concentración de creatinina, a la osmolalidad y la normalización a componentes que están presentes en todas las muestras²¹. La normalización a la concentración de creatinina es uno de los procedimientos más utilizados y es el que se ha empleado en esta Tesis Doctoral. La creatinina es un producto de desecho del metabolismo muscular que se excreta en la orina a un ritmo relativamente constante²⁵. En esta Tesis Doctoral, el método utilizado para determinar la concentración de creatinina en las diferentes muestras de orina ha sido el método de Jaffé²⁶, el cual se basa en la detección fotométrica del complejo formado entre la creatinina y el ácido pícrico. Este método se basa en la medida

²⁵ Wagner BD, Accurso FJ, Laguna TA, *The applicability of urinary creatinine as a method of specimen normalization in the cystic fibrosis population*, J Cyst Fibros. 9 (2010) 212-6, <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2010.02.004>

²⁶ Jaffe M. *Ueber den Neiderschlag, welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Kreatinins*, ZPhysiolChem. 10 (1886) 391-400, <https://doi.org/10.1515/bchm1.1886.10.5.391>

colorimétrica a 500 nm de la absorbancia del cromógeno rojo que se forma tras la reacción, en solución alcalina, de la creatinina con el picrato siendo la intensidad del color directamente proporcional a la concentración de creatinina.

Dentro del ámbito clínico, la orina es una muestra potencial para el diagnóstico y seguimiento de diferentes patologías. Este potencial como muestra de diagnóstico se debe a la diversidad química que presenta, su facilidad de recolección mediante procedimientos no invasivos y el amplio rango de concentraciones en el cual se encuentran los diferentes compuestos presentes en ella. Además, la capacidad de los riñones para filtrar toxinas o xenobióticos hace que sea un fluido particularmente útil para el control de la alimentación, la toma de medicamentos y para la evaluación de la exposición a sustancias químicas o contaminantes^{20,27}. Como muestra de diagnóstico presenta varias ventajas frente a las muestras de plasma o suero, como que requiere tratamientos de muestras menos complejos ya que contiene una menor cantidad de proteínas, lípidos y otros compuestos de alto peso molecular, se puede obtener en mayor volumen mediante procedimientos no invasivos y presenta mayores concentraciones de ciertos compuesto que permiten la utilización de métodos analíticos con límites de detección superiores^{20,21}. Además, ciertos biomarcadores presentes en orina permiten el diagnóstico temprano de algunas enfermedades²⁸. Muchos biomarcadores tempranos de enfermedad aparecen en este fluido antes que en la sangre e incluso antes que los síntomas²⁷. Teniendo en cuenta todas estas ventajas, se ha propuesto el análisis, mediante una gran variedad de métodos analíticos, de diferentes biomarcadores en orina para el diagnóstico de diferentes patologías²⁶.

²⁷ Pisitkun T, Johnstone R, Knepper MA., *Discovery of urinary biomarkers*, Mol Cell Proteomics. 5 (2006) 1760-71, <https://doi.org/10.1074/mcp.R600004-MCP200>

²⁸ Zhang Z, Liu J, Cheng Y, Chen J, Zhao H, Ren X, *Urine Analysis has a Very Broad Prospect in the Future*, Front Anal Sci. 1 (2022) 1-10, <https://doi.org/10.3389/frans.2021.812301>

Para la optimización y la validación de los diferentes métodos analíticos empleados para muestras de orina, se ha propuesto la utilización de orina sintética debido a que la composición exacta de la orina natural es difícil de determinar y varía por diferentes factores. Además, existe un riesgo en su manipulación por la presencia de agentes patógenos que pueden dañar a los investigadores²². En esta Tesis Doctoral se ha propuesto la utilización de orina sintética preparada según el procedimiento propuesto por Nico C. van de Merbel²⁹, cuya composición se indica en la tabla 1.

Componentes	Concentración
NaCl	14.10 g/L
KCl	2.80 g/L
Urea	17.30 g/L
CaCl ₂	0.60 g/L
MgSO ₄	0.40 g/L
NH ₃ (33%)	1.90 mL/L
HCl (37%)	1.70 mL/L
Creatinina	1.0 g/L

Tabla 1. Composición orina sintética²⁸

5.2.1. Métodos analíticos propuestos para la determinación de poliaminas y aminoácidos

Respecto a los compuestos estudiados en esta Tesis Doctoral, se han empleado diferentes métodos analíticos para su determinación en orina. En los últimos años, tanto para poliaminas como para aminoácidos, la metodología que más se ha empleado ha sido la cromatografía líquida acoplada a espectrometría

²⁹ Van de Merbel NC, *Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques*. TrAC - Trends Anal Chem. 27 (2008) 924-33, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.002>

de masas (LC-MS)^{30,31,32,33,34,35,36,37}. Las columnas cromatográficas más empleadas han sido las que presentan un mecanismo de retención de fase inversa, aunque, debido a la alta polaridad de estos compuestos, se ha propuesto la utilización de pares iónicos, como el ácido heptafluorobutírico (HFBA)^{30,35}. Como alternativa a la cromatografía de fase inversa, se ha propuesto la utilización de la cromatografía de interacciones hidrofílicas (*HILIC, Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*)³⁴ o el uso de columnas cromatográficas especiales^{29,36}.

³⁰ Ubhi BK, Davenport PW, Welch M, Riley J, Griffin JL, Connor SC, *Analysis of chloroformate-derivatised amino acids, dipeptides and polyamines by LC-MS/MS*, J Chromatogr B. 934 (2013) 79-88, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.06.026>

³¹ Liu R, Li Q, Ma R, Lin X, Xu H, Bi K, *Determination of polyamine metabolome in plasma and urine by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method: Application to identify potential markers for human hepatic cancer*, Anal Chim Acta. 791 (2013) 36-45, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.06.044>

³² Samarra I, Ramos-Molina B, Queipo-Ortuño MI, Tinahones FJ, Arola L, Delpino-Rius A, et al., *Gender-related differences on polyamine metabolome in liquid biopsies by a simple and sensitive two-step liquid-liquid extraction and LC-MS/MS*, Biomolecules. 9 (2019) 1-18, <https://doi.org/10.3390/biom9120779>

³³ Song Y, Xu C, Kuroki H, Liao Y, Tsunoda M, *Recent trends in analytical methods for the determination of amino acids in biological samples*, J Pharm Biomed Anal. 147 (2018) 35-49, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.08.050>

³⁴ Ferré S, González-Ruiz V, Guillarme D, Rudaz S, *Analytical strategies for the determination of amino acids: Past, present and future trends*, J Chromatogr B. 1132 (2019) 121819, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121819>

³⁵ Öztürk Er E, Özbek B, Bakirdere S, *Determination of seventeen free amino acids in human urine and plasma samples using quadruple isotope dilution mass spectrometry combined with hydrophilic interaction liquid chromatography – Tandem mass spectrometry*, J Chromatogr A. 1641 (2021) 461970, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461970>

³⁶ Waterval WAH, Scheijen LJJM, Ortmans-Ploemen MMJC, Habets-van der Poel CD, Bierau J, *Quantitative UPLC-MS/MS analysis of underivatized amino acids in body fluids is a reliable tool for the diagnosis and follow-up of patients with inborn errors of metabolism*, Clin Chim Acta. 407 (2009) 36-42, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2009.06.023>

³⁷ Le A, Ng A, Kwan T, Cusmano-Ozog K, Cowan TM, *A rapid, sensitive method for quantitative analysis of underivatized amino acids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)*, J Chromatogr B. 944 (2014) 166-74, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.11.017>

En menor medida se han utilizado otras técnicas de separación, como la cromatografía de gases y la electroforesis capilar, acopladas ambas a MS^{38,39,40,41}. Los métodos no separativos también han sido descritos aunque con laboriosos procedimientos de preparación de muestras o mediante del uso de instrumentación no convencional^{42,43,44,45}.

Se han aplicado diferentes tratamientos a este fluido biológico con objeto de eliminar aquellos compuestos que puedan interferir en el análisis. Para precipitar las proteínas se han empleado distintos procedimientos como el uso de disolventes orgánicos^{30,31,36} o la congelación/descongelación/centrifugación de la muestra^{37,38}. Para la extracción/preconcentración de los compuestos objeto de

³⁸ Maráková K, Piešťanský J, Zelinková Z, Mikuš P, *Simultaneous determination of twelve biogenic amines in human urine as potential biomarkers of inflammatory bowel diseases by capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry*, J Pharm Biomed Anal. 186 (2020) 113294, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113294>

³⁹ Casas-Ferreira AM, Moreno-Cordero B, Crisolino-Pozas AP, Pérez-Pavón JL, *Use of microextraction by packed sorbents and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of polyamines and related compounds in urine*, J Chromatogr A. 1444 (2016) 32-41, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.03.054>

⁴⁰ Naccarato A, Elliani R, Cavaliere B, Sindona G, Tagarelli A, *Development of a fast and simple gas chromatographic protocol based on the combined use of alkyl chloroformate and solid phase microextraction for the assay of polyamines in human urine*. J Chromatogr A. 1549 (2018) 1-13, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.03.034>

⁴¹ Mayboroda OA, Neusiß C, Pelzing M, Zurek G, Derks R, Meulenbelt I, et al., *Amino acid profiling in urine by capillary zone electrophoresis - mass spectrometry*, J Chromatogr A. 1159 (2007) 149-53, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.04.055>

⁴² Samejima K, Hiramatsu K, Takahashi K, Kawakita M, Kobayashi M, Tsumoto H, et al., *Identification and determination of urinary acetylpolyamines in cancer patients by electrospray ionization and time-of-flight mass spectrometry*, Anal Biochem. 401 (2010) 22-9, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.02.022>

⁴³ Rebolledo-Fernandez MM, Castiñeiras DE, Dolores Bõveda M, Luz Couce M, Cocho JA, Fraga JM, *Development of electrospray ionization tandem mass spectrometry methods for the study of a high number of urine markers of inborn errors of metabolism*, Rapid Commun Mass Spectrom. 26 (2012) 2131-44, <https://doi.org/10.1002/rcm.6325>

⁴⁴ González-Domínguez R, Castilla-Quintero R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL, *Development of a metabolomic approach based on urine samples and direct infusion mass spectrometry*. Anal Biochem. 465 (2014) 20-7, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.07.016>

⁴⁵ Xu N, Zhu ZQ, Yang SP, Wang J, Gu HW, Zhou Z, Chen HW, *Direct detection of amino acids using extractive electrospray ionization tandem mass spectrometry*, Chin J Anal Chem.41 (2013) 523-8, [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(13\)60643-X](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(13)60643-X)

estudio se han propuesto diferentes técnicas como la SPE^{31,41,44}, LLE^{29,31,44}, MEPS³⁸ y SPME³⁹. Con menor frecuencia, se ha propuesto la simple dilución de la orina tras la precipitación de las proteínas^{34,35,44}.

Como reactivos de derivatización para mejorar su separación cromatográfica o su detectabilidad se han propuesto reactivos comerciales especiales²⁹, cloroformatos de alquilo^{38,39}, cloruro de dansilo³¹ o anhídrido del ácido heptafluorobutírico⁴¹.

En esta Tesis Doctoral se propone el desarrollo y validación de métodos rápidos de análisis para la determinación de poliaminas y aminoácidos en muestras de saliva y orina. En todos los casos, el procedimiento de tratamiento de muestra empleado implica una mínima manipulación de esta, con la consiguiente reducción de los errores asociados a esta etapa del proceso analítico. En la figura 1 y en la figura 2 se muestra un esquema general de los procedimientos utilizados para saliva y orina, a lo largo de esta Tesis.

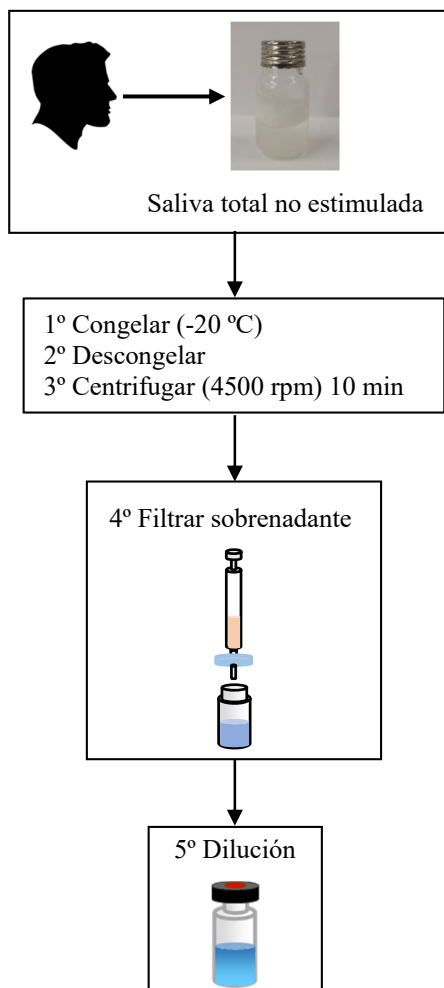


Figura 1. Esquema general del tratamiento aplicado a las muestras de saliva (capítulo I)

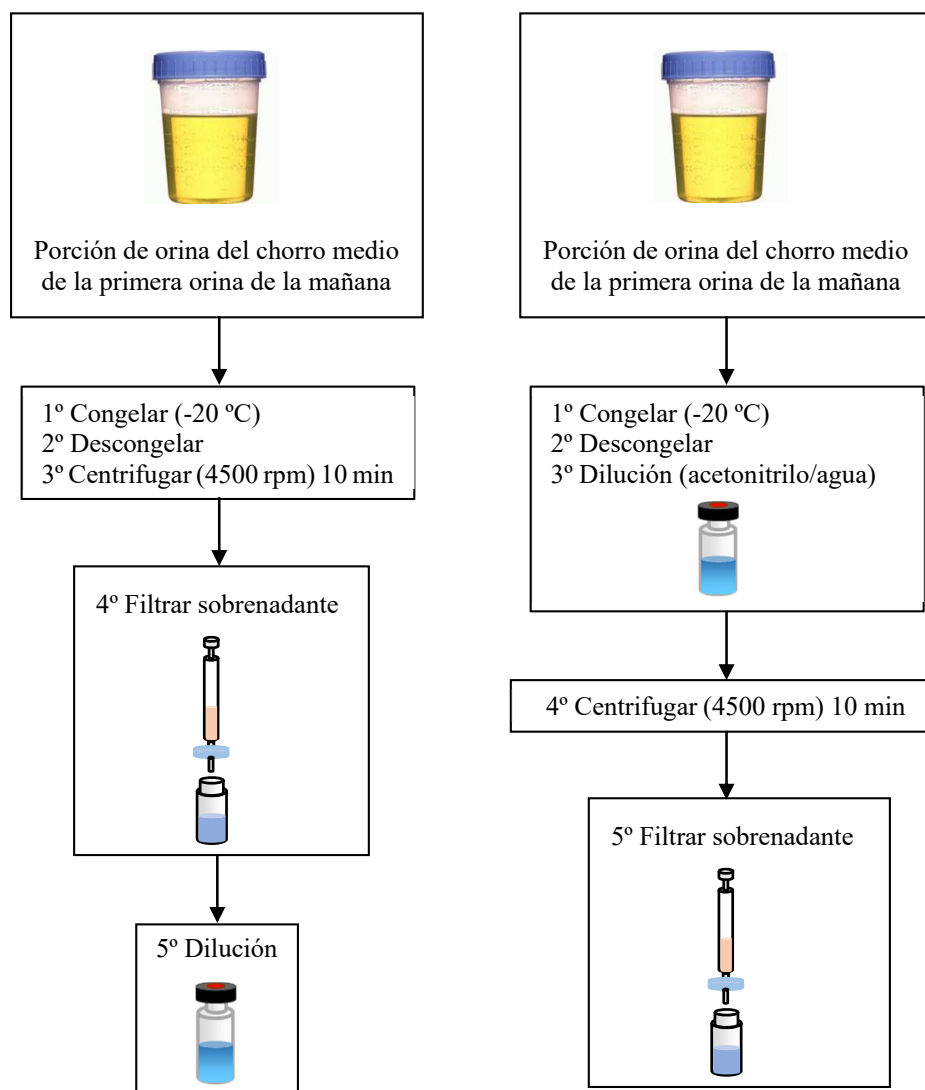


Figura 2. Esquema general de los tratamientos empleados para las muestras de orina (capítulo II)

6.

CONFIGURACIONES INSTRUMENTALES

6.1. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con un analizador triple cuadrupolo (LC-QqQ)

En esta configuración instrumental se utiliza un cromatógrafo de líquidos modelo 1200 de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania) acoplado a un triple cuadrupolo modelo 6410, también de la casa comercial Agilent Technologies, equipado con una fuente de ionización por electrospray (figura 1). Se utiliza el software MassHunter, versión B.07.01, que permite la recogida de datos procedente del detector, la visualización y el tratamiento posterior de las señales.



Figura 1. Agilent 1200 Series HPLC acoplado al analizador de masas Agilent 6410 Triple Quadrupole

6.1.1. Cromatógrafo de líquidos (LC)

Cromatógrafo de líquidos (LC) modelo 1200 de Agilent Technologies constituido por:

- ✓ Un desgasificador de vacío (G1379B)
- ✓ Una bomba binaria de alta presión (G1312B) que puede generar flujos entre 0.1-5 mL/min a una presión de hasta 600 bares (8702 psi).

- ✓ Un automuestreador (G1329B) que posee una bandeja que permite albergar hasta 100 viales de 1.8 mL cada uno y permite volúmenes de inyección entre 0.1-100 μ L.
- ✓ Un compartimento de columnas termostaticado (G1316B) que permite el calentamiento o la refrigeración desde 10 °C por debajo de la temperatura ambiente hasta 100 °C.

6.1.2. Fuente de ionización por electrospray (ESI)

Se utiliza una fuente de ionización por electrospray modelo G1948B de Agilent Technologies (figura 2). En esta fuente de ionización la aguja de nebulización está colocada ortogonalmente a la entrada del analizador (*Z-Spray*).

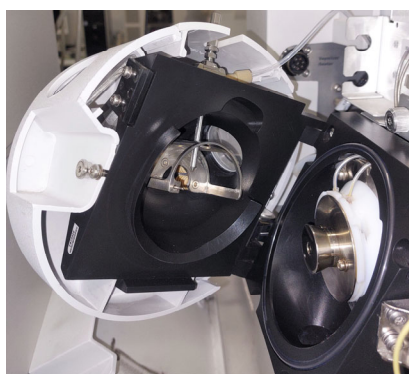


Figura 2. ESI modelo G1948B

6.1.3. Analizador de triple cuadrupolo (QqQ)

Analizador de triple cuadrupolo, modelo 6410 de Agilent Technologies, con un rango de masas (m/z) entre 15-1650 (m/z) y con una exactitud de 0.1 u en todo el rango de masas. Permite tres ajustes de la resolución (FWHM): *Unit* (0.7 u), *Wide* (1.2 u) y *Widest* (2.5 u).

6.2. Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UHPLC) acoplada a espectrometría de masas con un analizador de masas Orbitrap

Se utiliza un cromatógrafo de líquidos de ultra alta eficiencia Vanquish UHPLC (*UHPLC, Ultra High Performance Liquid Chromatography*) acoplado a un sistema de espectrometría de masas con un analizador de masas Orbitrap Q-Exactive Focus con una fuente de ionización por electrospray (figura 3), de la casa comercial Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). La configuración es controlada por el software Xcalibur versión 4.2.



Figura 3. Vanquish UHPLC acoplado un Orbitrap Q-Exactive Focus

6.2.1. Cromatógrafo de líquidos de ultra alta eficiencia (UHPLC)

Cromatógrafo de líquidos de ultra alta eficiencia Vanquish UHPLC de Thermo Fisher Scientific equipado por:

- ✓ Una bomba binaria de alta presión (VF-P10-A) que puede generar flujos entre 0.001-8 mL/min en un intervalo de presiones de 20 a 1034 bares (290-15000 psi). Dentro de la propia bomba está incluido un desgasificador de vacío.

- ✓ Una bomba cuaternaria (VF-P20-A) que alcanza un flujo máximo de 8 mL/min y permite trabajar en un intervalo de presiones de 20 a 1034 bares (290-15000 psi). Incorpora un desgasificador de vacío.
- ✓ Un automuestreador (VF-A10-A) equipado con un bucle de inyección de 50 μ L y una capacidad para 208 viales.
- ✓ Un compartimento de columnas termostatzado (VH-C10-A) que permite el calentamiento o la refrigeración desde 5°C por debajo de la temperatura ambiente hasta 120 °C.
- ✓ Un detector de diodos (*DAD, Diode Array Detection*) en el rango de longitudes de onda de 190 a 800 nm.

6.2.2. Fuente de ionización por electrospray (ESI)

La fuente de ionización por electrospray es una fuente Ion Max API Source de la Thermo Fisher Scientific, configurada para trabajar en modo de ionización por electrospray calentado (*H-ESI, Heated Electrospray Ionization*) que combina la ionización por electrospray con un gas auxiliar calentado. Este dispositivo se coloca en un ángulo de 60° aproximadamente respecto a la entrada del analizador. En la figura 4 se muestra esta fuente de ionización.

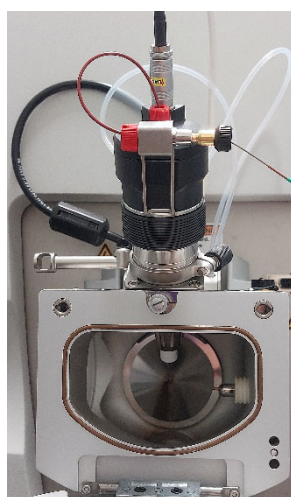


Figura 4. Ion Max API Source con sonda H-ESI

6.2.3. Analizador de masas Orbitrap

Se ha utilizado un Orbitrap modelo Q-Exactive Focus de Thermo Fisher Scientific. Este equipo presenta un rango de masas (m/z) comprendido entre 50-2000 (m/z) y permite una exactitud de masas inferior a 3 ppm con calibración externa e inferior a 1 ppm utilizando patrón interno. El equipo permite tres ajustes de la resolución: 17500 a m/z 200 (12500 a m/z 400), 35000 a m/z 200 (25000 a m/z 400) y 70000 a m/z 200 (50000 a m/z 400).

6.3. Aplicaciones de las configuraciones instrumentales

Configuración instrumental LC-QqQ

La configuración instrumental LC-QqQ descrita en el apartado 6.1 ha sido utilizada en el capítulo I de la presente Tesis Doctoral. La columna cromatográfica utilizada ha sido una columna Kinetex XB-C18 (50×3.00 mm, $2.6 \mu\text{m}$) de naturaleza *Core-Shell* suministrada por Phenomenex (Torrance, USA).

También se ha utilizado esta configuración instrumental en el capítulo II, apartado 1 y 2. En este caso se ha incluido una válvula de seis vías acoplada al compartimento de columnas del cromatógrafo de líquidos. En la figura 5 se muestra un esquema general del funcionamiento de dicha válvula en los apartados anteriormente descritos.

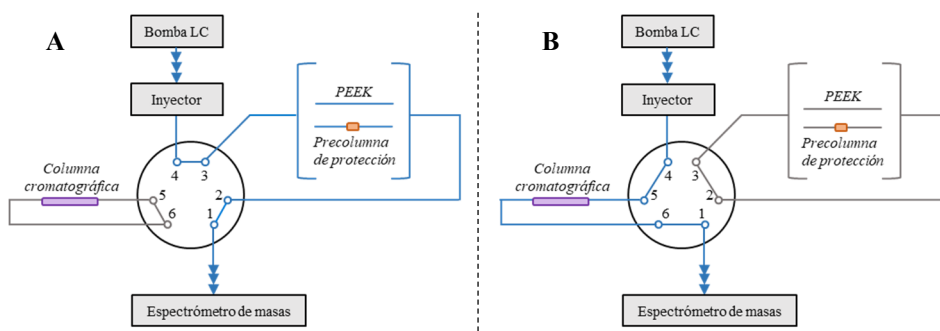


Figura 5. Esquema de las conexiones de la válvula de seis vías: A) métodos rápidos y B) métodos LC-MS

Las columnas cromatográficas utilizadas han sido:

- ✓ Cortecs C18 (50 × 2.1 mm, 2.7 μm), suministrada por Waters (Milford, USA) (capítulo II-1.1).
- ✓ Kinetex EVO C18 (150 × 2.1 mm, 2.6 μm), de naturaleza *Core-Shell*, de Phenomenex (capítulo II-1.2).

La precolumna de protección utilizada en ambos casos ha sido XBridge® BEH C18 (fase inversa) con una longitud de 10 mm, un diámetro interno de 2.1 mm y un tamaño de partícula de 3.5 μm de la casa comercial Waters.

Configuración instrumental UHPLC-Orbitrap

Esta configuración ha sido utilizada en el capítulo II, apartado 3. Las precolumnas de protección evaluadas han sido:

- ✓ XBridge® BEH C18 (2.1 × 10 mm, 3.5 μm) de Waters (figura 6). Permite trabajar en un rango de pH de 1-12.
- ✓ XBridge® Glycan BEH Amide (2.1 x 10 mm, 3.5 μm) de Waters (figura 6), con un mecanismo de separación de interacciones hidrofílicas. Permite trabajar en un rango de pH de 2-11.

- ✓ Primesep 200 (2.1 x 10 mm, 3 μ m) de SIELC (Wheeling, USA) (figura 7). Presenta un mecanismo de separación mixto, de intercambio catiónico y fase inversa. Esta precolumna es estable en el intervalo de pH de 1-7.5
- ✓ Hypersil GOLD AX (2.1 x 10 mm, 3 μ m) de Thermo Fisher Scientific (figura 8). Presenta un mecanismo de separación mixto, de intercambio aniónico e interacciones hidrofílicas. El pH en cual esta precolumna es estable está comprendido entre 2 y 8.



Figura 6. Precolumnas de protección XBridge® BEH C18 y Glycan BEH Amide

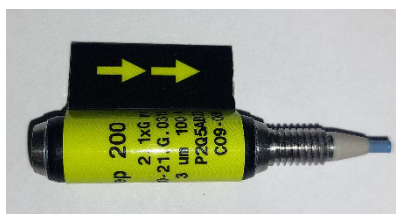


Figura 7. Precolumna de protección Primesep 200

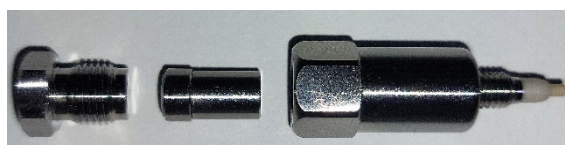


Figura 8. Precolumna de protección Hypersil GOLD AX

CAPÍTULO I

Estrategias no separativas

I.1. Artículo de investigación

Desarrollo de un método de cribado-confirmación para el análisis de compuestos endógenos polares en saliva basado en un sistema de cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem

Resumen

Existe un creciente interés en el desarrollo de métodos analíticos de alto rendimiento que permitan la determinación simultánea de un gran número de compuestos en muestras con matrices complejas. En este tipo de metodologías, junto con una reducción efectiva del tiempo de análisis, se requiere una adecuada selectividad y sensibilidad para abordar el análisis cuantitativo de compuestos de diferente naturaleza química de una manera fiable.

Una opción adecuada para abordar estos métodos se basa en el uso de estrategias no separativas utilizando la espectrometría de masas como sistema de detección. En algunos casos, la información así obtenida, puede ser suficiente para resolver un determinado problema analítico. Sin embargo, en otras situaciones, es necesario confirmar estos resultados mediante la realización adicional de una etapa de tipo separativo. Habitualmente, cuando se emplean de manera combinada métodos no separativos y métodos separativos, las técnicas analíticas empleadas en ambos casos suelen ser muy diferentes. El uso de la misma configuración instrumental en etapas separativas y no separativas ha sido propuesto para el análisis de compuestos orgánicos volátiles mediante una configuración basada en el acoplamiento de un generador de espacio de cabeza a un sistema de cromatografía de gases con espectrometría de masas (HS-GC-MS). Esta misma configuración instrumental es utilizada con fines de cribado y de confirmación de resultados: trabajando a altas temperaturas se anula la capacidad de separación de la columna GC (modo no separativo para fines de cribado) o bien aplicando una rampa de temperatura adecuada cuando se requiere la separación de los compuestos de cara a confirmar de los resultados.

En el caso de compuestos no volátiles, se han descrito algunas estrategias de alta capacidad de análisis que implican el manejo de muestras líquidas, pero, según nuestro conocimiento, hasta el momento, no se ha propuesto ninguna metodología en la cual el análisis no separativo y el análisis separativo se realicen empleando la misma configuración instrumental.

OBJETIVO

En este trabajo se describe el desarrollo y la validación de un método de alto rendimiento para compuestos no volátiles, basado en un esquema de cribado-confirmación, en el que la etapa de cribado (no separativa) y la etapa de confirmación (separativa) se llevan a cabo utilizando la misma configuración instrumental, un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas con un analizador de triple cuadrupolo. Este método se aplica a la determinación de un conjunto de compuestos endógenos polares de distinta naturaleza química (cadaverina, putrescina, triptófano, arginina, valina, histidina, lisina y creatinina) en saliva, como muestra biológica no invasiva. La alteración de los niveles endógenos de estos compuestos se ha relacionado con patologías de distinta gravedad, como enfermedad renal, ciertos tipos de cáncer o alteraciones congénitas del metabolismo. La posibilidad de seguir la evolución de ciertas enfermedades a través de métodos no invasivos es uno de los campos de interés prioritario en la investigación sanitaria. En bibliografía hay descritos algunos métodos para la determinación de estos analitos en saliva, pero en la mayoría de los casos son métodos que implican la derivatización de estos compuestos e incorporan alguna etapa de separación.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

La configuración desarrollada se basa en un sistema LC-MS/MS con una interfase de electrospray (ESI) y un analizador de triple cuadrupolo (QqQ) en la que se optimizan los distintos parámetros que afectan a las etapas de cribado y confirmación. Los analitos en estudio son creatinina junto con aminoácidos y poliaminas, sin derivatizar.

En primer lugar, se lleva a cabo la optimización de la separación cromatográfica en una columna de fase inversa C18 (Kinetex XB-C18, 50 x 3.0 mm, 2.6 μ m), requerida para la etapa de confirmación.

La retención de aminoácidos y poliaminas sin derivatizar en sistemas cromatográficos de fase inversa es muy deficiente debido a su polaridad y bajo peso molecular, por lo que se requiere el uso de reactivos formadores de pares iónicos. La formación de pares iónicos es una forma de incrementar el carácter hidrofóbico de estos compuestos, lo que les aporta una mayor afinidad por la fase estacionaria inversa y facilita su retención. Se ha descrito el uso de ácidos perfluorados como reactivos de par iónico para mejorar la retención de estos compuestos. En este trabajo, se utiliza el ácido heptafluorobutírico (HFBA) como reactivo de par iónico, el cual se añade a la fase móvil en una concentración 0.1% (v/v).

Con objeto de conseguir una separación adecuada de los analitos, se optimiza el gradiente de elución basado en mezclas de agua ultrapura y MeOH ambos conteniendo un 0.1% (v/v) de HFBA. El gradiente optimizado permite una adecuada separación de los compuestos en menos de 10 min, siendo el tiempo cromatográfico total de 16.5 min, teniendo en cuenta el tiempo necesario para reequilibrar la columna cromatográfica.

La detección mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) se lleva a cabo en la modalidad de seguimiento de reacción múltiple (MRM) seleccionando dos transiciones para cada analito, excepto para putrescina y cadaverina, para las cuales solo es posible seleccionar una transición MRM.

El tratamiento aplicado a las muestras de saliva se basa en un procedimiento de congelación/descongelación/centrifugación, seguido de una etapa de dilución del sobrenadante obtenido. Se ensayan distintas diluciones de la saliva, siendo una dilución 1:1 con agua ultrapura (0.1% v/v de HFBA) la que proporciona la mejor respuesta analítica sin presentar efectos de memoria (*carry over*).

La misma configuración instrumental LC-MS/MS se utiliza para el desarrollo de una estrategia no separativa rápida, con fines de cribado. En este caso, la fuerza de elución de la fase móvil debe ser suficientemente elevada para

evitar la retención de los analitos en la columna cromatográfica, de forma que éstos lleguen al equipo de espectrometría de masas generando una única señal de conjunto. Con este propósito, la fase móvil utilizada consiste en 100% MeOH con 0.1% de HFBA (v/v), con la que se comprueba que, efectivamente, los analitos pasan por la columna sin separación, llegando el espectrómetro de masas en un solo pico.

Se estudia la influencia del volumen de inyección y la velocidad de flujo de la fase móvil en la magnitud y morfología de la señal obtenida, obteniéndose como valores óptimos, un volumen de inyección de 10 μ L y una velocidad de flujo de la fase móvil de 1 mL/min. Valores inferiores de flujo proporcionan un excesivo ensanchamiento de pico, mientras que, para velocidades elevadas, las señales obtenidas son más bajas debido a la mayor dificultad para eliminar el disolvente durante el proceso de ionización por electrospray. El tiempo de análisis conseguido para esta etapa de cribado es de 1.5 min. En este caso no se requiere un tiempo adicional para reequilibrar la columna debido a que no se realiza separación cromatográfica.

Con esta configuración optimizada LC-MS/MS se propone un procedimiento de análisis en dos etapas: inicialmente, se realiza un cribado rápido de todas las muestras a analizar y, únicamente aquellas con valores anómalos de ciertos compuestos serían analizadas con la estrategia separativa de confirmación, pudiendo realizarse ambos análisis sin ninguna modificación de la configuración instrumental.

Evaluación de las características analíticas de las etapas de cribado y confirmación

Las características analíticas de las dos estrategias desarrolladas, cribado y confirmación, se evalúan en muestras de agua ultrapura dopada a seis niveles de concentración de los ocho analitos en estudio. Las rectas de calibración obtenidas muestran un comportamiento lineal, sin fallo de ajuste, con coeficientes de

determinación (R^2) satisfactorios y siempre superiores a 0.98. Sin embargo, la aplicación de una prueba t de Student (nivel de significación, 0.05) permite comprobar que las pendientes obtenidas para cada analito con ambas estrategias son significativamente diferentes ($p < 0.05$), probablemente debido a efectos de matriz en la modalidad no separativa (etapa de cribado).

Los límites de detección (*LOD, Limit Of Detection*) obtenidos en agua ultrapura están comprendidos entre $2.17 - 46.1 \times 10^{-3}$ mg/L para la etapa de cribado y entre $1.22 - 18.2 \times 10^{-3}$ mg/L, para la etapa de confirmación. Los límites de cuantificación (*LOQ, Limit Of Quantification*), aumentan a niveles de $7.23 - 153.3 \times 10^{-3}$ mg/L para la etapa de cribado y de $4.06 - 60.6 \times 10^{-3}$ mg/L para la etapa de confirmación.

Análisis de muestra de saliva

Para evaluar el efecto de matriz se comparan las pendientes de las rectas de calibración para cinco niveles de concentración, con ambas estrategias, en tres matrices: una muestra de agua ultrapura y dos muestras de saliva. Las comparaciones entre las pendientes obtenidas de las tres matrices muestran diferencias significativas ($p < 0.05$), según el test t de Student aplicado, lo que pone de manifiesto la existencia de efecto de matriz. Por esta razón, se propone la adición estándar de un punto para la cuantificación.

Los estudios de repetibilidad y reproducibilidad en una muestra de saliva no dopada (niveles de concentraciones endógenos) proporciona resultados consistentes aplicando ambas metodologías, con valores inferiores al 8% en el caso de repetibilidad y del 17 % en el caso de reproducibilidad. La exactitud, evaluada en términos de recuperación aparente, proporciona resultados entre 85-127% para el método no separativo de cribado y entre 80-120% para el método separativo de confirmación.

Finalmente, se analizan muestras de saliva de seis individuos aparentemente sanos con las estrategias propuestas (no separativa y separativa) con el fin de estimar las concentraciones endógenas de los compuestos en estudio. La cuantificación se realiza por adición estándar de un punto, analizando la muestra de saliva sin dopar y dopada a un nivel de 2,5-3 veces la concentración esperable de cada analito en saliva.

En todas las muestras de saliva analizadas se pueden detectar y cuantificar todos los compuestos estudiados con valores similares a los descritos en bibliografía y con resultados comparables cuando se usan ambas metodologías, excepto en casos puntuales en los que existen interferentes que dificultan su análisis.

En el análisis de muestra reales, se podría establecer un nivel de corte en la etapa de cribado, de forma que, únicamente aquellas muestras que contienen compuestos en concentraciones superiores al valor de corte establecido sean analizadas mediante el método de confirmación. El valor de corte debería corresponder al nivel de concentración de un determinado compuesto que actúe de biomarcador, que permita confirmar o rechazar la presencia de cierta patología en un individuo.

CONCLUSIONES

En este trabajo se describe el desarrollo y validación de una metodología que permite realizar etapas de cribado y confirmación en la misma configuración instrumental, basada en un sistema de cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. En la etapa de cribado, se desarrolla una estrategia no separativa rápida utilizando una fase móvil de fuerte poder de elución, para evitar la retención de los analitos. Para la etapa de confirmación, se optimiza un gradiente de elución que permite la adecuada separación cromatográfica de los compuestos en estudio.

Se propone la posibilidad de establecer un valor de corte para los compuestos de interés, y solo aquellas muestras que excedan ese valor en la etapa de cribado serían analizadas en la etapa de confirmación, sin ninguna modificación en la configuración instrumental para validar los resultados obtenidos.

La metodología propuesta ha sido aplicada a la determinación de un grupo de compuestos endógenos polares de distinta naturaleza (creatinina, poliaminas y aminoácidos) en muestras de saliva. Los resultados cuantitativos obtenidos en las etapas de cribado y confirmación están en buena concordancia, lo que demuestra la validez de la estrategia propuesta.

I.1. Artículo de investigación

Desarrollo de un método de cribado-confirmación para el análisis de compuestos endógenos polares en saliva basado en un sistema de cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem

Journal of Chromatography A 1590 (2019) 88-95



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma



Development of a screening and confirmatory method for the analysis of polar endogenous compounds in saliva based on a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric system



María Teresa Fernández-del-Campo-García, Ana María Casas-Ferreira*, Encarnación Rodríguez-Gonzalo, Bernardo Moreno-Cordero, José Luis Pérez-Pavón

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Salamanca, 37008 Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 July 2018
Received in revised form
10 December 2018
Accepted 1 January 2019
Available online 2 January 2019

Keywords:

Liquid chromatography
Tandem mass spectrometry
High-throughput screening analysis
Quantitative analysis
Multiclass polar compounds
Saliva samples

ABSTRACT

In this paper, a high-throughput approach is proposed for the sensitive screening and the confirmatory analysis of polar compounds in saliva using a two-step approach based on a liquid chromatographic system coupled to a triple quadrupole mass spectrometer. A reversed-phase chromatographic column was used in both steps and changes in the composition of the mobile phase allowed the screening and the confirmatory analyses to be performed with the same instrumental configuration. The proposed strategy has been tested for the determination of a multiclass group of polar endogenous compounds (creatinine, polyamines and amino acids) in saliva samples. The validation of the entire procedure showed consistent results for all the compounds in both steps. Repeatability and reproducibility were evaluated for both procedures, with values below 8% in the case of repeatability and 17% in the case of reproducibility. The instrumental limits of detection were found to be between 1.22×10^{-3} and 46.1×10^{-3} mg/L for creatinine and lysine, respectively, and accuracy of the method was evaluated in terms of apparent recoveries and values were found to be between 80 and 127%. Matrix effects were evaluated and it was found that the analytical outcome was influenced by the matrix of the sample. Thus, a one-point standard addition method was used for quantification. The optimized two-step procedure was applied to saliva samples from apparent healthy volunteers. Overall, satisfactory results were obtained in both steps, demonstrating its applicability for quantitative analysis of polar endogenous compounds in this kind of matrices.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In recent years, the development of high-throughput approaches for the simultaneous determination of a large number of compounds in complex samples is increasingly being demanded for research and for routine analytical laboratories application. Along with an effective reduction on the time of analysis, improvements in selectivity and sensitivity are also required to develop reliable methodologies capable of addressing the quantitative analysis of compounds of different chemical classes.

The use of non-separative methods is a very favourable option due to the reduction in the time needed to carry out the analysis, especially when a large number of samples are involved [1–3]. In some cases, the information obtained can be sufficient to solve

the analytical problem at hand [4,5], but in other situations, it is necessary to validate the results previously obtained by using an additional separative step [6,7]. Usually, the non-separative and the separative methods are based on very different analytical techniques [8–12].

An interesting approach based on the use of mass spectrometry has been reported in which screening and confirmatory analyses were performed using the same instrumental configuration. This approach has been fully evaluated for the analysis of volatile organic compounds by using, on one hand, direct headspace sampling coupled to mass spectrometry (HS-MS) for screening purposes and, on the other, a gas chromatographic separation step (HS-GC-MS) for confirmatory purposes [1,13,14]. The same instrumental configuration is used for both screening and confirmatory purposes by setting the oven temperature high enough to eliminate the separative capacity of the GC column (non-separative method) or by using a temperature gradient when the separation is required for confirmation. Recently, improvements to this

* Corresponding author.

E-mail address: anacasas@usal.es (A.M. Casas-Ferreira).

approach have been proposed such as the use of a programmed temperature vaporizer (PTV) as the injector device [15,16] or the direct coupling of microextraction by packed sorbents (MEPS) to the mass spectrometer [17].

High-throughput analytical methodologies involving liquid chromatographic approaches have also been proposed for non-volatile compounds [18–20]. Most of them propose a separative step and the use of high-resolution mass spectrometers. As an alternative to these configurations, different non-separative methods have been proposed, such as membrane extraction coupled to mass spectrometry [21] or direct infusion mass spectrometry [5,22,23]. However, none of them offers the possibility to use the same instrumental configuration for both non-separative and separative analyses.

This paper describes the development and validation of a high-throughput screening and confirmatory method that involves a two-step approach with the same instrumental configuration. It is based on a liquid chromatographic system coupled to a triple quadrupole mass spectrometer. A reverse-phase chromatographic column is included in the instrumental configuration. The two-step operation mode is simple: when the screening analysis is performed, the mobile phase has an eluting strength high enough to avoid the retention of the analytes in the chromatographic column; when confirmatory analysis is required, an elution gradient is proposed so the target compounds are separated and detected by the typical LC–MS/MS configuration. The main advantage of the proposed approach is that the instrumental configuration does not need to be modified in order to switch from the screening to the confirmatory analysis, unlike other reported methodologies in which the chromatographic column should be removed from the instrumental configuration and replaced by a polyether ether ketone (PEEK) tube to connect the automatic injector and the mass spectrometer [4,24–27]. It should be noted that although some LC systems allow injection to be performed using a multi-column setup, the methodology proposed here is an interesting alternative for those instruments that do not have this option.

In order to evaluate the possible use of the proposed approach, it was applied to the determination of a multiclass group of polar compounds (creatinine, polyamines and amino acids) in saliva samples from apparent healthy volunteers. These particular compounds have been associated with several diseases, such as chronic kidney disease [28], cancer [29,30] or inborn errors of metabolism [31]. Saliva can be quickly and easily collected through stress-free and non-invasive means and it has been shown that the concentration of many analytes in saliva and plasma are significantly related [32]. The possibility to trace the progression of certain diseases through non-invasive methods could be considered as one of the primary objectives in the field of Healthcare Research [32].

Different alternatives have been proposed for the determination of the aforementioned compounds in saliva samples, mainly based on separative methods. Underivatized salivary free amino acids have been determined by ultra-performance liquid chromatography mass spectrometry using hydrophilic interaction chromatography [33] or capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection [34]. Reverse phase liquid chromatography with fluorescence detection [35] or mass spectrometric detection [28,29,36,37] has been proposed for the determination of underivatized creatinine and derivatized polyamines in saliva samples. As derivatization reagents, different alternatives have been proposed, such as *o*-phthalaldehyde [35], 4-(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole [29] and phenyl-isothiocyanate [37]. Flow injection analysis-mass spectrometry has also been proposed for, as an example, the determination of derivatized polyamines, using phenyl-isothiocyanate as derivatization reagent [37] or the determination of creatinine in urine samples [38]. To the best of our knowledge, this is the first time that a two-step

screening-confirmatory procedure based on the same instrumental configuration is proposed for these type of compounds.

2. Experimental section

2.1. Chemicals

Putrescine (Put), cadaverine (Cad), creatinine (Cre), valine (Val), lysine (Lys), histidine (His), arginine (Arg) and tryptophan (Tryp) were supplied by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). All standards were of analytical grade. Methanol, as well as heptafluorobutyric acid (HFBA), were also supplied by Sigma-Aldrich. The ultra-high quality (UHQ) water used throughout the study was obtained with a Wasserlab Ultramatic water purification system (Noain, Spain).

2.2. Standard solutions and samples

Stock solutions of the target analytes were prepared in UHQ water at a concentration of 2500 mg/L and stored in darkness at 4 °C. These solutions were used to spike the water and saliva samples at the different concentrations analysed.

Unstimulated saliva was obtained from six apparent healthy adults of both sexes and was directly collected into a 10-mL glass vial and stored at -20 °C until use. The subjects ingested no food or beverages and did not brush their teeth within 1 h before sample collection. After thawing, the saliva was centrifuged at 1811 ×g during 10 min to precipitate the denatured mucins. The supernatant (500 µL) was added to a vial and mixed with the same volume of UHQ water (0.1% HFBA, v/v) and an aliquot (10 µL) was injected into the system.

2.3. Instrumental configuration

Screening and confirmatory analyses were performed in a LC–MS/MS system consisting of a 1200 series HPLC system with a binary pump, a membrane degasser, an autosampler, a six-port valve and a 6410 LC/MS triple quadrupole (QqQ) mass spectrometer equipped with an electrospray (ESI) ionization source, all from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). The chromatographic column used in both steps was a Kinetex XB–C18 column (50 mm × 3.0 mm) from Phenomenex (Torrance, CA, USA) packed with 2.6 µm core-shell particles. The MS was operated in positive ion mode. The ESI source nebulizer pressure and voltage were set at 50 psi and +4000 V, respectively. Nitrogen was used as the drying (12 L/min, 350 °C) and collision gas. Analyte quantification was carried out under Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode. All the parameters related to the instrumental configuration are listed in Table 1.

For screening purposes, the retention capacity of the column was eliminated using an isocratic mobile phase with a high eluting power (100% methanol, 0.1% HFBA, v/v) at a flow rate of 1 mL/min. The column was thermostatted at 25 °C. Under these conditions, the sample reaches the MS/MS detector directly being analyzed in less than 1.5 min.

For confirmatory purposes, the LC–MS/MS system worked in separative mode by using a mobile phase based on UHQ water (Solvent A) and methanol (Solvent B) mixtures. In both solvents, 0.1% HFBA (v/v) was added. The flow rate was set to 0.5 mL/min and the column was thermostatted at 25 °C. The solvent gradient used was as follows: 0% B for 0.5 min, then 0% to 70% B from 0.5 to 8.5 min, hold at 70% B during 2 min, and then returning to 0% B from 10.5 to 11.5 min and holding conditions during 5 min in order to re-equilibrate the column. The total chromatographic run time was 16.5 min.

Table 1
LC and MS/MS parameters of the target analytes.

Compound	t _R (min)	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Fragmentor (V)	Collision energy (eV)
Creatinine	2.1	114.1	44.1/86.1	81	17/9
Lysine	2.5	147.1	84.1/130.1	41	13/5
Histidine	2.5	156.1	110.1/93.0	81	13/21
Putrescine	3.5	89.1	72.1	56	5
Valine	4.1	118.1	72.1/55.1	41	5/21
Arginine	4.5	175.1	70.1/60.1	81	21/13
Cadaverine	4.6	103.1	86.1	56	5
Tryptophan	8.0	205.1	188.1/146.1	81	1/13

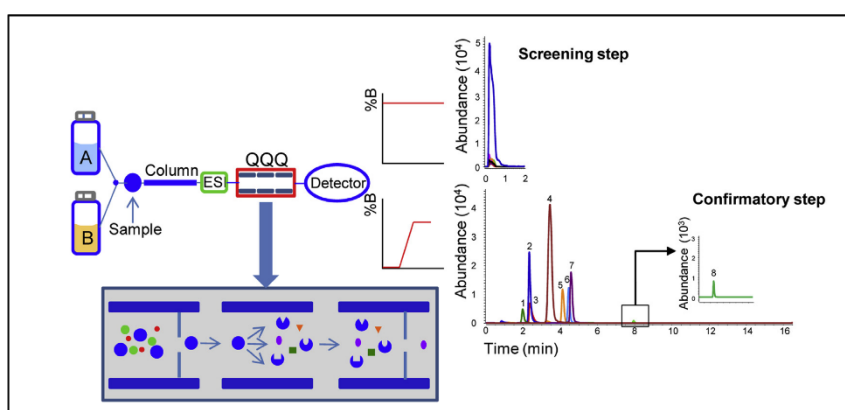


Fig. 1. Schematic diagram of the screening and confirmatory steps. 1, creatinine; 2, lysine; 3, histidine; 4, putrescine; 5, valine; 6, arginine; 7, cadaverine; 8, tryptophan.

Fig. 1 shows a general scheme of the proposed methods.

3. Results and discussion

The strategy described here is based on a LC–MS/MS system equipped with a reverse-phase column. To study the possibilities of the approach, several parameters were optimized, taking into account that, to perform the screening and the confirmatory analyses using the same instrumental configuration, the composition of the mobile phase is a critical parameter.

3.1. Optimization of the experimental LC–MS/MS conditions

For reversed-phase liquid-chromatographic analysis of underivatized amino acids and polyamines, the use of perfluorinated acids as ion-pair reagents have been described to improve the separation of these compounds on C18 columns [39,40]. Here, heptafluorobutyric acid (HFBA) was selected for such purpose and was added to the mobile phase at a concentration of 0.1% v/v.

The chromatographic separation of the target compounds was accomplished by using a solvent gradient based on UHQ water with 0.1% HFBA, v/v (solvent A) and methanol with 0.1% HFBA, v/v (solvent B). Four different elution conditions were evaluated. Best results were achieved with the following gradient: 0% B for 0.5 min, then 0% to 70% B from 0.5 to 8.5 min, hold at 70% B during 2 min, and then returning to 0% B from 10.5 to 11.5 min and holding conditions during 5 min. The flow rate was set at 0.5 mL/min. Under these conditions, a suitable separation was achieved in less than 10 min and another 6 min were required to reequilibrate the column. The total chromatographic run time was 16.5 min.

Multiple reaction monitoring (MRM) was used as the MS data acquisition mode. Two transitions were selected per analyte

(Table 1) except for putrescine and cadaverine, where only one MRM transition was possible. Dwell time was evaluated in the range of 10–100 ms and, finally, a value of 10 ms was chosen, resulting in a rate of 5.29 cycles per second.

For saliva analysis, samples were first centrifuged and then a simple dilution step of the supernatant was assayed. Different dilutions in UHQ water (0.1% HFBA, v/v) were evaluated: 1:1, 1:5 and 1:10, v/v, using an unspiked saliva sample, in order to obtain the best analytical response without carryover effects. A 1:1 (v/v) dilution of the saliva sample showed the best analytical results. In order to evaluate carryover effects, quantification of the analytes in an UHQ water sample injected after the analysis of the 1:1 diluted saliva sample was performed. No signals of the target analytes were observed, so carryover effects were considered negligible. Therefore, this dilution was selected for further experiments.

3.2. Screening analysis

The screening analysis was accomplished in the same instrumental LC–MS/MS configuration including the chromatographic column. In this case, elution was carried out under isocratic conditions, maintaining the concentration of mobile phase at 100% methanol (with 0.1% HFBA, v/v). Thus, the separation ability of the column was eliminated and all the analytes eluted in a single peak that is directed toward the mass spectrometer.

Unlike other methods of analysis reported in the literature based on flow injection mass spectrometry [24,26,27] where the connection of the autosampler to the mass spectrometer is always done using a polyether ether ketone (PEEK) capillary (around 0.13 mm inner diameter), in this work the chromatographic column (3.00 mm inner diameter) was maintained during the screening step. This could imply the widening of the injection band.

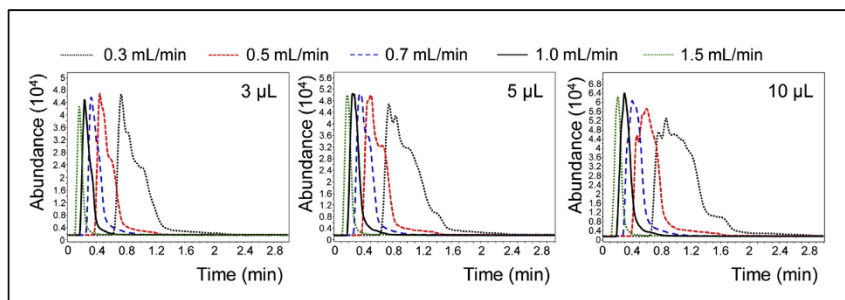


Fig. 2. Total ion current (TIC) corresponding to different injection volumes (3, 5 and 10 μL) and carrier flows (0.3, 0.5, 0.7, 1, 1.5 mL/min).

In order to optimize this screening step, different injection volumes (3–10 μL), as well as different flow rates (0.3–1.5 mL/min) were simultaneously evaluated (Fig. 2). Experiments were performed injecting a diluted saliva sample. As expected, higher injection volumes provided higher signal intensities but also wider peaks. Regarding the flow rate of the mobile phase, low values involved peak broadening; but at the highest flow rate assayed, lower signals were obtained due to the increased difficulty to eliminate the solvent during the electrospray ionization process [41]. Finally, 10 μL and 1 mL/min were chosen as the optimum value for injection volume and flow rate, respectively.

Under these conditions, it was possible to analyse each sample in less than 1.5 min. In addition, no time is required to reequilibrate the column since there is no chromatographic separation. The screening step described allowed us to perform around 30 injections per hour. These results confirm the high-throughput capacity of the proposed strategy.

A common problem encountered in all methods based on flow injection analysis mass spectrometry is the presence of interfering compounds, i.e., isobaric molecules, due to the elimination of the previous separation process. These interfering compounds can yield parent ions of the same mass-to-charge ratio, and if they exhibit similar gas-phase ion chemistry, they can also produce fragment ions of the same mass-to-charge ratio, causing quantification interferences when MRM is used [24]. This is even more significant when only one transition is available, which is the case for putrescine and cadaverine. Fig. 3 shows a chromatogram of an unspiked saliva sample. In this case, for each transition, no additional peaks were found for the majority of the compounds, except for lysine, arginine and tryptophan. However, other saliva samples could present different profile signals.

In the methodology described here, we propose to establish a cut-off value (i.e. a disease biomarker concentration level used to confirm or refute the presence of a disease in a subject) so that only samples that exceed it are analysed chromatographically for confirmation, without the need for any instrumental modifications. Therefore, only the suspicious samples would be analysed by the complete LC-MS/MS methodology to avoid false positives. In order to apply this method to a specific disease, it would be necessary to carry out an exhaustive evaluation of the existing literature to select the most significant analytes and the required cut-off values. Several publications have already shown elevated concentrations of several of the compounds evaluated here, such as putrescine, cadaverine and tryptophan, in saliva samples from breast, oral and pancreatic cancer patients [36,42], demonstrating the huge potential of the proposed methodology.

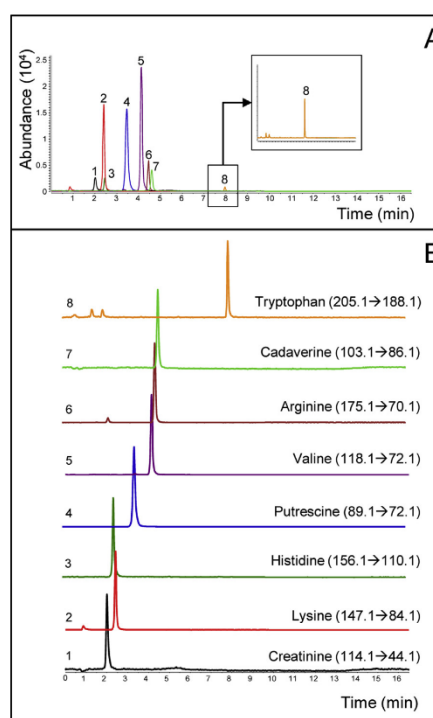


Fig. 3. A. MRM chromatogram of an unspiked saliva sample; B. individual MRM transitions of the target analytes. 1, creatinine; 2, lysine; 3, histidine; 4, putrescine; 5, valine; 6, arginine; 7, cadaverine; 8, tryptophan.

3.3. Evaluation of the screening and confirmatory approaches based on LC-MS/MS

The analytical characteristics of the screening and confirmatory approaches were evaluated for a mixture of the eight target compounds in water (Table 2). Standard calibration curves were obtained by analysing aqueous standard solutions of the analytes at six concentration levels. For putrescine, cadaverine and creatinine the concentration range was from 0.01 to 0.10 mg/L and for amino acids, the concentration range was from 0.02 to 0.20 mg/L.

Table 2
Analytical characteristics for the screening and confirmatory methods.

	Range (µg/L)	LC-MS/MS confirmatory method				MS/MS screening method			
		Slope	R ²	LOD (10 ⁻³ × mg/L)	LOQ (10 ⁻³ × mg/L)	Slope	R ²	LOD (10 ⁻³ × mg/L)	LOQ (10 ⁻³ × mg/L)
Creatinine	LOQ -100	244 ± 3	0.9993	1.22	4.06	113 ± 3	0.9973	2.17	7.23
Lysine	LOQ -200	16.4 ± 0.4	0.9981	10.7	35.6	6.2 ± 0.4	0.9930	46.1	153.5
Histidine	LOQ -200	13.3 ± 0.5	0.9946	18.2	60.6	4.1 ± 0.3	0.9863	33.3	110.9
Putrescine	LOQ -100	117 ± 4	0.9958	2.86	9.52	165 ± 3	0.9986	1.97	6.56
Valine	LOQ -200	40.7 ± 0.8	0.9987	11.5	38.3	18.9 ± 0.5	0.9995	31.6	105.2
Arginine	LOQ -200	10.9 ± 0.7	0.9854	2.92	9.72	8.5 ± 0.4	0.9963	11.5	38.3
Cadaverine	LOQ -100	80 ± 2	0.9974	1.91	6.39	79 ± 2	0.9998	2.24	7.46
Tryptophan	LOQ -200	7.8 ± 0.5	0.9856	6.50	21.6	5.7 ± 0.4	0.9890	9.52	31.7

Table 3
Comparison of the slopes obtained for the calibration curves obtained in UHQ water and in two saliva samples from different subjects with the screening and confirmatory methods.

Compound	LC-MS/MS confirmatory method			MS/MS screening method		
	UHQ water	Saliva 1	Saliva 2	UHQ water	Saliva 1	Saliva 2
Creatinine	227.8 ± 0.6	172 ± 3	123 ± 4	133.3 ± 0.7	70 ± 1	34 ± 3
Lysine	86 ± 2	35 ± 1	81 ± 2	24.4 ± 0.1	5.4 ± 0.2	18 ± 2
Histidine	77.6 ± 0.9	24.3 ± 0.9	41 ± 2	22.1 ± 0.3	6.3 ± 0.2	7.9 ± 0.3
Putrescine	71 ± 2	47 ± 2	51.4 ± 0.7	58 ± 3	38 ± 5	41 ± 1
Valine	162 ± 7	130 ± 4	152 ± 6	96.6 ± 0.6	13.3 ± 0.4	18.0 ± 0.8
Arginine	69 ± 1	52.7 ± 0.7	44.1 ± 0.9	50.3 ± 0.8	17.5 ± 0.7	11.8 ± 0.9
Cadaverine	84.4 ± 0.3	67 ± 1	68.2 ± 0.8	64 ± 1	20 ± 1	12.2 ± 0.3
Tryptophan	37.6 ± 0.3	36.7 ± 0.3	39.2 ± 0.4	29.2 ± 0.1	4.3 ± 0.1	6.1 ± 0.2

Each level was analysed in triplicate. All the calibration lines displayed linear behaviour. Their validity was checked using ANOVA analysis and it was observed that they did not exhibit any lack of fit. The values for the determination coefficient (R²) were higher than 0.98 in all cases, as shown in Table 2.

The slopes obtained with the screening and confirmatory methods were compared using a Student's *t*-test to determine whether the slopes were significantly different (significance level, 0.05). The calculated value of *t* for most of the compounds was higher than the critical value. Thus, there were significant differences in the slopes for the two methods. These results showed that when the screening method was used, signal suppression/enhancement occurred due to the differences in the elution conditions of the analytes compared to the confirmatory method (mobile phase composition) [43] and due to the presence of co-eluting species. This was because the chromatographic separation process had not been carried out before MS/MS detection.

The instrumental limits of detection (LODs) and the limits of quantification (LOQs) for both screening and confirmatory methods were also evaluated using a UHQ water sample spiked with the compounds at different concentrations: 10 µg/L for Put, Cad, Creat and 20 µg/L for amino acids. For non-separative analysis, the concentrations used for Lys, His and Val were increased to 40 µg/L. LODs and LOQs were determined as the analyte concentration giving a signal equal to the blank signal plus three and ten times the standard deviation of the blank, respectively [44]. For the confirmatory method, LODs values between 1.22 × 10⁻³ and 18.2 × 10⁻³ mg/L and LOQs values in the 4.06 × 10⁻³–60.6 × 10⁻³ mg/L range were obtained. For the screening method, higher values were obtained, with LODs between 2.17 × 10⁻³ and 46.1 × 10⁻³ mg/L and LOQs between 7.23 × 10⁻³ and 153.3 × 10⁻³ mg/L. The accuracy of the method was also evaluated in terms of apparent recoveries, calculated as the ratio of the measured concentration to the spiked concentration (expressed in percentages). The concentrations used for the calculations were those corresponding to the middle point of the calibration curve (i.e. 0.06 mg/L for creatinine, putrescine and cadaverine and 0.12 mg/L for amino acids). Values were found to be in the range of 88–111 % (for valine and putrescine, respectively).

3.4. Analysis of saliva samples

In order to evaluate matrix effects, calibration curves were obtained with both approaches for five calibration levels in three different matrices: UHQ water and two saliva samples from different subjects. Concentration intervals were selected based on the expected concentration of the compounds in saliva. These were from 10 to 30 mg/L for putrescine, from 0.4 to 1.6 mg/L for cadaverine, from 0.2 to 0.8 mg/L for creatinine and from 2.0 to 8.0 mg/L for amino acids. Each calibration level was analysed in triplicate. All these curves exhibited linear behaviour and did not exhibit any lack of fit.

The slopes of the calibration curves are shown in Table 3. They were compared by a Student's *t*-test (significance level, 0.05) [44,45]. Again, the calculated value of *t* for most of the compounds was higher than the critical value. Thus, there were significant differences in the slope of the different matrices evaluated. Similar results were obtained using both methods of analysis. In order to overcome the matrix effects, a one-point standard addition method was proposed for quantification. This is an alternative to the addition of isotopically labelled internal standards. Although the use of these compounds is the most powerful strategy for correcting suppression effects and improving quantitation accuracy, their use could be rather expensive, especially in a multi-class analysis and, in some situations, there are no commercial available standards [41,46].

Method reliability was evaluated in terms of the repeatability and reproducibility values, expressed as relative standard deviations (RSD, %), using an unspiked saliva sample (endogenous concentrations of the compounds). The sample was analysed ten times on the same day for repeatability and on three different days (three replicates per day) for reproducibility. Results are shown in Table 4. RSD values were found highly satisfactory, with values below 8% in the case of repeatability and 17% in the case of reproducibility. The results were found to be similar for both approaches, the screening and confirmatory methods. The accuracy of the method was also evaluated in terms of apparent recoveries. A saliva sample was spiked with the analytes at different concentration levels, 10 mg/L for putrescine, 3.0 mg/L for cadaverine, 0.2 mg/L

Table 4
Recovery, repeatability and reproducibility values (%) obtained for a saliva sample.

Compound	LC-MS/MS confirmatory method			MS/MS screening method		
	Recovery	Repeatability	Reproducibility	Recovery	Repeatability	Reproducibility
Creatinine	106	2.8	7.8	98	3.7	8.8
Lysine	90	7.7	10.0	99	3.5	9.7
Histidine	80	3.7	5.9	89	4.6	5.3
Putrescine	110	3.6	6.2	127	3.6	9.6
Valine	120	2.9	8.5	85	2.3	8.8
Arginine	100	1.8	11.8	95	4.6	16.7
Cadaverine	98	3.2	5.7	97	3.4	7.2
Tryptophan	100	1.9	5.1	85	3.6	6.1

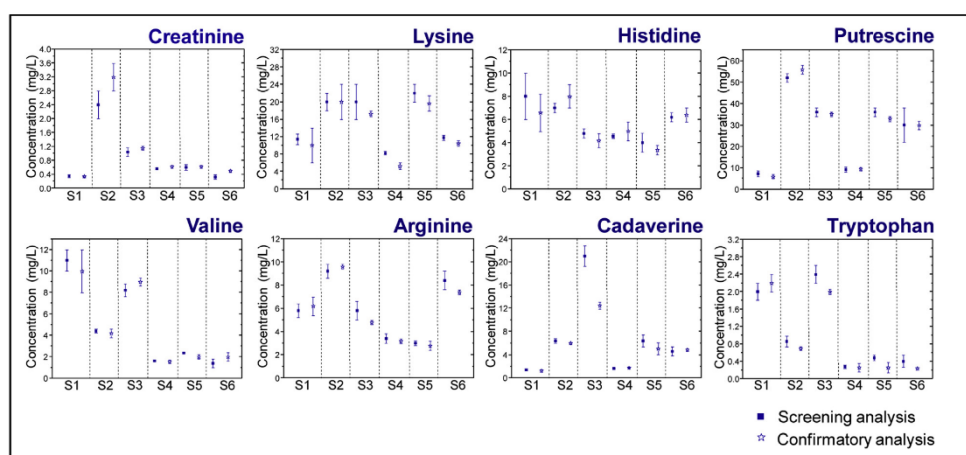


Fig. 4. Concentrations of the target compounds in different saliva samples (S1–S6). Uncertainty bars represent the prediction intervals. Screening results correspond to the filled squares and confirmatory results correspond to the empty stars.

for creatinine and 2.0 mg/L for the amino acids. The one-point standard addition protocol was used for the accurate determination of the compounds. The saliva sample was analysed before being spiked, and the area of the signals obtained for each compound were subtracted to the signals of the standard addition. Results are shown in Table 2. Values were found to be between 85 and 127% for the screening analysis (values found for valine and putrescine, respectively) and between 80 and 120% for the confirmatory analysis (values found for histidine and valine, respectively).

Due to the elevated concentrations of the compounds in saliva samples and the need to use the standard addition method, carry-over effects were evaluated after the injection of the spiked level of the saliva sample. It was shown that carryover existed at these elevated concentrations, although the magnitude did not reach 0.4% (with values of 0% for creatinine, valine and tryptophan). A second injection of an UHQ water sample was also evaluated. Carryover was observed but only for lysine and putrescine, with values below 0.1%. Although the magnitude of the effect was very small, it could be recommended to inject an UHQ water sample after the analysis of the spiked level of the saliva sample.

Finally, saliva samples from six subjects were analysed with the proposed methods in order to estimate the concentration of these endogenous compounds. All samples were obtained from apparent healthy individuals of both sexes and were analysed in triplicate. The one-point standard addition protocol was applied; two vials were prepared per sample (three replicates each). The first vial comprised the unspiked saliva sample (1:1 v/v, saliva:UHQ water,

0.1% HFBA). The second vial comprised the spiked saliva sample (1:1 v/v, saliva:UHQ water, 0.1% HFBA). The concentrations added in each case were calculated as 2.5 to 3 times the expected concentration of the analyte in the saliva sample. Final ratios were found to be between 1.8 and 4 times the real concentration.

As shown in Fig. 4, all compounds were detected and quantified in all of the samples. For each subject, results corresponding to the screening method correspond to the filled square and the empty star corresponds to the confirmatory method. The concentrations found for all of the analytes are in good agreement with previous published research [37,47,48]. Similar results were obtained using both methods of analysis. However, differences were observed for several compounds as, for example, tryptophan in sample 3. In this case, interfering compounds were observed in the chromatograms of this sample. Fig. 5 represents the workflow of the proposed LC-MS/MS strategy. First, samples are analysed using the screening method. As can be seen, samples from subject 1 and 3 are suspicious because the target analyte concentration is very close or higher than the concentration level established to confirm or refute the presence of the disease in the subject. Thus, only those samples were analysed using the chromatographic approach for confirmatory purposes. After chromatographic analysis, subject 1 is still suspicious and further evaluation of the subject would be needed (i.e. medical diagnosis). However, subject 3 could be discarded as suspicious because the concentration found using the confirmation step was below the cut-off value, avoiding a false positive result.

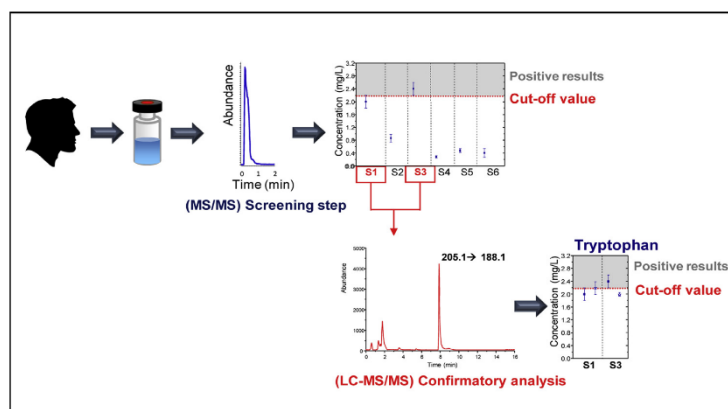


Fig. 5. Workflow of the proposed methodology. Uncertainty bars represent the prediction intervals. Screening results correspond to the filled squares and confirmatory results correspond to the empty stars.

4. Conclusions

In the present study, a rapid and reliable screening and confirmatory methodology for the analysis of polar compounds is described. The instrumental configuration is based on a liquid chromatographic system coupled to a triple quadrupole mass spectrometer. A two-step procedure has been developed for screening and confirmatory purposes without any instrumental modification. When the screening step is performed, a mobile phase with a strong eluting power was used in order to prevent the analyte retention; when the confirmation step was required, a solvent gradient is proposed in order to obtain the appropriate chromatographic separation of the target compounds. In addition, a cut-off value (i.e. a disease biomarker concentration level used to confirm or refute the presence of a disease in a subject) for the target compounds could be established and only those samples that exceed that value in the screening step can be easily analysed using the confirmatory procedure to validate the results obtained. In order to check the proposed approach, it was applied to determine a multiclass group of polar compounds (creatinine, polyamines and amino acids) in saliva samples. The quantitative results obtained by the screening and confirmatory steps were in good agreement, demonstrating the validity of the proposed strategy.

According to the obtained results, the screening step offers the important advantage of an effective reduction in time analysis, as around 30 injections per hour can be analysed. On the contrary, it presents some demerits, as possible matrix affects, since no separation takes place. The main advantage of the strategy proposed here is that the screening analysis step can be easily switched to the confirmatory step involving chromatographic separation without any modification in the configuration of the LC-MS/MS instrument.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for funding projects CTQ2013-47993-P/BQU and CTQ2017-87886-P/BQU, the Junta de Castilla y León for projects SA162U14 and SA055P17 and the Samuel Solórzano Foundation (FS/19-2017). M^a Teresa Fernández-del-Campo-García is also thankful to the University of Salamanca for a predoctoral fellowship.

References

- [1] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, C. García Pinto, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, A. Guerrero Peña, Strategies for qualitative and quantitative analyses with mass spectrometry-based electronic noses, *TrAC Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 257–266.
- [2] F. Biasioli, C. Yeretizian, T.D. Märk, J. Dewulf, H. Van Langenhove, Direct-injection mass spectrometry adds the time dimension to (B)VOC analysis, *TrAC Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 1003–1017.
- [3] R. González-Domínguez, A. Sayago, A. Fernández-Recamales, Direct infusion mass spectrometry for metabolomic phenotyping of diseases, *Bioanalysis* 9 (2017) 131–148.
- [4] R. González-Domínguez, T. García-Barrera, J.L. Gómez-Ariza, Application of a novel metabolomic approach based on atmospheric pressure photoionization mass spectrometry using flow injection analysis for the study of Alzheimer's disease, *Talanta* 131 (2015) 480–489.
- [5] R. González-Domínguez, R. Castilla-Quintero, T. García-Barrera, J.L. Gómez-Ariza, Development of a metabolomic approach based on urine samples and direct infusion mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 465 (2014) 20–27.
- [6] Y. Shigematsu, I. Hata, G. Tajima, Useful second-tier tests in expanded newborn screening of isovaleric acidemia and methylmalonic aciduria, *J. Inher. Metab. Dis.* 33 (2010) 283–288.
- [7] D. Oglesbee, K.A. Sanders, J.M. Lacey, M.J. Magera, B. Casetta, K.A. Strauss, S. Tortorelli, P. Rinaldo, D. Matern, Second-Tier test for quantification of alloisoleucine and branched-chain amino acids in dried blood spots to improve newborn screening for maple syrup urine disease (MSUD), *Clin. Chem.* 54 (2008) 542–549.
- [8] O. Van Den Hauwe, M. Schneider, A. Sahin, C.H. Van Peteghem, H. Naegeli, Immunochemical screening and liquid chromatographic-tandem mass spectrometric confirmation of drug residues in edible tissues of calves injected with a therapeutic dose of the synthetic glucocorticoids dexamethasone and flumethasone, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 326–330.
- [9] S.R. Savu, L. Silvestro, A. Haag, F. Sörgel, A confirmatory HPLC-MS/MS method for ten synthetic corticosteroids in bovine urines, *J. Mass Spectrom.* 31 (1996) 1351–1363.
- [10] A.M. Rojano-Delgado, F. Priego-Capote, M.D. Luque de Castro, R. De Prado, Screening and confirmatory analysis of glyoxylate: a biomarker of plants resistance against herbicides, *Talanta* 82 (2010) 1757–1762.
- [11] H.M. Ashwin, S.L. Stead, J.C. Taylor, J.R. Startin, S.F. Richmond, V. Homer, T. Bigwood, M. Sharman, Development and validation of screening and confirmatory methods for the detection of chloramphenicol and chloramphenicol glucuronide using SPR biosensor and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 529 (2005) 103–108.
- [12] A. DiBattista, N. McIntosh, M. Lamoureux, O. Al-Dibrashi, P. Chakraborty, P. Britz-McKibbin, Temporal signal pattern recognition in mass spectrometry: a method for rapid identification and accurate quantification of biomarkers for inborn errors of metabolism with quality assurance, *Anal. Chem.* 89 (2017) 8112–8121.
- [13] J.L. Pérez Pavón, C. García Pinto, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, A. Guerrero Peña, A method for the detection of hydrocarbon pollution in soils by headspace mass spectrometry and pattern recognition techniques, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2034–2041.

- [14] M. del Noga Sánchez, E. Hernández García, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Fast analytical methodology based on mass spectrometry for the determination of volatile biomarkers in saliva, *Anal. Chem.* 84 (2012) 379–385.
- [15] M. del Noga Sánchez, P.A. Callejo Gómez, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, A.P. Crisolino Pozas, A. Sánchez Rodríguez, Sensitivity enhancement in the determination of volatile biomarkers in saliva using a mass spectrometry-based electronic nose with a programmed Temperature Vaporizer, *Anal. Chem.* 86 (2014) 7890–7898.
- [16] A. García Ramos, A. Pérez Antón, M. del Noga Sánchez, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Urinary volatile fingerprint based on mass spectrometry for the discrimination of patients with lung cancer and controls, *Talanta* 174 (2017) 158–164.
- [17] A.M. Casas Ferreira, B. Moreno Cordero, J.L. Pérez Pavón, Use of microextraction by packed sorbent directly coupled to an electron ionization single quadrupole mass spectrometer as an alternative for non-separative determinations, *J. Chromatogr. B* 1043 (2017) 74–80.
- [18] A. Vonaparti, E. Lyrís, Y.S. Angelis, I. Panderi, M. Koupparis, A. Tsantili-Kakoulidou, R.J.B. Peters, M.W.F. Nielen, C. Georgakopoulos, Preventive doping control screening analysis of prohibited substances in human urine using rapid-resolution liquid chromatography/high-resolution time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 1595–1609.
- [19] X. Meng, H. Bai, T. Guo, Z. Niu, Q. Ma, Broad screening of illicit ingredients in cosmetics using ultra-high-performance liquid chromatography-hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometry with customized accurate-mass database and mass spectral library, *J. Chromatogr. A* 1528 (2017) 61–74.
- [20] R.J. Fan, F. Zhang, X.P. Chen, W.S. Qi, Q. Guan, T.Q. Sun, Y.L. Guo, High-throughput screening and quantitation of guanidino and ureido compounds using liquid chromatography-drift tube ion mobility spectrometry-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 961 (2017) 82–90.
- [21] V. Terropoli, G. Famigliani, P. Palma, A. Cappiello, G.W. Vandergrift, E.T. Krogh, C.G. Gill, Condensed Phase Membrane Introduction Mass Spectrometry with direct electron ionization; on-line measurement of PAHs in complex aqueous samples, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 27 (2016) 301–308.
- [22] M.A. García-Sevillano, T. García-Barrera, F. Navarro, Z. Montero-Lobato, J.L. Gómez-Ariza, Shotgun metabolomic approach based on mass spectrometry for hepatic mitochondria of mice under arsenic exposure, *Biomaterials* 28 (2015) 341–351.
- [23] K.O. Boernsen, S. Gatzek, G. Imbert, Controlled protein precipitation in combination with chip-based nanospray infusion mass spectrometry. An approach for metabolomics profiling of plasma, *Anal. Chem.* 77 (2005) 7255–7264.
- [24] S.C. Nanita, L.G. Kaldon, Emerging flow injection mass spectrometry methods for high-throughput quantitative analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 23–33.
- [25] M. Trojanowicz, K. Kolacińska, Recent advances in flow injection analysis, *Analyst* 141 (2016) 2085–2139.
- [26] H.G.J. Mol, R.C.J. van Dam, Rapid detection of pesticides not amenable to multi-residue methods by flow injection-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 6817–6825.
- [27] S.C. Nanita, A.M. Pentz, F.Q. Bramble, High-throughput pesticide residue quantitative analysis achieved by tandem mass spectrometry with automated flow injection, *Anal. Chem.* 81 (2009) 3134–3142.
- [28] M. Suzuki, M. Furuhashi, S. Sesoko, K. Kosuge, T. Maeda, K. Todoroki, K. Inoue, J.Z. Min, T. Toyo'oka, Determination of creatinine-related molecules in saliva by reversed-phase liquid chromatography with tandem mass spectrometry and the evaluation of hemodialysis in chronic kidney disease patients, *Anal. Chim. Acta* 911 (2016) 92–99.
- [29] H. Tsutsui, T. Mochizuki, K. Inoue, T. Toyama, N. Yoshimoto, Y. Endo, K. Todoroki, J.Z. Min, T. Toyo'oka, High-throughput LC-MS/MS based simultaneous determination of polyamines including N-acetylated forms in human saliva and the diagnostic approach to breast cancer patients, *Anal. Chem.* 85 (2013) 11835–11842.
- [30] R.A. Casero, L.J. Marton, Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases, *Nat. Rev. Drug Discov.* 6 (2007) 373–390.
- [31] C.M. Mak, H.C. Lee, A.Y. Chan, C.W. Lam, Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 50 (2013) 142–162.
- [32] J. Liu, Y. Duan, Saliva: a potential media for disease diagnostics and monitoring, *Oral Oncol.* 48 (2012) 569–577.
- [33] F. Cheng, Z. Wang, Y. Huang, Y. Duan, X. Wang, Investigation of salivary free amino acid profile for early diagnosis of breast cancer with ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Clin. Chim. Acta* 447 (2015) 23–31.
- [34] Y.H. Deng, H. Wang, H.S. Zhang, Determination of amino acid neurotransmitters in human cerebrospinal fluid and saliva by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 3088–3097.
- [35] M. Venza, M. Visalli, D. Cicciu', D. Teti, Determination of polyamines in human saliva by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr. B* 757 (2001) 111–117.
- [36] T. Takayama, H. Tsutsui, I. Shimizu, T. Toyama, N. Yoshimoto, Y. Endo, K. Inoue, K. Todoroki, J.Z. Min, H. Mizuno, T. Toyo'oka, Diagnostic approach to breast cancer patients based on target metabolomics in saliva by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *Clin. Chim. Acta* 452 (2016) 18–26.
- [37] Z.T. Dame, F. Aziat, R. Mandal, R. Krishnamurthy, S. Bouatra, S. Borzouie, A.C. Guo, T. Sajed, L. Deng, H. Lin, P. Liu, E. Dong, D.S. Wishart, The human saliva metabolome, *Metabolomics* 11 (2015) 1864–1883.
- [38] M. Niesser, B. Koletzko, W. Peissner, Determination of creatinine in human urine with flow injection tandem mass spectrometry, *Ann. Nutr. Metab.* 61 (2012) 314–321.
- [39] M.R. Häkkinen, T.A. Keinänen, J. Vepsäläinen, A.R. Khomutov, L. Alhonen, J. Jänne, S. Auriola, Analysis of underivatized polyamines by reversed phase liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45 (2007) 625–634.
- [40] M. Piraud, C. Vianey-Saban, K. Petritis, C. Elfakir, J. Steghens, D. Bouchu, Ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric analysis of 76 underivatized amino acids of biological interest: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 1587–1602.
- [41] F. Gosetti, E. Mazzucco, D. Zampieri, M.C. Gennaro, Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3929–3937.
- [42] M. Sugimoto, D.T. Wong, A. Hirayama, T. Soga, M. Tomita, Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles, *Metabolomics* 6 (2010) 78–95.
- [43] R. Kostianen, R.J. Kauppila, Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 299–685.
- [44] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, fifth ed., Pearson Education Limited, Harlow, 2005.
- [45] R.M. González Paredes, C. García Pinto, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, In situ derivatization combined to automated microextraction by packed sorbents for the determination of chlorophenols in soil samples by gas chromatography mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1359 (2014) 52–59.
- [46] S. Ito, K. Tsukada, Matrix effect and correction by standard addition in quantitative liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins, *J. Chromatogr. A* 943 (2002) 39–46.
- [47] M. Cooke, N. Leeves, C. White, Time profile of putrescine, cadaverine, indole and skatole in human saliva, *Arch. Oral Biol.* 48 (2003) 323–327.
- [48] M. Tsuruoka, J. Hara, A. Hirayama, M. Sugimoto, T. Soga, W.R. Shankle, M. Tomita, Capillary electrophoresis-mass spectrometry-based metabolome analysis of serum and saliva from neurodegenerative dementia patients, *Electrophoresis* 19 (2013) 2865–2872.

CAPÍTULO II

Estrategias basadas en el uso de precolumnas de protección

II.1.

Precolumnas de protección acopladas a espectrometría de masas con un analizador triple cuadrupolo

II.1.1. Artículo de investigación

Desarrollo de un método rápido y fiable para la determinación de poliaminas en orina utilizando una precolumna de protección para un fraccionamiento de baja resolución como paso previo a espectrometría de masas. Comparación con análisis por inyección en flujo-espectrometría de masas

Resumen

En la actualidad hay un gran interés en el desarrollo de metodologías rápidas y fiables que permitan realizar el análisis en el menor tiempo posible de un gran número de muestras y que utilicen instrumentación habitual disponible en los laboratorios de investigación. Una opción adecuada para estas metodologías es la espectrometría de masas ya que permite realizar determinaciones con alta sensibilidad y selectividad con tiempos cortos o largos de análisis dependiendo de las técnicas a las que se encuentre acoplada. Las técnicas en las que la muestra se introduce directamente en el espectrómetro de masas proporcionan tiempos cortos de análisis en comparación con aquellas en las que se realiza un paso separativo previo a la detección. Sin embargo, las metodologías no separativas presentan varias desventajas, como el efecto de matriz y la presencia de interferencias isobáricas que pueden dificultar la cuantificación de los analitos si estos no presentan patrones de fragmentación específicos. Estos problemas pueden aliviarse utilizando diferentes técnicas de tratamiento de muestra, pero, en muchos casos estas implican una gran manipulación de las mismas.

OBJETIVO

El objeto de este trabajo es el desarrollo de un método rápido y fiable para la determinación de compuestos endógenos de interés clínico en orina. Para ello se evalúan dos tipos de estrategias: a) análisis por inyección en flujo acoplado a espectrometría de masas (FIA-MS/MS) y b) la utilización de una precolumna de protección (*gC*, *guard Column*) previa al análisis mediante espectrometría de masas (*gC-FIA-MS/MS*). Con objeto de poder evaluar ambas propuestas, se desarrolla un método de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS/MS) que permite comparar y confirmar los resultados obtenidos.

Como analitos objeto de estudio se seleccionan un conjunto de poliaminas (putrescina, cadaverina, espermidina, espermina, N-acetilputrescina y N-acetilespermina) y compuestos relacionados, como el ácido gamma-

aminobutírico (GABA) y ornitina, por su implicación en patologías graves tales como el cáncer. En bibliografía se pueden encontrar diferentes metodologías para la determinación de estos compuestos en orina, principalmente, mediante separación cromatográfica. En menor medida hay descritas algunas estrategias no separativas, aunque normalmente implican laboriosos tratamientos de muestra o procesos de derivatización.

Según nuestro conocimiento, es la primera vez que la metodología rápida (gC-FIA-MS/MS) desarrollada en este trabajo ha sido aplicada a la determinación de estos compuestos en orina.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Las muestras de orina se congelan (-20°C) y se descongelan a temperatura ambiente de forma previa al análisis. Se evalúan distintos procedimientos para la precipitación de proteínas, como la adición de un medio orgánico (MeOH) en presencia de diferentes ácidos volátiles (ácido heptafluorobutírico (HFBA), ácido fórmico y ácido acético) y posterior centrifugación. Sin embargo, los resultados obtenidos con estos procedimientos son similares a los que se obtienen con una simple centrifugación tras la descongelación de la orina, por lo que se selecciona este por su simplicidad.

Estudios previos encontrados en bibliografía han descrito que los compuestos evaluados pueden interaccionar con distintos materiales. Por ello, para la filtración del sobrenadante obtenido tras la centrifugación, se ensayan distintos filtros de diferentes materiales (nailon, politetrafluoroetileno hidrofílico y fluoruro de polivinilideno) y jeringas (de vidrio y de plástico desechables). Cuando se utilizan jeringas de plástico se observa una fuerte disminución de la señal analítica para algunos de los compuestos en estudio. En cuanto al material de los filtros, se obtienen resultados similares con todos ellos, excepto para ornitina y GABA. Para estos dos compuestos, la señal analítica es ligeramente

superior cuando se utilizan filtros de nylon. Por lo tanto, para estudios posteriores se utilizan jeringas de vidrio y filtros de nylon.

Se evalúa el medio de dilución de la muestra, considerando la adición de un reactivo de par iónico para minimizar las interacciones anteriormente descritas. Los reactivos evaluados son ácido trifluoroacético (TFA) y ácido heptafluorobutírico (HFBA) en un rango de concentraciones de 0.01-0.1% (v/v) en agua ultrapura. No se utilizan concentraciones más altas debido a la supresión iónica que pueden ocasionar estos reactivos. Los mejores resultados se obtienen con HFBA a una concentración 0.1% (v/v). De la misma forma, se ha descrito que la presencia de ciertos modificadores orgánicos, como el ácido propiónico (PrA), pueden mejorar la señal analítica de analitos básicos cuando se utilizan ácidos fuertes volátiles como reactivos de par iónico. Sin embargo, en nuestro caso, el uso del PrA muestra ciertos problemas, como morfologías de pico deficientes, efecto memoria y presencia de señales correspondientes a compuestos desconocidos, por lo que se decide utilizar únicamente HFBA (0,1 %, v/v), que se añade tanto en el medio de dilución, como en la fase móvil. Se estudia el efecto de la dilución de la orina (1/1, 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/50, 1/75 y 1/100). Los mejores resultados se obtienen con una dilución 1/10.

La inyección directa en MS/MS mediante FIA es la primera de las configuraciones ensayadas como método rápido para estudios de cribado de muestras. En este método (FIA-MS/MS), se utiliza como fase portadora MeOH con 0.1% HFBA (v/v) en condiciones isocráticas. Se estudia la influencia de la velocidad de flujo (entre 0.2 y 1.0 mL/min) y del volumen de inyección (entre 1 y 20 μ L). Los mejores resultados se obtienen con un flujo de 0.5 mL/min y un volumen de inyección de 5 μ L, siendo el tiempo de análisis de 1.4 min. El tiempo total requerido para el análisis con esta configuración es de 2.2 min por muestra, incluyendo el tiempo requerido para la inyección

Los resultados obtenidos muestran que con esta configuración no se obtiene suficiente sensibilidad para la determinación fiable de algunos de los compuestos analizados, debido a sus bajas concentraciones en orina y al efecto de supresión iónica que se produce por la introducción directa de la muestra en el espectrómetro de masas.

Con el objeto de solucionar este problema, se propone la incorporación de la precolumna de protección en el sistema instrumental, previa al espectrómetro de masas (gC-FIA-MS/MS). Se utiliza una precolumna XBridge® C18 (2.1 × 10 mm, 3.5µm). Como fase móvil se utiliza una mezcla de agua ultrapura y MeOH, ambas con un 0.1% HFBA (v/v), en condiciones isocráticas.

Se evalúa el efecto de distintos porcentajes de agua (hasta un 98%) en la fase móvil. Para valores elevados se observa un fraccionamiento de los compuestos estudiados, debido a la retención de los analitos en el material de fase inversa presente en la precolumna. Se observa un fraccionamiento en tres grupos: primer grupo, GABA, ornitina y N-acetilputrescina; segundo grupo, putrescina y cadaverina y tercer grupo, espermidina, espermina y N-acetilespermina. Además, se observa un incremento de las señales analíticas y una ligera mejora en su morfología en comparación con las señales obtenidas con FIA-MS/MS. Este comportamiento se atribuye a la limpieza de la matriz y a la ligera separación de los compuestos por el uso de la precolumna. Los mejores resultados se obtienen para una composición de la fase móvil de un 80 % de agua ultrapura (0,1 % de HFBA, v/v) y 20 % de MeOH (0,1 % de HFBA, v/v). Sin embargo, con estas condiciones, el tercer grupo de compuestos se retienen excesivamente, por lo que se incluye una inyección de MeOH (modo secuencial de inyección) tras la inyección de la muestra. Con estas condiciones, se observa una adecuada reproducibilidad de los tiempos de retención de los analitos con valores inferiores al 4.5%. El tiempo análisis con esta configuración es 1.4 min, siendo el tiempo total, de 2.7 min, incluyendo el tiempo requerido para la inyección. Estos tiempos son ligeramente superiores a los obtenidos con la metodología FIA-MS/MS (2.7

min versus 2.2 min), pero adecuados para llevar a cabo un análisis rápido de las muestras.

A continuación, se propone un método de confirmación basado en cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS/MS) con una columna de fase inversa Cortecs C18 (2.1×50 mm, $2.7 \mu\text{m}$) y una elución por gradiente con mezclas de agua ultrapura y MeOH, con un 0.1% HFBA (v/v). El gradiente optimizado permite una adecuada separación de los compuestos en menos de 23 min. El tiempo total de análisis es de 32 min teniendo en cuenta el tiempo necesario para reequilibrar la columna cromatográfica.

Finalmente, se optimiza la detección mediante espectrometría de masas en tándem, en modo de adquisición MRM, estudiando diferentes voltajes de fragmentación (entre 5 y 200V) y energías de colisión (entre 1 y 60 eV). El tiempo de registro de cada ion (*dwell time*) es de 20 ms como valor óptimo para todos los compuestos.

Evaluación de interferencias

La presencia de interferencias isobáricas es uno de los principales inconvenientes de los métodos basados en la inyección directa en MS, especialmente cuando se utilizan analizadores de baja resolución.

En este trabajo, se realiza una profunda evaluación de la posible existencia de compuestos interferentes de los compuestos en estudio. Después de una exhaustiva búsqueda bibliográfica en artículos científicos previos y en bases de datos como *Human Metabolome Database* y *Metlin*, se identifican un total de 20 compuestos como posibles interferentes isobáricos para los cuales se plantean cuatro situaciones:

- i. No hay interferencia debido a diferencias en el patrón de fragmentación del interferente y el compuesto de interés.
- ii. Igual patrón de fragmentación, pero ausencia del interferente en orina.

- iii. Igual patrón de fragmentación, pero contribución no significativa del interferente debido a su baja concentración en orina.
- iv. Interferencia confirmada.

Solo GABA y espermina tienen compuestos isobáricos interferentes que presentan la misma transición principal y son colina para GABA y N^G, N^G-dimetilarginina para espermina. Además, se comprueba que la concentración de estos compuestos en orina es superior a la concentración de GABA y espermina. Para la correcta cuantificación de estos compuestos se utilizan sus transiciones secundarias, para las cuales no se observan interferencias.

Evaluación de las características analíticas de los métodos de cribado y confirmación

Las características analíticas del método rápido gC-FIA-MS/MS y de la estrategia de confirmación LC-MS/MS se evalúan en orina sintética dopada a siete niveles de concentración. Como patrones internos marcados isotópicamente se utilizan putrescina-d₄, GABA-d₆ y espermidina-¹³C₄. Las rectas de calibración muestran un comportamiento lineal, sin fallo de ajuste, con coeficientes de determinación (R²) satisfactorios y siempre superiores a 0.98. Las pendientes de las rectas de calibración obtenidas con los dos métodos (gC-FIA-MS/MS y LC-MS/MS) son significativamente diferentes (p<0.05), según la comparación que se realiza mediante una prueba t de Student (nivel de significación, 0.05). Se evalúan los LODs y LOQs para ambos métodos. Para gC-FIA-MS/MS, se encuentran LODs entre 0.6-21 µg/L y LOQs entre 2.0-70 µg/L. Para LC-MS/MS, se determinan unos LODs y LOQs de 0.4-8.2 y 1.2-27 µg/L, respectivamente. La exactitud se evalúa en términos de recuperación aparente, con valores entre 80-120% en ambos métodos, excepto en el caso de espermina, que presenta un valor de recuperación de 69% en el método cromatográfico. También se obtienen resultados satisfactorios de repetibilidad y reproducibilidad.

Análisis de muestras de orina

Para mostrar la aplicabilidad de la metodología descrita se analizan dos muestras de orina natural mediante gC-FIA-MS/MS y LC-MS/MS. Las dos matrices presentan diferentes pendientes de calibración (según el test t-Student para un nivel de significación 0.05) lo que indica la existencia de efecto de matriz. Debido a ello, se propone la adición estándar de un punto y la normalización con patrón interno para la cuantificación de los analitos en las muestras. Se comparan los valores de concentración cuantificados con los dos métodos (gC-FIA-MS/MS y LC-MS/MS) y se observan resultados similares para todos los compuestos, excepto para espermidina, que muestra una menor concentración con el método gC-FIA-MS/MS. Estos resultados muestran que la estrategia gC-FIA-MS/MS permite una correcta cuantificación putrescina, cadaverina, espermina, N-acetilputrescina, N-acetilespermina, GABA y ornitina. Las concentraciones determinadas para estos compuestos coinciden con las indicadas en trabajos publicados previamente.

CONCLUSIONES

El método gC-FIA-MS/MS desarrollado en este trabajo es una estrategia rápida y fiable que permite la correcta determinación y cuantificación de poliaminas y compuestos relacionados en muestra de orina.

La incorporación de la precolumna de protección previa a la introducción de la muestra en el espectrómetro de masas proporciona un fraccionamiento de baja resolución de los compuestos estudiados, con una notable mejora de la sensibilidad y la morfología de la señal respecto a la obtenida mediante FIA-MS/MS, sin incrementar significativamente el tiempo de análisis. Además, incorpora una etapa de limpieza de la fracción más polar de la matriz. La comparación de los resultados cuantitativos obtenidos con la configuración gC-FIA-MS/MS con los obtenidos mediante el sistema cromatográfico LC-MS/MS proporciona resultados satisfactorios para todos los compuestos en estudio,

excepto para espermidina. Estos resultados ponen de manifiesto que la estrategia gC-FIA-MS/MS desarrollada podría usarse como metodología rápida para un cribado inicial de las muestras, las cuales solo serían analizadas por el método cromatográfico de confirmación (LC-MS/MS) si mostraran valores anómalos de los compuestos de interés.

II.1.1. Artículo de investigación

Desarrollo de un método rápido y fiable para la determinación de poliaminas en orina utilizando una precolumna de protección para un fraccionamiento de baja resolución como paso previo a espectrometría de masas. Comparación con análisis por inyección en flujo-espectrometría de masas

Microchemical Journal 158 (2020) 105223



Development of a fast and reliable methodology for the determination of polyamines in urine by using a guard column as a low-resolution fractioning step prior to mass spectrometry. Comparison with flow injection-mass spectrometry analysis



María Teresa Fernández-del-Campo-García, Ana María Casas-Ferreira*, Encarnación Rodríguez-Gonzalo, Bernardo Moreno-Cordero, José Luis Pérez-Pavón

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Salamanca, 37008 Salamanca, SPAIN

ARTICLE INFO

Keywords:
Guard column
Flow injection analysis
Liquid chromatography
Polyamines
Tandem mass spectrometry

ABSTRACT

In this paper, we propose a fast and reliable method for the determination of polyamines and related compounds in urine samples using flow injection analysis directly coupled to a triple quadrupole mass spectrometer, with the inclusion of a guard column (XBridge® C18 guard column; 2.1 × 10 mm, 3.5 μm) as a low-resolution fractioning step prior to MS analysis. The use of the guard column resulted in a sensitivity enhancement, a critical issue because of the low concentration of the target compounds found in urine samples. Moreover, it represents an interesting alternative to the use of other sample preparation techniques. Using this instrumental setup, each sample can be analyzed in 2.7 min, which makes this method appropriate for screening analysis. A method including a chromatographic separation step is also proposed, if confirmation of the results is required (samples with abnormal concentrations of the compounds). In this case, the total analysis time was 33.3 min. All the steps involved in sample preparation and instrumental conditions were optimized. In both methods, an ion-pairing reagent was added to the mobile phase and to the diluted sample. For the screening method, the limits of detection were found to be between 0.6 and 21 μg/L and the limits of quantification between 2.0 and 70 μg/L. Influence of the matrix was confirmed; thus quantification was performed using the one-point standard addition method and normalization to IS. Comparable results were obtained with the screening and the confirmatory methods when applied to urine samples of apparently healthy volunteers, showing that the proposed screening methodology is suitable for rapid and reliable analysis of polyamines and related compounds in these samples.

1. Introduction

Nowadays, there is an increasing interest on the development of fast and reliable methodologies that allow the analysis of a great number of samples within the shortest time possible and with instrumental setups common in research laboratories [1,2]. With the use of mass spectrometry (MS), it is possible to perform the analysis with high sensitivity and selectivity and, depending on the coupled technique, with shorter or longer times of analysis. The use of strategies where the sample is introduced directly into the mass spectrometer allows shorter times of analysis compared to those in which there is a previous separation step (chromatographic or electrophoretic). In this way, it is possible to perform high throughput analysis, a very important aspect in routine analysis and when there is a large number of samples to analyze [2].

However, the use of these non separative methodologies based on direct injection into the mass spectrometer presents several disadvantages, such as matrix effects due to the absence of a previous separation step and the presence of isobaric interferences that could hamper analyte quantification if no specific fragmentation patterns are present [1,3]. These problems can be alleviated by the use of different sample treatment techniques, but, in many cases, imply extensive sample manipulation, specifically if the compounds are present at low concentrations in complex matrices [4–8].

Using guard columns is a widespread practice in analytical chemistry with different purposes, mainly as column protection [9–11] or as a sample clean-up step [12,13]. It also has been proposed the use of guard columns as chromatographic columns in order to perform liquid chromatography (LC), with times of analysis from 7 to 14 min [14–16].

* Corresponding author.

E-mail address: anacasas@usal.es (A.M. Casas-Ferreira).

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105223>

Received 22 April 2020; Received in revised form 23 June 2020; Accepted 24 June 2020

Available online 27 June 2020

0026-265X/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Recently, Couchman et al. [17] have proposed an ultra-fast LC-MS method using a guard column as the chromatographic one for the sub-minute analysis of therapeutic drugs in plasma samples, but it required the use of high performance pumps and double-needle autosamplers.

In the present work, we propose a fast and reliable method for the determination of polyamines and related compounds in urine samples. Two different options were evaluated, i) the use of flow injection analysis coupled to a mass spectrometer with an electrospray ion source and a triple quadrupole (FIA-MS/MS) and ii) the inclusion of a guard column as a low-resolution fractionation step prior to MS quantification (gC-FIA-MS/MS), in order to increase the sensitivity of the analysis. The final objective is the development of a method for screening purposes. A methodology including a chromatographic separation step (LC-MS/MS) is also proposed in order to confirm the results obtained with the screening one. This chromatographic method will be only used when required, that is, to analyze samples with altered concentrations of the compounds.

Polyamines and acetylated polyamines have long been associated with cancer [18] and elevated concentrations of these compounds have been found in urine of patients diagnosed with this disease [19–21]. Ornithine and gamma-amino butyric acid, also included in this study, are involved in the metabolic pathway of polyamines [18,22]. Accordingly, the development of fast and reliable methodologies for their determination is important, especially using samples that do not involve invasive sampling procedures. Several methodologies have already been proposed for the determination of the aforementioned compounds in urine samples, mainly using a chromatographic separation step [21,23–26]. Other non-separative methodologies have also been proposed, but they involve laborious sample preparative steps, such as solid phase extraction or the use of a derivatization reaction [4,5,27]. To the best of our knowledge, this is the first time that this fast approach (gC-FIA-MS/MS) is applied to the determination of these compounds in urine samples.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Putrescine (Put), cadaverine (Cad), spermidine (Spd), spermine (Spm), N-acetylputrescine (N-AcPut), N¹-acetylspermine (N-AcSpm), L-ornithine (Orn) and γ -aminobutyric acid (GABA) were supplied by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Isotopically labelled internal standards putrescine-2,2,3,3-d₄ (Put-d₄), spermidine-(butyl-¹³C₄) (Spd-¹³C₄) and 4-aminobutyric acid-2,2,3,3,4,4-d₆ (GABA-d₆) were also supplied by Sigma-Aldrich, as well as methanol, heptafluorobutyric acid (HFBA), trifluoroacetic acid (TFA), propionic acid (PrA) and creatinine (Cre).

Sodium chloride, magnesium sulfate, ammonia, hydrochloric acid, formic acid and acetic acid were supplied by Scharlau (Barcelona, Spain). Potassium chloride, calcium chloride and urea were supplied by Panreac (Barcelona, Spain).

For isobaric interference evaluation, 4-acetamidobutyric acid, agmatine, 2-aminoisobutyric acid, D-2-aminobutyric acid, DL-3-aminoisobutyric acid, L-asparagine, choline, N^ω,N^ω-dimethylarginine, glycylglycine, 4-guanidinobutyric acid, hexylamine, isobutyric acid, isopentylamine, isovaleric acid, morpholine, pyruvic acid, sebacic acid, 3-ureidopropionic acid, uridine and valeric acid were supplied by Sigma-Aldrich.

The ultra-high quality (UHQ) water used throughout the study was obtained with a Wasserlab Ultramatic purification system (Noain, Spain).

2.2. Standard solutions and synthetic urine

Stock solutions of the target compounds were prepared in UHQ water at a concentration of 2500 mg/L. Cre was prepared at

concentration of 1000 mg/L, as well as the isotope-labeled internal standards. All the solutions were stored in darkness at 4 °C and were used to spike the water, the synthetic urine and the urine samples at the different concentrations analyzed. Synthetic urine was prepared according to the procedure of N.C. Van de Merbel et al [28].

2.3. Sample preparation

First morning urine samples were collected from apparently healthy individuals of both sexes using disposable sterile containers and were frozen and stored at – 20 °C in the dark until analysis. After thawing at room temperature, samples were centrifuged at 1815g during 10 min to precipitate the proteins. The supernatant was filtered with nylon filters (0.45 μ m, 17 mm i.d.) and 100 μ L were added to a vial and mixed with 900 μ L of UHQ water (0.1% HFBA, v/v). An aliquot (5 μ L) was injected into the system. Creatinine content was measured using the Jaffé method [29].

2.4. Instrumental configuration

The LC-MS/MS instrumental setup consisted of a 1200 series LC chromatograph equipped with a binary pump, a membrane degasser, an autosampler, two six-port valves and a 6410 LC/MS triple quadrupole (QqQ) mass spectrometer, all from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). The triple quadrupole mass spectrometer was equipped with an electrospray ionization (ESI) source. The QqQ nebulizer pressure and voltage were set at 35 psi and + 4000 V, respectively. Nitrogen was used as the drying (12 L/min, 350 °C) and collision gas. Analyte quantification was carried out under Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode (unit mass resolution). All the parameters related to the instrumental configuration are listed in Table S1 (Supplementary material).

For LC-MS/MS analyses, a Cortecs C18 reversed-phase analytical column (2.1 \times 50 mm, 2.7 μ m) from Waters (Milford, MA, USA) was used. The mobile phase consisted of a UHQ water (Solvent A) and MeOH (Solvent B) mixture. In both solvents, 0.1% HFBA (v/v) was added. The solvent gradient used was as follows: 2% B for 12 min, then from 2% to 70% B from 12 min to 14 min, hold at 70% B during 6 min, and then returning to 2% B from 20 to 22 min and holding conditions during 10 min. The flow rate used was 0.15 mL/min. Under these conditions, a suitable separation was achieved in less than 23 min and 9 min were required to re-equilibrate the column. The total chromatographic runtime was 32 min. Taking into account the time required for injection, each sample was analyzed in 33.3 min.

For FIA-MS/MS analyses, a six-port valve was used to switch from the screening to the chromatographic method without any instrumental modification. A peek tube was used to connect the valve to the mass spectrometer. This analysis mode was used for sample treatment optimization. Final conditions implied isocratic conditions, 100% MeOH (0.1% HFBA, v/v), and a flow rate of 0.5 mL/min. Total analysis runtime was 1.4 min. Each sample was analyzed in 2.2 min.

In order to improve the analysis, a XBridge® C18 guard column (2.1 \times 10 mm, 3.5 μ m) was included in the FIA-MS/MS configuration. Isocratic conditions were used, with a mobile phase composition of 80% H₂O (0.1% HFBA, v/v) and 20% MeOH (0.1% HFBA, v/v) and the flow rate used was 0.5 mL/min. Total analysis runtime was 1.4 min. Each sample was analyzed in 2.7 min.

3. Results and discussion

3.1. Urine sample preparation

Protein content is a critical parameter because of ion suppression, especially when the samples are injected directly into the mass spectrometer. Protein precipitation was accomplished by the use of an acidified organic medium with different volatile acids [24,26]. HFBA,

formic acid and acetic acid were tested (0.1%, v/v), using MeOH as organic medium. The precipitation medium (300 µL) was mixed with 250 µL of the thawed urine and the mixture was vortexed (5 min) and centrifuged at 1815g for 10 min. The results obtained with the addition of the aforementioned acidified organic media were compared with those obtained when just a centrifugation step (1815g, 10 min) was used after thawing the sample at room temperature [21]. No significant differences were observed among procedures. Thus, the simplest one was selected; this was, just a centrifugation step after urine sample thawing.

3.1.1. Influence of the material used for sample filtration

After centrifugation, the supernatant was filtered in order to avoid particles in suspension. It has been described that some polyamines can interact with some materials [30]. For this reason, an evaluation of the kind of filters and syringes used for filtration was performed. Two types of syringes (glass syringes and disposable plastic syringes made of polypropylene and polyisoprene) and three types of filters (nylon, hydrophilic polytetrafluoroethylene and polyvinylidene fluoride, 0.45 µm) were assayed.

Regarding syringe nature, no significant differences were obtained for most of the compounds with both types of syringes, except for Spd, Spm and N-AcSpm with plastic ones, for which a dramatic decrease was observed (Fig. S1). The decrease of the signal was found to be between 25 and 70%. Reproducibility values were also worsened (RSD values between 20 and 57%). Thus, glass syringes were used for further experiments.

With regard to the kind of filters used, similar results were obtained for all of them, except for Orn and GABA. For these two compounds, the analytical signal was slightly superior when nylon filters were used (Fig. S2). Therefore, nylon filters (0.45 µm, 17 mm i.d.) were selected.

3.1.2. Study of sample dilution medium

Firstly, experiments were focused on the study of the stability of the compounds in the injection vial. As stated before, it has been described that the addition of an ion-pairing reagent to the medium avoids the adsorption of some of the target compounds on some material [30]. Thus, an evaluation of the addition of an ion-pairing reagent to the dilution media (UHQ water) was accomplished. TFA was initially selected at a concentration of 0.1% (v/v). The formation of the ion pair improved the stability of the compounds. The reproducibility of the analysis (5 replicates in two different days) was improved, especially for Spd and Spm, with values from 11 and 71% to 5 and 7% when TFA was present. Based on these results, a deeper evaluation of the ion-pairing reagents as well as the organic modifiers used was performed. Reagents were added to the dilution medium (UHQ water), as well as to the carrier phase (MeOH) (Table 1).

As ion-pairing reagents, TFA and HFBA were tested in the 0.01–0.1% (v/v) range. Higher values were not evaluated due to ionization suppression [30,31]. For TFA, the best results were obtained for a concentration of 0.05% v/v (Fig S3). For HFBA, the best results were obtained for a concentration of 0.1% v/v (Fig S4). When the results obtained with the two ion-pairing reagents were compared, an increment on the analytical signal was observed when HFBA 0.1% v/v was

used (Fig S5), in good agreement with previous published results [30,32]. Thus, this concentration of ion-pairing reagent was selected for further experiments.

Propionic acid (PrA) was tested as organic modifier (0.1–2%, v/v). Several studies have demonstrated that the addition of PrA, a weak acid, enhance the analytical signal for basic analytes when volatile strong acids are used as ion-pairing reagents (i.e. TFA or HFBA). PrA competes with TFA or HFBA anions for protons and TFA or HFBA, which are more volatile than PrA, will evaporate faster from the droplet during the electrospray ionization process [30,33]. This study was performed with and without HFBA 0.1% (v/v). In both situations, the best results were obtained when 2% v/v PrA was used. However, several issues were observed. These were poor peak shapes and high carry-over values (up to 27% when the ion-pairing reagent was not used). This behavior could be attributed to the disruption in the formation of the ion pair caused by the PrA. Moreover, it was observed a peak corresponding to an interfering compound (unknown source). This isobaric interference appeared when a blank sample was injected and it shared the transition 203.1 → 129.1 with Spm. We also checked the possibility of adding the PrA (2%, v/v) exclusively to the dilution medium, but the presence of the interfering compound remained.

Finally, we compared the results obtained with the use of HFBA (0.1%, v/v) and HFBA (0.1%, v/v) and PrA (2%, v/v) altogether, this last one added just in the dilution medium. A urine sample spiked with the compounds at a concentration of 1 mg/L was used for this experiment. Results showed that the best analytical response was obtained when HFBA was used alone (Fig. S6). Signal increments ranged between 63% for N-AcPut to 106% for Spm. Thus, it was decided to use HFBA (0.1%, v/v) in both dilution medium and carrier phase for further experiments.

3.1.3. Urine dilution ratio

Different dilution ratios were evaluated (1/1, 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/50, 1/75 and 1/100, v/v). Fig. 1 shows the results obtained for GABA and Cad with the FIA-MS/MS and LC-MS/MS methods, respectively. Similar trends were found for the rest of the target compounds. A decrease in the dilution ratio did not imply a proportional increment on the analytical signal due to matrix effects. Moreover, it was observed that for 1/1 and 1/5 dilution ratios, two peaks appeared for Orn (2.0 and 2.9 min). This effect was only present for this compound at its endogenous concentration and it disappeared at dilution ratios higher than 1/10. The same effect was observed when synthetic urine was used as matrix and can be related to the ion content of the matrix, as it has been previously described for bile acids [34] or glyphosate [35]. Thus, based on these results, a 1/10 dilution ratio was selected for further experiments.

3.2. Optimization of the screening analysis

Screening analysis was first optimized using the FIA-MS/MS configuration. Isocratic conditions, i.e. methanol (0.1% HFBA, v/v), were used. Different flow rates (0.2–1.0 mL/min) and injection volumes (1–20 µL) were evaluated. For this experiment, creatinine signal was also recorded (transition 114.1 → 44.1) as an indicator of the passage of

Table 1
Sample treatment: study of ion-pairing reagents and organic modifiers (best results are highlighted in bold).

Sample	Solvent for Sample Dilution (UHQ water)	Carrier/mobile phase (MeOH)
UHQ water (spiked with target compounds at 1 mg/L)	HFBA (0.01–0.1% , v/v)	HFBA (0.01–0.1% ,v/v)
	TFA (0.01–0.1%, v/v)	TFA (0.01–0.1%, v/v)
	PrA (0.1–2%, v/v)	PrA (0.1–2%, v/v)
	PrA (0.1–2%, v/v) + HFBA (0.1%, v/v)	PrA (0.1–2%, v/v) + HFBA (0.1%, v/v)
	PrA (2%, v/v) + HFBA (0.1%, v/v)	HFBA (0.1% , v/v)
Natural urine (spiked with target compounds at 1 mg/L)	HFBA(0.1% , v/v)	HFBA (0.1% , v/v)
	PrA (2% v/v) + HFBA (0.1%, v/v)	HFBA (0.1% , v/v)

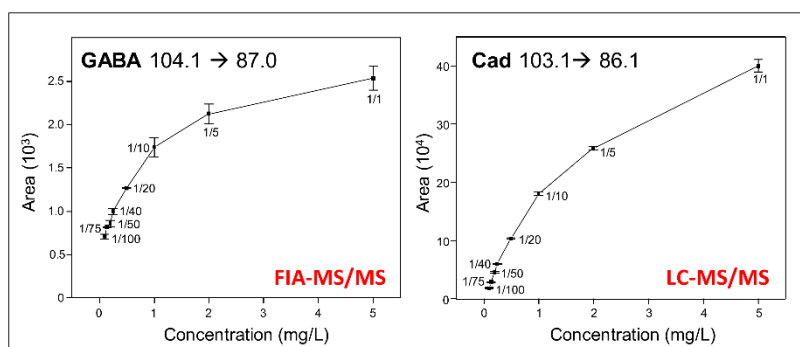


Fig. 1. Evaluation of different dilution ratios (1/1, 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/50, 1/75, 1/100, v/v) for GABA and Cad with the FIA-MS/MS and the LC-MS/MS methods, respectively.

the sample through the system. Optimum results were obtained with a flow rate of 0.5 mL/min and an injection volume of 5 μ L. Under these conditions, it was possible to analyze each sample in 1.4 min. Although the signal of the compounds appeared in less than 1 min, it was decided to increase the time of analysis up to 1.4 min in order to allow creatinine signal to reach baseline. No re-equilibration time was required since the chromatographic column was removed from the system. Taking into account the time required to inject the next sample, it was possible to analyze 27 samples per hour (2.2 min per sample).

However, when using this configuration, it was observed that the sensitivity of the analysis was not enough for the reliable quantification of some of the target compounds, mainly because of the low concentration found in urine samples and the ion suppression effects caused by the direct introduction of the sample into the mass spectrometer. In order to overcome this issue, a guard column was included in the instrumental setup prior to MS detection. Within this purpose, a XBridge® C18 guard column (2.1 \times 10 mm, 3.5 μ m) was used. A mobile phase based on a UHQ water:MeOH mixture (both with 0.1% HFBA, v/v) was proposed. Different percentages of water content were considered, up to 98%. The results obtained with and without the presence of the guard column were compared (Fig. 2).

With a high water content in the mobile phase, a low-resolution fractioning of the target compounds was produced when the guard column was used since the weak mobile phase favored analyte retention in reverse phase. Three groups were observed: first group, GABA, Orn and N-AcPut; second group, Put and Cad and third group, Spd, Spm and N-AcSpm. Moreover, an increment on the analytical signals was observed for Put, Cad, N-AcPut, Orn and GABA when compared to FIA-MS/MS signals, as well as a slight peak shape improvement. This behavior could be explained in terms of the clean-up effect from the other components of the matrix and due to the slight separation of the compounds. Optimum results were obtained for a mobile phase composition of 80% UHQ water and 20% MeOH, both with 0.1% HFBA, v/v. However, under these conditions, the third group of compounds exhibited a high retention behavior. In order to decrease the retention of these analytes, a MeOH injection was included after the injection of the sample (sequential injection mode, 5 μ L of sample and 50 μ L of MeOH at an injection speed of 400 μ L/min). Under these conditions, retention time reproducibility was evaluated. RSD values (%) were below 4.5% for all of the compounds (ten replicates at three different days). The inclusion of the guard column in the instrumental setup implied that each sample could also be analyzed in 1.4 min, 2.7 min taking into account the time required for injection (22 samples per hour). Fig. 3a and 3b show the signals obtained under optimum conditions when the FIA-MS/MS method and guard column (gC-FIA-MS/MS) one were used. Based on the obtained results, we decided to

include the guard column in the instrumental configuration.

3.3. Confirmatory analysis by LC-MS/MS

The chromatographic separation of the target compounds was accomplished by using a Cortecs C18 reversed-phase analytical column (2.1 \times 50 mm, 2.7 μ m). Gradient elution was based on a mixture of UHQ water (solvent A) and methanol (solvent B), both with a concentration of 0.1% v/v of HFBA. Seven different gradients were evaluated and the best separation was achieved within the following conditions: 2% B for 12 min, then from 2% to 70% B from 12 min to 14 min, hold at 70% B during 6 min, and then returning to 2% B from 20 to 22 min and holding conditions during 10 min. The flow rate and injection volume were set at 0.15 mL/min and 5 μ L, respectively. Under these conditions, a suitable separation was achieved in less than 23 min and 9 min were required to re-equilibrate the column. The total chromatographic run time was 32 min (Fig. 3c). Retention time reproducibility was evaluated for all of the analytes. Four different urine samples were analyzed (3 replicates each) and RSD values (%) were found to be below 1.5% for all of them.

Multiple reaction monitoring (MRM) acquisition parameters were optimized for the target compounds. Different fragmentors and collision energies were evaluated, in the 5 to 200 V and 1 to 60 eV range, respectively. The transitions selected for each analyte are shown in Table S1 (Supplementary material). Dwell time was also evaluated in the 1–100 ms range and a value of 20 ms was chosen as optimum.

3.4. Evaluation of possible MS interfering compounds

The presence of isobaric compounds is one of the main drawbacks when using methods based on direct injection mass spectrometry [1,36], especially when low resolution instruments are used. Therefore, an in-depth evaluation of the possible existence of interfering compounds was performed. An exhaustive bibliographic research, based on previous published articles and Human Metabolome Database and Metlin data search, was performed. A total of 20 possible interferences were found (see Section 2.1. for specific compound information). Aqueous standards of all of them were prepared and injected, and product ion spectra at different collision energies (1–40 eV) were recorded. Furthermore, all of them were also analyzed using the chromatographic method, in order to assign their retention behavior. Finally, six urines from different subjects were analyzed [37].

Four scenarios were found (Fig. 4): (i) no interference due to no similar fragmentation pattern (Fig. 4a), (ii) similar fragmentation pattern but absence of the compound in urine samples (Fig. 4b), (iii) similar fragmentation pattern but no significant contribution because of

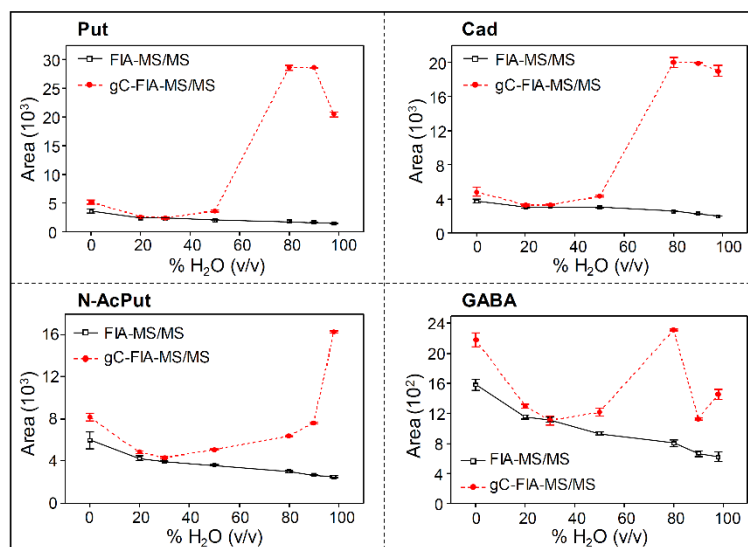


Fig. 2. Analytical signals obtained for putrescine (Put), cadaverine (Cad), N-acetylputrescine (N-AcPut) and gamma aminobutyric acid (GABA) in FIA-MS/MS and gC-FIA-MS/MS analyses with different percentages of UHQ water (v/v) in the carrier phase (MeOH, 0.1% HFBA, v/v).

the low concentration found in urine (Fig. 4c) and (iv) interference confirmed (Fig. 4d). Additional peaks were also observed, corresponding to unknown compounds. However, their contribution was not significant. Only two out of the twenty evaluated compounds were confirmed as interference. This were choline and N⁶N⁵-dimethylarginine. These compounds interfered with the transition 104.1 → 45.1 of GABA and 203.1 → 112.1 of spermine. Moreover, it was checked that the concentration of these compounds were higher than the concentrations found for GABA and Spm in urine samples. Taking into account those results, it was decided to use the transitions 104.1 → 87.0 and 203.1 → 129.1 for GABA and Spm quantification, respectively.

3.5. Analytical characteristics of the screening and confirmatory methods

The analytical characteristics of both screening and chromatographic methodologies were evaluated for a mixture of the eight target

compounds in synthetic urine. Calibration curves were obtained at seven concentration levels (50–1000 µg/L) and each level was analyzed in triplicate. Internal standards were added at a concentration of 300 µg/L. They were used as follows: Put-d₄ was used for Put, Cad and N-AcPut area normalization, GABA-d₆ for Orn and GABA normalization and Spd-¹³C₄ was used for Spd, Spm and N-AcSpm area normalization.

All the calibration curves displayed linear behavior. Their validity was checked using ANOVA analysis and it was observed that they did not exhibit any lack of fit. The values for the determination coefficient (R²) were higher than 0.98 for every case. The slopes obtained for both methods were demonstrated significantly different, after comparing them using a Student t-test (significance level, 0.05). Tables 2 and 3 shows the results obtained for the two methods.

Limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) were evaluated. They were determined as the analyte concentration corresponding to a signal-to-noise ratio (S/N) of 3 and 10, respectively [38].

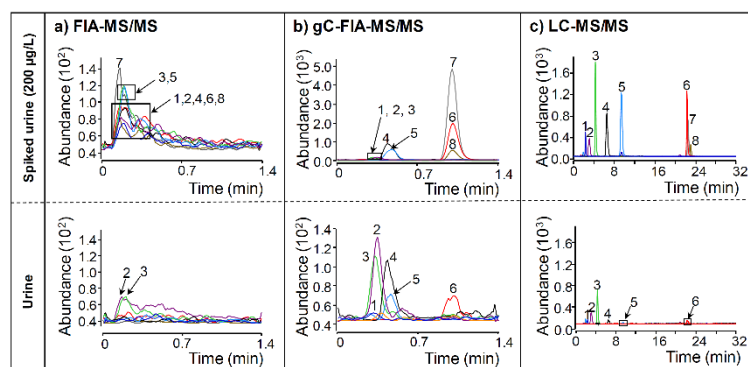


Fig. 3. MRM chromatograms of an unspiked and a spiked urine sample (200 µg/L) obtained with the a) FIA-MS/MS method, b) gC-FIA-MS/MS method and c) LC-MS/MS method. 1, Gamma aminobutyric acid; 2, ornithine; 3, N-acetylputrescine; 4, putrescine; 5, cadaverine; 6, spermidine; 7, N-acetylspermine, 8, spermine.

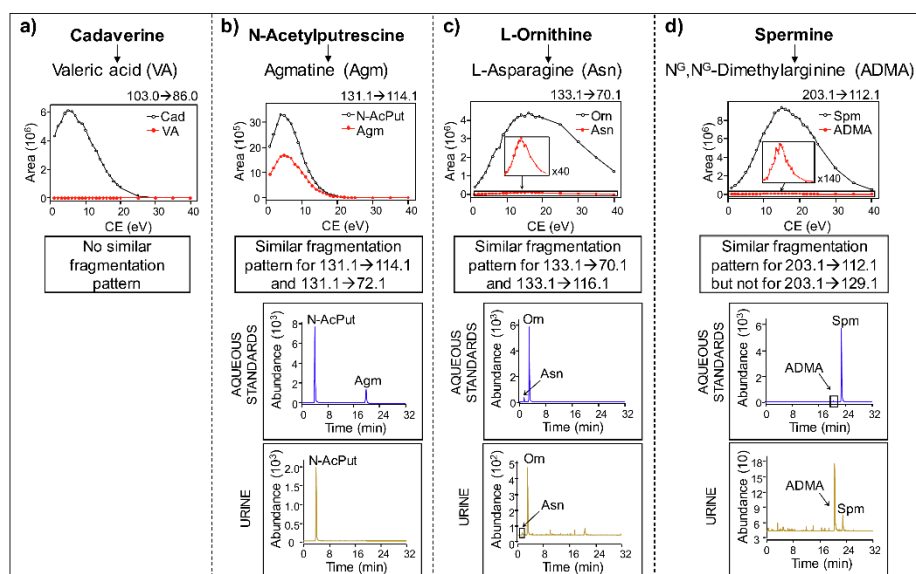


Fig. 4. Scenarios observed in the evaluation of interfering compounds: a) no interference due to no similar fragmentation pattern, but absence of the compound in urine, c) similar fragmentation pattern but no significant contribution because of the low concentration found in urine and d) similar fragmentation pattern and significant contribution.

For the screening method, LODs values were found to be between 0.6 and 21 µg/L and LOQs values between 2.0 and 70 µg/L. For the chromatographic one, LODs and LOQs were in the 0.4–8.2 and 1.2–27 µg/L ranges, respectively. Accuracies of both methods were also checked in terms of apparent recoveries, calculated as the ratio of the measured concentration to the spiked concentration (expressed in percentages). Values were found to be in the range of 80–120% for most compound, except Spm in the chromatographic method, with a recovery value of 69%. Repeatability and reproducibility values, expressed as relative standard deviations (RSD, %), using synthetic urine spiked at three levels of concentration (LOQ, 1.5 times the LOQ and 2 times the LOQ) are also shown in Tables 2 and 3 and values were found highly satisfactory.

3.6. Analysis of urine samples

Urine samples from two apparent healthy volunteers were analyzed. First, matrix effect was evaluated. Different matrices provided significant different slopes (Student *t*-test, significance level: 0.05). Thus, quantification was performed using a one-point standard addition and

normalization to IS protocol using the procedure described in ref. [36,39]. Internal standards were added at a concentration of 300 µg/L.

Table 4 shows the concentrations found for the two analyzed urines. Table 4 shows the concentrations found for the two analyzed urines. Values were normalized to creatinine content. For comparative purposes, results obtained with the screening and chromatographic methods were compared. Similar results were obtained for most of the compounds with both methods, except for Spd. For this compound, lower concentration values were found with the screening method, which results in an underestimation of its concentration. The concentrations found for the rest of the compounds were in good agreement with previous published results [40]. Spd behavior is still under study.

4. Conclusions

Here we have proposed a fast and reliable method for the determination of polyamines and related compounds in urine samples. The inclusion of a guard column in the FIA-MS/MS instrumental configuration resulted in a low-resolution fractioning of the target compounds with an increment on the analytical signals but without an

Table 2 Analytical characteristics of the screening method (gC-FIA-MS/MS) obtained with synthetic urine.

	Calibration range (µg/L)	R ²	b	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	Repeatability (%)			Reproducibility (%)			Recovery (%)
						LOQ	1.5 LOQ	2 LOQ	LOQ	1.5 LOQ	2 LOQ	
GABA	50–1000	0.9800	0.0058 ± 0.0004	12	40	17	17	15	26	21	17	94
Orn	50–1000	0.9850	0.010 ± 0.001	21	70	8.8	11	16	14	14	14	102
N-AcPut	50–1000	0.9938	0.0020 ± 0.0001	2.3	7.6	9.2	8.4	7.1	9.7	9.1	6.8	96
Put	50–1000	0.9952	0.0034 ± 0.0001	3.3	11	7.1	5.0	8.3	21	13	13	100
Cad	50–1000	0.9926	0.0030 ± 0.0001	3.8	12	11	9.2	9.8	11	11	8.8	106
Spd	50–1000	0.9987	0.0032 ± 0.0001	1.7	5.5	11	5.0	6.3	12	7.9	9.5	102
N-AcSpm	50–1000	0.9957	0.0036 ± 0.0001	0.6	2.0	8.8	18	9.6	7.6	16	9.8	80
Spm	50–1000	0.9885	0.0012 ± 0.0001	2.9	9.6	7.0	10	8.1	9.0	8.9	8.6	98

Capítulo II. Estrategias basadas en el uso de precolumnas de protección

M.T. Fernández-del-Campo-García, et al.

Microchemical Journal 158 (2020) 105223

Table 3
Analytical characteristics of the chromatography method (LC-MS/MS) obtained with synthetic urine.

	Calibration range (µg/L)	R ²	b	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	Repeatability (%)			Reproducibility (%)			Recovery (%)
						LOQ	1.5 LOQ	2 LOQ	LOQ	1.5 LOQ	2 LOQ	
GABA	50–1000	0.9994	0.0066 ± 0.0001	3.3	11	5.8	5.1	2.1	7.9	6.5	2.2	104
Orn	50–1000	0.9986	0.0041 ± 0.0001	8.2	27	4.3	4.7	3.7	8.5	6.4	6.7	102
N-AcPut	50–1000	0.9981	0.0029 ± 0.0001	0.7	2.3	8.6	5.8	5.5	12	7.8	6.8	119
Put	50–1000	0.9997	0.00352 ± 0.00003	2.8	9.1	4.4	3.0	1.8	5.4	2.9	2.2	104
Cad	50–1000	0.9996	0.0059 ± 0.0001	2.0	6.7	3.3	2.5	2.8	5.2	5.7	5.8	96
Spd	50–1000	0.9995	0.00279 ± 0.00003	1.8	6.0	4.0	4.5	3.4	6.3	6.2	4.0	110
N-AcSpm	50–1000	0.9987	0.00186 ± 0.00003	0.4	1.2	8.6	7.8	6.4	9.4	6.8	5.4	94
Spm	50–1000	0.9988	0.00142 ± 0.00003	2.3	7.6	6.6	3.8	3.9	9.3	6.3	5.1	69

Table 4
Concentration (nmol/mmol creatinine) found of the target compound in two urine samples using the LC-MS/MS and gC-FIA-MS/MS methods.

	Urine 1		Urine 2	
	gC-FIA-MS/MS	LC-MS/MS	gC-FIA-MS/MS	LC-MS/MS
GABA	(8 ± 4) × 10 ²	(5 ± 1) × 10 ²	< LOD	(24 ± 4) × 10
Orn	(20 ± 6) × 10 ²	(23 ± 2) × 10 ²	(28 ± 9) × 10 ²	(26 ± 2) × 10 ²
N-AcPut	(10 ± 2) × 10 ²	(11 ± 6) × 10 ²	(12 ± 1) × 10 ²	(139 ± 7) × 10
Put	(20 ± 6) × 10	(22 ± 5) × 10	(19 ± 4) × 10	(18 ± 1) × 10
Cad	(9 ± 4) × 10	(6 ± 2) × 10	(4 ± 2) × 10	24 ± 6
Spd	44 ± 4	(12 ± 3) × 10	(5 ± 3) × 10	(39 ± 7) × 10
N-AcSpm	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Spm	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

increase on the time of analysis. All the steps involved in sample preparation and instrumental conditions were optimized. Urine samples were centrifuged and filtered using Nylon filters (0.45 µm) after thawing them at room temperature. Plastic syringes should be avoided in the filtration step due to analyte adsorption. In both methods, an ion-pairing reagent was added to the mobile phase and to the dilution medium of the sample. An in-depth evaluation of possible interfering compounds was also performed and it was only observed that choline and N^G,N^G-dimethylarginine could interfere with the quantification of GABA and Spm, respectively. These interferences were solved using the transitions 104.1 → 87.0 and 203.1 → 129.1 for GABA and Spm quantification, respectively.

The screening (gC-FIA-MS/MS) and chromatographic (LC-MS/MS) methodologies were evaluated in terms of linearity, reproducibility and repeatability, obtaining satisfactory results. The LODs and LOQs obtained were the µg/L range for both methodologies. As matrix effect was observed, a one-point standard addition and normalization to IS protocol was used for quantification. Comparable results were obtained with the screening and confirmatory methods, except for Spd. This proved that the screening methodology could be used as a fast and reliable method for determination of the rest of polyamines and related compounds in urine samples. The chromatographic method would be only used to analyze those samples with altered concentration of the target compounds.

CRedit authorship contribution statement

María Teresa Fernández-del-Campo-García: Investigation, Validation, Formal analysis, Writing - original draft. **Ana María Casas-Ferreira:** Conceptualization, Supervision, Writing - review & editing, Visualization. **Encarnación Rodríguez-Gonzalo:** Conceptualization, Supervision, Writing - review & editing, Visualization. **Bernardo Moreno-Cordero:** Writing - review & editing. **José Luis Pérez-Pavón:** Conceptualization, Writing - review & editing, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for funding project CTQ2017-87886-P/BQU and the Junta de Castilla y León for project SA055P17. M^a Teresa Fernández-del-Campo-García is also thankful to the University of Salamanca for a predoctoral fellowship.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105223>.

References

- [1] S.C. Nanita, L.G. Kaldon, Emerging flow injection mass spectrometry methods for high-throughput quantitative analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 23–33, <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9193-1>.
- [2] D.P. Elpa, G.R.D. Prabhu, S.P. Wu, K.S. Tay, P.L. Urban, Automation of mass spectrometric detection of analytes and related workflows: a review, *Talanta* 208 (2019) 120304, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120304>.
- [3] A.M. Casas-Ferreira, M. Nogal-Sánchez, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, Determination of leucine and isoleucine/allo-isoleucine by electrospray ionization-tandem mass spectrometry and partial least square regression: Application to saliva samples, *Talanta* 120811 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120811>.
- [4] K. Samejima, K. Hiramatsu, K. Takahashi, M. Kawakita, M. Kobayashi, H. Tsumoto, K. Kohda, Identification and determination of urinary acetylpolyamines in cancer patients by electrospray ionization and time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 401 (2010) 22–29, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.02.022>.
- [5] M. Kobayashi, K. Samejima, K. Hiramatsu, M. Kawakita, Mass spectrometric separation and determination of N1, N 12-diacetylspermine in the urine of cancer patients, *Biol. Pharm. Bull.* 25 (2002) 372–374, <https://doi.org/10.1248/bpb.25.372>.

Capítulo II. Estrategias basadas en el uso de precolumnas de protección

M.T. Fernández-del-Campo-García, et al.

Microchemical Journal 158 (2020) 105223

- [16] Z. Niu, W. Zhang, C. Yu, J. Zhang, Y. Wen, Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques, *TRAC - Trends Anal. Chem.* 102 (2018) 123–146, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.02.005>.
- [17] R.J. Raterink, P.W. Lindenburg, R.J. Vreeken, T. Hankemeier, Three-phase electroextraction: a new (Online) sample purification and enrichment method for bioanalysis, *Anal. Chem.* 85 (2013) 7762–7768, <https://doi.org/10.1021/ac4010716>.
- [18] S.C. Nanita, N.I.T. Padivitage, Ammonium chloride salting out extraction/clean-up for trace-level quantitative analysis in food and biological matrices by flow injection tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 768 (2013) 1–11, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.01.011>.
- [19] C. Pistos, J.T. Stewart, Direct injection HPLC method for the determination of selected benzodiazepines in plasma using a Hiseq column, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 1135–1142, [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00426-6](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00426-6).
- [10] J.I. Malvar, J.I. Santos, J. Martín, I. Aparicio, F. Alonso, Simultaneous pressurized liquid extraction and clean-up for the determination of metabolites in complex environmental solid matrices, *Microchem. J.* 152 (2020) 104370, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104370>.
- [11] E. Milanetti, G. Carlucci, P.P. Olimpieri, P. Palumbo, M. Carlucci, V. Ferrone, Correlation analysis based on the hydrophobic properties of non-steroidal anti-inflammatory drugs in solid-phase extraction (SPE) and reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) with photodiode array detection and their applications to bio, *J. Chromatogr. A*. 1605 (2019) 360351, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.07.005>.
- [12] J.Z. Huang, S. Lin, Z. Huang, M.S. Bolgar, Enablement of the direct analysis of excipients in monoclonal antibody formulations through the incorporation of a wide pore C18 protein trap with hydrophilic interaction liquid chromatography, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1068–1069 (2017) 131–135, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.10.034>.
- [13] V.K. Boppana, C. Miller-Stein, W.H. Schaefer, Direct plasma liquid chromatographic-tandem mass spectrometric analysis of granisetron and its 7-hydroxy metabolite utilizing internal surface reversed-phase guard columns and automated column switching devices, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 678 (1996) 227–236, [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00480-7](https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00480-7).
- [14] K. Chen, I. Hsu, Y. Sun, Determination of methylmercury and inorganic mercury by coupling short-column ion chromatographic separation, on-line photocatalyst-assisted vapor generation, and inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. 1216 (2009) 8933–8938, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.10.061>.
- [15] N. Youngvives, T. Chaida, S. Khonyoung, N. Kuppithayanant, W. Tiyapongpattana, A. Itharat, J. Jakmunee, Greener liquid chromatography using a guard column with micellar mobile phase for separation of some pharmaceuticals and determination of parabens, *Talanta* 106 (2013) 350–359, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.12.040>.
- [16] P. Fagan, C. Wijesundera, Liquid chromatographic analysis of milk phospholipids with on-line pre-concentration, *J. Chromatogr. A*. 1054 (2004) 241–249, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.04.051>.
- [17] L. Couchman, D.S. Fisher, K. Subramaniam, S.A. Handley, R.J. Boughtflower, C.M. Benton, R.J. Flanagan, Ultra-fast LC-MS/MS in therapeutic drug monitoring: quantification of clozapine and noreclozapine in human plasma, *Drug Test. Anal.* 10 (2018) 323–329, <https://doi.org/10.1002/dta.2223>.
- [18] A. Onal, Current status of polyamine and polyamine analogs analysis in cancer research, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 40 (2010) 60–67, <https://doi.org/10.1080/10408340903018486>.
- [19] D.H. Russell, Increased polyamine concentrations in the urine of human cancer patients, *Nat. New Biol.* 233 (1971) 144–145, <https://doi.org/10.1038/newbio233144a0>.
- [20] U. Bachrach, Polyamines and cancer: minireview article, *Amino Acids* 26 (2004) 307–309, <https://doi.org/10.1007/s00726-004-0076-6>.
- [21] A.M. Casas Ferreira, B. Moreno Cordero, Á.P. Crisolino Pozas, J.L. Pérez Pavón, Use of microextraction by packed sorbents and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of polyamines and related compounds in urine, *J. Chromatogr. A*. 1444 (2016) 32–41, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.03.054>.
- [22] D.I.I. Bac, D.J.R. Lane, P.J. Jansson, D.R. Richardson, The old and new biochemistry of polyamines, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1862 (2018) 2053–2068, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.06.004>.
- [23] A. Naccarato, R. Elliani, B. Cavaliere, G. Sindona, A. Tagarelli, Development of a fast and simple gas chromatographic protocol based on the combined use of alkyl chloroformate and solid phase microextraction for the assay of polyamines in human urine, *J. Chromatogr. A* 1549 (2018) 1–13, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.03.034>.
- [24] C. Yu, R. Liu, C. Xie, Q. Zhang, Y. Yin, K. Bi, Q. Li, Quantification of free polyamines and their metabolites in biofluids and liver tissue by UHPLC-MS/MS: application to identify the potential biomarkers of hepatocellular carcinoma, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 6891–6897, <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8860-6>.
- [25] R. Liu, Y. Jia, W. Cheng, J. Ling, L. Liu, K. Bi, Q. Li, Determination of polyamines in human urine by precolumn derivatization with benzoyl chloride and high-performance liquid chromatography coupled with Q-time-of-flight mass spectrometry, *Talanta* 83 (2011) 751–756, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.10.039>.
- [26] R. Liu, Q. Li, R. Ma, X. Lin, H. Xu, K. Bi, Determination of polyamine metabolome in plasma and urine by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method: application to identify potential markers for human hepatic cancer, *Anal. Chim. Acta* 791 (2013) 36–45, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.06.044>.
- [27] C.Y. Lu, H.H. Su, Y.L. Chen, W.L. Tseng, Micro extraction to quantitate spermidine and spermine in human urine and blood by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1326 (2014) 1–6, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.12.037>.
- [28] N.C. van de Merbel, Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques, *TRAC - Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 924–933, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.002>.
- [29] M. Jaffe, Ueber den Neiderschlag, welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Kreatinins, *Z. Physiol. Chem.* 10 (1886) 391–400.
- [30] M.R. Häkkinen, T.A. Keinänen, J. Vepsäläinen, A.R. Khomutov, L. Alhonen, J. Jänne, S. Auriola, Analysis of underivatized polyamines by reversed phase liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45 (2007) 625–634, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.09.001>.
- [31] T.M. Annesley, Ion suppression in mass spectrometry, *Clin. Chem.* 49 (2003) 1041–1044, <https://doi.org/10.1053/j.cclm.2003.07.014>.
- [32] M.R. Häkkinen, A. Roine, S. Auriola, A. Tuokko, E. Veskimäe, T.A. Keinänen, T. Lehtimäki, N. Oksala, J. Vepsäläinen, Analysis of free, mono- and diacetylated polyamines from human urine by LC-MS/MS, *J. Chromatogr. B* 941 (2013) 81–89, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.10.009>.
- [33] F.E. Kuhlmann, A. Appfel, S.M. Fischer, G. Goldberg, P. Goodley, Signal enhancement for gradient reverse-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry analysis with trifluoroacetic acid and other strong acid modifiers by postcolumn addition of propionic acid and isopropanol, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 6 (1995) 1221–1225, [https://doi.org/10.1016/1044-0305\(95\)00571-4](https://doi.org/10.1016/1044-0305(95)00571-4).
- [34] N. Fang, S. Yu, M.J.J. Ronis, T.M. Badger, Matrix effects break the LC behavior rule for analytes in LC-MS/MS analysis of biological samples, *Exp. Biol. Med.* 240 (2015) 488–497, <https://doi.org/10.1177/1535370214554545>.
- [35] W. Skeff, C. Recknagel, D.E. Schulz-Bull, The influence of salt matrices on the reversed-phase liquid chromatography behavior and electrospray ionization tandem mass spectrometry detection of glyphosate, glufosinate, aminomethylphosphonic acid and 2-aminoethylphosphonic acid in water, *J. Chromatogr. A*. 1475 (2016) 64–73, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.11.007>.
- [36] M.T. Fernández-del-Campo-García, A.M. Casas-Ferreira, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, Development of a screening and confirmatory method for the analysis of polar endogenous compounds in saliva based on a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric system, *J. Chromatogr. A*. 1590 (2019) 88–95, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.01.001>.
- [37] G. Smith, European medicines agency guideline on bioanalytical method validation: what more is there to say? *Bioanalysis* 4 (2012) 865–868, <https://doi.org/10.4155/bio.12.44>.
- [38] A. Krueve, R. Rebane, K. Kipper, M.L. Oldekop, H. Evard, K. Herodes, P. Raviio, I. Leito, Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part I, *Anal. Chim. Acta* 870 (2015) 29–44, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.017>.
- [39] Rosa María González Paredes, Carmelo García Pinto, José Luis Pérez Pavón, Bernardo Moreno Cordero, Headspace-gas chromatography-mass spectrometry for the rapid determination of possible biomarkers in urine samples, *Anal. Meth* 9 (39) (2017) 5784–5790, <https://doi.org/10.1039/C7AY01655G>.
- [40] Urine metabolome, <https://urinemetabolome.ca/>, Accessed 13rd March 2020.

Supplementary material

Development of a fast and reliable methodology for the determination of polyamines in urine by using a guard column as a low-resolution fractioning step prior to mass spectrometry. Comparison with flow injection-mass spectrometry analysis.

María Teresa Fernández-del-Campo-García, Ana María Casas-Ferreira*, Encarnación Rodríguez-Gonzalo, Bernardo Moreno-Cordero, José Luis Pérez-Pavón

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Salamanca. 37008 Salamanca, SPAIN

* Corresponding author: (fax) +34-923-294483; (e-mail) anacasas@usal.es

Figure legends

Figure S1. Signals obtained for each compound for the different syringes used for filtration (glass syringes versus disposable plastic syringes).

Figure S2. Comparison of the signals obtained with three filters: Nylon, hydrophilic polytetrafluoroethylene (PTFE) and polyvinylidene fluoride (PVDF) (0.45 μm).

Figure S3. Comparison of the signals obtained with different TFA percentages (v/v) as ion-pairing reagent. Reagent was added to the sample dilution medium (UHQ water) as well as to the carrier phase (MeOH).

Figure S4. Comparison of the signals obtained with different HFBA percentages (v/v) as ion-pairing reagent. Reagent was added to the sample dilution medium (UHQ water) as well as to the carrier phase (MeOH).

Figure S5. Comparison of the signals obtained with TFA at a concentration of 0.05% (v/v) and with HFBA at a concentration of 0.1% (v/v). Reagents were added to the dilution medium (UHQ water) as well as to the carrier phase (MeOH).

Figure S6. Comparison of the signals obtained with HFBA (0.1 %, v/v) and with HFBA (0.1 %, v/v) plus PrA (2 %, v/v) together. Reagents were added to the dilution medium (UHQ water) as well as to the carrier phase (MeOH).

Figure S1

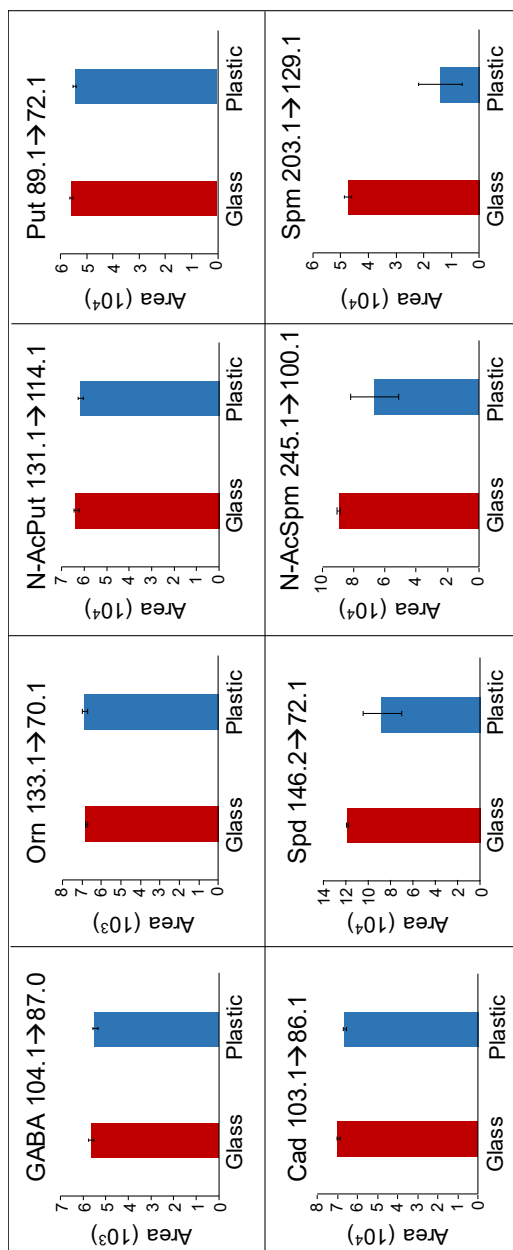


Figure S2

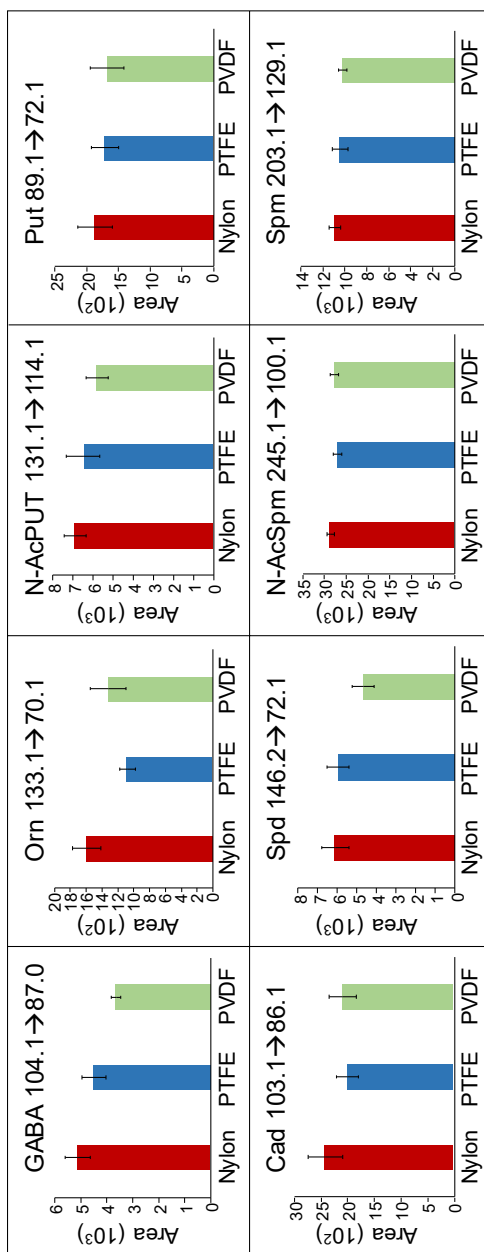


Figure S3

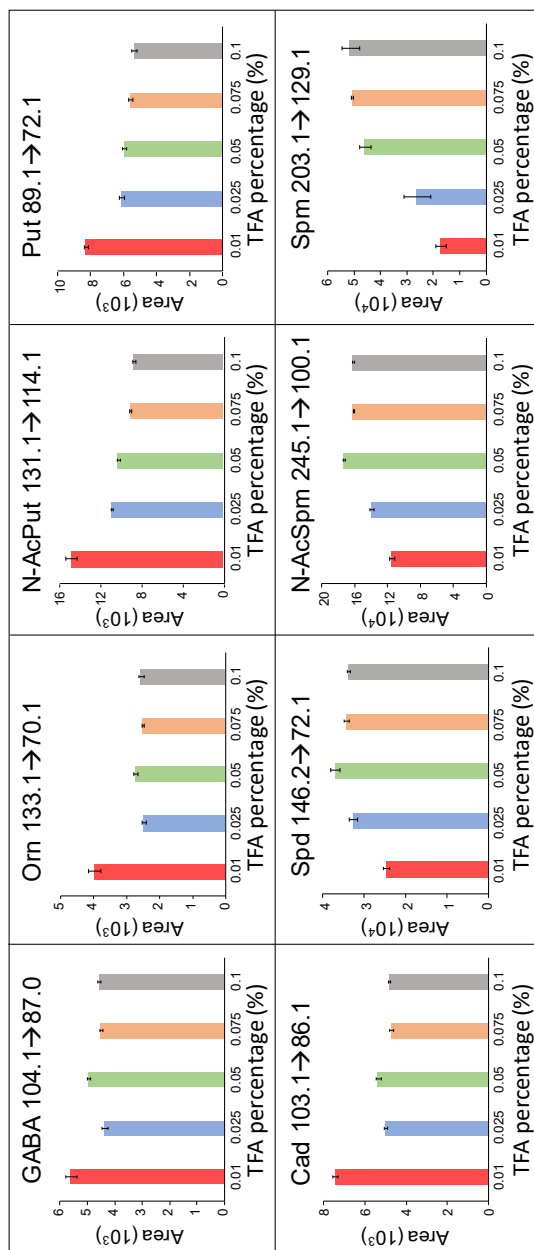


Figure S4

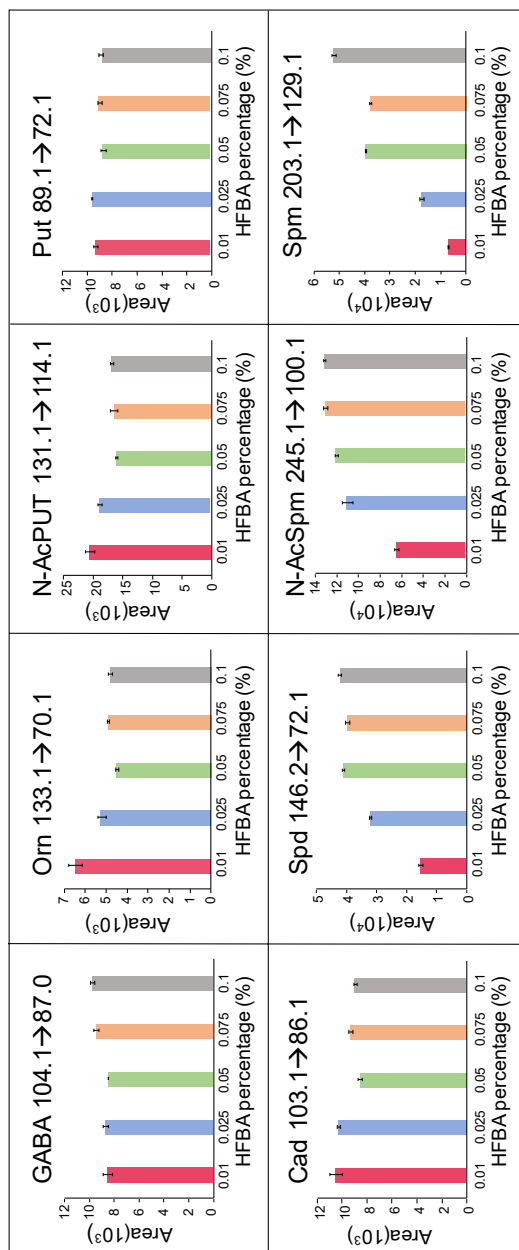


Figure S5

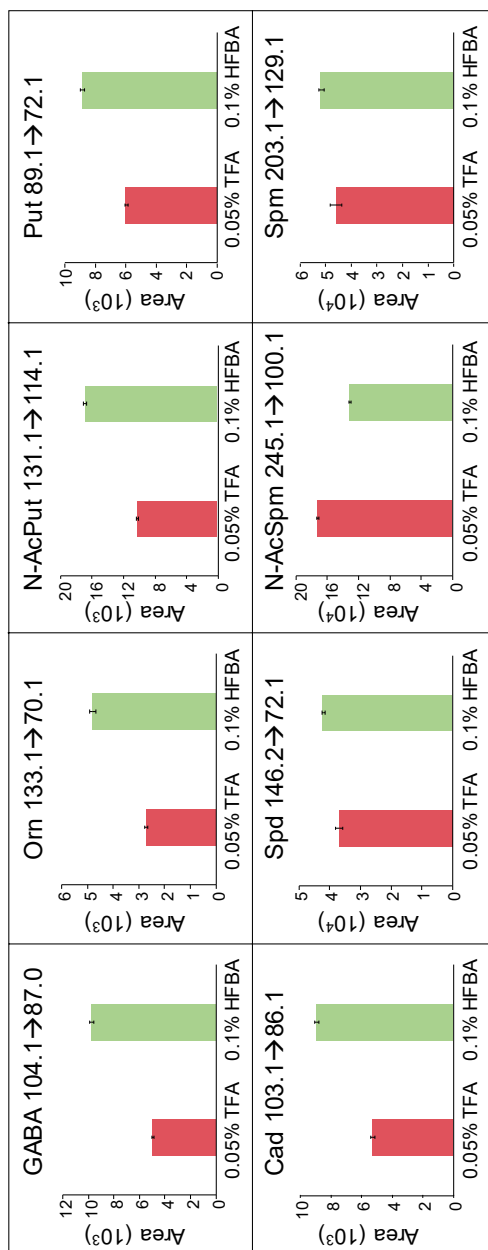


Figure S6

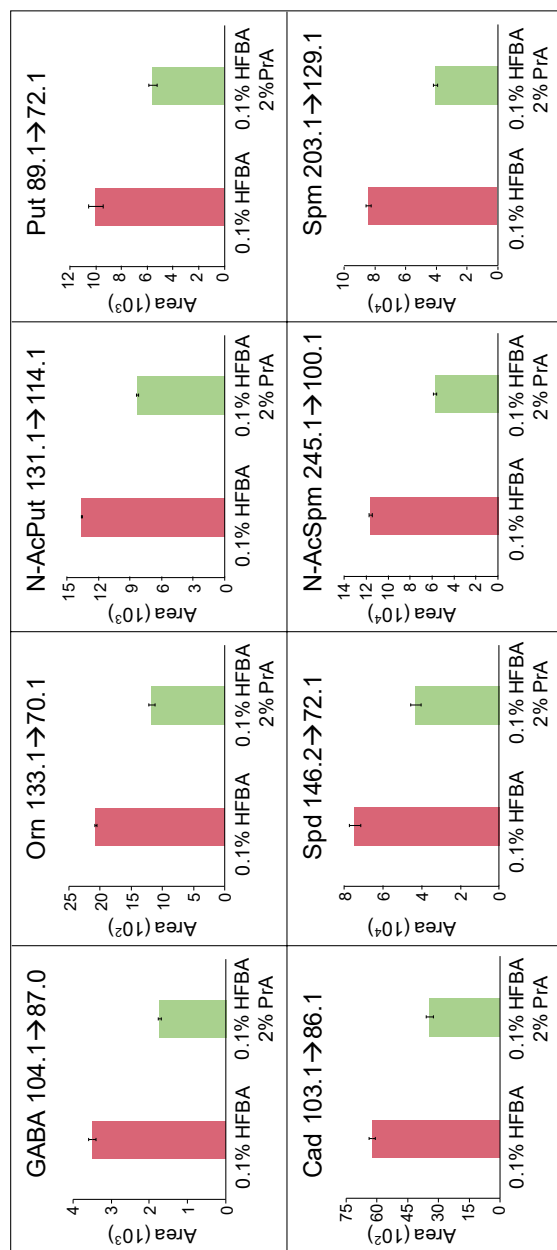

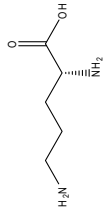



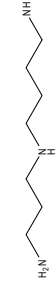
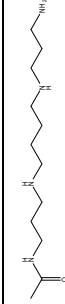



Table S1. Physical-chemical properties of the target compounds and MS/MS optimized parameters for their analysis.

Compound	Chemical structure	Mw (g/mol)	Log P ^a	t _R (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Fragmentor (V)	Collision energy (eV)
GABA		103.1	-2.90	2.2	104.1	87.0	41	5
Orn		132.1	-3.60	2.9	133.1	70.1/116.0	41	17/5
N-AcPut		130.2	-0.84	4.0	131.1	114.1/72.1	81	5/13
Put		88.2	-0.98	6.3	89.1	72.1	41	5
Cad		102.2	-0.27	8.8	103.1	86.1	41	5
Spd		145.3	-0.62	22.1	146.2	72.1/112.1	81	13/9
N-AcSpm		244.4	-0.42	22.3	245.1	100.1/112.1	81	17/17
Spm		202.4	-0.66	22.8	203.1	129.1	81	5

^a Values obtained from VCCLAB, Virtual Computational Chemistry Laboratory, <https://www.vcclab.org>, 2005

II.1.2. Artículo de investigación

Análisis rápido y fiable de aminoácidos no derivatizados en orina utilizando espectrometría de masas en tándem

Resumen

Los aminoácidos, tanto proteínogénicos como no proteínogénicos, son compuestos involucrados en muchos procesos biológicos importantes, asociándose niveles alterados de los mismos con diferentes patologías. Por ello, hay un gran interés en el desarrollo de métodos rápidos y fiables que permitan su determinación en diferentes matrices biológicas.

Las muestras biológicas pueden obtenerse de los pacientes mediante procedimientos invasivos o no invasivos. Las muestras no invasivas, como la orina, tienen un gran interés ya que suponen un menor estrés para el paciente y son más fáciles de obtener que las de tipo invasivo. La orina, comparada con otros fluidos biológicos, contiene una gran cantidad de metabolitos y compuestos de interés clínico. Respecto a los aminoácidos, se ha propuesto que su concentración en orina podría utilizarse para el diagnóstico y seguimiento de diferentes enfermedades.

La técnica más utilizada para la determinación de aminoácidos en orina ha sido la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). Sin embargo, hay un gran interés en el desarrollo de métodos en los cuales no se emplee una etapa separativa previa a la detección mediante espectrometría de masas debido a su elevada velocidad de análisis y a su simplicidad instrumental. Estas estrategias no han sido aún muy utilizadas para la determinación de aminoácidos en orina y los métodos propuestos utilizan equipamiento no convencional, laboriosos procedimientos de tratamiento de muestra o derivatizan los compuestos.

OBJETIVO

El objeto del presente trabajo es el desarrollo y validación de un método rápido y fiable de análisis basado en el acoplamiento de una precolumna de protección a un espectrómetro de masas para la determinación de aminoácidos proteínogénicos en orina. Los compuestos estudiados han sido alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína (en forma de cistina), glutamina, ácido

glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. El tratamiento de muestra utilizado es simple, sin necesidad de utilizar reacciones de derivatización. Para confirmar los resultados obtenidos, también se desarrolla un método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS). En todos los casos se utiliza una fuente de ionización por electrospray (ESI) y un triple cuadrupolo (QqQ) como analizador. Hasta donde sabemos, es la primera vez que esta metodología rápida (gC-MS/MS) ha sido propuesta para la determinación de aminoácidos en orina.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

El tratamiento de muestra propuesto implica una mínima manipulación, con una simple dilución de la orina tras congelar/descongelar/centrifugar la misma, observándose los mejores resultados con una dilución 1/10 (v/v). El medio de dilución utilizado es agua ultrapura con HFBA (0.1 %, v/v).

En un primer lugar se evalúa la posibilidad de la introducción de la muestra de forma directa en el espectrómetro de masas en la modalidad FIA-MS. Los resultados obtenidos muestran una sensibilidad insuficiente para algunos de los compuestos evaluados (como, por ejemplo, metionina y ácido aspártico), así como una morfología de pico deficiente.

Como alternativa, se propone la inclusión de una precolumna de protección en la configuración instrumental para llevar a cabo una etapa de limpieza y fraccionamiento previa a la detección mediante espectrometría de masas. La precolumna utilizada es una XBridge® C18 (2.1 × 10 mm, 3.5µm). Se evalúa la composición de la fase móvil, basada en la mezcla agua ultrapura y MeOH, ambos con HFBA (0.1 %, v/v). Los mejores resultados se obtienen en condiciones isocráticas, con un 80 % de agua ultrapura. Para evitar efecto memoria, se incluye una inyección de MeOH tras la inyección de la muestra utilizando el modo secuencial de inyección (5 µL de muestra y 50 µL de MeOH,

este último inyectado a una velocidad de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$). Bajo estas condiciones, el tiempo de análisis es de 1.5 min, 2.8 min considerando el tiempo requerido para la inyección. Los tiempos de retención de los compuestos son altamente reproducibles, con reproducibilidades inferiores al 6 %.

Para confirmar los resultados, se utiliza una columna cromatográfica Kinetex EVO-C18 (2.1 \times 150 mm, 2.6 μm). Se optimiza el gradiente de la fase móvil (mezcla agua ultrapura: MeOH, ambos con un 0.1% (v/v) HFBA), flujo y volumen de inyección. Con las condiciones optimizadas se obtiene una adecuada separación de los compuestos en menos de 22 min. Teniendo en cuenta el tiempo necesario para reequilibrar la columna, el tiempo total de análisis es de 35 min. La reproducibilidad en los tiempos de retención presenta valores inferiores a un 2% para todos los analitos.

Para llevar a cabo la detección de los compuestos en el analizador de triple cuadrupolo, se selecciona el modo de adquisición MRM, optimizándose todos los parámetros relacionados.

Se evalúa la posible existencia de compuestos interferentes de los aminoácidos analizados. Solo valina, arginina y leucina presentan interferentes con una contribución significativa en su señal analítica. Estos son: ácido guanidinoacético para valina, N-acetilasparginina para arginina y creatina para leucina. Sin embargo, con el uso de la precolumna de protección es posible la separación de estos interferentes de los compuestos afectados.

Adicionalmente se observa que algunos de los compuestos objeto de estudio comparten transiciones entre sí. Este es el caso de lisina y glutamina, las cuales aparecen en forma de dos picos no resueltos. Sin embargo, ambos compuestos pueden ser cuantificados de forma individual. Para la lisina se utiliza una transición específica (147.1 \rightarrow 67.0, m/z), mientras que para la glutamina se utiliza la transición 147.1 \rightarrow 84.0 (m/z), la cual permite la cuantificación conjunta de

glutamina y lisina. Eliminando la contribución de la lisina, se obtiene la concentración de la glutamina.

Se observa una situación similar para el ácido glutámico, para el cual se observan dos picos no resueltos cuando se selecciona la transición 148.1→84 (m/z). El primer pico corresponde a las señales conjuntas del ácido glutámico y glutamina y el segundo a lisina. Esta interferencia es debida a la contribución isotópica del carbono (^{13}C) de estos dos compuestos (glutamina y lisina). Este problema no puede ser resuelto, por lo que se elimina el ácido glutámico del conjunto de analitos objeto de estudio.

Evaluación de las características analíticas de las metodologías gC-MS/MS y LC-MS/MS

Se evalúan las características analíticas de las dos metodologías gC-MS/MS y LC-MS/MS utilizando orina sintética dopada a cinco niveles de concentración. Se utilizan alanina- ^{13}C y leucina- ^{13}C como patrones internos marcados isotópicamente. En ambas metodologías, las rectas de calibración muestran un comportamiento lineal, sin fallo de ajuste y con coeficientes de determinación satisfactorios. Se comparan las pendientes de las rectas de calibración obtenidas con las dos estrategias mediante una prueba t de Student (nivel de significación, 0.05) y se observa que estas son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Los LODs y LOQs obtenidos con gC-MS/MS se encuentran entre 0.004-0.425 mg/L y 0.01-1.40 mg/L, respectivamente. Para el ácido aspártico, estos límites son superiores, con valores de 3 mg/L y 9 mg/L, respectivamente. El comportamiento observado para este compuesto se debe a su alta polaridad y baja retención en la precolumna de protección, eluyéndose junto con el resto de los componentes polares de la matriz. En el caso de LC-MS/MS, los LODs y LOQs se encuentran entre 0.002-0.160 mg/L y 0.007-0.528 mg/L, respectivamente.

Los estudios de repetibilidad y reproducibilidad realizados utilizando orina sintética dopada al LOQ, 1.5 veces el LOQ y 2 veces el LOQ proporcionan valores altamente satisfactorios con ambos métodos. La exactitud, evaluada en términos de recuperación aparente, proporciona resultados entre 80-133% en ambos casos.

Análisis de muestras de orina

Para evaluar el efecto matriz, se comparan las pendientes de las rectas de calibración obtenidas en orina real y orina sintética con ambas metodologías, utilizando cinco niveles de concentración. Este estudio se realiza mediante una prueba de t de Student y se determina que estas son significativamente diferentes ($p < 0.05$), lo que pone de manifiesto la existencia de efecto de matriz. Por ello, se utiliza un protocolo de adición estándar de un punto y normalización con patrón interno para la cuantificación de los compuestos. Las concentraciones obtenidas son normalizadas al contenido de creatinina. Los resultados obtenidos con ambas metodologías son similares para todos los aminoácidos analizados, excepto para el ácido aspártico, el cual no puede ser cuantificado utilizando la metodología gC-MS/MS debido a su elevado LOQ.

Por último, se analizan muestras de orina de dieciocho voluntarios aparentemente sanos con edades comprendidas entre 11 y 68 años utilizando los métodos gC-MS/MS y LC-MS/MS. Mediante la utilización de una prueba U de Mann-Whitney, no se observan diferencias significativas entre las concentraciones obtenidas con las dos estrategias ($p > 0.05$), demostrando la aplicabilidad de la metodología gC-MS/MS.

Además, se evalúa si la concentración de aminoácidos presentes en la orina es diferente según el sexo. Para ello, se comparan mediante una prueba U de Mann-Whitney las concentraciones de aminoácidos en las orinas de hombres y mujeres. Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas entre ambos grupos ($p > 0.05$).

Comparación con otras estrategias ya propuestas

Por último, se lleva cabo la comparación de los resultados obtenidos con la estrategia gC-MS/MS con los obtenidos por metodologías LC-MS y metodologías en las cuales no hay ningún tipo de separación previa a la detección mediante espectrometría de masas, que ya han sido utilizadas para la determinación de aminoácidos en orina.

De esta comparación, se puede concluir que el método gC-MS/MS propuesto en este trabajo utiliza una instrumentación convencional y un tratamiento de muestra simple sin derivatización en comparación con trabajos previos. El tiempo de análisis es menor que la mayoría de los otros métodos reportados en la bibliografía y los LODs y LOQs obtenidos son adecuados para la determinación de los aminoácidos proteínogénicos, excepto para ácido aspártico, en muestras de orina. Por tanto, el método gC-MS/MS propuesto es una alternativa novedosa, rápida y fiable para la determinación de los aminoácidos objeto de estudio en orina.

COCLUSIONES

En este trabajo se utiliza, por primera vez, el acoplamiento de una precolumna de protección a un espectrómetro de masas en tándem (gC-MS/MS) para la determinación de aminoácidos proteínogénicos en orina. La precolumna de protección permite la inclusión de una etapa de limpieza y fraccionamiento rápido previo a la detección por MS. Además, permite obtener mejores morfologías de pico, así como una mayor sensibilidad en comparación con los resultados obtenidos cuando la muestra se introduce directamente en el espectrómetro de masas. Todas estas mejoras se consiguen sin un aumento significativo en el tiempo de análisis. Además, permite resolver algunos de los problemas relacionados con compuestos isobáricos. Para confirmar los resultados, se desarrollada de forma análoga un método basado en LC-MS/MS.

Los resultados obtenidos en la etapa de validación son altamente satisfactorios. Se observa la existencia de efecto de matriz, por lo que se utiliza un protocolo de adición estándar de un punto y normalización con patrón interno para la cuantificación de los compuestos. Se analizan las muestras de 18 sujetos aparentemente sanos, evaluándose la posible diferencia en la concentración de aminoácidos entre hombres y mujeres. No se observan diferencias significativas entre grupos.

La concordancia entre los resultados obtenidos mediante LC-MS/MS y gC-MS/MS demuestran que esta última es una estrategia rápida adecuada para la determinación de aminoácidos en orina. En comparación con otros métodos que aparecen en bibliografía, la metodología desarrollada presenta importantes ventajas, como son la simplicidad en el tratamiento de la muestra, sin la necesidad de derivatizar los compuestos, la utilización de instrumentación convencional y la reducción de los tiempos de análisis comparados con los métodos separativos ya propuestos.

II.1.2. Artículo de investigación

Análisis rápido y fiable de aminoácidos no derivatizados en orina utilizando espectrometría de masas en tándem

Microchemical Journal 172 (2022) 106914



Rapid and reliable analysis of underivatized amino acids in urine using tandem mass spectrometry

María Teresa Fernández-del-Campo-García, Ana María Casas-Ferreira*, Encarnación Rodríguez-Gonzalo, Bernardo Moreno-Cordero, José Luis Pérez-Pavón

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Salamanca. 37008 Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Stand-alone tandem mass spectrometry
Guard column
Tandem mass spectrometry
LC-MS
Amino acids
Urine samples

ABSTRACT

Nowadays there is a great interest in the development of fast and reliable methods for the determination of amino acids (AAs) in biological samples due to their biological importance. In the present work, a method based on the use of a guard column (gC) prior to tandem mass spectrometry (gC-MS/MS) is proposed for the determination of proteinogenic AAs in urine. Heptafluorobutyric acid (HFBA) is used as ion pairing reagent. Comparison of the gC-MS/MS method versus tandem mass spectrometry (MS/MS) in stand-alone mode showed improved sensitivity and peak shape, and solved some problems related to interfering compounds, with a total analysis time of 2.8 min. All the proteinogenic AAs were adequately determined using the gC-MS/MS method, except glutamic acid (Glu).

To confirm quantitative results obtained with gC-MS/MS for individual AAs, an ion-pair liquid chromatography tandem mass spectrometry method (LC-MS/MS) has also been developed. Both methods (gC-MS/MS and LC-MS/MS) were validated using synthetic urine. For the gC-MS/MS method, LODs and LOQs values were found to be between 0.004 and 0.425 mg/L and 0.01 and 1.40 mg/L, respectively. Aspartic acid (Asp) showed the highest LOD and LOQ values (3 mg/L and 9 mg/L, respectively). A one-point standard addition method and internal standard normalization were used for the quantification because matrix effects were observed. L-alanine-1-¹³C (Ala-¹³C) and L-leucine-1-¹³C (Leu-¹³C) were used as isotopically labeled internal standards.

To demonstrate the applicability of the gC-MS/MS method in the reliable determination of AAs in real samples, urine from eighteen healthy volunteers were analyzed using both gC-MS/MS and LC-MS/MS methods. Similar quantitative results were obtained for individual AAs with both of them. In addition, possible differences in AAs concentrations related to sex were checked, but the results did not show significant differences for the evaluated compounds.

1. Introduction

Amino acids (AAs) are important compounds involved in a great number of biological processes. There are two types of AAs: proteinogenic, that are encoded by genome and participate in the synthesis of proteins, and non-proteinogenic, that perform other functions such as neurotransmitters or metabolic intermediates. Alterations in the levels of AAs have been associated with different pathologies such as cancer [1,2], inborn errors of metabolism [3] and diabetes [4], among others.

Considering the important role of AAs in the organism, there is a great interest in the development of fast and reliable methods that allow their determination in biological samples. This fact is manifested in the large amount of literature referring to their determination in biological

matrices, where interesting review articles have been reported [5–7]. Biological samples can be taken from patients using invasive or non-invasive sampling procedures. Samples whose collection is invasive, such as blood, suppose an added stress to the patient and are more difficult to obtain. In contrast, non-invasive samples, such as urine and saliva, do not necessarily entail stress for the patient and their collection is simple. For this reason, the analysis of the latter is of particular interest. Urine, compared to other biofluids, has a large number of metabolites and compounds of clinical interest [8]. In particular, it has been shown that the concentration of amino acids in urine can be used for the diagnosis and monitoring of different diseases [2,3].

Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) has been the most widely used technique for AAs analysis in urine samples [2,3,5,6],

* Corresponding author.

E-mail address: anacasas@usal.es (A.M. Casas-Ferreira).

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106914>

Received 29 July 2021; Received in revised form 6 October 2021; Accepted 11 October 2021

Available online 15 October 2021

0026-265X/© 2021 The Author(s).

Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

although gas chromatography and capillary electrophoresis coupled to MS have also been described [9,10]. When reversed-phase liquid chromatography (RPLC) is proposed, separation of AAs is not easily achieved and it is necessary to apply a previous derivatization reaction [2,11–13] or the addition of an ion pairing reagent in the mobile phase [3,14,15]. An alternative to RPLC-MS is the use of hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HILIC-MS) [16–19]. Special columns for AAs, proteins and peptides separation have also been described [20,21].

Recently there has been a great interest in the development of stand-alone mass spectrometric methods, mainly due to its high speed of analysis and instrumental simplicity [22]. For the determination of AAs in urine, several applications can be found [23–25], although its use is still scarce. These methods proposed the use of unconventional equipment [24], laborious sample treatments [25] or the derivatization of the AAs [23].

In this work, a fast and reliable MS method is proposed for the determination of the proteinogenic AAs in urine. A guard column (gC) is placed prior to mass spectrometry detection (gC-MS/MS) to perform a short chromatographic separation step. The use of the gC enhances sensitivity and improves peak shape compared to the use of stand-alone tandem mass spectrometry (MS/MS) and reduces the analysis time in relation to conventional LC methods. The method proposed here involves a simpler sample treatment procedure than the already stand-alone MS methods proposed for the determination of AA in urine, without the need of a derivatization step [23–25]. To confirm the results obtained with the gC-MS/MS methodology, a liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method is also developed. The results obtained with these two methodologies were compared to demonstrate the applicability of the gC-MS/MS methodology. To the best of our knowledge, this is the first time that this approach (gC-MS/MS) has been applied to the determination of AAs in urine.

2. Material and methods

2.1. Chemical

Methanol (MeOH), creatinine (Cre) and heptafluorobutyric acid (HFBA) were purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). The AAs: alanine (Ala), arginine (Arg), asparagine (Asn), aspartic acid (Asp), cystine (Cys-Cys), glutamine (Gln), glutamic acid (Glu), glycine (Gly), histidine (His), isoleucine (Ile), leucine (Leu), lysine (Lys), methionine (Met), phenylalanine (Phe), proline (Pro), serine (Ser), threonine (Thr), tryptophan (Trp), tyrosine (Tyr) and valine (Val) were supplied by Sigma-Aldrich. Isotopically labelled internal standards (ILIS) L-alanine-1-¹³C (Ala-¹³C) and L-leucine-1-¹³C (Leu-¹³C) were also obtained from Sigma-Aldrich.

Acetylglycine, creatine, guanidinoacetic acid, N-acetylasparagine, N-acetylorithine, ornithine and sarcosine were used for isobaric interference evaluation and were obtained from Sigma Aldrich.

Synthetic urine was prepared according to [26] using sodium chloride, magnesium sulfate, ammonia and hydrochloric acid supplied by Scharlau (Barcelona, Spain) and potassium chloride, calcium chloride and urea from Panreac (Barcelona, Spain).

The ultra-high quality (UHQ) water used was obtained with a Wasserlab Ultramatic purification system (Noain, Spain).

2.2. Standard solutions

Stock solutions of AAs, ILIS and creatinine were prepared in UHQ water at a concentration of 1000 mg/L. For Cys-Cys and Tyr, solutions were prepared in HCl 0.1 M at the same concentration as the other AAs. All of them were stored in the dark at 4 °C. These solutions were used to prepare standard solutions and to spike the synthetic and natural urine samples.

2.3. Sample preparation

First morning urine samples were collected from apparently healthy individuals of both sexes in disposable sterile specimen collection cups and were frozen and stored at –20 °C in the dark. For analysis, samples were thawed at room temperature and centrifuged at 1815g during 10 min. The supernatant was filtered with nylon filters (0.45 µm, 17 mm i. d.). Then, a 1/10 dilution of the filtered supernatant was done, adding 100 µL to a vial and mixing it with 900 µL of UHQ water (0.1% HFBA, v/v). ILIS were added to all the samples at a concentration of 2 mg/L. An aliquot (5 µL) was injected into the system. The method used for the measurement of creatinine content was the Jaffé method [27].

2.4. LC-MS/MS analysis

LC-MS/MS analysis was carried out a 1200 series LC chromatograph equipped with a binary pump, a membrane degasser, an autosampler, two six-port valves and a 6410 LC/MS triple quadrupole (QqQ) mass spectrometer equipped with an electrospray ionization (ESI) source, all from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). The QqQ nebulizer pressure and voltage were set at 35 psi and + 4000 V, respectively. Nitrogen was used as the drying (12 L/min, 350 °C) and collision gas. Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode (unit mass resolution) was used for analyte quantification.

The chromatographic column used was a Kinetex EVO-C18 column 100 Å (2.1 × 150 mm) from Phenomenex (Torrance, CA, USA) packed with 2.6 µm core-shell particles. The mobile phase was composed of a UHQ water with 0.1% HFBA (v/v) (Solvent A) and MeOH with 0.1% HFBA (v/v) (Solvent B) mixture. The mobile phase flow rate was 150 µL/min and the injection volume used was 5 µL. The gradient elution used was as follows: 2% B for 5 min, then from 2% to 50% B from 5 min to 10 min, after from 50% to 70% B from 10 min to 12 min, hold at 70% B during 10 min, and then returning to 2% B from 22 to 23 min and holding conditions during 12 min. A suitable separation was achieved in less than 22 min and 13 min were required to re-equilibrate the column. The total chromatographic run time was 35 min. This analysis mode was used for sample treatment optimization.

All the parameters related to the experimental conditions used are shown in Table S1 (Supplementary material).

2.5. MS/MS and gC-MS/MS analysis

Stand-alone MS/MS and gC-MS/MS analyses were performed using the instrumental configuration described for LC-MS/MS. A six-port valve was used to switch from MS/MS or gC-MS/MS analysis to LC-MS/MS analysis without any instrumental modification.

When MS/MS analysis was performed, the six-port valve was directly connected to the mass spectrometer with a peek tube. The mobile phase used was 100% MeOH (0.1% HFBA, v/v) under isocratic conditions at a flow rate of 500 µL/min. Total analysis runtime was 1.4 min. Taking account the time required for injection, each sample was analyzed in 2.2 min.

The gC-MS/MS analysis was carried out using a XBridge® C18 guard column (2.1 × 10 mm, 3.5 µm). Isocratic conditions were used, with a mobile phase composition of 80% UHQ water (Solvent A) and 20% MeOH (Solvent B). In both solvents, 0.1% HFBA (v/v) was added. The mobile phase flow rate was 500 µL/min. A MeOH injection was included after the injection of the sample (sequential injection mode, 5 µL of sample and 50 µL of MeOH at an injection speed of 300 µL/min). Total analysis runtime was 1.5 min. Each sample was analyzed in 2.8 min.

The conditions of the mass spectrometer were the same described for LC-MS/MS analysis and MRM mode was also used for analyte quantification.

2.6. Method validation

Methods were validated using synthetic urine. The following parameters were evaluated: calibration curves, limits of detection (LODs) and quantification (LOQs), repeatability (intra-day precision), reproducibility (inter-day precision) and accuracy.

Matrix effect evaluation was carried out using real and synthetic urine. The slopes of the calibration curves obtained in the two matrices were compared using a Student's *t*-test (significance level, 0.05%).

3. Results and discussion

3.1. Sample treatment

Sample treatment optimization was performed using the LC-MS/MS method. After protein precipitation and filtration of urine samples (see Section 2.3.), UHQ water with 0.1% HFBA (v/v) was used for supernatant dilution. Different urine dilution ratios were tested: 1/1, 1/5, 1/10 and 1/20 (v/v). Deficient peak shape for Lys, Arg and His was obtained for 1/1 and 1/5 dilution ratios. The dilution ratio 1/10 was selected because of its optimum results.

3.2. gC-MS/MS method optimization

Initially, stand-alone MS/MS was considered for AAs determination in urine. The experimental conditions used were similar to those reported previously [28]. It was observed that when using this methodology, sensitivity was not enough for the reliable quantification of some of target compounds, such as Asp and Met. Also, peak morphology was not acceptable, as can be seen in Fig. 1.A.

Thus, a guard column (gC) was incorporated into the instrumental configuration setup prior to MS detection to carry out a short chromatographic separation step that minimized the shortcomings of the stand-alone MS/MS determination. Synthetic urine spiked with 1 mg/L of all AAs and 2 mg/L of ILIS was used for gC-MS/MS method optimization. A XBridge® C18 guard column (2.1 × 10 mm, 3.5 μm) was proposed. Isocratic conditions were used with a mobile phase composed of UHQ water with 0.1% HFBA (Solvent A) and MeOH with 0.1% HFBA (Solvent B). Different percentages of water content in the mobile phase were considered. The best results were obtained with 80% UHQ water and 20% MeOH, both with 0.1% HFBA (v/v). The flow rate used was 500 μL/min and the injection volume was set at 5 μL. Under these conditions, a slight separation of the compounds was achieved and an increment on the analytical signals was observed, as well as a peak shape improvement (Fig. 1.B). All these enhancements were accomplished

without a significant increase in analysis time: total analysis runtime was 1.5 min, with a total time of 2.8 min, considering the time required for injection (21 samples per hour).

To avoid carry-over, a MeOH injection was included after sample injection, using sequential injection mode (5 μL of sample plus 50 μL of MeOH). Different MeOH injection speeds were considered: 100, 200, 300 and 400 μL/min. The best results were obtained with an injection speed of 300 μL/min. Under these conditions, retention time reproducibility was evaluated using real urine. RSD values (%) were below 6 % (five replicates, three different days).

3.3. LC-MS/MS method optimization

The optimization of the LC-MS/MS method was performed using synthetic urine spiked with 1 mg/L of all AAs and 2 mg/L of ILIS. A Kinetex EVO-C18 column 100 Å (150 mm × 2.1 mm, 2.6 μm) was used for the chromatographic separation of the AAs. After injection volume, flow rate and separation gradient optimization, the instrumental conditions were set as described in Section 2.4. Retention time reproducibility was also evaluated using real urine and RSD values (%) were found to be below 2 % for all AAs (five replicates, three different days).

3.4. MS optimization and evaluation of isobaric interferences

Multiple Reaction Monitoring (MRM) acquisition parameters were optimized using solutions of the target compounds in UHQ water at a concentration of 1 mg/L. Different collision energies were evaluated in 1–60 eV range. Different dwell times were also tested for all the evaluated methodologies (LC-MS/MS, gC-MS/MS and stand-alone MS/MS): 20, 50 and 100 ms. With high dwell time values, peaks showed poor definition, especially when stand-alone MS/MS and gC-MS/MS methods were used due to the high speed of analysis. On the contrary, with a dwell time of 20 ms, peaks were more clearly defined (Figure S1). Thus, this value was chosen as optimum. The MS conditions selected for each analyte are shown in Table S1. Cysteine (Cys) was determined as Cys-Cys. This one is more stable than Cys, which is easily oxidized and dimerized [13].

An exhaustive evaluation of the possible existence of interfering compounds was performed by an in-depth bibliographic research using Human Metabolome Database and Metlin data search. Also, six urine samples from both sexes were analyzed using the LC-MS/MS method [29], to check if the target AAs presented interfering compounds at their selected transitions (Table S1). From these studies, it was concluded that only Val, Arg, and Leu displayed interferences with a significant contribution to their analytical signal. These were: guanidinoacetic acid

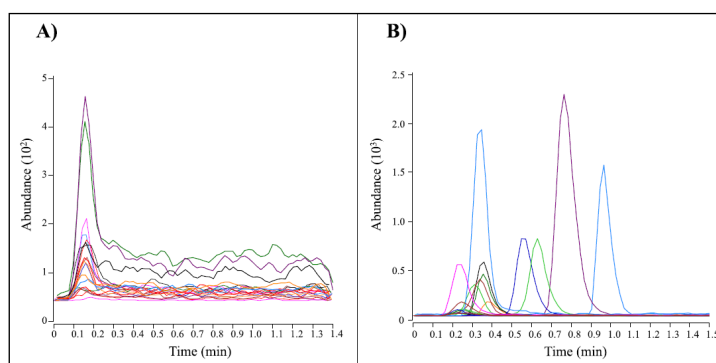


Fig. 1. MRM signals of synthetic urine spiked with AAs at a concentration of 1 mg/L (except Asp, at 6 mg/L) obtained with A) the MS/MS method and B) the gC-MS/MS method.

Capítulo II. Estrategias basadas en el uso de precolumnas de protección

M.T. Fernández-del-Campo-García et al.

Microchemical Journal 172 (2022) 106914

for Val (for transition 118.1 → 72.1), N-acetylasparagine for Arg (for transition 175.1 → 70.1) and creatine for Leu (for transition 132.1 → 43.1). Identity of the interfering compounds was confirmed injecting pure standards.

Fig. 2.A shows the MRM signals obtained for transition 132.1 → 43.1 when MS/MS and gC-MS/MS methods were used. As it is shown, when the first one was used, it was not possible to distinguish between Leu and creatine, which hinders Leu quantification. However, due to the slight separation obtained with the gC, Leu and creatinine peaks were perfectly resolved. Similar behavior was obtained for guanidinoacetic acid and Val, and N-Acetylasparagine and Arg.

Interferences of isobaric compound from the matrix was not the only

issue for AAs determination in urine. Transitions 147.1 → 84.1 and 147.1 → 130.0 were shared by Lys and Gln. For Glu, it was also observed that at its selected transitions (148.1 → 84.0 and 148.1 → 56.0), Gln and Lys also appeared because of their ¹³C contribution.

As can be seen in Fig. 2.B, even with the inclusion of the gC, the peaks obtained for Gln and Lys were not resolved and it was difficult to integrate each peak separately. Quantification of Lys was not problem because Lys could be quantified using the transition 147.1 → 67.0, specific for this compound. For Gln, the signal obtained for the transition 147.1 → 84.0 was integrated and the concentration was assigned to Gln and Lys altogether. Then, due to the concentration of Lys could be determined as previously mentioned, Gln concentration could be

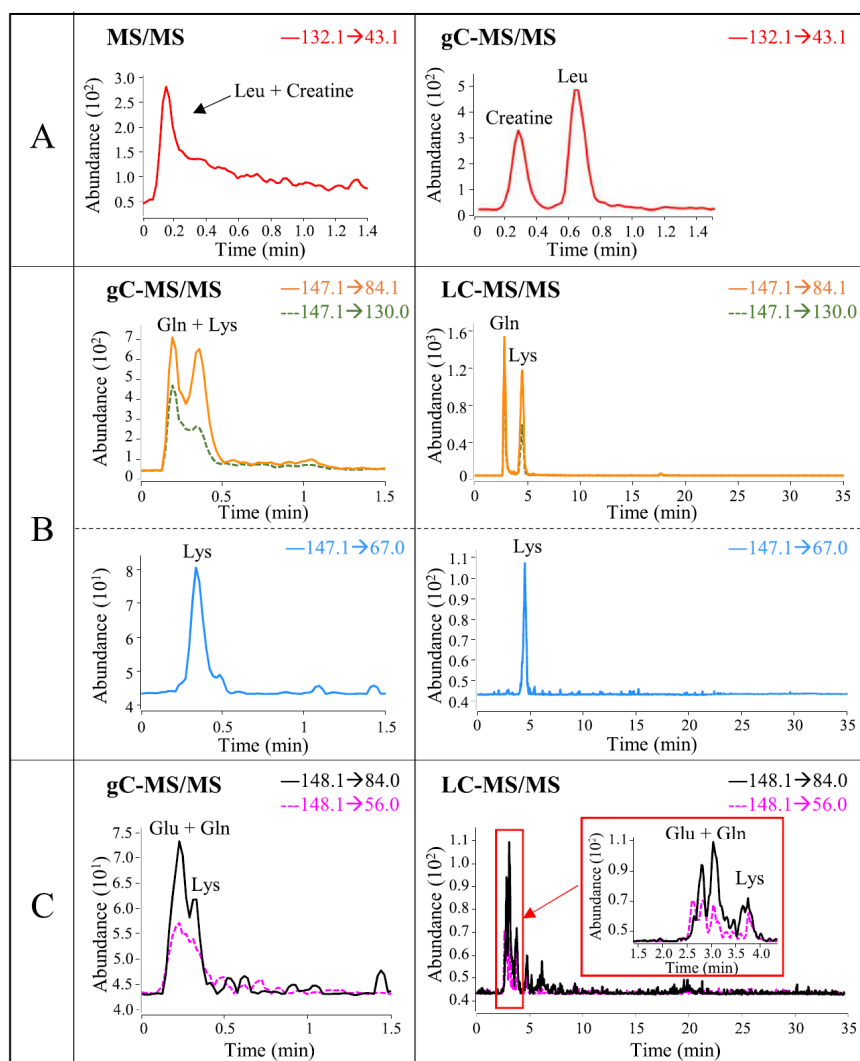


Fig. 2. MRM signals obtained for a urine sample for A) transition 132.1 → 43.1 using the MS/MS and gC-MS/MS methods, B) Gln and Lys transitions using the gC-MS/MS and LC-MS/MS methods and C) Glu transitions using the gC-MS/MS and LC-MS/MS methods.

4

Capítulo II. Estrategias basadas en el uso de precolumnas de protección

M.T. Fernández-del-Campo-García et al.

Microchemical Journal 172 (2022) 106914

calculated by the difference.

For Glu (148.1 → 84.0), two unresolved peaks were observed when the gC was used (Fig. 2.C). The first one corresponded to the signals obtained for Glu and Gln and the second one to Lys. Under these conditions, it was difficult to integrate each signal separately. A similar situation was found when the LC-MS/MS method was used (Fig. 2.C). For these reasons, Glu was eliminated from the analysis because its correct quantification was not possible.

3.5. Analytical characteristics of gC-MS/MS vs LC-MS/MS

Synthetic urine spiked with different concentrations of the 19 AAs (five concentration levels) were used to evaluate the analytical characteristics of both methodologies (gC-MS/MS and LC-MS/MS). Ala-¹³C and Leu-¹³C were selected as isotopically labeled internal standards and they were added at a concentration of 2 mg/L. They were used as follows: Ala-¹³C for Asn, Ser, Asp, Gly, Gln, Cys-Cys, Thr, Ala, Glu, Pro, His and Lys area normalization and Leu-¹³C for Val, Arg, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe and Trp area normalization. This selection was performed based on LC-MS/MS method retention time proximity. Each concentration level was analyzed in triplicate. All calibration curves showed good linear behavior with satisfactory coefficients of determination (R^2) for all the compounds using both methods (Table 1, Table 2). Their validity was checked using ANOVA analysis and it was observed that they did not exhibit any lack of fit. The slopes obtained for gC-MS/MS and LC-MS/MS methods were compared using a Student *t*-test (significance level, 0.05%). These slopes were demonstrated significantly different ($p < 0.05$).

The limits of detection (LODs) and the limits of quantification (LOQs) were determined as the analyte concentration corresponding to a signal-to-noise ratio (S/N) of 3 and 10, respectively [30]. For the gC-MS/MS method, LODs values were found to be between 0.004 and 0.425 mg/L and LOQs values between 0.01 and 1.40 mg/L. For Asp, the highest LODs (3 mg/L) and LOQs (9 mg/L) were obtained. Asp sensitivity differences could be related to the ion suppression caused by the rest of the components of the matrix when this method was used, being this compound the first to elute from de gC and one of the most polar analytes [31]. For the LC-MS/MS method, LODs and LOQs were in the 0.002–0.160 and 0.007–0.528 mg/L ranges, respectively (Table 1, Table 2).

Table 1
Analytical characteristics of the gC-MS/MS method obtained with synthetic urine.

Compounds	R^2	Slope ^a	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Repeatability (%) ^b			Reproducibility (%) ^b			Recovery (%) ^c
					1.5 LOQ	2LOQ	2LOQ	LOQ	1.5 LOQ	2 LOQ	
Asn	0.9934	0.052 ± 0.003	0.122	0.401	5.1	3.1	4.8	5.7	5.3	5.7	80
Ser	0.9988	0.190 ± 0.004	0.211	0.695	5.9	7.7	6.6	8.4	8.7	6.6	87
Asp	0.995	0.061 ± 0.003	2.730	9.009	4.1	6.0	6.7	7.4	5.3	3.7	133
Gly	0.9962	0.098 ± 0.004	0.326	1.076	6.7	11	9.2	9.4	8.9	9.2	100
Gln + Lys	0.9989	0.310 ± 0.007	0.085	0.281	3.3	4.2	3.5	4.4	4.8	4.4	104 ^d
Cys-Cys	0.9945	0.081 ± 0.004	0.051	0.167	5.8	4.5	8.7	8.3	9.6	7.6	130
Thr	0.9967	0.203 ± 0.009	0.425	1.401	5.6	6.6	6.8	11	5.9	4.7	85
Ala	0.9952	0.474 ± 0.019	0.236	0.777	5.3	7.2	3.5	6.1	6.3	5.2	100
Pro	0.9904	1.651 ± 0.101	0.019	0.063	6.8	5.5	7.6	11	6.9	7.7	100
His	0.9988	1.115 ± 0.024	0.010	0.034	8.9	2.7	7.7	9.9	7.8	8.0	90
Lys	0.9939	0.071 ± 0.004	0.040	0.132	6.9	5.7	3.8	8.6	5.9	7.6	80
Val	0.9933	1.139 ± 0.071	0.014	0.048	4.9	4.8	5.4	6.2	8.4	7.6	123
Arg	0.9978	0.212 ± 0.007	0.031	0.101	7.9	5.4	5.8	11	11	7.8	96
Met	0.9972	0.381 ± 0.013	0.006	0.018	6.9	5.4	5.4	5.0	7.4	6.7	90
Ile	0.9992	0.535 ± 0.010	0.015	0.050	6.1	6.2	9.7	7.0	6.4	7.3	88
Leu	0.9980	0.675 ± 0.017	0.019	0.061	9.4	6.5	5.5	8.4	6.0	7.0	100
Tyr	0.9966	0.098 ± 0.003	0.018	0.061	11	5.9	9.0	12	13	11	90
Phe	0.9985	1.551 ± 0.038	0.005	0.017	9.5	9.0	4.7	12	7.5	8.4	92
Trp	0.9932	0.652 ± 0.044	0.004	0.013	9.7	10	10	15	15	16	107

^a Expressed in arb. units vs. concentration in mg/L.

^b Calculated for ten replicates on the same day (repeatability) and for five replicates on three different days (reproducibility).

^c Obtained at the first level of the calibration curve for each compound.

^d Gln recovery, calculated as the difference of Gln + Lys concentration minus Lys concentration.

Repeatability (intra-day precision) and reproducibility (inter-day precision) were studied using synthetic urine spiked at LOQ, 1.5 times and 2 times the LOQ. The values, expressed as relative standard deviations (RSD, %), are shown in Table 1 and Table 2. These values were highly satisfactory for both methods.

Accuracy was also evaluated as apparent recoveries (expressed as percentages). These values were calculated as the ratio of the measured concentration to the spiked concentration. Acceptable recovery values were found in the range 80–133 % for both methodologies (Table 1, Table 2).

3.6. Analysis of urine samples

3.6.1. Matrix effect

To evaluate matrix effect, calibration curves (five levels) were obtained in two different matrices (synthetic and real urine) using both gC-MS/MS and LC-MS/MS methodologies. Concentration levels were selected based on the expected concentrations of the AAs in urine and each one was analyzed in triplicate. The calibration curves exhibited linear behavior and did not exhibit any lack of fit. The slopes of the calibration curves were compared using a Student's *t*-test (significance level, 0.05%). The slopes differed significantly ($p < 0.05$), as shown in the Table S2. These results showed the existence of matrix effect. For this reason, quantification was performed using a one-point standard addition and normalization to IS protocol [32]. Internal standards were added at a concentration of 2 mg/L.

Fig. 3 shows the concentration of AAs (normalized to creatinine content) predicted in one urine using the quantification protocol previously described with both LC-MS/MS and gC-MS/MS methodologies. Similar results were obtained with both methods, which demonstrated the reliability of the second one for screening purposes. The only disparity was observed for Asp, which was not detected and quantified in urine with the gC-MS/MS method, because of the high LOD found for this compound.

3.6.2. Determination of AAs in urine

Urine samples from eighteen healthy volunteers with ages between 11 and 68 years were analyzed using both gC-MS/MS and LC-MS/MS methods. Table S3 shows the mean values (including the lowest and highest ones) of the normalized concentrations of the target compounds

Table 2
Analytical characteristics of the LC-MS/MS method obtained with synthetic urine.

Compounds	R ²	Slope ^a	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Repeatability (%) ^b			Reproducibility (%) ^b			Recovery (%) ^c
					LOQ	1.5 LOQ	2LOQ	LOQ	1.5 LOQ	2 LOQ	
Asn	0.9929	0.206 ± 0.014	0.024	0.079	4.9	7.6	5.5	11	4.7	5.9	120
Ser	0.9779	0.439 ± 0.046	0.022	0.071	6.8	4.2	4.4	5.8	6.8	2.5	110
Asp	0.9924	0.122 ± 0.008	0.133	0.439	4.9	3.4	3.0	4.3	4.2	3.8	80
Gly	0.9919	0.144 ± 0.010	0.068	0.224	5.2	2.8	3.6	8.6	7.9	3.5	120
Gln	0.9973	0.142 ± 0.004	0.134	0.443	5.8	4.0	2.4	5.1	6.7	5.9	100
Cys-Cys	0.9946	0.049 ± 0.002	0.046	0.152	9.3	9.0	10	11	9.1	12	100
Thr	0.9969	0.133 ± 0.004	0.160	0.528	3.9	1.9	2.3	4.7	5.7	4.8	95
Ala	0.9984	0.465 ± 0.011	0.149	0.492	3.4	2.3	2.8	4.9	4.4	4.9	100
Pro	0.9983	6.232 ± 0.156	0.004	0.012	2.8	3.2	2.5	3.2	6.8	4.8	107
His	0.9904	1.380 ± 0.096	0.007	0.023	6.3	3.2	6.7	4.9	7.2	3.5	110
Lys	0.9913	0.046 ± 0.003	0.052	0.170	5.7	4.5	7.8	8.7	6.7	7.4	120
Val	0.997	3.577 ± 0.139	0.006	0.021	1.7	3.0	3.3	3.8	2.8	3.2	93
Arg	0.9988	0.432 ± 0.011	0.018	0.061	3.0	2.8	2.0	4.8	3.7	2.9	89
Met	0.999	1.228 ± 0.023	0.005	0.015	4.6	4.6	3.1	5.3	5.7	3.8	94
Ile	0.9984	0.629 ± 0.015	0.011	0.035	4.5	2.2	2.9	2.9	2.6	3.7	96
Leu	0.9991	0.661 ± 0.014	0.011	0.036	2.7	3.6	2.7	3.7	2.4	2.3	98
Tyr	0.9992	0.413 ± 0.007	0.013	0.043	5.8	3.6	4.0	5.5	5.0	5.0	83
Phe	0.9992	1.584 ± 0.027	0.002	0.007	3.9	5.1	3.2	8.9	5.2	4.9	96
Trp	0.9992	0.813 ± 0.014	0.006	0.018	4.4	2.5	1.9	5.8	3.2	3.2	100

^a Expressed in arb. units vs. concentration in mg/L.

^b Calculated for ten replicates on the same day (repeatability) and for five replicates on three different days (reproducibility).

^c Obtained at the first level of the calibration curve for each compound.

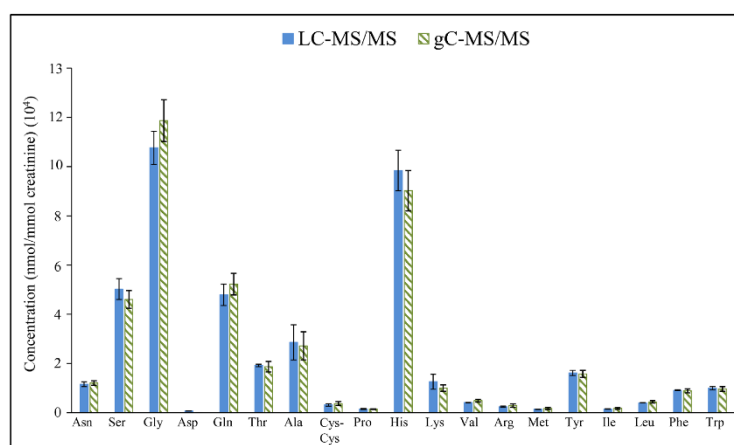


Fig. 3. Comparison of AAs concentrations (normalized to creatinine content) in one urine sample obtained with the LC-MS/MS and gC-MS/MS methods.

obtained with both methodologies. A Mann-Whitney *U* test was implemented in order to know whether there were significant differences between groups (gC-MS/MS and LC-MS/MS). No significant differences ($p > 0.05$) were observed, demonstrating again the applicability of the gC-MS/MS method for the reliable determination of proteinogenic AAs in urine.

AAs concentration differences related to sex were studied (Fig. 4). Results obtained with the gC-MS/MS were evaluated using a Mann-Whitney *U* test (significance level, 0.05%). Results showed that there were not significant differences between groups for the target compounds.

3.7. Comparison with other proposed methods

Table S4 summarizes the methodologies already proposed for the determination of proteinogenic AAs in urine samples based on LC and/or MS analysis. Regarding methodologies based on LC-MS, research

from the last 5 years was considered due to the huge number of publications found. However, for stand-alone MS methods, research was expanded to the last 10 years because just one publication was found in the last 5 years.

Comparing the gC-MS/MS method proposed in the present manuscript with the already published MS methodologies, only one work was found with lower times of analysis [24]. Authors proposed the use of an extractive electrospray ionization (EESI) ion source, which implied the use of unconventional equipment which may have a higher cost. The other works that proposed MS methods used a derivatization step of AAs for their determination [23,33]. Our method involves a simpler sample treatment procedure with no derivatization of the compounds required.

Regarding LC-MS analysis, most of the publications found required the derivatization of the AAs or the use of HILIC columns (references in supplementary material). Other methods used ion pairing reagents in reversed-phase mode or special column (references in supplementary material). Times of analysis in all these methods were higher than the

Capítulo II. Estrategias basadas en el uso de precolumnas de protección

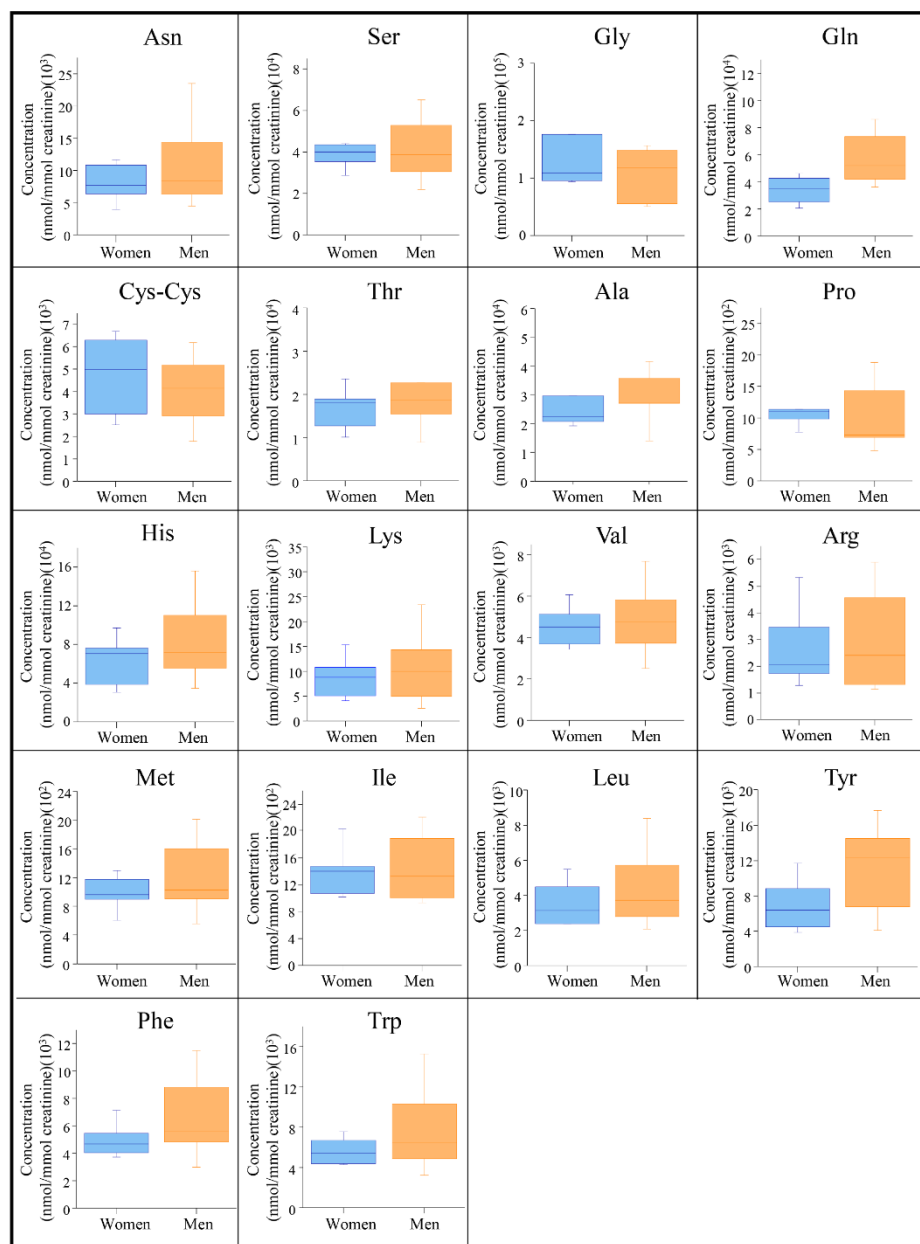


Fig. 4. Box plots representing the concentration of the AAs (expressed in nmol/mmol creatinine) found in urine samples from women (8) and men (10), using the proposed GC-MS/MS methodology.

one obtained with the gC-MS/MS methodology.

LODs and LOQs reported in some of the aforementioned publications were lower than the values obtained here, as can be observed in Table S3. However, the LODs and LOQs obtained with the proposed methodology were highly satisfactory and adequate for the determination of AAs in urine (except for Asp), as we have demonstrated analyzing different samples.

The gC-MS/MS method presented here used conventional instrumentation and a simple sample treatment without derivatization. The time of analysis was lower than most of the other methods reported in bibliography and the LODs and LOQs obtained were suitable for the determination of proteinogenic AAs, except for Asp, in urine samples. Therefore, the proposed gC-MS/MS method is a novel, fast and reliable alternative for the determination of proteinogenic AAs in urine.

4. Conclusions

In this work, we have successfully applied for the first time the use of a guard column prior to tandem mass spectrometry (gC-MS/MS) for the determination proteinogenic AAs in urine samples with a simple sample treatment step. The use of the gC implied a short chromatographic separation step, which allowed to obtain improved analytical signals, as well as better sensitivity, compared with the results obtained when stand-alone MS/MS was used, without a significant increase in analysis time. Moreover, the use of the gC allowed us to solve some of the problems related to isobaric compounds.

Results obtained with the gC-MS/MS methodology were confirmed using a LC-MS/MS method. Both methods were validated using synthetic urine and satisfactory results were obtained. Matrix effect was evaluated and confirmed. Thus, a one-point standard addition and normalization to IS protocol was used for AAs quantification.

Urine samples from eighteen healthy volunteers were analyzed with both methodologies. The results obtained with gC-MS/MS were similar to those obtained with the chromatographic method. Asp was not quantified in urine samples due to the high LOD found for this compound. AAs concentration differences related to sex were also studied. Results showed that there were not significant differences between groups.

The aforementioned results demonstrate that the gC-MS/MS method proposed here is a fast and reliable option for the determination of AAs in urine. It involves a simple sample treatment step without any derivatization and uses conventional instrumentation, advantages over other MS/MS methods already reported in bibliography for the determination of AAs in urine. Besides the method proposed here reduces the analysis time compared to conventional LC-MS/MS methods that involve higher times of analysis.

CRediT authorship contribution statement

María Teresa Fernández-del-Campo-García: Investigation, Validation, Formal analysis, Writing – original draft. **Ana María Casas-Ferreira:** Conceptualization, Supervision, Writing – review & editing, Visualization, Funding acquisition, Project administration. **Encarnación Rodríguez-Gonzalo:** Conceptualization, Supervision, Writing – review & editing, Visualization. **Bernardo Moreno-Cordero:** Writing – review & editing. **José Luis Pérez-Pavón:** Conceptualization, Project administration, Funding acquisition, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Project CTQ2017-87886-P), the Junta de Castilla y León (Project SA055P17 and SA111P20) and the University of Salamanca (Programa de financiación de grupos de investigación. Modalidad C2. 2020). María Teresa Fernández-del-Campo-García is also thankful to the University of Salamanca for a predoctoral fellowship.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106914>.

References

- [1] E.L. Lieu, T.u. Nguyen, S. Rhyne, J. Kim, Amino acids in cancer, *Exp. Mol. Med.* 52 (1) (2020) 15–30, <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0375-3>.
- [2] W.D. Sroka, B.A. Boughton, P. Reddy, U. Roessner, P. Stupski, P. Jarzanski, A. Dąbrowska, M.J. Markuszewski, M.P. Marszał, Determination of amino acids in urine of patients with prostate cancer and benign prostate growth, *Eur. J. Cancer Prev.* 26 (2017) 131–134, <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000248>.
- [3] W.A.H. Waterval, J.L.J.M. Scheijen, M.M.J.C. Ortmans-Ploemen, C.D. Habets-van der Poel, J. Bierau, Quantitative UPLC-MS/MS analysis of underivatized amino acids in body fluids is a reliable tool for the diagnosis and follow-up of patients with inborn errors of metabolism, *Clin. Chim. Acta.* 407 (1–2) (2009) 36–42, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2009.06.023>.
- [4] X. Bi, C.J. Henry, Plasma-free amino acid profiles are predictors of cancer and diabetes development, *Nutr. Diabetes.* 7 (2017), <https://doi.org/10.1038/nuid.2016.55>.
- [5] Y. Song, C. Xu, H. Kuroki, Y. Liao, M. Tsunoda, Recent trends in analytical methods for the determination of amino acids in biological samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147 (2018) 35–49, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.08.050>.
- [6] S. Ferré, V. González-Ruiz, D. Guillarmé, S. Rudaz, Analytical strategies for the determination of amino acids: Past, present and future trends, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1132 (2019) 121819, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121819>.
- [7] J.P. Violi, D.P. Bishop, M.P. Padula, J.R. Steele, K.J. Rodgers, Considerations for amino acid analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A tutorial review, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 131 (2020) 116018, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116018>.
- [8] M.M. Khamis, D.J. Adamko, A. El-Anead, Mass spectrometric based approaches in urine metabolomics and biomarker discovery, *Mass Spectrom. Rev.* 36 (2) (2017) 115–134, <https://doi.org/10.1002/mas.v36.2.1002/mas.21455>.
- [9] M.P. Lorenzo, D. Dudzik, E. Varas, M. Gibellini, M. Skotnicki, M. Zorawski, W. Zarzycki, F. Pellati, A. García, Optimization and validation of a chiral GC-MS method for the determination of free d-amino acids ratio in human urine: Application to a Gestational Diabetes Mellitus study, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 107 (2015) 480–487, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.01.015>.
- [10] O.A. Mayboroda, C. Neussüß, M. Pelzing, G. Zurek, R. Derks, I. Meulenbelt, M. Kloppenburg, E.P. Slagboom, A.M. Deelder, Amino acid profiling in urine by capillary zone electrophoresis - mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1159 (1–2) (2007) 149–153, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.04.055>.
- [11] Z. An, T. Hu, Y. Lv, P. Li, L. Liu, Targeted amino acid and related amines analysis based on ITRAQ®-LC-MS/MS for discovering potential hepatotoxicity biomarkers, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 178 (2020), 112812, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112812>.
- [12] C. Ishii, T. Akita, M. Mita, T. Ide, K. Hamase, Development of an online two-dimensional high-performance liquid chromatographic system in combination with tandem mass spectrometric detection for enantiomeric analysis of free amino acids in human physiological fluid, *J. Chromatogr. A.* 1570 (2018) 91–98, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.07.076>.
- [13] N. Gray, R.S. Plumb, I.D. Wilson, J.K. Nicholson, A validated UPLC-MS/MS assay for the quantification of amino acids and biogenic amines in rat urine, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1106–1107 (2019) 50–57, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.12.028>.
- [14] C. Seo, S. Hwan Kim, H.-S. Lee, H.-J. Park, Y. Kim, M. Ji, J. Min, S.-J. Oh, K. Lee, M.-J. Paik, Simultaneous Determination of 35 Organic Metabolites Including Amino Acids, Creatine, Creatinine, and Oxidized and Reduced Glutathione in Lung Tissue, Plasma and Urine Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Lett.* 53 (3) (2020) 469–481, <https://doi.org/10.1080/00032719.2019.1656728>.
- [15] T. Xia, S. Fu, Q. Wang, Y. Wen, S.A. Chan, S. Zhu, S. Gao, X. Tao, F. Zhang, W. Chen, Targeted metabolomic analysis of 33 amino acids and biogenic amines in human urine by ion-pairing HPLC-MS/MS: Biomarkers for tacrolimus nephrotoxicity after renal transplantation, *Biomed. Chromatogr.* 32 (2018) 1–11, <https://doi.org/10.1002/bmc.4198>.
- [16] T. Roggensack, B. Merz, N. Dick, A. Bub, R. Krüger, Targeted ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric quantification of methylated amines and selected amino acids in biofluids, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 34 (2020) 1–10, <https://doi.org/10.1002/rcm.8646>.

Capítulo II. Estrategias basadas en el uso de precolumnas de protección

- [17] G.S. Zhou, Y.C. Yuan, Y. Yin, Y.P. Tang, R.J. Xu, Y. Liu, P.D. Chen, L. Yin, J. A. Duan, Hydrophilic interaction chromatography combined with ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction for determination of underivatized neurotransmitters in dementia patients' urine samples, *Anal. Chim. Acta.* 1107 (2020) 74–84, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.02.027>.
- [18] E. Öztürk Er, B. Özbek, S. Bakırdere, Determination of seventeen free amino acids in human urine and plasma samples using quadruple isotope dilution mass spectrometry combined with hydrophilic interaction liquid chromatography – Tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* (1641 (2021)), 461970, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461970>.
- [19] C. Virgiliou, G. Theodoridis, I.D. Wilson, H.G. Gika, Quantification of endogenous aminoacids and aminoacid derivatives in urine by hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1642 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462005>.
- [20] Z. Tekin, E.Ö. Er, S. Bakırdere, Determination of glycine in body fluids at trace levels using the combination of quadrupole isotope dilution strategy and Liquid Chromatography-Quadrupole Time of Flight-Tandem Mass Spectrometry, *Meas.: J. Int. Meas. Confed.* 146 (2019) 606–612, <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2019.07.006>.
- [21] M. Şaylan, E.Ö. Er, Z. Tekin, S. Bakırdere, An accurate and sensitive analytical method for the simultaneous determination of glycine, methionine and homocysteine in biological matrices by matrix matching strategy and LC-quadrupole-time-of-flight-MS/MS, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 239 (2020), 10.1016/j.saa.2020.118394.
- [22] S.C. Nanita, L.G. Kaldon, Emerging flow injection mass spectrometry methods for high-throughput quantitative analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (1) (2016) 23–33, <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9193-1>.
- [23] M.M. Rebolledo-Fernandez, D.E. Castiñeiras, M. Dolores Bóveda, M. Luz Couce, J. A. Cocho, J.M. Fraga, Development of electrospray ionization tandem mass spectrometry methods for the study of a high number of urine markers of inborn errors of metabolism, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26 (18) (2012) 2131–2144, <https://doi.org/10.1002/rcm.6325>.
- [24] N. XU, Z.-Q. ZHU, S.-P. YANG, J. WANG, H.-W. GU, Z. ZHOU, H.-W. CHEN, Direct detection of amino acids using extractive electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Fenxi Huaxue/Chinese, J. Anal. Chem.* 41 (4) (2013) 523–528, [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(13\)60643-X](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(13)60643-X).
- [25] R. González-Domínguez, R. Castilla-Quintero, T. García-Barrera, J.L. Gómez-Ariza, Development of a metabolomic approach based on urine samples and direct infusion mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 465 (2014) 20–27, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.07.016>.
- [26] N.C. van de Merbel, Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 27 (10) (2008) 924–933, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.002>.
- [27] M. Jaffe, Ueber den Neiderschlag, welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Kreatinins, *Z.Physiol.Chem.* 10 (1886) 391–400.
- [28] M.T. Fernández-del-Campo-García, A.M. Casas-Ferreira, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, Development of a fast and reliable methodology for the determination of polyamines in urine by using a guard column as a low-resolution fractioning step prior to mass spectrometry. Comparison with flow injection-mass spectrometry analysis, *Microchem. J.* 158 (2020), 105223, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105223>.
- [29] European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CIMP/EWP/192217/2009.Rev1.Corr2*(2012), https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf.
- [30] A. Kruve, R. Rebane, K. Kipper, M.L. Oldekop, H. Evard, K. Herodes, P. Ravio, I. Leito, Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part I, *Anal. Chim. Acta.* 870 (2015) 29–44, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.017>.
- [31] T.M. Annesley, Ion Suppression in Mass Spectrometry, *Clin. Chem.* 49 (2003) 1041–1044, <https://doi.org/10.1373/49.7.1041>.
- [32] M.T. Fernández-del-Campo-García, A.M. Casas-Ferreira, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, Development of a screening and confirmatory method for the analysis of polar endogenous compounds in saliva based on a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric system, *J. Chromatogr. A.* 1590 (2019) 88–95, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.01.001>.
- [33] M. Rotter, S. Brandmaier, C. Prchn, J. Adam, S. Rabstein, K. Gawrych, T. Brüning, T. Illig, H. Lickert, J. Adamski, R. Wang-Sattler, Stability of targeted metabolite profiles of urine samples under different storage conditions, *Metabolomics.* 13 (2017), <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1137-z>.

Supplementary Material

Rapid and reliable analysis of underivatized amino acids in urine using tandem mass spectrometry

María Teresa Fernández-del-Campo-García, Ana María Casas-Ferreira*, Encarnación Rodríguez-Gonzalo, Bernardo Moreno-Cordero, José Luis Pérez-Pavón

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Salamanca. 37008 Salamanca, SPAIN

* Corresponding author: (fax) +34-923-294483; (e-mail) anacasas@usal.es

Figure S1. MRM signal (156.1 → 110.1) of His obtained with different dwell times (20 ms, 50 ms and 100 ms) using LC-MS/MS, gC-MS/MS and stand-alone MS/MS methods.

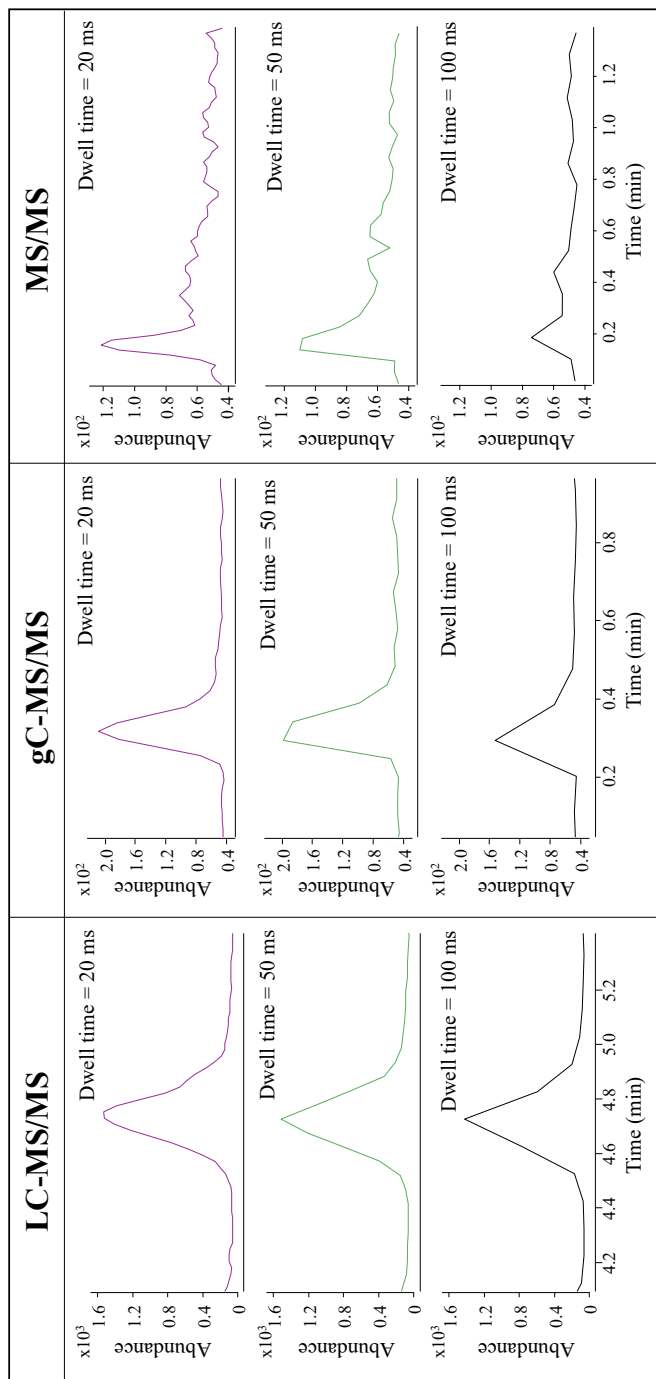
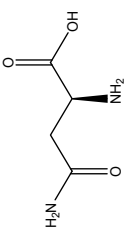
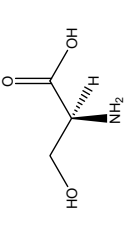
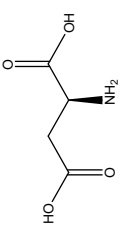
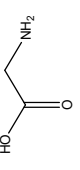
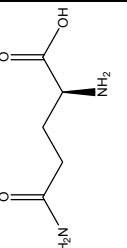
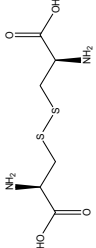
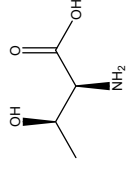
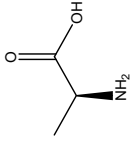
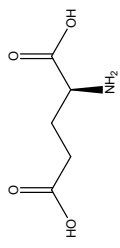
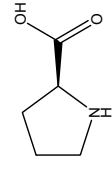
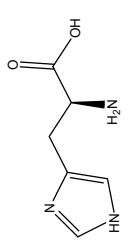
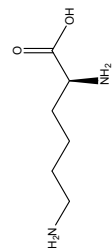
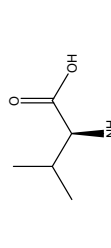
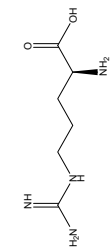
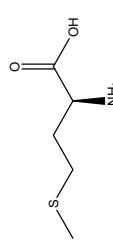
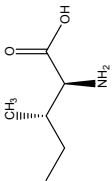
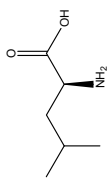
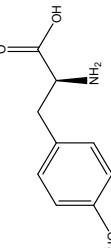
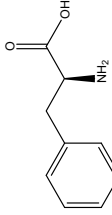
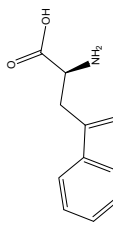


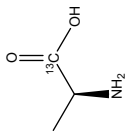
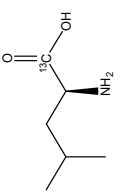
Table S1. Physical-chemical properties of the target compounds and MS/MS optimized parameters for their analysis.

Compound	Chemical structure	Mw (g/mol)	Log P ^a	t _R (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Fragmentor (V)	Collision energy (eV)
Asn		132.12	-3.4	2.768	133.1	74.1/87.1	41	13/1
Ser		105.09	-3.4	2.801	106.1	60.1/42.1	41	5/25
Asp		133.11	-3.5	2.813	134.1	74/88	41	9/1
Gly		75.07	-3.3	2.848	76.0	30.1	41	1
Gln		146.14	-3.3	2.945	147.1	84.1/130	41	13/1

Compound	Chemical structure	Mw (g/mol)	Log P ^a	t _R (min)	Precursor ion (m/z)	Productio ion (m/z)	Fragmentor (V)	Collision energy (eV)
Cys-Cys		240.02	-3.2	3.005	241.0	74.1	41	29
Thr		119.12	-3	3.065	120.1	74.1/56.1	41	5/13
Ala		89.09	-3	3.206	90.1	44.1	41	5
Glu		147.13	-3.5	3.362	148.1	84.0/56.0	41	13/29
Pro		115.11	-2.7	-3.518	116.1	70.1/43.1	41	13/33

Compound	Chemical structure	Mw (g/mol)	Log P ^a	t _R (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Fragmentor (V)	Collision energy (eV)
His		155.15	-2.7	4.646	156-1	110.1/83	41	9/25
Lys		146.19	-3.8	4.739	147.1	67/84.1/130	41	30/13/5
Val		117.15	--2.3	6.812	118.1	72.1/55.1	41	5/21
Arg		174.20	-3.5	6.865	175.1	70.1/60.1	41	21/9
Met		149.21	-1.8	8.057	150.1	56.1/104	41	13/5

Compound	Chemical structure	Mw (g/mol)	Log P ^a	t _r (min)	Precursor ion (m/z)	Productio ion (m/z)	Fragmentor (V)	Collision energy (eV)
Ile		131.17	-1.7	16.584	132.1	69.1/86.1	41	17/1
Leu		131.17	-1.8	17.324	132.1	43.1/86.1	41	21/1
Tyr		181.19	-2.4	17.739	182.1	91.1/165	41	25/1
Phe		165.19	-1.4	19.378	166.1	120.1/103	41	1/25
Trp		204.23	-1.4	20.362	205.2	188/146	81	1/13

Compound	Chemical structure	Mw (g/mol)	Log P ^a	t _R (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Fragmentor (V)	Collision energy (eV)
Ala- ¹³ C		90.09	-3	3.081	91.1	44.1	41	5
Leu- ¹³ C		132.17	-1.8	16.843	133.1	43.1/86.1	41	25/5

^a Values obtained from VCCLAB, Virtual Computational Chemistry Laboratory, <https://www.vcclab.org>, 2005.

^b In bold, product ion (m/z) used for quantification.

Table S2. Comparison of slopes (expressed in arb. units vs. concentration in mg/L) of the calibration curves obtained with synthetic and real urine with the gC-MS/MS and the LC-MS/MS methodologies.

	gC-MS/MS			LC-MS/MS			p value
	Slope		p value	Slope		p value	
	Urine	Synthetic urine		Urine	Synthetic urine		
Asn	0.075 ± 0.008	0.052 ± 0.003	< 0.001	0.170 ± 0.009	0.206 ± 0.014	< 0.001	
Ser	0.194 ± 0.009	0.190 ± 0.004	< 0.05	0.420 ± 0.017	0.439 ± 0.046	< 0.05	
Asp	-	0.061 ± 0.003	-	0.148 ± 0.010	0.122 ± 0.008	< 0.001	
Gly	0.103 ± 0.004	0.098 ± 0.004	< 0.001	0.148 ± 0.003	0.142 ± 0.004	< 0.05	
Gln + Lys	0.348 ± 0.013	0.310 ± 0.007	< 0.001	-	-	-	
Gln	-	-	-	0.222 ± 0.010	0.142 ± 0.004	< 0.001	
Cys-Cys	0.085 ± 0.007	0.081 ± 0.004	< 0.01	0.057 ± 0.002	0.049 ± 0.002	< 0.001	
Thr	0.198 ± 0.008	0.203 ± 0.009	< 0.01	0.142 ± 0.006	0.133 ± 0.004	< 0.001	
Ala	0.451 ± 0.018	0.474 ± 0.020	< 0.001	0.438 ± 0.009	0.465 ± 0.011	< 0.001	
Pro	1.726 ± 0.100	1.651 ± 0.108	< 0.001	4.438 ± 0.097	6.232 ± 0.156	< 0.001	
His	1.051 ± 0.052	1.115 ± 0.024	< 0.001	1.039 ± 0.030	1.380 ± 0.096	< 0.001	
Lys	0.082 ± 0.008	0.071 ± 0.004	< 0.001	0.044 ± 0.003	0.046 ± 0.003	< 0.01	
Val	0.831 ± 0.053	1.139 ± 0.071	< 0.001	3.390 ± 0.073	3.577 ± 0.139	< 0.001	
Arg	0.242 ± 0.010	0.212 ± 0.007	< 0.001	0.372 ± 0.015	0.432 ± 0.011	< 0.001	
Met	0.321 ± 0.030	0.381 ± 0.013	< 0.001	1.028 ± 0.025	1.228 ± 0.023	< 0.001	
Ile	0.518 ± 0.027	0.535 ± 0.010	< 0.001	0.685 ± 0.013	0.629 ± 0.015	< 0.001	
Leu	0.652 ± 0.029	0.675 ± 0.018	< 0.001	0.639 ± 0.011	0.661 ± 0.014	< 0.001	
Tyr	0.092 ± 0.007	0.098 ± 0.003	< 0.001	0.293 ± 0.012	0.413 ± 0.007	< 0.001	
Phe	1.578 ± 0.070	1.551 ± 0.038	< 0.05	1.683 ± 0.059	1.584 ± 0.027	< 0.001	
Trp	0.618 ± 0.034	0.652 ± 0.044	< 0.001	1.008 ± 0.019	0.813 ± 0.014	< 0.001	

Table S3. Concentration range of AAs concentration (nmol/mmol creatinine) found in urine samples from 18 healthy volunteers (mean, lowest and highest values) using the gC-MS/MS and LC-MS/MS methods.

	Concentration range Mean (low-high)	
	gC-MS/MS	LC-MS/MS
Asn	10413 (3998 - 23509)	11060 (5654 - 22098)
Ser	41876 (22058 - 71761)	46103 (23692 - 77912)
Asp	-	931 (312 - 1619)
Gly	151648 (51045 - 410962)	149136 (49750 - 380520)
Gln	50918 (20678 - 103207)	47211 (23998 - 98784)
Cys-Cys	4567 (1793 - 6683)	4600 (2818 - 7738)
Thr	19663 (8896 - 39328)	21537 (10451 - 41247)
Ala	30650 (14125 - 64128)	32633 (15913 - 73106)
Pro	1123 (483 - 2295)	1058 (460 - 1886)
His	78111 (30514 - 156150)	80736 (28567 - 163757)
Lys	12026 (2621 - 33994)	14480 (3670 - 37818)
Val	4732 (2515 - 7691)	3956 (2480 - 5640)
Arg	2828 (1149 - 5903)	2668 (977 - 5718)
Met	1114 (556 - 2013)	946 (473 - 1610)
Ile	1495 (935 - 2213)	1364 (796 - 2040)
Leu	4114 (2088 - 8395)	3368 (1920 - 5419)

Table S4. Methods reported in the literature for the determination of AAs in urine based on MS/MS analysis (last 10 years) and LC-MS or LC-MS/MS analysis (last 5 years).

Methods	Derivatization	Conditions	Time (min)	Number of AAs	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Ref
MS/MS							
ESI-MS/MS	n-butanol-chloride	(70:30, v/v) ACN/H ₂ O (0.1% CH ₂ O ₂)	2.5	15	0.1-0.9 ^b	0.1-1.3 ^b	[23]*
EESI-MS/MS	-	MeOH/H ₂ O	0.5	19	0.0001-0.0262 ^c	-	[24]*
FIA-MS/MS	AbsoluteIDQ® p150	-	7	13	-	-	[32]*
gC-MS/MS	-	Guard column: XBridge® C18 guard column (2.1 x 10 mm, 3.5 μm) Mobile phase: A: H ₂ O/0.1% HFBA B: MeOH/0.1% HFBA	1.5	19	0.004-2.730 ^a	0.013-9.009 ^a	This work
LC-MS/MS and LC-MS							
LC-ESI-QQQ-MS	6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimide carbamate (AQC)	Column: Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution HT (2.1x 50 mm, 1.8 μm) Mobile phase: A: H ₂ O/0.1% CH ₂ O ₂ B: ACN/0.1% CH ₂ O ₂	19	18	0.0059-0.0871 ^c	-	[2]*
LC-MS/MS	iTRAQ	Column: Agilent TC-C18 (4.6x150 mm x, 5 μm) Mobile phase: A: H ₂ O/0.01% HFBA/0.01% CH ₂ O ₂ B: ACN/0.01% HFBA/0.01% CH ₂ O ₂	25	20	-	-	[11]*
2D-HPLC-MS/MS	4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F)	Column: 1 st KSAARP (1.0x500mm) 2 nd KSAACSP-001S (1.5x250mm) Mobile phase: 1 st H ₂ O/MeCN (0.05% TFA)	515	6	-	-	[12]*

Capítulo II. Estrategias basadas en el uso de precolumnas de protección

Methods	Derivatization	Conditions	Time (min)	Number of AAs	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Ref
UPLC-MS/MS	AccQTag ULTRA™	2 ^a MeCN/MeOH (75:25, v/v) (0.5% CH ₂ O ₂); MeCN/MeOH (80:20, v/v) (0.3% CH ₂ O ₂) and MeCN/MeOH (20:80, v/v) (0.2% CH ₂ O ₂). Different mobile phase for different separation. Column: HSS T3 (2.1×150 mm, 1.8µm) Mobile phase: A: H ₂ O/0.1% CH ₂ O ₂ B: ACN/0.1% CH ₂ O ₂	7.5	20	1.2-12 ^{b,d}	-	[13]*
LC-MS/MS	-	Column: Synergi Hydro-reverse phase (4.6×150mm, 4µm) Mobile phase: A: 95% H ₂ O/ 5% MeOH/0.1% CH ₂ O ₂ /0.05% HFBA B: 95% MeOH/ 5% H ₂ O/0.1% CH ₂ O ₂ / 0.05% HFBA	22	19	0.002-0.011 ^{b,e}	0.006-0.038 ^{b,e}	[14]*
HPLC-MS/MS	-	Column: Agilent Zorbax SB-C18 (3.0×150 mm, 5µm) Mobile phase: A: H ₂ O/ 0.2% CH ₂ O ₂ / 0.02% HFBA B: MeOH	16	20	-	0.002-5.000 ^{b,g}	[15]*
UPLC-MS/MS	-	Column: Acquity BEH Amide (2.1×100mm, 1.7µm) Mobile phase: A: (1:1) ACN; H ₂ O/50 mM NH ₄ HCO ₂ B: ACN/0.05% CH ₂ O ₂	9	3	-	-	[16]*
HILIC-UHPLC-QTRAP/MS ₂	-	Column: Acquity UPLC BEH Amide (2.1x100 mm, 1.7µm) Mobile phase: A: H ₂ O/ 10 mM NH ₄ CH ₃ CO ₂ /0.5% CH ₃ CO ₂ H B: ACN/1 mM NH ₄ CH ₃ CO ₂ /0.1% CH ₃ CO ₂ H	4.5	4	0.002-0.008 ^b	0.005-0.0112 ^b	[17]*
LC-MS/MS	-	Column: ACE 3 SIL (3.0 x150 mm, 3µm) Mobile phase: A: 20 mM NH ₄ HCO ₂ /ACN (9:1, v/v) B: ACN /20 mM NH ₄ HCO ₂ (9:1, v/v)	8	17	0.003-0.269 ^c	0.01-0.90 ^c	[18]*

Methods	Derivatization	Conditions	Time (min)	Number of AAs	LOD (ng/L)	LOQ (mg/L)	Ref
HILIC-MS/MS	-	<p>Column: ACQUITY UPLC BEH Amide (2.1×150 mm,1.7µm)</p> <p>Mobile phase: A: 5 mM NH₄CH₃CO₂/ACN/H₂O (95:5, v/v) B: 5 mM NH₄CH₃CO₂/H₂O/ACN (70:30, v/v).</p>	14.1	19	0.0005-0.2350 ^a	0.005-2.34 ^a	[19] ^a
LC-QTOF-MS/MS	-	<p>Column: Intrada Amino Acids Separation WAA35 (3.0×150mm,3µm)</p> <p>Mobile phase: A: H₂O/ACN (9:1)/100 mM NH₄HCO₂ B: H₂O/ACN (1:9)/100 mM NH₄HCO₂</p>	6	1	1.4 ^c	4.7 ^c	[20] ^a
LC-QTOF-MS/MS	-	<p>Column: Intakt Intrada (3.0×150 mm,3.0 µm)</p> <p>Mobile phase: A: H₂O/ 10 mM NH₄HCO₂ B: MeOH</p>	4.01	2	0.017-0.730 ^c	0.058-2.44 ^c	[21] ^a
UPLC-MS/MS	-	<p>Column: Waters Acquity UPLC BEH Amide (2.1×100 mm,1.7µm)</p> <p>Mobile phase: A: H₂O/ 0.2% CH₂O₂ B: ACN/0.2% CH₂O₂</p>	10	18	-	0.1-1.2 ^{b,g}	[1]
UPLC-QTOF-MS	-	<p>Column: Waters ACQUITY UPLC BEH amide (2.1×100mm,1.7µm)</p> <p>Mobile phase: A: H₂O/ 10 mM NH₄HCO₂/0.15 % CH₂O₂ B: ACN/ 1 mM NH₄HCO₂/ 0.15 % CH₂O₂</p>	18	18	0.0001-0.0230 ^b	0.001-0.044 ^{b,g}	[2]
UPLC-QTOF-MS UPLC-QQQ-MS	6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimide carbamate (AQC)	<p>Column: Acquity UPLC HSS T3 (2.1×150 mm,1.8 µm)</p> <p>Mobile phase: A: 2 mM NH₄CH₃CO₂/H₂O B: 2 mM NH₄CH₃CO₂/ACN/H₂O (95:5, v/v)</p> <p>Column: CROWNPAK CR-(+) and CR-I(-) chiral (3.0×150 mm,5µm).</p> <p>Mobile phase: ACN/EtOH/H₂O/TFA (80:15:5:0.5, v/v/v/v)</p>	7.5	20	-	400 ^f (QTOF) 40 ^f (QQQ)	[3]
LC-MS/MS	-	<p>Column: CR-(+) and CR-I(-) chiral (3.0×150 mm,5µm).</p> <p>Mobile phase: ACN/EtOH/H₂O/TFA (80:15:5:0.5, v/v/v/v)</p>	20	18	0.0006-0.0500 ^f	0.002-0.16 ^c	[4]

Methods	Derivatization	Conditions	Time (min)	Number of AAs	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Ref
HPLC-TOF-MS (untarget) LC-MS/MS and FLA-MS/MS (target) LC-MS/MS	AbsoluteIDQ p180 aTRAQ	<p>Column: Waters Acquity BEH C18 (2.1×50 mm,1.7µm) Mobile phase: A: H₂O/0.2% CH₃O₂ B: ACN/0.2% CH₂O₂</p> <p>Column: C18 SCIEEX 4374841 (4.6×150 mm,5µm) Mobile phase: A: 0.1% CH₂O₂/ 0.01% HFBA/ H₂O B: 0.1% CH₂O₂/ 0.01% HFBA/ MeOH</p>	7 11	19 20	- -	- 0.375-1.31 ^{c,g}	[5] [6]
HPLC-MS/MS	-	<p>Column: Discovery C18 (2.1x50mm,5µm) Mobile phase: A: 0.1% TDFHA/H₂O B: 0.1%TDFHA/ACN 2 different gradients</p>	15 6	19	-	-	[7]
UPLC-ESI-MS/MS	Dansyl chloride	<p>Column: ACQUITY UPLC BEH C8 (1×100 mm,1.7 µm) Mobile phase: A: H₂O/0.1% (v/v) CH₂O₂ B: ACN/ IPA (1:1 v/v)/ 0.1% (v/v) CH₂O₂</p>	7.50	1	-	0.002 ^{b,g}	[8]
HILIC/RPLC-MS	-	<p>Column: HILIC: SeQuant ZIC-cHILIC column (2.1×100 mm,3 µm) RPLC: Acquity BEH C8 (2.1×50 mm,1.7 µm) and Acquity HSS T3 (2.1×50 mm,1.7 µm) RPLC: positive ion mode and negative ion mode, respectively. Mobile phase: HILIC: A: ACN/H₂O (9:1, v/v)/0.02% CH₃CO₂H/10 mM NH₄CH₃CO₂ B: ACN/H₂O (2:8, v/v)/0.02% CH₃CO₂H/10 mM NH₄CH₃CO₂ RPLC: For positive ion mode: A: H₂O/ 0.1% CH₂O₂</p>	25.4	18	HILIC:0.002-0.003 ^e RPLC:0.002-0.015 ^e (Ala, Cys-Cys, Leu and Phe)	-	[9]

Methods	Derivatization	Conditions	Time (min)	Number of AAs	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Ref
UHPLC-ESI-MS/MS	-	B: ACN/0.1% CH ₂ O ₂ . For negative ion mode: A: H ₂ O/6.5 mM NH ₄ HCO ₃ B: MeOH/H ₂ O (95/5, v/v) / 6.5 mM NH ₄ HCO ₃	14	2	1.74x10 ⁻¹¹ , 8.95x10 ^{-9c}	8.71x10 ⁻¹¹ , 4.48x10 ^{-8c}	[10]
UPLC-MS	6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimide carbonyl (AQC)	Column: ACQUITY UPLC BEH Amide (2.1×100 mm,1.7µm) Mobile phase: A: H ₂ O/0.1% CH ₂ O ₂ B: ACN/0.1% CH ₂ O ₂ Column: Cortecs UPLC BEH C18 (2.1×150 mm,1.6µm) Mobile phase: A: H ₂ O/0.1% CH ₂ O ₂ B: ACN/0.1% CH ₂ O ₂	8	20	-	0.0254-0.439 ^b	[11]
UPLC-MS/MS	Methanol-HCl	Column: Waters ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 ×100mm,1.7 µm) Mobile phase: A: H ₂ O/0.1% CH ₂ O ₂ B: MeOH	6	3	0.0001-0.0010 ^b	0.0003-0.0033 ^b	[12]
DLLME-LC-MS	-	Column: XBridge Amide™ BEH (3.0×100 mm,3.5 µm) Mobile phase: A: 10 mM NH ₄ HCO ₃ /H ₂ O B: 10 mM NH ₄ HCO ₃ /ACN	20	2	0.005 ^b	0.01 ^b	[13]
LC-MS/MS	-	Column: Acquity BEH C18 (2.1×100mm,1.7 µm) Mobile phase: A: H ₂ O/0.01%(v/v) CH ₂ O ₂ / 1mM NH ₄ HCO ₃ B: MeOH/ 0.01%(v/v) CH ₂ O ₂ / 1mM NH ₄ HCO ₃	12	5	0.010-0.050 ^b	0.033-0.165 ^b	[14]
LC-MS/MS	(R)-4-nitrophenyl-N-[2-(diethylamino)-6,6-dimethyl-1,1,1-biphenyl]-2-yl]	Column: YMC Triart Phenyl (2.1×75mm,1.9µm) Mobile phase: A: H ₂ O/ 0.1%(v/v) CH ₂ O ₂ / 10 mM NH ₄ HCO ₃ B: ACN/H ₂ O (95:5 v/v)	20	17	-	-	[15]

Methods	Derivatization	Conditions	Time (min)	Number of AAs	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Ref
LC-MS/MS	carbamate hydrochloride ((R)-BIAC) Dansyl chloride	Column: Kinetex C18 (2.1×100 mm, 5 μm) Mobile phase: A: 0.1% CH ₂ O ₂ /5% ACN B: 0.1% CH ₂ O ₂ /ACN	34	11	-	0.004-0.024 ^{b, g}	[16]
LC-ESI-MS/MS	aTRAQ	Column: Sciex C18 (4.6x150mm, 5μm) Mobile phase: A: H ₂ O/ 0.1% CH ₂ O ₂ / 0.01% HFBA B: MeOH/0.1% CH ₂ O ₂ / 0.01% HFBA	18	20	-	-	[17]
UHPLC-MS/MS	5-aminoisquinolyl-N-hydroxysuccinimide carbamate (5-AIQC)	Column: Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution HD (2.1×100mm, 1.8μm) Mobile phase: A: H ₂ O/0.1% (v/v) CH ₂ O ₂ B: MeOH/0.1% (v/v) CH ₂ O ₂	16	20	0.3-15 ^{c, d}	-	[18]

LOD and LOQ calculated in synthetic ^a urine, ^b urine sample and ^c standard solutions of AAs

Units: ^dfmol, ^eng and ^fnmol

^g LLOQ

* References in the main manuscript

References supplementary information

- [1] Y. Wen, X. Yuan, F. Qin, L. Zhao, Z. Xiong, Development and validation of a hydrophilic interaction ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for rapid simultaneous determination of 19 free amino acids in rat plasma and urine, *Biomed. Chromatogr.* 33 (2019) 1–13. <https://doi.org/10.1002/bmc.4387>.
- [2] R. Joyce, V. Kuziene, X. Zou, X. Wang, F. Pullen, R.L. Loo, Development and validation of an ultra-performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry method for rapid quantification of free amino acids in human urine, *Amino Acids*. 48 (2016) 219–234. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2076-0>.
- [3] N. Gray, N.G. Lawler, R. Yang, A.C. Morillon, M.C.L. Gay, S.H. Bong, E. Holmes, J.K. Nicholson, L. Whiley, A simultaneous exploratory and quantitative amino acid and biogenic amine metabolic profiling platform for rapid disease phenotyping via UPLC-QToF-MS, *Talanta*. 223 (2021) 121872. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121872>.
- [4] Y. Umakoshi, Y. Nakano, K. Fukuda, K. Watanabe, I. Miyawaki, E. Fukusaki, Automatic switching valve system to minimize variation of liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based chiral amino acid profiling, *J. Biosci. Bioeng.* 128 (2019) 773–779. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.06.005>.
- [5] K. Cho, J.S. Moon, J.H. Kang, H.B. Jang, H.J. Lee, S.I. Park, K.S. Yu, J.Y. Cho, Combined untargeted and targeted metabolomic profiling reveals urinary biomarkers for discriminating obese from normal-weight adolescents, *Pediatr. Obes.* 12 (2017) 93–101. <https://doi.org/10.1111/ijpo.12114>.

- [6] W.S. Phipps, E. Crossley, R. Boriack, P.M. Jones, K. Patel, Quantitative amino acid analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using low cost derivatization and an automated liquid handler, *JIMD Rep.* 51 (2020) 62–69. <https://doi.org/10.1002/jmd2.12080>.
- [7] G. Giordano, A. Gucciardi, P. Pirillo, M. Naturale, Quantification of Underivatized Amino Acids on Dry Blood Spot, Plasma, and Urine by HPLC-ESI-MS/MS, *Methods Mol. Biol.* 2030 (2019) 153–172. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9639-1_13.
- [8] M.P.M. Letertre, A. Myridakis, L. Whiley, S. Camuzeaux, M.R. Lewis, K.E. Chappell, A. Thaikkatil, M.E. Dumas, J.K. Nicholson, J.R. Swann, I.D. Wilson, A targeted ultra performance liquid chromatography – Tandem mass spectrometric assay for tyrosine and metabolites in urine and plasma: Application to the effects of antibiotics on mice, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1164 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122511>.
- [9] W. Lv, L. Guo, F. Zheng, Q. Wang, W. Wang, L. Cui, Y. Ouyang, X. Liu, E. Li, X. Shi, G. Xu, Alternate reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with mass spectrometry for broad coverage in metabolomics analysis, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1152 (2020) 122266. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122266>.
- [10] X. Su, X. Li, H. Wang, Z. Cai, Simultaneous determination of methionine cycle metabolites, urea cycle intermediates and polyamines in serum, urine and intestinal tissue by using UHPLC-MS/MS, *Talanta.* 224 (2021) 121868. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121868>.
- [11] C.J. Pretorius, B.C. McWhinney, B. Sipinkoski, A. Wilce, D. Cox, A. McWhinney, J.P.J. Ungerer, Rapid amino acid quantitation with

pre-column derivatization; ultra-performance reverse phase liquid chromatography and single quadrupole mass spectrometry, *Clin. Chim. Acta.* 478 (2018) 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.12.027>.

[12] W. Lee, N.H. Park, T.B. Ahn, B.C. Chung, J. Hong, Profiling of a wide range of neurochemicals in human urine by very-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with in situ selective derivatization, *J. Chromatogr. A.* 1526 (2017) 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.021>.

[13] L. Konieczna, A. Roszkowska, M. Niedźwiecki, T. Baczek, Hydrophilic interaction chromatography combined with dispersive liquid-liquid microextraction as a preconcentration tool for the simultaneous determination of the panel of underivatized neurotransmitters in human urine samples, *J. Chromatogr. A.* 1431 (2016) 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.062>.

[14] J. Marcos, N. Renau, O. Valverde, G. Aznar-Lain, I. Gracia-Rubio, M. Gonzalez-Sepulveda, L.A. Pérez-Jurado, R. Ventura, J. Segura, O.J. Pozo, Targeting tryptophan and tyrosine metabolism by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1434 (2016) 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.023>.

[15] M. Harada, S. Karakawa, H. Miyano, K. Shimbo, Simultaneous analysis of d, l-amino acids in human urine using a chirality-switchable biaryl axial tag and liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Symmetry (Basel)*. 12 (2020). <https://doi.org/10.3390/SYM12060913>.

[16] M.M. Khamis, D.J. Adamko, A. El-Aneed, Development of a validated LC- MS/MS method for the quantification of 19 endogenous asthma/COPD potential urinary biomarkers, *Anal. Chim. Acta.* 989 (2017) 45–58. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.08.007>.

[17] P. Dereziński, A. Klupczynska, W. Sawicki, J.A. Pałka, Z.J. Kokot, Amino acid profiles of serum and urine in search for prostate cancer biomarkers: A pilot study, *Int. J. Med. Sci.* 14 (2017) 1–12. <https://doi.org/10.7150/ijms.15783>.

[18] J. Wang, L. Zhou, H. Lei, F. Hao, X. Liu, Y. Wang, H. Tang, Simultaneous Quantification of Amino Metabolites in Multiple Metabolic Pathways Using Ultra-High Performance Liquid Chromatography with Tandem-mass Spectrometry, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01435-7>.

II.2.

Precolumnas de protección acopladas a espectrometría de masas con analizador Orbitrap

II.2.1. Artículo de investigación

Espectrometría de masas de alta resolución (Orbitrap) con el uso de precolumnas de protección (gC) para la determinación de compuestos de interés clínico en orina

Resumen

Con el objetivo de desarrollar métodos rápidos de análisis se han propuesto metodologías basadas en espectrometría de masas, utilizando analizadores de alta y baja resolución, sin una etapa previa de separación. La espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) permite identificar compuestos por su masa exacta (m/z) y realizar análisis con una gran exactitud. Además, HRMS tiene otras ventajas sobre la espectrometría de masas en tándem con resolución de masas unitaria (MS/MS), como la posibilidad de utilizar la misma inyección con fines cualitativos y cuantitativos, incluyéndose análisis dirigidos y no dirigidos, permitiendo recopilar espectros de barrido completo que se pueden almacenar y utilizar en análisis posteriores, lo que permite la elucidación estructural de compuestos desconocidos.

Los métodos analíticos que no implican una etapa separativa previa a la detección mediante espectrometría de masas presentan varias desventajas, sobre todo en muestras biológicas por su compleja matriz, como la supresión iónica y la presencia de interferencias isobáricas que pueden dificultar la cuantificación. Para reducir los problemas se han propuesto diferentes tratamientos de muestra y la utilización de precolumnas de protección para realizar una etapa de limpieza de la matriz y una separación rápida de los analitos.

Los aminoácidos son compuestos involucrados en una gran cantidad de procesos biológicos relevantes. Diferentes enfermedades, como el cáncer, han sido asociadas con la presencia de concentraciones alteradas de estos compuestos en orina. La cromatografía líquida acoplada a analizadores de masas de baja resolución utilizando espectrometría de masas en tándem (MS/MS) ha sido la técnica más utilizada para el análisis de aminoácidos en orina. La espectrometría de masas de alta resolución con equipos como Orbitrap se ha utilizado escasamente para el análisis dirigido de estos compuestos en orina.

OBJETIVO

El objeto de este trabajo consiste en el desarrollo de un método basado en HRMS utilizando una precolumna de protección acoplada a un analizador de masas Orbitrap (gC-Orbitrap-HRMS) para la determinación de aminoácidos proteinogénicos en orina. Con objeto de obtener la mejor limpieza de la matriz y un fraccionamiento adecuado de los analitos, se evalúan diferentes precolumnas de protección con materiales de relleno de diferente naturaleza química (fase inversa, intercambio catiónico, intercambio aniónico e interacciones hidrofílicas). Según nuestro conocimiento, es la primera vez que se propone esta metodología (gC-Orbitrap-HRMS) para la determinación de aminoácidos en la orina (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína (en forma de cistina), glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina).

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Todos los análisis se llevan a cabo en un sistema Vanquish UHPLC acoplado a una fuente de ionización por electrospray y un analizador de masas Orbitrap.

Una vez recibidas las muestras de orina en el laboratorio, estas se congelan a -20°C en oscuridad. Para el análisis, se descongelan a temperatura ambiente y se someten a diferentes procedimientos de tratamiento de muestra en función de la precolumna evaluada.

Cuando se evalúan las precolumnas de protección con naturaleza química de fase inversa, intercambio catiónico y aniónico, la orina se centrifuga para la separación de las proteínas. Posteriormente, se filtra el sobrenadante utilizando filtros de nailon y se diluye en una proporción 1/10 (v/v) con el medio de dilución seleccionado: agua ultrapura con 0.1% (v/v) de ácido difluoroacético (DFA) para la gC con fase inversa, agua ultrapura con 0.1% (v/v) de ácido fórmico (FA) para

la gC de intercambio catiónico y agua ultrapura con 10 mM de bicarbonato amónico (NH_4HCO_3) para la de intercambio aniónico.

Cuando se utiliza la cromatografía de interacciones hidrofílicas (HILIC), el medio en el que se encuentra la muestra debe tener un alto contenido de disolvente orgánico, para favorecer la retención y evitar la irreproducibilidad en los tiempos de retención. Sin embargo, cuando se analizan muestras biológicas, el uso de medios de dilución con tales características pueden causar la precipitación de proteínas. Por esta razón, cuando se evalúa la precolumna de protección de interacciones hidrofílicas (HILIC-gC), se utiliza un tratamiento ligeramente diferente. En este caso, se centrifuga la muestra tras la dilución de la misma (1/10, v/v), utilizando una mezcla de 77 % ACN (0,2 % FA, v/v) y 23 % agua ultrapura (0,2 % FA, v/v), y se filtra el sobrenadante para asegurar la ausencia de partículas en suspensión en la muestra.

La optimización de los distintos parámetros del Orbitrap, se realiza en ausencia de la precolumna de protección. Se utiliza como fase portadora una mezcla 80 % agua ultrapura:20 % MeOH, ambos con un 0,1 % FA (v/v), con un flujo de 0.5 mL/min y un volumen de inyección de 5 μL . El tiempo total del análisis es de 1.5 min.

Con objeto de obtener las mejores señales analíticas, se evalúan diferentes modos de adquisición en el Orbitrap. Estos son: barrido de MS completo (Full-MS), barrido de MS completo seguido de un conjunto de escaneos dependientes de datos (dd) con una energía de fragmentación determinada (Full MS-ddMS²), seguimiento de reacción en paralelo (PRM) y Full-MS combinado con PRM. Los mejores resultados se obtienen con las modalidades Full MS y PRM combinadas. Por un lado, se selecciona el modo Full MS para aquellos analitos para los que es posible realizar su determinación por masa exacta. El modo PRM se utiliza para aquellos compuestos que presentan interferencias isobáricas y para los cuales es necesario utilizar sus iones producto para su correcta cuantificación.

Para diferenciar que compuestos se analizan mediante Full MS o mediante PRM, se realiza un estudio de los posibles interferentes isobáricos de los aminoácidos mediante una revisión bibliográfica, concluyéndose que leucina, isoleucina, tirosina, valina, treonina, ácido glutámico, asparagina, ácido aspártico y glutamina presentan interferentes. Para estos aminoácidos, se selecciona como modo de adquisición PRM. También se evalúan posibles compuestos que pudieran presentar los mismos patrones de fragmentación que estos aminoácidos. Se concluye que ninguno de los compuestos identificados como posibles interferentes comparte los iones producto seleccionados para la cuantificación de los analitos objeto de estudio.

Se analizan seis muestras de orina para comprobar la existencia de otros compuestos interferentes no identificados. Para el ion quasi-molecular de la prolina (116,0706, m/z), se observan dos picos sin resolver, uno de ellos correspondiente a un analito sin identificar. Al evaluar la fragmentación de la prolina (PRM), se observa la existencia de iones productos con los cuales es posible la correcta cuantificación de este compuesto (en concreto, la transición 116.1→70.0656, m/z). Para esta transición, también aparecen dos picos, pero en este caso bien resueltos. El primero de ellos corresponde a prolina y el segundo a un segundo compuesto no identificado.

En el caso de leucina, las interferencias de compuestos isobáricos presentes en la matriz no es el único problema. La transición que normalmente se selecciona para la cuantificación individual de este compuesto (132.1→43.3180, m/z) no puede ser seleccionada por limitaciones instrumentales (el límite inferior de barrido (m/z) en el analizador de masas Orbitrap es 50). Por esta razón, se selecciona la transición 132.1→86.0968 (m/z), la cual es compartida por leucina e isoleucina. Este último compuesto puede ser cuantificado utilizando su transición específica 132.2→69.0704 (m/z). Para la cuantificación de leucina, se integra la señal obtenida para la transición 132.1→86.0968 (m/z), asignándose la

concentración obtenida a la suma de leucina e isoleucina, al ser la concentración de isoleucina conocida, la concentración de leucina se obtiene por diferencia.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se utiliza el modo de adquisición PRM para 9 aminoácidos (leucina-isoleucina, tirosina, valina, treonina, ácido glutámico, asparagina, ácido aspártico, ácido glutamina y prolina) y el modo Full MS para los 11 compuestos restantes.

Respecto a las precolumnas de protección se evalúan las siguientes: XBridge® C18 (2.1 x 10 mm, 3.5 µm) de fase inversa, Primesep 200 (2.1 x 10 mm, 3 µm) de intercambio catiónico, Hypersil GOLD AX (2.1 x 10 mm, 3 µm) de intercambio aniónico y XBridge® Glycan BEH Amide (2.1 x 10 mm, 3.5 µm) de interacciones hidrofílicas. Para todas ellas se utilizan condiciones isocráticas con una composición de fase móvil adecuada para cada una de ellas. Con la precolumna XBridge® Glycan BEH Amide (HILIC-gC) se obtiene la mejor separación en el menor tiempo de análisis, así como un aumento en la intensidad de las señales analíticas y una mejora en la morfología de los picos en comparación con los resultados obtenidos con las otras precolumnas evaluadas. Se optimiza la composición de fase móvil para HILIC-gC evaluando diferentes porcentajes de ACN en la misma. Los mejores resultados se obtienen con 77 % ACN (0,2 % FA, v/v) y 23 % agua ultrapura (0,2 % FA, v/v). Con estas condiciones se obtiene una adecuada reproducibilidad de los tiempos de retención de los analitos objeto de estudio obteniéndose desviaciones estándar relativas (RSD, %) por debajo del 8 %. El tiempo de análisis es de 1.6 min, con un tiempo total de 2.8 min, considerando el tiempo requerido para la inyección.

Evaluación de las características analíticas del método desarrollado

Se evalúan las características analíticas del método propuesto utilizando orina sintética. Se obtiene las rectas de calibración para los analitos objeto de estudio utilizando cinco niveles de concentración. Se emplean los patrones internos marcados isotópicamente leucina-¹³C, valina-¹³C, alanina-¹³C y lisina-d₄.

Las rectas de calibración muestran un comportamiento lineal, sin fallo de ajuste y con coeficientes de determinación (R^2) superiores a 0.99 en todos los casos.

Los LODs y LOQs obtenidos se encuentran entre 0.03-1.50 mg/L y entre 0.10-4.95 mg/L, respectivamente. Se estudia la exactitud en términos de recuperación aparente obteniéndose resultados entre 80-130% para todos los aminoácidos analizados. También se evalúa la repetibilidad y la reproducibilidad, para ello se utilizan muestras de orina sintética dopadas a tres niveles de concentración, LOQ, 1,5 veces y 2 veces el LOQ, y se analizan el mismo día (10 réplicas) y en los dos días consecutivos (5 réplicas por día). Los resultados expresados como desviaciones estándar relativas (RSD, %) son altamente satisfactorios

Análisis de muestras de orina

El efecto de matriz se estudia comparando las pendientes de las rectas de calibración obtenidas en orina sintética y orina natural (5 niveles de concentración, 3 réplicas). Esta comparación se realiza mediante una prueba t de Student (nivel de significación, 0.05) y se observa que las diferentes matrices proporcionan pendientes significativamente diferentes ($p < 0.05$), lo que demuestra la existencia de efecto de matriz. Por esta razón, la cuantificación se lleva a cabo mediante un protocolo de adición estándar de un punto y normalización con patrón interno (marcado isotópicamente).

Se analizan muestras de orina de cinco voluntarios sanos. Los valores de concentración obtenidos son normalizados al contenido de creatinina de cada orina. Todos los compuestos objeto de estudio son detectados y cuantificados en todas las orinas y las concentraciones obtenidas son similares a resultados publicados previamente. La concentración de los aminoácidos en las diferentes orinas varía ampliamente y el intervalo de concentraciones en el que se encuentra cada compuesto en cada orina es muy amplio. Con el método propuesto en este trabajo es posible detectar y cuantificar los aminoácidos en un rango de

concentraciones que va desde 500 µg/L hasta los 810 mg/L (467 nmol/mmol de creatinina a 728691 nmol/mmol de creatinina), demostrando ser adecuado para la determinación de estos compuestos en orina.

CONCLUSIONES

En este trabajo se desarrolla una nueva metodología basada en el acoplamiento de una precolumna de protección convencional a un analizador de masas Orbitrap (gC-Orbitrap-HRMS) para la detección y cuantificación de aminoácidos proteinogénicos en orina. El tratamiento aplicado a las muestras es sencillo implicando la mínima manipulación de las mismas. Se evalúan distintas precolumnas de protección y los mejores resultados se obtienen con la precolumna de protección tipo HILIC. Esta precolumna proporciona una mejor separación de los compuestos en el menor tiempo de análisis, las señales analíticas más altas y la mejor morfología de pico.

Los LODs y LOQs obtenidos con esta estrategia son satisfactorios y adecuados para la concentración de aminoácidos presentes en la orina. El método desarrollado se aplica satisfactoriamente al análisis de muestras de orina de voluntarios sanos, utilizándose un protocolo de adición estándar de un punto y normalización con patrón interno (marcado isotópicamente) debido a la existencia de efecto de matriz.

Los resultados obtenidos muestran que la metodología gC-Orbitrap-HRMS aquí propuesta es una opción rápida y fiable para la determinación de los aminoácidos en orina. El tiempo total del análisis es de 1.6 min, muy inferior a los tiempos necesarios para las técnicas cromatográficas habitualmente utilizadas para estos compuestos en orina. Además, la alta resolución del analizador de masas Orbitrap permite realizar un análisis con gran selectividad.

II.2.1. Artículo de investigación

Espectrometría de masas de alta resolución (Orbitrap) con el uso de precolumnas de protección (gC) para la determinación de compuestos de interés clínico en orina

Trabajo pendiente de publicación

Orbitrap-high resolution mass spectrometry (HRMS) with the use of a guard column (gC) for the determination of compounds of clinical interest in urine

María Teresa Fernández-del-Campo-García, Ana María Casas-Ferreira*, Encarnación Rodríguez-Gonzalo, José Luis Pérez-Pavón

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Salamanca. 37008 Salamanca, SPAIN

* Corresponding author: (fax) +34-923-294483; (e-mail) anacasas@usal.es

Abstract

A high-resolution mass spectrometry method based on the direct coupling of a commercial guard column (gC) to an Orbitrap mass analyzer (gC-Orbitrap-HRMS) has been developed and validated for the analysis of endogenous levels of amino acids (AAs) in urine. Several guard columns with packing materials of different chemistries (reversed-phase, cation exchange, anion exchange and hydrophilic interactions) were evaluated. The best results in terms of separation, signal enhancement and improvement on peak morphology were obtained for the HILIC-type guard column (HILIC-gC). The MS acquisition modes used for analysis were Full MS mode combined with Parallel Reaction Monitoring (PRM) one. Full MS mode was selected for those analytes for which it was possible to carry out their determination by exact mass and PRM was used for those compounds that presented isobaric interferences. The total analysis runtime was 1.6 min.

The method here developed, gC-Orbitrap-HRMS, was validated using synthetic urine. Limits of detection (LODs) between 0.003 and 1.50 mg/L and limits of quantification (LOQs) between 0.10 and 4.95 mg/L were found with recoveries in the 80-130% range for all the AAs analyzed. Matrix effect was observed; thus, quantification was performed using the one-point standard addition method and normalization using isotopically labelled internal standards (ILIS).

The optimized gC-Orbitrap-HRMS method was applied to urine from apparently healthy volunteers to demonstrate its applicability to real samples. The urinary levels found for the target compounds were in good agreement with previous published results. The proposed approach using gC directly coupled to Orbitrap-HRMS proved to be a fast and reliable method for the determination of AAs in urine.

Keywords: high-resolution mass spectrometry, Orbitrap, guard column, HILIC, amino acids, urine.

1. Introduction

Currently, there is great interest in the development of rapid methods of analysis for the determination of different compounds in biological samples. Clinical research is especially interested in those methods since they can obtain the maximum possible information in a short period of time. Stand-alone mass spectrometric methodologies have been proposed following that objective [1–6]. In those methods, detection by mass spectrometry has been carried out using high and low resolution mass spectrometers [1–6]. Although good results have been obtained using low-resolution mass spectrometers, with high resolution mass spectrometry (HRMS) compounds with mass differences as low as 0.0001 Da can be differentiated, allowing HRMS to distinguish compounds by their exact mass (m/z) with great accuracy [5,7–11]. In addition to this, HRMS has other advantages over classical unit-mass-resolution tandem mass spectrometry (MS/MS) such as a single injection can be used for quantification and screening purposes, including targeted and non-targeted analysis, and collection of full scan spectra can be stored and used in subsequent analysis, allowing structural elucidation of unknown compounds [8,12]. Several articles have been published comparing MS/MS and HRMS results for different types of compounds in different samples and the results obtained with HRMS were satisfactory [10,13–16].

Stand-alone mass spectrometry methods have several disadvantages, such as ion suppression and the presence of isobaric interferences that could impair the quantification of the target analytes [17,18]. These problems are especially important in biological samples because of their complexity. To alleviate these problems, different laborious sample treatments [1,3] and unconventional equipment [2] have been proposed. The use of guard columns (gC) to perform a cleaning step and a short and fast chromatographic separation has also been proposed as a solution to the problems previously described [19,20]. Using a gC provides a trade-off between the simplicity and high throughput of flow injection

analysis (FIA) and the capability to distinguish possible interferences and improve the analytical signal of the chromatographic methods [19–21]. The use of the gC reduces the analysis time in relation to conventional LC methods used for the determination of different compound in biological sample [10,11,30,22–29] without a significant increment on the analysis time compared to stand-alone mass spectrometric methods [19,20].

Urine is a biological fluid whose collection, using non-invasive methods, is quick and simple. Urine is a biological waste that contains a large number of different metabolic degradation products [31]. Amino acids (AAs) (proteinogenic and non-proteinogenic) are important compounds involved in a great number of biological processes. Different pathologies have been associated with abnormal AAs concentrations in urine samples, such as cancer [1,25,28,29,32–37]. The most widely used method for targeted analysis of AA in urine has been liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [23,26–28,34,38,39]. Low resolution mass spectrometers have been the most used instrument for the detection of AAs in urine [38,39]. Despite the advantages of HRMS, this method of detection using equipment such as an Orbitrap has been scarcely used for targeted analysis of this compounds in urine [29,40]. This kind of instrumentation has been used to a greater extent for untargeted analysis where AAs have been identified as possible biomarkers of different diseases [24,25,37,41].

In the present work, a method based on HRMS using a guard column (gC) coupled to an Orbitrap for the determination of proteinogenic AAs in urine has been developed (gC-Orbitrap-HRMS). Different guard columns with packing materials of different chemistries (reverse phase, cation exchange, anion exchange and hydrophilic interactions) have been evaluated. To the best of our knowledge, this is the first time that this approach (gC-Orbitrap-HRMS) has been proposed for the determination of AAs in urine.

2. Material and methods

2.1. Chemical

Tryptophan (Trp), leucine (Leu), isoleucine (Ile), tyrosine (Tyr), phenylalanine (Phe), methionine (Met), valine (Val), proline (Pro), alanine (Ala), threonine (Thr), glutamic acid (Glu), glycine (Gly), serine (Ser), asparagine (Asn), aspartic acid (Asp), glutamine (Gln), arginine (Arg), lysine (Lys), histidine (His) and cystine (Cys-Cys) were purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). L-leucine-1-¹³C (Leu-¹³C), L-valine-¹³C (Val-¹³C), L-alanine-¹³C (Ala-¹³C) and L-Lysine-4,4-5,5-d₄-dihydrochloride (Lys-D₄) were used as isotopically labelled internal standards (ILIS) and they were supplied by Sigma-Aldrich. For interference evaluation: guanidinoacetic acid, acetylglycine, creatine, hydroxyproline and N-acetylasparagine were obtained from Sigma Aldrich.

Methanol (MeOH), formic acid (FA), difluoroacetic acid (DFA), acetonitrile (ACN) and ammonium bicarbonate (NH₄HCO₃) was also supplied by Sigma Aldrich.

Magnesium sulfate, ammonia, sodium chloride and hydrochloric acid supplied by Scharlau (Barcelona, Spain) and potassium chloride, calcium chloride and urea from Panreac (Barcelona, Spain). These reagents were used for the preparation of synthetic to urine according to the procedure of N.C. Van de Merbel et al [42]. The ultra-high quality (UHQ) water used for all analysis was obtained with a Wasserlab Ultramatic purification system (Noain, Spain).

2.2. Standard solutions

Stock solutions (2000-15000 mg/L) of each analyte were prepared in UHQ water, except Cys-Cys and Tyr for which were prepared in HCl 0.1 M. Isotopically labelled internal standards (ILIS) were prepared in UHQ water at a concentration of 500. All solutions were stored at 4 °C and were properly diluted in UHQ water to prepare the working solutions.

2.3. Urine samples

First morning urine samples were collected from apparently healthy individuals of both sexes in disposable sterile specimen collection cups and were frozen and stored at -20°C in the dark. After thawing at room temperature, a 1/10 dilution of urine was done, adding 100 µL of urine, 40 µL of ILIS (50 mg/L) and 860 µL of a solution 77% ACN (0.2% FA, v/v)/23 % H₂O (0.2% FA, v/v) to a vial. The final concentration of ILIS in the sample was 2 mg/L. The diluted sample was centrifuged at 1815 g during 10 min to precipitate the proteins. Then, the supernatant was filtered with nylon filters (0.45 µm, 17 mm i.d.) and an aliquot (5 µL) was injected into the system. The Jaffe method [43] was used to measure creatinine content in urine samples.

2.4. Instrumental configuration

The gC-Orbitrap-HRMS analysis was carried out on a Vanquish UHPLC system including a quaternary pump, an autosampler and a column oven coupled to a heated electrospray ionization (ESI) source and a Q-Exactive Focus Orbitrap mass spectrometer (all Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

The Orbitrap MS operated in positive mode. The following parameters were used for detection: electrospray voltage, 3.8 kV; capillary temperature, 320°C; auxiliary gas heater temperature, 200 °C; sheath gas flow-rate (N₂), 40 arbitrary units (arb); auxiliary gas flow-rate (N₂), 15 (arb); S-Lens RF level at 55 (arb). Analyte quantification was carried out under Full MS and Parallel Reaction Monitoring (PRM) acquisition modes. The MS parameters for Full MS acquisition mode were: m/z range from 50 to 350; mass resolution, 70000 (at a m/z 200); AGC target, 1e⁶; microscans, 1. PRM parameters were as follows: default charge, 1; resolution, 70000 (at a m/z 200); isolation window, 1 m/z; AGC target, 5e⁴; microscans, 1. Stepped normalized collision energy (NCE) was 10, 30 and 50. Precursor and fragment mass tolerances were set at 5 ppm, except for Gly, with a mass tolerance of 10 ppm.

An evaluation of different guard columns was performed. The guard columns evaluated were XBridge® C18 (2.1 x 10 mm, 3.5 µm) from Waters (Milford, MA, USA), Primesep 200 (2.1 x 10 mm, 3 µm) from SIELC (Wheeling, IL, USA), Hypersil GOLD AX (2.1 x 10 mm, 3 µm) from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) and XBridge® Glycan BEH Amide (2.1 x 10 mm, 3.5 µm). Optimum results were obtained with the XBridge® Glycan BEH Amide guard column. The optimum mobile phase was composed of a UHQ water with 0.2% FA (v/v) (Solvent A) and ACN with 0.2% FA (v/v) (Solvent B) mixture. Isocratic conditions were used, with a mobile phase composition of 23 % A and 77% B. The mobile phase flow rate was 0.5 mL/min and the injection volume used was 5 µL. Total analysis runtime was 1.6 min. Each sample was analyzed in 2.8 min.

All the parameters related to the instrumental configuration are listed in Table S1 (Supplementary material).

2.5. Method validation

Synthetic urine was used to validate the gC-Orbitrap-HRMS method. Calibration curves, limits of detection (LODs) and quantification (LOQs), repeatability (intra-day precision), reproducibility (inter-day precision) and accuracy were the parameters evaluated. Matrix effect evaluation was carried out using natural and synthetic urine. The slopes of the calibration curves obtained in the two matrices were compared using a Student's *t*-test (significance level, 0.05%).

3. Results and discussion

3.1. Sample preparation

Urine samples were frozen at -20°C in the dark when they were received in the laboratory. Before analysis, they were thawed at room temperature. After this, different sample preparation procedures were used depending on the guard column evaluated (Table 1).

When the guard columns based on reversed phase, cation and anion exchange chemistries were evaluated, urine was centrifuged at 1,815 g for 10 min to precipitate proteins. Then, the supernatant was filtered through nylon filters (0.45 μm , 17 mm i.d.). Subsequently, a 1/10 dilution was performed with different dilution media depending on the guard column evaluated. The dilution medium used when the reversed phase-gC was selected was H_2O (0.1% DFA, v/v), for the cation exchange-gC H_2O (0.1% FA, v/v) was used and for the anion exchange-gC H_2O (10 mM NH_4HCO_3) was selected. These conditions are indicated in Table 1.

When hydrophilic interaction chromatography (HILIC) is used, it is recommended that the medium in which the sample is found has a high organic solvent content to avoid peak shape distortion and to make retention times reproducible [44]. However, the use of sample dilution media with such characteristics promotes protein precipitation when biological samples are analyzed [26,45]. For this reason, when HILIC-gC was evaluated, a slightly different urine procedure was used. In this case, centrifugation was done after dilution of the sample, using a mixture of 77% ACN (0.2% FA, v/v) and 23% H_2O (0.2% FA, v/v). Moreover, an evaluation of the filtration of the supernatant was done. Two aliquots of a diluted and centrifuged urine sample were obtained. Subsequently, one of them was filtered and the other one was not. Filtration was done using nylon filters (0.45 μm , 17 mm i.d.). The unfiltered and filtered samples were injected into the system. Figure 1 shows the results obtained in both cases. No significant differences were observed among conditions. However, to ensure the absence of particles in the sample, filtering of the supernatants was chosen.

3.2. MS optimization

A stand-alone HRMS method was used for the optimization of the HRMS parameters in the Orbitrap. The carrier phase used was 80% UHQ water (0.1%

formic acid, v/v) and 20% MeOH (0.1% formic acid, v/v). The flow rate used was 0.5 mL/min and the injection volume was set at 5 μ L in all cases. The total analysis runtime was 1.5 min.

Different acquisition modes allowed by the Orbitrap analyzer were evaluated to obtain the best analytical signals. These were: full scan and data dependent MS/MS (Full MS-ddMS²), PRM and Full MS combined with PRM.

With the Full MS-ddMS² mode, the equipment performs a complete record of all the mass/charge ratios (m/z) in the set interval (Full Scan), then selects the most intense ones and records their fragmentation (ddMS²) at different collision energies. The set interval (Full Scan) was 50-350 m/z. The signals of the AAs studied did not exceed the intensity established by the system to carry out its fragmentation analysis, since there were compounds in the urine that gave signals of greater intensity. For this reason, this registration modality was discarded.

In the PRM mode, the m/z ratios of the compounds of interest are selected in a simple quadrupole and their fragmentation is evaluated in the Orbitrap. This acquisition mode requires long acquisition times because for each selected m/z the high-resolution product ion scan is obtained. Considering that the number of compounds analyzed in this work was high (20) and that the compounds reached the detector very quickly in a narrow peak, an adequate number of points was not obtained to have well-defined analytical signals. Therefore, this acquisition modality was also discarded.

The possibility of using Full MS and PRM modalities together was also evaluated. On one hand, Full MS mode was selected for those analytes for which it was possible to carry out their determination by exact mass. On the other hand, PRM mode was used for those compounds that presented isobaric interferences and it was necessary to use their product ions for their correct quantification. Figure 2 shows the signals obtained for Trp and Val when Full MS combined with PRM was used compared to the signals obtained when only PRM acquisition

mode was used. As can be seen in Figure 2, the best results were obtained in the first case, obtaining well-defined analytical signals with an adequate number of points. Therefore, this combined acquisition mode was selected for analysis.

To establish the compounds for which Full MS or PRM were used, an identification of isobaric interferences in urine was carried out based on bibliographic research [19,20]. The AAs that were found to have isobaric interferences were: Leu, Ile, Tys, Val, Thr, Glu, Asn, Asp and Gln. For these AAs, PRM was selected. Moreover, an evaluation of possible compounds that could have the same fragmentation patterns than those AAs was also carried out. The compounds identified were creatine and hydroxyproline for Leu and Ile, guanidinoacetic acid and acetylglycine for Val and N-acetylasparagine for Arg. Pure standards of these compounds were injected. The results obtained showed that none of these compounds shared the selected product ions of the target analytes.

Six urine samples from both sexes were also analyzed using the gC-Orbitrap-HRMS method to check for other unidentified interfering compounds in the urine. [46]. Two unresolved peaks for the exact mass-to-charge ratio (m/z) of Pro (116.0706) were observed. When PRM was performed, it was observed that it was possible to use Pro product ions (specifically, transition $116.1 \rightarrow 70.0656$, m/z) for its correct quantification. When this m/z ratio was used, two peaks also appeared but they could be integrated individually. The first peak corresponded to Pro and the second peak corresponded to an unknown compound.

For Leu determination, interferences of isobaric compounds of the matrix were not the only problem. The transition usually chosen for Leu quantification is (m/z) $132.1 \rightarrow 43.3180$ [47]. In this work this one could not be selected because of instrumental limitations (the lower scan limit (m/z) in Orbitrap was 50 m/z). For this reason, the transition (m/z) $132.1 \rightarrow 86.0968$ was selected. Both Leu and Ile shared this. However, Ile quantification is possible using its specific transition

(m/z) 132.1 → 69.0704. Thus, for Leu quantification, the signal obtained for the transition (m/z) 132.1 → 86.0968 was integrated and the concentration assigned to Leu and Ile together. Then, due to the concentration of Ile could be determined as previously mentioned, Leu concentration could be calculated by the difference.

Briefly, considering the aforementioned results, PRM acquisition mode was used for 9 AAs (Leu-Ile, Tys, Val, Thr, Glu, Asn, Asp, Glu and Pro), selecting Full MS mode for the rest of the compounds. All the parameters related to the experimental conditions used are shown in Table S1 (Supplementary material).

3.3. Guard column optimization

3.2.1. Guard column (gC) selection

An evaluation of different guard columns (gCs) with packing material of different chemistries was performed. Table 1 shows the gCs evaluated and the conditions used for each one. In every case, isocratic conditions were used. The best results were obtained with the XBridge® Glycan BEH Amide (2.1 x 10 mm, 3.5 μm) guard column (HILIC-gC). With this gC the best results were observed, obtaining the best separation conditions in the shortest analysis time. Moreover, an increase in the intensity of the analytical signals and an enhancement of the peaks shape peaks were observed in comparison with the use of the other gCs. Figure 3 shows the signals obtained for Thr (transition 120.1 → 70.0605, m/z), Gly (76.0393, m/z) and His (156.0768, m/z) in natural urine with the gCs evaluated. As can be seen, with the HILIC-gC, the analytical signal was increased, and the morphology of the peaks was improved.

3.2.2. Mobile phase optimization

In HILIC, a high organic content in the mobile phase is required for the retention of polar analytes [48,49]. Thus, the composition of the selected mobile phase consisted of a UHQ water with 0.2% FA (v/v) (Solvent A) and ACN with 0.2% FA (v/v) (Solvent B) mixture. Isocratic conditions were used. Initially, the mobile

phase composition was set at 20 % solvent A and 80% solvent B. Under these conditions, the retention time of Cys-Cys was greater than 1 minute and its peak morphology presented a long tail. Different percentages of ACN content in the mobile phase were then considered (75%, 77% and 80%). The same percentages were added in the sample dilution medium. The best results were obtained with 77% ACN (0.2% FA, v/v) and 23 % H₂O (0.2% FA, v/v). Under these conditions, the retention time of Cys-Cys was reduced. In addition, an improvement in the shape of the peak was observed. Figure 4 shows the decrease in retention time and the improvement in the shape of the Cys-Cys peak with the percentages of ACN evaluated. The retention time of the other analytes varied slightly but maintained their separation. Retention time reproducibility was also evaluated using natural urine. The RSD values (%) observed were below 8 % (five replicates, three different days). Under the optimized conditions, total analysis runtime was 1.6 min, with a total time of 2.8 min, considering the time required for injection (21 samples per hour). Figure 5 shows the analytical signals obtained for all the AA_s in synthetic urine and natural urine with the optimum conditions selected for the HILIC-gC.

3.4. Analytical characteristics gC-Orbitrap-HRMS method

The analytical characteristics were evaluated for a mixture of the twenty proteinogenic AAs in synthetic urine. Calibration curves were obtained at five concentration levels (1-4 mg/L) and each level was analyzed in triplicate. ILIS were added at a concentration of 2 mg/L. They were used as follows: Leu-¹³C for Trp, Leu, Ile and Tyr area normalization; Val-¹³C for Met, Val and Pro area normalization; Ala-¹³C for Ala, Thr, Glu, Gly, Ser, Asn, Asp and Gln area normalization; Lys-d₄ for Lys, Arg, His and Cys-Cys area normalization. This selection was performed based on the similar order of appearance in the chromatogram obtained by the gC-Orbitrap-HRMS method. All the calibration curves displayed linear behavior. Their validity was checked using ANOVA analysis and it was observed that they did not exhibit any lack of fit. The values

for the determination coefficient (R^2) obtained were satisfactory, these values were higher than 0.99 for every case (Table 2).

Limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) were evaluated. They were calculated as the analyte concentration corresponding to a signal-to-noise ratio (S/N) of 3 and 10, respectively [50]. LODs values were found to be between 0.03 and 1.50 mg/L and LOQs values between 0.10 and 4.95 mg/L (Table 2). Accuracy was also evaluated as apparent recoveries (expressed as percentages). These values were calculated as the ratio of the measured concentration to the spiked concentration at first level of the calibration curve for each compound. Values were found in the range 80-130 % for the AAs (Table 2). Also, table 2 shows the apparent recoveries obtained in natural urine spiked with different concentrations for each compound.

Synthetic urine spiked at LOQ, 1.5 times and 2 times the LOQ were used to evaluate the repeatability (intra-day precision) and reproducibility (inter-day precision). The values obtained were highly satisfactory and they are shown in Table 2, expressed as relative standard deviations (RSD, %).

3.4. Analysis of urine samples

3.4.1. Matrix effect

Matrix effect was evaluated using natural and synthetic urine. Calibration curves (five levels) were obtained in the two matrices using the gC-Orbitrap-HRMS method. Each level was analyzed in triplicate. The concentration levels were selected based on the expected concentration of the target compounds in natural urine. All the calibration curves displayed linear behavior and did not exhibit any lack of fit. Different matrices provided significant different slopes (Student t-test, significance level: 0.05), demonstrating the existence of matrix effect. Quantification was carried out using a one-point standard addition and

normalization to IS protocol following the procedure described in [51]. In all case, ILIS were added at a concentration of 2 mg/L.

3.4.2. Quantification of AAs in natural urines

Urine samples from five apparent healthy volunteers (male and female) were analyzed using the gC-Orbitrap-HRMS method. The values of AAs concentration were normalized to creatinine content. Figure 6 shows the box plots representing the concentration of the AAs (expressed in nmol/mmol creatinine) found in the samples analyzed. All the target compounds were correctly detected and quantified in all the analyzed urines. The concentrations found for the AAs were in good agreement with previous published results [47]. The variation in the concentration of AAs between urines is large as can be seen in Figure 6. In addition, the range of concentrations in which each compound is found in urine is very wide. For these reasons, methods that could detect and quantify the compounds in a wide range of concentrations (from $\mu\text{g/L}$ to high mg/L) are necessary. The method proposed here was able to detect and quantify AAs in a concentration range from 500 $\mu\text{g/L}$ to 810 mg/L (467 nmol/mmol creatinine to 728691 nmol/mmol creatinine). This showed that the proposed method was suitable for the determination of AAs in urine.

4. Conclusion

In this work, a new methodology based on the coupling of a conventional guard column to and Orbitrap mass analyzer (gC-Orbitrap-HRMS) for the quantification of proteinogenic AAs in urine samples was developed. Sample handling was minimal, implying urine dilution followed by centrifugation and filtration. Different gCs were evaluated. The HILIC-type gC was selected for analysis as it showed the best separation in the shortest time of analysis of the compounds evaluated, the highest analytical signals, and the best peak morphology. The combination of Full MS with PRM acquisition modes was selected for HRMS detection.

An evaluation of possible isobaric interferences of the AAs was carried out. This evaluation showed that Leu-Ile, Tys, Val, Thr, Glu, Asn, Asp, Glu and Pro could have isobaric interferences, so PRM acquisition mode was selected for their determination. The rest of AAs was detected and quantified using Full MS.

The method was validated using synthetic urine. Satisfactory results in terms of linearity, precision and accuracy were obtained. The LODs and LOQs obtained with the proposed method were satisfactory and adequate for the concentration of AAs present in urine, with values found to be between 0.03-1.50 mg/L and 0.10-4.95 mg/L, respectively. The gC-Orbitrap-HRMS method was satisfactory applied to the analysis of real urine samples. One-point standard addition and normalization to IS protocol was used for the quantification of the AAs.

The results obtained show that the gC-Orbitrap-HRMS method proposed here is a fast and reliable option for the determination of AAs in urine. The total analysis runtime was 1.6 min, much less than the times required for the chromatographic techniques usually applied for the determination of AAs in urine. Moreover, the use of the high-resolution Orbitrap analyzer allows to carry out an analysis with great selectivity.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for funding project CTQ2017-87886-P, the Junta de Castilla y León for projects SA055P17 and SA111P20 and the University of Salamanca (Programa de financiación de grupos de investigación. Modalidad C2. 2020). M^a Teresa Fernández-del-Campo-García is also thankful to the University of Salamanca for a predoctoral fellowship. Authors gratefully thanks the Mass Spectrometry Facility (Nucleus) of the University of Salamanca for its kind help.

References

- [1] M.M. Rebollido-Fernandez, D.E. Castiñeiras, M. Dolores Bóveda, M. Luz Couce, J.A. Cocho, J.M. Fraga, Development of electrospray ionization tandem mass spectrometry methods for the study of a high number of urine markers of inborn errors of metabolism, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26 (2012) 2131–2144. <https://doi.org/10.1002/rcm.6325>.
- [2] N. Xu, Z.Q. Zhu, S.P. Yang, J. Wang, H.W. Gu, Z. Zhou, H.W. Chen, Direct detection of amino acids using extractive electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Fenxi Huaxue/ Chinese J. Anal. Chem.* 41 (2013) 523–528. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(13\)60643-X](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(13)60643-X).
- [3] R. González-Domínguez, R. Castilla-Quintero, T. García-Barrera, J.L. Gómez-Ariza, Development of a metabolomic approach based on urine samples and direct infusion mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 465 (2014) 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.07.016>.
- [4] B. Sarvin, S. Lagziel, N. Sarvin, D. Mukha, P. Kumar, E. Aizenshtein, T. Shlomi, Fast and sensitive flow-injection mass spectrometry metabolomics by analyzing sample-specific ion distributions, *Nat. Commun.* 11 (2020) 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17026-6>.
- [5] C.A. Pickens, K. Petritis, High resolution mass spectrometry newborn screening applications for quantitative analysis of amino acids and acylcarnitines from dried blood spots, *Anal. Chim. Acta.* 1120 (2020) 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.04.067>.
- [6] M.G.M. de Sain-van der Velden, M. van der Ham, J. Gerrits, H.C.M.T. Prinsen, M. Willemsen, M.L. Pras-Raves, J.J. Jans, N.M. Verhoeven-Duif, Quantification of metabolites in dried blood spots by direct infusion high resolution mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 979 (2017) 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.04.038>.

- [7] M.A.G. Wallace, J.P. Mccord, Chapter 16 - High-resolution mass spectrometry | Elsevier Enhanced Reader, Elsevier B.V., 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819967-1.00016-5>.
- [8] P. Lucci, J. Saurina, O. Núñez, Trends in LC-MS and LC-HRMS analysis and characterization of polyphenols in food, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 88 (2017) 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.12.006>.
- [9] A.G.M. Feng Xian, Christopher L. Hendrickson, High Resolution Mass Spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 84 (2012) 708–719. <https://doi.org/10.1021/ac203191t>.
- [10] A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, S. Walker, M. Widmer, Quantitative and confirmative performance of liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry compared to tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25 (2011) 979–992. <https://doi.org/10.1002/rcm.4952>.
- [11] A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, S. Walker, M. Widmer, Semi-targeted residue screening in complex matrices with liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry: Current possibilities and limitations, *Analyst.* 136 (2011) 1898–1909. <https://doi.org/10.1039/c0an00902d>.
- [12] A. Kaufmann, The current role of high-resolution mass spectrometry in food analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 1233–1249. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5629-4>.
- [13] A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, S. Walker, M. Widmer, Quantification of anthelmintic drug residues in milk and muscle tissues by liquid chromatography coupled to Orbitrap and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Talanta.* 85 (2011) 991–1000. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.05.009>.

- [14] P. Herrero, N. Cortés-Francisco, F. Borrull, J. Caixach, E. Pocurull, R.M. Marcé, Comparison of triple quadrupole mass spectrometry and Orbitrap high-resolution mass spectrometry in ultrahigh performance liquid chromatography for the determination of veterinary drugs in sewage: Benefits and drawbacks, *J. Mass Spectrom.* 49 (2014) 585–596. <https://doi.org/10.1002/jms.3377>.
- [15] S.J. Bruce, B. Rochat, A. Béguin, B. Pesse, I. Guessous, O. Boulat, H. Henry, Analysis and quantification of vitamin D metabolites in serum by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and high-resolution mass spectrometry - A method comparison and validation, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27 (2013) 200–206. <https://doi.org/10.1002/rcm.6439>.
- [16] S. De Baere, A. Osselaere, M. Devreese, L. Vanhaecke, P. De Backer, S. Croubels, Development of a liquid-chromatography tandem mass spectrometry and ultra-high-performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry method for the quantitative determination of zearalenone and its major metabolites in chicken and pig plasma, *Anal. Chim. Acta.* 756 (2012) 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.10.027>.
- [17] S.C. Nanita, L.G. Kaldon, Emerging flow injection mass spectrometry methods for high-throughput quantitative analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 23–33. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9193-1>.
- [18] A.M. Casas-Ferreira, M. del Nogal-Sánchez, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, Determination of leucine and isoleucine/allo-isoleucine by electrospray ionization-tandem mass spectrometry and partial least square regression: Application to saliva samples, *Talanta.* (2020) 120811. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120811>.

- [19] M.T. Fernández-del-Campo-García, A.M. Casas-Ferreira, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, Rapid and reliable analysis of underivatized amino acids in urine using tandem mass spectrometry, *Microchem. J.* 172 (2022) 106914. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106914>.
- [20] M.T. Fernández-del-Campo-García, A.M. Casas-Ferreira, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, Development of a fast and reliable methodology for the determination of polyamines in urine by using a guard column as a low-resolution fractioning step prior to mass spectrometry. Comparison with flow injection-mass spectrometry analysis, *Microchem. J.* 158 (2020) 105223. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105223>.
- [21] G. Gachumi, R.W. Purves, C. Hopf, A. El-Aneed, Fast Quantification without Conventional Chromatography, the Growing Power of Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 92 (2020) 8628–8637. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00877>.
- [22] W.C.W. Chang, P.H. Wang, C.W. Chang, Y.C. Chen, P.C. Liao, Extraction strategies for tackling complete hair metabolome using LC-HRMS-based analysis, *Talanta.* 223 (2021) 121708. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121708>.
- [23] C. Virgiliou, G. Theodoridis, I.D. Wilson, H.G. Gika, Quantification of endogenous aminoacids and aminoacid derivatives in urine by hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1642 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462005>.
- [24] Q. Zhang, F. Feng, A novel insight into the potential toxicity mechanisms of Zhi-Zi-Hou-Po decoction by dynamic urinary metabolomics based on

- UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1142 (2020) 122019. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122019>.
- [25] A. Cerrato, C. Bedia, A.L. Capriotti, C. Cavaliere, V. Gentile, M. Maggi, C.M. Montone, S. Piovesana, A. Sciarra, R. Tauler, A. Laganà, Untargeted metabolomics of prostate cancer zwitterionic and positively charged compounds in urine, *Anal. Chim. Acta.* 1158 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338381>.
- [26] Y. Wen, X. Yuan, F. Qin, L. Zhao, Z. Xiong, Development and validation of a hydrophilic interaction ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for rapid simultaneous determination of 19 free amino acids in rat plasma and urine, *Biomed. Chromatogr.* 33 (2019) 1–13. <https://doi.org/10.1002/bmc.4387>.
- [27] P. Krumpochova, B. Bruyneel, D. Molenaar, A. Koukou, M. Wührer, W.M.A. Niessen, M. Giera, Amino acid analysis using chromatography–mass spectrometry: An inter platform comparison study, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 114 (2015) 398–407. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.06.001>.
- [28] T. Xia, S. Fu, Q. Wang, Y. Wen, S.A. Chan, S. Zhu, S. Gao, X. Tao, F. Zhang, W. Chen, Targeted metabolomic analysis of 33 amino acids and biogenic amines in human urine by ion-pairing HPLC-MS/MS: Biomarkers for tacrolimus nephrotoxicity after renal transplantation, *Biomed. Chromatogr.* 32 (2018) 1–11. <https://doi.org/10.1002/bmc.4198>.
- [29] Q. Ma, C. Qi, X.L. Li, Q. Shi, C.Y. Xu, T. Jin, J.Z. Min, Simultaneous determination of DL-cysteine, DL-homocysteine, and glutathione in saliva and urine by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS: Application to studies of oxidative stress, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 196 (2021) 113939.

- <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.113939>.
- [30] M.M. Poojary, W. Zhang, I. Greco, C. De Gobba, K. Olsen, M.N. Lund, Liquid chromatography quadrupole-Orbitrap mass spectrometry for the simultaneous analysis of advanced glycation end products and protein-derived cross-links in food and biological matrices, *J. Chromatogr. A.* 1615 (2020) 460767. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460767>.
- [31] S. Bouatra, F. Aziat, R. Mandal, A.C. Guo, M.R. Wilson, C. Knox, T.C. Bjorndahl, R. Krishnamurthy, F. Saleem, P. Liu, Z.T. Dame, J. Poelzer, J. Huynh, F.S. Yallou, N. Psychogios, E. Dong, R. Bogumil, C. Roehring, D.S. Wishart, The Human Urine Metabolome, *PLoS One.* 8 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073076>.
- [32] E.L. Lieu, T. Nguyen, S. Rhyne, J. Kim, Amino acids in cancer, *Exp. Mol. Med.* 52 (2020) 15–30. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0375-3>.
- [33] Á. Fernández-Ochoa, R. Quirantes-Piné, I. Borrás-Linares, D. Gemperline, M.E. Alarcón Riquelme, L. Beretta, A. Segura-Carretero, Urinary and plasma metabolite differences detected by HPLC-ESI-QTOF-MS in systemic sclerosis patients, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 162 (2019) 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.09.021>.
- [34] W.D. Sroka, B.A. Boughton, P. Reddy, U. Roessner, P. Słupski, P. Jarzemski, A. Dąbrowska, M.J. Markuszewski, M.P. Marszał, Determination of amino acids in urine of patients with prostate cancer and benign prostate growth, *Eur. J. Cancer Prev.* 26 (2017) 131–134. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000248>.
- [35] V. Strmiska, P. Michalek, T. Eckschlager, M. Stiborova, V. Adam, S. Krizkova, Z. Heger, Prostate cancer-specific hallmarks of amino acids metabolism: Towards a paradigm of precision medicine, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer.* 1871 (2019) 248–258.

<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.01.001>.

- [36] K. Duskova, S. Vesely, J.D.C. Silva, N. Cernei, O. Zitka, Z. Heger, V. Adam, K. Havlova, M. Babjuk, Differences in urinary amino acid patterns in individuals with different types of urological tumor urinary amino acid patterns as markers of urological tumors, *In Vivo (Brooklyn)*. 32 (2018) 425–429. <https://doi.org/10.21873/invivo.11257>.
- [37] Y. Bai, H. Zhang, Z. Wu, S. Huang, Z. Luo, K. Wu, L. Hu, C. Chen, Use of ultra high performance liquid chromatography with high resolution mass spectrometry to analyze urinary metabolome alterations following acute kidney injury in post-cardiac surgery patients, *J. Mass Spectrom. Adv. Clin. Lab.* 24 (2022) 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.jmsacl.2022.02.003>.
- [38] Y. Song, C. Xu, H. Kuroki, Y. Liao, M. Tsunoda, Recent trends in analytical methods for the determination of amino acids in biological samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147 (2018) 35–49. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.08.050>.
- [39] S. Ferré, V. González-Ruiz, D. Guillarme, S. Rudaz, Analytical strategies for the determination of amino acids: Past, present and future trends, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1132 (2019) 121819. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121819>.
- [40] S. Zhang, J. Shi, C. Shan, C. Huang, Y. Wu, R. Ding, Y. Xue, W. Liu, Q. Zhou, Y. Zhao, P. Xu, X. Gao, Stable isotope N-phosphoryl amino acids labeling for quantitative profiling of amine-containing metabolites using liquid chromatography mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 978 (2017) 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.04.025>.
- [41] E. De Paepe, L. Van Meulebroek, C. Rombouts, S. Huysman, K. Verplanken, B. Lapauw, J. Wauters, L.Y. Hemeryck, L. Vanhaecke, A

- validated multi-matrix platform for metabolomic fingerprinting of human urine, feces and plasma using ultra-high performance liquid-chromatography coupled to hybrid orbitrap high-resolution mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 1033 (2018) 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.06.065>.
- [42] N.C. van de Merbel, Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 924–933. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.002>.
- [43] M. Jaffe, Ueber den Neiderschlag, welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Kreatinins, *Z.Physiol.Chem.* 10 (1886) 391–400.
- [44] P. Kozlik, K. Molnarova, T. Jecmen, T. Krizek, R. Goldman, Glycan-specific precipitation of glycopeptides in high organic content sample solvents used in HILIC, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1150 (2020) 122196. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122196>.
- [45] R. Joyce, V. Kuziene, X. Zou, X. Wang, F. Pullen, R.L. Loo, Development and validation of an ultra-performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry method for rapid quantification of free amino acids in human urine, *Amino Acids.* 48 (2016) 219–234. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2076-0>.
- [46] G. Smith, European medicines agency guideline on bioanalytical method validation: What more is there to say?, *Bioanalysis.* 4 (2012) 865–868. <https://doi.org/10.4155/bio.12.44>.
- [47] Urine metabolome, <https://urinemetabolome.ca/>, Accessed 15th April 2022
- [48] B. Buszewski, S. Noga, Hydrophilic interaction liquid chromatography

- (HILIC)-a powerful separation technique, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 231–247. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>.
- [49] P. Jandera, Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: A review, *Anal. Chim. Acta.* 692 (2011) 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.047>.
- [50] A. Kruve, R. Rebane, K. Kipper, M.L. Oldekop, H. Evard, K. Herodes, P. Ravio, I. Leito, Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part I, *Anal. Chim. Acta.* 870 (2015) 29–44. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.017>.
- [51] M.T. Fernández-del-Campo-García, A.M. Casas-Ferreira, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, Development of a screening and confirmatory method for the analysis of polar endogenous compounds in saliva based on a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric system, *J. Chromatogr. A.* 1590 (2019) 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.01.001>.

Figure legends

Figure 1. Normalized peak area obtained for the AAs in filtered and unfiltered samples.

Figure 2. Analytical signals obtained for Trp and Val with 20 PRM and Full MS and 9 PRM together.

Figure 3. Analytical signals obtained for Thr (120.1 → 74.0605, m/z), Gly (76.0393, m/z) and His (156.0768, m/z) with the guard columns evaluated.

Figure 4. Analytical signals obtained for Cys-Cys with the different percentages of ACN evaluated.

Figure 5. Analytical signals for the all AAs with the gC-Orbitrap-HRMS methodology in synthetic urine (2 mg/L of each AAs) and natural urine.

Figure 6. Box plots representing the concentration of the AAs (expressed in nmol/mmol creatinine) found in five urine samples using the proposed gC-Orbitrap-HRMS methodology

Figure 1

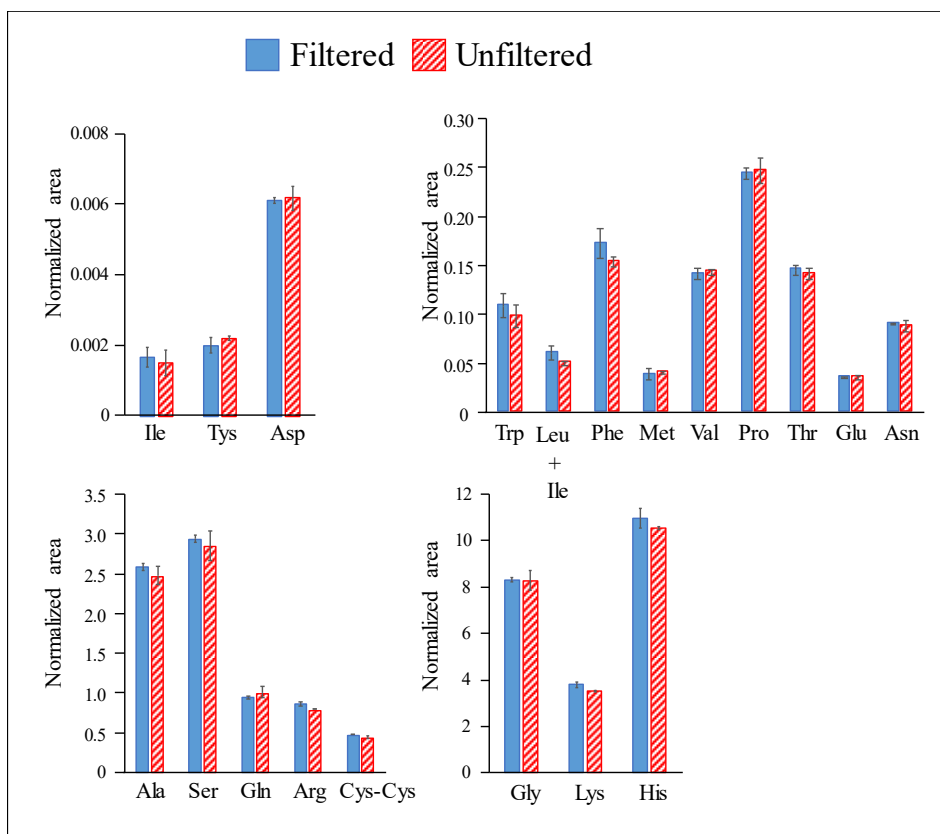


Figure 2

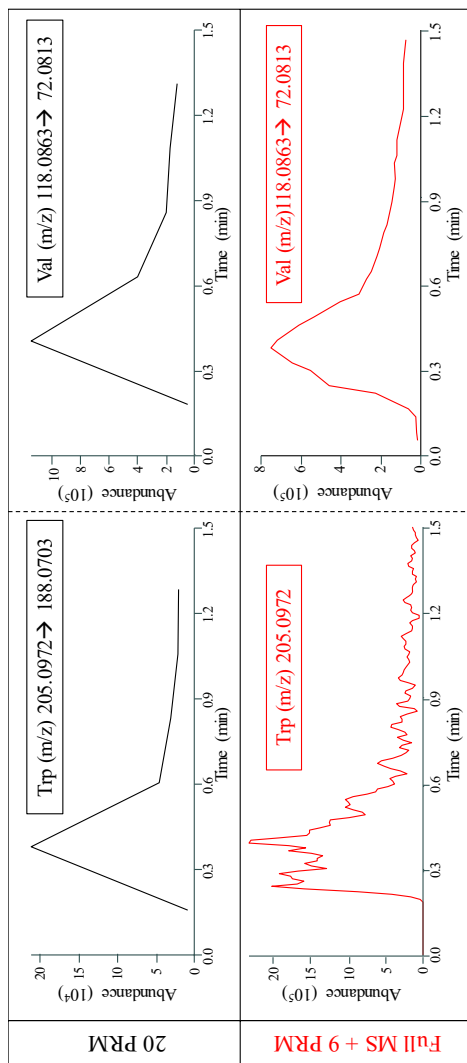


Figure 3

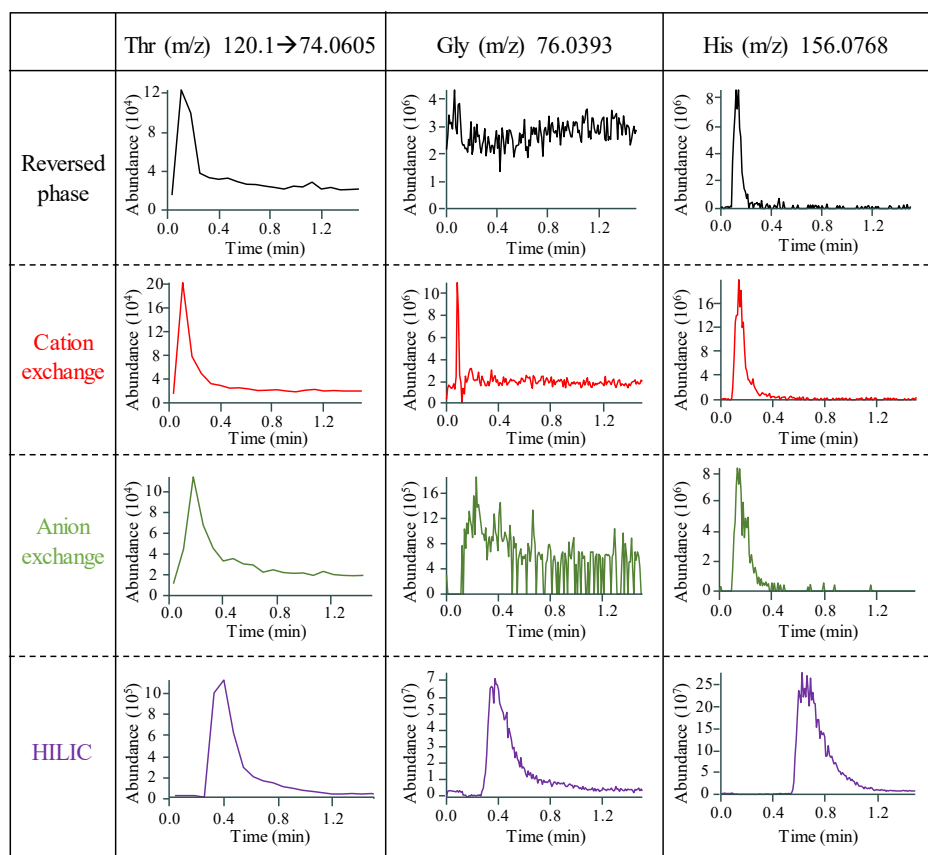


Figure 4

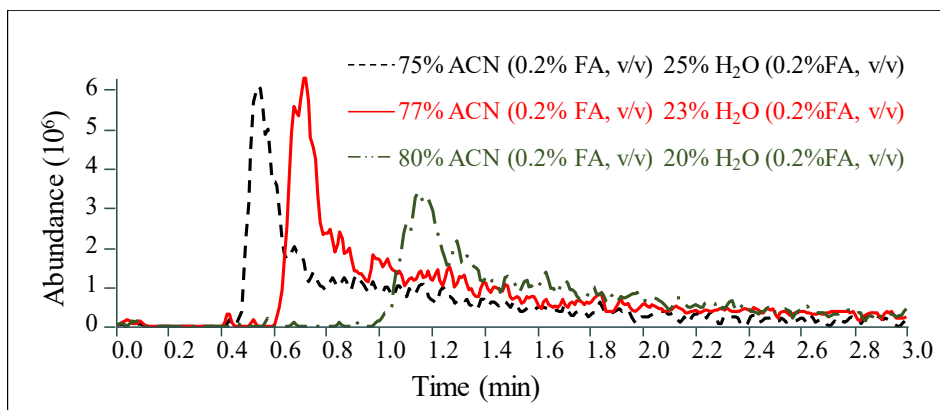


Figure 5

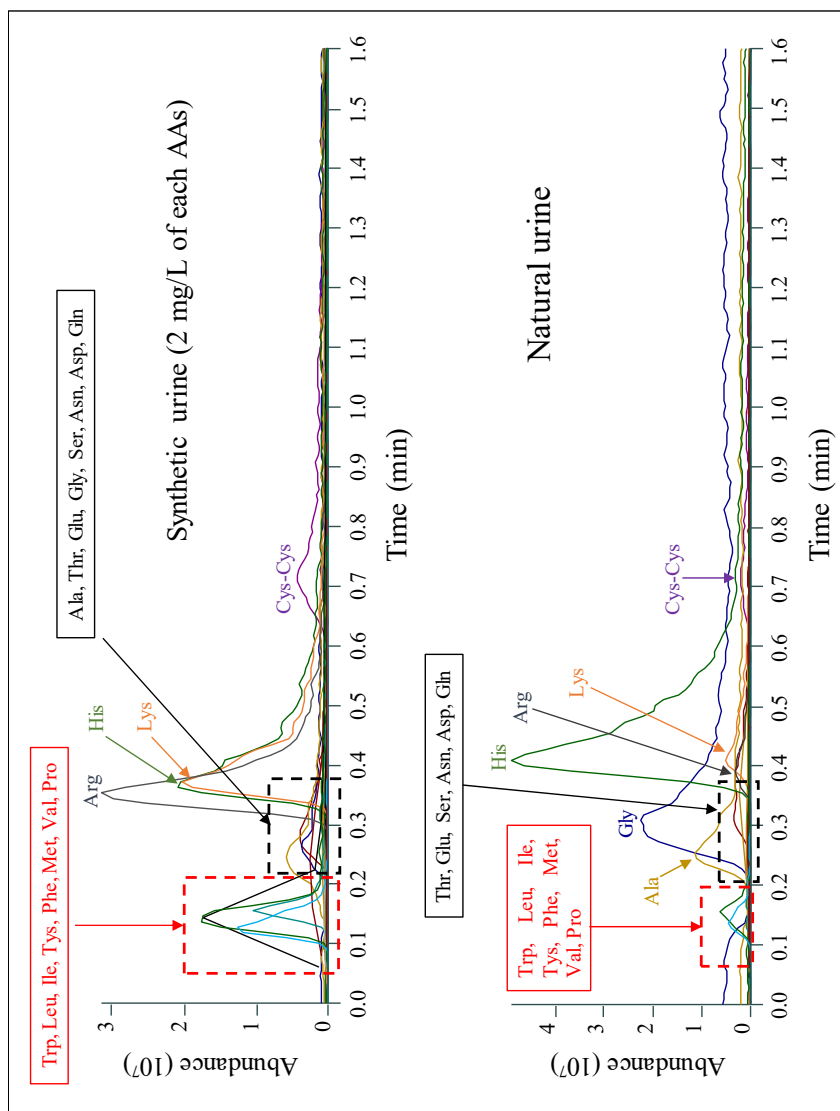


Figure 6

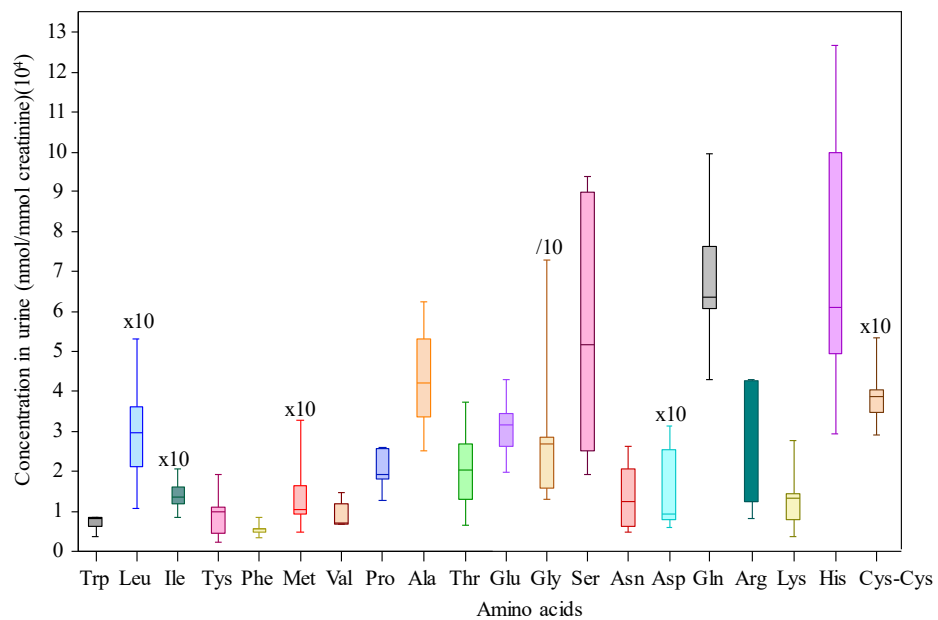


Table 1. Experimental conditions used for commercial guard columns (gCs) with different packing materials

Separation mechanism	Guard columns (gC)	Urine dilution medium	Mobile phase	Flow (ml/min)	Injection volumen (μL)
Reversed phase	XBridge® C18 (2.1 x 10 mm, 3.5 μm)	H ₂ O (0.1% DFA, v/v)	A: 80% H ₂ O/0.1% DFA B: 20% MeOH/0.1% DFA	0.5	5
Cation exchange	Primesep 200 (2.1 x 10 mm, 3 μm)	H ₂ O (0.1% FA, v/v)	A: 80% H ₂ O/0.1% FA B: 20% MeOH/0.1% FA	0.5	5
Anion exchange	Hypersil GOLD AX (2.1 x 10 mm, 3 μm)	H ₂ O (10mM NH ₄ HCO ₃)	A: 80% H ₂ O/10mM NH ₄ HCO ₃ B: 20% H ₂ O/10mM NH ₄ HCO ₃	0.5	5
HILIC	XBridge® Glycan BEH Amide (2.1 x 10 mm, 3.5 μm)	77% ACN (0.2% FA, v/v) 23 % H ₂ O (0.2% FA, v/v)	A: 20% H ₂ O/0.2% FA B: 80% ACN/0.2% FA	0.5	5

Table 2. Analytical characteristics of the gC-Orbitrap-HRMS method obtained with synthetic urine.

Compounds	R ²	Slope ^a	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Repeatability (%) ^b				Reproducibility (%) ^b			Recovery (%) ^c Synthetic urine	Recovery (%) ^c Urine
					LOQ	1.5 LOQ	2LOQ	LOQ	1.5 LOQ	2 LOQ			
Trp	0.9985	0.111 ± 0.003	0.13	0.44	13	7.0	3.4	10	8	5.7	100	80	
Leu + Ile	0.9938	0.23 ± 0.01	0.17	0.55	4.5	4.6	4	17	15	14	95	86	
Ile	0.9905	0.016 ± 0.002	0.09	0.29	8.6	9.2	7.4	22	23	16	130	100	
Tys	0.9949	0.0022 ± 0.0001	0.03	0.10	11	12	13	18	15	15	130	80	
Phe	0.9945	0.170 ± 0.008	0.16	0.53	5.7	3.4	3.7	10	6.4	4.2	110	80	
Met	0.9970	0.186 ± 0.007	0.27	0.87	11	4.3	3.8	17	8.8	8.3	100	115	
Val	0.9952	0.167 ± 0.009	0.97	3.19	3.8	3.5	1.5	5.3	5.8	5.2	130	100	
Pro	0.9972	0.38 ± 0.01	0.14	0.47	6.2	4.2	1.7	7.3	6.2	5.3	100	80	
Ala	0.9968	0.53 ± 0.02	0.61	2.02	4.9	2.7	1.4	11	6.0	3.4	110	110	
Thr	0.9978	0.060 ± 0.002	0.14	0.45	7.7	2.4	2.9	11	7.0	3.7	110	100	
Glu	0.9973	0.048 ± 0.002	0.20	0.65	3.6	3.5	2.4	7.5	7.8	7.0	100	87	
Gly	0.9920	0.36 ± 0.02	1.50	4.95	3.7	5.1	1.7	5.5	4.9	5.2	95	100	
Ser	0.9972	0.42 ± 0.02	0.53	1.76	7.9	3.0	2.2	11	4.6	3.1	80	105	
Asn	0.9990	0.042 ± 0.001	0.07	0.23	8.2	4.7	2.5	14	5.0	3.9	100	80	
Asp	0.9975	0.039 ± 0.001	0.16	0.53	4.4	4.3	2.9	10	8.7	8.6	100	114	
Gln	0.9959	0.086 ± 0.003	0.04	0.14	7.4	4.2	2.9	13	13	12	100	85	
Arg	0.9973	0.81 ± 0.03	0.06	0.18	7.1	5.3	2.7	9.1	6.1	5.4	100	80	
Lys	0.9987	0.01 ± 0.06	0.20	0.65	3.3	3.8	2.1	7.9	4.6	3.8	100	100	
His	0.9983	0.01 ± 0.06	0.21	0.68	3.7	4.3	2.3	8.1	4.8	2.6	100	100	
Cys-Cys	0.9986	0.327 ± 0.009	0.61	2.00	3.5	2.4	2.5	4.4	3.9	3.7	90	100	

^a Slope of the calibration curves expressed in arb. units vs. concentration in mg/L.

^b Calculated for ten replicates on the same day (repeatability) and for five replicates on three different days (reproducibility).

^c Obtained at the first level of the calibration curve for each compound.

^d Leu recovery, calculated as the difference of Ile+Leu concentration minus Ile concentration.

Supplementary Material

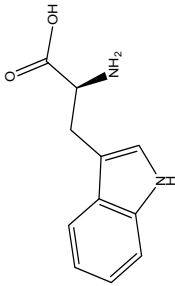
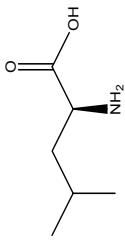
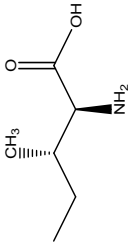
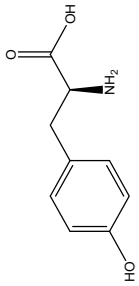
Orbitrap-high resolution mass spectrometry (HRMS) with the use of a guard column (gC) for the determination of compounds of clinical interest in urine

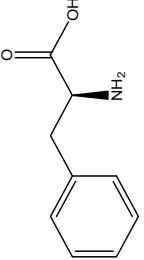
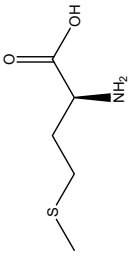
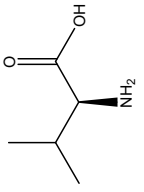
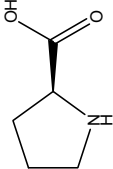
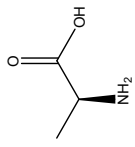
María Teresa Fernández-del-Campo-García, Ana María Casas-Ferreira*, Encarnación Rodríguez-Gonzalo, Bernardo Moreno-Cordero, José Luis Pérez-Pavón

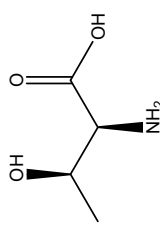
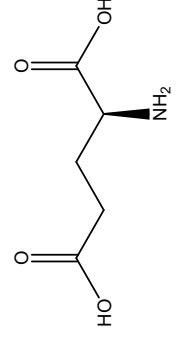
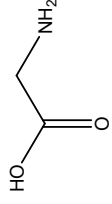
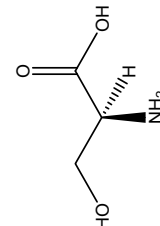
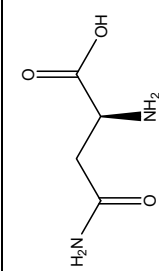
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Salamanca. 37008 Salamanca, SPAIN

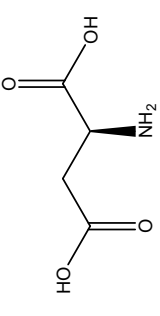
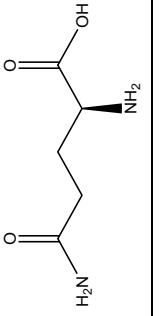
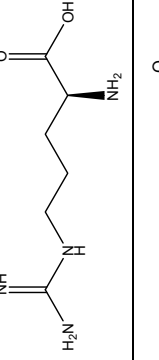
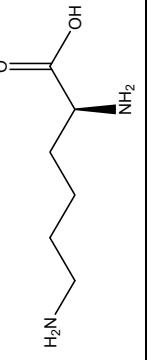
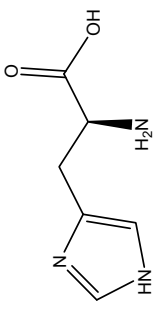
* Corresponding author: (fax) +34-923-294483; (e-mail) anacasas@usal.es

Table S1. Physical-chemical properties of the target compounds and HRMS optimized parameters for their analysis.

Compound (Abbreviation)	Chemical structure	Mw (g/mol)	Log P ^a	t _R (min)	[M + H] ⁺ (m/z)	Selected fragmentation (m/z)
Tryptophan (Tyr)		204.23	-1.1	0.13	205.0972	
Leucine (Leu)		131.17	-1.8	0.14	132.1019	69.0704
Isoleucine (Ile)		131.17	-1.7	0.14	132.1019	86.0968
Tyrosine (Tys)		181.19	-2.4	0.15		91.0545

Compound (Abbreviation)	Chemical structure	Mw (g/mol)	Log P ^{ca}	t _R (min)	[M + H] ⁺ (m/z)	Selected fragmentation (m/z)
Phenylalanine (Phe)		165.19	-1.4	0.16	166.0863	
Methionine (Met)		149.21	-1.8	0.17	150.0583	
Valine (Val)		117.15	-2.3	0.22	118.0863	72.0813
Proline (Pro)		115.11	-2.7	0.24	116.0706	70.0656
Alanine (Ala)		89.09	-3	0.25	90.0550	

Compound (Abbreviation)	Chemical structure	Mw (g/mol)	Log P ^{sa}	t _R (min)	[M + H] ⁺ (m/z)	Selected fragmentation (m/z)
Threonine (Thr)		119.12	-3	0.28	120.0655	74.0605
Glutamic acid (Glu)		147.13	-3.5	0.29	148.0604	84.0448
Glycine (Gly)		75.07	-3.3	0.30	76.0393	
Serine (Ser)		105.09	-3.4	0.31	106.0499	
Asparagine (Asn)		132.12	-3.4	0.33	133.0608	74.0241

Compound (Abbreviation)	Chemical structure	Mw (g/mol)	Log P ^a	t _R (min)	[M + H] ⁺ (m/z)	Selected fragmentation (m/z)
Aspartic acid (Asp)		133.11	-3.5	0.34	134.0448	74.0241
Glutamine (Gln)		146.14	-3.3	0.35	147.0764	84.0447
Arginine (Arg)		174.20	-3.5	0.40	175.1190	
Lysine (Lys)		146.19	-3.8	0.42	147.1128	
Histidine (His)		155.15	-2.7	0.43	156.0768	

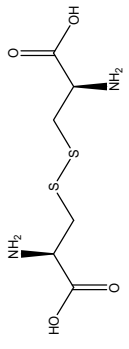
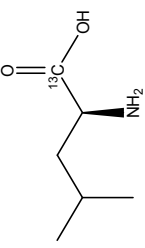
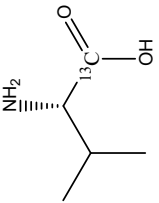
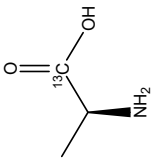
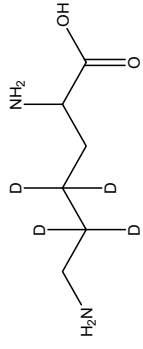
Compound (Abbreviation)	Chemical structure	Mw (g/mol)	Log P ^a	t _R (min)	[M + H] ⁺ (m/z)	Selected fragmentation (m/z)
Cystine (Cys-Cys)		240.02	-3.2	0.70	241.0311	
Leucine- ¹³ C (Leu- ¹³ C)		132.17	-1.8	0.14	133.1051	
Valine- ¹³ C (Val- ¹³ C)		118.14	-2.3	0.22	119.0896	
Alanine- ¹³ C (Ala- ¹³ C)		90.09	-3	0.25	91.0583	
Lysine-D ₄		150.21	-3.8	0.42	151.1376	

Table S2. Concentration range of AAs concentration (nmol/mmol creatinine) found in five natural urine samples (mean, lowest and highest values) using the gC-Orbitrap-HRMS method.

	Concentration range Mean (low-high) (nmol/mmol creatinine)
Trp	6909 (3483-8536)
Leu	3006 (1054-5294)
Ile	1407 (851-2059)
Tys	9315 (2309-19163)
Phe	5536 (3124-8407)
Met	1464 (467-3258)
Val	9524 (6918-14819)
Pro	2036 (1262-2594)
Ala	43254 (25050-62356)
Thr	20668 (6298-37309)
Glu	3100 (1962-4294)
Gly	313415 (130062-728691)
Ser	55931 (19161-93831)
Asn	14040 (4782-26280)
Asp	1590 (587-3115)
Gln	68679 (42950-99786)
Arg	2368 (801-4305)
Lys	13330 (3511-27718)
His	73238 (29266-126664)
Cys-Cys	3925 (2906-5346)

CONCLUSIONES GENERALES

La conclusión general que puede extraerse de este trabajo es que se ha alcanzado el objetivo general propuesto: *la puesta a punto de metodologías analíticas rápidas basadas en espectrometría de masas con fuente de ionización por electrospray orientadas a la determinación y cuantificación de compuestos de interés clínico en muestras biológicas.*

El trabajo descrito en esta memoria pone de manifiesto la viabilidad de desarrollar estrategias basadas en la introducción directa de muestras líquidas en sistemas de espectrometría de masas, en la modalidad de análisis por inyección en flujo o bien incorporando precolumnas de protección, para la determinación de forma rápida y fiable de compuestos endógenos en muestras biológicas como saliva y orina.

La primera parte de la Tesis tiene como objetivo concreto el desarrollo de un método de cribado (no separativo) y de confirmación (separativo) basados en LC-ESI-MS/MS, utilizando la misma configuración instrumental. Una vez desarrollado y validado, el método ha sido aplicado a la determinación de un conjunto de compuestos endógenos polares de distinta naturaleza, en muestras de saliva. En la modalidad rápida de cribado, el tiempo de análisis para una muestra es inferior a 2 minutos. Únicamente para aquellas muestras en las que se encuentren resultados anómalos sería necesario aplicar el método cromatográfico de confirmación.

La segunda parte de la Tesis está centrada en el acoplamiento directo de precolumnas de protección (*gC, guard-columns*) a sistemas de espectrometría de masas con ionización por electrospray (*gC-ESI-MS*). La incorporación de estas precolumnas ejerce un efecto de limpieza a la vez que permite obtener un fraccionamiento de baja resolución de los analitos de interés, sin incrementar de forma significativa el tiempo de análisis, inferior a 3 minutos.

Con esta configuración se plantean diferentes estrategias para la determinación de poliaminas y compuestos relacionados y de aminoácidos no

derivatizados en muestras de orina, basadas en la utilización de analizadores de triple cuadrupolo. El último de los estudios desarrollados corresponde a la utilización de precolumnas de protección con un analizador de masas de alta resolución (Orbitrap). También, se han desarrollado métodos basados en cromatografía líquida-espectrometría de masas para confirmar los resultados obtenidos con las metodologías rápidas, con resultados altamente satisfactorios. Las distintas metodologías propuestas, una vez validadas, han sido aplicadas a la evaluación de los niveles endógenos de los analitos de interés, en muestras de orina y saliva de voluntarios sanos. Los resultados obtenidos con la metodología rápida son confirmados mediante el método cromatográfico, y son coherentes con resultados similares descritos en literatura, lo que pone de manifiesto que son apropiadas para la determinación cuantitativa de estos compuestos en matrices reales. Las conclusiones particulares están recogidas en cada uno de los apartados correspondientes.

De forma global, se puede concluir que las metodologías aquí desarrolladas son rápidas y robustas, y constituyen una alternativa adecuada a los métodos más convencionales para el análisis de matrices biológicas mediante espectrometría de masas con ionización por electrospray. Este tipo de estrategias implican cortos tiempos de análisis, lo que las hace especialmente apropiadas cuando se requiere analizar un elevado número de muestras, como puede ser el caso de ensayos clínicos, estudios poblacionales, etc.

Además, se ha mostrado la capacidad y las posibilidades analíticas que presenta el acoplamiento directo de precolumnas comerciales a equipos de espectrometría de masas de baja y alta resolución, en el análisis de compuestos endógenos en matrices biológicas. Este acoplamiento presenta gran versatilidad en su aplicación, y permite el análisis de matrices tan complejas como orina y saliva que no requieren más pretratamiento que centrifugación/filtración y dilución.

