



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

**ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM ACOPLADA A
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON PRETRATAMIENTO *ON-
LINE*: DETERMINACIÓN DE XENOBIÓTICOS EN
ALIMENTOS Y BIOMARCADORES EN MUESTRAS
BIOLÓGICAS**

**TANDEM MASS SPECTROMETRY COUPLED TO LIQUID
CHROMATOGRAPHY WITH ON-LINE PRETREATMENT:
DETERMINATION OF XENOBIOTICS IN FOODSTUFF AND
BIOMARKERS IN BIOLOGICAL SAMPLES**

DIEGO GARCÍA GÓMEZ

2013

Memoria que para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca presenta el licenciado Diego García Gómez.

Salamanca, 21 de mayo de 2013

Fdo: Diego García Gómez

D.^a Rita Carabias Martínez y D.^a Encarnación Rodríguez Gonzalo, ambas Catedráticas de Química Analítica de la Universidad de Salamanca y directoras del trabajo “Espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía líquida con pretratamiento *on-line*: determinación de xenobióticos en alimentos y biomarcadores en muestras biológicas”, realizado por el licenciado Diego García Gómez 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, 21 de mayo de 2013

Fdo: Rita Carabias Martínez

Fdo: Encarnación Rodríguez Gonzalo

Deseo expresar mi agradecimiento al Ministerio de Educación por la concesión de una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU, AP-2008-03862).

Este trabajo, realizado en el Dpto. de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Salamanca, ha sido financiado por los proyectos CTQ2008-02200/BQU y CTQ2011-24075 del Ministerio de Ciencia e Innovación, así como el proyecto SA017A08 y el Grupo de Excelencia GR-65 de la Junta de Castilla y León.

A lo largo de estos cinco años, que suponen casi un 20% de lo vivido, son muchas las personas que de una u otra manera han contribuido a que esta tesis haya llegado a buen puerto.

Mis directoras de tesis, las Catedráticas D.^a Rita Carabias Martínez y D.^a Encarnación Rodríguez Gonzalo merecen mi primer agradecimiento. Ellas han sido mis maestras y la fuente de inspiración de esta tesis. Muchas gracias por todo lo que me habéis enseñado y por todo lo que me habéis dejado hacer.

Tampoco puedo olvidarme del resto de Profesores del Departamento de Química Analítica que siempre han mostrado un apoyo incondicional para con nosotros los becarios. Siempre guardaré un grato recuerdo de todos. Especialmente, por el simple e injusto motivo de que he tenido más trato con ellos, no puedo dejar de mostrar mi agradecimiento particular a Bernardo, Milagros, Myriam, Jesús y Pepe. Sin duda también recordaré particular y gratamente a Javi y nuestras ideas ingeniosas frente a problemas variopintos; algunas hasta funcionaron. Gracias también a Fernando Luis y a Ana que, a su manera, han sido también motor de esta y otras muchas Tesis. Y, como no, a César Raposo, Director del Servicio General de Espectrometría de Masas, por su hospitalidad y amabilidad y por estar siempre dispuesto a iniciar una agradable discusión sobre el electrospray, la trampa iónica o los últimos avances en alta resolución.

Especialmente gratificante son los incontables momentos vividos con los compañeros de laboratorio; podría escribirse un anecdotario al menos tan extenso como esta tesis. De los inicios guardo un especial recuerdo de Eli, culpable de enseñarme los entresijos y sutilezas del trabajo de laboratorio y de Ana Casas que me brindó su amistad y siempre se preocupó por mí. Gracias por ser mi primer referente; aunque los tiempos y las situaciones cambien siempre habrá un hueco para ti. Fueron estos inicios tiempos de viejas glorias (Josemi, Sarita, Paradinas, Luis, Miguel...) que alcanzaron su punto álgido en la inigualable ciudad de Innsbruck y que, inevitablemente, llevan a pensar que cualquier tiempo pasado fue mejor.

Uno de los primeros pequeños grandes cambios del laboratorio fue la llegada de una compañera de andanzas y desventuras. Rachel sabe que siempre será mi ojito derecho y mi niña mimada

electroforética, por mucho que a veces potencie mis instintos homicidas y se olvide de que somos hombres, pero tenemos sentimientos. La réplica llegó poco después con Lara, inigualable en su género y con buenas dotes para la química analítica y la vida. Gracias por todo lo que nos hemos reído juntos.

Otro pequeño gran cambio fue el “boom” de las Tesinas, que dura hasta hoy en día, y que fue responsable del paso por el laboratorio de varias tesinandas que, aunque no estuvieron mucho tiempo, dejaron huella. Gracias en particular a Marta, Crisfer y Maite (socias numerarias del fondo norte) por ponerle ilusión, de paso renovando la mía, a esto de la ciencia.

Y de las viejas glorias, inexorablemente, a las nuevas. Muchas gracias Valen por tus conversaciones, por tus sonrisas, por hacer del mundo un sitio mejor; en resumen, por ser como eres. Por favor, no cambies nunca. Y también a Rosa por “ponerse” de amiga. En vuestras manos queda la responsabilidad de que todo siga tan bien por aquí.

Tuve la suerte de completar mi formación con una estancia de quince semanas en el King’s College de Londres. Gracias a la Dra. Cristina Legido-Quigley por hacer posible un periodo tan especial y por revelarme los caminos de la metabolómica. Disfruté del viaje.

Como no todo es trabajar, muchas gracias por los momentos inolvidables en el desayuno de las 8:00 (poco frecuentado), en el zumo del mediodía, el café de las 16:00 y las cañas de las 19:00, trasladadas los viernes a las 14:00. Vicen y Estrella podéis sentirnos orgullosos de ser los responsables de que aquí en las tesis se trabaje con alegría. Mención de honor a Pepe Cerveró, fichaje de invierno de última hora, de los que ganan ligas o dan permanencias.

Y tras los caminos recorridos los que quedan por recorrer. Difícil saber a dónde nos llevarán en los tiempos que corren pero, seguro que lejos o cerca, mantendré a mis dos grandes amigas, ganadas gracias a esta tesis. La primera es Gloria. Gallega, Doctora en química analítica y madre, por este orden. Nuestras conversaciones y la fundación y posterior evolución de “el tomate” no tienen precio y son, casi con total seguridad, los mejores momentos que he pasado en el departamento. Gracias por tu amistad, es un regalo inigualable que cuidaré con tesón. La segunda es María. Carismática. Imposible no ver reflejado en ella al

yo de párrafos atrás, las mismas ilusiones, el mismo ojo clínico y sarcástico para la química analítica y la vida. Gracias por confiar en mí y convertirte en la mejor compañera de trabajo y, de paso, en una importante y fiel amiga. Lástima que se hiciera tan corto, espero que algún día volvamos a investigar juntos, CE o LC, tú eliges delfina.

Y aunque uno destaque principalmente las novedades de este 20%, huelga resaltar la importancia de los que ya estaban y siempre estuvieron. Gracias a mis amigos, ¡qué sería de mí sin vosotros! Gracias a Ángel por ser el mejor amigo que uno puede desear e imaginar y a Juan por ser el hermano que nunca tuve y que incasablemente cuida, vigila y hace de brújula en mi camino de la vida. Gracias a mi familia, ampliada ahora exponencialmente, por los buenos momentos y las enseñanzas recibidas. Especialmente a Coto, por el cariño mutuo y su confianza, y a Cris, porque eres la mejor persona que conozco y conoceré nunca.

Gracias a mis padres y a mi abuelo. Hicieron de mí lo que soy con su educación, nunca os equivocasteis. Vuestros sacrificios han sido, son y serán impagables, imposible recompensaros, imposible devolveros todo lo que me habéis dado. Gracias.

Y por último, gracias a mi mujer, Soledad. Mi alma gemela. Gracias por lo felices que somos y por el largo camino que nos queda juntos. Imposible vislumbrar un futuro mejor.

*Perdóname, no sé decirte nada más [...],
pero siempre acuérdate
de lo que un día yo escribí,
pensando en ti, pensando en ti,
como ahora pienso.*

“Una condición esencial para toda investigación fructífera es tener a nuestra disposición una técnica satisfactoria. Todo progreso científico es progreso en un método”

Primeras líneas de “Las clorofilas en el mundo vegetal y animal” de M.S. Tsvet, 1910.

ACRÓNIMOS



ADS	<i>Alkyl-Diol-Silica</i> Alquil-Diol-Sílice
BGE	<i>BackGround Electrolyte</i> Medio de Separación Electroforético
CE	<i>Capillary Electrophoresis</i> Electroforesis Capilar
CV	<i>Coefficient of Variation</i> Coeficiente de Variación
DAD	<i>Diode-Array Detector</i> Detector de Barrera de Diodos
EIC o XIC	<i>EXtracted Ion Chromatogram</i> Cromatograma de Ion EXtraído
EMEA	<i>European Medicines Agency</i> Agencia Europea del Medicamento
ESI	<i>ElectroSpray Ionization</i> Ionización por ElectroSpray
GC	<i>Gas Chromatography</i> Cromatografía de Gases
HILIC	<i>Hydrophilic Interaction LIquid Chromatography</i> Cromatografía Líquida de Interacciones Hidrofílicas
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> Cromatografía Líquida de Alta Resolución
ILIS	<i>Isotope Labeled Internal Standard</i> Patrón Interno Marcado Isotópicamente
IP	<i>Identification Point</i> Punto de Identificación
IT	<i>Ion Trap</i> Trampa Iónica
LC	<i>Liquid Chromatography</i> Cromatografía Líquida

LC-LC	<i>Heart-cutting Bidimensional Liquid Chromatography</i> Cromatografía Bidimensional Parcial o Fraccionada
LCxLC	<i>Comprehensive Bidimensional Liquid Chromatography</i> Cromatografía Bidimensional Exhaustiva
LOD	<i>Limit of Detection</i> Límite de Detección
LOQ o LLOQ	<i>Lower Limit Of Quantification</i> Límite de Cuantificación
MF	<i>Matrix Factor</i> Factor de Matriz
MNN	<i>Modified Nucleosides and Nucleobases</i> Nucleósidos y nucleobases modificados
MRL	<i>Maximum Residue Limit</i> Nivel Máximo de Residuo
MRM o SRM	<i>Multiple Reaction Monitoring or Selected Reaction Monitoring</i> Seguimiento de Reacción Múltiple
MS	<i>Mass Spectrometry</i> Espectrometría de Masas
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i> Espectrometría de Masas en Tándem
NPLC	<i>Normal Phase Liquid Chromatography</i> Cromatografía Líquida de Fase Normal
PFP	<i>PentaFluoroPhenyl</i> PentaFluoroFenil
Q	<i>Quadrupole</i> Cuadrupolo
QqQ	<i>Triple Quadrupole</i> Triple Cuadrupolo
QC	<i>Quality Control Samples</i> Muestras para Control de Calidad

RAM	<i>Restricted Access Material</i> Material de Acceso Restringido
RPLC	<i>Reversed Phase Liquid Chromatography</i> Cromatografía Líquida de Fase Inversa
RSD	<i>Relative Standard Deviation</i> Desviación Estándar Relativa
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> Extracción en Fase Sólida
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i> Cromatograma de Ion Total
TIE	<i>Total Ion Electropherogram</i> Electroferograma de Ion Total
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i> Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución
UHQ	<i>Ultra High Quality water</i> Agua Ultrapura
ZIC-HILIC	<i>ZwitterionIC Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i> Cromatografía Líquida Zwitteriónica de Interacciones Hidrofílicas

ÍNDICE

I

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA: FASE INVERSA (RPLC) E INTERACCIONES HIDROFÍLICAS (HILIC).....	3
1.1.1. <i>Cromatografía líquida de interacciones hidrofílicas (HILIC)</i>	4
1.1.1.1. <i>Mecanismo de separación en HILIC</i>	6
1.1.1.2. <i>Fases móviles y estacionarias en HILIC</i>	8
1.2. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC-MS).....	12
1.2.1. <i>Interfaces LC-MS</i>	13
1.2.1.1. <i>Interfaces de ionización a presión atmosférica (API)</i>	15
1.3.1. <i>Analizadores de espectrometría de masas</i>	22
1.4.1. <i>Espectrometría de masas en tándem</i>	27
1.4.1.1. <i>Adquisición de datos en MS/MS</i>	31
1.3. MATERIALES DE ACCESO RESTRINGIDO (RAM) EN ETAPAS DE TRATAMIENTO DE MUESTRA.....	34
1.3.1. <i>Clasificación de los RAM</i>	36
1.3.2. <i>Configuración instrumental de los RAM</i>	40
1.4. XENOBIÓTICOS Y BIOMARCADORES.....	48
1.4.1. <i>Contaminantes en alimentos</i>	48
1.4.2. <i>Biomarcadores en muestras biológicas: biomonitoring</i>	50
1.5. VALIDACIÓN Y LEGISLACIÓN.....	60
1.5.1. <i>Decisión de la Comisión Europea 2002/657</i>	60
1.5.1.1. <i>Criterios de funcionamiento y otros requisitos y procedimientos de los métodos analíticos</i>	61
1.5.1.2. <i>Parámetros de validación</i>	62
1.5.2. <i>Guía de validación de métodos bioanalíticos (EMEA)</i>	64

2. OBJETO	69
3. EXPERIMENTAL	75
3.1. PATRONES, DISOLVENTES Y REACTIVOS.....	77
3.1.1. <i>Patrones</i>	77
3.1.2. <i>Disolventes y reactivos</i>	79
3.2. DISOLUCIONES ESTÁNDAR.....	81
3.3. MATERIAL E INSTRUMENTACIÓN.....	81
3.3.1. <i>Configuración instrumental en el acoplamiento RAM-LC</i>	83
3.3.2. <i>Otras configuraciones instrumentales</i>	84
3.4. MUESTRAS ANALIZADAS.....	85
3.5. VALIDACIÓN Y LEGISLACIÓN.....	88
3.5.1. <i>Decisión de la Comisión Europea 2002/657</i>	88
3.5.2. <i>Guía de validación de métodos bioanalíticos (EMEA)</i>	90
4. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS XENOBIÓTICOS EN ALIMENTOS	93
4.A. DETERMINACIÓN DE DISRUPTORES ENDOCRINOS EN MIEL	95
4.A.1. OBJETO.....	97
4.A.2. INTRODUCCIÓN.....	98
4.A.2.1. <i>Fenoles como disruptores endocrinos</i>	98
4.A.2.2. <i>Miel</i>	103
4.A.3. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE DISRUPTORES ENDOCRINOS FENÓLICOS EN MIEL: RAM-RPLC-MS/MS (IT).....	105
4.A.3.1. <i>Optimización de la separación cromatográfica</i>	105
4.A.3.2. <i>Optimización de los parámetros de la trampa iónica</i>	106
4.A.3.3. <i>Optimización del tratamiento de muestra utilizando materiales de acceso restringido</i>	108
4.A.3.4. <i>Estudio del efecto de matriz</i>	111
4.A.3.5. <i>Validación del método analítico RAM-RPLC-MS/MS</i>	113
ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN I	115

4.A.4. DETERMINACIÓN ELECTROFORÉTICA DE DISRUPTORES ENDOCRINOS FENÓLICOS EN MIEL: RAM, SPE, CE-MS (Q).....	127
4.A.4.1. Optimización de la separación electroforética.....	128
4.A.4.2 Optimización del acoplamiento CE-ESI-MS.....	128
4.A.4.3. Características analíticas del método CE-ESI-MS.....	132
4.A.4.4. Adaptación del tratamiento RAM a CE-MS.....	133
4.A.4.5. Incorporación de SPE al método RAM, CE-MS.....	135
4.A.4.6. Características analíticas del método RAM, SPE, CE-MS.....	136
ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN II.....	137
4.B. DETERMINACIÓN DE BENZIMIDAZOLES ANTIHELMÍNTICOS EN LECHE.....	149
4.B.1. OBJETO.....	151
4.B.2. INTRODUCCIÓN.....	152
4.B.2.1. Benzimidazoles como agentes antihelmínticos.....	152
4.B.2.2. Leche.....	156
4.B.3. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE BENZIMIDAZOLES ANTIHELMÍNTICOS EN LECHE: RAM-RPLC-MS/MS (QqQ).....	160
4.B.3.1. Optimización de la separación cromatográfica.....	160
4.B.3.2. Optimización de los parámetros del triple cuadrupolo.....	161
4.B.3.3. Optimización del tratamiento de muestra utilizando materiales de acceso restringido.....	163
4.B.3.4. Estudio del efecto de matriz.....	169
4.B.3.5. Características analíticas del método RAM-RPLC-MS/MS.....	170
4.B.3.6. Estudio de la contaminación entre muestras.....	171
4.B.3.7. Validación del método analítico RAM-RPLC-MS/MS.....	172
ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN III.....	175

5. DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	183
5.A. DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN A COMPUESTOS XENOBIÓTICOS.....	185
5.A.1. OBJETO.....	187
5.A.2. INTRODUCCIÓN.....	189
5.A.2.1. <i>Biomarcadores de exposición a pesticidas.....</i>	190
5.A.2.2. <i>Biomarcadores de exposición a contaminantes industriales.....</i>	195
5.A.3. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN EN ORINA: RAM-RPLC-DAD.....	198
5.A.3.1. <i>Optimización de la separación cromatográfica.....</i>	198
5.A.3.2. <i>Optimización del tratamiento de muestra utilizando materiales de acceso restringido.....</i>	199
5.A.3.3. <i>Efecto de matriz y características analíticas del método RAM-RPLC-DAD. Inyección de 100 µL.....</i>	202
5.A.3.4. <i>Materiales de acceso restringido como etapa de preconcentración.....</i>	204
5.A.3.5. <i>Características analíticas del método RAM-RPLC-DAD.....</i>	205
ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN IV.....	207
5.A.4. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN EN ORINA: RAM-RPLC-MS/MS (IT).....	219
5.A.4.1. <i>Optimización de los parámetros de la trampa iónica.....</i>	219
5.A.4.2. <i>Optimización de la separación cromatográfica.....</i>	221
5.A.4.3. <i>Influencia del volumen de inyección.....</i>	222
5.A.4.4. <i>Estudio del efecto de matriz.....</i>	223
5.A.4.5. <i>Características analíticas del método RAM-RPLC-MS/MS.....</i>	225
5.A.4.6. <i>Validación del método RAM-RPLC-MS/MS.....</i>	226
5.A.4.7. <i>Análisis cualitativo no dirigido.....</i>	227
ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN V.....	229

5.B. DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES DE EFECTO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA HIDROFÍLICA ZWITTERIÓICA.....	241
5.B.1. OBJETO.....	243
5.B.2. INTRODUCCIÓN.....	245
5.B.2.1. <i>Nucleósidos y nucleobases como biomarcadores.....</i>	245
5.B.2.2. <i>Nucleósidos y nucleobases estudiados.....</i>	250
5.B.3. ESTUDIO SOBRE LA APLICACIÓN DE CROMATOGRAFÍA HILIC ZWITTERIÓICA PARA LA SEPARACIÓN DE NUCLEÓSIDOS Y NUCLEOBASES MODIFICADOS.....	254
5.B.3.1. <i>Separación cromatográfica de MNN y compatibilidad con ESI-MS en RPLC, HILIC y ZIC-HILIC.....</i>	256
5.B.3.2. <i>Efecto de la naturaleza y contenido de componente orgánico en la fase móvil en ZIC-HILIC.....</i>	258
5.B.3.3. <i>Efecto del pH de la fase móvil en ZIC-HILIC.....</i>	259
5.B.3.4. <i>Efecto de la concentración de sales en la fase móvil en ZIC-HILIC.....</i>	261
5.B.3.5. <i>Evaluación cuantitativa de la contribución de la interacción electrostática a la retención en ZIC-HILIC.....</i>	262
5.B.3.6. <i>Efecto de la temperatura en ZIC-HILIC.....</i>	264
5.B.3.7. <i>Efecto del flujo cromatográfico en ZIC-HILIC.....</i>	265
5.B.3.8. <i>Efecto de la inyección en ZIC-HILIC.....</i>	266
5.B.3.9. <i>Reproducibilidad en ZIC-HILIC.....</i>	267
ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN VI.....	269
ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN VII.....	279

5.B.4. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE NUCLEÓSIDOS URINARIOS: RAM-ZIC-HILIC-MS/MS (QqQ). APLICACIÓN POTENCIAL EN DIAGNÓSTICO CLÍNICO.....	287
5.B.4.1. Optimización de la separación cromatográfica.....	287
5.B.4.2. Optimización de los parámetros del triple cuadrupolo.....	287
5.B.4.3. Optimización del tratamiento de muestra: RAM de naturaleza polar.....	288
5.B.4.3.1. Disolvente de elución y transferencia.....	292
5.B.4.4. Validación del método analítico RAM-HILIC-MS/MS.....	294
5.B.4.5. Aplicación del método RAM-HILIC-MS/MS desarrollado al análisis de muestras reales: reconocimiento de pautas.....	296
5.B.4.5.1. Gráficos de dispersión y de estrella.....	297
5.B.4.5.2. Reconocimiento de pautas.....	298
ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN VIII.....	301
5.B.5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA: FASES ESTACIONARIAS PARA LA SEPARACIÓN DE NUCLEOBASES, NUCLEÓSIDOS Y NUCLEÓTIDOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIONES HIDROFÍLICAS.....	313
ARTÍCULO DE REVISIÓN.....	315
6. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA BIDIMENSIONAL: HILIC-RPLC PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES EN ORINA. ESTUDIOS PRELIMINARES.....	335
6.1. OBJETO.....	337
6.2. INTRODUCCIÓN.....	338
6.2.1. Cromatografía líquida bidimensional (2D-LC).....	338
6.2.1.1. Interfaces en cromatografía líquida bidimensional.....	341
6.2.1.2. Problemas asociados a la cromatografía líquida bidimensional.....	342
6.2.2. Características generales de los acoplamientos HILIC x RPLC.....	343

6.3. ESTUDIO PRELIMINAR DEL ACOPLAMIENTO HILIC-RPLC PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN Y EFECTO EN ORINA.....	346
6.3.1. Separaciones cromatográficas monodimensionales.....	347
6.3.2. Configuración instrumental.....	348
6.3.3. Naturaleza del RAM.....	348
6.3.4. Selección de la columna de la primera dimensión.....	348
6.3.5. Selección de la columna de la segunda dimensión.....	351
6.3.6. Sistema bidimensional RAM-ZIC-HILIC-PFP-MS/MS.....	354
7. CONCLUSIONES.....	361
8. SUMMARY IN ENGLISH.....	365
APÉNDICE I: ESPECTROS DE MS/MS.....	389
APÉNDICE II: MENCIÓN “DOCTORADO EUROPEO”.....	425

INTRODUCCIÓN

1

1.1. Cromatografía líquida: fase inversa (RPLC) e interacciones hidrofílicas (HILIC)

Desde los años 70, la introducción paulatina de la cromatografía líquida de alta resolución (*HPLC, High Performance Liquid Chromatography*) como técnica de separación ha supuesto un importante progreso en las ciencias analíticas. La cromatografía líquida de fase inversa (*RPLC, Reversed-Phase Liquid Chromatography*), en la que se utilizan fases estacionarias hidrofóbicas, basadas en sílice con cadenas alquílicas; y fases móviles polares, mezclas de tampón acuoso y ACN/MeOH, ha sido y es, sin duda, la modalidad más utilizada. Hoy en día, aproximadamente un 70% de las separaciones que se llevan a cabo por HPLC son RPLC.

La gran aplicabilidad de RPLC se debe principalmente a su versatilidad y al desarrollo constante de nueva instrumentación y fases estacionarias. Como norma general, la retención aumenta con la hidrofobicidad de la fase estacionaria y con el porcentaje de tampón acuoso en la fase móvil. Así, los analitos polares se retienen en menor grado que los no polares. A pesar de su amplia implantación, las separaciones de compuestos de elevada polaridad y basicidad usando RPLC presentan aún algunas limitaciones. El análisis de algunos compuestos polares requiere el uso de altos porcentajes de tampón acuoso, incluso en las columnas de RPLC más inertes, lo que genera perfiles de pico inadecuados. Así, compuestos muy hidrofílicos, como carbohidratos u otros compuestos de bajo peso molecular y elevada polaridad, presentan una retención muy pobre en RPLC eluyendo muy cerca del volumen muerto, lo que dificulta en gran medida la separación entre ellos y de los interferentes polares de la matriz, incluso con fases móviles 100% acuosas¹.

La principal alternativa a RPLC, la cromatografía en fase normal (*NPLC, Normal Phase Liquid Chromatography*) conlleva el uso de fases estacionarias polares y disolventes orgánicos (hexano, acetato de etilo, etc.) como fase móvil. A diferencia de RPLC, la retención aumenta al hacerlo la polaridad de los analitos y de la fase estacionaria o al reducir

¹ B.K. Lavine, D.T. Corona, U.D.N.T. Perera, *Microchem. J.* 103 (2012) 49. “*Analysis of vanilla extract by reversed phase liquid chromatography using water rich mobile phases*”

la polaridad de la fase móvil. NPLC presenta una baja eficiencia para el análisis de compuestos polares, con picos cromatográficos altamente asimétricos. Esta modalidad cromatográfica es, además, incompatible con la espectrometría de masas como método de detección. En el caso de compuestos de elevada polaridad, estos pueden presentar una retención excesiva en NPLC o, incluso, no ser suficientemente solubles en los disolventes orgánicos no polares o de muy baja polaridad.

La cromatografía líquida de interacciones hidrofílicas (*HILIC*, *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) es una alternativa interesante para el análisis de compuestos polares. HILIC puede definirse como una modalidad de separación cromatográfica en la que se combinan las fases estacionarias normalmente utilizadas en NPLC con las fases móviles utilizadas en las separaciones de RPLC. Así, las fases estacionarias habituales en HILIC están basadas en sílice sin modificar o modificada con grupos polares, o polímeros también de naturaleza polar. La fase móvil está formada por un disolvente orgánico polar (acetonitrilo en la mayor parte de los casos) que contiene hasta un 30% de agua. HILIC proporciona una buena retención para compuestos de elevada polaridad ofreciendo una gran diferencia en selectividad cuando se compara con RPLC. Además, dado que la fase móvil contiene una alta proporción de disolvente orgánico (baja viscosidad) la eficiencia de la separación es mayor que en RPLC (menor altura equivalente de plato teórico), donde es necesario un alto contenido de agua en la fase móvil para la separación de analitos polares². Otra ventaja importante de HILIC, especialmente en comparación con NPLC, es su excelente compatibilidad con la detección por espectrometría de masas.

1.1.1. Cromatografía líquida de interacciones hidrofílicas (HILIC)

En 1990, Alpert³ sugirió el término “HILIC” para describir una modalidad de separación cromatográfica en la que analitos polares interactúan con una fase estacionaria moderadamente polar y son

² F. Gritti, A. dos Santos Pereira, P. Sandra, G. Guiochon, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 683. “Efficiency of the same neat silica column in hydrophilic interaction chromatography and per aqueous liquid chromatography”

³ A.J. Alpert, J. Chromatogr. A 499 (1990) 177. “Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds”

eluidos con una fase móvil relativamente hidrofóbica. Sin embargo, la cromatografía líquida de fase normal acuosa (*ANPLC, Aqueous Normal-Phase Liquid Chromatography*) se ha utilizado, bajo diferentes nombres, desde mucho tiempo antes. Algunos autores remontan los orígenes de HILIC a los inicios de la cromatografía en columna cuando, en 1937, Martin y Synge⁴ separaron aminoácidos en una columna de sílice utilizando agua saturada con cloroformo como fase móvil. En todo caso, esta afirmación es discutible teniendo en cuenta la diferente polaridad y miscibilidad de esta fase móvil comparada con la mezcla de acetonitrilo y agua típica de HILIC. La primera separación que estrictamente puede considerarse como HILIC se registra en 1975, año en el que Linden y Lawhead⁵ describen una separación de sacáridos utilizando como fase estacionaria sílice modificada con grupos amina y mezclas de acetonitrilo y agua como fase móvil. En el mismo año, Palmer⁶ describió una separación similar.

A pesar de que estos primeros trabajos separaron carbohidratos como analitos polares en columnas de sílice o sílice modificada con amina, el trabajo de Alpert³ utilizó columnas de sílice modificadas con un intercambiador catiónico o un grupo orgánico neutro para la separación de aminoácidos y péptidos. Este estudio confirmó que se podía llevar a cabo HILIC con columnas modificadas pero que la naturaleza de la modificación debía ser, en todo caso, polar. El mérito de Alpert fue demostrar, por primera vez, que separaciones en diferente tipo de columnas y para diferentes analitos polares podían ser explicadas a través de un mecanismo común.

El interés en HILIC ha crecido exponencialmente durante los últimos años debido a la demanda creciente en la determinación de fármacos polares, metabolitos y otros compuestos de importancia biológica en proteómica, metabolómica y análisis clínico⁷. También se han desarrollado aplicaciones de compuestos polares de bajo peso

⁴ A.J.P. Martin, R.L.M. Synge, *Biochem. J.* 35 (1941) 1358. "A new form of chromatogram employing two liquid phases"

⁵ J.C. Linden, C.L. Lawhead, *J. Chromatogr. A* 105 (1975) 125. "Liquid chromatography of saccharides"

⁶ J.K. Palmer, *Anal. Lett.* 8 (1975) 215. "A versatile system for sugar analysis via liquid chromatography"

⁷ M.A. Strega, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2439. "Hydrophilic Interaction Chromatography-Electrospray Mass Spectrometry Analysis of Polar Compounds for Natural Product Drug Discovery"

molecular, como extractos de plantas, de gran interés en las industrias alimentaria y farmacéutica⁸.

El número de artículos de revisión en HILIC ha crecido a la par que el interés creciente en esta técnica. Existen diversos artículos de revisión de carácter general que estudian el desarrollo de fases estacionarias, el efecto de las condiciones de operación (fase móvil, temperatura, etc.), el desarrollo de metodologías analíticas con HILIC, la comprensión del mecanismo de separación y el acoplamiento de HILIC con espectrometría de masas y otras columnas analíticas (cromatografía líquida bidimensional)^{9,10,11,12,13,14}. En la actualidad existen alrededor de veinte artículos de revisión centrados en mostrar las aplicaciones en la separación de péptidos¹⁵ y en el análisis biológico¹⁶ y farmacéutico¹⁷. La revista *Journal of Separation Science* ha dedicado dos números especiales a aspectos relacionados con HILIC: el volumen 31, número 9 (2008); y el volumen 36, números 6 y 7 (2010).

1.1.1.1. Mecanismo de separación en HILIC

El mecanismo propuesto por Alpert³, que es el aceptado hoy en día para la modalidad cromatográfica HILIC, es complejo. Según dicho mecanismo, los grupos polares que forman parte de la fase estacionaria atraen a las moléculas de agua, formando una capa acuosa sobre la superficie de la fase estacionaria. Así, un analito polar disuelto en la fase móvil sufre un reparto o partición entre las dos fases líquidas

⁸ V.V. Tolstikov, O. Fiehn, *Anal. Biochem.* 301 (2002) 298. "Analysis of Highly Polar Compounds of Plant Origin: Combination of Hydrophilic Interaction Chromatography and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry"

⁹ P. Hemstroem, K. Irgum, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1784. "Hydrophilic interaction chromatography"

¹⁰ P. Jandera, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1421. "Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts"

¹¹ P. Jandera, *Anal. Chim. Acta* 692 (2011) 1. "Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review"

¹² T. Ikegami, K. Tomomatsu, H. Takubo, K. Horie, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 474. "Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography"

¹³ B. Buszewski, S. Noga, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 231. "Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique"

¹⁴ M.R. Gama, R.G. da Costa Silva, C.H. Collins, C.B.G. Bottoli, *Trends Anal. Chem.* 37 (2012) 48. "Hydrophilic interaction chromatography"

¹⁵ T. Yoshida, *J. Biochem. Biophys. Met.* 60 (2004) 265. "Peptide separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography: a review"

¹⁶ W. Jian, R.W. Edom, Y. Xu, N. Weng, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 681. "Recent advances in application of hydrophilic interaction chromatography for quantitative bioanalysis"

¹⁷ B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 698. "HILIC methods in pharmaceutical analysis"

presentes: la fase acuosa inmóvilizada sobre la superficie y el grueso de la fase móvil, de naturaleza principalmente orgánica. Los compuestos polares muestran una mayor afinidad por la capa acuosa inmóvilizada que por la fase móvil dado que en la primera presentan mayor solvatación. Esta preferencia por la capa acuosa es el origen de la retención. La Figura 1.1 muestra, de forma esquemática, la naturaleza del mecanismo propuesto por Alpert.

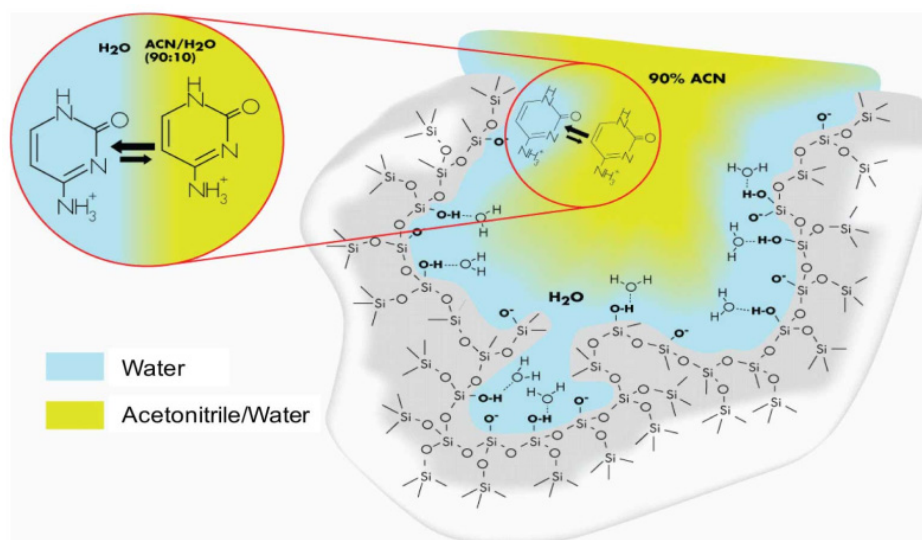


Figura 1.1. Mecanismo de retención por reparto de un compuesto polar (citosa) en una columna HILIC de sílice sin modificar (waters.com)

En estudios posteriores, reanalizando los resultados encontrados por otros autores en el pasado, Hemström e Irgum¹⁸ concluyeron que la retención de los compuestos en HILIC disminuye con el aumento del contenido en agua de la fase móvil debido a que, en las separaciones gobernadas por partición, el equilibrio de reparto del analito entre las dos fases depende de la solubilidad relativa y, al aumentar el contenido en agua de la fase móvil, esta se vuelve similar a la fase acuosa inmóvilizada. En conclusión, la retención en HILIC es directamente proporcional a la polaridad del analito e inversamente proporcional a la polaridad de la fase móvil.

¹⁸ P. Hemström, K. Irgum, J. Sep. Sci. 29 (2006) 1784. "Hydrophilic interaction chromatography"

Actualmente, el mecanismo de separación en HILIC aún está en discusión. Se han observado multitud de separación HILIC en las que están presentes procesos tanto de partición como de adsorción debidos a fuerzas intermoleculares (interacciones electrostáticas, enlace de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo e interacciones hidrofóbicas débiles). Estos mecanismos mixtos son especialmente relevantes para analitos que contienen más de un grupo funcional en sus estructuras.

Recientemente se han llevado a cabo más estudios para confirmar las interacciones que tienen lugar en las separaciones HILIC. Dinh et al.¹⁹ han evaluado el comportamiento que presentan columnas comerciales con diferentes grupos polares (catiónicos, aniónicos, neutros y zwitteriónicos) concluyendo que cada columna presenta interacciones específicas, basadas principalmente en procesos de adsorción. En todo caso, el mecanismo de retención en HILIC no depende solo de la fase estacionaria sino también de la naturaleza química del analito y de la composición de la fase móvil²⁰.

Es importante resaltar que, aunque el mecanismo mixto en HILIC está ampliamente aceptado, el mecanismo de partición se sigue considerando el principal fenómeno de la retención, tal como se propuso inicialmente²¹.

1.1.1.2. Fases móviles y estacionarias en HILIC

- *Fases estacionarias*

La primera generación de fases estacionarias para HILIC incluía sílice sin modificar y modificada con grupos aminopropilo⁵. La segunda generación, disponible desde los años 80, incluye sílice modificada con grupos diol y amida y aún hoy se aplica en separaciones HILIC¹². A finales de los 80 se introdujeron las fases estacionarias zwitteriónicas²². Estas están formadas por cadenas

¹⁹ N.P. Dinh, T. Jonsson, K. Irgum, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 5880. "Probing the interaction mode in hydrophilic interaction chromatography"

²⁰ B. Chauve, D. Guillarme, P. Cléon, J.L. Veuthey, J. Sep. Sci. 33 (2010) 752. "Evaluation of various HILIC materials for the fast separation of polar compounds"

²¹ D.V. McCalley, J. Chromatogr. A 1171 (2007) 46. "Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds?"

²² L.W. Yu, R.A. Hartwick, J. Chromatogr. Sci. 27 (1989) 176. "Zwitterionic Stationary Phases in HPLC"

carbonadas cortas con grupos cargados de forma positiva y negativa unidas a una base de sílice o a un esqueleto polimérico. Este tipo de fases estacionarias ha tenido una gran aceptación en HILIC y su uso sigue vigente²³.

La sílice es el soporte más utilizado para las fases estacionarias de HILIC. Puede encontrarse una amplia gama de grupos funcionales unidos químicamente a la superficie de la sílice. Algunos de los más utilizados son aminopropilo, amida, ciano y, principalmente, grupos hidroxilados. También es posible encontrar fases estacionarias formadas por carbohidratos, triazoles, tetrazoles y otros muchos grupos, con tal de que sean capaces de atraer moléculas de agua para formar la capa acuosa inmovilizada. El número de diferentes fases estacionarias disponibles se ha incrementado durante los últimos años, si bien solo algunas de ellas están disponibles comercialmente.

Las características químicas de la fase estacionaria influyen notablemente en la separación HILIC ya que el número y naturaleza de los grupos polares unidos a la sílice influyen notablemente en la formación de la capa acuosa. Además, la naturaleza química del grupo polar también influye en otros fenómenos de retención (enlace de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo, intercambio iónico, etc.)¹⁹. Generalmente, las interacciones polares aumentan según la siguiente secuencia: cianopropilo < diol < aminopropilo < sílice. Es decir, para un mismo analito, las columnas de sílice sin modificar presentan, habitualmente, mayores tiempos de retención¹⁰. Kawachi et al.,²⁴ tras llevar a cabo una serie de ensayos con analitos-prueba, dividen a las fases estacionarias de HILIC en dos grandes grupos: las fases fuertemente hidrofílicas (zwiteriónicas y amida) y las débilmente hidrofílicas (diol, triazol, amina y ciclodextrina).

El rápido desarrollo de HILIC en la última década ha conllevado la aparición de diferentes fases estacionarias comerciales. Sin embargo, estas son aún escasas siendo su variedad claramente inferior a la existente en RPLC. Además, el conocimiento de los mecanismos de

²³ Y. Guo, S. Gaiki, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 5920. "Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography"

²⁴ Y. Kawachi, T. Ikegami, H. Takubo, Y. Ikegami, M. Miyamoto, N. Tanaka, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 5903. "Chromatographic characterization of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases: Hydrophilicity, charge effects, structural selectivity, and separation efficiency"

retención que actúan en HILIC es aún limitado encontrándose diferencias significativas entre las diferentes fases estacionarias estudiadas. Por ello, diversos grupos han enfocado su investigación al desarrollo de nuevas fases estacionarias aplicables a HILIC. Las fases estacionarias no comerciales presentan buena selectividad y reproducibilidad aunque los procedimientos de preparación son, en algunos casos, complicados. En general, la síntesis se basa en derivatización de sílice, en uno o más pasos, introduciendo residuos polares de diversa naturaleza. En los últimos años también se ha propuesto la fabricación de columnas HILIC de base polimérica.

- *Fases móviles*

El contenido en agua de la fase móvil en HILIC, que suele variar entre un 5% y un 40%, es de vital importancia¹¹. Un contenido mínimo de un 2% es esencial para la formación de la capa acuosa inmovilizada sobre la fase estacionaria pero, como se ha indicado anteriormente, un alto contenido reduce drásticamente la retención hidrofílica de los analitos.

En cuanto al componente orgánico de la fase móvil, pueden utilizarse muchos disolventes orgánicos polares siendo el acetonitrilo el que muestra las características más favorables lo que le convierte en el disolvente más utilizado. El acetonitrilo presenta un poder de elución (ϵ_0) de 0.65 menor que el del metanol (ϵ_0 : 0.95), el del etanol (ϵ_0 : 0.89) o el del isopropanol (ϵ_0 : 0.82), lo que conlleva mayores tiempos de retención. La acetona (ϵ_0 : 0.58) posee un poder de elución similar al acetonitrilo pero presenta alta absorción en ultravioleta para valores < 330 nm y, además, reduce significativamente la sensibilidad en espectrometría de masas.

Otra gran ventaja del acetonitrilo, frente a otros disolventes orgánicos, es su incapacidad para formar enlaces de hidrógeno lo que evita la posible competencia con el agua por los sitios activos de la fase estacionaria. La sustitución del agua por disolvente orgánico en la fase

acuosa inmovilizada hace que esta sea más hidrofóbica, reduciendo la retención de los analitos polares²⁵.

La presencia de tampones y otras sales en la fase móvil puede tener una influencia importante en la separación HILIC. En función del pH, los analitos pueden ionizarse lo que no solo les hace más polares incrementándose su retención, sino que también les hace susceptibles de sufrir interacciones electrostáticas. Además, dichas interacciones electrostáticas dependen fuertemente de la concentración de sales, debido al efecto competitivo de estas por los sitios activos de la fase estacionaria, por lo que no solo la sal presente sino también su concentración pueden tener un efecto importante sobre la separación HILIC²⁶.

²⁵ Z. Hao, B. Xiao, N. Weng, J. Sep. Sci. 31 (2008) 1449. *“Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC)”*

²⁶ E. Rodríguez-Gonzalo, D. García-Gómez, R. Carabias-Martínez, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 3994. *“Study of retention behaviour and mass spectrometry compatibility in zwitterionic hydrophilic chromatography for the separation of modified nucleosides and nucleobases”*

1.2. Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)

El acoplamiento de la cromatografía líquida con la espectrometría de masas (LC-MS) es relativamente reciente habiéndose desarrollado a lo largo de los últimos 30 años. El desarrollo instrumental fue llevado a cabo principalmente por Arpino²⁷, Ishii²⁸, Henion²⁹ y Fenn³⁰.

Como técnica híbrida, la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas mantiene y aún a las principales ventajas de las dos poderosas técnicas de las que proviene. De la cromatografía líquida (LC) toma la compatibilidad con matrices líquidas y la alta eficiencia y selectividad en la separación -el 80 % de las especies orgánicas conocidas pueden separarse por LC³¹-. De la espectrometría de masas (MS) toma su capacidad para discernir estructuras, masas moleculares, fórmulas empíricas y su elevada selectividad y sensibilidad, así como su gran margen lineal en el análisis cuantitativo.

Sin embargo, presenta como principales desventajas su alto coste y el requerimiento de personal cualificado, todo ello derivado de la dificultad práctica a la hora de combinar ambas técnicas. Dichas dificultades son principalmente tres:

- La incompatibilidad de los caudales, al tener que introducir 1 mL min⁻¹ de efluente de la columna en el sistema de alto vacío del espectrómetro de masas (un caudal líquido acuoso de 1 mL min⁻¹ equivale aproximadamente a un caudal gaseoso de 3000 mL min⁻¹ a 350°C y 1 atm).
- La incompatibilidad de la fase móvil, al ser frecuente en cromatografía líquida el uso de aditivos no volátiles (tampones, etc.).
- La ionización de analitos no volátiles y térmicamente lábiles.

²⁷ P.J. Arpino, G. Guiochon, P. Krien, G. Devant, J. Chromatogr. 185 (1979) 529. "Optimization of the instrumental parameters of a combined liquid chromatograph-mass spectrometer, coupled by an interface for direct liquid introduction : I. Performance of the vacuum equipment"

²⁸ S. Tsuge, M.V. Novotny, D. Ishii. Elsevier, Amsterdam, 1985, p. 217. "Microcolumn Separations"

²⁹ A.P. Bruins, T.R. Covey, J.D. Henion, Anal. Chem. 59 (1987) 2642. "Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry"

³⁰ J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, Mass Spectrom. Rev. 9 (1990) 37. "Electrospray ionization-principles and practice"

³¹ L.R. Snyder, J.J. Kirkland. Wiley, New York (1991). "Introduction to Modern Liquid Chromatography"



Figura 1.2. Metáfora de Arpino para reflejar la incompatibilidad entre LC y MS

Para ilustrar dichas dificultades, Arpino³² desarrolló la muy conocida metáfora del amor entre un pájaro y un pez, especies totalmente incompatibles. La cromatografía líquida, representada por el pez, es una técnica de separación en fase líquida incompatible con los gases. La espectrometría de masas, representada por el pájaro, es una técnica muy poderosa de separación de iones en fase gaseosa cuyas condiciones operativas son incompatibles con los líquidos.

La solución a los problemas planteados por estas dificultades conllevó el desarrollo de las interfaces LC-MS que, continuando la metáfora, resultan ser el nexo de unión entre el pez y el pájaro.

1.2.1. Interfaces LC-MS

El desarrollo de las interfaces LC-MS ha sufrido importantes cambios estratégicos a lo largo de su corta historia. Inicialmente, se intentó mimetizar las interfaces usadas con éxito en el acoplamiento entre la cromatografía de gases y la espectrometría de masas. Así, el disolvente era eliminado rápidamente y los analitos vaporizados antes de producirse la ionización por alguno de los mecanismos clásicos de la MS, ionización electrónica (*EI*, *Electron Ionization*) o química (*CI*, *Chemical Ionization*) principalmente. Entre estas primeras interfaces, ahora ya obsoletas, la que más desarrollo y aplicación alcanzó fue la cinta móvil (*moving-belt*) desarrollada en 1977 por McFadden³³. Consistía en una cinta sin fin que transportaba el efluente desde la columna cromatográfica a la fuente de iones del espectrómetro de masas. Durante el transporte, la fase móvil se eliminaba por calentamiento a baja presión. Al finalizar la interfaz el analito se encontraba en fase gaseosa, susceptible de ser ionizado por ionización

³² P.J. Arpino, *Biological Mass Spectrometry*, 9 (1982) 176. "Trying to arrange a difficult marriage: A report on the workshop on liquid chromatography mass spectrometry"

³³ W.H. McFadden, H.L.Schwartz, S.Evans.J. *Chromatogr.* 122 (1976) 389. "Direct analysis of liquid chromatographic effluents"

electrónica o química. Fue la primera interfaz disponible comercialmente.

Pronto se mostró que el paso determinante que limitaba la aplicabilidad del acoplamiento era la vaporización de los analitos. En este sentido, el desarrollo de interfaces en las que se produce una desolvatación muy suave al vaporizarse pequeñas gotas del disolvente se considera que fue el paso crucial para el éxito final del acoplamiento LC-MS³⁴. Este hecho se vio ratificado por el éxito del termospray (*TSP*, *ThermoSPray*). Esta interfaz, desarrollada por Vestal et al. a finales de los 70³⁵, se basa en la generación de un chorro de vapor y pequeñas gotas líquidas en un tubo vaporizador caliente. La nebulización ocurre por la disrupción causada en el líquido por el vapor formado. La ionización se lleva a cabo de forma similar a la ionización química clásica, en la que interviene el tampón volátil disuelto en la fase móvil. El termospray fue la interfaz más utilizada durante muchos años, período en el cual se produjo la expansión y consolidación del acoplamiento LC-MS.

La fase móvil pasó así de ser el portador activo de LC que debía ser eliminado rápida y exhaustivamente para transferir correctamente los analitos a estado gaseoso, a ser un constituyente esencial del proceso de ionización. En todo caso, la fase móvil continuaba imponiendo fuertes demandas y restricciones en la instrumentación, especialmente por problemas relacionados con los equipos de vacío y la compatibilidad con diferentes disolventes. Las principales interfaces desarrolladas en este sentido, instaladas de forma rutinaria, son las que realizan la introducción de la muestra en el espectrómetro de masas a presión atmosférica. Genéricamente se denominan interfaces de ionización a presión atmosférica (*API*, *Atmospheric Pressure Ionization*).

³⁴ P.J. Arpino, O. Guiochon, *J. Chromatogr.* 251 (1982) 153. "Optimization of the instrumental parameters of a combined liquid chromatograph-mass spectrometer, coupled by an interface for direct liquid introduction: III. Why the solvent should not be removed in liquid chromatographic-mass spectrometric interfacing methods"

³⁵ C.R. Blakey, M.J. McAdams, M.L. Vestal, *J. Chromatogr.* 158 (1978) 261. "Crossed-beam liquid chromatograph—mass spectrometer combination"

1.2.1.1. Interfaces de ionización a presión atmosférica (API)

Knewstubb y Sugden fueron los primeros en describir estas interfaces a presión atmosférica para espectrometría de masas en 1958, pero fueron Horning y Carroll^{36,37} los que las desarrollaron en los años 70, consiguiendo que fueran comercializadas en los 80. En estas, tanto la nebulización como la ionización se producen a presión atmosférica.

Frente a las interfaces anteriormente descritas, la introducción de muestras a presión atmosférica requiere de importantes cambios instrumentales. En un analizador de masas convencional, equipado con una bomba turbomolecular con una velocidad de bombeo efectivo (S_b) de $0.3 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, el vacío alcanzado se mantiene en torno a 10^{-8} atm (P_b). La cantidad máxima de gas (Q) que se puede introducir en el instrumento a través de un orificio artificial puede calcularse a través de la fórmula:

$$Q = S_b \cdot P_b$$

Para un sistema como el descrito, se deduce un caudal máximo admitido de aproximadamente $200 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$ provenientes de una región a presión atmosférica, lo que se traduce en un caudal líquido máximo de $0.1 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$. Es por lo tanto necesario introducir sistemas de vacío adicionales. En teoría una etapa de vacío intermedia con un S_b de $20 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ que mantenga una presión de 0.01 atm es suficiente para inyectar un caudal líquido de hasta 1 mL min^{-1} . Sin embargo, existen razones prácticas que aconsejan instalar una segunda etapa de vacío: la evaporación incompleta del efluente, que redundaría en una presión mayor y la transmisión de los analitos ya que dos cámaras permiten instalar conos de muestreo mayores.

La evolución de esta instrumentación llevó al desarrollo de diferentes técnicas para ionizar en fase líquida tales como la ionización química a presión atmosférica, la fotoionización a presión atmosférica y la ionización por electrospray.

³⁶ E.C. Horning, M.G. Horning, D.I. Carroll, I. Dzidic, R.N. Stillwell, Anal. Chem. 45 (1973) 936. "New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure"

³⁷ D.I. Carroll, I. Dzidic, R.N. Stillwell, M.G. Horning, E.C. Horning, Anal. Chem. 46 (1974) 706. "Subpicogram detection system for gas phase analysis based upon atmospheric pressure ionization (API) mass spectrometry"

- *Ionización química a presión atmosférica (APCI, Atmospheric Pressure Chemical Ionization)*³⁸

Esta técnica está basada en la ionización química por reacciones ion-molécula o de captura de electrones en una fuente de iones a presión atmosférica. Utilizando la sonda de APCI, el líquido que procede del LC se nebuliza y evapora rápidamente por la acción de una temperatura elevada (300-500 °C) pasando los analitos también a fase gaseosa. Esta fracción eluida vaporizada del cromatógrafo se fuerza a pasar a través de la fuente de ionización química a presión atmosférica con una pequeña corriente de nitrógeno caliente (10 mL min⁻¹). Los electrones primarios de una fuente radioactiva (⁶³Ni) o un descargador de corona (2-6 kV) interaccionan tanto con el gas portador de nitrógeno como con el disolvente, produciendo iones reactivos, los cuales ionizan el analito. Finalmente, los iones se transfieren a través de un pequeño orificio (25 a 75 µm de diámetro interno) al analizador de masas. Generalmente, la sonda de APCI se utiliza para el análisis de moléculas de menos de 2000 u y de baja a moderada polaridad. Estos analitos deben poseer además cierta volatilidad y no ser excesivamente termolábiles³⁹.

- *Fotoionización a presión atmosférica (APPI, Atmospheric Pressure Photoionization)*

En esta técnica de ionización, desarrollada por Bruins⁴⁰, el flujo líquido de salida se evapora por nebulización a alta temperatura, de forma similar a APCI. Se provoca entonces la ionización con un haz de fotones emitidos por una lámpara ultravioleta. Se han descrito dos tipos de APPI, la directa y aquella en la que se necesita de un compuesto dopante. La APPI directa sólo es aplicable cuando el primer potencial de ionización del analito es inferior a la energía del fotón. En la APPI indirecta, son las moléculas dopantes las que se ionizan mediante la radiación ultravioleta, transfiriendo posteriormente la

³⁸ D.I. Carroll, I. Dzidic, E. C. Horning, R.N. Stillwell, Appl. Spectrosc. Rev. 17 (1981) 337. "Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry"

³⁹ O. Quintela, A. Cruz, M. Concheiro, A. De Castro, M. López-Rivadulla, Rev. Toxicol. 22 (2005) 7. "Metodología LC-MS. Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología"

⁴⁰ D.B. Robb, T.R. Covey, A.P. Bruins, Anal. Chem. 72 (2000) 3653. "Atmospheric Pressure Photoionization: An Ionization Method for Liquid Chromatography-Mass Spectrometry"

ionización a los analitos. Este modo de ionización se encuentra aún en expansión y permite determinar moléculas apolares, compuestos difíciles de ionizar en otras interfaces. Recientemente, a partir de APPI, se ha desarrollado la interfaz APLI (*Atmospheric Pressure Laser Ionization*) en la que la lámpara ultravioleta de APPI es sustituida por un láser. En comparación con ésta permite la ionización de moléculas aún de menor polaridad y mayor masa molecular.

- *Ionización por electrospray (ESI, Electrospray Ionization)*

La primera aplicación del electrospray en espectrometría de masas se remonta a las investigaciones de Dole en 1968⁴¹, dándose además la primera explicación lógica del fenómeno de electrospray, el modelo de cargas residuales (*CRM, Charges Residue Model*). Pero fue en los años 80 cuando surgió el desarrollo de la ionización por electrospray, como respuesta a uno de los mayores desafíos de la época, encontrar la forma de analizar compuestos de alto peso molecular y termolábiles. Esta técnica de ionización se basa en la generación, a partir de la solución de analitos, de una nube formada por diminutas gotas cargadas eléctricamente, que es sometida a la acción de un fuerte campo eléctrico. Las diferentes mejoras introducidas con el tiempo han conducido al método de ionización que hoy se conoce como ESI, y que llevó a John B. Fenn^{42,43} a compartir con Tanaka el Premio Nobel de Química en 2002.

El mecanismo por el que se produce la nebulización y la ionización en electrospray sigue siendo en la actualidad un importante campo de investigación. El conocimiento de los fenómenos físicos implicados permitirá mejorar aún más la técnica en términos de sensibilidad. Para explicar los fenómenos que tienen lugar en electrospray existen dos modelos en constante controversia: el modelo de cargas residuales de Dole⁴¹ (1968) y el modelo de evaporación de

⁴¹ M. Dole, L.L. Mack, R.L. Hines, R.C. Mobley, L.D. Ferguson, M.B. Alice, *J. Chem. Phys.* 49 (1968) 2240. "*Molecular Beams of Macroions*"

⁴² J.B. Fenn. (Nobel Lecture) "*Electrospray Wings for Molecular Elephants*"

⁴³ M. Yamashita, J.B. Fenn, *J. Phys. Chem.* 88 (1984) 4451. "*Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme*"

iones de Iribarne y Thomson⁴⁴ (1976). Posiblemente ambos modelos son válidos dependiendo de los diferentes analitos y disolventes. En ambos modelos el primer paso es la nebulización del líquido en pequeñas gotas cargadas, que después disminuyen de tamaño debido a la evaporación, con el consecuente aumento de carga eléctrica en la superficie de la gota, dando lugar a la ionización. Es en este último paso donde los dos modelos difieren. En el modelo de evaporación de iones, los iones pasan directamente a la fase gaseosa cuando las gotas son lo suficientemente pequeñas y cargadas mientras, en el modelo de cargas residuales, la tensión superficial no puede vencer la repulsión de los iones (alcanzándose el límite de inestabilidad de Rayleigh) produciéndose la explosión de la gota. Se consiguen así gotas de pequeño tamaño con un solo ion, que pasa a fase gaseosa por evaporación del disolvente⁴⁵. Este último es el modelo más aceptado y se muestra en la Figura 1.3.

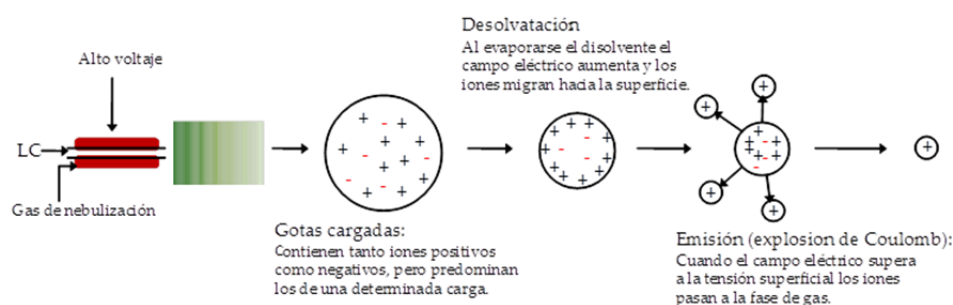


Figura 1.3. Representación esquemática de una interfaz de ionización por electrospray (ESI).

En la práctica, el proceso de ionización en el electrospray ocurre por un mecanismo más complejo ya que, tras la evaporación de los iones preformados en fase líquida, se producen reacciones ion-molécula en fase gaseosa que juegan un papel importante en el proceso de ionización.

⁴⁴ J.V. Iribarne, B.A. Thomson, J. Chem. Phys. 64 (1976) 2287. "On the evaporation of small ions from charged droplets"

⁴⁵ W.M.A. Niessen. J. Chromatogr. A 856 (1999) 179. "State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry"

Las interfaces ESI utilizadas actualmente pertenecen a una segunda generación desarrollada y comercializada en 1993. Presentan mejoras en tres partes del sistema:

- En la aguja del espray, al incorporar un sistema de nebulización neumática que complementa a la nebulización por electropray.
- En el sistema del cono de muestreo, al introducir sistemas de transferencia más eficaces como un capilar calentado.
- En los dispositivos de recogida y enfoque de iones, reemplazando las lentes convencionales por sistemas cuadropolares, hexapolares u octapolares.

Esta segunda generación permite usar caudales, procedentes de la columna cromatográfica, de hasta 1 mL min^{-1} . En la Figura 1.4 se muestra esquemáticamente una interfaz ESI, en la configuración *on-axis*. Esta configuración es la más simple y en ella el espray se genera en la dirección de la entrada de los iones al espectrómetro de masas, pudiéndose presentar problemas de contaminación. En la configuración *Z-spray*, el espray está dirigido en dirección perpendicular al orificio de entrada del espectrómetro de masas con lo que se reduce la entrada de componentes no ionizables y poco volátiles de la matriz. Así, las interfaces *Z-spray* presentan una eficacia de vaporización superior a la de la configuración *on-axis* y permiten disminuir los problemas de supresión de la ionización.

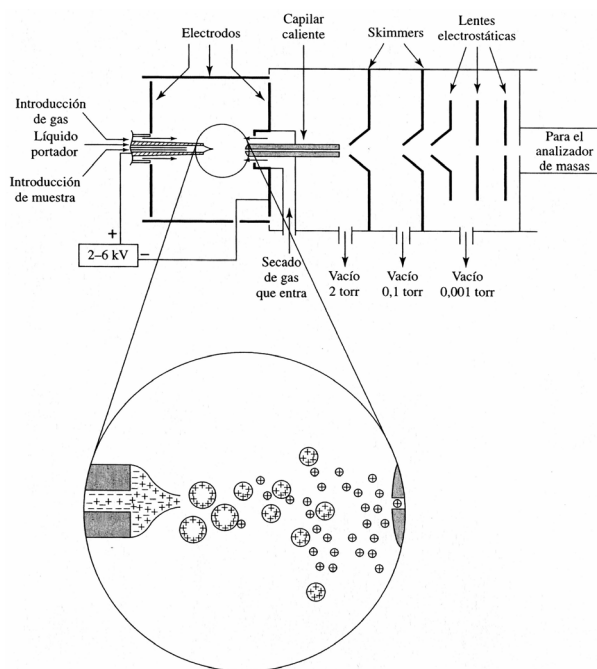


Figura 1.4. Representación esquemática de una interfaz LC-MS ESI de segunda generación

Es importante señalar que ninguna de las interfaces citadas proporciona una ionización universal. En este sentido, la carencia más importante es la ionización de moléculas apolares, hecho sólo en parte solventado por la interfaz APPI. En la Figura 1.5 se muestra el uso relativo de las diferentes interfaces API en trabajos de investigación⁴⁶. En la Figura 1.6 se muestran las diversas interfaces disponibles comercialmente para LC-MS y su intervalo de aplicabilidad en cuanto a masa molecular y polaridad.

⁴⁶ M. Holcapek, R. Jirásko, M. Lisa, J. Chromatogr. A 1259 (2012) 3. "Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques"

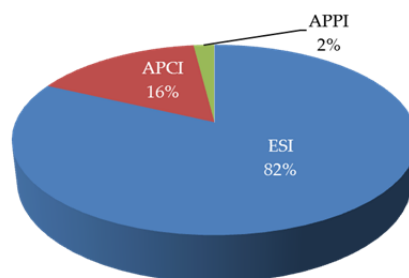


Figura 1.5. Uso relativo de las diferentes técnicas de ionización a presión atmosférica (API) en LC-MS. Búsqueda en *Web of Science* (1 de marzo de 2012)

Como se puede observar, las interfaces más utilizadas son APCI y ESI. En ellas, las especies detectadas más frecuentemente son iones moleculares protonados $[M+H]^+$ para moléculas básicas o iones moleculares desprotonados $[M-H]^-$ para moléculas ácidas. Además de estos iones, es habitual la formación de aductos con otras especies presentes en el medio como iones sodio, potasio, amonio o cloruro. Aunque la interfaz ESI es la más indicada para compuestos iónicos o muy polares y APCI para los menos polares, hay un amplio margen de polaridades en las que ambas interfaces pueden funcionar aceptablemente; en estos casos la elección de una u otra va a depender de la sensibilidad alcanzada en cada caso específico. Como norma general ESI suele dar lugar a determinaciones más sensibles.

En todo caso cabe destacar que, en oposición a lo que ocurre en GC-MS, la eficiencia de la ionización depende de las diferencias entre interfaces y otros factores como la composición de la fase móvil o el voltaje de cono. Por ello, en LC-MS, resulta de poca utilidad el uso de librerías de espectros a la hora de comparar resultados.

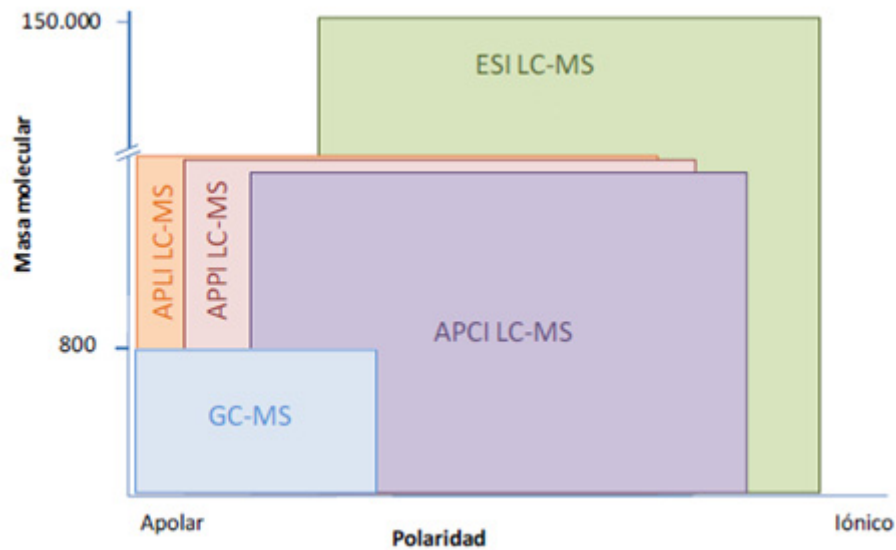


Figura 1.6. Aplicabilidad de diferentes interfaces de LC-MS en función de la polaridad y masa molecular del analito en estudio

1.3.1. Analizadores de espectrometría de masas

El analizador es la parte esencial de un espectrómetro de masas y de él dependen en mayor grado las características más importantes del sistema como la resolución y la sensibilidad. El principio físico en el que se basa su diseño y forma de dispersar los iones y después focalizarlos en función de la relación masa/carga (m/z) es lo que diferencia a los instrumentos de espectrometría de masas. Los analizadores más utilizados son: cuadrupolo (Q , *Quadrupole*), trampa de iones (IT , *Ion Trap*), tiempo de vuelo (TOF , *Time-Of-Flight*), resonancia iónica en ciclotrón con transformada de Fourier ($FT-ICR$, *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*) y orbitrap. Los principales parámetros analíticos que distinguen a estos equipos son la resolución y la masa exacta. La resolución se define como la anchura a media altura ($FWHM$, *Full Width at Half Maximum*) y marca la capacidad del analizador para distinguir entre dos picos con m/z similares. La exactitud (MA , *Mass Accuracy*) es definida como la diferencia relativa (ecuación 1) entre el valor de m/z experimental (m/z_{exp}) y verdadero (m/z_{ver}), expresada habitualmente en partes por millón (ppm).

$$\frac{m/z_{exp} - m/z_{ver}}{m/z_{ver}} \cdot 10^6 \quad (1)$$

Así, por ejemplo, para una masa teórica de 348.4560, un resultado experimental de 348.4600 tendría una exactitud de 11.5 ppm y uno de 348.4550 de -3 ppm.

Otras características analíticas a considerar son el intervalo de masas, la linealidad y el coste.

- *Analizador cuadrupolo (Q)*

Actualmente, este diseño de espectrómetro de masas es el más extendido, debido a que es simple, ofrece reproducibilidad, precisión y sensibilidad para la cuantificación, además de un precio razonable.

Un cuadrupolo consiste en cuatro barras conductoras dispuestas en paralelo. A las barras situadas en posición opuesta se les aplica una corriente continua (DC) y un voltaje de radiofrecuencia (RF). Los iones avanzan a lo largo del analizador siguiendo trayectorias oscilantes, siendo repelidos y atraídos por las barras, dependiendo directamente de su relación m/z. Así, el cuadrupolo actúa como filtro de masas, de forma que de todos los iones provenientes de la fuente sólo se transfieren al detector los seleccionados, con una resolución de 1 u. Permite analizar relaciones m/z en el intervalo 10-3000 u con una exactitud en torno a 100 ppm. Su velocidad de adquisición ronda los 10 Hz y el intervalo de linealidad es, aproximadamente, de 10⁶. Cabe destacar, como principal ventaja, su bajo coste en comparación con otros analizadores.

Recientemente se ha desarrollado una modificación del cuadrupolo en el que las barras presentan forma hiperbólica. Esta configuración permite mejorar la sensibilidad, la resolución (0.1 u) y la exactitud (≈ 5 ppm). Como desventaja, presenta una velocidad de adquisición inferior (5 Hz).

- *Trampa iónica (IT)*

Wolfgang Paul introdujo la trampa iónica como analizador en un sistema de espectrometría de masas en 1960⁴⁷, y fue galardonado con el premio Nobel de física en 1989 por sus trabajos en este campo.

La trampa iónica está formada por dos electrodos metálicos hiperbólicos enfrentados y un electrodo hiperbólico de anillo en la región intermedia, a los que se aplican campos eléctricos de corriente alterna y continua (Figura 1.7).

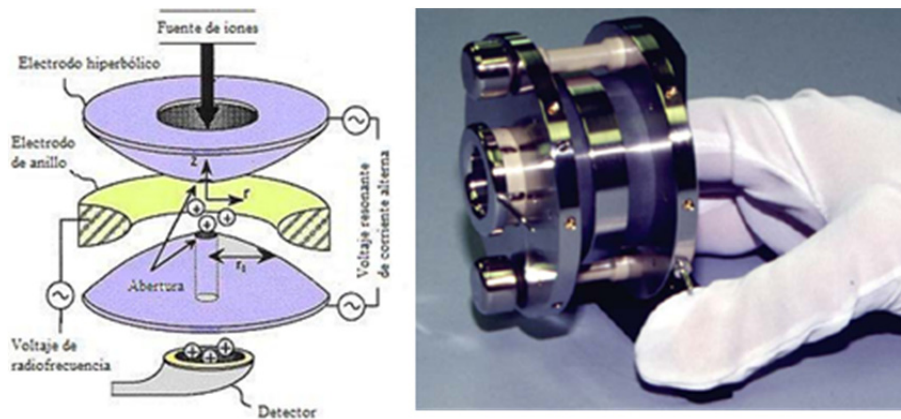


Figura 1.7. Trampa iónica tridimensional (Trampa de Paul)

Los iones son atrapados en el espacio existente entre los tres electrodos por campos eléctricos de corriente alterna (oscilantes) y de corriente continua (no oscilantes). El voltaje de radiofrecuencia de corriente alterna se hace oscilar entre los dos electrodos hiperbólicos si se desea excitar los iones. El voltaje de corriente alterna director se aplica en el electrodo de anillo. Los iones son inicialmente arrastrados axialmente (de arriba a abajo) mientras que son empujados radialmente. Posteriormente se produce el fenómeno inverso siendo los iones empujados axialmente y arrastrados radialmente. Bajo estas fuerzas los iones adquieren un movimiento complejo formando una nube que oscila entre un estado alargado y estrecho y otro corto y ancho (figuras de

⁴⁷ W. Paul and H. Steinwedel, US Patent 2 939 952 (1960). "Apparatus for separating charged particles of different specific charges"

Lissajous). La introducción de un gas amortiguador que facilita el confinamiento de los iones (He a 1 mm Hg) permitió la introducción de las primeras trampas comerciales desarrolladas por Stafford a mediados de los 80⁴⁸. Junto a este, el hecho determinante que permitió el éxito comercial de las trampas iónicas fue el control de las líneas de estabilidad-inestabilidad. Esto permitió construir dispositivos con una resolución en relaciones masa/carga en torno a una unidad (0.3-1 u) lo que permite aislar un ion, fragmentarlo y expulsar los fragmentos selectivamente hacia el detector. Permite analizar relaciones m/z en el intervalo 50-5000 u, su velocidad de adquisición ronda los 10 Hz y el intervalo de linealidad es, aproximadamente, de 10⁵. En comparación con otros analizadores su coste es moderado.

Posteriormente a la trampa de Paul (3D) se desarrolló la trampa iónica lineal (*LIT, Linear Ion Trap*)⁴⁹ formada por cuatro electrodos paralelos situados de forma similar a los electrodos del cuadrupolo. Las principales ventajas de esta configuración son una mayor capacidad de confinamiento de iones, velocidades de adquisición más rápidas y mayor simplicidad para su construcción, sin que se produzca deterioro en ninguno de los demás parámetros analíticos.

- *Analizador de tiempo de vuelo (TOF)*

En un analizador de tiempo de vuelo los iones se aceleran a la salida de la fuente de ionización mediante un campo eléctrico. Así, los iones adquieren una distribución de energía cinética proporcional a su relación m/z, usualmente corregida por uno o dos reflectrones. La separación de los iones se realiza en función del tiempo que tardan en alcanzar el detector.

Estos analizadores presentan una alta resolución (0.005 – 0.1 u) y elevada exactitud en la medida de las masas moleculares (<1-5 ppm) y permiten trabajar con intervalos de masas más amplios (50-20000 u). Además, la medida en un analizador de tiempo de vuelo se realiza

⁴⁸ G.C. Stafford, P.E. Kelley, J.E.P. Syka, W.E. Reynolds, J.F.J. Todd, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 60 (1984) 85. “Recent improvements in and analytical applications of advanced ion trap technology”

⁴⁹ J.C. Schwartz, M.W. Senko, J.E.P. Syka, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13 (2002) 659. “A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer”

mucho más rápidamente que en un cuadrupolo (50-200 Hz). Sin embargo, su precio es relativamente elevado.

La elevada resolución y exactitud del TOF permite obtener medidas con masa exacta. Sin embargo, debido a la variabilidad que presenta este tipo de instrumentos con respecto a parámetros como, por ejemplo, la temperatura, es necesario, además de la calibración diaria, que el equipo esté en constante calibración. Esto se consigue mediante la adición de un compuesto de masa conocida (*lock mass*) simultánea a la muestra en la interfaz. La masa del analito en estudio se corrige posteriormente en función de la masa del *lock mass* lo que permite obtener elevadas exactitudes pudiéndose asignar una fórmula molecular concreta a cada ion.

- *Analizador de resonancia iónica en ciclotrón (ICR)*

El FT-ICR fue propuesto por primera vez por Comisarow y Marshall en 1974⁵⁰. En este analizador los iones son atrapados en una trampa de Penning (un campo magnético con trampas eléctricas) donde son excitados por un campo eléctrico oscilante ortogonal al campo magnético. Una vez que la excitación es eliminada los iones se encuentran rotando en su frecuencia ciclotrónica característica, formando paquetes de iones. Dichos iones inducen una corriente al pasar cerca de un par de electrodos que actúan como detector. La señal resultante se denomina señal del decaimiento libre de inducción (*FID*, *Free Induction Decay*) o transiente y consiste en una superposición de sinusoides que, al aplicarle la transformada de Fourier, resulta en el espectro de masas.

FT-ICR se diferencia de los demás analizadores de MS en que los iones no son detectados al golpear el detector sino al pasar cerca de este. Así, los iones no son detectados en diferentes lugares o a diferentes tiempos sino que la detección es simultánea. Este hecho conlleva una gran mejora en la relación señal-ruido de acuerdo con la ventaja de Fellgett o multiplex.

⁵⁰ M.B. Comisarow, A.G. Marshall, Chem. Phys. Lett. 25 (1974) 282. “*Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy*”

Los equipos de ICR presentan una muy elevada resolución (0.00002 u) y exactitud (< 0.25 ppm). El intervalo de trabajo es de 50-10000 u y el de linealidad de 10^4 . Su velocidad de adquisición es baja (0.5-2 Hz) y, como principal desventaja, se puede decir que su precio es muy elevado.

- *Orbitrap*

En el año 2000, Makarov⁵¹ propuso una variación de la trampa iónica de Kingdon denominada orbitrap. El orbitrap consta de un electrodo exterior con forma de barril y de otro interior con forma de huso que aplica un campo electrostático. En el orbitrap los iones son atrapados por la atracción electrostática del electrodo interno, compensado por la fuerza centrífuga. Los iones adquieren una trayectoria de hélice que sólo depende de su m/z. La detección es llevada a cabo por el electrodo exterior en el que los iones inducen una corriente que actúa como señal. En este sentido el orbitrap es similar al ICR siendo la principal diferencia que en el orbitrap no existe campo magnético. Su resolución (0.001-0.002 u) y exactitud (<1 ppm) son elevadas. Permite trabajar con un intervalo de masas de 50 a 40000 u, a una velocidad de adquisición de 1 a 5 Hz y con un intervalo de linealidad de hasta 10^3 . Es esta su principal desventaja junto con su elevado coste, mayor incluso que para ICR.

1.4.1. Espectrometría de masas en tándem

Las fuentes de ionización desarrolladas para el acoplamiento LC-MS, ESI y APCI principalmente, son fuentes muy blandas, lo que equivale a que para la gran mayoría de los analitos se genera un único ion, correspondiente a la molécula completa ($[M+H]^+$; $[M-H]^-$, $[M+Na]^+$...). Al no haber fragmentación, se obtiene información útil sobre la masa del compuesto, pero existe una carencia de información estructural necesaria para asegurar que la señal obtenida corresponde a un cierto analito y no a otro compuesto isobárico que podría contener la

⁵¹ A. Makarov, Anal. Chem. 72 (2000) 1156. "Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis"

muestra analizada. Para obtener dicha información y aumentar la especificidad de las determinaciones cuantitativas se pueden combinar varios analizadores de masas, en el tiempo o en el espacio, dando lugar a la espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

La espectrometría de masas en tándem (comúnmente abreviada como tándem MS o MS/MS) consiste en la realización de análisis de masas consecutivos entre los cuales se intercala una etapa de fragmentación de la molécula. En la Figura 1.8 se muestra esquemáticamente un proceso general de tándem MS. En primer lugar se produce la generación no selectiva de iones en la fuente (ESI, APCI, etc.). Todos los iones formados son conducidos al primer analizador de masas que selecciona los iones precursores deseados. Éstos son entonces conducidos a la celda de colisión donde son fragmentados. Así se produce una colección de iones producto (fragmentos de los iones precursores) que son posteriormente separados en el segundo analizador para ser, finalmente, registrados en el detector.

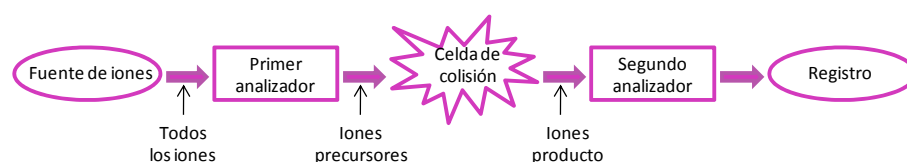


Figura 1.8. Proceso general de tándem MS

La fragmentación de los iones en tándem MS se lleva a cabo en la celda de colisión. A los iones que alcanzan esta etapa 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, lo que provoca la ruptura del ion. Habitualmente se utilizan como gases de colisión helio, argón, xenón o nitrógeno.

En cuanto a la instrumentación en espectrometría de masas en tándem pueden distinguirse dos grandes grupos de equipos:

- 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.

Así, en *tándem MS* en el espacio los diferentes elementos individuales (conectados a alto vacío) pueden ser sectores magnéticos, cuadrupolos, o tiempos de vuelo. Sin embargo, en *tándem MS* en el tiempo, se requiere que los iones permanezcan atrapados en una única región del espacio lo que conlleva la utilización de una trampa iónica, orbitrap o un equipo de resonancia ciclotrónica de iones (ICR-MS).

El equipo de masas en el espacio más habitual y sencillo es el triple cuadrupolo (QqQ). Permite realizar cualquiera de las modalidades existentes, todas ellas limitadas a una única etapa de fragmentación (MS^2). Se utiliza, principalmente, en la modalidad SRM donde presenta muy alta sensibilidad. Sin embargo, para asegurar la confirmación de los analitos es necesario, habitualmente, seguir al menos dos transiciones diferentes. Recientemente se ha evaluado la capacidad de un QqQ con cuadrupolos hiperbólicos⁵². Este equipo permite trabajar con la alta sensibilidad habitual del QqQ mejorando, además, los parámetros de resolución (Q_1 : 0.1 u; Q_2 : 0.7 u) y exactitud (≈ 3 ppm).

Otra configuración del sistema QqQ es aquella en la que el último cuadrupolo del sistema QqQ es sustituido por un analizador de masas de alta resolución como, por ejemplo, un tiempo de vuelo (QqTOF). Se consigue así alta resolución y exactitud aunque se reduce la sensibilidad y el intervalo de linealidad. Al igual que el QqQ permite realizar cualquiera de las modalidades existentes, todas ellas limitadas a una única etapa de fragmentación.

⁵² O. Nuñez, H. Gallart-Ayala, I. Ferrer, E. Moyano, M.T. Galcerán, J. Chromatogr. A 1249 (2012) 164. "Strategies for the multi-residue analysis of 100 pesticides by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry"

El equipo de masas en el tiempo más habitual es la trampa iónica (IT). Sólo permite realizar barridos de iones producto y seguimientos de reacción múltiple, eso sí, con tantas etapas de fragmentación como se desee (MS^n). También son equipos de MS/MS en el tiempo el orbitrap y el ICR.

Finalmente, se han desarrollado equipos híbridos que permiten realizar análisis de MS en tándem tanto en el espacio como en el tiempo. El más conocido es el qTRAP, de Applied Biosystems, que está basado en la sustitución del tercer cuadrupolo por una trampa de iones lineal (QqLIT). La Tabla 1.1 muestra los espectrómetros de masas en tándem más habituales y sus principales características.

Tabla 1.1. Espectrómetros de masas en tándem utilizados más frecuentemente para el análisis de moléculas orgánicas a nivel de trazas⁵³

	QqQ	IT	QqLIT	QqTOF	FT-ICR	Orbitrap
Intervalo de masas	++	+++	++/+++	+++	++++	+++/++++
Resolución	+	++	++	++/+++	++++	+++
Intervalo lineal	++++	+++	+++	++/+++	++	+/++
Exactitud	+	+	+	+++	++++	+++
Velocidad de adquisición	+++	++	+++	++++	+	+/++
Coste	++/+++	++	+++	+++	++++	++++

+: Bajo; ++: moderado; +++: alto; ++++: muy alto

La selección del equipo de MS/MS depende de los objetivos del análisis, presentando cada uno sus ventajas y limitaciones. QqQ presenta una elevada selectividad y sensibilidad en modo SRM pero, sin

⁵³ M. Farré, L. Kantiani, M. Petrovic, S. Pérez, D. Barceló, J. Chromatogr. A 1259 (2012) 86. "Achievements and future trends in the analysis of emerging organic contaminants in environmental samples by mass spectrometry and bioanalytical techniques"

embargo, la sensibilidad es muy baja en modo scan completo. La sensibilidad de IT es moderada, tanto en SRM como en scan completo permitiendo, además, realizar múltiples etapas de MS (MS^n), aunque su capacidad de almacenamiento de iones es limitada. El equipo híbrido QqLIT reúne las principales ventajas de QqQ e IT. Por su parte, QqTOF, orbitrap e ICR permiten la obtención de masas exactas y, por lo tanto, de fórmulas moleculares. Como principal desventaja, se puede decir que QqTOF solo permite una etapa de MS/MS (MS^2) y es menos sensible que QqQ en modo SRM. Los analizadores orbitrap e ICR sí permiten realizar MS^n y presentan elevada sensibilidad pero, sus bajas velocidades de adquisición, los hacen parcialmente incompatibles con técnicas de cromatografía rápida (UHPLC).

En la Figura 1.9 se muestra el uso relativo de los diferentes analizadores de MS/MS en trabajos de investigación⁴⁶.

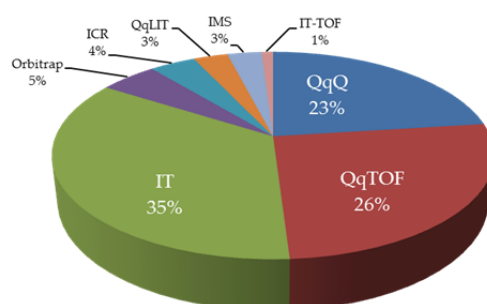


Figura 1.9. Uso relativo de los diferentes equipos de MS/MS en LC-MS. Búsqueda en *Web of Science* (1 de marzo de 2012)

1.4.1.1. Adquisición de datos en MS/MS

La adquisición de datos en MS/MS ofrece gran versatilidad (Figura 1.10) existiendo diferentes modos de adquisición cuyas características los hacen idóneos para diferentes objetivos concretos. Las diferentes modalidades que se pueden aplicar son⁵⁴:

⁵⁴ L. Sleno D.A. Volmer, *J. Mass Spectrom.* 39 (2004) 1091. "Ion activation methods for tandem mass spectrometry"

- *Barrido de iones producto* (product ion scan)

El primer analizador permanece constante permitiendo el paso de un único ion precursor, con determinada relación m/z , mientras que, tras la fragmentación en la celda de colisión, el segundo analizador registra todos los iones producto. Esta configuración se utiliza habitualmente para identificar las múltiples transiciones que puede presentar un analito (análisis de confirmación) además de servir para identificar las transiciones posteriormente utilizadas para cuantificar en el modo de seguimiento de reacción múltiple.

- *Barrido de iones precursores* (precursor ion scan)

En este caso, 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.

- *Barrido de pérdida 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 masa predeterminadas entre el primer y el segundo analizador. Esta modalidad se utiliza para la identificación selectiva de compuestos estructuralmente relacionados.

- *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. De esta forma se consigue un análisis muy selectivo que permite incrementar la sensibilidad. Esta modalidad es análoga al seguimiento de ion seleccionado (SIM) en la espectrometría de masas simple.

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

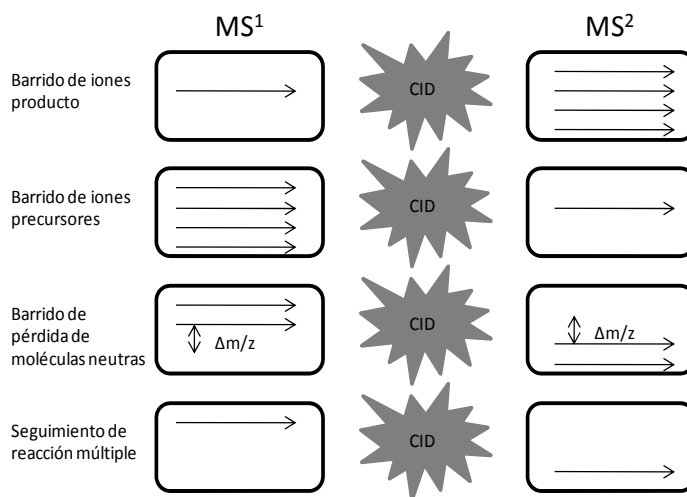


Figura 1.10. Modalidades de adquisición de datos en MS/MS

1.3. Materiales de acceso restringido (RAM) en etapas de tratamiento de muestra

En cualquier proceso analítico el tratamiento de muestra es un aspecto clave. Esto conlleva habitualmente una intensa manipulación de matrices biológicas, medioambientales o de alimentos, con el objetivo de evitar interferencias de especies macromoleculares y, a la vez, preservar el equipo instrumental.

En la determinación de compuestos a nivel de traza, estos tratamientos previos están dirigidos no sólo a la extracción del analito de la matriz y purificación del extracto, sino también a la preconcentración del analito hasta alcanzar un nivel de concentración adecuado para su posterior determinación.

Los tratamientos de muestra más frecuentes se basan en la utilización de técnicas como la extracción líquido-líquido (*LLE, Liquid-Liquid Extraction*) o la extracción en fase sólida (*SPE, Solid Phase Extraction*)⁵⁵. Estas técnicas se llevan a cabo habitualmente en modo "off-line" y, en consecuencia, se considera la etapa limitante en cuanto a tiempo, del proceso analítico global, además de requerir de una importante manipulación por parte del investigador.

El desarrollo de una extracción selectiva, consiguiendo inyecciones directas y múltiples, es una solución atractiva para reducir los tiempos de preparación de muestra. Entre los diferentes soportes de extracción especiales y selectivos, se encuentran los materiales de acceso restringido (*RAM, Restricted Access Materials*). El término RAM, acuñado por Desilets en 1991⁵⁶, designa a toda una familia de materiales de estructura porosa, que conjugan las características de los sorbentes de extracción en fase sólida con mecanismos de exclusión por tamaño. Aunque existen RAM con diferentes estructuras, el mecanismo de funcionamiento es idéntico para todos ellos: una barrera permite el paso exclusivo de moléculas de bajo peso molecular a su través que acceden, posteriormente, a la fase estacionaria. Las macromoléculas, como las proteínas, no pueden superar la barrera y son excluidas de la

⁵⁵ M. Gilar, E.S.P. Bouvier, B.J. Compton, J. Chromatogr. A 909 (2001) 111. "Advances in sample preparation in electromigration, chromatographic and mass spectrometric separation methods"

⁵⁶C.P. Desilets, M.A. Rounds, F.E. Regnier, J. Chromatogr. 544 (1991) 25. "Semipermeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography"

fase interna. Así, la selectividad proviene de dos mecanismos diferenciados, por una parte la exclusión molecular aportada por la barrera y, por otra, la interacción de las moléculas que superan dicha barrera con la fase estacionaria interna.

Dicha barrera puede presentar diferentes naturalezas: física, cuando el tamaño de poro de la fase externa (habitualmente 6 nm) actúa como barrera para compuestos macromoleculares excluyendo a la mayor parte de las proteínas séricas y plasmáticas o química, a través de los grupos funcionales hidrofílicos de la superficie del sorbente o de la red polimérica. En la Figura 1.11 se muestra esquemáticamente la naturaleza de las barreras RAM física y química.

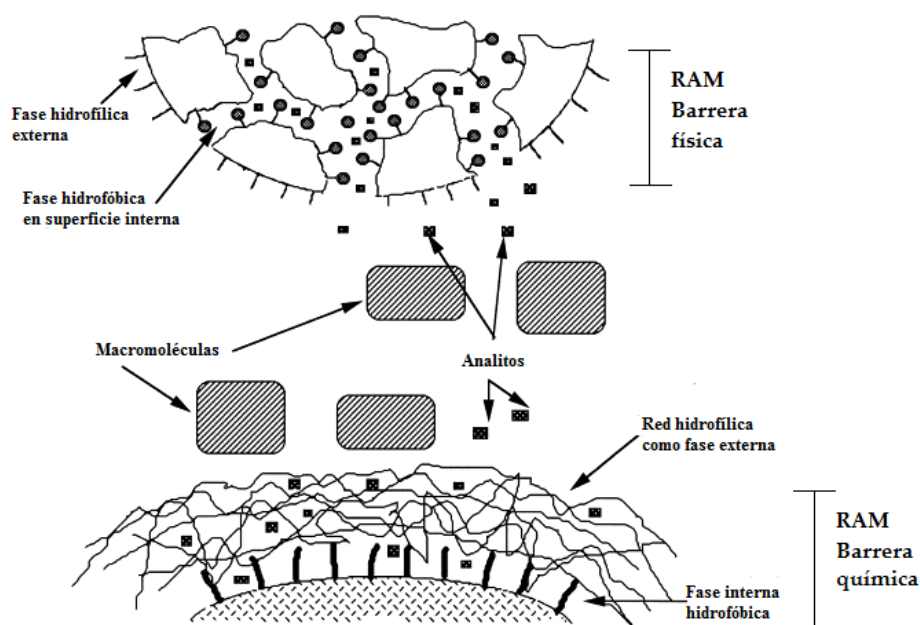


Figura 1.11 Representación esquemática de las barreras macromoleculares física y/o química presentes en un RAM⁵⁷

⁵⁷ E. Hogendoorn, P. van Zoonen, J. Chromatogr. A 892 (2000) 435. "Recent and future developments of liquid chromatography in pesticide trace analysis"

1.3.1. Clasificación de los RAM

Sadilek⁵⁸ y otros autores proponen la clasificación de los RAM en seis clases básicas, divididos de acuerdo a la naturaleza de la barrera y la estructura de la superficie del sorbente:

- *Fases de funcionalidad mixta y materiales de doble zona (MF, Mixed-Functional phases and dual-zone materials)*

En estos materiales, tanto la superficie interna como externa muestran propiedades idénticas proporcionadas por el enlace covalente de dos grupos funcionales diferentes o por un grupo funcional con dos posibles interacciones. La eliminación de las macromoléculas se produce gracias a los grupos hidrofílicos superficiales. Introducidos por Kanda⁵⁹ en 1994 son comercializados bajo el nombre comercial de Capcell Pak MF.

- *Superficie interna de fase inversa (ISRP, Internal Surface Reverse Phase)*

Introducidos por Hagestam y Pinkerton⁶⁰ en 1985 son los RAM más antiguos y también los más utilizados. Se caracterizan por presentar dos superficies con diferentes grupos funcionales: una hidrofílica que cubre la superficie externa del sorbente, y una hidrofóbica o de intercambio iónico unida a la superficie interna de los poros. El diámetro de dichos poros actúa como barrera física evitando que las macromoléculas interactúen con la fase interna. El mecanismo de separación es, por lo tanto, una combinación de fase inversa o intercambio iónico y cromatografía en gel. Existen dos grandes tipos: los sorbentes con filtro de fibra de vidrio (*GFF, Glass-Fiber Filter*) y los sorbentes de alquil-diol-sílice (*ADS, Alkyl-Diol-Silica*). Desde su

⁵⁸ P. Sadilek, D. Satinsky, P. Solich, Trends Anal. Chem. 26 (2007) 375. "Using restricted-access materials and column switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices"

⁵⁹ T. Kanda, H. Kutsuna, Y. Ohtsu, M. Yamaguchi, J. Chromatogr. A 672 (1994) 51. "Synthesis of polymer-coated mixed-functional packing materials for direct analysis of drug-containing serum and plasma by high-performance liquid chromatography"

⁶⁰ I.H. Hagestam, T.C. Pinkerton, Anal. Chem. 57 (1985) 1757. "Internal surface reversed-phase silica supports for liquid chromatography"

introducción en 1995 por Vielhauer⁶¹, los materiales ADS son los más utilizados. Están constituidos por partículas de sílice porosa de 60 Å de tamaño de poro que forman la barrera física que conlleva la exclusión de cualquier macromolécula de más de 10000 u⁶²; las cuales no quedan adsorbidas sobre el soporte gracias a los grupos hidrofílicos (glicerilpropil o dioles) unidos a la superficie externa de las partículas. En las Figuras 1.12 y 1.13 se muestran la naturaleza química y el funcionamiento de un RAM-ADS. Los materiales alquil-diol-sílice se clasifican según los diferentes tipos de fase estacionaria inversa: cadenas butílicas (C4), caprílicas (C8) o estearílicas (C18)⁵⁸.

Los RAM-ADS han mostrado su versatilidad al ser utilizados satisfactoriamente en una gama importante de matrices biológicas como plasma, suero, orina, saliva, leche, secreciones bronquiales y tejidos, mostrando una vida media larga ya que permiten el paso de volúmenes de muestra biológica de hasta 100 mL⁶³.

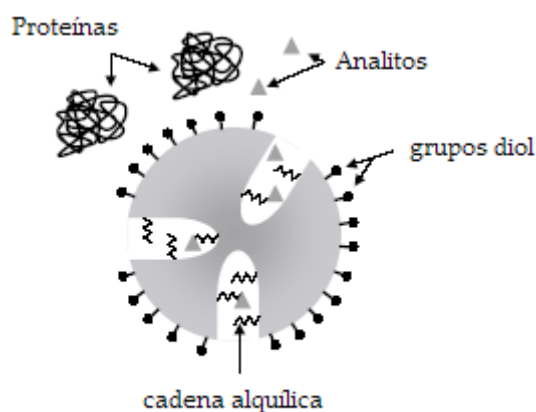


Figura 1.12. Representación del funcionamiento de un RAM-ADS⁶³

⁶¹ S. Vielhauer, A. Rudolphi, K.S. Boos, D. Seidel, J. Chromatogr. B 666 (1995) 315. "Evaluation and routine application of the novel restricted-access precolumn packing material Alkyl-Diol Silica: coupled-column high-performance liquid chromatographic analysis of the photoreactive drug 8-methoxypsoralen in plasma"

⁶² K.S. Boos, C.H. Grimm, Trends Anal. Chem. 18 (1999) 175. "High-performance liquid chromatography integrated solid-phase extraction in bioanalysis using restricted access precolumn packings"

⁶³ S. Souverain, S. Rudaz, J. L. Veuthey, J. Chromatogr. B 801 (2004) 141. "Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis"

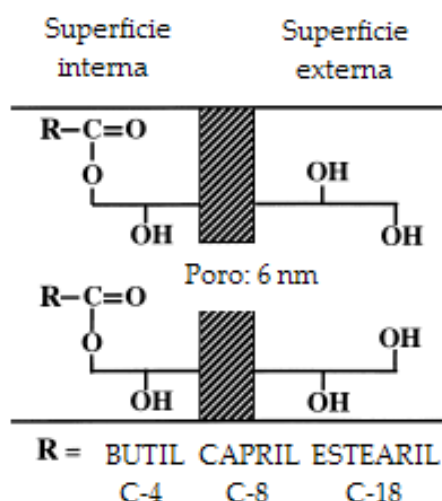


Figura 1.13. Representación esquemática de la naturaleza química de un RAM-ADS⁶²

También se han desarrollado materiales ISRP en los que la fase interna está formada por grupos sulfónicos^{64,65} (SO_3^-) o dietilaminoetil⁶⁶ (DEAE, *DiEthylAminoEthyl*) lo que implica que tengan lugar interacciones por intercambio catiónico fuerte (SCX-RAM, *Strong Cation eXchange-Restricted-Access Material*) y aniónico débil (WCX-RAM, *Weak Anion eXchange-Restricted-Access Material*) respectivamente. Ambos se denominan de intercambio-diol-sílice (XDS, *eXchange Diol Silica*) y se han aplicado en el análisis de compuestos endógenos y farmacéuticos.

⁶⁴ P. Chiap, O. Rbeida, B. Christiaens, P. Hubert, D. Lubda, K.S. Boos, J. Crommen, J. Chromatogr. A 975 (2002) 145. "Use of a novel cation-exchange restricted-access material for automated sample clean-up prior to the determination of basic drugs in plasma by liquid chromatography"

⁶⁵ E. Machtejevas, R. Denoyel, J.M. Meneses, V. Kudirkaitė, B.A. Grimes, D. Lubda, K.K. Unger, J. Chromatogr. A 1123 (2006) 38. "Sulphonic acid strong cation-exchange restricted access columns in sample cleanup for profiling of endogeneous peptides in multidimensional liquid chromatography: Structure and function of strong cation-exchange restricted access materials"

⁶⁶ O. Rbeida, B. Cristianes, Ph. Hubert, D. Lubda, K.S. Boos, J. Crommen, P. Chiap, J. Chromatogr. A 1030 (2004) 95. "Evaluation of a novel anion-exchange restricted-access sorbent for on-line sample clean-up prior to the determination of acidic compounds in plasma by liquid chromatography"

- *Fases hidrofóbicas protegidas (SHP, Shielded Hydrophobic Phases)*

Introducidos en 1988 por Gisch⁶⁷, estos RAM están formados por una fase estacionaria protegida por una barrera química. Dicha barrera está formada por una red de polietilenglicol que contiene grupos fenilos hidrofóbicos. Se comercializan bajo el nombre de Hisep SHP.

- *Superficies semipermeables (SPSs, Semi-Permeable Surfaces)*

Estos materiales están formados por una barrera química de naturaleza polimérica hidrofílica. Presentan grupos funcionales internos y externos sintetizados de forma independiente y, en la mayoría de los casos, unidos covalentemente a la superficie de las partículas de sílice. La superficie externa (polímero hidrofílico de polioxietileno) repele a las macromoléculas mientras que la superficie interna está formada por una fase inversa hidrofóbica que retiene a los analitos que atraviesan la barrera polimérica⁵⁶. A esta categoría pertenece un RAM cuya superficie externa está formada por una proteína plasmática humana que sustituye a la barrera polimérica⁶⁸. Como principal ventaja presenta un mayor amplio intervalo de trabajo de pH (2-10). Disponibles comercialmente como BioTrap.

- *Materiales poliméricos*

Desarrollados y comercializados por Shimadzu estos RAM, formados por columnas empaquetadas con materiales poliméricos, están diseñados para la eliminación de macromoléculas en sistemas de columnas acopladas. Se comercializan en dos líneas diferenciadas: MSpak GF y MSpak PK.

Los RAM MSpak PK están empaquetados con un copolímero hidrofílico que contiene N-vinilacetamida lo que supone que muestran gran utilidad tanto para el análisis de analitos polares como apolares.

⁶⁷ D.J. Gisch, B.T. Hunter, B. Feibush, J. Chromatogr. B 433 (1988) 264. "Shielded hydrophobic phase: a new concept for direct injection analysis of biological fluids by high-performance liquid chromatography"

⁶⁸ J. Hermansson, A. Grahn, J. Chromatogr. A 660 (1994) 119. "Determination of drugs by direct injection of plasma into a biocompatible extraction column based on a protein-entrapped hydrophobic phase"

Por su parte, los RAM MSpak GF eliminan las macromoléculas mediante una barrera física. Son más eficaces que la serie MSpak PK pero no son útiles para la preconcentración de analitos hidrofílicos.

- *RAM magnéticos*

En los últimos años ha crecido el interés por las separaciones que utilizan materiales magnéticos debido a que la recuperación de las partículas activas ante el campo magnético es más selectiva, eficiente y rápida que la centrifugación o la filtración. El uso de materiales magnéticos en SPE ha resultado ser muy eficiente para la preconcentración de diversos analitos en muestras complejas; sin embargo, su aplicación con líquidos biológicos se ha visto muy restringida debido a la absorción irreversible de proteínas. El desarrollo de RAM magnéticos ha puesto solución a este problema consiguiéndose separaciones efectivas y selectivas de diferentes analitos en fluidos biológicos^{69,70}. Como principales inconvenientes, se puede indicar que estos materiales no permiten la automatización del análisis y requieren de una laboriosa etapa de síntesis ya que no están aún disponibles comercialmente.

1.3.2. Configuración instrumental de los RAM

A la hora de realizar el análisis directo de la muestra los materiales RAM se han utilizado en muy diversas configuraciones. En su versión más sencilla, el RAM puede integrarse en un sistema de flujo no separativo como en el análisis por inyección de flujo (*FIA, Flow Injection Analysis*) o en el análisis por inyección secuencial (*SIA, Sequential Injection Analysis*). Sin embargo, la presión necesaria para mantener el flujo a través del RAM es alta e incompatible con las bombas peristálticas de FIA. Satiínsky llevó a cabo el primer intento de

⁶⁹ Y. Wang, Y. Wang, L. Chen, Q.H. Wan, J. Magn. Magn. Mater. 324 (2012) 410. "Restricted access magnetic materials prepared by dual surface modification for selective extraction of therapeutic drugs from biological fluids"

⁷⁰ L. Ye, Q. Wang, J. Xu, Z.G. Shi, L. Xu, J. Chromatogr. A 1244 (2012) 46. "Restricted-access nanoparticles for magnetic solid-phase extraction of steroid hormones from environmental and biological samples"

acoplamiento SIA-RAM, obteniendo resultados satisfactorios⁷¹. En este análisis por inyección secuencial, la bomba de jeringa utilizada en los equipos comerciales alcanza presiones a las que es posible incorporar un pequeño RAM de tamaño de partícula de 20 μm o mayor. En todo caso, la técnica SIA-RAM es muy limitada siendo utilizada simplemente para aplicaciones sencillas.

Mucho más habitual es la incorporación de RAM a métodos cromatográficos de análisis. En este caso, existen dos posibles configuraciones:

- *Modalidad de columna única*

En esta configuración la muestra se inyecta en el RAM en el medio apropiado tal que permita la retención de los analitos en el sorbente mientras que las macromoléculas (principalmente proteínas) son eluidas hacia el detector. Seguidamente, se pasa por el RAM una disolución que permita la elución de los analitos que deben alcanzar el detector libres de interferencias. Pueden distinguirse dos modalidades según el tipo de detección empleado:

- a) Las columnas RAM se desarrollaron cuando el detector espectrofotométrico de UV era, sin duda, el más utilizado para este tipo de análisis. Dada la baja sensibilidad y nula selectividad del detector de UV la separación cromatográfica que tiene lugar en el RAM ha de ser muy efectiva. Puesto que, en la mayoría de los casos, el RAM presenta una pobre resolución, existen pocos ejemplos de combinación RAM-UV.
- b) Por otra parte, los detectores de espectrometría de masas presentan gran sensibilidad y, lo que es más importante, una alta selectividad, lo que permite compensar la baja resolución cromatográfica aportada por el RAM. Sin embargo, a pesar de las ventajas de la espectrometría de masas, la conexión en modo

⁷¹ D. Satinsky, H. Sklenarova, J. Huclova, R. Karlicek, Analyst 128 (2003) 351. "On-line coupling of sequential injection extraction with restricted-access materials for sample clean-up and analysis of drugs in biological matrix"

directo de RAM y espectrometría de masas es poco versátil lo que limita el número de aplicaciones de la técnica^{72,73}.

- *Modalidad de intercambio de columna o de columna acopladas*

Debido a las limitaciones del uso del RAM en el modo de columna única, la modalidad de intercambio de columna (*column switching*) ha sido la más utilizada. En este caso el RAM, utilizado para extraer y/o preconcentrar la muestra, se acopla a una columna analítica antes de la detección, teniendo así una buena separación cromatográfica que mejorará la detección con respecto al modo anterior. Las restricciones sólo afectan al medio en el que la muestra se carga en el sistema. Frente a sus múltiples ventajas sobre la modalidad de columna única, cabe destacar como principal desventaja la mayor complejidad instrumental ya que son necesarias al menos dos bombas de alta presión y una válvula de 6 vías sincronizada con las mismas como se muestra en la Figura 1.14.

⁷² D. Ortelli, S. Rudaz, S. Souverain, J.L. Veuthey. J. Sep. Sci. 25 (2002) 222. "Restricted access materials for fast analysis of methadone in serum with liquid chromatography-mass spectrometry"

⁷³ R. Papp, W.M. Mullett, E. Kwong. J. Pharm. Biomed. Anal. 36 (2004) 457. "A method for the direct analysis of drug compounds in plasma using a single restricted access material (RAM) column"

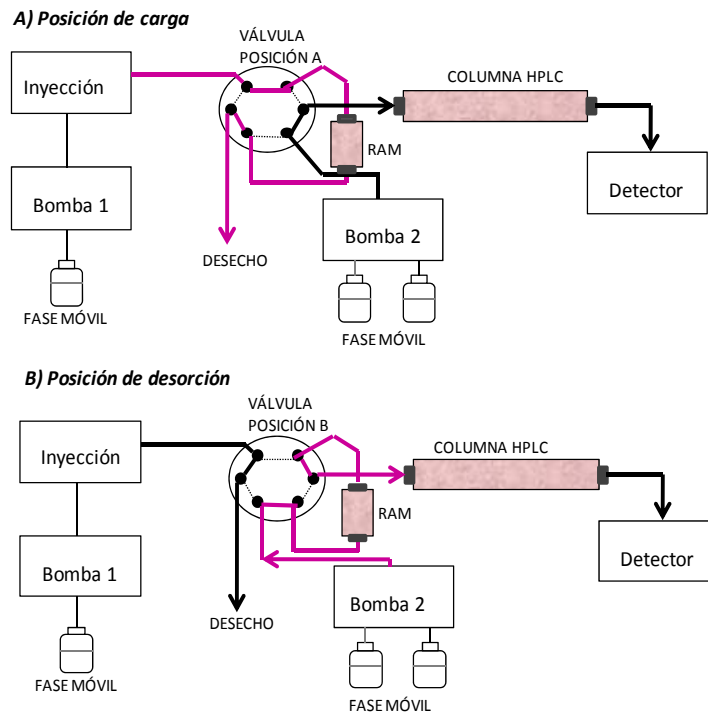


Figura 1.14. Configuración instrumental del sistema RAM-LC con la modalidad de intercambio de columna. En la posición de carga (A) se produce una etapa de extracción y/o lavado y en la posición de desorción (B) se produce la elución de los analitos a la columna y su posterior separación

En esta modalidad, la muestra inyectada es arrastrada al RAM por una fase móvil impulsada por la bomba 1, con la válvula en posición A, quedando los analitos de bajo peso molecular retenidos; mientras los componentes de la matriz no retenidos (interferentes) se eliminan a desecho al ser arrastrados por la fase móvil. Por lo tanto, en esta etapa tiene lugar la extracción de los analitos de la matriz y el lavado de estos en el RAM. Este sistema permite la inyección de volúmenes elevados de muestra lo que puede dar lugar a importantes factores de preconcentración. Durante esta etapa, la columna cromatográfica está acondicionándose con la fase móvil impulsada por la bomba 2. Cuando se han eliminado los interferentes de la matriz, la válvula cambia a la posición B, conectando el RAM a la otra bomba (bomba 2), cuya fase móvil eluye los analitos del RAM y los introduce en la columna analítica donde se produce la separación para dar paso, seguidamente, a la detección. Finalmente, la válvula vuelve a la

posición A para acondicionar el sistema y, seguidamente, dar paso a la siguiente inyección.

La elución de los analitos del RAM a la columna cromatográfica se puede llevar a cabo de dos modos diferentes: con la fase móvil de elución en el mismo sentido que la de lavado/extracción (*straight-flush mode*) o en sentido opuesto (*back-flush mode*), modalidad representada en la Figura 1.14. En este último caso, los componentes de la matriz fuertemente retenidos en el RAM también se eluyen con el flujo inverso; evitando así el taponamiento del RAM. Además el modo *back-flush* minimiza la anchura de pico⁵⁸.

En la Tabla 1.2. se muestran algunas referencias de trabajos, realizados en los últimos años, que utilizan RAM en la modalidad de intercambio de columna. De especial interés y mayor extensión son las revisiones realizadas en este campo por Souverain⁶³ para el análisis de fluidos biológicos, por Sadílek⁵⁸ para compuestos con actividad biológica, por Marazuela y Bogialli⁷⁴ para muestras de alimentos y por Hogendoom y van Zoonen⁵⁷ para pesticidas. En una reciente revisión se pone de manifiesto la importancia que en los últimos años han adquirido los RAM en el análisis de fluidos biológicos y como siguen atrayendo gran interés en diferentes campos de investigación⁷⁵.

⁷⁴ M. D. Marazuela, S. Bogialli, Anal. Chim. Acta 645 (2009) 5. "A review of novel strategies of sample preparation for the determination of antibacterial residues in foodstuffs using liquid chromatography-based analytical methods"

⁷⁵ O. Nuñez, H. Gallart-Ayala, C.P.B. Martins, P. Lucci, R. Busquets, J. Chromatogr. B 927 (2013) 3. "State-of-the-art in fast liquid chromatography-mass spectrometry for bio-analytical applications"

Tabla 1.2. Antecedentes bibliográficos de la aplicación de RAM en la modalidad de intercambio de columna

Campo de aplicación	Matriz	Analitos	RAM	Ref.
Análisis de fármacos	Plasma	Cloxacilina	XDS (DEAE)	76
	Orina	Metanfetamina	Polimérico	77
	Sangre	Benzodiazepinas	ADS (C-18)	78
	Orina	Verapimilo	ADS (C-8)	79
	Plasma	Ciproterona	ADS (C-4)	80
	Plasma	Rofecoxib	ADS (C-18)	81
	Orina	Heroína	MF	82
	Suero	Metadona	ADS (C-4)	72
	Hígado	Epirubicina	ADS (C-4)	83
	Suero	Barbitúricos	MF	84
	Suero	Oxitetraciclina	SHP	85
	Suero	Fleroxacina	SHP	86

⁷⁶ O. Rbeida, P. Chiap, D. Lubda, K.S. Boos, J. Crommen, Ph. Hubert, J. Pharm. Biomed. Anal. 36 (2005) 961. "Development and validation of a fully automated LC method for the determination of cloxacillin in human plasma using anion exchange restricted access material for sample clean-up"

⁷⁷ M. Kumihashi, K. Ameno, T. Shibayama, K. Suga, H. Miyauchi, M. Jamal, W. Wang, I. Uekita, I. Ijiri, J. Chromatogr. B 845 (2007) 180. "Simultaneous determination of methamphetamine and its metabolite, amphetamine, in urine using a high performance liquid chromatography column-switching method"

⁷⁸ M. Walles, W.M. Mullett, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A 1025 (2004) 85. "Monitoring of drugs and metabolites in whole blood by restricted-access solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry"

⁷⁹ W.M. Mullett, M. Walles, K. Levsen, J. Borlak, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. B 801 (2004) 297. "Multidimensional on-line sample preparation of verapamil and its metabolites by a molecularly imprinted polymer coupled to liquid chromatography-mass spectrometry"

⁸⁰ B. Cristianes, M. Fillet, P. Chiap, O. Rbeida, A. Ceccato, B. Streel, J. de Graeve, J. Crommen, Ph. Hubert, J. Chromatogr. A 1056 (2004) 105. "Fully automated method for the liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of cyproterone acetate in human plasma using restricted access material for on-line sample clean-up"

⁸¹ A. Vintiloui, W.M. Mullett, R. Papp, D. Lubda, E. Kwong, J. Chromatogr. A 1082 (2005) 150. "Combining restricted access material (RAM) and turbulent flow for the rapid on-line extraction of the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib in plasma samples"

⁸² M. Katagi, M. Nishikawa, M. Tatsuno, A. Miki, H. Tsuchihashi, J. Chromatogr. B 751 (2001) 177. "Column-switching high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for identification of heroin metabolites in human urine"

⁸³ A. Rudolphi, S. Vielhauer, K.S. Boos, D. Seidel, I.M. Bathge, H. Berger, J. Pharm. Biomed. Anal. 13 (1995) 615. "Coupled-column liquid chromatographic analysis of epirubicin and metabolites in biological material and its application to optimization of liver cancer therapy"

⁸⁴ O. Shirota, A. Suzuki, T. Kanda, Y. Ohtsu, M. Yamaguchi, J. Microcol. Sep. 7 (1995) 29. "Low concentration drug analysis by semi-microcolumn liquid chromatography with a polymer-coated mixed-function precolumn"

⁸⁵ R. Ueno, K. Uno, T. Auki, J. Chromatogr. B 573 (1992) 333. "Determination of oxytetracycline in blood serum by high-performance liquid chromatography with direct injection"

⁸⁶ P. Djurdjevic, M. Jelkic-Stankov, A. Laban, Talanta 55 (2001) 631. "High-performance liquid chromatographic assay of fleroxacin in human serum using fluorescence detection"

Tabla 1.2. Continuación. Antecedentes bibliográficos de la aplicación de RAM en la modalidad de intercambio de columna

Campo de aplicación	Matriz	Analitos	RAM	Ref.
Análisis de péptidos	Sangre	Angiotensina I	XDS (SO ₃)	87
	Sangre	Angiotensina II	ADS (C-18)	87
	Plasma	Neuropéptido Y	XDS (SO ₃)	88
Análisis Ambiental	Orina	1 y 2 naftol	ADS (C-8)	89
	Orina	Ftalatos	ADS (C-8)	90
	Plasma	Organofosforados	ADS (C-18)	91
	Orina	Pesticidas Azol	ISRP	92
	Plasma	Paraquat	ADS (C-18)	93
	Orina	Tetrodotoxina	Polimérico	94

⁸⁷ F.M. Musteata, M. Wales, J. Pawliszyn, Anal. Chim. Acta 537 (2005) 231. "Fast assay of angiotensin I from whole blood by cation-exchange restricted-access solid-phase microextraction"

⁸⁸ K. Racaityte, E.S. M. Lutz, K.K. Unger, D. Lubda, K.S. Boos, J. Chromatogr. A 890 (2000) 135. "Analysis of neuropeptide Y and its metabolites by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry and integrated sample clean-up with a novel restricted-access sulphonic acid cation exchanger"

⁸⁹ R. Preuss, J. Angerer, J. Chromatogr. B 801 (2004) 307. "Simultaneous determination of 1- and 2-naphthol in human urine using on-line clean-up column-switching liquid chromatography–fluorescence detection"

⁹⁰ R. Preuss, H.M. Koch, J. Angerer, J. Chromatogr. B 816 (2005) 269. "Biological monitoring of the five major metabolites of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine using column-switching liquid chromatography–tandem mass spectrometry"

⁹¹ N. Amini, C. Crescenzi, J. Chromatogr. B 795 (2003) 245. "Feasibility of an on-line restricted access material/liquid chromatography/tandem mass spectrometry method in the rapid and sensitive determination of organophosphorus triesters in human blood plasma"

⁹² J. Martínez Fernández, J.L. Martínez Vidal, P. Parrilla Vazquez, A. Garrido Frenich, Chromatographia 53 (2001) 503. "Application of restricted-access media column in coupled-column RPLC with UV detection and electrospray mass spectrometry for determination ofazole pesticides in urine"

⁹³ M.R. Brunetto, A.R. Morales, M. Gallignani, J.L. Burguera, M. Burguera, Talanta 59 (2003) 913. "Determination of paraquat in human blood plasma using reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with direct sample injection"

⁹⁴ M. Hayashida, H. Hayakawa, K. Wada, T. Yamada, M. Nihira, Y. Ohno, Legal Medicine 5 (2003) S101. "A column-switching LC/MS/ESI method for detecting tetrodotoxin and Aconitum alkaloids in serum"

Tabla 1.2. Continuación. Antecedentes bibliográficos de la aplicación de RAM en la modalidad de intercambio de columna

Campo de aplicación	Matriz	Analitos	RAM	Ref.
Análisis de alimentos	Huevo	Colesterol	SPS	95
	Leche	Poliaminas	ADS (C-18)	96
	Leche	Trimetoprima	ADS (C-18)	97
	Leche	Tetraciclinas	ADS (C-8)	98
-----	-----	-----	-----	-----
Análisis veterinario	Plasma	Ketoprofeno	ADS (C-18)	99

⁹⁵ S. Emara, S.A. Hussein, F.A. Mohamed, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 22 (1999) 1235. "Determination of cholesterol in egg yolk by high performance liquid chromatography using an automated precolumn-switching procedure"

⁹⁶ F. Bellagamba, V.M. Moretti, T. Mentasti, A. Albertini, U. Luzzana, F. Valfrè, J. Chromatogr. A 791 (1997) 79. "High-performance liquid chromatographic determination of polyamines in milk as their 9-fluorenylmethoxycarbonyl derivatives using a column-switching technique"

⁹⁷ E. Blahova, L. Bosanova, E. Brandsteterova, J. Liq. Chrom. Rel. Technol. 24 (2001) 3027. "Direct HPLC analysis of trimethoprim in milk"

⁹⁸ J. Chico, S. Meca, R. Companyó, M.D. Prat, M. Granados. J. Chromatogr. A 1181 (2008) 1. "Restricted access materials for sample clean-up in the analysis of trace levels of tetracyclines by liquid chromatography: Application to food and environmental analysis"

⁹⁹ W. Baeyens, G. Van der Weken, J. Haustraete, H. Aboul-Enein, S. Corveleyn, J.P. Remon, A.M. García-Campaña, P. Deprez, J. Chromatogr. A 871 (2000) 153. "Application of the restricted-access precolumn packing material alkyl-diol silica in a column-switching system for the determination of ketoprofen enantiomers in horse plasma"

1.4. Xenobióticos y biomarcadores

1.4.1. Contaminantes en alimentos

Los alimentos son mezclas complejas de compuestos naturales orgánicos como lípidos, carbohidratos, proteínas, vitaminas, compuestos fenólicos, ácidos orgánicos y aromas; e inorgánicos como agua y minerales. Además, también suelen estar presentes otras sustancias, generalmente originadas en el procesado, en los tratamientos agroquímicos, en el empaquetado y en el almacenamiento¹⁰⁰.

En los países desarrollados, el estilo de vida moderno ha cambiado los hábitos alimenticios incrementándose cada vez más el consumo de comidas preparadas elaboradas con ingredientes de todo el mundo. Este hecho, unido al incremento de la presión social de los consumidores, ha implicado la promulgación de regulaciones sanitarias cada vez más estrictas para el control de la producción y distribución de alimentos. Más allá de la importancia de la demanda social, uno de los factores más importantes que ha favorecido el establecimiento de límites cada vez menores en el contenido de contaminantes en alimentos, es la existencia de métodos analíticos capaces de detectar cada vez menores cantidades de analito.

Los diferentes contaminantes que se han de supervisar en seguridad alimentaria pueden dividirse esquemáticamente en tres grupos principales: contaminantes de origen microbiano (bacterias, microorganismos, etc.), contaminantes de origen inorgánico (metales pesados) y contaminantes de origen orgánico (pesticidas, contaminantes industriales, etc.). Los tres grupos presentan importantes diferencias en cuanto a su enfoque analítico a pesar de que, en algunos casos, pueden estar interconectados.

Los contaminantes orgánicos pueden, a su vez, ser divididos en subcategorías según su origen. Así, existen compuestos responsables de efectos biológicos adversos que están presentes de forma natural (micotoxinas), compuestos formados a partir de sustancias naturales durante el procesado y transformación de los alimentos (acrilamida) y

¹⁰⁰ L. Mondello, G. Dugo, P. Dugo, LC–GC Eur. 2 November (2002) 2. “Recent Applications in LC–MS: Food and Flavours”

compuestos que llegan al alimento por diversas vías: contaminación por productos o subproductos de uso industrial (pesticidas, fármacos, etc.) o por migración desde los materiales de envase de los alimentos. A esta última subcategoría es a la que se denominada, de forma general, xenobióticos.

Los compuestos xenobióticos no presentan ningún valor nutricional y pueden ser potencialmente tóxicos. Pueden aparecer en alimentos muy diversos y es deseable su detección tan pronto como sea posible. Dependiendo de sus características físico-químicas la metodología analítica a aplicar puede ser muy diferente. Además, es de gran importancia poseer información sobre la posible degradación metabólica de los xenobióticos porque sus efectos biológicos pueden deberse a uno de sus metabolitos.

El análisis de xenobióticos en alimentos, en el campo de la seguridad alimentaria, es importante por las siguientes razones¹⁰¹:

- Para verificar que no estén presentes contaminantes no esperados.
- Para llevar a cabo programas de vigilancia.
- Para asegurar que la ingesta diaria de contaminantes no excede los niveles aceptables y por tanto que en el alimento no se sobrepasan los niveles máximos de residuo (*MRLs, Maximum Residue Limits*).

Durante los últimos años, la comunidad científica ha prestado especial atención a un grupo numeroso de xenobióticos, que penetran en la cadena alimentaria en diferentes niveles, y que interfieren con los receptores hormonales produciendo una disrupción en el sistema endocrino, lo que induce perturbaciones en la función sexual y reproductiva de animales y humanos¹⁰². Estos xenobióticos se denominan disruptores endocrinos y, aunque inducen efectos biológicos similares, pueden pertenecer a familias químicas muy diferentes como pesticidas, compuestos químicos utilizados en la fabricación de plásticos u otros contaminantes, lo que conlleva que su

¹⁰¹ C. Soler, Y. Picó, Trends Anal. Chem. 26 (2007) 103. "Recent trends in liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine pesticides and their metabolites in food"

¹⁰² A. Rivas, N. Olea, F. Olea-Serrano, Trends Anal. Chem. 16 (1997) 613. "Human exposure to endocrine-disrupting chemicals: assessing the total estrogenic xenobiotic burden"

análisis sea muy complejo, requiriendo la determinación simultánea de un gran número de compuestos en un solo análisis¹⁰³.

Para cumplir este requisito los métodos analíticos han de ser rápidos y exactos, si bien estas dos propiedades analíticas son difíciles de conseguir en conjunto¹⁰⁴. Sin embargo, la alta especificidad de la espectrometría de masas en tándem ofrece posibilidades reales de aunar velocidad y exactitud al:

- Simplificar la preparación de muestra.
- Simultanear el cribado y la cuantificación.
- Analizar compuestos desconocidos en la muestra.

En conclusión, la cromatografía de gases, método de rutina para el análisis de contaminantes en alimentos desde los años 70, se está viendo desplazada por la cromatografía de líquidos gracias al desarrollo de métodos multi-residuo, especialmente tras la introducción de la espectrometría de masas en tándem como método de detección. Este hecho se ve reflejado en diversos artículos de revisión que engloban el análisis de xenobióticos en alimentos^{104,105,106,107}.

1.4.2. Biomarcadores en muestras biológicas: biomonitoring

Las primeras determinaciones de compuestos químicos en fluidos biológicos se efectuaron en el contexto de la medicina ocupacional para evaluar la salud de los trabajadores expuestos. La determinación de metabolitos del plomo en 1933¹⁰⁸ y del benceno en 1936¹⁰⁹ en sangre y orina son un buen ejemplo de los comienzos del seguimiento biológico

¹⁰³ M. Petrovic, E. Eljarrat, M.J. López de Alda, D. Barceló, J. Chromatogr. A 974 (2002) 23. "Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples"

¹⁰⁴ M. Careri, F. Bianchi, C. Corradini, J. Chromatogr. A 970 (2002) 3. "Recent advances in the application of mass spectrometry in food-related analysis"

¹⁰⁵ Y. Picó, C. Blasco, G. Font, Mass Spectrom. Rev. 23 (2004) 45. "Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: An overview"

¹⁰⁶ O. Nuñez, E. Moyano, M.T. Galcerán, Trends Anal. Chem. 24 (2005) 683. "LC-MS/MS analysis of organic toxics in food"

¹⁰⁷ L. Alder, K. Greulich, G. Kempe, B. Vieth, Mass Spectrom. Rev. 25 (2006) 838. "Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS?"

¹⁰⁸ R.A. Kehoe, F. Thamman, J. Cholak, J. Indust. Hyg. 15 (1933) 320. "Lead absorption and excretion in relation to the diagnosis of lead poisoning"

¹⁰⁹ H.H. Schrenk, W.P. Yant, R.R. Sayers, J. Am. Med. Assoc. 107 (1936) 849. "A new procedure for the control of benzene exposure"

de analitos de interés. A principios de los años 60 comenzaron a desarrollarse las técnicas analíticas que permitieron determinar cada vez concentraciones menores de sustancias químicas en diferentes fluidos lo que supuso un importante avance para este campo. Así, los estudios realizados usando espectroscopía de absorción atómica mostraron que la población general de los países industrializados estaba expuesta a unos niveles de plomo que requerían una acción inmediata¹¹⁰. Como consecuencia, se redujo el contenido en plomo de las gasolinas, lo que supuso el primer caso de seguimiento biológico de la población general. Estos hechos llevaron a la Comisión de la Comunidad Europea a promulgar una Directiva¹¹¹ que requería a los Estados Miembros que tomaran las medidas necesarias para realizar un seguimiento biológico continuo, no sólo de los grupos expuestos por motivos laborales, sino de toda la población europea. En años posteriores las diferentes autoridades nacionales han ido promocionando diversos estudios de seguimiento biológico para diferentes sustancias tóxicas¹¹⁰. Así, en 1985 comienzan a realizarse los estudios medioambientales en Alemania (GerES, 1985) y en 1976 los correspondientes en Estados Unidos (NHANES, 1976). Más recientemente, la Unión Europea (*Open Stakeholder Consultation*, 2006) y el Congreso de los Estados Unidos (*National Research Council*, 2006) han propuesto sendos planes generales de seguimiento biológico. Estas propuestas demuestran claramente que el seguimiento biológico es un método de plena actualidad que cada vez está ganando más peso en las políticas de salud pública, medioambientales y científicas.

El seguimiento biológico^{110,112,113,114} (*biological monitoring o biomonitoring*) de la presencia y concentración de compuestos tóxicos en seres humanos, como forma de evaluación de los riesgos que supone su exposición a la contaminación medioambiental, es, por lo tanto, un campo de creciente interés, tanto en los aspectos relacionados con el estudio y validación de biomarcadores adecuados como en el desarrollo

¹¹⁰ J. Angerer, U. Ewers, M. Wilhelm, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 210 (2007) 201. "Human biomonitoring: State of the art"

¹¹¹ Council Directive 77/312/EEC of 29 March 1977. "On biological screening of the population for lead"

¹¹² L.L. Needham, A.M. Calafat, D.B. Barr, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 210 (2007) 229. "Uses and issues of biomonitoring"

¹¹³ D. Paustenbach, D. Galbraith, *Regul. Toxicol. Pharm.* 44 (2006) 249. "Biomonitoring: Is body burden relevant to public health?"

¹¹⁴ D.B. Barr, L.L. Needham, *J. Chromatogr. B* 778 (2002) 5. "Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review"

de metodologías analíticas rápidas y eficaces que permitan una identificación y cuantificación fiables. Las innovaciones en ambos aspectos inciden positiva y directamente en el desarrollo de estrategias de control y prevención de riesgos en la salud humana.

Otra forma de evaluar la exposición a sustancias químicas es lo que se denomina seguimiento ambiental (*ambient monitoring*) que consiste en la determinación de las sustancias químicas en matrices medioambientales como aire, agua, suelos, etc. El seguimiento biológico se complementa con el seguimiento ambiental sin llegar a reemplazarlo completamente. El seguimiento ambiental es especialmente necesario a la hora de identificar las fuentes de exposición y así facilitar la minimización de las emisiones. Sin embargo, el seguimiento biológico es indispensable ya que muestra cuándo y en qué extensión los compuestos químicos penetran en los seres vivos desde el medioambiente (dosis interna). El seguimiento biológico permite estudiar los procesos metabólicos *in vivo*, lo que conduce a la posible elucidación de los mecanismos tóxicos. En todo caso, el seguimiento biológico, además de ser más barato, refleja mejor la exposición a xenobióticos que la determinación de los compuestos en aire, agua, suelos, etc. Además, el seguimiento biológico tiene en cuenta todas las rutas (ingestión, absorción dérmica, inhalación, etc.) y todas las posibles fuentes de exposición.

Para la realización de un correcto seguimiento biológico han de cumplirse tres requisitos indispensables:

- Disponibilidad de la matriz biológica adecuada.
- Disponibilidad de parámetros capaces de reflejar la exposición interna, o efectos bioquímicos o biológicos, los llamados biomarcadores.
- Disponibilidad de métodos analíticos apropiados, fiables y robustos.

- *Matrices biológicas*

La selección de la matriz biológica depende, principalmente, de la naturaleza del tóxico a determinar y de su farmacocinética, así como de las características de la población. Las principales rutas de exposición a compuestos químicos son la ingestión, la inhalación y la vía dérmica. Una vez que se ha producido la exposición, el tóxico es absorbido en el torrente sanguíneo donde puede sufrir diferentes transformaciones (metabolización). La sangre distribuye el tóxico (o sus metabolitos) por todo el organismo. Los tóxicos más persistentes, de elevada naturaleza lipofílica como por ejemplo las dioxinas o los compuestos bifenilos policlorados (PCB's), con tiempos de vida media de años, pueden ser determinados directamente en sangre o bien en el tejido adiposo. Sin embargo, la mayoría de los compuestos químicos no son tan persistentes, presentando tiempos de vida media pequeños, lo que conlleva que su concentración en sangre sea muy baja. En este caso, la orina se convierte en la matriz por excelencia; ya que en ella se concentra la mayor parte del tóxico o alguno de sus metabolitos. En la Figura 1.15 se muestran los perfiles de concentración de compuestos químicos no persistentes en sangre y orina.

Además, la orina presenta otras importantes ventajas: su adquisición es sencilla y no invasiva y se puede disponer de grandes volúmenes, lo que permite desarrollar metodologías analíticas más sensibles. Por todo ello, la orina es sin duda la matriz biológica más utilizada a la hora de realizar seguimientos biológicos de todo tipo de tóxicos.

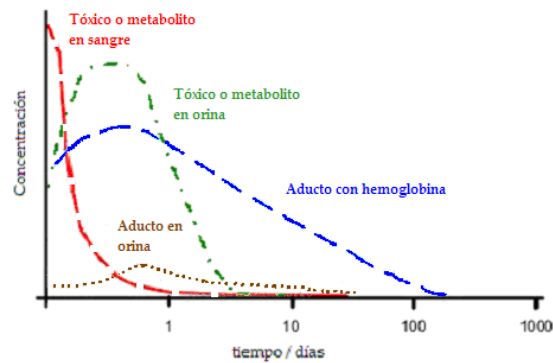


Figura 1.15. Perfiles de concentración de un tóxico no persistente y sus posibles metabolitos y aductos en sangre y orina¹¹²

- *Biomarcadores: clasificación*

Dentro de los requisitos indispensables para el seguimiento biológico, es de especial importancia la disponibilidad de parámetros capaces de reflejar la exposición interna o efectos bioquímicos o biológicos. Dichos parámetros se denominan marcadores biológicos o biomarcadores.

Estrictamente, la palabra biomarcador haría referencia a la respuesta biológica del organismo frente a la agresión de un xenobiótico y no a la presencia de éste o algún metabolito de él en el organismo. Sin embargo, es indudable que la medida del xenobiótico en un sistema biológico es un indicador biológico de exposición, y por tanto, debería ser considerado bajo este concepto.

En este sentido, biomarcador se puede definir, en sentido amplio, como la presencia de un xenobiótico en un fluido biológico y/o las alteraciones inducidas por el mismo sobre los procesos, estructuras o funciones de un organismo vivo, que son cuantificables en un sistema biológico o muestra¹¹⁵. Silbergeld y Davis¹¹⁶ hablan de marcadores biológicos para referirse a señales fisiológicas inducidas por un xenobiótico que reflejan una exposición, una respuesta celular precoz, o una susceptibilidad inherente o adquirida, proporcionando una estrategia para la resolución de estos problemas.

Los biomarcadores pueden utilizarse para evaluar la exposición (cantidad absorbida o dosis interna) y los efectos en el organismo así como la susceptibilidad individual causada por agentes químicos externos. Pueden ser aplicados sin importar la fuente de exposición (oral, ambiental, ocupacional...) y permiten elucidar relaciones causa-efecto y dosis-efecto. Son ampliamente utilizados en campos como la evaluación de riesgos para la salud, el diagnóstico clínico o con fines de monitorización. Los biomarcadores permiten confirmar la exposición de un individuo o una población a una sustancia particular, siendo así el nexo de unión entre la dosis de exposición y la dosis interna.

¹¹⁵ F. Gil Hernández, Rev. Toxicol. 17 (2000) 19. "El papel de los biomarcadores en Toxicología Humana"

¹¹⁶ E. K. Silbergeld, D. L. Davis, Clin. Chem. 40 (1994) 1363. "Role of biomarkers in identifying and understanding environmentally induced disease"

La principal ventaja del empleo de biomarcadores estriba en que considera las variaciones interindividuales e incluso intraindividuales como consecuencia de una alteración fisiopatológica concreta en un período de tiempo determinado. Una de las limitaciones más importantes de los biomarcadores radica en que no pueden aplicarse a sustancias que ejercen sus efectos tóxicos de forma instantánea (por ejemplo, gases y vapores irritantes primarios) o sustancias que tienen una tasa de absorción muy pequeña.

Un biomarcador ideal debería de cumplir los siguientes requisitos¹¹⁷:

- Presentar una recogida de la muestra y análisis sencillo.
- Poseer especificidad.
- Reflejar únicamente un cambio subclínico y reversible.
- Permitir adoptar medidas preventivas.
- Ser éticamente aceptable.

Son muy pocos los biomarcadores que se ajustan a estos requisitos ideales, especialmente el relativo a la especificidad. Así, pueden encontrarse biomarcadores con un margen muy amplio de especificidad. Desde los que presentan una muy alta como, por ejemplo, la inhibición de la acetilcolinesterasa –AChE– por los insectidas organofosforados y carbámicos o la inhibición de la enzima ALA-D (δ -aminolevulinata) por el plomo, hasta los muy inespecíficos como los aductos de ADN o los marcadores de respuesta inmune. De este hecho se desprende que un aspecto importante a valorar sea la complementariedad entre ellos, lo que permite aumentar el grado de especificidad.

La Organización Mundial de la Salud clasifica los marcadores biológicos para el seguimiento de la exposición a agentes biológicos en tres categorías¹¹⁸: biomarcadores de exposición: *“una sustancia exógena o su metabolito, o el producto de una interacción entre el agente xenobiótico y alguna molécula, que se mide en un organismo”*; biomarcadores de efecto: *“una alteración bioquímica y/o fisiológica, dentro de un organismo que,*

¹¹⁷ P. Granjean, S. S. Brown, P. Reavey, D. S. Young, Clin. Chem. 40 (1994) 1360. *“Biomarkers of chemical exposure: state of the art”*

¹¹⁸ WHO Internacional Programme of Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 155, WHO, 1993, Geneva. *“Biomarkers and risk assessment: concepts and principles”*

dependiendo de la magnitud, puede ser reconocida o asociada con una posible o establecida alteración de la salud” y biomarcadores de susceptibilidad: “un indicador de una inherente o adquirida habilidad de un organismo a responder a la exposición a un xenobiótico específico”. Sin embargo, esta subdivisión es algunas veces muy difusa, ya que a menudo resulta imposible establecer claramente la pertenencia a una de estas clases; la respuesta de los biomarcadores puede interpretarse como el “efecto” bioquímico o biológico después de la “exposición” a un cierto tóxico, por lo que, teóricamente, resultan útiles a la vez como biomarcadores de exposición y de efecto. La Tabla 1.3 muestra algunos ejemplos de diferentes biomarcadores y su categoría. En la Figura 1.16 se representa esquemáticamente el método de seguimiento biológico y la situación de los diferentes biomarcadores dentro del proceso general de exposición a un tóxico.

Tabla 1.3. Algunos ejemplos de biomarcadores según la clasificación de la OMS

Biomarcador de Exposición
Plomo en sangre
p-Nitrofenol en orina: <i>biomarcador de organofosforados</i>
α -Naftol en orina: <i>biomarcador de hidrocarburos policíclicos aromáticos</i>
Biomarcador de Efecto
Aumento de proteínas
Aductos de ADN
Nucleósidos hidroxilados
<i>p. ej. 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina</i>
Biomarcador de susceptibilidad
Actividad de ciertas enzimas
<i>p. ej. acetiltransferasa</i>

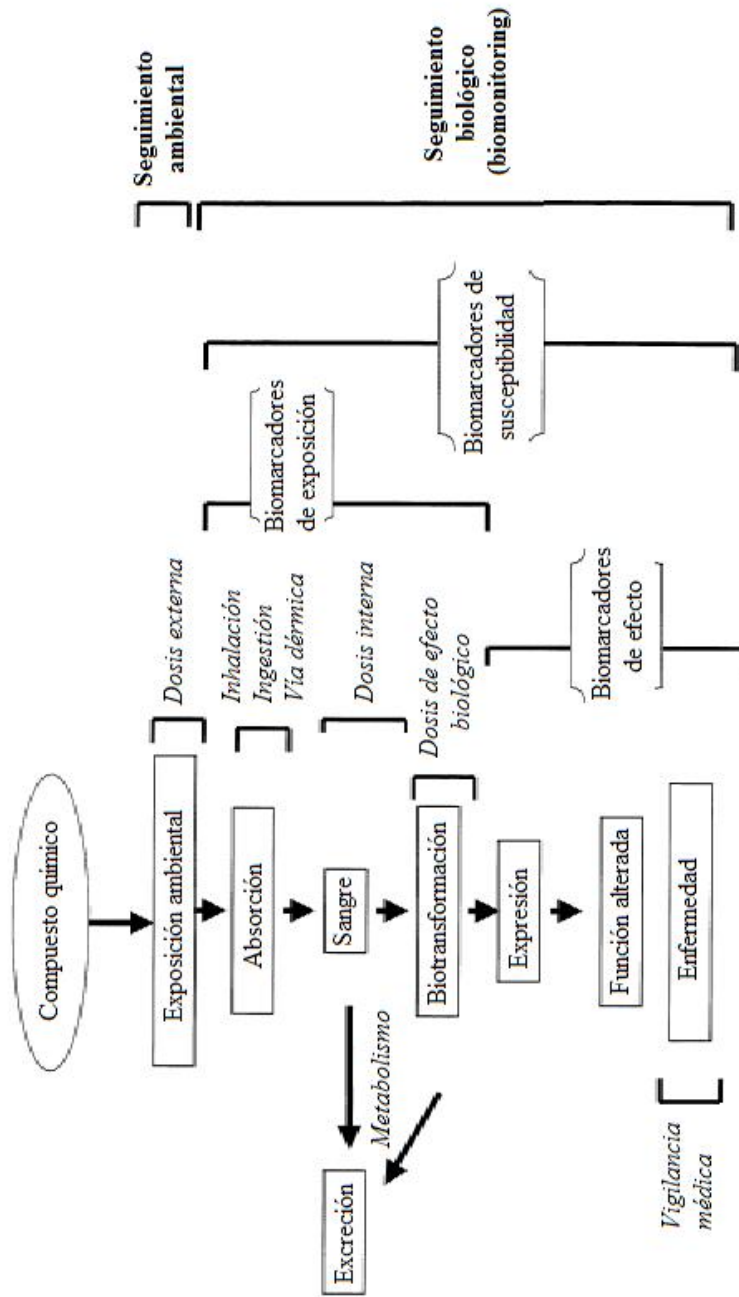


Figura 1.16. Representación esquemática del proceso desencadenado por exposición a un tóxico¹¹⁴

- *Métodos analíticos para la determinación de biomarcadores*

En la determinación de biomarcadores en fluidos biológicos, como forma de evaluación de la exposición humana a compuestos xenobióticos, se utilizan las técnicas de inmunoensayo^{119,120,121} y, fundamentalmente, técnicas cromatográficas tanto de gases^{122,123} como de líquidos^{124,125,126}; en ambos casos acopladas a espectrometría de masas. También se ha utilizado la electroforesis capilar^{127,128} aunque su aplicación es aún escasa.

La mayoría de los métodos descritos en bibliografía abarcan un número limitado de biomarcadores de un mismo grupo de compuestos xenobióticos, probablemente debido a que están enfocados a evaluar la exposición de tipo ocupacional. Esta tendencia está evolucionando debido al creciente interés por evaluar no ya la exposición de tipo ocupacional (exposición a un número limitado de xenobióticos) sino también la exposición de tipo medioambiental (exposición a un amplio número de xenobióticos y de naturaleza muy diferente).

¹¹⁹ R.E. Biaggini, J.P. Smith, D.L. Sammons, B.A. MacKenzie, C.A.F. Striley, S.K. Robertson, J.E. Snawder, *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 368. "Development of a sensitivity enhanced multiplexed fluorescence covalent microbead immunosorbent assay (FCMLA) for the measurement of glyphosate, atrazine and metolachlor mercapturate in water and urine"

¹²⁰ C.J. Hines, J.A. Deedens, C.A. Striley, R.E. Biaggini, D.A. Shoemaker, K.K. Brown, B.A. Mackenzie, R.D. Hull, *Ann. Occup. Hyg.* 47 (2003) 503. "Biological Monitoring for Selected Herbicide Biomarkers in the Urine of Exposed Custom Applicators: Application of Mixed-effect Models"

¹²¹ M.E. Koivunen, K. Dettmer, R. Vermuelen, B. Bakke, S.J. Gee, B.D. Hammock, *Anal. Chim. Acta* 572 (2006) 180. "Improved methods for urinary atrazine mercapturate analysis—Assessment of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and a novel liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) method utilizing online solid phase extraction (SPE)"

¹²² T. Tsukioka, J. Broca, S. Graiser, J. Nguyen, H. Nakazawa, T. Makino, *Anal. Sci.* 19 (2003) 151. "Determination of Trace Amounts of Bisphenol A in Urine by Negative-Ion Chemical-Ionization-Gas Chromatography/Mass Spectrometry"

¹²³ M. Kawaguchi, N. Sakui, N. Okanouchi, R. Ito, K. Saito, S.I. Izumi, T. Makino, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. B* 820 (2005) 49. "Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry for measurement of phenolic xenoestrogens in human urine samples"

¹²⁴ X. Ye, Z. Kuklenyik, L.L. Needham, A.M. Calafat, *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 638. "Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction–high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry"

¹²⁵ M.J. Silva, N.A. Malek, C.C. Hodge, J.A. Reidy, K. Kato, D.B. Barr, L.L. Needham, J.W. Brock, *J. Chromatogr. B* 789 (2003) 393. "Improved quantitative detection of 11 urinary phthalate metabolites in humans using liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry"

¹²⁶ D.B. Barr, P. Panuwet, J.V. Nguyen, S. Udunka, L.L. Needham, *Environ. Health Perspect.* 115 (2007) 1474. "Assessing Exposure to Atrazine and Its Metabolites Using Biomonitoring"

¹²⁷ P.A. Babay, R.T. Gestar, M.F. Silva, B. Thiele, D.A. Batistoni, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 277. "Separation of nonylphenol ethoxylates and nonylphenol by non-aqueous capillary electrophoresis"

¹²⁸ P. Tuma, E. Samcová, V. Kvasnicová, *J. Chromatogr. B* 813 (2004) 255. "Improved detection limit for a direct determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in untreated urine samples by capillary electrophoresis with optical detection"

Dentro del campo del seguimiento biológico a la exposición a pesticidas, tienen un interés especial los trabajos de revisión de métodos analíticos realizados por Barr y Needham¹¹⁴ y por Aprea et al.¹²⁹.

¹²⁹ C. Aprea, C. Colosio, T. Mammone, C. Minoia, M. Maroni, J. Chromatogr. B 769 (2002) 191. “*Biological monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods*”

1.5. Validación y legislación

Los métodos analíticos desarrollados han de ser evaluados y sometidos a prueba para asegurar que producen unos resultados válidos y coherentes con el objetivo previsto, es decir, han de ser validados. Dicha validación se basa, principalmente, en asegurar la calidad de las denominadas propiedades analíticas supremas (exactitud y representatividad), básicas (precisión, sensibilidad, selectividad y muestreo) y complementarias (rapidez, coste, etc.).

Existen diferentes enfoques para llevar a cabo la validación de métodos analíticos. Sin embargo, en los últimos años, diferentes organismos han tratado de normalizar y/o legislar los diferentes requisitos y procedimientos a seguir para considerar una metodología en particular como validada. Puesto que en este trabajo se abordan dos problemáticas diferentes, la determinación de xenobióticos en alimentos y muestras biológicas y la determinación de biomarcadores endógenos, se han utilizado dos normativas diferentes: la “Decisión de la Comisión Europea 2002/657” que establece normas relativas a las medidas de control aplicables respecto a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y la “*Guideline on validation of bioanalytical methods from the European Medicines Agency (EMA)*” que establece recomendaciones para la validación de métodos bioanalíticos aplicados a la determinación de fármacos en matrices biológicas.

1.5.1. Decisión de la Comisión Europea 2002/657¹³⁰

La Decisión 2002/657 incide en dos aspectos diferenciados en lo que respecta al desarrollo de métodos analíticos. Por una parte, fija los criterios de funcionamiento exigibles y, por otra, fija los parámetros de validación que han de cumplir dichos métodos.

¹³⁰ Diario oficial de las Comunidades Europeas L221/8, 17.8.2002. “*Decisión de la Comisión Europea de 12 de agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados*”

1.5.1.1. Criterios de funcionamiento y otros requisitos y procedimientos de los métodos analíticos

En cuanto a los criterios de funcionamiento, la Decisión aclara que los métodos de confirmación para residuos orgánicos o contaminantes incluirán información sobre la estructura química del analito. En consecuencia, los métodos basados exclusivamente en análisis cromatográficos que precinden de la detección espectrométrica no convienen por sí solos como métodos de confirmación.

Más específicamente, se indica que la detección por espectrometría de masas se llevará a cabo mediante técnicas de MS, como el registro de espectros de masa completos (barridos completos) o el control de iones específicos (SIM), así como de técnicas de MS-MSⁿ, como el seguimiento de reacción seleccionada (SRM), u otras técnicas apropiadas de MS o MS-MSⁿ, combinadas con los modos de ionización adecuados. Cuando se miden fracciones de la masa con técnicas distintas de las de barrido completo, ha de utilizarse un sistema de puntos de identificación para interpretar los datos. La confirmación de las sustancias clasificadas en el grupo A del anexo I de la Directiva 96/23/CE requiere un mínimo de 4 puntos de identificación. El Grupo A está formado por sustancias con efecto anabolizante y otros compuestos específicamente no autorizados que deben estar ausentes de las muestras. La confirmación de las sustancias clasificadas en el grupo B del anexo I de la Directiva 96/23/CE, formado por medicamentos veterinarios y otras sustancias y contaminantes medioambientales, requiere un mínimo de 3 puntos de identificación. La relación entre diversos tipos de fracciones de masa y puntos de identificación obtenidos que establece la Decisión se muestra en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4. Relación entre diversos tipos de fracciones de masa y puntos de identificación

Técnica de MS	Puntos de identificación obtenidos por ion
MS de baja resolución (LR)	1.0
Ion precursor en LR-MS ⁿ	1.0
Ion producto en LR-MS ⁿ	1.5
MS de alta resolución (HR)	2.0
Ion precursor en HR-MS ⁿ	2.0
Ion producto en HR-MS ⁿ	2.5

- Cada ion se contará solo una vez
- Para las sustancias del grupo A, si se emplea una de las técnicas de HPLC combinada con DAD puede aportarse un máximo de un punto de identificación
- Los productos de transición abarcan productos de segunda y de tercera generación

1.5.1.2. Parámetros de validación

La Decisión 2002/657 establece que el objetivo de la validación es demostrar que el método analítico cumple los criterios relativos a las características de funcionamiento aplicables. Los parámetros a validar son diferentes según la finalidad del método desarrollado. Así, la Decisión distingue entre métodos cualitativos o cuantitativos y de criba o confirmación. Los parámetros más rigurosos se establecen para los métodos cuantitativos de confirmación para los cuales es necesario determinar la capacidad de detección (CC_{β}), el límite de decisión (CC_{α}), la veracidad o recuperación, la precisión, la selectividad o especificidad, la aplicabilidad o robustez y la estabilidad.

- *La capacidad de detección (CC_{β})* es el contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado en una muestra, con una probabilidad de error β . En el caso de sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido, la capacidad de detección es la concentración mínima en la que un método puede detectar muestras realmente contaminadas con una certeza estadística de $1 - \beta$.
- *El límite de decisión (CC_{α})* es el límite en el cual y a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error α que una muestra no es conforme.

En esta tesis, además de estos dos parámetros también se han determinado otros límites analíticos como el límite de detección (*LOD, Limit Of Detection*) y el de cuantificación (*LOQ, Limit Of Quantification*). Para ello se ha utilizado el criterio de la IUPAC¹³¹ según el cual se establece el límite de detección como la concentración para la que se obtiene una señal tres veces superior a la obtenida para un blanco. El límite de cuantificación se define de igual manera para una relación señal-ruido de diez.

- *La veracidad* es el grado de concordancia existente entre el valor medio obtenido de una gran serie de resultados y un valor de referencia aceptado. Puede ser sustituido por *la recuperación* si no se dispone de material de referencia certificado, definida como el porcentaje de la concentración real de una sustancia recuperado durante el procedimiento analítico. Los valores encontrados solo se consideran aceptables si entran dentro del intervalo de 50% a 120% para concentraciones inferiores a 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$, de 70% a 110% para concentraciones comprendidas entre 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y de 80% a 110% para concentraciones superiores a 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$.
- *La precisión* es el grado de concordancia entre resultados de ensayos independientes obtenidos en condiciones estipuladas (predeterminadas). La precisión suele expresarse como imprecisión y calcularse como desviación estándar de los resultados de los ensayos. Cuanto mayor es la desviación estándar menor es la precisión. Puede distinguirse entre repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio, entendiéndose esta última cuando se evalúan diferentes condiciones ambientales (muestras, operadores, reactivos, disolventes, temperatura...). Se consideran valores de precisión aceptables cuando las desviaciones estándar no superan el 20% para concentraciones comprendidas entre 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

¹³¹ IUPAC. Compiled by A.D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). "Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book")".

kg⁻¹, el 15% para concentraciones comprendidas entre 100 µg kg⁻¹ y 1000 µg kg⁻¹ y el 10% para concentraciones superiores a 1000 µg kg⁻¹.

- *La especificidad o selectividad* es la capacidad de un método de distinguir entre el analito que se está midiendo y otras sustancias. Esta característica está íntimamente relacionada con la técnica de detección utilizada, pero puede variar en función del tipo de compuesto o de la matriz.
- *La aplicabilidad o robustez* es la susceptibilidad de un método analítico a los cambios de las condiciones experimentales, que pueden expresarse en forma de lista de los materiales, de la muestra, los analitos, las condiciones de almacenamiento o las condiciones ambientales o de preparación de la muestra en las que puede aplicarse el método tal cual o con determinadas modificaciones menores.
- *La estabilidad* hace referencia al analito o los constituyentes de la matriz en la muestra durante el almacenamiento o el análisis que puedan dar origen a desviaciones significativas del resultado del análisis.

1.5.2. Guía de validación de métodos bioanalíticos (EMEA)¹³²

La guía de validación de métodos bioanalíticos, aprobada por la Agencia Europea del Medicamento en 2011, establece recomendaciones para la validación de concentraciones de fármacos en matrices biológicas obtenidas en estudios de toxicocinética en animales y en ensayos clínicos, siendo su principal objetivo demostrar la validez de un método analítico para la determinación de un analito en una matriz biológica específica, tales como sangre, plasma, orina, saliva o tejido. A

¹³² EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). 21.07.2011 European Medicines Agency (EMA). "Guideline on bioanalytical method validation"

pesar de que los fármacos y su metabolitos no forman parte de los analitos de estudio de esta tesis, se decidió hacer uso de esta guía de validación, en el análisis de nucleósidos y nucleobases, por el amplio tratamiento que en ella se hace sobre las matrices biológicas y, en particular, sobre la determinación de compuestos endógenos.

Las principales características del método bioanalítico a asegurar, según la citada guía, son: la selectividad, el efecto memoria, el límite de cuantificación, la curva de calibrado, la exactitud, la precisión, el efecto de matriz y la estabilidad de los analitos, tanto en la matriz biológica como en las disoluciones *stock* y de trabajo. Además, cuando se utiliza MS como detección, se recomienda la utilización de un patrón interno marcado isotópicamente (*ILIS, Isotope Labeled Internal Standard*).

- *La selectividad* es la capacidad de un método de distinguir entre los analitos de interés y otros componentes endógenos de la matriz. Según la guía, han de analizarse al menos seis matrices de diferente origen. Por otra parte, se considera que no existen interferentes cuando la señal de estos es inferior al 20% de la obtenida para el límite de cuantificación.
- El *efecto de memoria (carry-over)* hace referencia a la posible contaminación entre muestras consecutivas. Puede considerarse que no existe dicho efecto cuando la señal para un blanco inyectado tras una muestra de alta concentración es inferior al 20% de la señal obtenida para el límite de cuantificación.
- El *límite de cuantificación (LLOQ, Lower Limit Of Quantification)* es la concentración más baja de analito en la que este puede ser cuantificado con unos valores de exactitud y precisión aceptables. El LLOQ de un método debe adaptarse a las concentraciones esperadas y ha de suponer el punto más bajo de la curva de calibrado.

- La *curva de calibrado* es la respuesta del instrumento frente a la concentración de analito. El intervalo abarcado ha de adaptarse a las necesidades del método, siendo la concentración más baja el LLOQ. Deben establecerse al menos seis niveles de concentración que han de analizarse por duplicado. Las concentraciones recalculadas deben estar en el intervalo de ± 15 % del valor nominal, con excepción del LLOQ para el que se admite un intervalo de ± 20 %.
- La *exactitud* se define como la proximidad entre el valor obtenido con el método y el valor nominal de concentración del analito. Ha de establecerse utilizando muestras dopadas, denominadas muestras QC (*Quality Control samples*), que han de ser independientes de los estándares de calibración. El valor de exactitud suele expresarse como porcentaje del valor nominal y ha de asegurarse a diferentes niveles de concentración (cinco muestras por nivel a cuatro niveles de concentración). Los valores obtenidos deben estar en el intervalo de ± 15 % del valor nominal, con excepción del LLOQ para el que se admite un intervalo de ± 20 %.
- La *precisión* es definida como la proximidad entre medidas individuales repetidas para un analito y se expresa como coeficiente de variación (*CV, Coefficient of Variation*). Ha de determinarse para diferentes niveles de concentración (LLOQ, medios y altos) y en una misma secuencia (al menos cinco muestras para cada nivel de concentración) y en secuencias diferentes (tres secuencias analizadas en, al menos, dos días diferentes). Los coeficientes de variación obtenidos deben ser inferiores a ± 15 %, con excepción del LLOQ para el que se admiten coeficientes de hasta el ± 20 %.
- El *efecto de matriz* debe ser investigado cuando se validan métodos que emplean espectrometría de masas, utilizando al menos seis matrices diferentes. En ningún caso deben utilizarse

mezclas de matrices. Para cada analito y patrón interno debe calcularse el factor de matriz (*MF, Matrix Factor*) como la relación entre el área de pico en la matriz (blancos dopados tras la extracción) y en disolución estándar. Debe también calcularse el MF normalizado como la relación entre el MF del analito y el MF del ILIS. El coeficiente de variación del MF normalizado debe ser inferior al 15% para niveles de concentración altos y bajos. Si no puede utilizarse este enfoque, por ejemplo en métodos con tratamiento de muestra *on-line*, pueden analizarse muestras dopadas previamente o que presenten los analitos de forma endógena. En todo caso el coeficiente de variación no debe ser superior al 15% para las áreas de pico obtenidas.

- La *estabilidad* debe ser evaluada para asegurar que todas las etapas de la preparación y análisis de la muestra, así como las condiciones de almacenamiento, no afectan a la concentración del analito. Especialmente han de estudiarse los ciclos de congelación/descongelación.

OBJETO

2

La tesis que se presenta está enfocada al desarrollo de nuevos métodos analíticos basados en el acoplamiento de la espectrometría de masas a técnicas separativas de alta eficacia, como la electroforesis capilar y la cromatografía líquida de alta resolución. Estos acoplamientos se aplicarán a la resolución de problemas de especial interés relacionados con la seguridad alimentaria y con la sanidad ambiental. Así, se plantea la determinación de residuos tóxicos en alimentos y la evaluación de compuestos endógenos y exógenos utilizados como biomarcadores en muestras biológicas.

El objetivo global de la tesis es el desarrollo de nuevas metodologías que respondan a las demandas que tiene planteadas actualmente la Química Analítica tales como la simplificación de los procedimientos analíticos, tanto en las etapas de tratamiento de muestra, especialmente laboriosas, como en los aspectos relacionados con la separación-cuantificación e identificación.

Concretamente, se desarrollarán nuevas estrategias de tratamiento de muestra (extracción-preconcentración-limpieza) utilizando sorbentes constituidos por materiales de acceso restringido, en configuraciones *on-line*, que faciliten o reduzcan las etapas del proceso global. Se dedicará especial atención al desarrollo metodológico de estas etapas de tratamiento de muestra basadas en la utilización de estos sorbentes para poder realizar, siempre que sea posible, un tratamiento de muestra automatizado. Estos materiales excluyen a macromoléculas como proteínas y otras sustancias polares gracias a un mecanismo de exclusión molecular y a su polaridad superficial. Por ello, uno de los objetivos de esta tesis es poner de manifiesto que el uso de estos materiales permite la automatización del tratamiento de muestra con matrices de gran complejidad como alimentos o muestras biológicas, al proporcionar una limpieza adecuada para el posterior análisis cromatográfico o electroforético.

Un segundo enfoque es el estudio de nuevos mecanismos cromatográficos que permitan ampliar el número de compuestos analizables. Este aspecto está dirigido al estudio de la cromatografía de interacciones hidrofílicas para la separación de compuestos de elevada polaridad. En este apartado se realizará un estudio detallado de los mecanismos de retención que tienen lugar en cromatografía líquida de

interacciones hidrofílicas (HILIC) cuando se utiliza en la separación de compuestos de alta polaridad. De especial relevancia es la evaluación cuantitativa de la contribución electrostática al mecanismo de retención. También se realizará un estudio del posible acoplamiento de la cromatografía líquida de interacciones hidrofílicas a sistemas de cromatografía en fase inversa (HILIC–RPLC), con objeto de poder efectuar una determinación simultánea y automática de compuestos endógenos (habitualmente compuestos de elevada polaridad) y de compuestos exógenos utilizados como biomarcadores de exposición a compuestos xenobióticos (de polaridad intermedia y baja).

En los distintos métodos desarrollados se empleará la detección por espectrometría de masas en distintas modalidades (cuadrupolo, triple cuadrupolo, trampa iónica) para optimizar la detección e identificación de los analitos, estudiando los procesos de fragmentación y las transiciones que puedan proporcionar una identificación inequívoca.

Finalmente, cabe destacar que, desde el punto de vista metodológico, esta tesis es unitaria en su planteamiento, ya que las innovaciones metodológicas que se pretenden abordar están enfocadas al establecimiento de métodos analíticos rápidos, sensibles y selectivos, y que además puedan cumplir los criterios establecidos por la Legislación para su validación como métodos cuantitativos de confirmación en el análisis de los compuestos de interés. Los compuestos de interés en las distintas matrices objeto de estudio en esta tesis se pueden dividir en: contaminantes en alimentos (capítulo 4) y biomarcadores en muestras biológicas (capítulo 5).

Entre los objetivos concretos se puede señalar que se desarrollarán nuevas metodologías automatizadas y validadas para la determinación de distintos disruptores endocrinos en muestras de miel utilizando métodos cromatográficos y electroforéticos. Otro estudio dentro de este apartado será la optimización de un método automatizado para la determinación de diversos benzimidazoles en muestras de leche.

Otro objetivo ha sido el desarrollo de distintos métodos de análisis para la separación, identificación y cuantificación, a niveles de trazas en muestras de orina, de biomarcadores de exposición o exógenos

utilizando cromatografía de fase reversa (RPLC) y biomarcadores de efecto o endógenos usando cromatografía líquida de interacciones hidrofílicas (HILIC) con una fase estacionaria zwitteriónica. Los biomarcadores exógenos estudiados son compuestos xenobióticos de especial relevancia por su amplio uso en actividades agrícolas e industriales. Los biomarcadores endógenos estudiados están relacionados con las alteraciones del ADN/ARN: nucleósidos modificados por metilación (1-metilguanina, 7-metilguanina, 9-metilguanina, 7-metilguanosina y 1-metiladenosina) e hidroxilación (8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina y 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina). El método desarrollado se aplicará al análisis de muestras de pacientes oncológicos para conocer el potencial de estos biomarcadores en el diagnóstico o monitorización del progreso de la enfermedad oncológica.

EXPERIMENTAL

3

3.1. Patrones, disolventes y reactivos

3.1.1. Patrones

- *Fenoles:*

Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania)

- Bisfenol-F (BPF), *bis-(4-hidroxifenil) metano*, CAS RN [620-92-8]
- Bisfenol-A (BPA), *bis-(4-hidroxifenil)propano*, CAS RN [80-05-7]
- Tertbutilfenol (tBPL), *4-(1,1-dimetiletil)fenol*, CAS RN [98-54-4]
- Diclorofenol (DCPL), *2,4-diclorofenol*, CAS RN [120-83-2]
- Triclorofenol (TCPL), *2,4,5-triclorofenol*, CAS RN [95-95-4]
- Pentaclorofenol (PCPL), *pentaclorofenol*, CAS RN [87-86-5]

Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania)

- Ácido tertbutilbenzoico (tBBA), *ácido 4-(1,1-dimetiletil) benzoico*, CAS RN [98-73-7]
- n-Octilfenol (nOPL), *4-octilfenol*, CAS RN [1806-26-4]
- Tertoctilfenol (tOPL), *4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenol*, CAS RN [140-66-9]

- *Benzimidazoles:*

Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania)

- Albendazol (ABZ), *N-(6-propilsulfanil-benzimidazol-2-il)carbamato de metilo*, CAS RN [54965-21-8]
- Albendazol-sulfóxido (ABZ-SO), *N-(6-propilsulfinil-benzimidazol-2-il)carbamato de metilo*, CAS RN [54029-12-8]
- Albendazol-sulfona (ABZ-SO₂), *N-(6-propilsulfonil-benzimidazol-2-il)carbamato de metilo*, CAS RN [75184-71-3]
- Albendazol-2-aminosulfona (ABZ-NH₂-SO₂), *N-(6-propilsulfonil-benzimidazol-2-il)amina*; CAS RN [80983-34-2]
- Carbendazim (MBC), *N-(benzimidazol-2-il)carbamato de metilo*, CAS RN [10605-21-7]

Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania)

- Fenbendazol (FBZ), *N*-(6-fenilsulfanil-benzimidazol-2-il)carbamato de metilo, CAS RN [53571-02-1]
 - Oxfendazol (OFZ), *N*-(6-fenilsulfonil-benzimidazol-2-il)carbamato de metilo, CAS RN [53716-50-0]
 - Fenbendazol sulfona (FBZ-SO₂), *N*-(6-fenilsulfonil-benzimidazol-2-il)carbamato de metilo, CAS RN [54029-20-8]
 - Oxibendazol (OXI), *N*-(6-propoxi-benzimidazol-2-il)carbamato de metilo, CAS RN [20559-55-1]
 - Flubendazol (FLU), *N*-[6-(4-fluorofenil)-benzimidazol-2-il]carbamato de metilo, CAS RN [31430-15-6]
 - 2-amino-flubendazol (FLU-HMET), *N*-(6-(4-fluorofenil)-benzimidazol-2-il)amina, CAS RN [82050-13-3]
 - Febantel (FBT), [2-[2-(2-metoxiacetamido)-4-(fenilsulfanil)fenil]imidocarbonil]dicarbamato de metilo, CAS RN [58306-30-2]
- *Pesticidas y contaminantes industriales:*

Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania)

- Atrazina (Atz), 6-cloro-2-*N*-etil-4-*N*-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina, CAS RN [1912-24-9]
- Carbarilo (Cbl), 1-naftil-*N*-metilcarbamato, CAS RN [63-25-2]
- Clorometilfenilurea (CMPU), 1-(3-cloro-4-metilfenil)urea, CAS RN [13142-64-8]
- Clortolurón (Clt), 3-(3-cloro-4-metilfenil)-1,1-dimetilurea, CAS RN [15545-48-9]
- Dicloroanilina (DiClAnil), 3-4-dicloroanilina, CAS RN [95-76-1]
- Diurón (Din), 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea, CAS RN [330-54-1]
- 1-Naftol (1NPL), 1-hidroxinaftaleno, CAS RN [90-15-3]

Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania)

- Bisfenol-F (BPF), bis-(4-hidroxifenil)metano, CAS RN [620-92-8]
- Bisfenol-A (BPA), bis-(4-hidroxifenil)propano, CAS RN [80-05-7]
- Cloroanilina (ClAnil), 4-cloroanilina, CAS RN [106-47-8]

- Triclorofenol (TCPL), *2,4,5-triclorofenol*, CAS RN [95-95-4]
- 2,4,5-T (245T), *ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético*, CAS RN [93-76-5]
- 2,4,5-TP (245TP), *ácido 2-(2,4,5-triclorofenoxi)propiónico*, CAS RN [93-72-1]

- *Nucleobases y nucleósidos:*

- Cayman Chemical (Michigan, EEUU)

- 8-hidroxi-guanosina (8OHG), CAS RN [3868-31-3]
 - 8-hidroxi-guanina (8OHGua), CAS RN [5614-64-2]

- Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania)

- 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OH2dG), CAS RN [88847-89-6]
 - 9-metil-guanina (9mGua), CAS RN [5502-78-3]
 - 1-metil-guanina (1mGua), CAS RN [938-85-2]
 - 7-metil-guanina (7mGua), CAS RN [578-76-7]
 - 7-metil-guanosina (7mG), CAS RN [20244-86-4]
 - 1-metil-adenosina (1mA), CAS RN [15763-06-1]
 - Uridina (URN), CAS RN [58-96-8]
 - Inosina (INN), CAS RN [58-63-9]
 - Adenosina (ADN), CAS RN [58-61-7]
 - Guanina (Gua), CAS RN [73-40-5]

- Cambridge Isotope Laboratories (Massachusetts, EEUU)

- 8-¹³C-guanina (13C-Gua), 98%
 - 2'-¹³C-adenosina (13C-ADN), 99%

3.1.2. *Disolventes y reactivos*

- *Preparación de fases móviles*

- Agua ultrapura (18.2 MΩ·cm a 25 °C, COT < 10 ppb) obtenida con un sistema de purificación Wasserlab Ultramatic (Noain, España)

-
- Metanol (MeOH), grado HPLC, suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania)
 - Acetonitrilo (ACN), grado HPLC, suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania)
 - Formiato amónico puro (> 98%) suministrado por Riedel de Hæen (Hannover, Alemania)
 - Ácido fórmico puro (> 98%) suministrado por Fluka (Steinheim, Alemania)
 - *Otros disolventes y reactivos*
 - Ácido cítrico monohidratado (>99.5%) suministrado por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania)
 - Disodiohidrogenofosfato dihidratado, grado reactivo, suministrado por Scharlau (Barcelona, España)
 - Hidróxido sódico, grado reactivo, suministrado por Scharlau (Barcelona, España)
 - Dimetilsulfóxido (DMSO), para análisis, suministrado por Panreac (Barcelona, España)
 - Sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (AEDT), grado reactivo, Scharlau (Barcelona, España)
 - Acetato de etilo (AcOEt), grado HPLC, suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania)
 - Amoníaco concentrado (25 %), grado reactivo, suministrado por Scharlau (Barcelona, España)
 - Ácido clorhídrico concentrado (37 %), para análisis, suministrado por Scharlau (Barcelona, España)
 - Perclorato amónico, grado reactivo, suministrado por Scharlau (Barcelona, España)
 - Perclorato potásico, grado reactivo, suministrado por Scharlau (Barcelona, España)
 - Ácido pícrico (> 98%) suministrado por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania)
 - Creatinina (> 98%) suministrada por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania)

3.2. Disoluciones estándar

Se prepararon disoluciones estándar, a partir de los patrones, disolviendo 12.5 mg de cada uno en 25 mL de disolvente ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$). Los disolventes se seleccionaron de acuerdo a la solubilidad de los analitos y su compatibilidad con el proceso cromatográfico. Así, los patrones de fenoles, pesticidas y compuestos industriales se disolvieron en ACN; los benzimidazoles en DMSO y, finalmente, los nucleósidos y nucleobases en agua ultrapura, acidificando (HCl 0.1 M) cuando fue necesario para su completa disolución. Como excepción, los nucleósidos modificados por hidroxilación y los marcadores isotópicamente se prepararon en agua ultrapura a una concentración de $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Para 8OHGua fue necesario alcalinizar (NaOH 0.1 M).

Las disoluciones estándar fueron almacenadas en frascos topacio a 4°C , con excepción de las disoluciones de benzimidazoles que se almacenaron a temperatura ambiente. A partir de ellas se prepararon diariamente, por dilución, las disoluciones de trabajo.

3.3. Material e instrumentación

Los materiales de acceso restringido (RAMs) utilizados fueron tres LiChroCART 24-5 LiChrospher RP4 ADS, RP8 ADS y RP18 ADS de 25×4.0 mm (Figura 3.1). Estos materiales presentan un tamaño de partícula de $25 \mu\text{m}$, un tamaño de poro de 60 \AA y la cadena alquílica correspondiente en cada caso (C4, C8 y C18). Fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania). También se utilizó un RAM MSpak 4A, empaquetado con un copolímero hidrofílico conteniendo N-vinilacetamida y con un tamaño de $10 \text{ mm} \times 4.0 \text{ mm}$ suministrado por Shodex (Kawasaki, Japón). Se utilizó también, tanto *on-line* ($20 \times 4.6 \text{ mm}$) como *off-line*, un sorbente polimérico Oasis HLB (60 mg) suministrado por Waters (Milford, EEUU) formado por un copolímero de divinilbenceno y N-vinilpirrolidona. Otro sorbente utilizado *on-line* fue el Isolute ENV+, empaquetado manualmente con partículas de $100 \mu\text{m}$ formadas por un polímero de divinilbenceno hidroxilado, suministrado por International Sorbent Technology (Cambridge, Reino Unido).



Figura 3.1. Cartucho RAM y su carcasa capaz de soportar altas presiones

Las columnas analíticas de fase inversa (RPLC) utilizadas fueron una Luna PFP(2) de 150 x 4.60 mm empaquetada con partículas de 3 μm suministrada por Phenomenex (California, EEUU), una ZORBAX Eclipse XDB-C18 de 150 x 4.60 mm empaquetada con partículas de 3 μm suministrada por Agilent (Waldbronn, Alemania) y una ACE 3 C18-PFP de 100 x 2.10 mm empaquetada con partículas de 3 μm suministrada por Advanced Chromatography Technologies (Aberdeen, Escocia).

Las columnas analíticas de interacciones hidrofílicas (HILIC) utilizadas fueron una Luna HILIC de 150 x 4.60 mm empaquetada con partículas de 3 μm suministrada por Phenomenex (California, EEUU), dos ZIC-HILIC de 150 x 4.60 mm y de 100 x 2.10 mm empaquetadas con partículas de 3.5 μm suministradas por Merck (Darmstadt, Alemania) y una XBridge Amide de 100 x 2.10 mm empaquetada con partículas de 3.5 μm suministrada por Waters (Massachusetts, EEUU).

Los capilares empleados en la separación electroforética fueron de sílice fundida, con un diámetro interno de 50 μm y una longitud de 87.5 cm. Los capilares fueron suministrados por CM Scientific (ShIPLEY, West Yorkshire, Reino Unido).

Los equipos de cromatografía líquida utilizados fueron Agilent (Waldbronn, Alemania) modelos 1100 y 1260. Ambos equipos modulares están formados por dos bombas de alta presión, un automuestreador equipado con un bucle de inyección de 1500 μL , una válvula de seis vías, un desgasificador de membrana y un detector de barrera de diodos que permite registrar el espectro de cada pico cromatográfico en el margen de longitudes de onda de 190 a 400 nm. El modelo 1100 está controlado por el *software* Agilent HP ChemStation, versión B.01.03 y el modelo 1260 por el *software* MassHunter, versión

B.04.00. Ambos permiten la recogida de los datos procedentes de los detectores y la integración posterior de las señales.

La separación electroforética se llevó a cabo en un equipo Hewlett Packard 3D (Waldbronn, Alemania) equipado con un detector espectrofotométrico de barrera de diodos (DAD) Todo el sistema está controlado por el *software* Agilent HP ChemStation, versión B.04.01, que permite la recogida de los datos procedentes de ambos detectores y la integración posterior de las señales.

Para la detección por LC-MS se emplearon dos espectrómetros: una trampa iónica Agilent MSD Trap XCT y un triple cuadrupolo Agilent 6410. Ambos están equipados con una sonda de electrospray pudiendo trabajar en modo positivo o negativo.

Para la detección por CE-MS se empleó un detector de cuadrupolo simple Agilent LC/MSD SL, con una interfaz de electrospray (ESI). Dicha interfaz CE-MS tiene un diseño de tipo coaxial por el que circula el líquido adicional impulsado mediante una bomba isocrática HP 1100 Series de Hewlett Packard (Waldbronn, Alemania).

Para las medidas fotométricas de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV/Vis 160.

El resto del material utilizado es el usual de laboratorio: balanza analítica, agitadores magnéticos, diferente material volumétrico, pHmetro, etc.

3.3.1. Configuración instrumental en el acoplamiento RAM-LC

La configuración instrumental utilizada en el acoplamiento RAM-LC se muestra en la Figura 1.14 (Pág. 43), que corresponde a la configuración instrumental de columnas acopladas en modo “*back-flush*”. Esta configuración, menos restrictiva que la de columna única, permite eliminar los interferentes de matriz a la vez que se produce una posible preconcentración de los analitos con anterioridad a su separación en la columna cromatográfica. El tipo de RAM utilizado depende de cada uno de los métodos desarrollados.

Para llevar a cabo la limpieza de la muestra, la inyección se produce mientras la válvula está en la posición de carga (Figura 1.14.A)

y es impulsada al RAM por la bomba 1. La válvula permanece en esta posición durante un tiempo prefijado mientras la columna cromatográfica se está acondicionando. Transcurrido este tiempo, la válvula cambia a la posición de elución (Figura 1.14.B), arrastrando los analitos a la columna mediante la bomba 2 y separándolos posteriormente mediante el gradiente cromatográfico preestablecido en cada caso.

3.3.2. Otras configuraciones instrumentales

La configuración de columnas acopladas explicada anteriormente es la más utilizada a lo largo de esta tesis. Sin embargo, en el acoplamiento de RAM a electroforesis capilar o cromatografía líquida bidimensional no es posible aplicar directamente dicha configuración siendo necesario realizar ciertas modificaciones.

En el caso del acoplamiento RAM-CE se utilizó una configuración *off-line* basada en dos válvulas de seis vías. Esta configuración es equivalente a la modalidad de columna única con la salvedad de que el eluyente del RAM no alcanza directamente el detector sino que es recogido para su posterior determinación por CE. Este acoplamiento se muestra en detalle en la Figura II.1 (Pág. 141).

Para el acoplamiento RAM-LC-LC se amplió la configuración de columnas acopladas, añadiendo una segunda válvula de seis vías, una tercera bomba cromatográfica y una conexión T; con el fin de incorporar una segunda columna separativa. Este acoplamiento se muestra en detalle en la Figura 6.9 (Pág. 355-7).

3.4 Muestras analizadas

- *Miel:*

Se seleccionaron muestras de miel polifloral de diferentes marcas comerciales. Todas ellas fueron analizadas no encontrándose señal para los analitos de interés en ninguna de ellas por lo que se procedió a trabajar con muestras dopadas, añadiendo la cantidad adecuada de disolución estándar. Las muestras de miel dopadas fueron cerradas y almacenadas durante 12 horas en la oscuridad para permitir la interacción entre los analitos y los componentes de la matriz. A continuación, las muestras fueron diluidas con agua ultrapura (1:5, p/v), agitadas vigorosamente y filtradas (*nylon*, 5.0 μm) para finalmente ser analizadas siguiendo los métodos desarrollados en esta tesis.

- *Leche:*

Se seleccionaron muestras de leche de vaca que fueron almacenadas en la oscuridad y a 4°C hasta su utilización. Las leches utilizadas fueron:

- Entera (leche 1)
- Desnatada (leche 2)
- Con fibra (leche 3)
- Con calcio (leche 4)
- Con calcio e isoflavonas de soja (leche 5)
- Con aceites vegetales, ácido fólico y vitaminas B6 y B12 (leche 6)
- De cabra no comercial (leche 7)
- De vaca no comercial (leche 8)

Las dos muestras de leches no comerciales proceden de una granja ecológica y, por lo tanto, provienen de animales que no han sido tratados con antihelmínticos.

Todas las muestras de leche fueron analizadas no encontrándose señal para los analitos de interés en ninguna de ellas por lo que se procedió a trabajar con muestras dopadas, añadiendo la cantidad adecuada de disolución estándar. Las muestras de leche así dopadas fueron almacenadas durante 12 horas en la oscuridad antes de

proceder a su análisis. Para llevar a cabo el pretratamiento de las muestras se siguieron los siguientes pasos:

- 2.5 mL de leche se mezclan con 5 mL de MeOH, 2.5 mL de tampón McIlvaine (pH 2.5) y 0.37 g de sal disódica de AEDT (0.1 M). De esta manera, la muestra se somete a una dilución 1:4 (v/v)
 - La muestra diluida se centrifuga durante 15 minutos a 4000 rpm (2500 g)
 - El suero obtenido se separa y se lleva a pH 7.2 con NaOH 2 M con el fin de que todos los benzimidazoles se encuentren sin carga y presenten una adecuada retención
 - Finalmente se filtra (Polifluoruro de vinilideno, *PVDF*, *PolyVinylidene DiFluoride*, 0.22 μm) y analiza
-
- *Orina:*

Se recogieron muestras de orina de seis voluntarios sanos (nombradas como H1-H6) y de seis pacientes oncológicos hospitalizados (nombradas como C1-C6). Las muestras se almacenaron en frascos topacio de 250 mL y se congelaron inmediatamente. En el momento previo al análisis fueron descongeladas a temperatura ambiente y filtradas (*nylon* 0.45 μm ; *PVDF* 0.22 μm). Para compensar las posibles variaciones en la concentración de la orina, todos los valores de concentración de analitos fueron normalizados frente a la concentración de creatinina y, por lo tanto, expresados como nmol de analito frente a μmol de creatinina.

Los niveles de creatinina fueron determinados según el método de Jaffè, basado en la detección fotométrica del complejo formado entre la creatinina y el ácido pícrico¹³³. La creatinina reacciona con el picrato alcalino produciendo un cromógeno rojo. Se ha demostrado que los cromógenos generados por otros compuestos diferentes a la creatinina, que interfieren, se forman en los 30 segundos iniciales de reacción. Por

¹³³ M. Jaffè, Z. Physiol. Chem. 10 (1886) 391. "Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins"

lo tanto, entre los 30 segundos y los 5 minutos posteriores al inicio de reacción, el incremento de color se debe exclusivamente a la creatinina.

En el análisis de biomarcadores de exposición a pesticidas y compuestos industriales, todas las muestras fueron analizadas no encontrándose señal para los analitos en ninguna de ellas por lo que se procedió a trabajar con muestras dopadas, añadiendo la cantidad adecuada de disolución estándar.

En el análisis de nucleobases y nucleósidos, presentes en la orina de forma natural, todas las muestras fueron dopadas con patrón interno ($8\text{-}^{13}\text{C}$ -guanina y $2'\text{-}^{13}\text{C}$ -adenosina) a una concentración de 500 ng mL^{-1} .

3.5. Validación y legislación

Los diferentes métodos analíticos desarrollados a lo largo de esta tesis fueron validados según la Decisión de la Comisión Europea 2002/657 y la Guía de validación de métodos bioanalíticos de la EMEA. La primera se aplicó en la determinación de xenobióticos, tanto en alimentos (Capítulo 4, Pág. 93) como en muestras biológicas (Capítulo 5.A, Pág. 185) y la segunda en la determinación de marcadores endógenos (Capítulo 5.B, Pág. 241). A continuación se detalla cómo se determinaron experimentalmente los diferentes parámetros según ambas normativas.

3.5.1. Decisión de la Comisión Europea 2002/657¹³⁰

Como ya se ha indicado (Pág. 60), la Decisión 2002/657 establece que el objetivo de la validación es demostrar que el método analítico cumple los criterios relativos a las características de funcionamiento aplicables. Los parámetros a validar son diferentes según la finalidad del método desarrollado. Así, la Decisión indica que en los métodos cuantitativos de confirmación es necesario determinar la capacidad de detección (CC_{β}), el límite de decisión (CC_{α}), la veracidad o recuperación, la precisión, la selectividad o especificidad, la aplicabilidad o robustez y la estabilidad.

- *La capacidad de detección (CC_{β}) y El límite de decisión (CC_{α})*

Estos límites se calcularon a partir de las curvas de calibrado según el criterio de Verdon et al¹³⁴. Dicho criterio, conforme a la Decisión 2002/657, propone calcular estos límites como la concentración correspondiente a la ordenada en el origen más 2.33 veces su desviación estándar para el límite de decisión y más 3.97 veces para la capacidad de detección. Así, para un calibrado cuya ecuación general es:

¹³⁴ E. Verdon, D. Hurtaud-Pessel, P. Sanders, *Accred. Qual. Assur.* 11 (2006) 58. "Evaluation of the limit of performance of an analytical method based on a statistical calculation of its critical concentrations according to ISO standard 11843: Application to routine control of banned veterinary drug residues in food according to European Decision 657/2002/EC."

$$y = a + b \cdot x$$

El límite de decisión y la capacidad de detección se expresan como:

$$CC_{\alpha} = \frac{2.33 S_a}{b}$$

$$CC_{\beta} = CC_{\alpha} + \frac{1.64 S_a}{b}$$

donde b es la pendiente del calibrado y S_a la desviación estándar de la ordenada en el origen.

- *La veracidad o la recuperación*

Al no disponer de materiales de referencia certificados se determinaron, en todos los casos, los valores de recuperación. Se analizaron muestras en matriz real dopadas a 3 niveles de concentración, siendo estos, 0.5, 1.0 y 1.5 veces el límite permitido más pequeño para los casos en que existe dicho límite.

- *La precisión*

Se determinó la repetibilidad analizando 8 réplicas por cada muestra, en matriz real, a 3 niveles de concentración en el mismo día (precisión "*intraday*"). De igual manera se calculó la reproducibilidad intralaboratorio pero, en este caso, analizando réplicas de tres días consecutivos (precisión "*interday*").

- *La especificidad o selectividad*

En general, se aseguró la especificidad comparando las señales de patrones con muestras en matriz real dopadas y sin dopar. En todo caso, la especificidad está asegurada dado el alto nivel de selectividad propio de la espectrometría de masas en tándem.

- *La aplicabilidad o robustez*

El alto grado de automatización que permite la utilización de los RAM como método de tratamiento de muestra asegura, en gran medida, la robustez del método. Dada la elevada vida de los RAM se estudió, en todos los casos, el posible efecto memoria del sistema. También se evaluó la robustez mediante el análisis de muestras de diversa naturaleza y origen.

- *La estabilidad*

Se aseguró la estabilidad controlando las condiciones de almacenamiento de analitos y muestras manteniendo los parámetros de conservación (temperatura, humedad, ausencia de luz, etc.) dentro del margen de los valores establecidos por el suministrador.

3.5.2. *Guía de validación de métodos bioanalíticos (EMEA)*¹³²

- *La selectividad*

Además de por el alto grado de selectividad inherente a la detección por espectrometría de masas en tándem, se aseguró la selectividad evaluando los posibles interferentes presentes en seis matrices de orina diferentes (H1-H6) y reanalizando tres de los nucleósidos estudiados utilizando transiciones SRM secundarias.

- *El efecto de memoria (carry-over)*

Una de las principales desventajas del uso de los RAM, dada su elevada vida útil, es el posible efecto de memoria entre muestras. Se estudió este posible efecto inyectando un blanco después de doce inyecciones de orina, siendo la última de las muestras de elevado concentración.

- La *exactitud*

El enfoque planteado por la guía de validación de métodos bioanalíticos para determinar la exactitud no puede utilizarse cuando se analizan compuestos endógenos, debido a que no pueden conseguirse muestras blancas (sin analito) con las que preparar las muestras QC. Una solución ampliamente aplicada para abordar este problema es la cuantificación mediante el método de la adición estándar¹³⁵. La exactitud se determinó analizando seis matrices de orina diferentes (H1-H6) por el método de la adición estándar, comparando los resultados con los obtenidos con la metodología propuesta. Cabe destacar que los diferentes analitos estudiados están presentes en un amplio intervalo de concentraciones. Este hecho permite evaluar la exactitud del método a distintos niveles de concentración.

- La *precisión*

La precisión se evaluó analizando una muestra de orina sin dopar (H1) inyectada ocho veces consecutivas en tres días diferentes. Las nucleósidos y nucleobases, presentes de forma endógena, están presentes en un amplio intervalo de concentraciones lo que permitió evaluar la precisión a diferentes niveles: bajo, medio y alto.

- El *efecto de matriz*

Para evaluar el efecto de matriz, se calcularon el MF y el MF normalizado con el patrón interno. Para ello se doparon muestras de orina a un nivel de concentración para el cual la concentración endógena puede considerarse despreciable para la mayoría de los analitos.

¹³⁵ N.C. van de Merbel, Trends Anal. Chem. 27 (2008) 924. “Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques”

- La *estabilidad*

Se aseguró la estabilidad controlando las condiciones de almacenamiento de analitos y muestras manteniendo los parámetros de conservación (temperatura, humedad, ausencia de luz, etc.) dentro del margen de los valores establecidos por el suministrador. Se estudió la estabilidad analizando una muestra de orina tras someterla a 5 ciclos de congelación/descongelación.

**DETERMINACIÓN DE
COMPUESTOS XENOBIÓTICOS
EN ALIMENTOS**

4

4.A. DETERMINACIÓN DE DISRUPTORES ENDOCRINOS EN MIEL

4.A.1. Objeto

El estudio realizado en este apartado está centrado en la puesta a punto de diversas metodologías de tratamiento de muestra haciendo uso de materiales de acceso restringido (RAM) con cadenas alquílicas de C4, C8 y C18, para la determinación de diversos disruptores endocrinos, compuestos capaces de interrumpir o modificar la acción del sistema endocrino y generar anomalías fisiológicas o bioquímicas. Concretamente, los compuestos en estudio son: bisfenol A (BPA), bisfenol F (BPF), 4-tert-butilfenol (tBPL), n-octilfenol (nOPL), 4-tert-octilfenol (tOPL), 2,4-diclorofenol (DCPL), 2,4,5-triclorofenol (TCPL), pentaclorofenol (PCPL) y el ácido p-t-butylbenzoico (tBBA). La determinación de estos compuestos hidroxilados en muestras medioambientales es amplia; sin embargo, su evaluación en alimentos es más escasa. Una vez optimizado el tratamiento de la muestra se acoplará a cromatografía líquida de fase inversa (RPLC) desarrollándose así un sistema de análisis automático. Como método de detección se utilizará la espectrometría de masas en tándem con trampa iónica con el fin de asegurar la correcta identificación de los analitos estudiados a través de las diferentes rutas de fragmentación.

Adicionalmente, se utilizará el tratamiento con materiales RAM, desarrollado previamente, con la técnica de separación de electroforesis capilar. Con el fin de aumentar la sensibilidad será necesario realizar una etapa posterior de preconcentración *off-line* utilizando, en este caso, materiales poliméricos. Antes de realizar el tratamiento de muestra, se optimizará el acoplamiento de la electroforesis capilar con espectrometría de masas con cuadrupolo simple a través de una interfase "*sheath flow*", estudiándose las variables que influyen en la sensibilidad del método.

4.A.2. Introducción

4.A.2.1. Fenoles como disruptores endocrinos

Cada vez es mayor la preocupación por el estudio y determinación de una serie de sustancias utilizadas en la industria, la agricultura y los bienes de consumo de las que se sospecha que interfieren en los procesos endocrinos de los seres humanos y de los animales. Tales sustancias reciben el nombre de disruptores endocrinos y pueden ser causa de perjuicios para la salud como el cáncer, alteraciones del comportamiento y anomalías en la reproducción.

El sistema endocrino está formado por una serie de glándulas que, mediante las hormonas que producen, ayudan a dirigir el desarrollo, crecimiento, la reproducción y el comportamiento de personas y animales. Se cree que las sustancias que alteran los procesos endocrinos pueden interferir en el funcionamiento de este sistema al menos de tres formas¹³⁶ (Figura 4.1):

- Imitando la acción de las hormonas naturales y provocando en el organismo reacciones químicas similares.
- Bloqueando los receptores hormonales de las células e imposibilitando la acción de las hormonas normales.
- Interfiriendo en la síntesis, el transporte, el metabolismo y la secreción de hormonas con la consiguiente alteración de las concentraciones hormonales naturales.

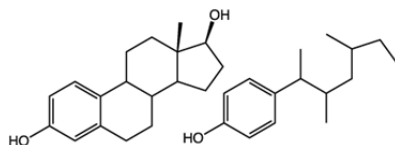


Figura 4.1. Comparación de las estructuras de la hormona estradiol y el compuesto nonilfenol

¹³⁶ J.A. Rogers, L. Metz, V.W. Yong, Mol. Immunol. 53 (2013) 421. "Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: A focus on bisphenol-A and its potential mechanisms"

El número de sustancias químicas sospechosas de producir alteraciones en los procesos endocrinos es considerable y engloba a una gran diversidad de compuestos pudiéndose distinguir dos grandes tipos:

- Hormonas naturales como los estrógenos, la progesterona y la testosterona, que se encuentran de forma natural en el organismo de los seres humanos y los animales; o los fitoestrógenos, sustancias presentes en algunas plantas.
- Sustancias artificiales, dentro de las que habría que diferenciar dos grupos: por una parte las hormonas sintéticas y, por otra, las sustancias químicas artificiales concebidas para su aplicación en la industria, la agricultura y en bienes de consumo; además de algunos subproductos generados en los procesos industriales.

Una comisión científica delegada del Parlamento Europeo elaboró un informe¹³⁷ que incluía una lista de 553 sustancias propuestas como posibles disruptores endocrinos clasificadas en tres categorías, establecidas en función de los distintos niveles de información disponibles. Sobre 118 de estas sustancias se admitía ya la existencia de datos que confirmaban su capacidad para causar alteraciones endocrinas. Recientemente, la Organización Mundial de la Salud ha reafirmado la peligrosidad de estos compuestos tanto para los humanos como para la vida silvestre¹³⁸.

La gran diversidad de compuestos evaluados como posibles disruptores endocrinos (pesticidas, bifenilos policlorados, dioxinas, furanos, hidrocarburos policíclicos aromáticos, alquilfenoles, esteroides sintéticos, hormonas naturales...) hace que las vías posibles de exposición a estos compuestos sean muy numerosas. En cuanto a la fauna terrestre, se cree que la exposición es fundamentalmente de origen alimentario. La situación de la fauna acuática es distinta, ya que la absorción directa de sustancias químicas disueltas en el agua es una fuente de exposición de considerable importancia.

¹³⁷ Comunicación de la Comisión al Consejo y al Parlamento Europeo COM/2001/0262. “*Aplicación de la estrategia comunitaria en materia de alteradores endocrinos -sustancias de las que se sospecha interfieren en los sistemas hormonales de seres humanos y animales.*”

¹³⁸ Summary for Decision-Makers, United Nations Environment Programme and the World Health Organization (2013). “*State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012*”

Los compuestos seleccionados para el presente estudio se encuentran dentro de la lista de posibles disruptores endocrinos y son objeto de numerosos estudios dada su amplia aplicación para diversos fines. Se han analizado nueve compuestos (Figura 4.2): los clorofenoles DCPL, TCPL y PCPL; los alquilfenoles tBPL, tOPL y nOPL; y otros bisfenoles y derivados como BPF, BPA y tBBA. Algunas de sus propiedades fisicoquímicas se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos estudiados (25 °C)¹³⁹

Compuesto	log K _{ow}	pK _a	Solubilidad en agua / mg L ⁻¹	Presión de vapor / mm Hg
DCPL	3.1 ± 0.2	7.7	440	0.136
TCPL	3.8 ± 0.3	6.7	87	1.0 10 ⁻²
PCPL	5.1 ± 0.4	4.9	8	3.5 10 ⁻⁴
tBPL	3.4 ± 0.2	10.3	950	3.6 10 ⁻²
tOPL	5.2 ± 0.2	10.2	62	2.0 10 ⁻²
nOPL	5.6 ± 0.2	10.2	33	2.5 10 ⁻⁴
BPA	3.6 ± 0.2	9.8	71	5.3 10 ⁻⁷
BPF	2.8 ± 0.2	9.7	200	1.2 10 ⁻⁶
tBBA	3.8 ± 0.2	4.4	250	1.5 10 ⁻³

¹³⁹ Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 (© 1994-2013 ACD/Labs)

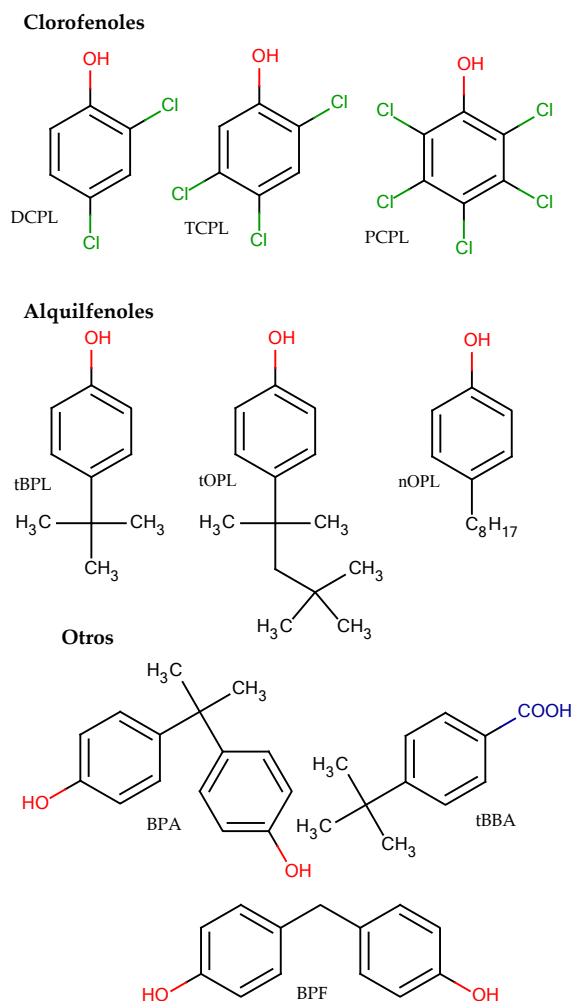


Figura 4.2. Estructura de los compuestos estudiados

En cuanto al uso de estos compuestos, se puede indicar que los alquilfenoles se emplean principalmente en la producción de detergentes derivados de los alquilfenoles etoxilatos y en la fabricación de plásticos. Los bisfenoles A y F son monómeros utilizados en la producción de epoxiresinas y plásticos de policarbonato. Estos plásticos son empleados para el envasado de alimentos y bebidas mientras que las resinas son utilizadas frecuentemente como lacas para cubrir ciertos productos metálicos como tapones y latas para recipientes de alimentos y bebidas, tuberías de suministro de agua, etc.

Los clorofenoles aparecen como subproductos en numerosos procesos industriales en los que se emplea el cloro, como es el caso de las industrias del blanqueo del papel. También han sido utilizados como herbicidas y aparecen en las formulaciones de ciertos pesticidas. El PCPL fue utilizado como biocida para eliminar pequeños microorganismos y, aunque su uso se encuentra prohibido actualmente en la Unión Europea, sigue empleándose en algunos países como conservante de la madera preservándola de la putrefacción y del ataque de plagas. Respecto al tBBA, aparece en la industria farmacéutica como subproducto de ciertas síntesis y como fijador de fragancias.

Como se deduce de su variado número de aplicaciones, estos compuestos pueden encontrarse ampliamente distribuidos en la naturaleza siendo, probablemente, las aguas naturales y los alimentos los dos focos de exposición más importantes¹⁴⁰. El BPA ha sido detectado tanto en aguas naturales superficiales¹⁴¹ como en aguas subterráneas¹⁴², en algunos casos junto al BPF¹⁴³. La presencia de BPA ha sido también confirmada en determinados alimentos como leche en polvo para niños¹⁴⁴, café y té negro¹⁴⁵ y alimentos enlatados y envasados¹⁴⁶. El DCPL, por su parte, ha sido detectado en vegetales frescos¹⁴⁷.

Aunque se considera que la contaminación de los alimentos con este tipo de contaminantes puede producirse a varios niveles durante

¹⁴⁰ T. Geens, D. Aerts, C. Berthot, J.P. Bourguignon, L. Goeyens, P. Lecomte, G. Maghuin-Rogister, A.M. Pironnet, L. Pussemier, M.L. Scippo, J. Van Looco, A. Covaci, *Food. Chem. Toxicol.* 50 (2012) 3725. "A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A"

¹⁴¹ H. Sambe, K. Hoshina, K. Hosoya, J. Haginaka, *J. Chromatogr. A* 1134 (2006) 16. "Simultaneous determination of bisphenol A and its halogenated derivatives in river water by combination of isotope imprinting and liquid chromatography-mass spectrometry"

¹⁴² A. Latorre, S. Lacorte, D. Barceló, *Chromatographia* 57 (2003) 111. "Presence of nonylphenol, octylphenol and bisphenol a in two aquifers close to agricultural, industrial and urban areas"

¹⁴³ E. Herrero-Hernández, E. Rodríguez-Gonzalo, M.S. Andrades, R. Carabias-Martínez, *Sci. Total Environ.* 454 (2013) 299. "Occurrence of phenols and phenoxyacid herbicides in environmental waters using an imprinted polymer as a selective sorbent"

¹⁴⁴ H.W. Kuo, W.H. Ding, *J. Chromatogr. A* 1027 (2004) 67. "Trace determination of bisphenol A and phytoestrogens in infant formula powders by gas chromatography-mass spectrometry"

¹⁴⁵ Y. Kawamura, K. Inoue, H. Nakazawa, T. Yamada, T. Maitani, *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 42 (2001) 71. "Determination of Bisphenol A in Foods Using GC/MS"

¹⁴⁶ H. Gallart-Ayala, E. Moyano, M.T. Galcerán, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1603. "Fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bisphenol A-diglycidyl ether, bisphenol F-diglycidyl ether and their derivatives in canned food and beverages"

¹⁴⁷ K. Sasaki, S. Takatsuki, S. Nemoto, M. Imanaka, S. Eto, E. Murakami, M. Toyoda, *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 40 (1999) 460. "Determination of Alkylphenols and 2, 4-Dichlorophenol in Foods"

su etapa de producción, es la migración de estos compuestos desde los recipientes o desde las envolturas en contacto con ellos, la vía que se considera principal. Numerosos estudios han demostrado la presencia de BPA residual en varios tipos de recipientes de policarbonato, incluidas botellas de leche para bebés¹⁴⁸ y film transparente para envasar alimentos¹⁴⁹.

En definitiva, los disruptores endocrinos están siendo sometidos a un examen continuo y, por ello, el desarrollo de métodos adecuados para su identificación y posterior cuantificación es un requerimiento básico con el fin de poder llevar a cabo acciones legislativas destinadas a proteger a los ciudadanos y al medioambiente del efecto de estos compuestos.

4.A.2.2. Miel

La miel es un alimento natural de excelentes propiedades nutricionales y de consumo generalizado en todo el mundo¹⁵⁰. Dado su sabor dulce se utiliza en ocasiones como sustituto del azúcar y como ingrediente y conservante natural en cientos de comidas preparadas. Desde el punto de vista químico, la miel es una mezcla compleja de carbohidratos, agua, ácidos orgánicos, enzimas, aminoácidos, pigmentos, polen y cera. Estos componentes proceden de la maduración de la propia miel, son añadidos por las abejas o derivan de componentes de las plantas. Su composición depende en gran medida de la especie de planta de la que haya sido recogido el néctar, así como de factores medioambientales y climáticos. La miel en bruto contiene elementos externos como polen, cera, levaduras y cristales de dextrosa hidratada. Salvo que la humedad sea inferior al 17%, no se produce fermentación. La miel cristaliza con el tiempo salvo que sea procesada. El procesado de la miel incluye tratamiento térmico para eliminar la levadura y disolver los cristales de dextrosa, combinado con filtración por presión. Normalmente se calienta hasta una temperatura de 32-

¹⁴⁸ K.O. Wong, L.W. Leo, H.L. Seah, *Food Addit. Contam.* 22 (2005) 280. "Dietary exposure assessment of infants to bisphenol A from the use of polycarbonate baby milk bottles"

¹⁴⁹ J. López-Cervantes, P. Paseiro-Losada, *Food Addit. Contam.* 20 (2003) 596. "Determination of bisphenol A in, and its migration from, PVC stretch film used for food packaging"

¹⁵⁰ E. Anklam, *Food Chem.* 63 (1998) 549. "A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey"

40°C, temperatura similar a la de las colmenas. Pueden encontrarse en el mercado diferentes presentaciones según su clasificación física (prensada, centrifugada, escurrida...) así como diferentes formas (en panal, cristalizada o granulada, cremosa, procesada a alta temperatura...).

La miel es una interesante matriz a la hora de estudiar la contaminación por disruptores endocrinos dada su amplia difusión mundial. En los estudios realizados por Inoue et al.¹⁵¹, encuentran que la fuente de contaminación más probable parece ser la migración de estos compuestos desde las epoxiresinas y otros plásticos que recubren los bidones metálicos en los que se transporta la miel para su importación. Estos mismos autores no encuentran diferencias significativas, en los contenidos de BPA, entre la miel envasada para su venta final en recipientes plásticos o de vidrio.

¹⁵¹ K. Inoue, S. Murayama, K. Takeba, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, J. Food Com. Anal. 16 (2003) 497. "Contamination of xenoestrogens bisphenol A and F in honey: safety assessment and analytical method of these compounds in honey"

4.A.3. Determinación cromatográfica de disruptores endocrinos fenólicos en miel: RAM-RPLC-MS/MS (IT)

El análisis de disruptores endocrinos ha sido llevado a cabo, habitualmente, utilizando métodos de tratamiento de muestra laboriosos y manuales; entre los que destaca SPE. Como alternativa se plantea el uso de RAM, que, aunque han sido muy utilizados para el tratamiento de muestras biológicas, fin para el que fueron inicialmente diseñados, su uso para el tratamiento de muestras de alimentos es muy escaso. Partiendo de este hecho, se estudió las posibilidades que ofrece un RAM de la familia ADS como etapa de tratamiento de muestra en el análisis de disruptores endocrinos en miel.

Así, el objetivo que se plantea es el desarrollo de una metodología RAM-RPLC-MS/MS que permita el análisis automático de disruptores endocrinos en miel, eliminando totalmente el tratamiento de muestra manual. Este hecho redundará en análisis con mejor precisión y menor coste y tiempo requerido. Además, en el caso de los fenoles volátiles estudiados, se minimiza la pérdida de analitos durante el análisis, hecho habitual cuando se utiliza SPE como método de tratamiento. Por otro parte, la utilización de un detector de espectrometría de masas en tándem, permite el desarrollo de métodos analíticos con gran capacidad de cuantificación e identificación segura de los analitos.

Hasta la fecha, ningún trabajo de investigación ha propuesto el uso de RAM para el análisis de contaminantes en miel.

4.A.3.1. Optimización de la separación cromatográfica

La separación cromatográfica de los nueve analitos estudiados se optimizó buscando maximizar la separación y la compatibilidad con el detector de espectrometría de masas. Para ello, se seleccionó como fase móvil una mezcla agua/metanol con un alto contenido orgánico, facilitándose así el proceso de ionización por electrospray. Además, también se redujo lo máximo posible la presencia de sales, con el fin de

mejorar el proceso de ionización¹⁵². Siguiendo estos criterios, se consiguió la separación de los fenoles estudiados en 19 minutos, aplicando un gradiente del 80% al 100% de metanol, con una fase acuosa formada por un tampón ácido fórmico / formiato amónico 1.0 mM (pH: 3.4) y un flujo de fase móvil de 0.65 mL min⁻¹.

4.A.3.2. Optimización de los parámetros de la trampa iónica

La trampa iónica requiere la optimización de ciertos parámetros instrumentales, para poder así maximizar la señal de los analitos, lo que redundaría en una mayor sensibilidad instrumental. Pueden distinguirse dos grandes grupos de factores a optimizar: por una parte, los parámetros generales de la trampa iónica y, por otra, los parámetros dependientes de cada analito particular y que están principalmente relacionados con la etapa de fragmentación.

Los parámetros generales a optimizar están en gran parte ligados a la correcta formación del spray en la fuente de ionización. Dado que esta depende principalmente del flujo de fase móvil, que viene impuesto por la separación cromatográfica, la posible variación de dichos parámetros está muy restringida. Por lo tanto, se tomaron como parámetros óptimos los tabulados por el fabricante para un flujo de fase móvil de 0.65 mL min⁻¹. Así, los parámetros fijados fueron:

- Voltaje del capilar: -3500 V
- Flujo de gas de secado (N₂): 10 L min⁻¹
- Temperatura de gas de secado (N₂): 350°C
- Presión de nebulización: 50 psi

Otros parámetros generales que deben ser fijados son el intervalo de masas de barrido, el tiempo máximo de acumulación, el máximo de iones en la trampa (*smart target*) y el ancho de la ventana de aislamiento. Para el barrido de masas se seleccionó un intervalo de 60 a 400 u acorde con los analitos de bajo peso molecular estudiados. El tiempo máximo de acumulación y el *smart target* se fijaron en los valores habituales de 200

¹⁵² R. Kostianen, T.J. Kauppila, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 685. "Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry"

ms y de 50000 a 100000 iones. El ancho de la ventana de aislamiento se fijó en 4 u, valor óptimo cuando se busca maximizar la sensibilidad.

Además de los parámetros generales es necesario optimizar una serie de factores que dependen de la naturaleza propia de cada analito. Para ello se instaló una unión T en el sistema instrumental de manera que en la fuente de ionización confluyeron dos caudales: uno constituido por una disolución, con una composición idéntica a la fase móvil optimizada, a 0.3 mL min^{-1} , y otro de una disolución estándar ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) del analito a estudiar, a 1 mL h^{-1} inyectado a través de una jeringa manual. Bajo esta configuración se optimizaron los siguientes factores:

- *Polaridad del ESI*: La fuente de ionización permite trabajar en modo positivo o negativo lo que conlleva la detección en el analizador de masas de cationes o aniones, respectivamente. Puede determinarse la polaridad óptima de antemano puesto que los analitos ácidos tienden a formar aniones y los básicos cationes. Sin embargo, este hecho debe ser verificado experimentalmente puesto que no puede descartarse la formación de especies protonadas en medio básico o de especies desprotonadas en medio ácido, fenómeno conocido como *wrong-way-round ionization*¹⁵³. En el caso de los fenoles estudiados, se obtienen señales óptimas en modo negativo, como cabía esperar dada la naturaleza ácida de dichos compuestos.
- *Fragmentación en la trampa*: Para cada analito, se seleccionó el ion más abundante que se tomó como ion precursor en la fragmentación. La energía a transmitir a dicho ion para fragmentarlo se determinó como la amplitud (en voltios) que produjo la fragmentación de un 90% del ion, procurándose mantener, por lo tanto, una señal para el ion precursor de aproximadamente un 10 % de la original. El primer ion de fragmentación más abundante se seleccionó como ion producto para la transición de identificación y el segundo más abundante como ion producto para la transición de confirmación.
- *Ventanas de detección*: El proceso de detección de un analito en la trampa iónica requiere el aislamiento del ion precursor, su

¹⁵³ S. Zhou, K.D. Cook, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 11 (2000) 961. "Protonation in electrospray mass spectrometry: wrong-way-round or right-way-round?"

fragmentación y el posterior aislamiento del ion producto lo que conlleva un tiempo no despreciable. Si se prefijan demasiados analitos existe el riesgo de obtener pocas señales para cada pico cromatográfico lo que conduce a la obtención de picos de forma muy poco definida imposibilitando la cuantificación. Este problema puede solucionarse trabajando con analizadores de masas ultrarrápidos o utilizando la estrategia de las ventanas prefijadas. Dicha estrategia consiste en prefijar ventanas de tiempo para la detección de cada analito de manera tal que éstos no son rastreados durante todo el tiempo de análisis sino sólo durante el tiempo de su ventana. Como inconveniente, se hace necesario conocer los tiempos de retención cromatográficos para cada analito por lo que hay que llevar a cabo un estudio previo en dicho sentido. Por lo tanto, una vez conocidos los tiempos de retención cromatográficos, se fijaron las correspondientes ventanas, tomando como criterio la presencia del menor número posible de analitos por ventana y siempre que la separación entre los picos cromatográficos fuera lo suficientemente clara como para establecer una línea divisoria.

Todos los parámetros optimizados, característicos de cada analito, se muestran en la Tabla I.1 (artículo publicado I, Pág. 119).

4.A.3.3. Optimización del tratamiento de muestra utilizando materiales de acceso restringido

Con el fin de optimizar el tratamiento de muestra, se acopló el RAM al sistema RPLC-DAD de forma on-line. En la Figura I.1.a (Pág. 120) se muestra el cromatograma de una muestra de miel inyectada directamente en el sistema RPLC-DAD, es decir, sin utilizar el RAM como tratamiento de muestra. Se observa un importante número de picos cromatográficos de elevada intensidad, correspondientes a los interferentes de la matriz. En la figura I.1.b y I.1.c se muestran los cromatogramas obtenidos al inyectar la misma muestra en el sistema RAM-RPLC-DAD, utilizando RAM-ADS de naturaleza C18 (Fig. I.1.b) y C4 (Fig. I.1.c). Puede observarse que el número e intensidad de los picos decrece considerablemente, en comparación con la inyección

directa (I.1.a). Estos resultados indican que el RAM puede utilizarse como etapa de extracción y limpieza.

La comparación de los cromatogramas obtenidos con los RAM-ADS C18 y C4 muestra que, en ambos casos, se consigue un nivel de limpieza adecuado, aunque el obtenido para el RAM-ADS de naturaleza C4 es ligeramente superior. Así, se seleccionó este RAM (ADS-C4) como el más adecuado para el análisis de los compuestos de interés en miel, y con él se llevaron a cabo todos los análisis posteriores.

Posteriormente se procedió a la optimización del disolvente de lavado del RAM y que a la vez impulsa a la muestra a su través. El objetivo de dicha optimización es maximizar el lavado sin que este afecte negativamente a la retención de los analitos en el RAM. Son dos los factores que influyen principalmente en estos parámetros: el porcentaje de fase orgánica en el disolvente de lavado y el tiempo de lavado. Un incremento en el componente orgánico del disolvente de lavado ha de conllevar una mejor eliminación de los interferentes de matriz. Sin embargo, un incremento excesivo puede producir la elución (no retención) de los analitos estudiados. Así, se estudió la influencia de los porcentajes de acetonitrilo, comprendidos entre el 0% y el 25%, para un tiempo de lavado de 3 minutos. En cada caso, se calcularon las recuperaciones para cada analito comparando la concentración obtenida, a través de un calibrado, con la concentración original del patrón inyectado. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.3.

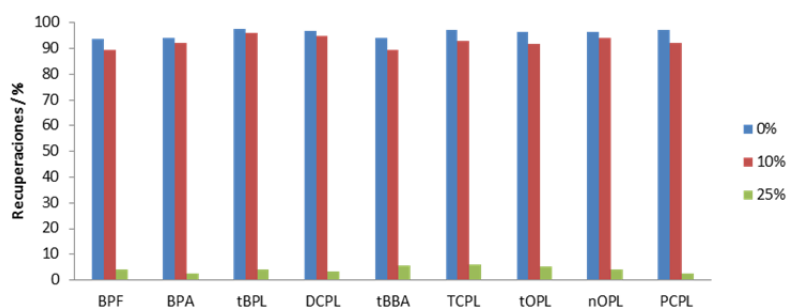


Figura 4.3. Recuperaciones obtenidas con el RAM-ADS-C4 utilizando diferentes porcentajes de ACN en el disolvente de lavado. Tiempo de lavado: 3 minutos

Se observa en la figura como las recuperaciones permanecen prácticamente constantes, en torno a un 90%, para porcentajes de ACN iguales o inferiores al 10%. El incremento, hasta un 25%, produce en fuerte descenso en la recuperación para todos los analitos estudiados. A la vista de estos resultados, se fijó como disolvente de lavado una disolución acuosa 2.5 mM de tampón ácido fórmico / formiato amónico (pH: 2.9) conteniendo un 10% de ACN.

Partiendo de la composición del disolvente de lavado ya optimizado, se estudió el efecto del tiempo de lavado, es decir, del tiempo que dicho disolvente circula a través del RAM desde la inyección hasta el cambio en la válvula de seis vías. Se estudiaron tiempos desde 3 a 15 minutos, encontrándose que en ningún caso se producía una mejora significativa de la limpieza obtenida. A partir de estos resultados, se seleccionó como óptimo un tiempo de lavado de 3 minutos, buscando no alargar innecesariamente el tiempo total de análisis.

Una de las principales ventajas de RAM, además de su capacidad de limpieza *on-line*, es la posibilidad de actuar como elemento de preconcentración, al permitir la inyección de grandes volúmenes de muestra. Para estudiar esta posibilidad, se inyectaron volúmenes crecientes de una muestra de miel dopada a un nivel de concentración de $4 \mu\text{g g}^{-1}$ en el sistema RAM-RPLC-MS/MS. Los resultados obtenidos para tres de los analitos estudiados, en el intervalo de 20 a 1500 μL de muestra inyectada, se muestran en la Figura I.2 (Pág. 121).

Puede observarse que la señal aumenta al hacerlo el volumen inyectado alcanzando un valor máximo, saturación de la señal del detector, para volúmenes superiores a 500 μL . Por lo tanto, se seleccionó este volumen, considerándolo como el más alto que puede inyectarse sin que se produzca saturación de la señal analítica. La Tabla 4.2 muestra, a modo de resumen, la tabla de tiempos optimizada para efectuar la etapa de tratamiento *on-line* utilizando el RAM.

Tabla 4.2. Tabla de tiempos del método RAM-RPLC-MS/MS desarrollado según la configuración instrumental mostrada en la Figura 1.14 (Pág. 43)

Tiempo /min	Bomba 1 ^a Flujo / mL min ⁻¹	Bomba 2 ^{b,c} B / %	Válvula de 6 vías	Evento
0-3	1	80	Carga	Inyección (500 µL) y limpieza
3-20	0.3	80 → 100	Elución	Transferencia y separación
20-23	0.3 → 1	100	Elución	Separación de analitos
23-26	1	100 → 80	Elución	Equilibrando
26-30	1	80	Carga	Equilibrando

a. Fase móvil: tampon ácido fórmico / formiato amónico 2.5 mM (pH: 2.9) con 10 % de ACN

b. Flujo: 0.65 mL min⁻¹

c. Fase móvil: A: tampon ácido fórmico / formiato amónico 1.0 mM (pH: 3.4) B: MeOH

En la Figura I.4. (Pág. 123) se muestra el cromatograma de ion total (*TIC, total ion chromatogram*) y los cromatogramas de ion extraído (*EIC o XIC, Extracted ion chromatogram*) para cada uno de los fenoles analizados a un nivel de concentración de 10 ng g⁻¹.

4.A.3.4. Estudio del efecto de matriz

La presencia de interferentes de la matriz que coeluyan con los analitos de interés puede producir, en la ionización por electrospray, el efecto de matriz conocido como supresión iónica. Este efecto puede ser incluso más pronunciado en el método desarrollado debido a la gran cantidad de volumen inyectado, si bien es de esperar que la limpieza aportada por el RAM corrija en gran medida este problema.

Este hecho puede verse claramente reflejado en la Figura I.3. (Pág. 122) donde se muestra el TIC al inyectar un patrón acuoso (Fig. I.3.a), una muestra de miel inyectada según el método RAM-RPLC-MS/MS propuesto (Fig. I.3.b) y la misma muestra de miel inyectada directamente en el sistema RPLC-MS/MS (Fig. I.3.c).

Se observa que la señal total de los analitos en el patrón acuoso y en la muestra de miel inyectada utilizando el método propuesto (RAM-RPLC-MS/MS) son similares tanto en intensidad como en forma. Sin

embargo, la señal para la miel inyectada directamente en el sistema RPLC-MS/MS, es decir, sin utilizar el RAM, es claramente inferior al sufrir una fuerte supresión iónica. Este hecho demuestra la gran eficiencia del RAM en el lavado de la muestra eliminando los interferentes de matriz.

En todo caso, aunque la configuración RAM-RPLC-MS/MS reduce en gran medida la supresión iónica, esta sigue existiendo. Para cuantificar dicho efecto de matriz se utilizó la fórmula propuesta por Feitosa-Felizzola et al.¹⁵⁴:

$$\text{Supresión iónica (\%)} = \frac{A_p - (A_m - A_{bm})}{A_p} 100$$

donde A_p es el área de un patrón acuoso, A_m es el área de una muestra en matriz real dopada al mismo nivel de concentración que el patrón acuoso y A_{bm} es el área para una muestra real de matriz sin dopar. Las supresiones iónicas, así calculadas para cada uno de los analitos, se muestran en la Tabla I.2 (Pág. 123). Los valores encontrados variaron entre el 4.6% para tBBA y el 24% para tBPL. El hecho de que la supresión iónica, aunque eliminada en gran medida, siguiera estando presente, hace inadecuada la calibración por patrón externo. Por ello, la calibración se realizó en matriz real libre de analito (*matrix-matched calibration*).

Las supresiones iónicas calculadas no presentan correlación con los tiempos de retención, correlación que sí se observa con la constante de acidez (Figura 4.4).

¹⁵⁴ J. Feitosa-Felizzola, B. Temine, S. Chiron, J. Chromatogr. A 1164 (2007) 95. "Evaluating on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-ion trap mass spectrometry for reliable quantification and confirmation of several classes of antibiotics in urban wastewaters"

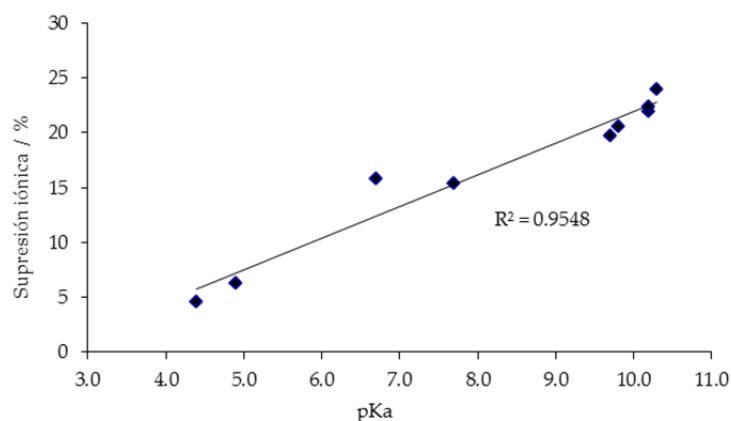


Figura 4.4. Correlación entre la constante ácida de los fenoles estudiados (pK_a) y la supresión iónica calculada para el método RAM-RPLC-MS/MS propuesto

Esta correlación puede entenderse si se tiene en cuenta que la formación de los iones en el electrospray es uno de los factores críticos en LC-ESI-MS. La eficiencia de esta etapa depende de la presencia previa de los iones estudiados en fase líquida o su posterior generación, a través de mecanismos complejos, en fase gaseosa¹⁵². De acuerdo con esto, el pK_a de los analitos es un factor relevante ya que marca la tendencia de los compuestos a formar especies aniónicas. La competencia entre estas especies aniónicas y los interferentes de la matriz es uno de los factores que suelen citarse como más importantes en el proceso de la ionización por electrospray y, por lo tanto, fuente principal de la supresión iónica. Además, dado que la supresión iónica afecta de forma directa a la sensibilidad, la correlación entre la constante de acidez y la supresión iónica se extiende a otros parámetros analíticos, como por ejemplo el límite de detección.

4.A.3.5. Validación del método analítico RAM-RPLC-MS/MS

El método analítico RAM-RPLC-MS/MS propuesto para el análisis de nueve disruptores endocrinos en miel fue validado según la Decisión 2002/657 (sección 3.5.1, Pág. 88). La identificación de los analitos se realizó a partir de sus diferentes tiempos de retención y determinando los distintos puntos de identificación (IPs). En el

apéndice I de esta memoria de tesis se muestran los espectros de iones precursores, obtenidos en un barrido completo y los espectros de iones productos obtenidos tras producirse la fragmentación del ion más abundante. En el apéndice I se muestran también las estructuras más probables de los fragmentos más abundantes.

En la etapa de validación, la trampa iónica se configuró en la modalidad de barrido de iones producto, registrándose un espectro completo de estos iones con el que se comprobó la existencia tanto de las transiciones de cuantificación como de las de confirmación. En estas condiciones de trabajo propuestas, se obtuvieron entre 3 y 5 puntos de identificación para seis de los analitos estudiados (BPF, BPA, DCPL, TCPL, tOPL y PCPL, Tabla I.1, Pág. 119). Sin embargo, no fue posible obtener el número mínimo de puntos de identificación para tBPL, tBBA y nOPL debido, principalmente, a la pobre fragmentación que presentan estos analitos en la trampa iónica. Por lo tanto, estos tres compuestos fueron eliminados del proceso de validación, ya que no cumplían los requisitos de confirmación exigidos por la Decisión 2002/657. Para los seis analitos restantes se obtuvo la señal analítica a través de los cromatogramas de ion extraído (EIC) de los iones producto correspondientes a las transiciones de confirmación.

Los diferentes parámetros de la validación, para los seis fenoles, son ampliamente discutidos en el artículo de investigación I (Pág. 122). A modo de resumen, cabe destacar que se alcanzaron valores de CC_{α} en el intervalo 2-13 ng g^{-1} y valores de CC_{β} comprendidos entre 3 ng g^{-1} y 22 ng g^{-1} . Los valores de recuperaciones están comprendidos entre el 88% y el 120% y los valores de RSDs *interday* variaron entre el 5% y el 11% para muestra de miel dopadas a 12.5 ng g^{-1} y 20 ng g^{-1} , respectivamente. (Tabla I.3, Pág. 124). Se debe destacar que el RAM utilizado mostró una elevada robustez y vida útil, soportando al menos 150 inyecciones de muestra, equivalentes a 16 g de miel.

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN I
Analytical and Bioanalytical Chemistry 398 (2010) 1239

A confirmatory method for the determination of phenolic endocrine disruptors in honey using restricted-access material–liquid chromatography–tandem mass spectrometry

E. Rodríguez-Gonzalo · D. García-Gómez ·
R. Carabias-Martínez

Received: 27 January 2010 / Revised: 22 February 2010 / Accepted: 25 February 2010 / Published online: 26 March 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract The present work describes the development and validation of an analytical method based on liquid chromatography (LC), coupled with tandem mass spectrometry (MS/MS) that allows the determination and confirmation of several endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in honey. The EDCs studied were nine phenols of different nature: chlorophenols (2,4-dichlorophenol, 2,4,5-trichlorophenol, and pentachlorophenol), alkylphenols (4-*tert*-butylphenol, 4-*tert*-octylphenol, and 4-*n*-octylphenol) bisphenols (bisphenol-A and bisphenol-F), and 4-*tert*-butylbenzoic acid. The method incorporates a restricted-access material (RAM), coupled on-line to the LC-MS/MS system, which allows direct injection of the matrix into the RAM-LC-MS/MS system. The optimized method developed, RAM-LC-MS/MS, was applied to fortified honey samples, affording detection limits in the 0.6–7.2 ng g⁻¹ range, calculated for a signal-to-noise ratio of 3. In addition, the method was validated as a quantitative confirmatory method according to European Union Decision 2002/657/EC. The validation criteria evaluated were linearity, repeatability, reproducibility, recovery, decision limits, detection capabilities, specificity, and ruggedness. Repeatability and within-laboratory reproducibility were evaluated at two concentration levels, being ±11% or below at 20 ng g⁻¹. The decision limits (CC_α) and detection capabilities (CC_β) were in the 1.7–12.6 and 2.8–21.6 ng g⁻¹ range, respectively.

Keywords Endocrine-disrupting chemicals · Phenolic compounds · Honey · Liquid chromatography–tandem mass spectrometry · Validation according to 2002/657/EC · Restricted-access materials

Introduction

Honey is a healthy natural product with excellent nutritional properties. Since it is a product consumed worldwide, it is evident that human health should be taken into consideration in regards to its consumption. Owing to its sweetness, color, and different flavors, honey is often used as a sugar substitute, as is an ingredient, or used as a natural preservative in hundreds of manufactured foods. From the chemical point of view, honey is a complex mixture of sugars. Its composition depends strongly on the plant species from which the nectar or honey dew has been collected as well as on other factors such as environmental conditions and climate [1].

To ensure the safety and quality control of honey, it is necessary to perform the analysis of chemical contaminants in honey in order to assure that this natural product does not contain toxic residues in quantities that might imply a risk for consumers. Accordingly, sensitive, selective, fast, and inexpensive analytical methods for food analysis are continuously under development.

The analysis of hazardous compounds at trace level in complex matrices includes a procedure of sample preparation, which can cover analyte isolation, trace enrichment, and further cleanup to remove matrix interferences. The sample treatment techniques frequently employed for the isolation and enrichment of chemical contaminants from honey are liquid–liquid extraction (LLE) [2, 3], solid-phase extraction (SPE) [4–6], solid-phase microextraction (SPME) [7] and matrix solid-phase dispersion (MSPD)

E. Rodríguez-Gonzalo (✉) · D. García-Gómez ·
R. Carabias-Martínez
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología,
Facultad de Química, Universidad de Salamanca,
37008 Salamanca, Spain
e-mail: erg@usal.es

[8]. Other analytical procedures reported involve supercritical fluid extraction (SFE) [9], ultrasound-assisted extraction (UAE) [10] or pressurized liquid extraction (PLE) [11].

Restricted-access materials (RAMs) are porous chromatographic supports specifically designed to allow solid-liquid extraction and the enrichment of small molecules, limiting the access of macromolecules to the interaction sites of a stationary phase bonded to their inner surface. Only small molecules are able to penetrate into the pores and interact with the solid sorbent on the inner surface, while large molecules are eluted with the clean-up solvent. RAMs were initially designed to remove proteins in the analysis of drugs in biological matrices [12–14], although they have also found applications in environmental analysis [15]. However, only a few studies have been reported regarding the applications of RAMs to sample treatment steps in food analysis [16].

The present study was aimed at developing a simple, fast, precise, accurate, and highly automated analytical approach for the identification and quantification of several EDCs in honey. The analytes assayed were: bisphenol A (BPA), bisphenol F (BPF), 4-*tert*-butylbenzoic acid (tBBA), the chlorophenols 2,4-dichlorophenol (DCPL), 2,4,5-trichlorophenol (TCPL) and pentachlorophenol (PCPL), 4-*tert*-butylphenol (tBPL), 4-*tert*-octylphenol (tOPL) and 4-*n*-octylphenol (nOPL). These compounds are used in industry or are produced as intermediates in the production of epoxy resins and polycarbonate plastics. These plastics are used in many food- and drink-packaging applications, whilst the resins are commonly used as lacquers to coat metal products such as food cans, bottle tops, and water supply pipes. These compounds have been widely analyzed in environmental matrices such as water, sludge, and sediments [17, 18]. Food may be another important route of exposure to endocrine-disrupting compounds. Some EDCs could enter the food chain at several stages of its production and also via plastic packaging material, stretch films used for food packaging, and many foodstuff containers for oven or microwave cooking [19]. The presence of phenolic EDCs in different foods [20–24], among which honey is included [25, 26], has been reported by several authors, highlighting a possible risk for consumers.

The method proposed here is based on the use of a RAM coupled on-line to an LC-MS/MS system for the identification and quantification of nine EDCs in honey. The use of RAM material enables fast on-line clean-up of honey samples, efficiently eliminating matrix components and providing appropriate selectivity and sensitivity for the determination of these compounds at trace levels. The on-line configuration developed involves minimum sample treatment (a simple dilution and filtration step) and affords a shorter analysis time. The method was validated as a quantitative confirmatory method according to the EU Decision 2002/657/EC: linearity,

precision (repeatability and intra-laboratory reproducibility), recovery, decision limits, detection capabilities, specificity, and ruggedness were evaluated for the target compounds.

Experimental

Chemicals

Analytical standards of *bisphenol-F* (BPF), bis-(4-hydroxyphenyl)methane, CAS RN [620-92-8]; *bisphenol-A* (BPA), 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane, CAS RN [80-05-7]; *tert-butylphenol* (tBPL), 4-(1,1-dimethylethyl)phenol, CAS RN [98-54-4]; *dichlorophenol* (DCPL), 2,4-dichlorophenol, CAS RN [120-83-2]; *trichlorophenol* (TCPL), 2,4,5-trichlorophenol, CAS RN [95-95-4] and *pentachlorophenol* (PCPL), 2,3,4,5,6-pentachlorophenol, CAS RN [87-86-5] were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). *tert-butylbenzoic acid* (tBBA), 4-(1,1-dimethylethyl)benzoic acid, CAS RN [98-73-7]; *n-octylphenol* (nOPL), 4-octylphenol CAS RN [1806-26-4] and *tert-octylphenol* (tOPL), 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenol, CAS RN [140-66-9] were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

The organic solvents acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH) were of HPLC grade (Merck, Darmstadt, Germany) and were used as received. Ultra-high quality (UHQ) water was obtained with a Wasserlab (Noain, Navarra, Spain) Ultramatic water purification system.

All chemicals used for the preparation of the buffer and all other chemicals were of analytical reagent grade.

Instrumentation

HPLC analyses were performed on a HP 1100 Series chromatograph from Agilent (Waldbronn, Germany) equipped with a binary pump, an additional isocratic pump, a membrane degasser, an autosampler (equipped with a 1,500- μ L capillary seat), a six-port valve, and a diode-array detector (DAD). The system was controlled by a HP ChemStation, which also performed data collection from the detectors and quantitative measurements. The RAMs used were LiChro-CART 25-4LiChrospher alkyl-diol-silica (ADS, 25 μ m, 25 mm \times 4 mm) RP18, RP8, and RP4 from Merck (Darmstadt, Germany). The analytical column was a 150 \times 4.60 mm Luna PFP(2) packed with 3- μ m particles (Phenomenex, Torrance, CA, USA).

The clean-up mobile phase, impelled by the isocratic pump, consisted of a 2.5 mmol L⁻¹ formic acid/ammonium formate buffer (pH: 2.9) with 10% ACN. The separation mobile phase, impelled by the binary pump, consisted of a 1 mmol L⁻¹ formic acid/ammonium formate buffer, pH: 3.4, (solvent A) and methanol (solvent B) gradient from

80% to 100% of B. The analytical column was thermostated at 20 °C.

Mass spectrometry

The LC/MSD Trap XCT ion-trap mass spectrometer (Agilent, Waldbronn, Germany) was equipped with an electrospray (ESI) source with a nebulizer spacer. The ESI settings were a capillary voltage of -3,500 V; a drying gas flow of 10 L min⁻¹ at a temperature of 350 °C, and a nebulizer pressure of 50 psi. Optimization of the ionization and fragmentation parameters was achieved manually while injecting standard solutions of each analyte (5 µg mL⁻¹) with a syringe pump at a flow rate of 1 mL h⁻¹; these solutions were mixed with the mobile phase at 0.3 mL min⁻¹ by means of a T piece. The trap parameters were set at a smart target of 50,000 to 100,000 and a maximum accumulation time of 200 ms at an *m/z* range from 60 to 400 u. A narrow isolation width of 4 u was selected. The optimized parameters and retention times for each analyte are listed in Table 1.

Honey samples

Samples of polyfloral honey commercially available from different commercial brands on the retail market were used in this work. All honey samples were first analyzed by the proposed method in order to check the natural occurrence of these compounds. No signals corresponding to the target analytes were found, and hence fortified honey samples were used.

Calibrant preparation and calibration procedure

Stock solutions of analytical calibrants were prepared by dissolving 12.5 mg of each analyte in 25 mL of acetonitrile

(500 µg mL⁻¹). These stock solutions were stored at 4 °C in brown glass bottles. Matrix-matched calibrants, in the 10–200 ng g⁻¹ range, were prepared daily by adding the appropriate amount of each stock solution to the honey samples. The fortified honey samples were capped and stored in the dark at room temperature for approximately 12 h to permit the interaction between the analytes and the matrix compounds. Finally, the fortified honey samples were diluted 1:5 (m/V) with UHQ water, shaken vigorously and filtered with a 5.0 µm nylon filter before analysis. Calibration curves were obtained by plotting the peak areas of the analytes versus concentration using matrix-matched standards.

Procedure for on-line sample preparation and separation

The experimental setup for RAM-LC-MS/MS was an on-line column switching configuration [27]. First, a predetermined volume of diluted honey was injected with the autosampler and the isocratic pump was immediately started to pump the clean-up mobile phase at 1 mL min⁻¹ for 3 min with the valve in the “sample enrichment” position. The target compounds were withheld in the RAM, while the matrix components of the honey were washed to waste. At 3 min, the system setup was changed to the “sample elution” position and the separation gradient (binary pump) eluted the analytes at a flow rate of 0.65 mL min⁻¹ in backflush mode to the analytical column, where they were separated and finally detected by the mass spectrometer. During this time, the isocratic pump changed the flow rate to 0.3 mL min⁻¹ in order to save solvent until next injection. At 23 min, the separation ended and the gradient was returned to the initial conditions. The flow rate of the isocratic pump was changed to 1 mL min⁻¹. At 26 min, the valve was switched to the “sample enrichment”

Table 1 Ion-trap tandem mass spectrometer parameters optimized for the studied EDCs

Analyte ^a	<i>t_R</i> (min)	Identification transition	Confirmation transition	Fragmentation amplitude (V)	IPs ^b	Window
BPF	14.2	199→93	199→123	1.10	4	12–17.3 min
BPA	14.6	227→212	227→133	0.95	4	12–17.3 min
<i>t</i> BPL	15.7	149→133	– ^c	0.67	2.5	12–17.3 min
DCPL	15.9	161→125	163→125	0.68	3.5	12–17.3 min
<i>t</i> BBA	16.4	177	– ^c	– ^c	1	12–17.3 min
TCPL	17.6	195→159	197→161	0.95	5	17.3–25 min
<i>t</i> OPL	18.6	205→133	205→190	0.87	4	17.3–25 min
<i>n</i> OPL	20.1	205→106	– ^c	0.86	2.5	17.3–25 min
PCPL	21.4	265	267, 263 ^d	– ^c	3	17.3–25 min

^a BPF bisphenol-F, BPA bisphenol-A, *t*BPL 4-*tert*-butylphenol, DCPL 2,4-dichlorophenol, *t*BBA 4-*tert*-butylbenzoic acid, TCPL 2,4,5-trichlorophenol, *t*OPL 4-*tert*-octylphenol, *n*OPL 4-*n*-octylphenol, PCPL pentachlorophenol

^b Identification Points (IPs) according to 2002/657/EC

^c No satisfactory transition was found

^d Chloride isotopes ions

mode and a 4-min post-run program was started, keeping the system under the initial conditions in order to equilibrate the analytical column for the next analysis.

Method validation

The method was validated, according to the pertinent legislation [28], by evaluating the following parameters:

- Specificity: by calculating ion suppressions and comparing patterns with matrix-matched samples.
- Determination of the statistical parameters and the quality of the linear regression using the confirmation transition. The matrix-matched calibrations were obtained in the 10–150 ng g⁻¹ range. The decision limit (CC_α) and the detection capability (CC_β) were also calculated.
- Repeatability and within-laboratory reproducibility were determined as intraday and interday precisions by analyzing honey samples at two concentrations levels (20 and 100 ng g⁻¹).
- Recoveries were determined at two concentration levels (12.5 and 25 ng g⁻¹).
- Stability: by controlling the storage conditions of the analytes and stock solutions (see “Calibrant preparation and calibrant procedure” section), keeping them in the range in which stability is guaranteed by the manufacturer.

Results and discussion

The chromatographic separation of the analytes was optimized by searching for maximum compatibility with the detection performed with mass spectrometry. Thus, water/methanol mixtures with a high content in organic component were used as the mobile phase, facilitating the electrospray ionization process. Likewise, the presence of salts was reduced as much as possible, this aiming and increasing the ionizing efficiency of the analytes in the source [29]. Following these criteria, optimum chromatographic separation was observed in 19 min for the nine EDCs studied, applying a gradient of 80% to 100% of methanol, and using a 1.0 mmol L⁻¹ formic acid/ammonium formate buffer, pH 3.4, as the aqueous component of the mobile phase, with a mobile phase flow rate of 0.65 mL min⁻¹.

Restricted-access materials: optimization of sample treatment using RAM-LC-DAD

The analysis of complex matrices using chromatographic methods usually requires one or several clean-up steps in

order to remove the greatest amount possible of the compounds present in the matrix that could hinder analysis and shorten the useful lifetime of the chromatographic column.

RAMs have frequently been used in the clean-up steps of biological samples, but their use in the clean-up of food samples has not received much attention. In previous studies carried out by us, we observed that these materials may be highly suitable for the clean-up of samples with high contents of sugars. Accordingly, here we studied the possibilities offered by a restricted-access material of the ADS type as a sample treatment step for the analysis of phenolic EDCs in honey samples. For this study, an ADS-RAM coupled on-line to a LC-DAD system was used. Figure 1 shows the chromatograms for an unfortified honey sample injected directly into the LC-DAD system (Fig. 1a), together with those obtained upon injecting the same sample volume through the RAM-LC-DAD system: using ADS-RAMs of the C18 and C4 types (Fig. 1b–c). Regarding the direct injection, it is possible to observe a large number of very intense chromatographic peaks, corresponding to the matrix. The number and intensity of these peaks decreased considerably when the samples were injected through the RAM, which acted as an extraction and on-line clean-up step. The results obtained reveal the efficiency of the RAM in cleaning the components of the matrix in the honey, which is an important aspect in order to preserve the instrumental system and lengthen the life of the chromatographic column. The chromatograms obtained upon using the ADS-RAM of the C18 (Fig. 1b) and C4 (Fig. 1c) types for the same unfortified honey sample indicate that the level of clean-up is adequate in both cases, although the most favorable one was obtained with the ADS-RAM with the C4 stationary phase. It was thus decided to use the C4 RAM for later studies.

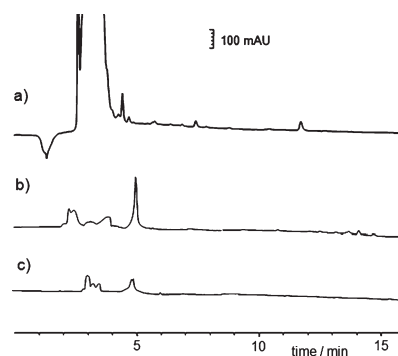


Fig. 1 LC-DAD chromatograms obtained for an unfortified honey sample injected **a** directly into the chromatographic column, **b** through the on-line RAM-LC-DAD using a C18 RAM, and **c** the same as in **b** using a C4 RAM. Injected volume, 100 μ L, signal 214 nm

The next step consisted of optimizing the RAM washing solvent, i.e., the mobile phase impelled by the isocratic pump that acted as a washing solvent and at the same time transported the sample through the RAM. Study of the composition of this mobile phase (washing solvent) aimed at maximizing sample clean-up without negatively affecting the analyte recovery. There are two main factors that jointly affect these parameters: the percentage of organic phase in the washing solvent and the time that the washing step lasts. Increases in the organic component afforded a better cleaning of the interferents, although an excessive increase may lead to the elution of the analytes of interest, low recoveries being obtained. We therefore studied percentages of acetonitrile in the washing solvent between 0% and 25%, keeping a clean-up time of 3 min throughout the study. In each case, the recoveries of each analyte were determined by comparing the concentration obtained, by means of a calibration, with the real concentration at which the sample was originally fortified. The recoveries remained above 90% when a washing solvent with up to 10% acetonitrile was used. An increase in this percentage up to 25% led to a dramatic decrease in the recoveries for all the analytes studied. In light of the results, it was decided to use as a washing solvent, corresponding to the mobile phase impelled by the isocratic pump, 2.5 mmol L⁻¹ formic acid/ammonium formate buffer (pH 2.9) with 10% of acetonitrile because this was the highest percentage of organic phase with which satisfactory recoveries were obtained.

With this composition for the washing solvent, a study was made of the effect of the RAM washing time; that is, the time during which it was circulating through the RAM once the sample had been injected. For washing times between 3 and 15 min, an increase in the washing time did not afford a significantly better clean-up but did elicit the corresponding increase in the analysis time. Accordingly, a time of 3 min was chosen as optimum since it afforded an adequate washing of the undesired components of the matrix.

Optimization of the on-line coupling RAM-LC-MS/MS

In the literature, it has been reported that RAMs admit the injection of large sample volumes [30]. Thus, the possibility of injecting large sample volumes into the RAM-LC-MS/MS system was studied in order to improve the sensitivity of the method. The sample volumes injected were in the 20–1,500- μ L range. Figure 2 shows the results obtained for a honey sample fortified at 4 μ g g⁻¹. For high injection volumes it is possible to observe detector saturation. Accordingly, an injection volume of 500 μ L was chosen, considering this value as the highest volume that could be injected without saturating the MS/MS system.

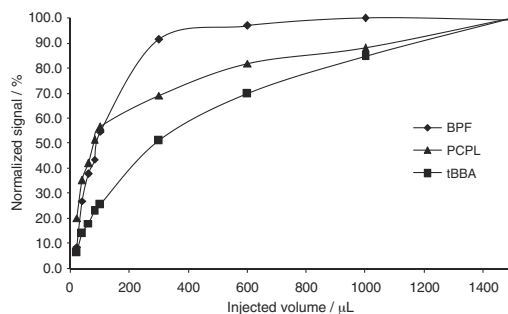


Fig. 2 Normalized (to the highest area) signals as a function of the volume of fortified honey injected according to the RAM-LC-MS/MS method developed. Fortified level: 4 μ g g⁻¹ for each analyte. BPF bisphenol-F, PCPL pentachlorophenol, tBBA 4-*tert*-butylbenzoic acid

Study of ion suppression

When ESI-MS is used as a method of detection, it is known that this ionization source (ESI) may undergo losses of sensitivity owing to the presence of other compounds that co-elute with the analytes of interest, a phenomenon known as ion suppression. Moreover, this effect may be more pronounced when large sample volumes are injected.

Here, we studied the possible effect of ion suppression on the signals of the analytes when 500 μ L of honey sample was injected into the RAM-LC-MS/MS system. To accomplish this, the total ion chromatograms (TIC) were recorded (Fig. 3) for a standard aqueous sample of the analytes studied, fortified at 100 ng g⁻¹ in UHQ water (Fig. 3a) and for a honey sample fortified at 100 ng g⁻¹ injected using the proposed RAM-LC-MS/MS methodology (Fig. 3b). This honey sample was also directly injected into the LC-MS/MS system (Fig. 3c). It may be observed that the total signal of the analytes in the standard in UHQ water and in the honey injected through the RAM was similar both in shape and in intensity. However, when fortified honey was injected directly into the LC-MS/MS system, the signal of the analytes underwent a strong decrease owing to ion suppression. This points to the efficiency of the RAM in the cleaning of the matrix components.

Although upon injecting 500 μ L of honey sample the RAM-LC-MS/MS configuration strongly reduced the ion suppression of the analytes, such suppression persisted. Thus, this matrix effect was calculated as ion suppression according to the method suggested by Feitosa-Felizzola et al. [31]. Table 3 shows the ion suppression (expressed as a percentage with respect to the signal obtained in UHQ water) for each of the analytes separately. The values of ion suppression varied between 4.6% for tBBA and 24% for tBPL.

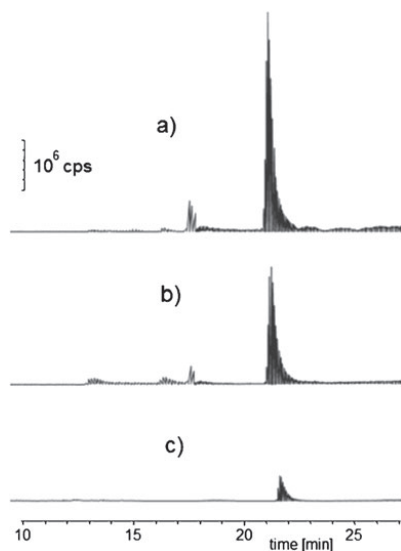


Fig. 3 Total ion chromatograms (TICs) obtained by the analysis of: a) a UHQ standard, b) a fortified honey sample injected according to the RAM-LC-MS/MS method developed, and c) a fortified honey sample injected directly into the LC-MS/MS system. Injected volume, 500 μL , fortified level, 100 ng g^{-1} for each analyte

The level of ion suppression undergone by the analytes did not seem to be related to their retention times. However, we did observe a correlation between ion suppression and the acidity constant ($\text{p}K_{\text{a}}$) of the analytes, i.e., with their tendency to lose a proton. The formation of ions in the electrospray is one of the most critical factors in liquid chromatography coupled to mass spectrometry. The efficiency of this step depends on the previous presence of the ions studied in liquid phase or on their later generation, through highly complex mechanisms, in the gas phase [29]. Accordingly, the $\text{p}K_{\text{a}}$ of the compounds of interest is one of the most relevant factors affecting the efficiency of the formation of such ions. Table 2 shows the $\text{p}K_{\text{a}}$ value for each of the EDCs studied, together with its corresponding ion suppression, calculated experimentally. The correlation between ion suppressions and $\text{p}K_{\text{a}}$ ($r^2=0.954$) is coherent with the fact that all the compounds of interest were detected as anions arising from the loss of a proton: $[\text{M}-\text{H}]^-$. Since the effect of ion suppression leads to a loss of analytical signal, and hence sensitivity, this correlation could be extended to different analytical characteristics, such as the limit of detection.

Analytical characteristics of the RAM-LC-MS/MS method

Once the parameters of the RAM-LC-MS/MS method had been optimized, their analytical characteristics were stud-

ied. The MS/MS detection system was configured in multiple reaction monitoring (MRM) mode, analyzing the transition of identification for each of the analytes. The limits of detection (LODs), calculated as three times the signal–noise ratio, varied between 0.6 ng g^{-1} for PCPL and 7.2 ng g^{-1} for BPF. The limits of quantification (LOQs), calculated as ten times the signal–noise ratio, ranged between 2.0 ng g^{-1} for PCPL and 22.6 ng g^{-1} for BPA. Figure 4 shows the MS/MS chromatograms and total ion chromatogram (TIC) of the analytes studied, at a concentration level of 10 ng g^{-1} , in MRM mode, analyzing the transition of identification.

Validation of the RAM-LC-MS/MS method according to 2002/657/EC

In recent years, the Commission Decision of the 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC establishes criteria and procedures for the validation of analytical methods to ensure the quality and comparability of analytical results generated by official laboratories. This decision establishes common criteria for the interpretation of test results and introduces a procedure to progressively establish minimum required performance limits (MRPL) for analytical methods employed to detect substances for which no permitted limit (maximum limit) has been established. This, especially for substances whose use is not authorized or is specifically prohibited in the EU. Thus, through the 2002/657/EC Decision [28] the EU has established the characteristics that must be fulfilled by an analytical method for it to be required as a confirmatory quantitative method. The parameters to be evaluated are: the detection capacity (CC_{β}), the limit of decision (CC_{α}), recovery, precision, selectivity, and ruggedness.

Additionally, for confirmatory methods based on MS/MS detection, the 2002/657/EC Decision establishes a minimum of three points of identification (IPs) that must be presented for each analyte based on the number of mass and mass/mass signals found. The IPs found for the nine EDCs studied are shown in Table 1. Unfortunately, it was not possible to achieve the minimum number of identification points required by the EU [28] in the case of tBPL, tBBA, and nOPL; even when MS^3 experiments were performed for tBPL and nOPL, no additional fragment ions were observed. This is due to the poor fragmentation that these analytes present by collision-induced dissociation (CID) in the ion trap. Accordingly, these analytes were removed from the validation process. For the other six target analytes (BPF, BPA, DCPL, TCPL, tOPL, and PCPL) IP values between 3 and 5 were observed. For PCPL, the three IPs corresponded to the three m/z ratios of the chloride isotope ions. A higher number of IPs can be obtained when it is possible to analyze two transitions for each analyte: a transition of identification

Table 2 Retention times, acidic constants and ion suppressions for the EDCs studied obtained by analyzing fortified honey samples

Analyte ^a	BPF	BPA	tBPL	DCPL	tBBA	TCPL	tOPL	nOPL	PCPL
t_r	14.2	14.6	15.7	15.9	16.4	17.6	18.6	20.1	20.4
pK_a	9.7	9.8	10.3	7.7	4.4	6.7	10.2	10.2	4.9
Ion supp. (%)	20	21	24	15	4.6	16	22	22	6.3

^a BPF bisphenol-F, BPA bisphenol-A, tBPL 4-*tert*-butylphenol, DCPL 2,4-dichlorophenol, tBBA 4-*tert*-butylbenzoic acid, TCPL 2,4,5-trichlorophenol, tOPL 4-*tert*-octylphenol, nOPL 4-*n*-octylphenol, PCPL pentachlorophenol

and the other one for confirmation. To validate the method, the MS/MS detection system was configured in the Product Ion Scan mode. With this configuration, a complete spectrum of product ions was observed, with which it was possible to check the existence of both transitions and the correspondence of the ratios. For each analyte, the analytical signal was obtained by collecting an extracted ion chromatogram (EIC) of the product ion corresponding to the confirmation transition.

Table 3 shows the calibration characteristics for each analyte (intercept, slope, and r^2) corresponding to the confirmation transition and the validation parameters

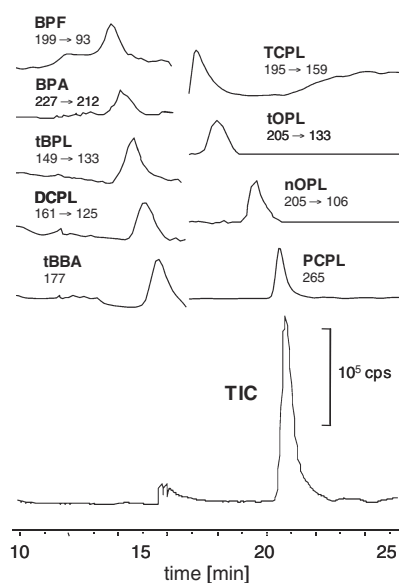


Fig. 4 MS/MS chromatograms and total ion chromatogram (TIC) of a fortified honey sample obtained using the developed RAM-LC-MS/MS method. Fortified level, 10 ng g^{-1} for each analyte. BPF bisphenol-F, BPA bisphenol-A, tBPL 4-*tert*-butylphenol, DCPL 2,4-dichlorophenol, tBBA 4-*tert*-butylbenzoic acid, TCPL 2,4,5-trichlorophenol, tOPL 4-*tert*-octylphenol, nOPL 4-*n*-octylphenol, PCPL pentachlorophenol

established by the 2002/657/EC Commission Decision. The limit of decision (CC_α) varied between 1.7 ng g^{-1} for PCPL and 12.6 ng g^{-1} for BPA and the values of the detection capabilities (CC_β) ranged between 2.8 ng g^{-1} for PCPL and 21.6 ng g^{-1} for BPA. The correlations between CC_α and CC_β versus the pK_a had r^2 values of 0.904 and 0.908, respectively.

Since no reference materials are available, recovery studies were carried out in order to check the accuracy of the proposed RAM-LC-MS/MS method. Polyfloral honey samples from different commercial brands that had not been used previously in the method were analyzed, none of the analytes studied being found in them at concentrations higher than the CC_α of the method. These samples were fortified at two levels, 12.5 and 25 ng g^{-1} . The signal obtained for each of the analytes was introduced into the corresponding calibration line. In the case of honey fortified at the lowest level of concentration, the recoveries varied between $88 \pm 16\%$ for tOPL and $120 \pm 24\%$ for BPA.

Repeatability and within-laboratory reproducibility were assessed as intraday and interday precision, respectively for the two concentration levels; 20 and 100 ng g^{-1} . The highest values of the relative standard deviation (RSD) varied in the 5.5 – 11% range for interday analysis at a level of 20 ng g^{-1} .

Finally, the specificity and ruggedness of the method were determined by the high level of selectivity characteristic of tandem mass spectrometry and by the different checks and calibrations to which the system had been subjected, respectively. At all times along the work, the pressure of the system was controlled; both that of the isocratic pump connected to the RAM column and that of the binary pump connected to the analytical column. The pressure control of both pumps, together with the background noise and the shape of the peaks obtained, allowed the proper functioning of the system to be checked. Moreover, a standard solution was injected each week with a view to controlling the intensity of the signals obtained in the MS/MS detector.

Along this work, only one RAM column was employed, supporting about 150 injections. This implies a total sample

Table 3 Statistic and performance characteristics, according to 2002/657/EC, of the proposed RAM-LC-MS/MS method obtained by analyzing fortified honey samples

Analyte ^a	BPF	BPA	DCPL	TCPL	tOPL	PCPL
Intercept (area units; au)	$(0.4 \pm 5.4) \times 10^2$	$(-0.5 \pm 1.8) \times 10^2$	$(0.0 \pm 3.0) \times 10^2$	$(0.5 \pm 1.0) \times 10^3$	$(1.7 \pm 2.2) \times 10^3$	$(-0.6 \pm 6.0) \times 10^5$
Slope (au; ng g^{-1})	4.70 ± 0.04	11 ± 0.2	$(2.8 \pm 0.2) \times 10^2$	$(1.3 \pm 0.1) \times 10^2$	$(0.7 \pm 0.1) \times 10^2$	$(2.4 \pm 0.1) \times 10^5$
r^2	0.998	0.997	0.999	0.999	0.998	1.000
CC_{α} ^b (ng g^{-1})	9.6	12.6	7.6	6.8	10.8	1.7
CC_{β} ^c (ng g^{-1})	16.6	21.6	12.9	11.5	18.4	2.8
Recovery ^d (%)	112 ± 16	120 ± 24	104 ± 16	112 ± 16	88 ± 16	96 ± 8
RSD ^{e,f} Intraday (%)	12.5 ng g^{-1}	96 \pm 8	108 \pm 8	104 \pm 8	98 \pm 8	104 \pm 4
RSD ^{e,g} Interday (%)	20 ng g^{-1}	4.9	5.9	7.4	7.1	3.9
	100 ng g^{-1}	2.1	2.3	3.2	4.5	1.6
	20 ng g^{-1}	11	7.5	9.5	9.5	5.5
	100 ng g^{-1}	7.6	4.3	5.8	7.7	3.0

^a Concentration range from 10 to 150 ng g^{-1} (five calibration points). *BPF*: bisphenol-F; *BPA*: bisphenol-A; *DCPL*: 2,4-dichlorophenol; *TCPL*: 2,4,5-trichlorophenol; *tOPL*: 4-*tert*-octylphenol; *PCPL*: pentachlorophenol

^b Decision limit (CC_{α}) calculated from the confirmation transition in product ion scan mode. r^2 (CC_{α} vs. pK_{α}): 0.904

^c Detection capability (CC_{β}) calculated from the confirmation transition in product ion scan mode. r^2 (CC_{β} vs. pK_{β}): 0.908

^d Confidence intervals at 95% significance level

^e RSD relative standard deviation

^f Intraday precision (repeatability) was determined by eight injections

^g Interday precision (within-laboratory reproducibility) was determined in three consecutive days (eight injections each day)

volume of approximately 80 mL (equivalent to 16 g of honey). It is unquestionable that the half-life of RAMs will depend on their use (number of injections). As an indication, replacement of the RAM column should be carried out when the pressure of the system is excessively high (>20%) with respect to the usual values or when the intensity of the signal and the shape of the peaks so indicate.

Conclusions

An automated method for the analysis of endocrine disruptors in honey samples, by using a configuration that incorporates a RAM material, has been developed. The results obtained showed that the use of restricted-access materials in the clean-up of honey samples with different origins is acceptable. The proposed on-line configuration allowed prior sample treatment to be minimized, this being reduced to a dilution and filtration step. Additionally, the RAM used (ADS-C4) proved to have a fairly long half-life (150 injections) and allowed the injection of at least 16 g of honey.

The method described, RAM-LC-MS/MS, is a sensitive, selective, and precise automated tool for the determination and confirmation of several different EDCs in a complex matrix such as honey. The ESI-MS/MS system showed acceptable sensitivity, which is related to the pK_a value of each of the analytes studied. In any case, its acceptable sensitivity allowed limits of detection at the low nanogram per gram level to be obtained. For six of the nine analytes studied (BPF, BPA, DCPL, TCPL, tOPL, and PCPL) between three and five points of identification were found, such that for these compounds the proposed method has been validated as a quantitative confirmatory method in accordance with the 2002/657/EC Commission Decision.

Acknowledgments The *Ministerio de Ciencia e Innovación*, Spain, (Project CTQ 2008-02200/BQU) and *Junta de Castilla y León* (Grupo de Excelencia GR-65) are gratefully acknowledged for financial support of this work. Diego García-Gómez gratefully acknowledges financial assistance from a *Formación de Profesorado Universitario (FPU)* grant of the *Ministerio de Educación*. The authors thank Dr. C. Raposo (Servicio General de Espectrometría de Masas, Universidad de Salamanca) for assessment and technical support.

References

1. Anklam E (1998) *Food Chem* 63:549–562
2. Fernández M, Picó Y, Mañes J (2002) *J Food Prot* 65:1502–1511
3. Tahboub YR, Zaater MF, Barri TA (2006) *Anal Chim Acta* 558:62–68
4. Pang GF, Cao YZ, Fan CL, Zhang JJ, Li XM, Li ZY, Jia GQ (2003) *Anal Bioanal Chem* 376:534–541
5. Nozal MJ, Bernal JL, Martín MT, Jiménez JJ, Bernal J, Higes M (2006) *J Chromatogr A* 1116:102–108
6. Herrero-Hernández E, Carabias-Martínez R, Rodríguez-Gonzalo E (2009) *Anal Chim Acta* 650:195–201
7. Campillo N, Peñalver R, Aguinaga N, Hernández-Córdoba M (2006) *Anal Chim Acta* 562:9–15
8. Bogialli S, Di Corchia A (2007) *J Biochem Biophys Methods* 70:163–179
9. Rissato SR, Galhiane MS, Knoll FRN, Apon BM (2004) *J Chromatogr A* 1048:153–159
10. Tadeo JL, Sánchez-Brunete C, Albero B, García-Valcárcel AI (2009) *J Chromatogr A*. doi:10.1016/j.chroma.2009.11.066
11. Korta E, Bakkali A, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F (2002) *J Food Prot* 65:161–166
12. Desilets CP, Rounds MA, Regnier FE (1991) *J Chromatogr* 544:25–39
13. Souverain S, Rudaz S, Veuthey JL (2004) *J Chromatogr B* 801:141–156
14. Sadílek P, Satinsky D, Solich P (2007) *Trends Anal Chem* 26:375–384
15. Lopez de Alda MJ, Diaz-Cruz S, Petrovic M, Barceló D (2003) *J Chromatogr A* 1000:503–526
16. Chico J, Meca S, Companyó R, Prat MD, Granados M (2008) *J Chromatogr A* 1181:1–8
17. Li D, Oh JR, Park J (2003) *J Chromatogr A* 1012:207–214
18. Basheer C, Lee HK (2004) *J Chromatogr A* 1057:163–169
19. Muncke J (2009) *Sci Total Environ* 407:4549–4559
20. Kuo HW, Ding WH (2003) *J Chromatogr A* 1027:67–74
21. Ballesteros-Gómez A, Rubio S, Pérez-Bendito D (2009) *J Chromatogr A* 1216:449–469
22. Nerin C, Philo MR, Salafranca J, Castle L (2002) *J Chromatogr A* 963:375–380
23. Shao B, Han H, Li D, Ma Y, Tu X, Wu Y (2007) *Food Chem* 105:1236–1241
24. Shao B, Han H, Tu X, Huang L (2007) *J Chromatogr B* 850:412–416
25. Campillo N, Peñalver R, Hernández-Córdoba M (2006) *J Chromatogr A* 1125:31–37
26. Inoue K, Murayama S, Takeba K, Yoshimura Y, Nakazawa H (2003) *J Food Compos Anal* 16:497–506
27. Rodríguez-Gonzalo E, García-Gómez D, Carabias-Martínez R (2009) *J Chromatogr A* 1217:40–48
28. 2002/657/EC: Commission Decision. Official Journal of the European Union L 221, 17.8.2002
29. Kostianen R, Kauppila TJ (2009) *J Chromatogr A* 1126:685–699
30. Liu M, Yan W, Lin JM, Hashi Y, Liu LB, Wei Y (2008) *J Chromatogr A* 1198–9:87–94
31. Feitosa-Felizzola J, Temine B, Chiron S (2007) *J Chromatogr A* 1164:95–104

4.A.4. Determinación electroforética de disruptores endocrinos fenólicos en miel: RAM, SPE, CE-MS (Q)

En el análisis de alimentos, la electroforesis capilar (*CE, Capillary Electrophoresis*) es una alternativa viable a técnicas de separación más tradicionales como LC o GC. Además, el acoplamiento CE-MS presenta características muy atractivas al combinar el alto poder de separación de CE con la selectividad y el poder de identificación de MS. La aplicación de CE para el análisis de alimentos ha sido ampliamente revisada^{155,156}, así como la aplicación de métodos de CE-MS para el análisis de fenoles y clorofenoles¹⁵⁷.

Se puede decir que el mayor inconveniente de CE es su baja sensibilidad, lo que en ocasiones limita su aplicación para el análisis de residuos orgánicos presentes a bajas concentraciones. En estos casos, el punto crítico del análisis es la preparación de muestra, que debe aportar un elevado factor de preconcentración. Las técnicas empleadas habitualmente en el análisis de residuos orgánicos en alimentos son la extracción líquido-líquido, la extracción en fase sólida (*SPE, Solid Phase Extraction*) y la microextracción en fase sólida. En el caso particular de muestras de miel, SPE es la técnica de preparación de muestra más habitual para la extracción y enriquecimiento de diferentes contaminantes orgánicos¹⁵⁸. En este trabajo se ha realizado un estudio detallado del acoplamiento de espectrometría de masas a electroforesis capilar y del tratamiento que hay que realizar a la muestra. Dicho tratamiento incluye el uso del RAM optimizado previamente seguido de una etapa de preconcentración utilizando materiales poliméricos.

¹⁵⁵ V. García-Cañas, A. Cifuentes, *Electrophoresis* 29 (2008) 294. "Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis"

¹⁵⁶ M.C. Boyce, *Electrophoresis* 28 (2007) 4046. "Determination of additives and organic contaminants in food by CE and CEC"

¹⁵⁷ O. Jáuregui, E. Moyano, M.T. Galcerán, J. Chromatogr. A 896 (2000) 125. "Capillary electrophoresis-electrospray ion-trap mass spectrometry for the separation of chlorophenols"

¹⁵⁸ A. Michalkiewicz, M. Biesaga, K. Pyrzynska, J. Chromatogr. A 1187 (2008) 18. "Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey"

4.A.4.1. Optimización de la separación electroforética

La separación electroforética se optimizó previamente al acoplamiento con MS, es decir, utilizando un sistema CE-UV/VIS. Se estudiaron el pH y la fuerza iónica del medio de separación (*BGE*, *BackGround Electrolyte*), el voltaje de separación y la temperatura del capilar. Las principales limitaciones para que el método optimizado sea compatible posteriormente con MS son la necesidad de que el BGE sea volátil y que la intensidad de corriente no supere los 50 μ A. Además, es deseable que el pH sea alto y que los analitos estén presentes como aniones para favorecer tanto la separación como la posterior detección. Se seleccionó así, como BGE, una disolución de acetato amónico ajustada con amoníaco y con diferentes porcentajes de metanol como aditivo. Los intervalos estudiados y los valores optimizados se muestran en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Optimización de la separación electroforética

Parámetro	Intervalo estudiado	Valor óptimo
pH	9.7-11.6	11.0
[BGE] / mM	10-15	15
[MeOH] / % vol.	0-30	0
Voltaje / kV	20-30	22
Temperatura / °C	15-35	25

Los valores óptimos se fijaron, en todos los casos, buscando un compromiso entre la morfología del pico, la intensidad de la corriente eléctrica y el tiempo de análisis.

4.A.4.2. Optimización del acoplamiento CE-ESI-MS

En comparación con el acoplamiento entre espectrometría de masas y cromatografía líquida (LC-MS), el acoplamiento con electroforesis capilar (CE-MS) presenta una serie de características propias ya que la interfaz entre ambas técnicas debe ser compatible con

las características eléctricas de la separación electroforética. Por ello, esta interfaz ha sido objeto de múltiples investigaciones.

La primera descripción del acoplamiento CE-MS propuesta por Smith et al. en 1987, utilizaba una envoltura metálica alrededor del extremo de salida del capilar, que sustituía al electrodo terminal de la configuración CE tradicional¹⁵⁹ y permitía cerrar el circuito eléctrico necesario para CE. Los autores demostraron que, con este capilar metalizado, se cumplían los requisitos necesarios para generar un electrospray adecuado para la posterior detección por MS.

Este diseño inicial fue modificado rápidamente por estos mismos autores¹⁶⁰, para proponer la utilización de un líquido adicional, conductor, que permitía el contacto eléctrico a la vez que incrementaba la compatibilidad, en cuanto a la composición del electrolito de fondo utilizado en CE, con la generación de un electrospray estable.

Las interfaces de líquido adicional son las únicas disponibles comercialmente. Estas interfaces se basan en la utilización de un flujo de líquido, denominado líquido adicional, que se mezcla con el flujo electroforético a la salida del capilar. Este flujo adicional tiene varias funciones. La primera es establecer contacto eléctrico entre el electrodo y el medio de separación que circula dentro del capilar para que se lleve a cabo la separación electroforética. La segunda función es que permite modificar la composición del medio electroforético de separación para hacerlo más compatible con el proceso de ionización por electrospray, y por tanto, con la detección por espectrometría de masas. Además, el líquido adicional aporta estabilidad al electrospray ya que el flujo electroforético no es capaz de mantener por sí mismo un electrospray estable salvo que se trabaje en condiciones extremas que maximicen el flujo electroosmótico. Las interfaces comerciales actuales emplean un diseño coaxial de tres tubos concéntricos, que se muestra de forma detallada en la Figura 4.5. El tubo más interno es el capilar de separación que sobresale ligeramente ($\approx 2 \mu\text{m}$) del segundo tubo, a través del cual circula el líquido adicional, también denominado "líquido envolvente". El tercer y más externo de los tubos, aporta el

¹⁵⁹ J.A. Olivares, N.T. Nguyen, C.R. Yonker, R.D. Smith, Anal. Chem. 59 (1987) 1230. "On-line mass spectrometric detection for capillary zone electrophoresis"

¹⁶⁰ R.D. Smith, J.A. Olivares, N.T. Nguyen, H.R. Udseth, Anal. Chem. 60 1 (1988) 436. "Capillary zone electrophoresis-mass spectrometry using an electrospray ionization interface"

gas necesario para mejorar la nebulización y el proceso de desolvatación, aumentando aún más la estabilidad del electrospray.

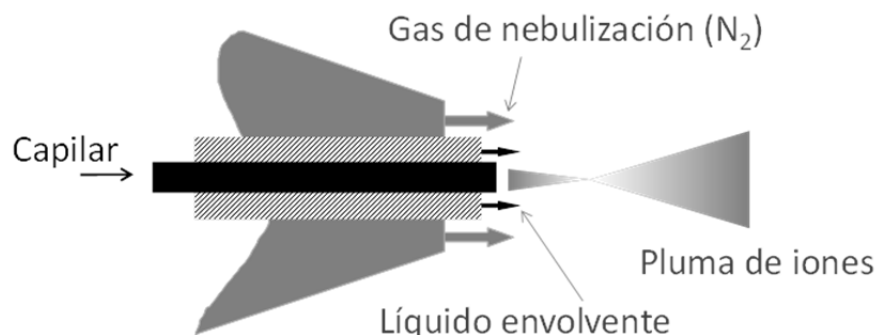


Figura 4.5. Configuración de tubos concéntricos por los que circula el líquido adicional y el gas de nebulización

Una vez optimizada la separación electroforética, se estudiaron aquellos factores que afectan al acoplamiento CE-ESI-MS. En primer lugar, se evaluaron diferentes líquidos adicionales formados por agua, isopropanol, metanol y acetonitrilo con un 1% de amoníaco así como todas las posibles mezclas binarias (1:1 v/v). Los mejores resultados se obtuvieron utilizando MeOH como líquido adicional (Fig. II.2, Pág. 143) encontrándose como iones más abundantes los iones moleculares desprotonados ($[M-H]^-$).

Partiendo de este líquido adicional se optimizaron los diferentes parámetros que afectan a la formación del electrospray. Así, se estudió el contenido en amoníaco del líquido adicional, la presión de nebulización, el flujo de líquido adicional y el flujo y temperatura del gas de secado. Los intervalos estudiados para cada parámetro se muestran en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Optimización del acoplamiento CE-ESI-MS. Diseño de Doehlert (5 factores, 31 experiencias)

Parámetro	Intervalo estudiado	Niveles	Valor óptimo
[NH ₃] líquido adicional / % vol.	0-3	5	3
Flujo líquido adicional / mL min ⁻¹	0.05-2 (<i>split</i>)	7	0.78
Presión de nebulización / psi	2-20	7	2
Flujo gas de secado / mL min ⁻¹	2-10	7	2
Temperatura gas de secado / °C	100-200	3	100

La optimización de estos cinco factores se llevó a cabo a través de un diseño de experimentos de Doehlert¹⁶¹. El uso de técnicas de diseño de experimentos es interesante en el acoplamiento CE-ESI-MS porque permite reducir el número de experimentos redundantes en la búsqueda de las condiciones óptimas frente a un enfoque paso a paso^{162,163}. El tipo de diseño utilizado (diseño de Doehlert o de red uniforme) no es habitual en química analítica a pesar de sus ventajas como su alta eficiencia en comparación con otros diseños, como Box-Behnken o central compuesto; y la posibilidad de estudiar un mayor número de niveles para las variables más significativas incorporando así conocimientos previos al diseño. Las características del modelo, los coeficientes y los factores de inflación de varianza (*VIF*, *Variance Inflation Factors*) se muestran en la Tabla II.2 (Pág. 144). La búsqueda de los máximos fue llevada a cabo utilizando un algoritmo genético. Los valores óptimos obtenidos para los cinco parámetros estudiados se muestran en la Tabla 4.4. Otros parámetros optimizados, tras el diseño de experimentos, fueron el voltaje de cono y las condiciones para efectuar la inyección hidrodinámica. Los valores óptimos encontrados fueron de 60 V y de 50 mbar durante 17 s, respectivamente.

¹⁶¹ D.H. Doehlert, Appl. Stat. 19 (1970) 231. "Uniform Shell Designs"

¹⁶² J. Hernández-Borges, M.A. Rodríguez-Delgado, F.J. García-Montelongo, A. Cifuentes, Electrophoresis 25 (2004) 2065. "Highly sensitive analysis of multiple pesticides in foods combining solid-phase microextraction, capillary electrophoresis-mass spectrometry, and chemometrics"

¹⁶³ J. Hernández-Borges, M.A. Rodríguez-Delgado, F.J. García-Montelongo, A. Cifuentes, J. Sep. Sci. 28 (2005) 948. "Analysis of pesticides in soy milk combining solid-phase extraction and capillary electrophoresis-mass spectrometry"

4.A.4.3. Características analíticas del método CE-ESI-MS

Las características analíticas del método CE-ESI-MS inyectando disoluciones acuosas de patrones de los disruptores estudiados se muestran en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Características analíticas del método CE-ESI-MS desarrollado para el análisis de EDCs fenólicos en disoluciones acuosas

	tBPL	BPA	PCPL	TCPL	DCPL
Ordenada en el origen ^{a)}	-1.0 (0.3)	-1.3 (0.2)	0.1 (0.2)	0.09 (0.07)	-0.11 (0.04)
Pendiente ^{a)} / g μg^{-1}	0.82 (0.02)	1.78 (0.02)	4.3 (0.1)	1.00 (0.02)	0.54 (0.01)
R²	0.991	0.998	0.989	0.992	0.991
Intervalo / $\mu\text{g g}^{-1}$	1.7-42	0.8-20	0.2-5	0.4-10	0.4-10
LOD / ng g^{-1} ^{b)}	800	250	40	280	300
Recuperaciones / %					
a 0.4-3.5 $\mu\text{g g}^{-1}$	101±5	96±9	100±10	100±10	100±20
a 1.5-10 $\mu\text{g g}^{-1}$	80±20	100±4	97±3	108±7	105±8
RSD / % ^{c)}					
a 0.4-1.6 $\mu\text{g g}^{-1}$	17	16	13	11	14
a 0.8-3.2 $\mu\text{g g}^{-1}$	17	12	11	12	16

a. Áreas de pico normalizadas frente al patrón interno (tBBA). Entre paréntesis, desviación estándar

b. LOD, límites de detección (S/R=3). Detección simultánea en modo SIM

c. *Intraday* (n=7)

Los LODs del método CE-MS indican que, con el fin de alcanzar los límites máximos permitidos de contaminantes en alimentos, es necesario realizar una etapa de preconcentración. Inicialmente, se realizaron estudios usando sorbentes poliméricos Oasis HLB. Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios ya que se producía la obstrucción del cartucho al pasar volúmenes de miel, previamente diluida (1:5 p/v), de tan solo 5 mL. Bajo estas condiciones los LODs no mejoraron significativamente, siendo el PCPL el único analito detectado en una muestra dopada a un nivel de concentración de 250 ng g^{-1} .

4.A.4.4. Adaptación del tratamiento RAM a CE-MS

A diferencia del método desarrollado previamente con LC-MS/MS, el tratamiento de la muestra, utilizando RAM y midiendo en CE-MS, se ha realizado de forma *off-line*, es decir las muestras tratadas son recogidas en viales e inyectadas posteriormente en el sistema CE-MS. La configuración instrumental propuesta, adaptación de la desarrollada anteriormente, se muestra en la Figura II.1 (Pág. 141).

El montaje propuesto está formado por dos válvulas de 6 vías y dos bombas cromatográficas. La bomba A impulsa el disolvente de lavado del RAM. La composición del disolvente, previamente optimizada, fue una mezcla de tampón ácido fórmico / formiato amónico 2.5 mM (pH: 2.5) con un 10% de ACN. La bomba B impulsa MeOH produciendo la elución de los analitos.

El proceso experimental es como sigue. En primer lugar, un volumen predeterminado de miel se carga manualmente con una jeringa en el bucle de inyección con el sistema en la posición de carga (Fig. II.1.a). Inmediatamente, el sistema cambia a la posición de inyección (Fig. II.1.b) y, el disolvente de limpieza, impulsa la muestra hacia el RAM. Esta posición se mantiene durante 10 minutos a 1 mL min⁻¹. Durante este tiempo los interferentes de la matriz se lavan a desecho mientras que los compuestos de interés se retienen en el RAM. Tras este tiempo, el sistema cambia a la posición de elución (Fig. II.1.c) y el MeOH impulsado por la bomba B eluye los analitos a 1 mL min⁻¹ hacia la salida, donde son recogidos manualmente en un vial. Finalmente, el sistema se mantiene tres minutos en la posición de elución para asegurar el lavado completo del RAM. La jeringa y el bucle de inyección se lavaron manualmente con MeOH.

Con el objetivo de aumentar al máximo la sensibilidad del método se evaporó la disolución metanólica bajo corriente de N₂ reconstituyéndose finalmente con una mezcla metanol/agua (60:40 v/v). Los resultados experimentales mostraron que la etapa de evaporación conllevó la pérdida de los analitos más volátiles (DCPL, TCPL y tBPL, Tabla 4.1, Pág. 100).

A la vista de los resultados obtenidos, y con el fin de evitar la etapa de evaporación a la par que aumentar la sensibilidad, se estudió

la posible minimización del volumen de elución y la maximización del volumen de muestra inyectada en el sistema. Se realizó lo primero recogiendo fracciones de 167 μL , controlando el tiempo de elución (10 segundos), con el fin de determinar cuál de ellas presentaba el mayor porcentaje de los analitos de interés. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura II.3 (Pág. 145).

Se observa como al utilizar MeOH como disolvente de elución la fracción eluida que contiene el porcentaje más alto de los analitos es la segunda. Las recuperaciones para esta fracción son superiores al 80% en todos los casos. Las fracciones tercera y cuarta no superan, en ningún caso, el 15% de área total. Por lo tanto, la segunda fracción, con un volumen de 167 μL , es la que se recoge y utiliza para el posterior análisis en CE-MS.

En cuanto a la maximización del volumen de muestra inyectado, se ensayaron volúmenes de inyección en el RAM de entre 2 y 6 mL. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura II.4 (Pág. 145).

Puede observarse como la señal analítica aumenta al hacerlo el volumen de muestra inyectado debido a la preconcentración aportada por el RAM. Sin embargo, para volúmenes superiores a 4 mL, se observa un importante descenso de la señal. Este comportamiento revela que la inyección de volúmenes tan grandes compromete la eficacia de la limpieza aportada por el RAM, incluso para un tiempo de lavado de 10 minutos, aumentando la supresión iónica sufrida por los analitos de interés. Se seleccionó, por lo tanto, un volumen de inyección de muestra de 4 mL como el óptimo para el método desarrollado.

Partiendo de las variables previamente optimizadas se determinaron las características analíticas del método RAM, CE-MS propuesto. En el intervalo de calibración estudiado, de 200 a 1500 ng g^{-1} , se obtuvieron rectas de calibrado con valores de R^2 superiores a 0.99. Los límites de detección, estimados como la concentración para la que se obtendría una relación señal-ruido de 3, variaron en el intervalo de 20 ng g^{-1} a 120 ng g^{-1} . Para un nivel de concentración de 200 ng g^{-1} , las recuperaciones variaron entre 92% y 104% y la precisión, medida como RSD en el mismo día, entre 5% y 22%. En la parte izquierda de la figura II.5 (RAM, CE-MS) se muestra el electroferograma de ion total

(*TIE, Total Ion Electropherogram*) y los electroferogramas de ion extraído para una muestra de miel dopada a un nivel de concentración de 200 ng g⁻¹.

4.A.4.5. Incorporación de SPE al método RAM, CE-MS

Cuando la Legislación no establece límites máximos de residuo (*MRLs, Maximum Residue Limits*) se considera que el método es adecuado siempre que sus límites de detección sean próximos al nivel más bajo establecido por la Legislación para otros contaminantes en esa matriz.

Aunque los límites de detección obtenidos con el método RAM, CE-MS (20-120 ng g⁻¹) mejoran sensiblemente los obtenidos con el método CE-MS (40-800 ng g⁻¹) es necesario obtener LODs aún menores que permitan detectar a los fenoles estudiados a un nivel de concentración próximo a 10 ng g⁻¹.

La incorporación de una etapa de SPE suele permitir la preconcentración de los analitos lo que redundará en la mejora de los límites analíticos. Se estudió la posible incorporación de esta etapa al método RAM, CE-MS desarrollándose así una metodología RAM, SPE, CE-MS. La suma de las fracciones eluidas del RAM (4 x 167 µL) fue diluida hasta reducir el contenido metanólico al 20% y preconcentrada en un sorbente Oasis HLB. Así, la incorporación de la etapa SPE al método RAM, CE-MS permitió tratar hasta 16 mL de muestra (4 inyecciones de 4 mL en el RAM), debido a la importante limpieza aportada por el RAM. La metodología RAM, SPE, CE-MS resultó apropiada para el análisis de los compuestos estudiados en miel. En la parte derecha de la figura II.5 (RAM, SPE, CE-MS, Pág. 146) se muestra el electroferograma de ion total (*TIE, Total Ion Electropherogram*) y los electroferogramas de ion extraído para una muestra de miel dopada a un nivel de concentración de 50 ng g⁻¹.

El estudio sobre los efectos de matriz se muestra en la Figura II.6 (Pág. 147). Se representan en ella las señales, normalizadas frente a la de los patrones, obtenidas al dopar una muestra después (*blank spiked*) y antes (*sample spiked*) del procedimiento de tratamiento propuesto. Se puede deducir que la eficacia de la etapa de extracción propuesta

(relación entre *sample spiked* y *blank spiked*) está comprendida entre el 71% y el 113%. Además, la diferencia de señal entre los patrones y las muestras dopadas (*sample spiked*) refleja la existencia de supresión iónica siendo necesario realizar el proceso de calibración en matriz real libre de analito (*matrix-matched calibration*).

4.A.4.6. Características analíticas del método RAM, SPE, CE-MS

En el proceso de validación, realizado con calibrados en la propia matriz y utilizando tBBA como patrón interno, se obtuvo un punto de identificación para cada analito, correspondiente al ion molecular desprotonado. Por lo tanto, no puede considerarse el método como de confirmación al no alcanzarse el mínimo número de IPs necesario. Sin embargo, en el caso del TCPL y PCPL los puntos de identificación aumentan hasta tres ya que se analizan tres isótopos del cloro diferentes, por lo que estos analitos sí pueden considerarse como confirmados.

Los estudios sobre la validación de esta metodología RAM, SPE, CE-MS son ampliamente discutidos en el artículo de investigación II (Pág. 146). Los límites de detección alcanzados variaron entre 5 y 31 ng g⁻¹. Los RSDs *interday* estuvieron comprendidos entre el 20% y el 24% para un nivel de concentración de 50 ng g⁻¹. Las recuperaciones, calculadas a partir de muestras dopadas, mostraron valores entre el 96% y el 114% para un nivel de concentración de 100 ng g⁻¹ (Tabla II.3, Pág. 147).

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN II

Electrophoresis 31 (2010) 2279

Encarnación Rodríguez-Gonzalo¹
Javier Domínguez-Álvarez¹
Diego García-Gómez¹
María-Guadalupe García-Jiménez²
Rita Carabias-Martínez¹

Research Article

Determination of endocrine disruptors in honey by CZE-MS using restricted access materials for matrix cleanup

¹Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, Universidad de Salamanca, Spain
²Departamento de Química, Universidad de Guanajuato, México, Mexico

Received November 25, 2009
Revised February 4, 2010
Accepted February 17, 2010

An analytical method based on CZE coupled to ESI-MS is proposed for the identification and simultaneous quantification of several endocrine-disrupting chemicals in honey. The target compounds were the chlorophenols: 2,4-dichlorophenol, 2,4,5-trichlorophenol and pentachlorophenol, and bisphenol-A, 4-*tert*-butylphenol, and 4-*tert*-butylbenzoic acid. A two-step optimization of the ESI-MS detection was carried out. First, the organic solvent present in the sheath liquid was selected and its effect on the analytical signal was studied. The best results in terms of the intensity of the MS signals were obtained with methanol. Thus, an experimental design technique (Doehlert type) was used for the optimization of the other parameters: the NH₃ concentration in the sheath liquid, the flow of the sheath liquid, the nebulizer pressure in ESI, and the drying gas temperature and flow. Here, we developed a new sample treatment based on the combined use of a restricted access material and a polymeric sorbent for SPE. The LOD achieved were in the range of 5–31 ng/g. The intraday precision of the proposed method was determined from replicate analyses ($n = 4$) at a concentration level of 50 ng/g, with RSD values in the range of 15–23%. The results revealed that the proposed method is suitable for the reliable quantification of endocrine-disrupting chemicals in honey at nanograms *per* gram levels.

Keywords:

CE-ESI-MS / Endocrine-disrupting chemicals / Honey / Restricted access material / SPE
DOI 10.1002/elps.200900715

1 Introduction

There is increasing concern about a series of substances used in industrial, agricultural and consumer goods, because some chemicals may cause disruption of the endocrine system and may affect the hormonal control of development in aquatic organisms, wildlife and even humans. These chemicals have often been described as endocrine-disrupting chemicals (EDCs) and include different groups of chemicals such as pesticides, alkylphenols, dioxins, furans, certain polychlorinated biphenyls, synthetic steroids, *etc.* A report from the European Commission [1]

has proposed a candidate list of 553 substances for further evaluation of their role in endocrine disruption. The analytes studied in the present work are included among these substances: bisphenol A (BPA), 4-*tert*-butylbenzoic acid (*t*-BBA), 4-*tert*-butylphenol (*t*-BP), and the chlorophenols 2,4-dichlorophenol (DCP), 2,4,5-trichlorophenol (TCP), and pentachlorophenol (PCP).

These compounds are used in industry or are produced as intermediates in certain industrial processes. Alkylphenols are mainly used to make alkylphenol ethoxylate surfactants (detergents) and can themselves be used as plasticisers in plastics. BPA is used in the production of epoxy resins and polycarbonate plastics. These plastics are used in many food and drinks packaging applications, while the resins are commonly used as lacquers to coat metal products such as food cans, bottle tops, and water supply pipes. Chlorophenols are released as byproducts in a number of chemical processes involving chlorine. PCP is still used in some countries as a heavy-duty wood preservative, and 4-*t*-BBA can be used as an intermediate in pharmaceuticals.

Although these compounds have been widely analyzed in water, sludge and sediments, food may be another important route of exposure to the EDCs. Some EDCs could enter food at several stages of food production and *via* the

Correspondence: Professor Rita Carabias Martínez, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, Universidad de Salamanca, 37008 Salamanca, Spain
E-mail: rcm@usal.es
Fax: +34-923-294-483

Abbreviations: AcOET, ethyl acetate; BPA, bisphenol A; DCP, dichlorophenol; EDC, endocrine-disrupting chemical; GA, genetic algorithm; IS, internal standard; PCP, pentachlorophenol; RAM, restricted access material; *t*-BBA, *tert*-butylbenzoic acid; *t*-BP, *tert*-butylphenol; TCP, trichlorophenol

plastic packaging material, stretch films used for food packaging, or many foodstuff containers for oven or microwave cooking. Therefore, it is important to consider food packaging [2] as an important route of exposure of humans to EDCs by leaching from packaging the food. The presence of phenolic EDCs in different foods [3–5] among which is honey [6, 7] has been reported by several authors, showing the potential risk for consumers. Some of the analytes studied here (BPA, PCP – banned according to EC Directive (91/173/EEC) – and *t*-BP) appear in the list compiled by the Scientific Committee for Food of the European Commission concerning monomers and additives used in the manufacture of plastic materials intended to come into contact with foodstuffs. The globally increased concern about these compounds underscores the need to develop highly specific and sensitive analytical methods for their analysis in food samples.

Honey is a natural and wholesome product that is consumed worldwide. The nutritional and quality aspects of honey are important since they determine consumer acceptance. The safety of honey is also critical because it affects human health. According to European Union (EU) regulations, honey as a natural product must be free of chemicals (Directive 74/409/EEC).

In this sense, CE is a good alternative to the more traditional analytical separation techniques such as LC or GC. Moreover, the coupling of CE-MS has some very attractive features, since it combines the highly separative capacity of CE with the good selectivity and high-power identification of MS. Nevertheless, CE-MS currently presents a limited concentration sensitivity that may prevent its use in the analysis of residues of organic contaminants in foods. This is why the development and application of preconcentration techniques before CE-MS is of special importance in this field. The application of capillary electromigration methods for the analysis of foods and food components has been the subject of different reviews [8, 9] as have the main applications of CE-MS for the analysis of organic contaminants in foods [10–13]. Several CE and CE-MS methods for the determination of chlorophenols and other phenolic compounds have also been reported [14–16].

Often, the most critical point in analysis is the need for efficient sample preparation, which may involve analyte isolation, trace enrichment, and further cleanup to remove the matrix interferences. These pretreatment steps often take up most of the total analysis time, contributing strongly to the total cost of analysis and greatly influencing the reliability and accuracy of the analysis. Liquid–liquid extraction, SPE, and solid-phase microextraction are the sample treatment techniques most frequently employed for the extraction of these kinds of EDCs in food. In the particular case of the analysis of honey samples, SPE has been widely used for the extraction and enrichment of different organic contaminants [4, 17–19].

Restricted access materials (RAMs) are porous chromatographic supports specifically designed to allow solid–liquid extraction and the enrichment of small mole-

cules, thereby limiting the access of macromolecules to the interaction sites of a stationary phase bonded on their inner surface. Only small molecules are able to penetrate into the pores and interact with the solid sorbent on the inner surface, while large molecules are eluted with the cleanup solvent. RAMs were initially designed to remove proteins in the analysis of drugs in biological matrices [20–22]. The literature contains reports concerning naphthols [23], bisphenol A, and octylphenol [24]. However, applications to food analysis are still scarce [25, 26].

Here, a procedure based on the combined use of RAMs and polymeric SPE sorbents was developed for the extraction–preconcentration–cleanup of several EDCs in honey. After this sample treatment, the analytes were separated and analyzed by CE-ESI-MS. The optimum conditions for the electrophoretic separation and detection by MS were optimized. The whole method developed, RAM+SPE before CE-ESI-MS, was applied to commercial honey samples. To our knowledge, this work describes for the first time the use of a RAM in sample treatment steps before the analysis of microcontaminants in food by CE-MS.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

The compounds studied were as follows: 4-*t*-BP, CAS RN [98-54-4]; BPA, CAS RN [80-05-7]; 2,4-DCP, CAS RN [120-83-2]; 2,4,5-TCP, CAS RN [95-95-4]; PCP and CAS RN [87-86-5] obtained from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany); and 4-*t*-BBA, CAS RN [98-73-7] obtained from Aldrich. Stock solutions of each compound were prepared in ACN at 500 mg/L. Table 1 summarizes some of the physicochemical properties of these compounds.

The organic solvents – ACN, methanol, and ethyl acetate (AcOET) – were of HPLC grade (Merck, Darmstadt, Germany) and were used as received. All the chemicals used for the preparation of the buffer and all other chemical were of analytical reagent grade.

The RAM used was LiChroCART 25-4LiChrospher RP4 ADS (25 μ m, 25 \times 4 mm) from Merck. The polymeric sorbent used for the SPE step was Oasis HLB 60 mg, a copolymer of poly(divinylbenzene-co-*N*-vinylpyrrolidone) from Waters (Milford, Massachusetts, USA).

2.2 Instrumentation

All the experiments were carried out with a Hewlett-Packard HP^{3D} CE instrument (Agilent Technologies, Waldbron, Germany) equipped with a UV-visible DAD device working at 214 nm with a bandwidth of 16 nm. MS was performed using an Agilent LC/MSD SL mass spectrometer equipped with a single quadrupole analyzer. Both, the UV-visible DAD detector and the MS device were controlled by Agilent HP ChemStation software, version B.02.01 SR1.

Table 1. Physicochemical properties of the target compounds^{a)}

Compound	Log k_{ow}	pK_a	Solubility ^{b)} (mg/L)	Vapor pressure ^{b)} (mmHg)	Ions monitored (m/z)
4- <i>t</i> -BP	3.31	10.3	580	3.8×10^{-2}	149
4- <i>t</i> -BBA	3.85	4.4	28	6.4×10^{-4}	177
BPA	3.32	9.8	120	3.9×10^{-7}	227
PCP	5.12	4.9	14	1.1×10^{-4}	265, 267, 263
2,4,5-TCP	3.72	6.7	1200	7.5×10^{-3}	195, 197, 199
2,4-DCP	3.06	7.7	4500	9.0×10^{-2}	161

a) Data from Interactive PhysProp Database Demo, Syracuse Research Corporation, USA (<http://esc.syrres.com/interkow/physdemo.htm>).

b) Water, 25 °C.

Fused silica capillaries (75 μ m id) were from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA), supplied by Composite Metal Services (West Yorkshire, UK), and were used throughout the work.

Sample treatments using the RAM were performed on an HP 1100 Series instrument from Agilent equipped with two high pressure pumps, two six-port valves, and a 4-mL homemade injection loop. The system was controlled with an HP ChemStation.

For SPE, Oasis HLB sorbents were used. The conditioning of these sorbents and sample passage were accomplished using a syringe. The cartridge was dried in a vacuum pump (Afa, Barcelona, Spain) coupled to a 20-place manifold for sample preparation (Varian, Harbor City, USA)

2.3 Sample preparation

In this work, samples of polyfloral honey available commercially in the retail market were used. All the honey samples were first analyzed with the proposed method to check the natural occurrence of the target EDCs. No signals corresponding to the target analytes were found, and hence spiked honey samples were used. An amount of 2.5 g of honey sample was weighed in a small beaker and spiked with all six compounds. The sample was kept covered for approximately 12 h before the extraction to permit the interaction between the analytes and the matrix compounds. Quantitative results were obtained by using matrix-matched standards (blank honey samples spiked with standard analyte solutions). *t*-BBA was used as internal standard (IS). Calibration curves were established by considering the relative peak areas (as the ratio of analyte peak to IS peak). All the honey samples were diluted with UHQ water at a ratio 1:5 w/v.

2.3.1 Treatment of honey samples

The experimental setup for RAM sample treatment is shown in Fig. 1. The solution impelled by pump A consisted of a 2.5 mM ammonium formate (pH 2.9) solution with 10% ACN. This solution was used to transfer the sample

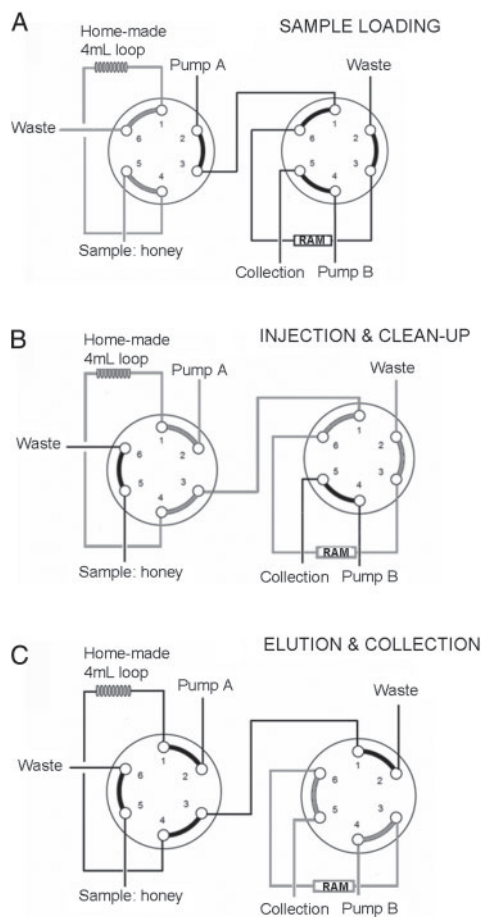


Figure 1. Experimental setup for RAM sample treatment.

bolus to the RAM column and in turn to clean the RAM. Pump B impelled the elution solvent (methanol) to elute the analyte retained on the RAM.

First, a predetermined volume of honey was loaded manually into the loop with a syringe, with the system in the “sample loading” position. Immediately thereafter, the system was changed to the “injection and cleanup position” (Fig. 1B) and pump A was started to pump the cleanup solution at 1 mL/min for 10 min. While the matrix components of the honey were washed to waste, the target compounds studied were withheld in the RAM. At 10 min, the system setup was changed to the “elution and collection” position (Fig. 1C) and methanol, from pump B, was used to elute the analytes at a flow rate of 1 mL/min in back-flush mode to the collection exit, where they were collected manually into a vial. Controlling the elution time, 167 μ L were collected. After the collection had been completed, the system was kept for 3 min in the “elution and collection position” to wash the RAM completely. Then, the system was changed to the initial positions. Three minutes were allowed to elapse in order for the system to become reequilibrated. The syringe and the loop were cleaned manually with methanol before each analysis. In the proposed method (RAM+SPE before CE-MS), initially 4.0 mL of honey was injected and the fraction eluted was collected, this process being repeated four times. Thus, the total amount of honey preconcentrated was 16 mL.

The sum of the fractions eluted from the RAM ($4 \times 167 \mu$ L) was later preconcentrated by SPE, using an Oasis HLB sorbent. Dilution of methanolic RAM extracts with UHQ water to a methanol content of about 20% was performed to prevent elution of the compounds from the SPE sorbent during the sample-loading step. Since preconcentration must be carried out under acidic conditions to avoid ionization of the compounds in the sample, 10 mM of ammonium formate was also added.

The SPE method, using Oasis HLB sorbents, has been optimized elsewhere [27] and involves the conditioning of the cartridges with 5 mL of AcOET, then 5 mL of ACN and, finally, 5 mL of UHQ water. Sample passage (~ 3.5 mL) was carried out by gravity. Once the retention step had been completed, the cartridges were dried for 15 min under a vacuum of 15 mmHg (1 mmHg = 133.322 Pa). The compounds retained were eluted with 0.5 mL of ACN and 3 mL of AcOET. The organic phase obtained was carefully evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen at 30–35°C, and the residue was reconstituted with the appropriate injection medium (60/40 v/v methanol/water).

2.4 CE separation conditions

Optimization of the electrophoretic separation was carried out with a 57-cm total-length capillary, with 50 cm to the UV detector. The rest of the experiments were carried out with an 87.5-cm total-length capillary, with 21 cm to the UV detector.

Injections were made at the anodic end, using a pressure of 50 mbar for 17 s. Electrophoretic separation was achieved with a voltage of 22 kV (normal mode), with an

initial ramp of 7 s. The running buffer was an aqueous solution of 15 mM ammonium acetate adjusted to pH 11.0 with a concentrated aqueous solution of ammonium hydroxide. The temperature of the capillary was kept constant at 25°C. Before the first use, the capillary was conditioned by flushing with the BGE for 10 min at 4 bar. This was also implemented as a daily startup procedure. After each run, the capillary was prewashed at 4 bar for 1 min with fresh running buffer.

2.5 ESI interface

An Agilent coaxial sheath liquid sprayer was used for CZE-MS coupling. The fused silica capillary was mounted in such a way that the tip just protruded from the surrounding steel needle; $\sim 1/2$ of the capillary od. The sheath liquid consisted of methanol containing 3% v/v of aqueous ammonium hydroxide concentrated solution and was delivered at a flow rate of 0.78 mL/min by a Agilent 1100 series pump, equipped with a 1:100 flow splitter. The ESI voltage was set at -4000 V. Other electrospray parameters at optimum conditions were: nebulizer pressure, 2 psi; drying gas flow rate, 2 L/min; drying gas temperature, 100°C.

2.6 MS conditions

The mass spectrometer was operated in the negative ion mode. Analyte quantification was carried out under SIM acquisition mode using deprotonated molecules. The ions monitored simultaneously were as follows: 149 m/z for 4-*t*-BP; 177 m/z for 4-*t*-BBA; 227 m/z for BPA; 265, 267, and 263 m/z for PCP; 195, 197, and 199 m/z for 2,4,5-TCP; and 161 for 2,4-DCP (Table 1). The number of identification points was 1 for all the analytes, except for PCP and 2,4,5-TCP for which it was 3. The optimized fragmentor voltage was 60 V for all the analytes.

3 Results and discussion

3.1 Electrophoretic separation

Before the application of MS detection, previous studies were carried out to optimize the electrophoretic separation of the selected compounds using a UV-Vis DAD device. Thus, the pH and ionic strength of the BGE, the separation voltage, and the temperature of the capillary during separation were evaluated. A volatile buffer of low conductivity (*i.e.*, an electric current below 50 μ A) must be used to consider the compatibility of the CE method with MS. An ammonium acetate buffer was employed. The optimized buffer concentration was 15 mM, since this was found to provide a good compromise among peak shape, electrical current intensity, and analysis time.

The pH of the CE separation buffer must be set at a high value to achieve good separation and to improve the presence of deprotonated molecules in the electrospray device (Table 1). The optimized value was 11.0 (range studied 9.7–11.6). The separation voltage and the temperature of the capillary were also optimized, and values of 22 kV and 25°C were selected. Methanol was employed as an additive in the BGE; the range studied was 0–30% v/v and the optimum value proved to be 0%.

3.2 CE-ESI-MS optimization

Starting from the optimum values for separation, the optimization of the parameters affecting the CE-ESI-MS method was performed. Initially, different sheath liquids were tested, all of them containing 1% v/v of aqueous ammonium hydroxide concentrated solution to improve the presence of the deprotonated molecules in the electrospray. Water, methanol, isopropanol, and ACN, as well as all their binary mixtures (ratio 50:50 v/v) were tested. Each analyte dissolved in the CE buffer was introduced by direct infusion through the capillary into the spray chamber and the scan (100–400 *m/z*) was monitored over 5 min. The ESI and MS

parameters were set at typical values. As shown in Fig. 2, the best results in terms of intensity of the MS signal for the endocrine disruptors studied were obtained using methanol containing 1% v/v of aqueous ammonium hydroxide concentrated solution. The main ion obtained was the deprotonated molecular ion, except for ACN as sheath liquid, where different adducts with BGE anions were obtained for 2,4-DCP, BPA, and 4-*t*-BP. In addition, for 4-*t*-BP another main adduct, [2M-H]⁻, was obtained for the isopropanol/methanol, isopropanol/ACN, and methanol/ACN mixtures.

Using methanol as sheath liquid, all the parameters related to electrospray formation were studied to obtain the highest abundance signal for the molecular ions for all the analytes. The factors studied and their corresponding ranges were as follows: percentage of the aqueous ammonium hydroxide concentrated solution in the sheath liquid, 0–3% v/v; nebulizer pressure, 2–20 psi; sheath liquid flow, 0.05–2 mL/min (before 1:100 split); drying gas flow, 2–20 L/min; and drying gas temperature 100–200°C. The intervals studied for these parameters were imposed by different constraints such as initial proofs, the stability of the spray, and the instrumental and capillary limitations. The use of the experimental design techniques for the

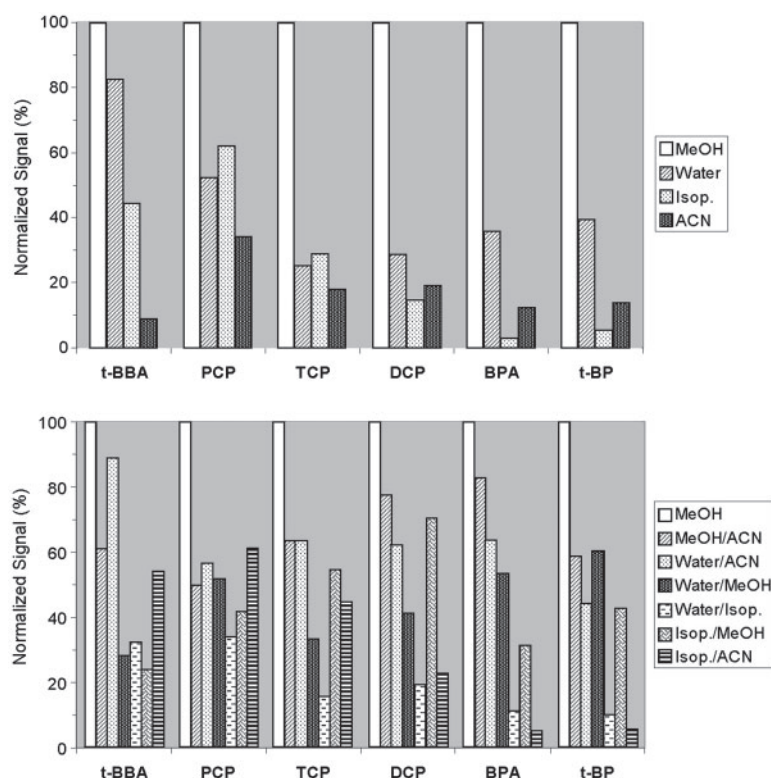


Figure 2. Number of counts for each analyte normalized to the largest value (%) employing different sheath liquids containing 1% v/v aqueous ammonium hydroxide concentrated solution.

optimization of ESI parameters is suitable [28–30] for reducing the redundancies in the experiments and searching for optimal conditions simultaneously instead of using a step-by-step method. In our case, the optimization of these five factors was carried out by means of a Doehlert design [31], plus three central points to evaluate the lack of fit. The levels for the factors were 5, 7, 7, 7, and 3, respectively. This kind of design is not much used in analytical chemistry in spite of its advantages, such as its high efficiency in comparison with other designs such as the Box–Behnken or central composite designs, and because of the possibility of studying a higher number of levels for the most significant variables, taking into account the observed effects from screening designs or initial experiments.

The analytical response to be optimized was the geometric mean for peak heights working in SIM mode. The analyses were performed electrophoretically under the optimized CE separation conditions, each time injecting an aqueous sample containing all the analytes at the 10 mg/L concentration level. The MS capillary voltage was set to its maximum allowed value (−4000 V).

The experimental analytical responses obtained were fitted to a model containing the linear terms and the double interactions among the five factors without containing the quadratic interactions. The model-fitting characteristics, coefficients and their variance inflation factors are shown in Table 2. The experimental response values were significantly fitted to the model (<5%). Also, the experimental responses did not show significantly lack of fit to the model (>5%).

The search for the maximum value of the analytical response was carried out using a genetic algorithm (GA).

GAs differ substantially from more traditional search and optimization methods since they use probabilistic, and not deterministic, transition rules, and they search for a population of points in parallel and not merely a single point; hence, GAs are potentially useful for identifying all alternative or similar solutions simultaneously.

The factor values giving the maximum of the analytical responses were located at: percentage of aqueous ammonium hydroxide concentrated solution in the sheath liquid, 3% v/v; nebulizer pressure, 2 psi; sheath liquid flow, 0.78 mL/min; drying gas flow, 2 L/min; and drying gas temperature 100 °C.

Under the optimized ESI conditions, the MS fragmentation curves were studied for all the analytes. Typical fragmentation curves were obtained and hence a voltage of 60 V was selected for all the analytes. The amount of sample injected in the CE capillary was also studied, obtaining the maximum of the SIM peak height for all the analytes at 17 s when the hydrodynamic injection pressure was set at 50 mbar.

3.3 Characteristics of the method

The whole optimized CE-ESI-MS method was initially characterized for standard aqueous solutions of the analytes with a residual content of methanol lower than 14% v/v. Linear calibration curves were obtained for all compounds across the range tested (0.2–42 µg/mL, depending on the analyte), employing 4-*t*-BBA as IS. Calibration curves were prepared at six levels and each calibration level was replicated four times. The LOD (S/N of 3) ranged from 0.04, for PCP, to 0.80 µg/mL for 4-*t*-BP. The RSD values

Table 2. Coefficients, statistical parameters, and model fitting^{a)} for ESI optimization

	Related term ^{b)}	Coefficient × 10 ³	VI F ^{c)}	Confidence interval ^{d)}	Significance
b ₀	–	3.7711	1.1316	3.4 to 4.1	Yes
b ₁	C _{NH3}	−0.0458	1.0925	−0.7 to 0.6	No
b ₂	P _{Neb}	−2.1256	1.1987	−2.9 to −1.4	Yes
b ₃	Q _{Sheat}	1.1180	1.1179	0.3 to 1.9	Yes
b ₄	Q _{N2}	−0.1148	1.1219	−0.9 to 0.7	No
b ₅	T _{N2}	0.5697	1.0314	−0.1 to 1.3	No
b ₁₂	C _{NH3} · P _{Neb}	0.3991	1.7302	−1.9 to 2.7	No
b ₁₃	C _{NH3} · Q _{Sheat}	−1.3194	1.4843	−4.0 to 1.4	No
b ₁₄	C _{NH3} · Q _{N2}	0.7053	1.3809	−2.1 to 3.5	No
b ₁₅	C _{NH3} · T _{N2}	−1.9089	1.3128	−4.4 to 0.6	No
b ₂₃	P _{Neb} · Q _{Sheat}	2.4621	1.2678	0.2 to 4.7	Yes
b ₂₄	P _{Neb} · Q _{N2}	3.9699	1.2440	1.6 to 6.4	Yes
b ₂₅	P _{Neb} · T _{N2}	0.8471	1.3623	−1.1 to 2.8	No
b ₃₄	Q _{Sheat} · Q _{N2}	1.9982	1.0982	−0.2 to 4.2	No
b ₃₅	Q _{Sheat} · T _{N2}	0.0998	1.0569	−2.1 to 2.3	No
b ₄₅	Q _{N2} · T _{N2}	2.6836	1.0079	0.5 to 4.9	Yes

a) Model significance lower than 5% (0.03%); lack of fit significance higher than 5% (6.0%); correlation coefficient 0.899; S_{v/x} 0.78 × 10³.

b) C_{NH3}, concentration (% volume) of aqueous ammonium hydroxide concentrated solution in the sheath liquid; P_{Neb}, nebulizer pressure (psi); Q_{Sheat}, sheath liquid flow (mL/min); Q_{N2}, drying nitrogen flow (L/min); T_{N2}, drying nitrogen temperature (°C).

c) Variance inflation factors (<4 acceptable values, 1 optimal value).

d) Confidence intervals for each coefficient at 95% significance level.

(intraday, $n = 7$) for the analytical signal ranged from 11.0, for TCP, to 16.7%, for 4-*t*-BP at a concentration level of 0.4–1.6 mg/L, depending on the compound.

3.4 Sample treatment

The analysis of complex matrices using MS requires previous sample treatment since quantitative determinations may be affected by the ion suppression that occurs in electrospray, mainly due the coelution of matrix interferents with the analytes. It is well known that the matrix effects due to coextracted and coeluting matrix substances can seriously affect analyte signals.

To apply the optimized CE-ESI-MS method to the analysis of EDCs in honey, it was necessary to develop a suitable sample treatment. Initially, a commercial Oasis HLB polymeric cartridge was used. The SPE procedure for Oasis HLB is described in Section 2.3. With these materials, it was not possible to pass sample volumes (honey dissolved at a proportion of 1:5 w/v) above 5 mL through the cartridge, since the sorbent became blocked. For this 5-mL sample volume, working with honey samples spiked at 250 ng/g, only PCP was detected.

3.4.1 Use of the RAM before CE-MS

The use of RAMs is very effective in the analysis of small molecules in biological fluids. They act by limiting the access of macromolecules to the sorbent by means of a porous membrane, thereby achieving the cleanup of the biological matrix. Here, we checked the possibility of using a RAM column as an efficient step for the cleaning of honey samples, which have a high content of sugars. Accordingly, a study was made of the variables involved in the process.

Initially, 500 μ L of sample were injected using the configuration shown in Fig. 1A. The solvent that transfers the sample bolus to the RAM material (Fig. 1B) also acted as a washing solvent. The composition of this solvent was optimized. By means of pump A different solutions containing 2.5 mM ammonium formate (pH 2.9) with different percentages of ACN were passed through the system. The results showed that the use of aqueous solutions afforded not very clean extracts; however, upon increasing the percentage of ACN above 25% analyte elution occurred. The use of solutions containing 2.5 mM ammonium formate (pH 2.9) with 10% ACN for 10 min eliminated the matrix interferents and did not elute the analytes retained in the RAM.

The initial studies were carried out eluting the RAM with methanol and collecting 1 mL of the eluted fraction (Fig. 1C, pump B). To increase the sensitivity of the method, the methanolic solution was brought to dryness under a gentle stream of N_2 and the dry residue was reconstituted with a solution containing 60/40 v/v of methanol/water. These experiments indicated that the evaporation of methanolic solutions involves the loss of DCP, TCP, and *t*-

BP, which are the most volatile analytes (Table 1). In light of this, and with a view to eliminating the evaporation step, we determined the fraction of eluate that contained the highest percentage of analyte. Figure 3 shows the variations in the signals as a function of the fraction eluted and analyzed. It may be seen that upon using methanol all the analytes eluted in the same fraction. The fraction richest in analytes was the second one, whereas in the third and fourth fractions the amount of analyte eluted was lower than 15%. In later studies, the second fraction, a volume of 167 μ L, was collected. This fraction was diluted with UHQ water until a solution with 60/40 v/v of methanol/water was obtained.

With a view to enhancing sensitivity, the possibility of injecting volumes of up to 6000 μ L was assayed. For the injected volumes greater than 4000 μ L, a decrease in the signal was obtained (Fig. 4). This kind of behavior reveals that the injection of large volumes of sample into the RAM column decreases the cleaning efficiency and hence greater ion suppression is obtained.

The analytical characteristics of the method (RAM before CE-MS) were determined by injecting a volume of 4000 μ L of honey into the RAM. The estimated LOD were in the range 20–120 ng/g.

Since EDCs are still being evaluated [1], no legislation limits for these compounds in foodstuffs are available. Thus,

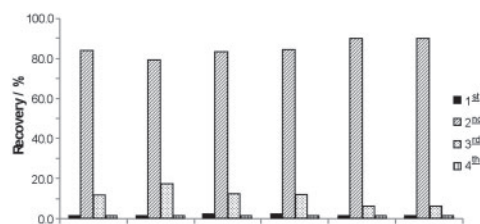


Figure 3. Elution profiles for each compound from the RAM system using methanol as eluent. Volume of each fraction is 167 μ L.

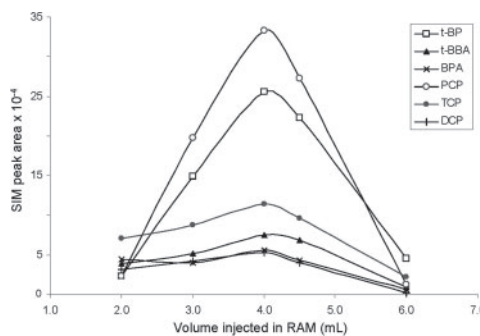


Figure 4. Effect on the analytical signal of the RAM injected volume of 1:5 diluted honey sample.

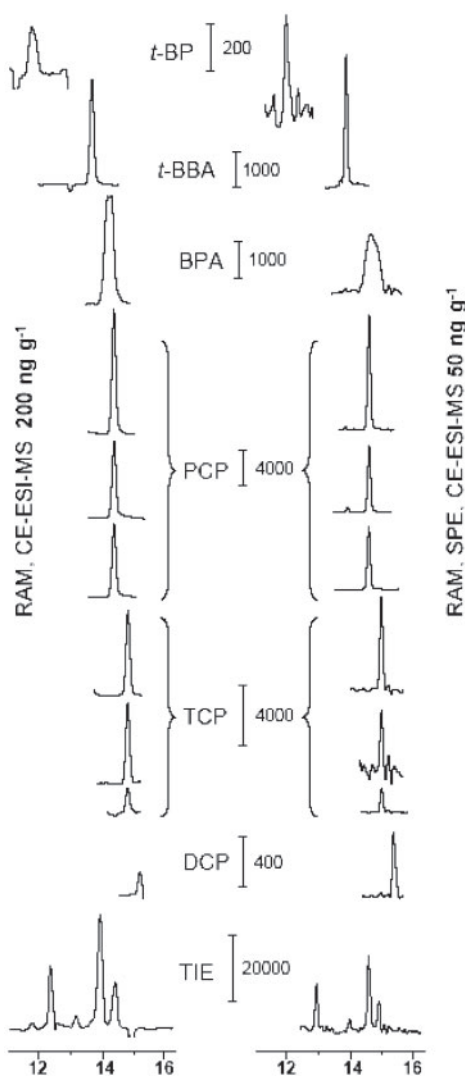


Figure 5. Electropherograms for two different honey samples spiked with the EDCs and analyzed by RAM and RAM+SPE before CE-ESI-MS. The concentration levels of each analyte in the honey samples are 200 and 50 ng/g, respectively. CE conditions: BGE, 15 mM ammonium acetate buffer (pH 11.0) with ammonium hydroxide; uncoated fused silica capillary, 75 μm id \times 87.5 cm; injection by pressure at 50 mbar for 17 s; applied voltage, 22 kV; temperature 25°C. ESI conditions: negative ion mode; spray voltage -4.0 kV; sheath liquid, methanol with 3% v/v of aqueous ammonium hydroxide concentrated solution at 0.78 mL/min (1:100 flow splitter); drying gas flow, 2 L/min; drying gas temperature, 100°C; nebulizer pressure, 2 psi. MS conditions: SIM acquisition mode of deprotonated molecules, PCP, and TCP with three isotopic identification points; fragmentation amplitude, 60 V. TIE, total ion electropherogram.

the development of sensitive methods to identify and assess EDCs is a basic requirement for comprehensive legislative action aimed at protecting people and the environment from the potential dangers posed by these chemicals. In view of the lack of legislation, it has been considered that the method should have LOD of 10 ng/g (values proposed by default in the legislation as maximum residue limits for food contaminants).

3.4.2 Use of a RAM and SPE step before CE-MS

To obtain a more sensitive method for the quantification of the target compounds in honey, a combination of the cleanup performed with the RAM followed by another new step with a polymeric SPE sorbent was studied. The experimental procedure is described in Section 2.3. In Fig. 5, the electropherograms for two differently spiked honey samples analyzed by RAM and by RAM+SPE before CE-MS are depicted. The combined RAM+SPE procedure appeared to be appropriate for the cleanup and enrichment of target compounds from honey.

Figure 6 shows the normalized signals for a honey sample spiked at 400 ng/g and subsequently treated following the RAM+SPE before CE-ESI-MS procedure and for a honey blank treated using the same procedure and spiked shortly before injection. From a comparison of both signals, it may be observed that the recovery values of the proposed method lie between 71 and 113%. The same figure shows the signal generated by a standard solution of the same injected concentration as the previous ones. The difference between the signal of the standard and that of the spiked honey samples reflects an important degree of ion suppression. Accordingly, quantification should be carried out using the matrix-matched method.

3.5 Performance of the analytical method for the determination EDCs in honey

The optimized method, based on RAM+SPE before CE-MS, was validated with respect to linearity, precision, recoveries, and detection limits. Calibration was accomplished in the spiked honey samples using *t*-BBA as IS; the IS was added before starting sample treatment (Section 2.3). Calibration curves were prepared at seven levels and each calibration level was injected in quadruplicate. The range of concentrations and LODs ($S/N=3$) are summarized in Table 3.

The repeatability (intraday precision) of the analytical signal was determined. To do so, four honey samples spiked at two different concentration levels were used, 50 and 200 ng/g (Table 3) were used. Intraday RSD values ranged between 8 and 23%. Interday precision (within laboratory reproducibility) was determined in three consecutive days (four injections each day). The RSD values did not differ significantly from these percentages, ranging between 20

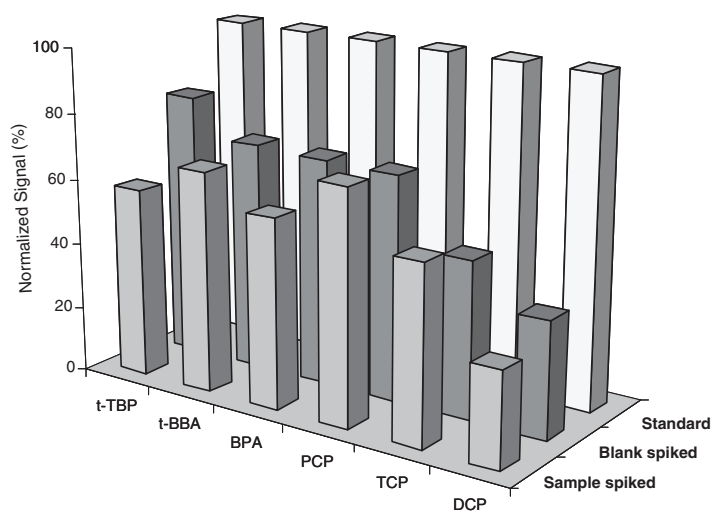


Figure 6. Effect on the analytical signal normalized to the highest value (%) for a standard; a honey blank (blank spiked) treated following the RAM+SPE before CE-ESI-MS procedure and spiked shortly before injection; and a honey sample spiked and subsequently treated following the same procedure. Concentration level in honey, 400 ng/g. Conditions as in Fig. 5.

Table 3. Analytical characteristics of the RAM, SPE, CE-ESI-MS methods applied to the analysis of EDCs in spiked honey samples

	t-BP	t-BPA	PCP	TCP	DCP
Intercept ^{a)}	-2.5 (2)	11.3 (13)	9.9 (25)	18.1 (14)	0.2 (2)
Slope ^{a)}	0.225 (0.005)	1.363 (0.025)	1.919 (0.044)	1.040 (0.031)	0.167 (0.003)
R ²	0.991	0.993	0.992	0.989	0.996
LOD (ng/g) ^{b)}	31	7.5	5.3	9.5	23
Range studied (ng/g)	50–1000	50–1000	50–1000	50–1000	50–1000
Recoveries (%)					
Per concentration level 100 ng/g	114 (13)	103 (14)	96 (20)	110 (23)	96 (17)
Per concentration level 200 ng/g	94 (7)	96 (7)	86 (10)	96 (11)	108 (9)
RSD (%) signal ^{c)}					
Per concentration level 50 ng/g	22.0	22.5	14.9	13.4	23.0
Per concentration level 200 ng/g	15.0	21.2	8.3	15.1	21.0

a) Normalized peak areas in SIM mode against IS (t-BBA). Standard deviations in brackets.

b) LOD (S/N = 3). Simultaneous detection in SIM mode.

c) Intraday (n = 4).

and 24%. This result is expected due to the normalization brought about by the use of t-BBA as IS.

In view of the lack of certified samples of EDCs in honey, the model was validated by determining the recovery values at two concentration levels in honey samples from a different commercial brand. To accomplish this, we analyzed honey samples that had not been used previously in the development of the RAM+SPE before CE-MS method; no EDCs were found at concentrations above the LOD of the method in them. These samples were spiked at two levels: 100 and 200 ng/g. The signal obtained for each of the analytes was introduced into the corresponding calibration line. The recovery values obtained and their precision are shown in Table 3. In all cases, satisfactory recovery values were obtained.

4 Concluding remarks

In this paper, a CE-ESI-MS method has been developed and validated for the quantification of EDCs in honey.

The use of an experimental design method for optimizing the variables affecting the ESI allows a reduction in the experimentation necessary to achieve maximum efficiency in the ionization of these compounds by means of the negative ionization in mode ESI.

A sample pretreatment procedure is proposed based on the combined use of a RAM and a SPE step with a polymeric sorbent. The use of the RAM column before the SPE sorbent allows volumes up to 16 mL to be preconcentrated, while in the absence of the RAM the SPE cartridge is blocked at sample volumes greater than 5 mL. This shows that the use of a RAM

before SPE efficiently removes sugars from the honey samples, which enables the preconcentration of a greater volume in the SPE sorbent. Also, the use of the RAM exerts a positive effect on the decrease in the ion suppression in the ESI-MS detector.

The procedure is simple and effective for the cleaning–extraction–preconcentration of the target compounds, including volatile compounds from honey samples, allowing detection limits in the range 5–31 ng/g.

The Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain (Project CTQ 2008-02200/BQU) and Junta de Castilla y León (Project SA017A08 and Grupo de Excelencia GR-65) are gratefully acknowledged for financial support of this work.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Communication from the Commission to the Council and the European Parliament. *Implementation of the Community Strategy for Endocrine Disruptors: a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife*. COM (1999) 706. Brussels, 14-06-2001, COM (2001) 262.
- [2] Muncke, J., *Sci. Total Environ.* 2009, 407, 4549–4559.
- [3] Kuo, H.-W., Ding, W.-H., *J. Chromatogr. A* 2003, 1027, 67–74.
- [4] Ballesteros-Gómez, A., Rubio, S., Pérez-Bendito, D., *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 449–469.
- [5] Nerín, C., Philo, M. R., Salafranca, J., Castle, L., *J. Chromatogr. A* 2002, 963, 375–380.
- [6] Campillo, N., Peñalver, R., Hernández-Córdoba, M., *J. Chromatogr. A* 2006, 1125, 31–37.
- [7] Inoue, K., Murayama, S., Takeba, K., Yoshimura, Y., Nakazawa, H., *J. Food Comp. Anal.* 2003, 16, 497–506.
- [8] García-Cañas, V., Cifuentes, A., *Electrophoresis* 2008, 29, 2309–2904.
- [9] Óbice, M. C., *Electrophoresis* 2007, 28, 4046–4062.
- [10] Herrero, M., García-Cañas, V., Simó, C., Cifuentes, A., *Electrophoresis* 2010, 31, 205–228.
- [11] Font, G., Ruiz, M. J., Fernández, M., Picó, Y., *Electrophoresis* 2008, 29, 2059–2078.
- [12] Müller, L., Barták, P., Bednář, P., Fryšová, I., Ševčík, J., Lemr, K., *Electrophoresis* 2008, 29, 2088–2093.
- [13] Hernández-Borges, J., Borges-Miquel, T. M., Rodríguez-Delgado, M. A., Cifuentes, A., *J. Chromatogr. A* 2007, 1153, 214–226.
- [14] Arráez-Román, D., Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 41, 1648–1656.
- [15] Jáuregui, O., Moyano, E., Galceran, M. T., *J. Chromatogr. A* 2000, 896, 125–133.
- [16] Jáuregui, O., Puignou, L., Galceran, M. T., *Electrophoresis* 2000, 21, 611–618.
- [17] Martel, A. C., Zeggane, S., *J. Chromatogr. A* 2002, 954, 173–180.
- [18] Rissato, S. R., Galhiane, M. S., Almeida, M. V., Gerenutti, M., Apon, B. M., *Food Chem.* 2007, 101, 1719–1726.
- [19] Michalkiewicz, A., Biesaga, M., Pyrzynska, K., *J. Chromatogr. A* 2008, 18–26.
- [20] Sadílek, P., Satinský, D., Solich, P., *Trends in Anal. Chem.* 2007, 26, 375–384.
- [21] Schafer, C., Lubda, D., *J. Chromatogr. A* 2001, 909, 73–78.
- [22] Souverain, S., Rudaz, S., Veuthey, J. L., *J. Chromatogr. B* 2004, 801, 141–156.
- [23] Preuss, R., Angerer, J., *J. Chromatogr. B* 2004, 801, 307–316.
- [24] Liu, M., Hashi, Y., Pan, F., Yao, J., Song, G., Lin, J. M., *J. Chromatogr. A* 2006, 1133, 142–148.
- [25] Chico, J., Meca, S., Compayó, R., Prat, M. D., Granados, M., *J. Chromatogr. A* 2008, 1181, 1–8.
- [26] Marazuela, M. D., Bogialli, S., *Anal. Chim. Acta* 2009, 645, 5–17.
- [27] Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Revilla-Ruiz, P., *J. Chromatogr. A* 2004, 1056, 131–138.
- [28] Lara, F. J., García-Campaña, A. M., Alés-Barrero, F., Bosque-Sendra, J. M., García-Ayuso, L. E., *Anal. Chem.* 2006, 78, 7665–7673.
- [29] Hernández-Borges, J., Rodríguez-Delgado, M. A., García-Montelongo, F. J., Cifuentes, A., *Electrophoresis* 2004, 25, 2065–2076.
- [30] Hernández-Borges, J., Rodríguez-Delgado, M. A., García-Montelongo, F. J., Cifuentes, A., *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 948–956.
- [31] Doehlert, D. H., *Appl. Stat.* 1970, 19, 231–239.

4.B. DETERMINACIÓN DE BENZIMIDAZOLES ANTIHELMÍNTICOS EN LECHE

4.B.1. Objeto

El presente apartado describe el desarrollo de un método analítico rápido y robusto para la determinación de fármacos antihelmínticos en leche basado en el acoplamiento de un RAM a un sistema LC-MS/MS. La novedad del método propuesto reside, principalmente, en el alto grado de automatización alcanzado en comparación con otros métodos descritos en bibliografía que, generalmente, emplean etapas de tratamiento de muestra manuales y laboriosas.

Como ya se ha indicado, los RAM se han utilizado principalmente en el análisis de muestras biológicas siendo su uso escaso en el análisis de muestras alimentarias. El trabajo realizado en el apartado anterior (4.A) estuvo centrado en el análisis de compuestos apolares en muestras de miel. La finalidad de este trabajo es el desarrollo de un método analítico utilizando RAM-RPLC-MS/MS para la determinación multi-residuo de benzimidazoles antihelmínticos y sus metabolitos en muestras de leche, compuestos que, en conjunto, abarcan un gran intervalo de polaridad. La determinación de benzimidazoles y sus metabolitos en leche es un desafío científico debido a que aunque los analitos objeto de estudio tienen una estructura molecular muy similar, presentan polaridades y características ácido-base muy distintas. Por ello, se dedicará especial atención al estudio del acoplamiento *on-line* en la etapa de extracción y limpieza de las muestras utilizando RAM.

La elevada ingesta diaria de leche condiciona que los MRLs establecidos por la Legislación, en esta matriz, sean inferiores a los establecidos para otros alimentos. Por ello, y con el fin de alcanzar los MRLs establecidos, se empleó un detector de triple cuadrupolo para cuantificar y confirmar la presencia de estos fármacos en muestras de leche siguiendo la Decisión 2002/657/EC. Posteriormente, el método fue aplicado al análisis de seis muestras de leche de vaca comerciales y otras dos, una de cabra y de vaca, procedentes de una granja ecológica.

Se debe señalar que, en nuestro conocimiento, hasta la fecha no se ha propuesto el uso de materiales RAM para el análisis de compuestos benzimidazólicos en leche.

4.B.2. Introducción

4.B.2.1. Benzimidazoles como agentes antihelmínticos

De todos los fármacos antiparasitarios, los benzimidazoles son uno de los grupos con mayor espectro de actividad y con elevada efectividad y seguridad. Se utilizan para el control de endoparásitos del ganado bovino, ovino, caprino y porcino; también en mascotas y en la agricultura para el control de nematodos parásitos de diversos cultivos.

Los benzimidazoles se introdujeron en los años 60 del siglo pasado. El primero en salir al mercado fue el tiabendazol, después se introdujeron otros como cambendazol, mebendazol y oxibendazol; eficaces contra adultos y larvas de la mayoría de los nematodos gastrointestinales del ganado. Posteriormente, a final de los años 70, se introdujeron benzimidazoles más modernos, que poseían grupos funcionales sulfóxidos y sulfonas, como el albendazol, el fenbendazol y el oxfendazol; eficaces también contra nematodos pulmonares y cestodos pero no contra las fasciolas (duelas de hígado), a excepción del albendazol, eficaz contra fasciolas adultas. Posteriormente se han incorporado al mercado otros como el febantel, el netobimin y el tiofanato conocidos como pro-benzimidazoles ya que, poco después de ser administrados y ya en el cuerpo del huésped, se transforman (metabolismo hepático) en un benzimidazol que es el que aporta la eficacia antihelmíntica. Los pro-benzimidazoles suelen ser bastante solubles en agua y por lo tanto su formulación y administración es más sencilla.

Los benzimidazoles presentan una estructura bicíclica compuesta por un anillo de benceno que se fusiona en las posiciones 4 y 5 de un anillo imidazólico formando el anillo benzimidazólico¹⁶⁴.

Los distintos benzimidazoles difieren en los sustituyentes que se encuentran en las posiciones R₁ y R₂ del anillo benzimidazólico (Figura 4.6).

¹⁶⁴ L.B. Townsend, D.S. Wise, Parasitol. Today 6 (1990) 107. “*The synthesis and chemistry of certain anthelmintic benzimidazoles*”

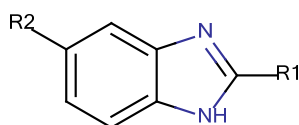


Figura 4.6. Estructura química básica de los benzimidazoles

De acuerdo con estos sustituyentes pueden clasificar en:

- *Metilcarbamatos*: si R₁ es un grupo metilcarbamato.
- *Tiazólicos*: si R₁ es un grupo tiazol.
- *Tiol halogenados*: si R₁ es un grupo tiol y R₂ es un halógeno.

En la Tabla 4.6 se muestran los benzimidazoles estudiados. Todos son metilcarbamatos con la excepción de albendazol-2-aminosulfona y 2-aminoflubendazol, que son metabolitos del albendazol y flubendazol, respectivamente, en los que ha ocurrido la transformación del grupo metilcarbamato en una amina.

Tabla 4.6. Benzimidazoles estudiados

Benzimidazol	R₁	R₂
Albendazol (ABZ)	-NH-CO-O-CH ₃	-S-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
Albendazol-sulfona (ABZ-SO ₂)	-NH-CO-O-CH ₃	-SO ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
Albendazol-sulfóxido (ABZ-SO)	-NH-CO-O-CH ₃	-SO-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
Carbendazim (MBC)	-NH-CO-O-CH ₃	-H
Flubendazol (FLU)	-NH-CO-O-CH ₃	-CO-(C ₆ H ₆)-4-F
Oxibendazol (OXI)	-NH-CO-O-CH ₃	-CO-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
Fenbendazol (FBZ)	-NH-CO-O-CH ₃	-S-(C ₆ H ₆)
Fenbendazol-sulfona (FBZ-SO ₂)	-NH-CO-O-CH ₃	-SO ₂ -C ₆ H ₆
Oxfendazol (OFZ)	-NH-CO-O-CH ₃	-SO-C ₆ H ₆
Metabolitos	R₁	R₂
Albendazol-2-aminosulfona (ABZ-NH ₂ -SO ₂)	-NH ₂	-SO ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
2-aminoflubendazol (FLU-HMET)	-NH ₂	-CO-(C ₆ H ₆)-4-F

Además de los analitos indicados en la Tabla 4.6, también se ha estudiado el Febantel que no es un benzimidazol en sí sino un probenzimidazol, precursor del Fenbendazol (Figura 4.7)¹⁶⁵.

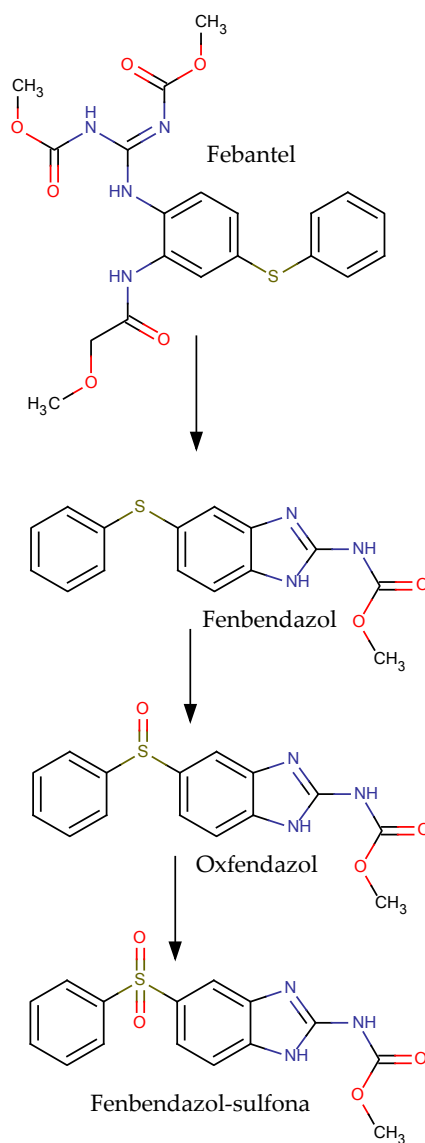


Figura 4.7. Metabolitos del probenzimidazol Febantel

¹⁶⁵ M. Danaher, H. De Ruyck, S.R.H. Crooks, G. Dowling, M. O’Keeffe, J. Chromatogr. B 845 (2007) 1. “Review of methodology for the determination of benzimidazole residues in biological matrices”

Todos los compuestos estudiados se utilizan generalmente como antihelmínticos menos el carbendazim que, aunque en ocasiones se utiliza como antihelmíntico, su uso más general es como fungicida.

Estos fármacos son polvos blancos cristalinos, con baja solubilidad en agua y elevada solubilidad en disolventes orgánicos como metanol, acetato de etilo o dimetilsulfóxido y con naturaleza anfótera. Tienen puntos de fusión ligeramente altos y no se descomponen térmicamente. Respecto a las propiedades químicas, se pueden mencionar el coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}) y los valores de pK_a ; si bien hay que indicar que la mayoría no se conocen experimentalmente, sino que se han determinado mediante *software*. Los benzimidazoles poseen un anillo imidazólico que contiene átomos de nitrógeno ácidos y básicos (Tabla 4.7). Según esto, las moléculas se pueden protonar ($pK_a \approx 5-6$) o desprotonar ($pK_a \approx 12$), como se muestra en la Figura 4.8¹⁶⁵.

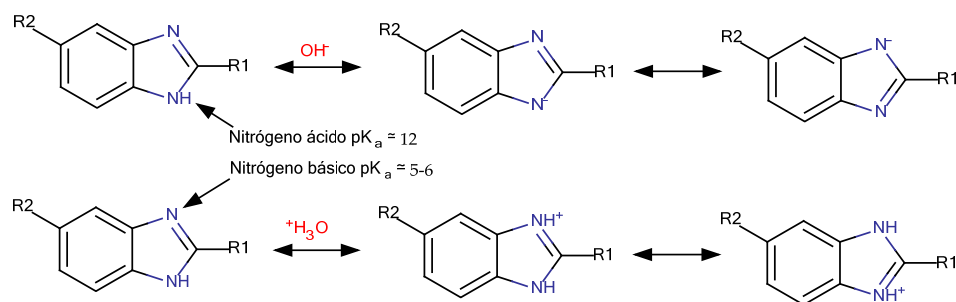


Figura 4.8. Ionización de los benzimidazoles en condiciones ácidas (A) o básicas (B)

El coeficiente de partición (K_{ow}) es también una propiedad importante que aporta información sobre la solubilidad de estos residuos en diferentes disolventes y del orden de elución en un sistema cromatográfico de fase inversa (Tabla 4.7). Los valores $\log K_{ow}$ para los analitos estudiados están comprendidos entre 0.7 y 4.0.

Tabla 4.7. Algunas propiedades químicas de los benzimidazoles estudiados¹⁶⁵

Benzimidazol	log K _{ow}	pK _a	
		Ácido	Básico
ABZ-NH ₂ -SO ₂	0.69-0.75	6.0	13.3
ABZ-SO	0.82-0.94	5.7	13.2
ABZ-SO ₂	0.90-1.01	3.5	11.2
MBC	1.29-1.69	5.5	13.1
FBT	1.53	-	-
FLU-HMET	1.72	6.6	13.9
OXI	1.86-2.63	6.3	13.8
OFZ	1.88-2.13	4.1	11.8
FLU	1.98-2.41	4.1	11.8
FBZ-SO ₂	2.13-3.30	3.4	11.1
ABZ	2.20-2.92	5.5	13.1
FBZ	3.07-4.01	5.1	12.7

4.B.2.2. Leche

La leche de origen animal, principalmente de vaca, y sus productos de fermentación representan una de las mayores fuentes nutricionales, siendo uno de los principales componentes de la dieta humana no sólo en recién nacidos sino también en la edad adulta¹⁶⁶. La leche es un fluido biológico complejo, cuyo fin es la alimentación de los mamíferos recién nacidos. Está formada por una emulsión de glóbulos de grasa en agua en la que se encuentran disueltos carbohidratos, proteínas y minerales. Las proporciones de estos componentes varían en cada especie. En el caso de la leche de vaca, el contenido medio es de un 3% de proteínas, un 5% de carbohidratos y un 4% de grasas de las cuales un 60% son saturadas. El mineral más destacado es el calcio, con un contenido del 0.1%. Un litro de leche contiene la cantidad diaria

¹⁶⁶ P. Roncada, C. Piras, A. Soggiu, R. Turk, A. Urbani, L. Bonizzi, J. Proteomics 75 (2012) 4259. "Farm animal milk proteomics"

recomendada de calcio para un adulto. Además, están presentes diversos micronutrientes entre los que destacan las vitaminas A, B₁, B₂, B₁₂, D y K.

Debido a la importancia de las enfermedades parasitarias, una de las áreas de mayor expansión e investigación farmacéutica ha sido el desarrollo de nuevos antihelmínticos para el control de parásitos en animales domésticos, que son esenciales para el mantenimiento de pesos adecuados y para una adecuada reproducción del ganado¹⁶⁷. Esto ha dado lugar a un gran número de fármacos veterinarios disponibles, tanto para el tratamiento de infecciones como para su prevención. Pero este desarrollo ha suscitado también preocupación debido a una amplia disponibilidad de medicamentos veterinarios sin receta y al lanzamiento de productos genéricos más baratos¹⁶⁸.

En general, se puede decir que los residuos de antihelmínticos en leche no tienen riesgos para la salud humana, siempre que estos sean administrados de forma adecuada y con la dosis recomendada. Sin embargo, es necesario vigilar que se cumplan los periodos de administración y que los productos se administren a los animales en condiciones adecuadas¹⁶⁸, ya que un mal uso de estos compuestos puede dar lugar a una concentración elevada de residuos. Para proteger a los consumidores de estos riesgos se han establecido límites máximos de residuos (*MRLs, Maximum Residue Limits*), enumerados en la Regulación de la Comisión Europea 37/2010¹⁶⁹, que a menudo son la suma de las sustancias originales junto con sus metabolitos. Para la leche y los compuestos estudiados se establecen los siguientes MRLs:

- Familia del albendazol: 100 µg kg⁻¹ en todos los rumiantes
- Familia del fenbendazol: 10 µg kg⁻¹ en todos los rumiantes

La Regulación no establece límites en leche para carbendazim, flubendazol y oxibendazol.

¹⁶⁷ A.F. Loyacano, J.C. Williams, J. Gurie, A.A. DeRosa, Vet. Parasitol. 107 (2002) 227. "Effect of gastrointestinal nematode and liver fluke infections on weight gain and reproductive performance of beef heifers"

¹⁶⁸ B. Kinsella, S.J. Lehotay, K. Mastovska, A.R. Lightfield, A. Furey, M. Danaher, Anal. Chim. Acta 637 (2009) 196. "New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography-tandem mass spectrometry"

¹⁶⁹ Reglamento N° 37/2010 de la Comisión Europea, Diario Oficial de la Unión Europea L 15/1 20.1.2010. "Sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal"

Para el control de estos compuestos en leche se han descrito distintos métodos para su determinación^{170,171}. Los más utilizados emplean técnicas cromatográficas, concretamente cromatografía líquida en diferentes modalidades y con diferentes detectores. La determinación de benzimidazoles mediante GC no es fácil, debido a la naturaleza y la baja volatilidad de estos compuestos; sólo el tiabendazol y el triclabendazol se pueden determinar sin derivatizar¹⁶⁵. La mayoría de las aplicaciones de GC se han empleado en la determinación de benzimidazoles fungicidas en cultivos, no encontrándose antecedentes bibliográficos para su determinación en leche mediante esta técnica.

Como se ha indicado, la cromatografía líquida ha sido la técnica más utilizada para el análisis de estos compuestos, utilizando columnas de fase inversa. Entre los detectores más utilizados se pueden citar: espectrofotometría de barrera de diodos (DAD) y fluorescencia. El uso de este último se debe a que algunos de estos compuestos, como el flubendazol, triclabendazol, albendazol, cambendazol y tiabendazol y sus metabolitos poseen fluorescencia natural¹⁶⁵. Por ejemplo, se han determinado albendazol y sus metabolitos mediante cromatografía líquida de par iónico con detección UV¹⁷² y con detección de fluorescencia¹⁷³.

En los últimos años, puede decirse que la detección por MS es el método principal de detección debido a su elevada sensibilidad y selectividad tanto en modalidad MS¹⁷⁴ como en MS/MS^{175,176}. También se han

¹⁷⁰ P. Jedziniak, T. Szprengier-Juszkiewics, M. Olejnik, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 8165. "Determination of benzimidazoles and levamisole residues in milk by liquid chromatography-mass spectrometry: Screening method development and validation"

¹⁷¹ J. Keegan, M. Whelan, M. Danaher, S. Crooks, R. Sayers, A. Anastasio, C. Elliott, D. Brandon, A. Furey, R. O'Kennedy, Anal. Chim. Acta 654 (2009) 111. "Benzimidazole carbamate residues in milk: Detection by Surface Plasmon Resonance-biosensor, using a modified QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method for extraction"

¹⁷² D.J. Fletouris, N.A. Botsoglou, I.E. Psomas, A.I. Mantis, J. Chromatogr. B 687 (1996) 427. "Trace analysis of albendazole and its sulphoxide and sulphone metabolites in milk by liquid chromatography"

¹⁷³ D.J. Fletouris, N.A. Botsoglou, I.E. Psomas, A.I. Mantis, Anal. Chim. Acta 345 (1997) 111. "Determination of the marker residue of albendazole in milk using ion-pair liquid chromatography and fluorescence detection"

¹⁷⁴ K. Takeba, K. Fujinuma, M. Sakamoto, T. Miyazaki, H. Oka, Y. Itoh, H. Nakazawa, J. Chromatogr. A 882 (2000) 99. "Simultaneous determination of triclabendazole and its sulphoxide and sulphone metabolites in bovine milk by high-performance liquid chromatography"

¹⁷⁵ M. Whelan, B. Kinsella, A. Furey, M. Moloney, H. Cantwell, S.J. Lehotay, M. Danaher, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 4612. "Determination of anthelmintic drug residues in milk using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with rapid polarity switching"

¹⁷⁶ H. Ruyck, E. Daeseleire, H. Ridder, R. Renterghem, J. Chromatogr. A 976 (2002) 181. "Development and validation of a liquid chromatographic-electrospray tandem mass spectrometric multiresidue method for anthelmintics in milk"

desarrollado métodos que utilizan columnas cada vez de menor diámetro interno y tamaño de partícula, lo que ha originado la modalidad UHPLC (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*)^{175,177}. Por último, se han determinado benzimidazoles en leche, junto con otros fármacos veterinarios, mediante UHPLC-TOF¹⁷⁸.

La mayoría de los métodos mencionados anteriormente conllevan procedimientos de tratamiento de muestra relativamente costosos y/o tediosos. Se han propuesto tratamientos basados en extracción líquido-líquido¹⁷⁴, extracción en fase sólida¹⁷⁶ y QuEChERS¹⁷⁵.

¹⁷⁷ X. Xia, Y. Dong, P. Luo, X. Wang, X. Li, S. Ding, J. Shen, J. Chromatogr. B 878 (2010) 3174. "Determination of benzimidazole residues in bovine milk by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry"

¹⁷⁸ D. Ortelli, E. Cognard, P. Jan, P. Edder, J. Chromatogr. B 877 (2009) 2363. "Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry"

4.B.3. Determinación cromatográfica de benzimidazoles antihelmínticos en leche: RAM-RPLC-MS/MS (QqQ)

4.B.3.1. Optimización de la separación cromatográfica

La separación cromatográfica fue optimizada para obtener la mayor resolución y eficacia en el menor tiempo posible de análisis. Aunque inicialmente se hicieron ensayos con mezclas de metanol/agua como fase móvil, posteriormente se trabajó con mezclas acetonitrilo/agua, ya que proporcionaron picos más estrechos y un menor tiempo de separación. Teniendo en cuenta que en ESI-MS la presencia de sales puede producir supresiones iónicas, se decidió trabajar con una fase móvil de formiato amónico de baja concentración (2.5 mM). Se fijó un pH de 7.5 para el cual los benzimidazoles estudiados están presentes en forma neutra, lo que evita la presencia de especies cargadas, difíciles de retener en una fase inversa, mejorando así la resolución y la forma de los picos cromatográficos. La Figura 4.9 muestra el cromatograma obtenido para una mezcla patrón de todos los analitos estudiados a un nivel de concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ así como el gradiente del contenido de ACN empleado. Se observa que se alcanza una resolución adecuada de los 12 analitos en un tiempo de 25 minutos.

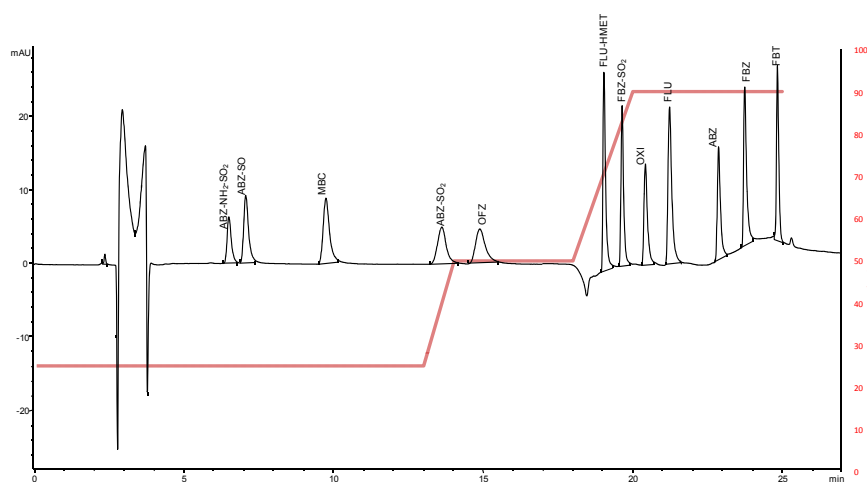


Figura 4.9. Cromatograma correspondiente a una mezcla patrón de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Detección DAD: 254 nm. Inyección $50 \mu\text{L}$

4.B.3.2. Optimización de los parámetros del triple cuadrupolo

Los parámetros a optimizar que afectan a la fuente de ionización (ESI) están en gran parte ligados a la correcta formación del spray en la fuente de ionización. Se tomaron como parámetros óptimos los tabulados por el fabricante, con un flujo de fase móvil de 0.5 mL min⁻¹. Así, los parámetros fijados fueron:

- Voltaje del capilar: +3500 V
- Flujo del gas de secado (N₂): 12 L min⁻¹
- Temperatura del gas de secado: 350 °C
- Presión de nebulización: 35 psi

Otros parámetros generales que deben ser fijados son: el tiempo máximo de acumulación y el ancho de ventana de aislamiento. Estos se fijaron en los valores habituales en espectrometría de masas, el tiempo máximo de acumulación en 200 ms y el ancho de la ventana de aislamiento en 1 u. El modo de adquisición de datos fue SRM.

Además de los parámetros generales es necesario optimizar una serie de factores que dependen de la naturaleza propia de cada analito:

- *Polaridad del ESI*: La fuente de ionización permite trabajar en modo positivo o negativo lo que conlleva la conducción al analizador de masas de cationes o aniones respectivamente. Los benzimidazoles tienen uno o más átomos de nitrógeno que pueden protonarse, como se muestra en la Figura 4.8, dando así lugar a la correspondiente molécula protonada [M+H]⁺. Por lo tanto, todos los compuestos se analizaron en forma positiva.
- *Fragmentación en el triple cuadrupolo*: Para cada analito se seleccionó la molécula protonada [M+H]⁺ como ion precursor. El equipo optimiza la energía a transmitir al ion precursor para su fragmentación, eligiendo la energía de colisión (en voltios) adecuada para que la sensibilidad de los distintos fragmentos sea lo mayor posible. El ion de fragmentación más abundante se seleccionó como ion producto para la transición de cuantificación y el resto de transiciones se utilizaron con fines de confirmación.

- *Ventanas de detección:* Una vez conocidos los tiempos de retención cromatográficos se fijaron los correspondientes periodos de adquisición o ventanas: una de 8.5 a 18.5 min y otra de 18.5 a 35 min.

Todos los parámetros optimizados, característicos de cada analito, junto con los IPs obtenidos se muestran en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Parámetros del triple cuadrupolo optimizados para los compuestos estudiados

Analito	t _R / min	Transiciones ^a	Energía de colisión / V	Ventana ^b	IPs
ABZ-NH ₂ -SO ₂	9.4	240 → 133	28	A	4
		240 → 163	12		
		282 → 159	32		
ABZ-SO	9.6	282 → 155	20	A	8.5
		282 → 113	32		
		282 → 183	20		
MBC	12.1	192 → 160	12	A	4
		192 → 134	4		
		298 → 159	32		
ABZ-SO ₂	15.1	298 → 192	47	A	4
		316 → 159	36		
		316 → 191	16		
OFZ	15.6	316 → 239	16	A	5.5
		256 → 123	28		
		256 → 95	40		
FLU-HMET	21.6	332 → 159	36	B	4
FBZ-SO ₂	22.1	250 → 218	16	B	4
		250 → 176	28		
OXI	22.9	314 → 282	20	B	4
		314 → 123	36		
		266 → 234	16		
ABZ	25.3	266 → 191	32	B	5.5
		266 → 159	40		
		300 → 268	16		
FBZ	27.9	300 → 159	36	B	4
		447 → 383	12		
FBT	30.8	447 → 268	28	B	4

a. En negrita la transición más abundante (transición de cuantificación)

b. Ventana A: 12.0-17.3 minutos, Ventana B: 8.5-18.5 minutos

4.B.3.3. Optimización del tratamiento de muestra utilizando materiales de acceso restringido

En este trabajo se pretende unificar las etapas de tratamiento de muestra mediante la utilización de un material de acceso restringido (RAM) acoplado *on-line* al sistema cromatográfico. Para realizar dicho estudio se acopló el RAM al sistema LC-DAD de forma *on-line*. Hay que señalar que la leche fue pretratada antes de ser inyectada en el sistema siguiendo, inicialmente, el procedimiento descrito por J. Chico¹⁷⁹. En la Figura 4.10.a se muestra el cromatograma de una muestra de leche pretratada inyectada directamente en el sistema LC-DAD, es decir, sin utilizar el RAM como tratamiento de muestra. Se observa un importante número de picos cromatográficos de elevada intensidad, correspondientes a los interferentes de la matriz. En la figura 4.10.b se observa el cromatograma obtenido al inyectar la misma muestra en el sistema RAM-LC-DAD, utilizando un RAM-ADS de naturaleza C4. Puede observarse que el número e intensidad de los picos decrece considerablemente, en comparación con la inyección directa. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la capacidad de limpieza del RAM. Hay que aclarar que en la Figura 4.10.a el tiempo mostrado es de 0 a 5 minutos, mientras que en la Figura 4.10.b el tiempo mostrado es de 5 a 10 minutos, ya que en este caso los primeros 5 minutos se emplean en efectuar el lavado del RAM.

¹⁷⁹ J.Chico, S.Meca, R.Companyó, M.D. Prat, M.Granados, J.Chromatogr.A 1181 (2008) 1. "Restricted access materials for sample clean-up in the analysis of trace levels of tetracyclines by liquid chromatography: Application to food and environmental analysis"

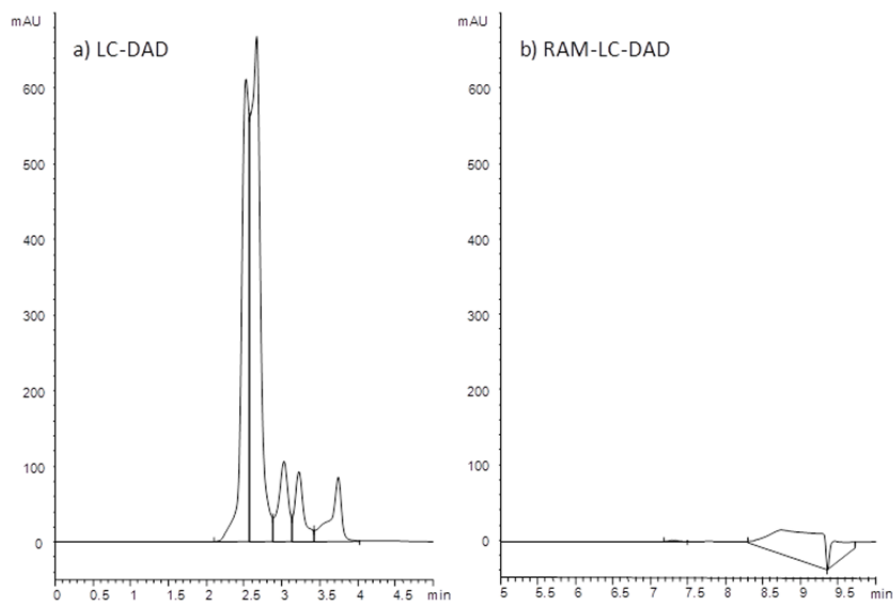


Figura 4.10. Cromatogramas obtenidos al inyectar una muestra de miel directamente en el sistema LC-DAD (a) y a través del sistema RAM-LC-DAD utilizando un RAM-ADS C4 (b). Volumen inyectado: 50 μL . Señal: 214 nm

La elección adecuada del RAM, dentro de la familia ADS, debe tener en cuenta, por una parte, que la fase estacionaria debe retener los analitos deseados y, por otra parte, tiene que poseer una gran capacidad para limpiar la matriz, eliminando las especies interferentes. Se estudiaron diferentes RAM de la familia alquil-diol-sílice (ADS) cuyas fases estacionarias están formadas por cadenas alquílicas de diferente longitud: C4, C8 y C18.

En un primer estudio se conectó el RAM directamente al detector (DAD), sin la columna cromatográfica. En la Figura 4.11 se muestran los correspondientes perfiles de elución de una muestra de leche dopada a un nivel de concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ cuando se utilizan las diferentes fases estacionarias del RAM. Durante los primeros cinco minutos, correspondientes a la etapa de limpieza con agua ultrapura, se obtiene un pico debido a compuestos interferentes de la matriz. En este tiempo hay poca diferencia entre las tres fases estacionarias. A partir de cinco minutos tiene lugar la elución de los analitos retenidos en el RAM. En la Figura 4.11.c (ampliación de los cromatogramas) se observa que con la

fase estacionaria C18 los analitos se retienen fuertemente, por lo que se eluyen de forma muy dispersa. En consecuencia, esta fase estacionaria es poco adecuada por su excesiva retención. Cuando se trabaja con C4 y C8 (Figura 4.11.a y 4.11.b) los analitos se eluyen a un tiempo menor; con una focalización ligeramente superior cuando se emplea un RAM con cadenas C4. Los resultados obtenidos indican que el RAM de C18 no es adecuado, mientras que los de C4 y C8 pueden ser utilizados para la determinación de los benzimidazoles.

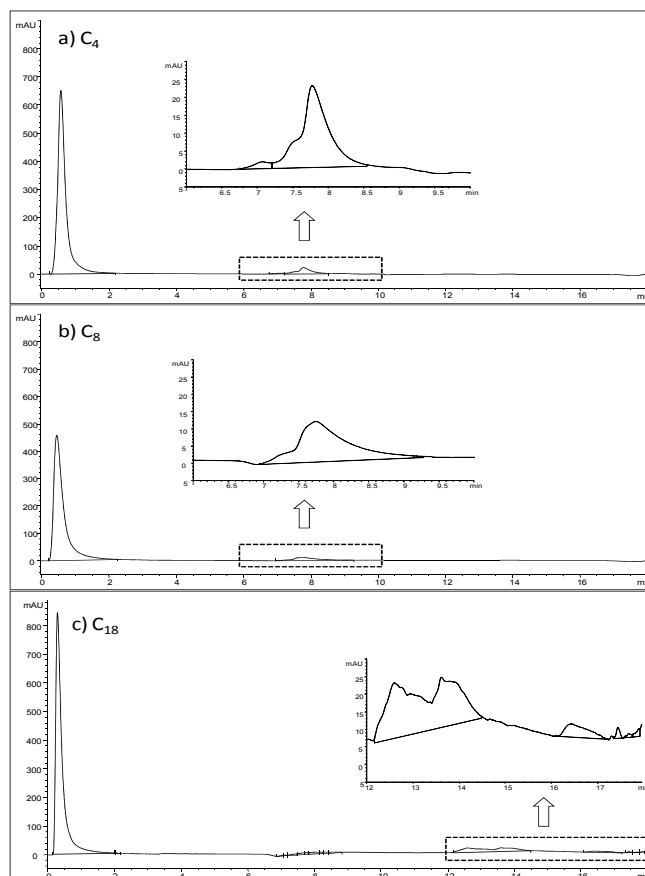


Figura 4.11. Perfiles de elución del sistema RAM-DAD. Leche dopadas a un nivel de concentración de $1 \mu\text{g L}^{-1}$. RAM-ADS C4 (a) C8 (b) y C18 (c). Inyección: $50 \mu\text{L}$. Señal: 214 nm

Posteriormente, se realizó un estudio más detallado utilizando las fases estacionarias C4 y C8, incorporando ya la columna cromatográfica (RAM-LC-DAD). Se obtuvieron mejores resultados con el RAM-ADS C4 con picos de mejor resolución; mientras que los resultados obtenidos con el RAM-ADS C8 mostraron picos mal separados y más anchos. Por lo tanto, todos los estudios posteriores se realizaron utilizando el RAM-ADS de fase estacionaria butílica (C4).

El siguiente paso en la optimización del método consiste en la optimización del pretratamiento que hay que realizar a la leche antes de su introducción en el sistema ya que, debido a la baja solubilidad de los benzimidazoles en medio acuoso, estos no se solubilizan totalmente, quedando parcialmente en el precipitado. Con el fin de solubilizar los analitos se hicieron algunas modificaciones con respecto al procedimiento inicial, propuesto por J. Chico et al. para el análisis de tetraciclinas en leche¹⁷⁹:

- Se modificó el pH a 2.5, ya que para los benzimidazoles la solubilidad en medio acuoso aumenta al hacerlo la acidez.
- Se añadió un porcentaje de disolvente orgánico para solubilizar los compuestos.

Este porcentaje de disolvente orgánico, presente en el medio de inyección de la muestra, puede condicionar la retención y los valores de las recuperaciones de los benzimidazoles en el RAM. Así, para optimizar esta etapa, se realizó un estudio con muestras de leche dopadas a un nivel de concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando como disolventes orgánicos metanol y acetonitrilo, en diferentes proporciones. Se calcularon las recuperaciones comparando las áreas de los picos cromatográficos con respecto a los que proporciona una disolución patrón de la misma concentración, inyectada también en el sistema RAM-LC-DAD. El volumen de inyección utilizado fue de $50 \mu\text{L}$ y se estudiaron dos tiempos de lavado del RAM con agua ultrapura: 3 y 5 minutos. En la Figura 4.12 se comparan los resultados obtenidos al modificar el disolvente orgánico en el pretratamiento y el tiempo de lavado con agua ultrapura.

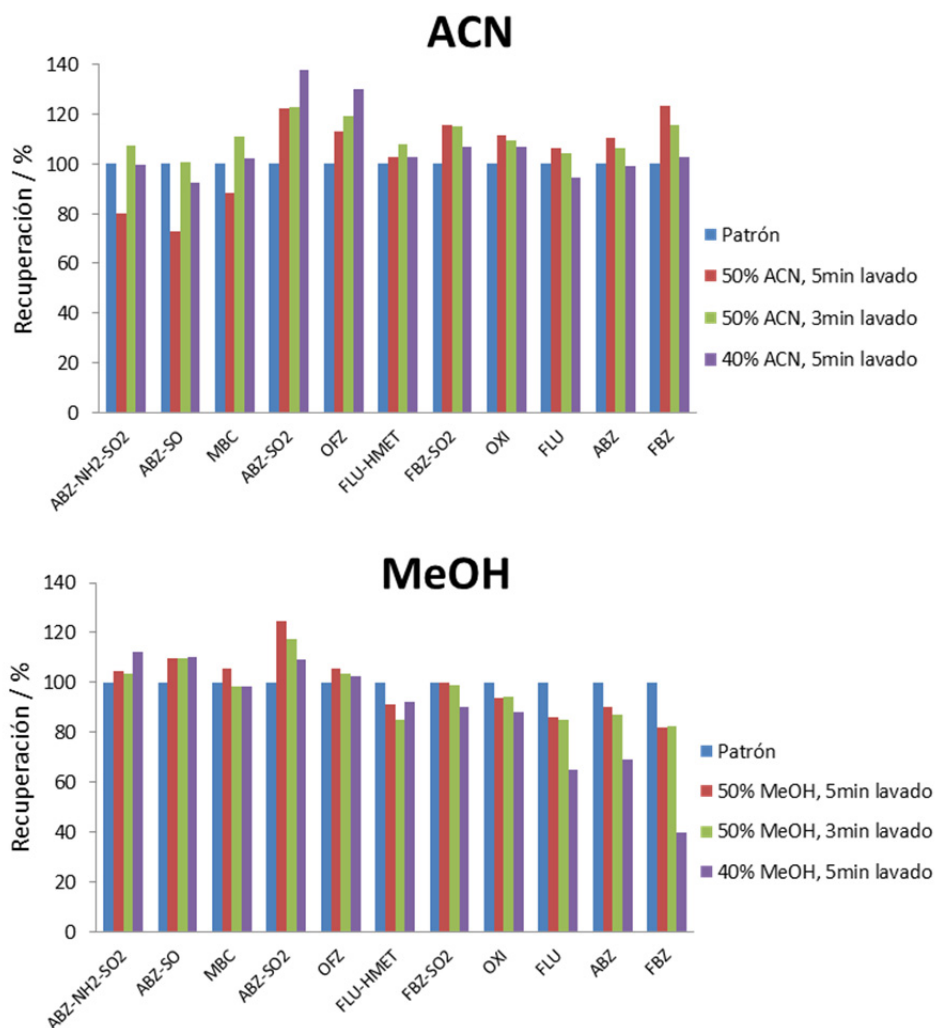


Figura 4.12. Recuperación en el RAM de los benzimidazoles estudiados en función del disolvente orgánico presente en la muestra inyectada y el tiempo de lavado

Se puede observar como para un elevado porcentaje de acetonitrilo (50%), los analitos más polares (ABZ-NH₂-SO₂, ABZ-SO y MBC) presentan bajas retenciones en el RAM cuando se emplea un tiempo de lavado de 5 minutos. En cambio, si para este mismo porcentaje se lava durante solo 3 minutos o si se utiliza solo un 40% de acetonitrilo, las recuperaciones aumentan considerablemente. Cuando el disolvente es metanol, si el porcentaje es del 40% los compuestos más apolares (FLU,

ABZ, FBZ), presentes valores de recuperación inferiores al 70% quedando, probablemente, en el precipitado con las proteínas. Si la cantidad de este disolvente orgánico es del 50%, los analitos apolares (FLU, ABZ, FBZ) presentan recuperaciones superiores al 80%. Así, los resultados más satisfactorios se encontraron para:

- 40% de acetonitrilo y utilizando 3 o 5 minutos de lavado con agua ultrapura o 50% de ACN si el tiempo de lavado es de 3 minutos.
- 50% de metanol con 3 o 5 minutos de lavado con agua ultrapura.

El medio orgánico finalmente elegido fue el metanol, ya que produce mejores resultados que el acetonitrilo en la etapa de precipitación de las proteínas. En cuanto al tiempo, se fijaron 3 minutos para minimizar el tiempo total de análisis. La Tabla 4.9 muestra, a modo de resumen, los diferentes parámetros recomendados para utilizar el RAM como etapa de tratamiento on-line.

Tabla 4.9. Tabla de tiempos del método RAM-RPLC-MS/MS desarrollado según la configuración instrumental mostrado en la Figura 1.14 (Pág. 43)

Tiempo /min	Bomba 1 ^a Flujo / mL min ⁻¹	Bomba 2 ^{b,c} B / %	Válvula de 6 vías	Evento
0-3	1	25	Carga	Inyección (50 µL) y limpieza
3-16	0.3	25	Elución	Transferencia y separación
16-17	0.3	25 → 50	Elución	Separación de analitos
17-25	0.3	50	Elución	Separación
25-26	0.3	50 → 90	Elución	Separación
26-33	0.3 → 1	90	Elución	Separación
33-35	1	90 → 25	Carga	Equilibrando

a. Fase móvil: agua ultrapura

b. Flujo: 0.65 mL min⁻¹

c. Fase móvil: A: formiato amónico 2.5 mM (pH: 7.5) B: ACN

En la Figura III.1 (Pág. 180) se muestra el cromatograma de ion total (TIC, *Total Ion Chromatogram*) y los cromatogramas de ion extraído

(EIC o XIC, *EXtracted Ion Chromatogram*) para cada uno de los benzimidazoles analizados a un nivel de concentración de 10 ng mL⁻¹.

4.B.3.4. Estudio del efecto de matriz

Se estudió el posible efecto de matriz comparando las pendientes del calibrado obtenido al inyectar patrones en medio acuoso con las respectivas pendientes obtenidas en leche (Tabla 4.10). Para ello, se aplicó un test-t de dos colas cuyos resultados se muestran también en la Tabla 4.10. Los resultados obtenidos indican que, a pesar de la utilización del RAM como etapa previa de limpieza y de la dilución 1:4 de la muestra, existe efecto de matriz para los analitos estudiados.

Tabla 4.10. Comparación de pendientes de calibrado en medio acuoso y en leche mediante un test-t de dos colas

Analito	Pendiente en acuoso ^{a/} mUA mL ng ⁻¹	Pendiente en leche ^{b/} mUA mL ng ⁻¹	p ^c
ABZ-NH ₂ -SO ₂	106 ± 1	88 ± 2	8·10 ⁻⁴
ABZ-SO	81 ± 1	80 ± 1	0.3
MBC	950 ± 20	880 ± 20	0.03
ABZ-SO ₂	207 ± 1	201 ± 3	0.04
OFZ	323 ± 4	318 ± 4	0.2
FLU-HMET	417 ± 5	315 ± 6	2·10 ⁻⁴
FBZ-SO ₂	116 ± 3	161 ± 3	5·10 ⁻⁴
OXI	590 ± 10	570 ± 20	0.2
FLU	659 ± 8	654 ± 7	0.5
ABZ	797 ± 8	690 ± 9	6·10 ⁻⁴
FBZ	891 ± 9	680 ± 10	1·10 ⁻⁴
FBT	2600 ± 100	2200 ± 100	0.03

a. Intervalo de calibración: 5-500 ng mL⁻¹

b. Intervalo de calibración: 5-200 ng mL⁻¹

c. p: Probabilidad en tanto por uno, según un test-t de dos colas, de que las pendientes no sean significativamente diferentes y, por lo tanto, no exista efecto de matriz

Se observa que para la mayoría de los analitos se obtienen valores para la probabilidad (p) menores de 0.05, menos para ABZ-SO, OFZ, OXI y FLU. Por lo tanto, para estos cuatro compuestos, las pendientes obtenidas en ambos medios no son significativamente diferentes, y

puede decirse que no hay efecto de matriz. En cambio, para los ocho compuestos restantes, los valores obtenidos ($p < 0.05$) indican que las pendientes son significativamente diferentes, y por lo tanto, existe efecto de matriz. Ello significa que la cuantificación en muestras de leche con el método propuesto y el sistema RAM-LC-MS/MS requiere la modalidad de calibración en matriz real (*matrix matched calibration*).

4.B.3.5. Características analíticas del método RAM-RPLC-MS/MS

El calibrado en matriz real se realizó en el intervalo de concentraciones de 5 a 500 ng mL⁻¹, siendo lineal para la mayoría de los benzimidazoles estudiados, con excepción de FBT, FBZ-SO₂, y FLU que son lineales en el intervalo de concentración de 5 a 200 ng mL⁻¹. Para este margen, se obtienen en todos los casos valores de r² superiores a 0.99.

Se calcularon los límites de detección y cuantificación expresados como las concentraciones, en muestras reales, que producirían una relación señal/ruido de 3 y 10, respectivamente. Los valores obtenidos se recogen en la Tabla 4.11. Los límites de detección varían entre 0.08 y 0.81 ng mL⁻¹ y los límites de cuantificación entre 0.26 y 2.70 ng mL⁻¹.

Tabla 4.11. Límites de detección y cuantificación para el método RAM-RPLC-MS/MS desarrollado

Analitos	LOD ^a / ng mL ⁻¹	LOQ ^b / ng mL ⁻¹
ABZ-NH ₂ -SO ₂	0.46	1.53
ABZ-SO	0.57	1.89
MBC	0.81	2.70
ABZ-SO ₂	0.42	1.43
OFZ	0.24	0.81
FLU-HMET	0.08	0.26
FBZ-SO ₂	0.15	0.51
OXI	0.13	0.42
FLU	0.21	0.71
ABZ	0.09	0.32
FBZ	0.32	1.08
FBT	0.11	0.38

a. LOD: límite de detección para una relación señal-ruido de 3

b. LOQ: límite de cuantificación para relación señal-ruido de 10

4.B.3.6. Estudio de la contaminación entre muestras

En la mayoría de los procedimientos descritos en bibliografía que emplean etapas de limpieza mediante sorbentes sólidos (SPE) estos materiales son de un único uso, es decir, se desechan después de su utilización. En este trabajo, en cambio, se propone un método en continuo basado en el acoplamiento de un material RAM a un sistema cromatográfico, lo que implica que el material RAM es reutilizable. Por ello, se creyó conveniente realizar un estudio para conocer el posible recuerdo o contaminación entre muestras. Para ello se inyectaron muestras de leche (10 μL) dopadas con diferentes concentraciones, 50, 200 y 500 ng mL^{-1} , y seguidamente se hicieron inyecciones de agua ultrapura (10 μL), con el mismo gradiente que el utilizado para las muestras de leche, con el fin de observar si se obtenían señales cromatográficas de los analitos debidas a contaminación. Se determinó el porcentaje en área de los picos que aparecen cuando se realiza la inyección de agua con respecto a los picos obtenidos al inyectar la muestra de leche de cada concentración. La Tabla 4.12 muestra los resultados obtenidos en este estudio.

Tabla 4.12. Estudio de la contaminación entre muestras

Muestra de leche 50 ng mL⁻¹	Inyección Agua 1^a	Inyección Agua 2^a	Inyección Agua 3^a
FBT	0.14 %	-	-
Muestra de leche 200 ng mL⁻¹	Inyección Agua 1^a	Inyección Agua 2^a	Inyección Agua 3^a
FBT	0.26 %	0.08 %	0.01 %
FBZ	0.40 %	-	-
ABZ	0.13 %	-	-
FLU	0.10 %	-	-
OXI	0.08 %	-	-
Muestra de leche 500 ng mL⁻¹	Inyección Agua 1^a	Inyección Agua 2^a	Inyección Agua 3^a
FBT	0.30 %	0.05 %	0.02 %
FBZ	0.40 %	0.07 %	-
ABZ	0.20 %	0.06 %	-
FLU	0.15 %	0.03 %	-
OXI	0.10 %	0.04 %	-

Según estos resultados puede concluirse que al inyectar concentraciones elevadas, del orden de 500 ng mL⁻¹, existe efecto de recuerdo o contaminación entre muestras para los analitos más apolares (FBT y FBZ). Esta contaminación es de una magnitud muy pequeña ya que no alcanza, en ningún caso, el 1%. Con el fin de minimizar este efecto y evitar posibles falsos positivos, en el análisis de muestras con altas concentraciones de analitos, es aconsejable hacer una inyección de agua entre muestra y muestra.

4.B.3.7. Validación del método analítico RAM-RPLC-MS/MS

El método analítico RAM-RPLC-MS/MS para el análisis de benzimidazoles antihelmínticos en leche fue validado según la Decisión 2002/657 (sección 3.5.1, Pág. 88). La identificación de los analitos se realizó a partir de sus diferentes tiempos de retención y determinando los distintos puntos de identificación (IPs). En el apéndice I de esta memoria de tesis se muestran los espectros de iones precursores, obtenidos en un barrido completo y los espectros de iones productos obtenidos tras producirse la fragmentación del ion más abundante. En el apéndice I se muestran también las estructuras más probables de los fragmentos más abundantes.

En la etapa de validación, el triple cuadrupolo se configuró en la modalidad de SRM, registrándose para cada analito tanto la transición de cuantificación como las de confirmación. En estas condiciones de trabajo propuestas se obtuvieron más de 3 puntos de identificación para todos los compuestos estudiados, con excepción del FBZ-SO₂ para el que solo se encontraron 2.5 IPs y fue, por lo tanto, eliminado del proceso de validación ya que no cumplía los requisitos de confirmación exigidos por la Decisión 2002/657 (Tabla 4.8, Pág. 162). Para los once analitos restantes se obtuvo la señal analítica a través de los cromatogramas de SRM de las transiciones de cuantificación.

Los diferentes parámetros de la validación son ampliamente discutidos en el artículo de investigación III (Pág. 181).

Según la Legislación, el MRL para la familia del Albendazol es de 100 µg kg⁻¹ y se calcula como la suma de las concentraciones de ABZ-NH₂-SO₂, ABZ-SO y ABZ-SO₂ expresados como ABZ. Expresando así los

tres metabolitos y sumándolos, el límite de decisión (CC_{α}) y la capacidad de detección (CC_{β}) para la familia del albendazol son 3.1 ng mL^{-1} y 5.4 ng mL^{-1} , respectivamente. Ambos valores son inferiores al establecido por la legislación como MRL para estos analitos.

Para el caso de la familia del Febantel (FBT, FBZ, OFZ y FBZ-SO₂), según la legislación¹⁶⁹ los límites se calculan como la suma de los cuatro estableciéndose un MRL de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. Sumando los respectivos límites de los cuatro compuestos el límite de decisión (CC_{α}) y la capacidad de detección (CC_{β}) para esta familia son 3.3 ng mL^{-1} y 5.7 ng mL^{-1} , inferiores al MRL establecido por la legislación.

Para el resto de benzimidazoles estudiados (MBC, FLU-HMET, OXI y FLU) se alcanzaron límites de decisión individuales en el intervalo $0.3\text{-}0.7 \text{ ng mL}^{-1}$.

Al no disponer de muestras certificadas la veracidad fue determinada evaluando la recuperación del método. Los valores de recuperaciones variaron entre el 87% y el 114% para un nivel de concentración de 5 ng mL^{-1} . La precisión, expresada como RSDs *interday*, resultó en valores del 5% al 20% para un nivel de concentración de 5 ng mL^{-1} (Tabla III.1, Pág. 179).

Finalmente, también cabe destacar que se comprobó la robustez del método aplicándolo a siete muestras de leche de diversa naturaleza (sección 3.4, Pág. 85). Se obtuvieron recuperaciones (Tabla III.2, Pág. 181) que variaron entre el 92% y el 115% para todos los benzimidazoles con la excepción del FBZ (78-109%) y el FBT (85-132%). Estos resultados demuestran la robustez y aplicabilidad del método propuesto.

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN III
Analytical and Bioanalytical Chemistry 404 (2012) 2909

A fast and reliable method for the quantitative determination of benzimidazoles and metabolites in milk by LC-MS/MS with on-line sample treatment

Diego García-Gómez · Marta García-Hernández · Encarnación Rodríguez-Gonzalo · Rita Carabias-Martínez

Received: 18 June 2012 / Revised: 4 September 2012 / Accepted: 6 September 2012 / Published online: 16 October 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract This work reports the development of a simple, reliable and automated method based on LC-MS/MS for the quantitative determination of benzimidazole residues and some of their metabolites in milk. The method involves the use of an extraction cartridge coupled on-line to the chromatographic system for the clean-up of the milk samples, efficiently eliminating matrix macromolecules and providing appropriate selectivity for the determination of such compounds. In the online method developed here, only a reduced manual sample manipulation was required (protein precipitation and filtration) prior to injection into the chromatographic system. The limits of detection of the target anthelmintics ranged from 0.1 to 0.8 ngmL⁻¹ in milk samples, these values being below the maximum residue limit established for these compounds. The whole method developed was validated in real samples according to the requirements set by the Commission Decision 2002/657/EC. The optimized method was successfully applied to commercial and raw milk samples of different origin demonstrating that the proposed method may find application in routine laboratory analyses of food control safety.

Keywords Benzimidazole drugs · Milk · Restricted access material · On-line sample treatment · Liquid chromatography–tandem mass spectrometry · Validation according to Commission Decision 2002/657/EC

D. García-Gómez · M. García-Hernández · E. Rodríguez-Gonzalo (✉) · R. Carabias-Martínez
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología,
Universidad de Salamanca,
37008 Salamanca, Spain
e-mail: erg@usal.es

D. García-Gómez
e-mail: dgg@usal.es

Introduction

Benzimidazole derivatives are drugs used in veterinary practice as broad-use anthelmintic agents for the treatment of parasite infestations in animals destined for human consumption [1]. The extensive use of these anthelmintic agents increases the likelihood of the appearance of residues in foods of animal origin [2]. Thus, the control of these residues from veterinary drugs in foods of animal origin is especially important. Some other benzimidazoles used as fungicides, like carbendazim, may become accessible to organisms feeding on leaf litter too, because they are stable for several weeks on plant material.

The determination of benzimidazole residues in milk continues to be problematic because despite the similarities in their chemical structure and mode of action, their chemical properties, such as lipophilicity and acid–base behavior, are very different [3]. In addition, maximum residue limits of pharmacologically active substances in milk are usually lower than in other foodstuffs of animal origin.

The literature describes several methods for the determination of benzimidazoles in milk [4].

In recent years, detection by mass spectrometry (MS) has been the main method used for both benzimidazole residues and for other veterinary drugs in biological matrices. LC-MS [5] or LC-MS/MS coupling [2, 6] allow the development of highly sensitive and selective methods.

Most of the above-mentioned methods require relatively expensive instruments and/or need time-consuming sample treatment procedures prior to analysis. Liquid–liquid extraction [5], solid-phase extraction [6] and QuEChERS [2] have been described for the extraction of benzimidazoles from milk.

In the present work, we focus on the development of an automated analytical method for the sample treatment, separation, identification, and quantification at trace level of a broad set of benzimidazole drugs in milk samples with minimum sample pretreatment that could be applied in routine laboratory work in order to guarantee food safety and quality.

To accomplish this, we developed a procedure for on-line sample treatment based on the use of Restricted Access Materials [7] that allows the low food residue levels currently established in the legislation to be achieved. To our knowledge, this is the first time that this configuration has been proposed to determine benzimidazole drugs in milk. As a final goal, we validated the method developed as a quantitative confirmatory method, according to the criteria set forth by European legislation (Commission Decision 2002/657/EC) for toxic residues in foods [8].

Experimental

Chemicals

Analytical standards of *Albendazole* (ABZ), *Albendazole-sulfoxide* (ABZ-SO), *Albendazole-sulfone* (ABZ-SO₂), *Albendazole-2-aminosulfone* (ABZ-NH₂-SO₂), and *Carbendazim* (MBC) were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany).

Fenbendazole (FBZ), *Oxfendazole* (OFZ), *Fenbendazole-sulfone* (FBZ-SO₂), *Oxibendazole* (OXI), *Flubendazole* (FLU), *Flubendazole-2-amine* (FLU-HMET), and *Febantel* (FBT) were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

Standard preparation and calibration procedure

Stock solutions of analytical standards were prepared by dissolving each analyte in dimethylsulfoxide (100–500 µg mL⁻¹). Working solutions were prepared daily by diluting adequate amounts of stock solutions in McIlvane buffer at pH 7.2 plus 10 % MeOH (v/v).

Instrumentation

HPLC analyses were performed on a HP 1200 Series chromatograph from Agilent (Waldbronn, Germany). The restricted access material used was a LiChroCART 25-4LiChrospher RP4 alkyl-diol-silica (ADS) (25 µm, 25 × 4 mm) from Merck (Darmstadt, Germany). The analytical column was a 150 × 4.60 mm Zorbax Eclipse XDB-C18 packed with 3 µm particles (Agilent, Waldbronn, Germany). The 6410 Triple Quad mass spectrometer (Agilent, Waldbronn, Germany) was equipped with an electrospray

ionization source (ESI). The ESI settings were a capillary voltage of +3,500 V; a drying gas flow of 12 Lmin⁻¹ at a temperature of 350 °C, and a nebulizer pressure of 35 psi.

Sample collection and pretreatment

Six samples of cow's milk of different types were analyzed: whole milk (milk 1), skimmed milk (milk 2), and milk enriched in fiber (milk 3) calcium (milk 4), soya isoflavones (milk 5), and vitamin B (milk 6). They were purchased at local supermarkets. Two samples of raw non-commercial goat's milk (milk 7), and cow's milk (milk 8), collected from organic farms, were also analyzed.

Prior to their analysis, the milk samples were pretreated according to the following procedure: 2.5 mL of milk were mixed with 5 mL of methanol, 2.5 mL of McIlvane buffer (pH 2.5) and 0.37 g of EDTA. The resulting whey, whose pH was adjusted to 7.2 with NaOH, was separated by centrifugation for 15 min.

On-line sample preparation and HPLC separation

The experimental setup and the schedule for clean-up and chromatographic separation was similar to that reported previously [9]. Briefly, 50 µL of pretreated milk (with a content of 50 %v/v of MeOH) were first injected with the autosampler and the isocratic pump was started immediately to pump the mobile phase (unbuffered water) at 0.5 mL min⁻¹ for 3 min with the system in the "sample loading" position. After a prefixed clean-up time, the system setup was changed to the "sample elution" position and the separation gradient from 25 to 90 % of ACN (binary pump), eluted the analytes to the chromatographic column at a flow rate of 0.5 mLmin⁻¹ in backflush mode.

Results and discussion

Sample treatment

Optimization of sample pretreatment

Initially, a McIlvane buffer (pH 3.5) with 0.1 M EDTA was tested as precipitation solution, following a procedure described in the literature for tetracyclines [10]. However, this procedure is not valid for benzimidazoles owing to their low solubility in aqueous medium. With a view to solubilizing the analytes, the pH was changed to 2.5 and a portion of organic solvent was added. For the organic solvent, ACN and MeOH were assayed at proportions of 40–50 %. It was found that ACN precipitation was poor and a turbid whey was obtained that was much harder to filter than that obtained with MeOH.

In addition, a study to check whether spiking the sample before or after protein precipitation might have some effect on recovery was carried out. When the milk samples were spiked before protein precipitation, recoveries ranged between 82 and 117 %, and very similar values were obtained when it was the supernatant obtained in the separation that was spiked.

Optimization of sample treatment using on-line extraction

The instrumental configuration used here for coupling was that of the so-called coupled columns and has been described previously [11].

Different cartridges from the ADS family with stationary phases made of alkyl chains of different lengths (C4, C8, and C18) were studied. The best results were obtained with the C4 since in the C8 and C18 cartridges the analytes were retained too strongly, later providing broader and less well resolved peaks. The next step consisted of optimizing the washing time in order to maximize sample clean-up without negatively affecting analyte recovery, which could be hindered by the fact that the pretreated sample was injected in a high content of organic solvent (40–50 %v/v). A washing time of 3 min was selected.

It was noticed that upon injecting the sample of unspiked milk, peaks belonging to unidentified compounds in the milk were obtained. One of these unidentified peaks co-eluted with the more retained analyte (FBT) and hence, with the DAD detector only 11 of the 12 benzimidazoles studied could be determined.

Development of the online extraction-LC-MS/MS method

In order to achieve the levels demanded by current legislation for the determination of veterinary drugs in milk it was necessary to use MS/MS with a QqQ analyzer since with the previous method—DAD detection—it was not possible to attain the values of maximum residue limit (MRL) demanded by the Commission Regulation 37/2010/EC [12]. It should be noted that for all the analytes at least two transitions were obtained; the most abundant one was that used in quantification and the following ones for confirmation. FBZ-SO₂ was an exception, since it only showed one satisfactory transition.

The incorporation of prior clean-up steps of the sample that eliminates the possible interferents responsible for possible matrix effects is one of the strategies that have been proposed [13] to minimize ion suppression in ESI. In this work, the on-line extraction cartridge device behaved as an efficient clean-up step for the milk samples, reducing ion suppression.

The matrix effect was evaluated by comparison of the response of the target compounds in spiked milk samples

Table 1 Validation parameters of the developed method according to Commission Decision 2002/657/EC

2002/657/EC VALIDATION		ABZ-NH ₂ -SO ₂	ABZ-SO	MBC	ABZ-SO ₂	OFZ	FLU-HMET	OXI	FLU	ABZ	FBZ	FBT
Calibration parameters	Intercept/ua	-5±10	-4±10	-30±60	4±30	4±40	-30±30	-20±60	40±70	20±100	-3±80	90±400
	Slope/ua mLng ⁻¹	30±1	35±1	347±6	71±3	113±3	110±3	449±5	352±6	450±10	341±7	741±25
	CC _α /ngmL ⁻¹	0.8	0.9	0.4	1.0	0.8	0.7	0.3	0.5	0.6	0.6	1.1
Repeatability ^a and (reproducibility) as RSD/%	CC _β /ngmL ⁻¹	1.3	1.6	0.6	1.6	1.4	1.2	0.5	0.8	1.0	1.0	1.9
	5 ngmL ⁻¹	3.3 (6.9)	2.4 (13)	1.4 (9.0)	3.0 (8.1)	2.2 (9.3)	2.9 (5.2)	16 (20)	7.9 (16)	12 (16)	9.2 (20)	3.2 (9.4)
	10 ngmL ⁻¹	5.6 (4.8)	5.2 (9.7)	6.8 (5.2)	4.8 (7.3)	9.7 (7.6)	2.6 (4.9)	4.6 (9.4)	7.1 (4.7)	9.4 (7.1)	4.9 (8.0)	4.7 (5.6)
Recovery ^b /%	15 ngmL ⁻¹	2.0 (4.5)	3.5 (8.7)	1.3 (3.9)	2.1 (5.7)	0.8 (6.7)	2.1 (4.6)	1.6 (12)	1.9 (6.7)	1.8 (7.8)	2.3 (6.6)	1.4 (5.6)
	5 ngmL ⁻¹	108±8	110±8	108±3	103±9	114±7	105±7	100±3	108±4	104±7	101±12	87±9
	10 ngmL ⁻¹	102±4	95±4	105±2	93±4	101±4	100±4	88±2	92±2	91±3	90±9	106±12
	15 ngmL ⁻¹	99±3	93±3	102±1	95±3	99±2	93±3	82±1	87±2	115±2	93±7	93±7

^a Repeatability calculated as intraday precisions (eight injections per level). Reproducibility calculated as interday precisions (three consecutive days, eight injections per level each day)

^b Recoveries (process efficiency) calculated as the average of six injections per concentration level

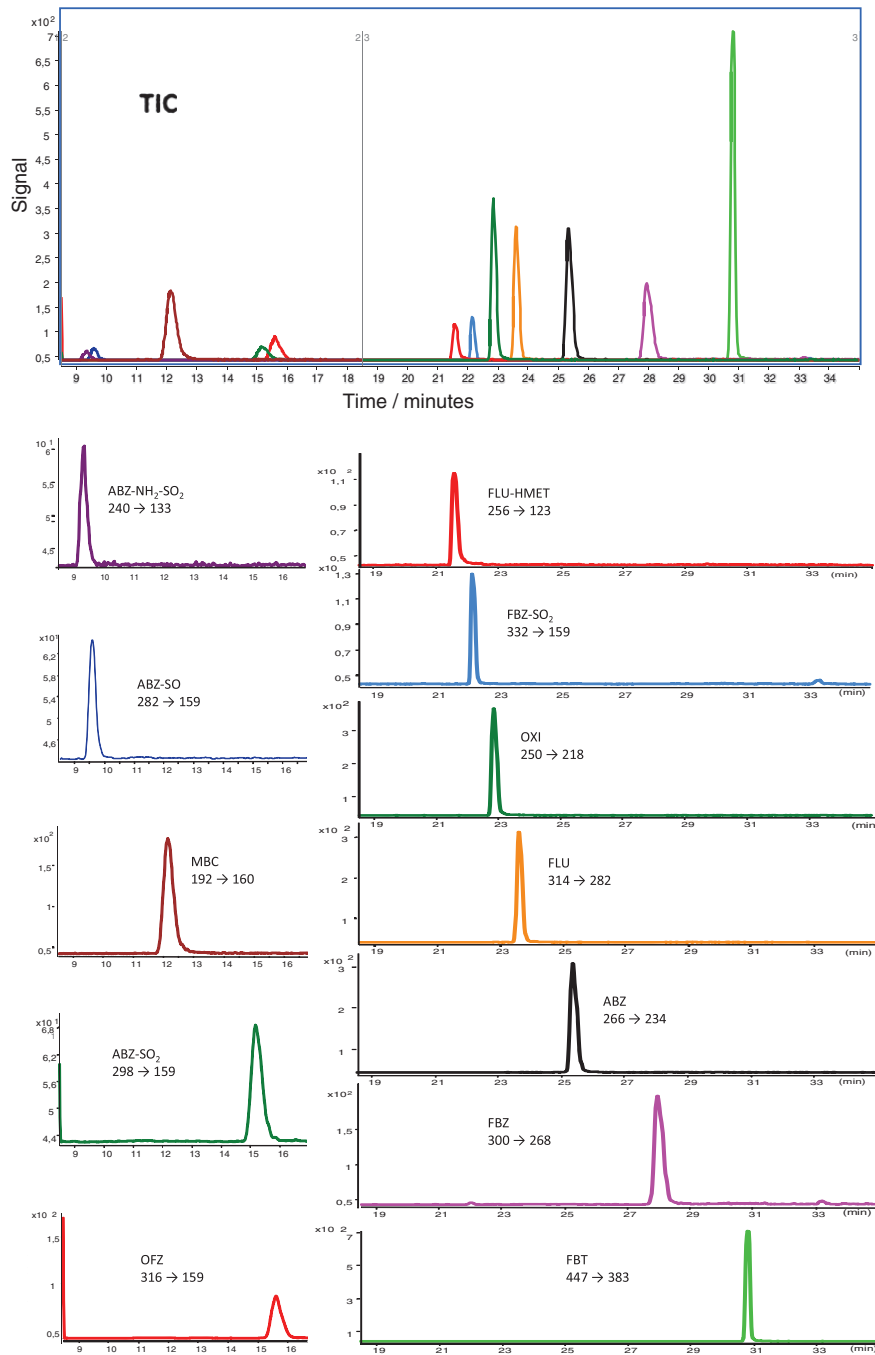


Fig. 1 Total ion chromatogram (TIC) and extracted ion chromatograms (XIC) obtained with the whole proposed method for a milk sample spiked at 10 ng mL⁻¹

and in aqueous standards. A two-tailed *t* test was applied to compare the slopes. It may be seen that for most of the analytes probability values (*p*) lower than 0.05 were obtained. These results confirm that for 8 of the 12 compounds there was a matrix effect. Accordingly, quantification in milk samples with the proposed method requires the use matrix-matched calibration. A calibration in milk samples in the 5–200 ngmL⁻¹ concentration range was performed, this being linear for most of the benzimidazoles studied (Table 1). Figure 1 shows the MS/MS extracted ion chromatograms (XIC) obtained in the analysis of a milk sample.

Validation of method according to Commission Decision 2002/657

Owing to the low stability of benzimidazoles in water, the stability of the stock solutions was studied in three different media: water, McIlvane buffer at pH 7.2, and McIlvane buffer at pH 7.2 plus 10 % MeOH (v/v). The results revealed that the analytes were more stable in McIlvane buffer at pH 7.2 plus 10 % MeOH, with stable signals for at least 72 h, such that in later studies stock solutions of this medium were used.

Validation of the proposed method was performed following the Commission Decision 2002/657/EC which establishes the validation criteria of analytical methods for the determination of organic residues or contaminants in foods of animal origin.

Two analytical limits are recommended: the decision limit (CC_{α}) and the detection capability (CC_{β}). These parameters were determined in whole milk and verified by respective experiments, estimated using the calculations described by Verdon et al. [14] (Table 1). According to current legislation [12], the MRL for the albendazole family (ABZ, ABZ-NH₂-SO₂, ABZ-SO and ABZ-SO₂) is 100 μg kg⁻¹. Calculated values for the CC_{α} and the CC_{β} for this

family were 3.2 and 5.4 μgkg⁻¹, respectively. Both values are much lower than those established by the legislation as the MRL for this family.

In the case of the febantel family (FBT, FBZ, OFZ, and FBZ-SO₂), CC_{α} and CC_{β} were 3.3 and 5.7 μgkg⁻¹, which are again much lower than those established.

In order to determine the intralaboratory repeatability and reproducibility of the proposed method, milk samples were spiked with all the analytes at three concentration levels: 5, 10, and 15 ngmL⁻¹. The relative standard deviations (RSD) for the three concentrations studied are shown in Table 1. The values found were lower than 20 %, even in the most unfavorable of cases.

Validation of the method requires estimation of its accuracy. The recoveries of milk samples spiked at 5, 10, and 15 ngmL⁻¹ were determined. The results obtained, as percentages of analyte recovered, are shown in Table 1. It may be seen that for the three concentrations studied the recoveries were in the accepted range of the Codex Guidelines (CAC/GL 71–2009): 70–120 %, with relative standard deviations less than 15 % (Table 1).

In order to validate the ruggedness of the method, seven different milk samples were analyzed. None of the samples showed benzimidazole compounds at concentrations above the LOD and hence they were spiked at 10 ngmL⁻¹. The signal obtained for each of the analytes was introduced into the corresponding calibration line. Table 2 shows the recovery values obtained. In all cases, satisfactory recoveries were obtained.

One of the disadvantages of the use of on-line preconcentration with the same sorbent for different samples is possible contamination among them. It was shown that a memory effect, or contamination among samples, existed at elevated concentrations (500 ngmL⁻¹), although the magnitude of the effect was very small since it did not reach 1 % in any of the cases. However, it is recommended that in the analysis of samples with high concentrations of analyte, an

Table 2 Recoveries found for the analyses, using the developed method, of milk samples from different sources and of different nature spiked at 10 ngmL⁻¹. Average of six injections

Analyte	Milk 2	Milk 3	Milk 4	Milk 5	Milk 6	Milk 7	Milk 8
ABZ-NH ₂ -SO ₂	109±4	113±4	108±4	112±5	99±5	107±5	98±5
ABZ-SO	99±4	101±4	99±4	100±5	98±5	99±5	93±5
MBC	98±2	92±2	92±2	106±3	106±3	106±3	106±3
ABZ-SO ₂	109±4	108±4	105±4	98±4	99±4	96±4	94±4
OFZ	110±4	97±3	110±3	105±3	109±4	108±4	105±4
FLU-HMET	102±3	101±4	104±3	99±4	97±4	100±4	114±4
OXI	109±4	110±4	111±4	103±4	105±4	98±4	108±4
FLU	110±4	113±4	108±4	104±4	107±4	100±4	111±4
ABZ	115±7	115±6	108±7	104±6	109±6	104±6	107±7
FBZ	95±2	85±2	78±2	106±1	109±5	93±2	107±3
FBT	109±10	100±10	85±10	13±17	128±17	114±19	125±17

injection of water should be made between samples with a view to minimizing this effect and the possibility of obtaining “false positives”.

Conclusions

In this work, a rapid and efficient method for the determination of benzimidazoles in milk samples was developed, at the levels required by current legislation. The method is user-friendly at control laboratories since it involves a minimum of sample manipulation. The results obtained show that the use of a restricted access material as a prior clean-up step in milk samples is very efficient in reducing the matrix effect, being useful for samples containing up to 50 % of MeOH.

Additionally, the C4 ADS-cartridge studied shows good ruggedness, cost and half-life.

Acknowledgments The *Ministerio de Ciencia e Innovación*, Spain, (Project CTQ 2011-24075) is gratefully acknowledged for financial support of this work. D.G.G. gratefully acknowledges financial assistance from *Ministerio de Educación*, Spain (FPU grant).

References

1. Townsend LB, Wise DS (1990) *Parasitol Today* 6:107–112
2. Whelan M, Kinsella B, Furey A, Moloney M, Cantwell H, Lehotay SJ, Danaher M (2010) *J Chromatogr A* 1217:4612–4622
3. Danaher M, Ruyck H, Crooks SRH, Dowling G, O’Keeffe M (2007) *J Chromatogr B* 845:1–37
4. Keegan J, Whelan M, Danaher M, Crooks S, Sayers R, Anastasio A, Elliott C, Brandon D, Furey A, O’Kennedy R (2009) *Anal Chim Acta* 654:111–119
5. Takeba K, Fujinuma K, Sakamoto M, Miyazaki T, Oka H, Itoh Y, Nakazawa H (2000) *J Chromatogr A* 882:99–107
6. Ruyck H, Daeseleire E, Ridder H, Renterghem R (2002) *J Chromatogr A* 976:181–194
7. Souverain S, Rudaz S, Veuthey JL (2004) *J Chromatogr B* 801:141–156
8. Commission Decision 657/2002/EC (2002) *Off J Eur Commun L* 221/8
9. Rodríguez-Gonzalo E, García-Gómez D, Carabias-Martínez R (2010) *J Chromatogr A* 1217:40–48
10. Chico J, Meca S, Companyó R, Prat MD, Granados M (2008) *J Chromatogr A* 1181:1–8
11. Rodríguez-Gonzalo E, García-Gómez D, Herrero-Hernández E, Carabias-Martínez R (2010) *J Sep Sci* 33:2240–2249
12. Commission Regulation 37/2010/EC (2010) *Off J Eur Union. L* 15/1
13. Eeckhaut A, Lanckmans K, Sarre S, Smolders I, Michotte Y (2009) *J Chromatogr B* 877:2198–2207
14. Verdon E, Hurtaud-Pessel D, Sanders P (2006) *Accred Qual Assur* 11:58–62

**DETERMINACIÓN DE
BIOMARCADORES EN
MUESTRAS BIOLÓGICAS**

5

**5.A. DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES
DE EXPOSICIÓN A COMPUESTOS
XENOBIÓTICOS**



5.A.1. Objeto

Este apartado está dirigido al desarrollo de métodos de análisis para la separación, identificación y cuantificación a nivel de traza de un amplio conjunto de biomarcadores de exposición a compuestos xenobióticos en muestras biológicas. El objetivo del trabajo es desarrollar una metodología analítica automática, rápida y eficaz que permita evaluar la exposición ambiental de los seres vivos a diversos tipos de compuestos tóxicos.

La selección de xenobióticos y sus respectivos biomarcadores se ha realizado de acuerdo a su importancia medioambiental: por una parte, insecticidas y herbicidas de amplio uso doméstico y agrícola como carbamatos, fenoxiácidos, fenilureas y triazinas y por otra parte, compuestos tóxicos de origen industrial como clorofenoles, otros derivados fenólicos e hidrocarburos policíclicos aromáticos. Como matriz biológica se ha seleccionado la orina debido a su fácil obtención de manera no invasiva.

Dentro de este contexto, en este trabajo se estudiarán las posibilidades que ofrece la utilización de materiales de acceso restringido (RAM) en etapas de extracción y limpieza para el tratamiento de matrices biológicas. Uno de los objetivos del trabajo es el acoplamiento de este tipo de dispositivos a sistemas de cromatografía líquida (RAM-LC). Este acoplamiento posibilitará la inyección directa de la muestra biológica en el sistema cromatográfico, reduciendo así las etapas previas de tratamiento y, por lo tanto, la manipulación de la muestra por parte del analista.

Como técnica de análisis se utilizará la cromatografía líquida con detector de diodos y acoplada a espectrometría de masas en tándem en el tiempo utilizando un analizador de trampa de iones.

El método desarrollado se validará como método cuantitativo de confirmación de acuerdo con los requisitos legislados por la Unión Europea (2002/657/CE) que requieren estudiar parámetros tales como la veracidad, la precisión, la selectividad y la robustez así como las capacidades de detección y decisión del método a desarrollar (RAM-LC-MS/MS).

Finalmente, un último aspecto a desarrollar comprende el estudio de las posibilidades que puede presentar el método desarrollado (RAM-LC-MS/MS) como método de *screening* para la confirmación en orina de biomarcadores de exposición.

5.A.2. Introducción

Los riesgos para la salud humana que conlleva la exposición a plaguicidas y otros compuestos tóxicos es un aspecto que genera una constante preocupación. El desarrollo industrial y la agricultura intensiva de los últimos 50 años, unidos estrechamente a la industria química, son responsables de la síntesis, utilización y, en muchos casos, liberación al medio ambiente de alrededor de 120000 compuestos químicos. Se calcula que cada año se introducen en el mercado 1000 nuevos productos de síntesis¹⁸⁰. Aunque muchos de ellos no han sido evaluados en su capacidad potencial de actuar sobre los sistemas biológicos, sí se tiene evidencia de la peligrosidad de algunas de estas sustancias para organismos superiores. Además, como consecuencia de un empleo generalizado, están ampliamente repartidas por todo el mundo por lo que la exposición de los seres vivos es universal.

La problemática de la exposición a estos tóxicos xenobióticos no afecta únicamente a los trabajadores, que sufren la mayor exposición a los plaguicidas y otros compuestos químicos, sino también al medio ambiente en general y por consiguiente a toda la comunidad, que se ve afectada por la contaminación de alimentos, aguas, suelos y aire, con los consiguientes riesgos para la salud.

El seguimiento biológico^{181,182,183,184} (*biological monitoring* o *biomonitoring*) de la presencia y concentración de compuestos tóxicos en seres humanos, como forma de evaluación de los riesgos que supone su exposición a la contaminación medioambiental, es un campo de creciente interés, tanto en los aspectos relacionados con el estudio y validación de biomarcadores adecuados como en el desarrollo de metodologías analíticas rápidas y eficaces que permitan una identificación y cuantificación fiables. Las innovaciones en ambos

¹⁸⁰ C. Castillo, D. Barceló, Trends Anal. Chem. 16 (1997) 574. "Analysis of industrial effluents to determine endocrine-disrupting chemicals"

¹⁸¹ J. Angerer, U. Ewers, M. Wilhelm, Int. J. Hyg. Environ. Health 210 (2007) 201. "Human biomonitoring: State of the art"

¹⁸² L.L. Needham, A.M. Calafat, D.B. Barr, Int. J. Hyg. Environ. Health 210 (2007) 229. "Uses and issues of biomonitoring"

¹⁸³ D. Paustenbach, D. Galbraith, Regul. Toxicol. Pharm. 44 (2006) 249. "Biomonitoring: Is body burden relevant to public health?"

¹⁸⁴ D.B. Barr, L.L. Needham, J. Chromatogr. B 778 (2002) 5. "Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review"

aspectos inciden positiva y directamente en el desarrollo de estrategias de control y prevención de riesgos en la salud humana.

Dado que uno de los objetivos de este apartado es desarrollar una metodología que permita la determinación de biomarcadores de exposición a diferentes xenobióticos, tanto en su polaridad como en sus características ácido-base, se siguió principalmente este criterio a la hora de seleccionar los diferentes analitos objeto de estudio. Además, en la selección también se ha tenido en cuenta el uso mundial de los contaminantes industriales y, en la selección de los pesticidas, su utilización en nuestra región. Así, los biomarcadores estudiados pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- Biomarcadores de exposición a pesticidas
- Biomarcadores de exposición a contaminantes industriales

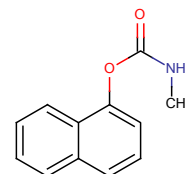
5.A.2.1. Biomarcadores de exposición a pesticidas

Se define pesticida como cualquier producto químico destinado a combatir plagas. Actualmente más de 1400 compuestos están registrados en todo el mundo como pesticidas. La contaminación por pesticidas de aguas superficiales y acuíferos debido a su uso en agricultura y posterior filtración ha sido bien documentada en todo el mundo. Por estos motivos, el análisis de pesticidas ha recibido una creciente atención en las últimas décadas, dando lugar a numerosos programas de control. Los biomarcadores de exposición a pesticidas estudiados son:

- Carbamatos

Ésteres de ácidos carbámicos sustituidos ($R-O-CO-NR'R''$). Familia de insecticidas y herbicidas de amplio espectro utilizados desde la década de 1950. Actúan por inhibición de la enzima acetilcolinesterasa. Presentan una DL_{50} de 250 a 850 mg kg^{-1} en ratas.

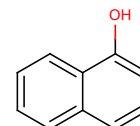
Carbarilo



Nombre comercial: Kevin

Tóxico para humanos. Clasificado como posible carcinógeno por la EPA. No se acumula y se elimina parcialmente por la orina¹⁸⁵.

1-Naftol



Principal metabolito del carbarilo, un 85 % de este se elimina como 1-naftol por la orina¹⁸⁶. También aparece como metabolito de la napropamida (herbicida de amplio espectro) y como metabolito de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (ver Pág. 197).

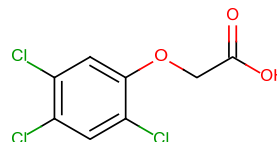
- Fenoxiácidos

Familia de herbicidas de amplio espectro. Relacionados estructuralmente con el ácido indoleacético, hormona reguladora del crecimiento en plantas. Produce en ellas un crecimiento rápido e incontrolado que termina por matarlas. Se dividen en fenoxiacéticos, fenoxibutíricos y fenoxipropiónicos siendo estos últimos los que más variantes comerciales presentan. Prácticamente no son metabolizados, por lo que se eliminan por la orina sin sufrir alteraciones¹⁸⁷. Su toxicidad es media (DL₅₀ de 500 mg kg⁻¹ en ratas).

¹⁸⁵ B.J. Duck, M. Woolias, J. Anal. Toxicol. 9 (1985) 177. "Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatographic Determination of Carbaryl in Postmortem Specimens"

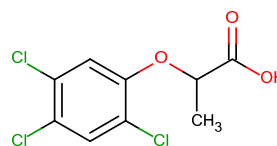
¹⁸⁶ World Health Organization, Environmental Health Criteria. No. 153. International Chemical Safety, Geneva, 1994. "Carbaryl"

¹⁸⁷ IARC, IARC Monographs 41 (1986) 357. "Some Halogenated Hydrocarbons and Pesticide Exposures"

2,4,5-T

Nombre comercial: Arbokan, Trioxon

Desarrollado a finales de los 40 fue ampliamente utilizado tanto de forma individual como mezclado con 2,4-D, formando así el “agente naranja”. Su excreción a través de la orina es lenta, presentando un máximo a los dos días. A los 5 días la excreción alcanza el 80%¹⁸⁸.

2,4,5-TP

Nombre comercial: Fenoprop, Silvex

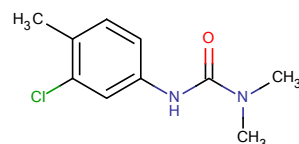
De características muy similares al 2,4,5-T, el 2,4,5-TP se utilizó principalmente para el control de arbustos y malas hierbas de hoja ancha.

- Fenilureas

Derivados de la urea que presentan átomos de cloro unidos a un núcleo aromático y dos grupos metilos unidos al nitrógeno lo que les confiere una alta actividad herbicida. Actúan inhibiendo la reacción de Hill y, por tanto, impidiendo el proceso normal de la fotosíntesis. Se utilizan principalmente como esterilizantes en terrenos donde se quiere evitar el crecimiento de todas las plantas y en tratamientos de pre-emergencia. Su toxicidad es baja (DL₅₀ de 3400 a 7500 mg kg⁻¹ en ratas).

¹⁸⁸ R.J. Feldman, H.I. Maibach, Toxicol. Appl. Pharmacol. 28 (1974) 126. “Percutaneous penetration of some pesticides and herbicides in man”

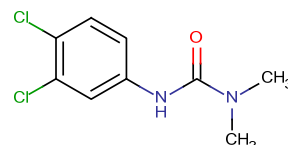
Clortolurón



Nombre comercial: Dicuran, Tolurex

Poco soluble en agua. Se emplea para tratar muchas malas hierbas de hoja ancha de los cereales de invierno.

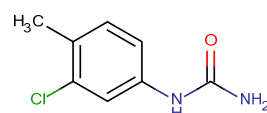
Diurón



Nombre comercial: DCMU, Diurex

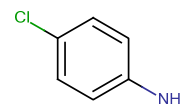
Utilizado como herbicida para controlar malezas en plantaciones de piña, banana, cítricos, caña de azúcar y otros cultivos, así como en las vías férreas. Se adsorbe persistentemente en el suelo, con una vida media de hasta once meses. La biodegradación en agua es lenta.

CMPU



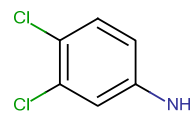
Metabolito principal del Clortolurón junto a la 3-cloro-4-metilanilina.

4-cloroanilina



Metabolito de cuatro fenilureas (Monurón, Monolinurón, Buturón y Diflubenzurón). Se elimina por vía urinaria¹⁸⁹.

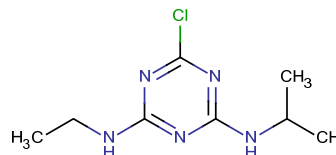
¹⁸⁹K. Wittke, H. Hajimiragha, L. Dunemann, J. Begerow, J. Chromatogr. B 755 (2001) 215. "Determination of dichloroanilines in human urine by GC-MS, GC-MS-MS, and GC-ECD as markers of low-level pesticide exposure"

3,4-dicloroanilina

Metabolito de cuatro fenilureas (Diurón, Linurón, Neburón y Propanil). Se elimina por vía urinaria¹⁸⁹.

- Triazinas

Derivados de la s-triazina. Las más utilizadas son las clorotriazinas, derivados con un átomo de cloro y otros sustituyentes. Poco solubles en agua presentan una elevada persistencia, con una vida media de hasta 261 días¹⁹⁰. Su toxicidad es baja (DL₅₀ de 3000 mg kg⁻¹ en ratas). La acción herbicida fundamental es el bloqueo de la fotosíntesis.

Atrazina

Nombre comercial: Atranex, Zeazin

Se utiliza en cultivos como el maíz y los frutales con dosis de aplicación de 1 kg ha⁻¹ y 3 kg ha⁻¹, respectivamente. Prohibido en la Unión Europea. Es uno de los herbicidas más utilizados en Estados Unidos con un gasto anual de 35000 toneladas. Aunque se metaboliza parcialmente por dealquilación se detecta inalterado en orina¹⁹¹.

¹⁹⁰ U.S. EPA, January, 2003. "Interim Reregistration Eligibility Decision for Atrazine"

¹⁹¹ G. Catenacci, M. Maroni, D. Cottica, L. Pozzoli, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 44 (1990) 1. "Assessment of human exposure to atrazine through the determination of free atrazine in urine"

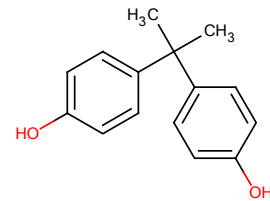
5.A.2.2 Biomarcadores de exposición a contaminantes industriales

Se entiende por contaminación industrial a la emisión de sustancias nocivas, tóxicas o peligrosas, directa o indirectamente de las instalaciones o procesos industriales al medio natural. En estas emisiones quedan incluidas las que se derivan de los productos o subproductos que las industrias ponen en el mercado. Los tipos de contaminantes producidos por los focos industriales dependen fundamentalmente del tipo de proceso de producción empleado, de la tecnología utilizada y de las materias primas usadas.

- Monómeros

Desde mediados del siglo XX los polímeros son la materia prima más utilizada. La producción de polímeros se incrementa cada año, en 2003 la producción mundial alcanzó las 200 millones de toneladas. Este hecho pone de manifiesto la necesidad de controlar los posibles residuos generados por este sector industrial.

Bisfenol-A



Nombre comercial: BPA

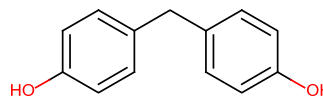
El bisfenol-A se utiliza para la fabricación de policarbonatos y de resinas epoxi. Estos polímeros son ampliamente utilizados en una gran variedad de aplicaciones siendo de especial importancia su uso en botes y latas de alimentos ya que es la vía principal de exposición. Es un disruptor endocrino débil con probados efectos en la reproducción. Es poco persistente en el organismo presentando un tiempo de vida media de 6 horas eliminándose principalmente por vía urinaria^{192,193}.

¹⁹² W. Völkel, T. Colnot, G.A. Csanady, J.G. Filser, W. Dekant, Chem. Res. Toxicol. 15 (2002) 1281. "Metabolism and Kinetics of Bisphenol A in Humans at Low Doses Following Oral Administration"

¹⁹³ L.A. Hoepner, R.M. Whyatt, A.C. Just, A.M. Calafat, F.P. Perera, A.G. Rundle, Environ. Res. 122 (2013) 38. "Urinary concentrations of bisphenol A in an urban minority birth cohort in New York City, prenatal through age 7 years"

Bisfenol-F

Nombre comercial: BPF

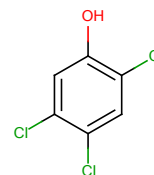


De características similares al bisfenol-A se utiliza junto a este en la fabricación de resinas epoxi para el recubrimiento interior de latas de comida. Su migración a los alimentos está ampliamente demostrada¹⁹⁴.

- Clorofenoles

Los clorofenoles se incluyen entre los contaminantes más importantes del medio ambiente, tanto en los sistemas acuosos como sólidos. Presentan elevada toxicidad que aumenta con el número de átomos de cloro en la molécula. Se utilizan ampliamente como intermediarios en la producción de tintes, plásticos y productos farmacéuticos. También se originan en los procesos de depuración y tratamientos de aguas como consecuencia de la cloración de los fenoles presentes en el agua¹⁹⁵.

2,4,5-triclorofenol



El 2,4,5-triclorofenol se produce como intermedio en la síntesis de 2,4,5-T y sus derivados. Es ampliamente utilizado como fungicida en la industria de la madera¹⁹⁶. Junto con el 2,4,6-triclorofenol forma parte de la lista de contaminantes prioritarios¹⁹⁷. Es resistente a la degradación microbiana. También puede detectarse en orina como biomarcador de la exposición al fungicida hexaclorobenceno¹⁹⁸.

¹⁹⁴ I. Jordáková, J. Dobiás, M. Voldrich, J. Poustka, Czech J. Food Sci. 21 (2003) 85. "Determination of bisphenol A, bisphenol F, bisphenol A diglycidyl ether and bisphenol F diglycidyl ether migrated from food cans using Gas Chromatography-Mass Spectrometry"

¹⁹⁵ I. Rodríguez, M.P. Ilompart, R. Cela, J. Chromatogr. A 885 (2000) 291. "Solid-phase extraction of phenols"

¹⁹⁶ D. Bello, C. Trasar-Cepeda, M.C. Leirós, F. Gil-Sotres, Environ. Pollut. 156 (2008) 611. "Evaluation of various tests for the diagnosis of soil contamination by 2,4,5-trichlorophenol (2,4,5-TCP)"

¹⁹⁷ M. Sittig, Noyes Publications, Park Ridge, N.J. 1981. "Handbook of toxic and hazardous chemicals"

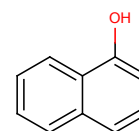
¹⁹⁸ G. Renner, K.P. Schuster, Toxicol. Appl. Pharmacol. 39 (1977) 355. "2,4,5-Trichlorophenol, a new urinary metabolite of hexachlorobenzene"

- Hidrocarburos policíclicos aromáticos

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (*PAHs*, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*) son una familia de compuestos formados por anillos aromáticos fusionados que no contienen ningún heteroátomo o sustituyente. Se encuentran de forma natural en el petróleo, el carbón y el alquitrán de donde son liberados al ambiente por los procesos de combustión.

También se producen en los alimentos que se han sido cocinados en barbacoa, ahumados y en otros procesos que provocan que productos de la combustión entren en contacto directo con los alimentos¹⁹⁹. Se encuentran en estos en concentraciones de hasta $30 \mu\text{g kg}^{-1}$ ²⁰⁰.

1-Naftol



Los PAHs son metabolizados a formas más oxidadas por el citocromo p450. En dicha ruta metabólica predominan las formas hidroxiladas (OH-PAHs) que son ampliamente reconocidas como biomarcadores de exposición a PAHs eliminados por vía urinaria²⁰¹. Por lo tanto, el 1-naftol, es un biomarcador de exposición a naftaleno además de, como ya se citó anteriormente, un biomarcador de exposición a ciertos pesticidas.

¹⁹⁹ B.K. Larsson, J Agric Food Chem. 31 (1983) 867. "Polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled food"

²⁰⁰ R. Martí-Cid, J.M. Llobet, V. Castell, J.L. Domingo, Food Chem. Toxicol. 46 (2008) 3163. "Evolution of the dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in Catalonia, Spain"

²⁰¹ F. Onyemauwa, S.M. Rappaport, J.R. Sobus, D. Gajdošová, R. Wu, S. Waidyanatha, J. Chromatogr. B 877 (2009) 1117. "Using liquid chromatography-tandem mass spectrometry to quantify monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine"

5.A.3. Determinación cromatográfica de biomarcadores de exposición en orina: RAM-RPLC-DAD

5.A.3.1. Optimización de la separación cromatográfica

La separación cromatográfica fue optimizada para obtener la mayor resolución y eficacia en el menor tiempo posible de análisis. Así, se utilizó una fase móvil formada por acetonitrilo y tampón ácido fórmico / formiato amónico a una concentración de 2.5 mM (pH 3.4). En estas condiciones el valor del pH de la fase móvil es menor que los pK_a de todos los analitos lo que evita la presencia de especies cargadas, difíciles de retener en una fase inversa, mejorando así la forma de los picos cromatográficos. El gradiente optimizado con dicha mezcla varía desde un 15 % hasta un 100 % de fase orgánica. La Figura 5.1 muestra el cromatograma obtenido a 214 nm para una mezcla patrón de todos los analitos estudiados, inyectados en agua ultrapura a una concentración de 500 ng mL⁻¹. Se observa que se alcanza una resolución adecuada de 12 de los 13 biomarcadores estudiados (con la excepción de BPA) en un tiempo de 23 minutos.

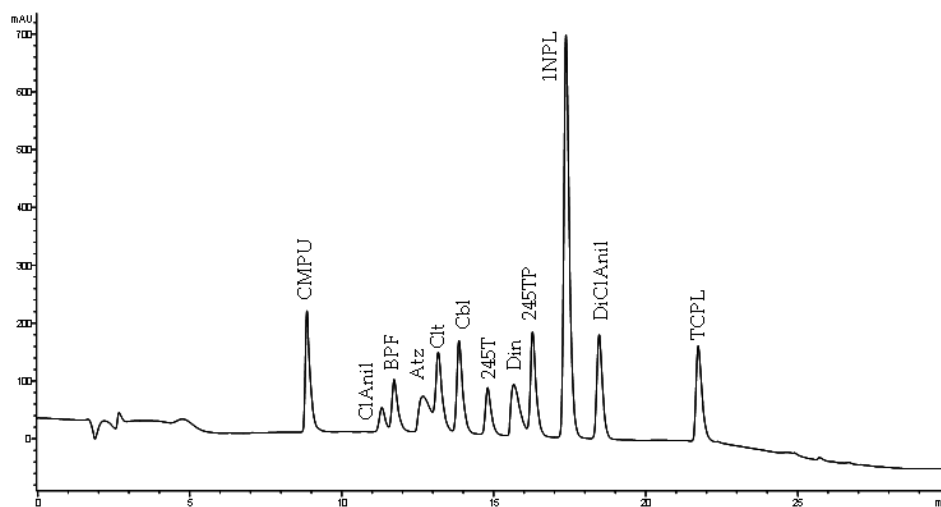


Figura 5.1. Cromatograma correspondiente a una mezcla patrón de 500 ng mL⁻¹ obtenido con el gradiente tampón formiato amónico (pH: 3.4) / ACN. Detección con barrera de diodos (DAD), 214 nm

5.A.3.2. Optimización del tratamiento de muestra utilizando materiales de acceso restringido

El análisis de analitos a nivel de traza en muestras biológicas, como la orina, requiere habitualmente una o varias etapas de separación/preconcentración que permitan el aislamiento del analito de la matriz para alcanzar los niveles de concentración adecuados para el posterior análisis. Además, si el análisis se lleva a cabo mediante métodos cromatográficos, se requiere normalmente de una etapa de limpieza para eliminar en lo posible la mayor cantidad de los compuestos presentes en la orina, que dificultan el análisis y acortan el tiempo de vida útil de las columnas cromatográficas.

En este trabajo se comprobaron inicialmente las posibilidades que ofrece un RAM en el análisis simultáneo de biomarcadores de exposición de diversa naturaleza química en muestras de orina. Estos estudios, así como la optimización posterior del tratamiento, se llevó a cabo acoplado el RAM al sistema LC-DAD.

Los cromatogramas obtenidos con esta configuración instrumental, RAM-LC-DAD, y utilizando un RAM con cadenas alquílicas de cuatro átomos de carbono, C₄, se compararon con los obtenidos al inyectar muestras de orina directamente en el sistema LC-DAD y los obtenidos después de una etapa de limpieza de la orina *off-line* usando un sorbente de extracción en fase sólida (SPE) de tipo polimérico (Oasis HLB). Los cromatogramas mostrados en la Figura IV.2 (Pág. 213) ponen de manifiesto la eficacia de los dispositivos RAM en la limpieza de muestras biológicas. Puede observarse (Fig. IV.2.A) como en los cromatogramas obtenidos con la muestra de orina inyectada directamente aparecen una gran cantidad de picos correspondientes a los interferentes de matriz presentes en la orina. Esos picos disminuyen cuando se introduce una etapa de extracción y limpieza a través del Oasis HLB (Fig. IV.2.B) y lo hacen aún más cuando esa etapa de limpieza se lleva a cabo a través del RAM (Fig. IV.2.C).

Una vez comprobada la posibilidad de utilizar este tipo de materiales para la limpieza de muestras de orina se estudió la influencia del tipo de sorbente, el cual actúa como fase estacionaria en el RAM reteniendo los analitos en estudio.

Se estudió el comportamiento que presentan diferentes RAM-ADS cuyas fases estacionarias están formadas por cadenas alquílicas de diferente longitud: C4, C8 y C18. Para ello, se inyectaron en el sistema 100 μ L de muestras de orina. Para la carga y el lavado del RAM se utilizó la bomba isocrática con un disolvente constituido por un tampón ácido fórmico / formiato amónico 2.5 mM de pH 2.9 con un 5 % de ACN, manteniendo un tiempo de lavado de 3 minutos. Posteriormente, los analitos fueron eluidos a la columna cromatográfica donde se llevó a cabo la separación con el gradiente previamente optimizado. En la Figura IV.3 (Pág. 213) se muestran los cromatogramas obtenidos.

Puede observarse que la limpieza obtenida es mayor a medida que va disminuyendo la longitud de las cadenas alquílicas de la fase estacionaria del RAM-ADS, especialmente en los primeros minutos del cromatograma, zona que presenta las mayores interferencias. Por lo tanto, se decidió continuar el estudio empleando el RAM-ADS de fase estacionaria butílica (C4).

Una vez seleccionado el RAM más adecuado, se optimizaron diferentes factores que pueden mejorar la limpieza de la muestra y, en consecuencia, facilitar la cuantificación de los diferentes analitos así como alargar la vida útil de la columna cromatográfica.

En este sentido, el comportamiento del RAM en la etapa de limpieza de muestras biológicas se ve afectado principalmente por dos factores: el disolvente utilizado en la etapa de lavado del RAM y el tiempo que dura esta etapa.

En la configuración instrumental utilizada, el disolvente impulsado por la bomba isocrática es el que carga la muestra en el RAM, actuando por lo tanto al mismo tiempo como disolvente de lavado. La composición de este disolvente es por tanto un factor decisivo para obtener un lavado eficiente de aquellos componentes de la matriz que puedan interferir, sin que se produzca la eliminación de los compuestos de interés.

Se estudió la composición de dicho disolvente empleando mezclas de tampón ácido fórmico / formiato amónico (pH 2.9) y acetonitrilo en las que se varió la proporción de acetonitrilo desde un 5% hasta un 25% (v/v). A medida que aumenta la proporción de

componente orgánico el lavado que se produce es mayor pero también aumenta la posibilidad de eliminar los analitos estudiados. Para evaluar dicha posibilidad, se determinaron las recuperaciones para cada biomarcador al variar el porcentaje de ACN en la etapa de lavado. Las recuperaciones se determinaron comparando la concentración obtenida, a través de un calibrado, con la concentración real con la que se dopó inicialmente la muestra.

En la Figura IV.4 (Pág. 214) se puede observar que la recuperación de los analitos de mayor polaridad (CMPU, CIAnil, BPF, Atz) disminuye drásticamente a medida que aumenta la proporción de componente orgánico en el disolvente de lavado. Para el resto de los analitos los valores de recuperación son superiores al 80 % cuando se trabaja con disolventes de lavado que contienen un porcentaje de ACN inferior al 15%. Al aumentar el porcentaje de disolvente orgánico disminuyen los valores de recuperación, siendo esta disminución más acusada para los analitos de mayor polaridad. A la vista de los resultados obtenidos, se decidió utilizar como disolvente de lavado tampón ácido fórmico / formiato amónico 2.5 mM (pH 2.9) con un 10% de acetonitrilo, ya que con este porcentaje se obtiene una buena limpieza sin que se produzcan pérdidas apreciables de los analitos más polares.

Utilizando esta disolución, optimizada como disolvente de lavado, se estudió la influencia del tiempo que ésta está circulando por el RAM una vez que la muestra ha sido inyectada, es decir, lo que se ha denominado tiempo de lavado del RAM. Este tiempo comprende el período que transcurre desde la inyección de la muestra (válvula en posición de “enriquecimiento”) hasta que la válvula se conmuta a la posición de “elución”. En la Figura 5.2 se muestran los cromatogramas obtenidos en el sistema RAM-LC-DAD correspondientes a la inyección de 100 μL de muestras de orina dopadas con 400 ng mL^{-1} de cada uno de los analitos estudiados, modificando el tiempo de lavado entre 3 y 15 minutos.

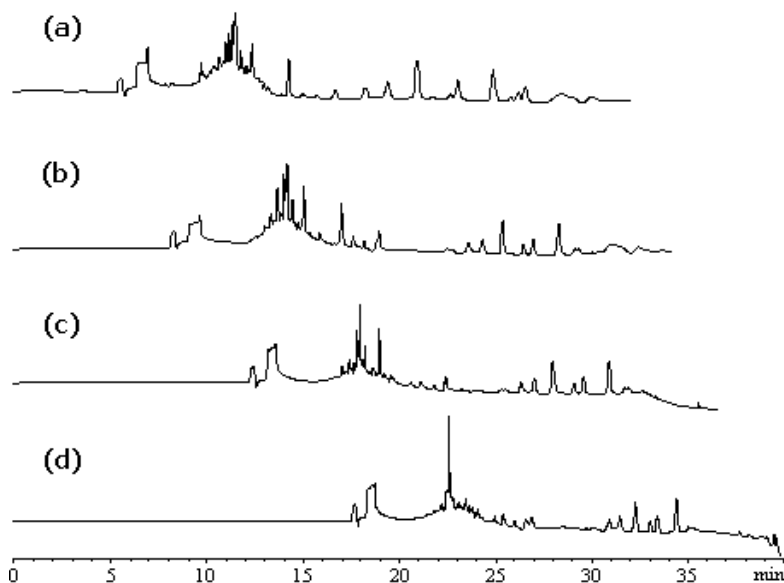


Figura 5.2. Cromatogramas RAM-LC-DAD de muestras de orina dopadas a 400 ng mL^{-1} . Inyección: $100 \mu\text{L}$. Tiempo de lavado del RAM - tampón formiato amónico $2,5 \text{ mM}$, 10% ACN- : a) 3 minutos, b) 5 minutos, c) 10 minutos y d) 15 minutos

En los cromatogramas obtenidos se observa un aumento del tiempo de análisis al hacerlo el de lavado. Además, el tiempo de lavado del RAM afecta a la separación cromatográfica de los analitos. Sin embargo, las magnitudes de los frentes de los cromatogramas no muestran diferencias significativas lo que indica que 3 minutos es un tiempo suficiente para obtener un lavado adecuado de los componentes no deseados de la matriz. Por lo tanto, se decidió utilizar este tiempo de 3 minutos como tiempo de lavado del RAM.

5.A.3.3. Efecto de matriz y características analíticas del método RAM-RPLC-DAD. Inyección de $100 \mu\text{L}$

Una vez optimizadas las variables que afectan el comportamiento del RAM se realizó un estudio de la influencia de la concentración de los analitos en la respuesta obtenida. Para ello se prepararon muestras de orina dopada a distintas concentraciones en un intervalo de 250 a 500 ng mL^{-1} . Las curvas de calibrado, obtenidas representando el área de pico

frente a la concentración de cada analito, muestran un comportamiento lineal en el margen estudiado.

A partir de dichas curvas de calibrado se estudió el posible efecto de matriz. Para ello, se compararon las pendientes del calibrado lineal, obtenidas en matriz real, frente a las respectivas pendientes obtenidas en las mismas condiciones experimentales pero analizando estándares en agua UHQ. Se aplicó un test-t de una cola cuyos resultados se muestran en la Tabla 5.1. Se obtuvieron valores para la probabilidad (p) menores de 0.05 en todos los casos. Por lo tanto, existe efecto de matriz y, para la correcta cuantificación de los analitos, es necesario realizar calibrados en matriz real (*matrix-matched calibration*).

Tabla 5.1. Comparación de las pendientes del calibrado en agua UHQ y en orina a través de un test-t de una cola. Inyección de 100 μ L

Analito	Pendiente en agua / mUA mL ng ⁻¹	Pendiente en orina / mUA mL ng ⁻¹	p ^a
CMPU	0.38±0.01	0.28±0.01	4·10 ⁻⁴
ClAnil	0.59±0.02	0.30±0.01	3·10 ⁻⁶
BPF	0.45±0.01	0.25±0.01	2·10 ⁻⁵
Atz	0.48±0.01	0.40±0.02	2·10 ⁻²
Clt	0.29±0.01	0.26±0.01	4·10 ⁻²
Cbl	1.31±0.02	1.00±0.02	5·10 ⁻⁵
245T	0.52±0.02	0.37±0.02	2·10 ⁻³
Din	0.34±0.01	0.28±0.01	4·10 ⁻³
245TP	0.56±0.02	0.43±0.03	1·10 ⁻²
1NPL	1.15±0.02	0.61±0.04	1·10 ⁻⁴
DiClAnil	0.45±0.01	0.30±0.02	2·10 ⁻³
TCPL	0.64±0.02	0.51±0.04	3·10 ⁻²

a. p: Probabilidad en tanto por uno, según un test-t de una cola, de que las pendientes no sean significativamente diferentes y, por lo tanto, no exista efecto matriz

También se evaluaron, inyectando 100 μ L de orina dopada, los límites de detección expresados como la concentración para la que se obtendría una relación señal/ruido de 3; la precisión del método, como la desviación estándar relativa obtenida al analizar 6 réplicas de una muestra de orina dopada a un nivel de concentración de 400 ng mL⁻¹ y las recuperaciones, comparando la concentración obtenida con la concentración real con la que se dopó la muestra. Los resultados se

muestran en la Tabla IV.2 (Pág. 214). Se obtuvieron valores, para los límites de detección, comprendidos entre 15 ng mL^{-1} para el Din y 80 ng mL^{-1} para el BPF. Para todos los analitos la desviación estándar relativa fue inferior al 10% y las recuperaciones variaron entre el 85% y el 100%.

5.A.3.4. *Materiales de acceso restringido como etapa de preconcentración*

Todos los estudios realizados hasta este punto se han llevado a cabo inyectando un volumen de muestra de $100 \mu\text{L}$. Sin embargo, una posibilidad para incrementar la sensibilidad del método y, por tanto, de mejorar los límites de detección, consiste en aumentar el volumen de muestra inyectado en el sistema.

Para estudiar esta posibilidad, se modificó el sistema cromatográfico instalando un asiento capilar de inyección de mayor capacidad, lo que permitió inyectar volúmenes de muestra de hasta $1500 \mu\text{L}$. La Figura IV.5 (Pág. 215) muestra como varía la señal analítica de tres de los analitos cuando se inyectan volúmenes de orina de 400 , 750 , 1000 y $1500 \mu\text{L}$. Puede observarse que en todos los casos existe una relación lineal entre el área de pico y el volumen de muestra inyectado.

Además, cuando se compararon (Tabla IV.3, Pág. 215) las señales obtenidas al inyectar $100 \mu\text{L}$ de una muestra de orina dopada con 1500 ng mL^{-1} con las señales que se obtuvieron al inyectar $1500 \mu\text{L}$ de una muestra de orina de concentración 100 ng mL^{-1} (esto es, en ambas experiencias la cantidad de analito inyectada es la misma) no se observaron diferencias significativas entre las señales obtenidas. Sin embargo, si se comparan las señales analíticas obtenidas con muestras de orina con las de agua ultrapura, se observa que las señales que se obtienen para estas muestras acuosas son ligeramente superiores a las obtenidas anteriormente con muestras de orina.

Estos resultados sugieren la existencia, al igual que sucedía al inyectar $100 \mu\text{L}$, de efectos de matriz al analizar muestras de orina, lo que afecta a la señal analítica. Por ello, para poder cuantificar de forma adecuada los analitos en muestras de orina, debe utilizarse un método de calibración que contemple estos efectos, por ejemplo, la calibración en matriz real (*matrix-matched calibration*).

La linealidad encontrada anteriormente entre la señal analítica y el volumen de muestra inyectado sugiere la posibilidad de utilizar el máximo volumen de inyección permitido por el equipo, 1500 μL , como forma de mejorar la sensibilidad del método. Para ello, fue necesario comprobar previamente si para este volumen de orina inyectada la etapa de lavado del RAM seguía siendo eficaz. Como disolvente de lavado se utilizó el mismo optimizado anteriormente: tampón formiato amónico, pH 2.9, con un 10% de acetonitrilo. La Figura IV.6 (Pág. 216) muestra los cromatogramas obtenidos al aumentar el tiempo de lavado entre 3 y 10 min. En los cromatogramas se observa que para tiempos de lavado de 10 minutos (Fig. IV.6.C) se obtienen cromatogramas más limpios, si bien el tiempo de análisis es mayor.

Por lo tanto, para trabajar con un volumen de muestra inyectada de 1500 μL , se eligió utilizar un tiempo de lavado de 10 minutos a pesar del aumento del tiempo de análisis ya que, un lavado adecuado del RAM, prolonga la vida útil de la columna cromatográfica y facilita la identificación y cuantificación de los analitos de interés. La Tabla IV.1 (Pág. 212) muestra, a modo de resumen, los diferentes parámetros recomendados para utilizar el RAM como etapa de tratamiento *on-line*.

5.A.3.5. Características analíticas del método RAM-RPLC-DAD

Con estas nuevas condiciones, se determinaron las características analíticas del método propuesto para la determinación de estos biomarcadores en muestras de orina. En el artículo de investigación IV (Tabla IV.4, Pág. 216) se discuten ampliamente los resultados encontrados. Cabe destacar que CMPU no pudo ser cuantificado ya que, al inyectar 1500 μL de orina, coeluye con interferentes de matriz.

Los límites de detección variaron entre 1 ng mL^{-1} para Din y DiClAnil y 10 ng mL^{-1} para BPF, Cbl y TCPL con RSDs en el intervalo de 2.6 % para BPF a 8.9 % para Atz.

Las recuperaciones, obtenidas a partir de un calibrado *matrix-matched*, variaron entre $87\pm 10\%$ para ClAnil y $110\pm 10\%$ para Clt a un nivel de concentración de 20 ng mL^{-1} .

En la Figura IV.7 (Pág. 217) se muestra un cromatograma obtenido al inyectar 1500 μL de una muestra de orina dopada a un nivel de concentración de 20 ng mL^{-1} según el método RAM-LC-DAD desarrollado.

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN IV
Journal of Separation Science 33 (2010) 2240

Encarnación Rodríguez-Gonzalo
Diego García-Gómez
Eliseo Herrero-Hernández*
Rita Carabias-Martínez

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

Received March 27, 2010

Revised May 6, 2010

Accepted May 16, 2010

Research Article

Automated sample treatment with the injection of large sample volumes for the determination of contaminants and metabolites in urine

This work reports the development of a simple and automated method for the quantitative determination of several contaminants (triazine, phenylurea, and phenoxyacid herbicides; carbamate insecticides and industrial chemicals) and their metabolites in human urine with a simplified sample treatment. The method is based on the online coupling of an extraction column with RP LC separation–UV detection; this coupling enabled fast online cleanup of the urine samples, efficiently eliminating matrix components and providing appropriate selectivity for the determination of such compounds. The variables affecting the automated method were optimized: sorbent type, washing solvent and time, and the sample volume injected. The optimized sample treatment reported here allowed the direct injection of large volumes of urine (1500 µL) into the online system as a way to improve the sensitivity of the method; limits of detection in the 1–10 ng/mL range were achieved for an injected volume of 1500 µL of urine, precision being 10% or better at a concentration level of 20 ng/mL. The online configuration proposed has advantages such as automation (all the steps involved in the analysis – injection of the urine, sample cleanup, analyte enrichment, separation and detection – are carried out automatically) with high precision and sensitivity, reducing manual sample manipulation to freezing and sample filtration.

Keywords: Contaminants and metabolites / Human urine / Large volume injection / LC / Online sample treatment
DOI 10.1002/jssc.201000202

1 Introduction

Analytical methods for the analysis of contaminants are mainly based on chromatographic techniques. Although many methods have been reported for measuring pesticides and industrial chemicals in human matrices, most of them refer to a limited number of compounds or analytes belonging to the same chemical group [1]. There is a continual need for methods that assess exposure to emerging

pesticides, as well as for the multiresidue determination of contaminants of different chemical groups for application in occupational and environmental toxicology.

One of the main problems in multiresidue analysis of contaminants in real samples is the tediousness and complexity of the procedures required for the extraction, cleanup, and preconcentration of the matrix analytes [2]. This highlights the importance of, and indeed current interest in, the search for new procedures that will allow sample treatment to be simplified, with the collection of reliable results and also allowing automation. Most methods described in the literature for the determination of contaminants employ a combination of some extraction methods with organic solvents with one or several washing steps aimed at removing co-extractants before the samples are injected into the chromatographic system [3, 4]. Moreover, a preconcentration/evaporation step is usually carried out to increase the concentration and/or replace the solvent with one that is more compatible with the chromatographic system.

*Current address: Eliseo Herrero-Hernández, Institute of Natural Resources and Agrobiology (IRNASA-CSIC), 37008 Salamanca, Spain

Correspondence: Dr. Encarnación Rodríguez-Gonzalo, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, Universidad de Salamanca, 37008 Salamanca, Spain

E-mail: erg@usal.es

Fax: (+34) 923-294-574

Abbreviations: ADS, alkyl-diol-silica; Atz, atrazine; BPF, bisphenol-F; ClAnil, chloroaniline; Clt, chlortoluron; Cbl, carbaryl; CMPU, 3-chloro-4-methylphenylurea; DiClAnil, dichloroaniline; Din, diuron; LC-DAD, LC-diode array detector; 1NPL, naphthol; 2,4,5-T, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid; 2,4,5-TP, 2,4,5-trichlorophenoxypropionic acid; TCPL, trichlorophenol

Some of these steps can be combined and automated through coupling to the chromatographic system. Advances in the automation of pesticide analyses in biological samples focus on the cleanup procedure, which involves the separation of target analytes from a large number of interferents present in the matrix [5].

Sample treatment steps based on the use of restricted access materials were initially designed to remove proteins in the analysis of drugs in biological matrices; they allow online solid-liquid extraction and the enrichment of small molecules contained in the biofluid in question, limiting the access of macromolecules to the interaction sites by means of a porous membrane [6–8]. Souverain *et al.* [9] have reviewed a large number of applications for the purification of pharmaceutical and endogenous compounds in biological matrices such as serum, urine, saliva, milk, and tissues. The literature contains reports concerning phthalates [10], triazines [11], naphthols [12], organophosphorus compounds [13], bisphenol and octylphenol [14], together with many articles addressing drugs. However, to our knowledge no authors have applied these materials to the multiresidue analysis of compounds of very different chemical nature.

The determination of contaminants in biological matrices involves the measurement and assessment of compounds or their metabolites in fluids, tissues, secretions, exhaled air, or a combination of these as a method for evaluating exposure and health risks [15]. The determination of contaminants and their metabolites is often linked to the concentration of the internal dose and can be useful for the estimation of the integrated exposure by all routes [16, 17]. Choice of the biological matrix is determined by the nature of the contaminant of interest and its pharmacokinetics and also by the population characteristics. When attempting to analyse low-molecular weight compounds with possible toxic activity, urine is the most favorable candidate [18]; usually, metabolites are excreted in urine since they have half-lives of hours or days and are not bioaccumulated in tissues. Furthermore, their concentration in urine is much higher than in other matrices, and they can be detected over longer periods of time. All the foregoing, together with the fact that urine is very easy to obtain, means that it is the fluid of choice in this type of analysis [19].

In light of the above, here we were prompted to develop a method for the determination of contaminants and metabolites of known toxic activity and from different families and provenances. The aim of this work was to develop a simple, robust, and automated method for the determination of contaminants at trace levels in human urine, with minimum sample treatment and avoiding the use of sophisticated and/or expensive instrumentation. With this in mind, the work described here focuses on (i) the study and optimization of a sample treatment step coupled online to an LC-diode array detector (DAD) system, and (ii) the development of a procedure based on the injection of large sample volumes that can be applied directly to biological samples such as urine.

Thus, here we propose an online configuration that allows the direct injection of volumes of urine up to 1500 μL

into the in-line system, with no losses of resolution or deterioration of the chromatographic devices. In this way, a considerable improvement in sensitivity can be achieved. The contaminants and their respective metabolites used in the present study were as follows: (i) Pesticides, such as the 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) and 2,4,5-trichlorophenoxypropionic acid (2,4,5-TP) phenoxyacids, which are the herbicides globally most used domestically [20]; the carbamate carbaryl (Cbl), one of the most popular domestic insecticides throughout the world, and its metabolite 1-naphthol (1NPL) [21]; the phenylureas chlortoluron (Clt) and diuron (Din), designated as “priority hazardous substances” by the EU [22] and their metabolites 3-chloro-4-methylphenylurea (CMPU) [23], chloroaniline (ClAnil) and dichloroaniline (DiClAnil) [4] and the triazine atrazine (Atz), the second most widely used herbicide [20]. (ii) Contaminants of industrial origin, such as bisphenol F (BPF), which is widely used in the preparation of epoxy resins and polycarbonates [24], and trichlorophenol (TCPL), associated with the always dangerous dioxins [25], and the already mentioned 1NPL, a metabolite of polycyclic aromatic hydrocarbons [26].

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

Analytical standards were obtained from two different suppliers; seven contaminants were from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany): Atz, 6-chloro- N^2 -ethyl- N^4 -isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine, CAS RN [1912-24-9]; Cbl, 1-naphthyl- N -methylcarbamate, CAS RN [63-25-2]; DiClAnil, 3,4-DiClAnil, CAS RN [95-76-1]; Clt, 3-(3-chloro-4-methyl)-1,1-dimethylurea, CAS RN [15545-48-9]; CMPU, N -(3-chloro-4-methylphenyl)urea, CAS RN [13142-64-8]; Din, 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, CAS RN [330-54-1] and 1NPL, 1-hydroxynaphthalene, CAS RN [90-15-3]. Another five contaminants were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany): ClAnil, 4-ClAnil, CAS RN [106-47-8]; BPF, bis-(4-hydroxyphenyl)methane, CAS RN [620-92-8]; TCPL, 2,4,5-TCPL, CAS RN [95-95-4]; 2,4,5-T, CAS RN [93-76-5]; and 2,4,5-TP, CAS RN [93-72-1].

The organic solvents – ACN and methanol – were of HPLC grade from Merck (Darmstadt, Germany) and were used as received. Ultra high-quality water was obtained with an Elgastat UHQ water purification system.

All the chemicals used for the preparation of the buffer and all the other chemicals were of analytical reagent grade.

2.2 Sample collection

Urine samples collected from four healthy volunteers were used for developing the method and the preparation of the calibration standards. Urine samples were collected in 250-mL brown glass bottles and frozen immediately until analysis. Before use, the urine samples were thawed at

room temperature and spiked daily with diluted standard solutions. Samples were filtered through 0.45 μm CAMEO filters to remove the precipitated proteins. Creatinine was determined to normalize the results for concentration and rule out overdiluted or overconcentrated samples; values from 877 to 1268 mg/L were obtained. All urine samples were first analyzed with the proposed method to check the natural occurrence of the target compounds. No signal corresponding to the target analytes was found, and hence spiked urine samples were used.

2.3 Instrumentation

LC-DAD was performed on a HP 1100 Series chromatograph from Hewlett Packard (Waldbronn, Germany) equipped with a binary pump, an additional isocratic pump, a membrane degasser, an autosampler (equipped with a 1500- μL capillary seat), a six-port valve and a DAD. The system was controlled by a HP ChemStation, which also performed data collection from the DAD and quantitative measurements. The extraction columns used were alkyl-diol-silica (ADS), restricted access materials LiChroCART 25-4LiChrospher RP4 ADS, RP8 ADS, and RP18 ADS (25 μm , 25 mm \times 4 mm) from Merck. The separation

column used was a 150 \times 4.60 mm Luna PFP(2) packed with 3- μm particles (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The DAD was set at 214 and 244 nm. The spectra were recorded in the 190–400 nm range. Full-scan UV detection fulfills the performance criteria set by 2002/657/EC. These criteria are based on the comparison of the sample and calibration spectra. The absorption maxima in the spectrum of the analyte will be at the same wavelengths as those of the calibration standard within a ± 2 -nm margin. The spectrum of the analyte above 220 nm will, for those parts of the two spectra with a relative absorbance $\geq 10\%$, not be visibly different from the spectrum of the calibration standard.

The mobile phase of the isocratic pump consisted of 2.5 mM ammonium formate buffer (pH 2.9) with 10% ACN. The mobile phase of the binary pump consisted of a 2.5 mM ammonium formate buffer, pH 3.5 (solvent A), and ACN (solvent B) gradient. The analytical column was thermostated at 25°C.

2.4 Online sample preparation and LC separation

The experimental setup for online configuration is shown in Fig. 1 and the schedule for cleanup, enrichment, and analysis is shown in Table 1. First, after the injection of the

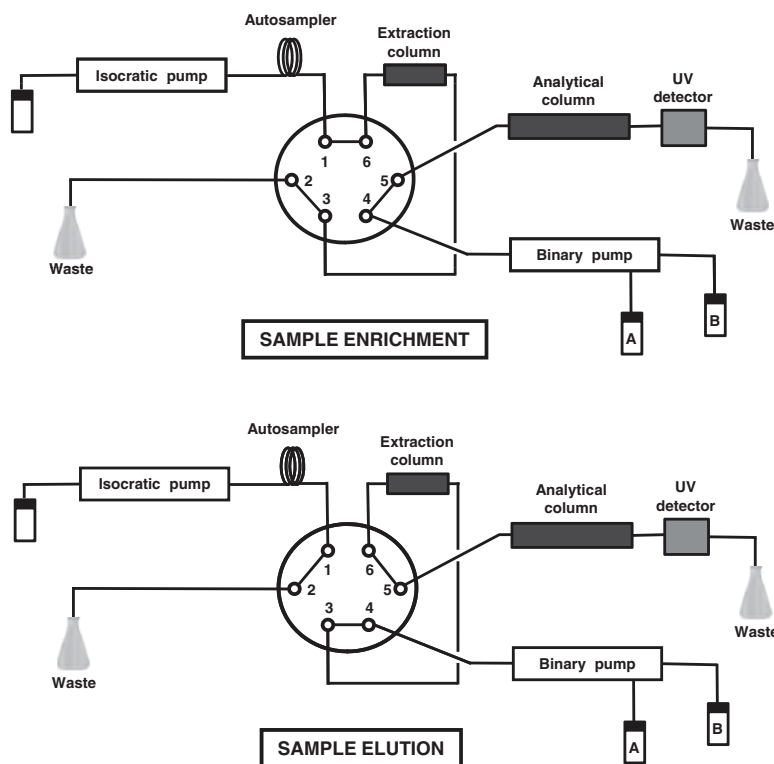


Figure 1. Schematic diagrams of the proposed online method.

Table 1. Chromatographic conditions of online proposed method

Time (min)	Isocratic pump ^{a)} flow (mL/min)	Binary pump ^{b,c)} (% A)	Six-port valve position	Event
0–10	1	85	Enrichment	Sample charging
10–11	1→0.3	85	Elution	Analyte transfer
11–12	0.3	85→65	Elution	Analyte separation
12–19	0.3	65	Elution	Analyte separation
19–30	0.3	65→45	Elution	Analyte separation
30–35	0.3	45→0	Elution	Analyte separation
35–37	0.3	0	Elution	Analyte separation
37–39	0.3→1	0→85	Elution	Equilibrating
39–42	1	85	Enrichment	Equilibrating

a) Mobile phase: ammonium formate buffer 2.5 mM (pH = 2.9) with 10% ACN.

b) Flow: 1 mL/min.

c) Mobile phase: (solvent A) ammonium formate buffer 2.5 mM (pH = 3.4), (solvent B) ACN.

urine (up to 1.5 mL) by the autosampler, the isocratic pump was run 10 min at 1 mL/min with the valve in “enrichment” mode. While the matrix components of the urine were being washed to the waste, the analytes studied were withheld in the extraction column. At 10 min, the valve was changed to “elution” mode and a gradient (binary pump), shown in Table 1, with a flow rate of 1 mL/min eluted the analytes in backflush mode to the column, where they were separated and finally detected by the DAD. The isocratic pump changed the flow rate to 0.3 mL/min to avoid wasting solvent. At 37 min, the separation was terminated and the gradient was returned to the initial conditions. The flow rate of the isocratic pump was changed to 1 mL/min. At 39 min, the valve was switched to “enrichment” mode and equilibrated for 3 min. Then, at 42 min, the system was ready for the next injection.

For offline SPE experiments, commercial OASIS HLB 60 mg cartridges from Waters System (Milford, MA, USA) were conditioned with 3 mL of ACN and then with 3 mL of UHQ water. Following this, 400 µL of urine was loaded, including a cleanup step with 10 mL of water containing 5% of ACN, once the sample had been passed. The Oasis HLB cartridges were easily fouled, admitting the passage of 400 µL but not much more, which to a large extent limits the preconcentration of the analytes. After loading the sample a slight vacuum was applied. Analytes were eluted with 3 mL of ACN. The extracts were evaporated to complete dryness in a nitrogen stream and reconstituted in 400 µL of UHQ water for further analysis.

2.5 Standard preparation and calibration procedure

The initial stock solutions for the standards were prepared by dissolving 12.5 mg of each analyte in 25 mL of ACN (500 µg/mL). These stock solutions were stored at 4°C in brown glass bottles. For a 100-µL injection, calibration standards were prepared in a range from 250 to 500 ng/mL. In the case of 1500-µL injection, standards between 10 and 200 ng/mL were prepared. Before analysis, the standards were filtered with a

Cameo (0.45 µm Nylon) filter. Calibration curves were obtained by plotting the peak areas of the analytes *versus* the concentration using matrix-matched samples.

The stability of these stock solutions was ensured by controlling the storage conditions (temperature, humidity, absence of light) of the analytes, keeping them in the range in which stability is guaranteed by the manufacturer. Moreover, a standard solution was injected each week with a view to controlling the intensity of the signals obtained.

Spiked urine standards were prepared daily by spiking urine with the appropriate amounts of each analyte.

2.6 Stability of the online procedure

Throughout the work, the pressure of the LC system was controlled, both that of the isocratic pump connected to the extraction column and that of the binary pump connected to the analytical column. Control of the pressure of both pumps, together with the background noise and the shape of the peaks obtained, allowed the proper functioning of the system to be checked.

Along this work, two extraction columns were employed, of which the one that lasted the shortest time supported 110 injections of urine, corresponding to a total volume of 92.2 mL. As an indication, replacement of the extraction column should be carried out when the pressure of the LC system is excessively high with respect to the usual values or when the intensity of the signal and the shape of the peaks so indicate.

3 Results and discussion

The analysis of urine samples with methods based on LC that include an extraction–preconcentration step normally requires a cleanup step to eliminate as many of the compounds as possible present in the urine that would hinder the analysis and would shorten the useful life of the chromatographic columns. Figure 2 shows the chromatograms corresponding

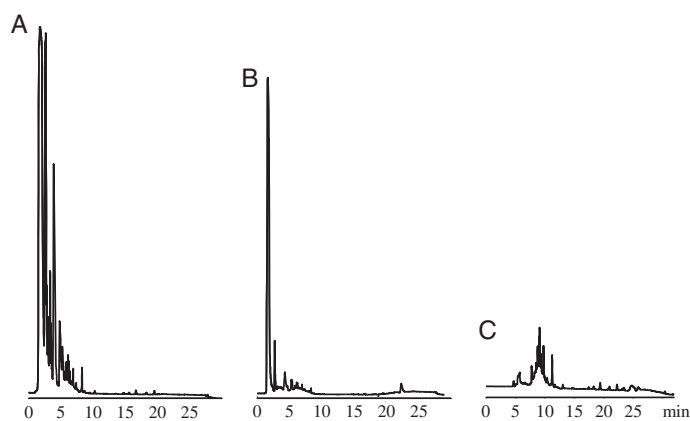


Figure 2. Comparison of different sample cleanup procedures for an unspiked urine sample: (A) injected directly into the LC-DAD system, (B) after offline cleanup with Oasis HLB cartridges, and (C) after online cleanup with a C4-ADS extraction column. Sample volume injected: 100 μ L. Y-axis at the same scale.

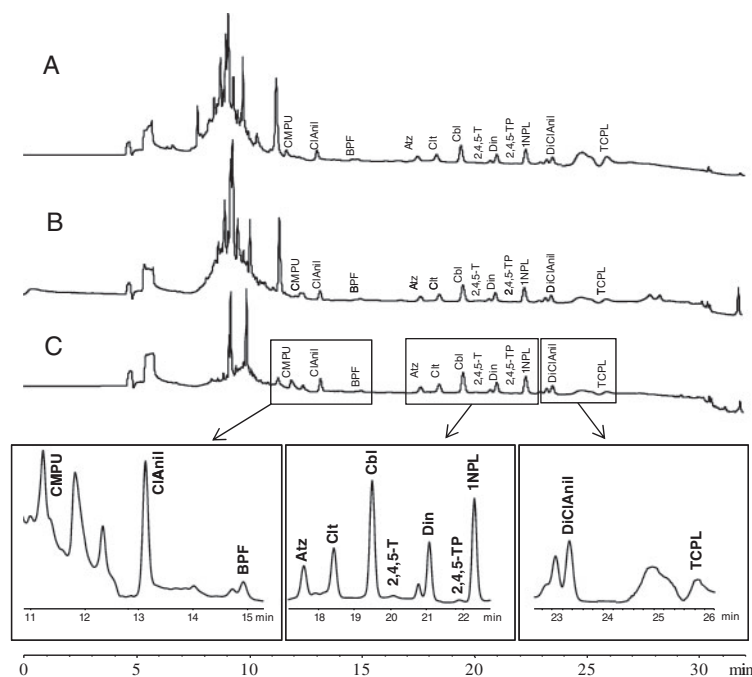


Figure 3. Chromatograms of a urine sample spiked with 400 ng/mL using sorbents with alkyl chains of different lengths: (A) C18, (B) C8, (C) C4. Sample volume injected: 100 μ L. (A–C) Y-axis at the same scale.

to urine samples injected directly into the LC-DAD system (Fig. 2A) or subjected to extraction and cleanup through a conventional cartridge Oasis HLB (Fig. 2B), or through a column containing a restricted access material (C4 ADS type) with a time of 3 min for washing it (Fig. 2C). As may be seen, in the urine sample injected directly into the LC-DAD system many peaks were observed, corresponding to impurities present in the urine. These peaks decreased in number when an extraction and cleanup step through Oasis HLB was

introduced, and even more so when the cleanup was performed through the extraction column with the restricted access material. Peaks before 10 min, although not relevant for the determination of analytes, are relevant for the analytical method. Thus, the use of Oasis HLB would elicit the entry of a large front of interferences into the column, which would strongly affect its life.

It should also be taken into account that it is necessary to use an Oasis HLB cartridge for each sample since they

collapse rapidly (Section 2.4), whereas restricted access materials allow the injection of a large number of samples [27]. Accordingly, the use of the restricted access materials seems to be more favorable than that employing offline Oasis HLB cartridges.

3.1 Selection of the material used as sorbent in the extraction column

A study was made of the effect of the type of ADS restricted access material used, for which materials with different lengths of the alkyl chain were assayed: C4, C8, and C18. Figure 3 shows the chromatograms corresponding to the injection of 100- μ L urine samples spiked with 400 ng/mL of each of the analytes studied. The isocratic pump was used for loading and washing the extraction column, with a 2.5 mM ammonium formate buffer, pH 2.9, with 5% of ACN as the mobile phase and a washing time of 3 min. As may be observed, cleaner chromatograms were obtained as the chain length of the sorbent decreased, with no appreciable decrease in the peaks corresponding to the analytes studied. It was decided to use the C4 sorbent for later studies.

3.2 Online sample cleanup and preconcentration of urine samples (small volume, 100 μ L)

Once the most suitable sorbent for the target analytes had been selected, we studied different factors that might improve the cleaning of the sample, eliminating possible interferents and thus enabling the identification of the different analytes, since an efficient washing step is also important for preserving the instrumental system and lengthening the column life.

3.2.1 Optimization of the washing step. Evaluation of matrix effects

The process of washing the extraction column is affected by two main factors: the solvent used and the washing time. The mobile phase impelled by the isocratic pump acts as a washing solvent and at the same time transports the sample

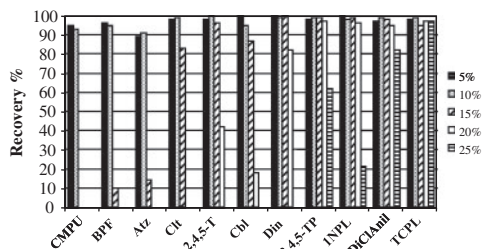


Figure 4. Recoveries as a function of the percentage of ACN in the mobile phase used as washing solvent (isocratic pump).

through the extraction column. The composition of the mobile phase is therefore a decisive factor for achieving an efficient washing of the sample matrix with no elimination of the compounds of interest. As the proportion of organic component in this solution increases, the washing effect also increases, although so does the possibility of removing the target compounds. To optimize the composition of the mobile phase, ammonium formate buffer (pH 2.9)–ACN mixtures were assayed and the content in ACN was modified from 5 to 25%. The results (Fig. 4) revealed that the more polar analytes (CMPU, BPF, Atz) were not retained in the extraction column, or only sparingly so, when the ACN content surpassed 10%. For the rest of the analytes no losses were observed and percentages of ACN of 15% could be used, maintaining recoveries above 80%. In the later studies, for the washing solution it was decided to use one with a composition of 2.5 mM ammonium formate buffer (pH 2.9)–10% ACN, since this was the one offering the best cleaning without producing appreciable losses of the more polar analytes.

Another parameter to be controlled was the washing time that is the time during which the previously optimized washing solvent is circulating through the extraction column. This period comprises the time that elapses since sample introduction to the change in position of the injection valve. Four analyses were made modifying the washing time between 3 and 15 min. There were no large differences in the chromatograms obtained, apart from the consequent increase in the analysis time such that it was decided to use a 3 min washing time.

Once the parameters that might affect the sample treatment step had been established, a study was made of the influence of the concentration of the target compounds. The calibration curves obtained for all the analytes exhibited linearity throughout the range studied.

The matrix effect was studied by comparing the slopes, using linear regression analysis, obtained from aqueous

Table 2. Recoveries and precisions of online cleanup step injecting 100 μ L of a urine sample spiked with 400 ng/mL

	LOD ^{a)} (ng/mL)	Recovery (%)	RSD ^{b)} (%)
CMPU	76	100	8
ClAnil	20	85	2
BPF	80	91	3
Atz	34	93	6
Cit	31	99	4
Cbl	51	97	5
2,4,5-T	23	91	7
Din	15	97	7
2,4,5-TP	44	93	9
1NPL	53	89	4
DiClAnil	31	97	7
TCPL	48	86	9

a) Limit of detection for a signal-to-noise ratio of 3.

b) RSD: $n = 6$.

standards and matrix-matched calibration graphs obtained by using spiked urine samples. A paired *t*-test was applied and the *p* values (probability that the slopes in the aqueous standards were not significantly higher than slopes in spiked urine) obtained were less than 0.05 in all cases, which points at the existence of a matrix effect. As a consequence, the matrix-matched calibration procedure is recommended for quantification purposes.

The limits of detection (Table 2), determined for a signal-to-noise ratio of 3, varied between 15 ng/mL for Din, and 80 ng/mL for BPF. Recovery values obtained by injecting 100 μ L of urine are also shown in Table 2. The recoveries for each analyte were calculated by comparing the concentration obtained from the matrix-matched calibration lines and the real value of the concentration used to spike the sample. Precision was studied by analyzing 8 replicates of a urine sample spiked with 400 ng/mL, in all cases RSD values lower than 10% were obtained (Table 2).

3.3 Influence of the volume of sample injected

The studies performed up to this point involved the injection of a sample volume of 100 μ L. A study was made of the possibility of injecting larger volumes, which would allow the sensitivity to be increased, thereby improving the limits of detection. Accordingly, the system was modified by installing a capillary seat that would allow sample volumes of up to 1500 μ L to be injected. Figure 5 shows the variation in peak areas for three of the analytes studied upon injecting volumes of 400, 750, 1000, and 1500 μ L. It may be seen that in all cases there was a linear relationship between the signal and the volume injected. Additionally, upon comparing the chromatographic areas obtained on injecting samples of 100 μ L spiked with 1500 ng/mL with those obtained upon injecting samples of 1500 μ L spiked with 100 ng/mL (*i.e.* the amount of sample injected was the same), no significant differences were observed in the signals of the different analytes (Table 3). It may also be seen that the signal corresponding to the urine samples was

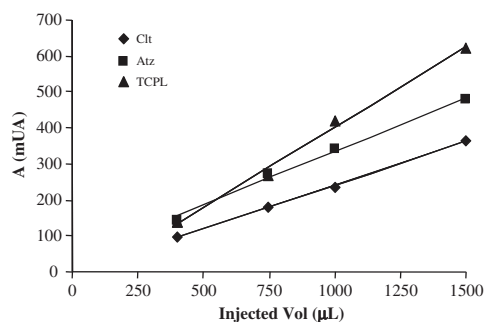


Figure 5. Influence of the volume of urine injected into the online system.

slightly lower than that achieved with the aqueous samples due to matrix effect, this effect being smaller for medium polarity analytes. This points to the need to perform quantification using matrix-matched samples.

3.4 Online sample cleanup and preconcentration for urine sample volumes of 1500 μ L

In view of the linear relationship between the signal and volume injected, it was decided to inject the maximum volume accepted by the device (1500 μ L) to improve the sensitivity of the method.

First, it was ascertained whether for these volumes of urine the efficiency of the previously optimized washing step of the extraction column would be maintained. Since previously it had been observed that for proportions of ACN higher than 10% no retention of the more polar analytes occurred, it was decided to use this same solvent: ammonium formate buffer (pH 2.9), plus 10% ACN. However, the washing times required another optimization owing to the important increase in the amount of urine injected. Figure 6 shows the effect of applying washing times of 3 min (Fig. 6A), 5 min (Fig. 6B) and 10 min (Fig. 6C), injecting a volume of unspiked urine of 1500 μ L. Large differences can be seen in the efficiency of the washing process, which was notably improved with the increase in time (Fig. 6C), although it also increased the analysis time. To work with these sample volumes (1500 μ L), a washing time of 10 min was chosen because correct washing allows the useful life of the column to be prolonged and facilitates the identification of the different analytes in question.

Table 3. Comparison of areas, in UHQ and urine matrix, of a sample spiked with 100 ng/mL injecting 1500 μ L and a sample spiked with 1500 ng/mL injecting 100 μ L

Analyte	UHQ		Urine	
	1500 μ L of 100 ng/mL	100 μ L of 1500 ng/mL	1500 μ L of 100 ng/mL	100 μ L of 1500 ng/mL
CMPU	361.4	350.9	— ^{a)}	267.6
ClAnil	585.8	592.5	292.2	287.5
BPF	286.8	290.7	158.1	157.2
Atz	467.1	434.5	391.7	433.3
Cit	323.4	318.4	291.3	235.5
Cbl	1186	1158	915.1	910.0
2,4,5-T	550.8	566.6	391.9	355.4
Din	334.1	330.6	277.3	257.0
2,4,5-TP	601.5	591.6	517.7	518.4
1NPL	1136	1109	600.5	580.2
DiClAnil	348.1	347.8	234.2	287.5
TCPL	59.8	52.2	47.5	48.3

a) Concentration below limit of quantification.

3.5 Analytical characteristics of the proposed method injecting 1500 μL of urine

Once the different parameters of the method developed had been optimized and selected – choice of sorbent (an ADS restricted access material, C4-type), injection volume (1500 μL), washing solvent (10% ACN), and washing time (10 min) – we evaluated the spiking of the samples because this is performed after freezing and must be compared with the samples spiked before freezing, in the sense that this latter situation would correspond to a real contaminated sample.

Two urine samples spiked at 100 ng/mL were prepared and subjected to freezing before and after spiking, respectively. The signal of each of the analytes was

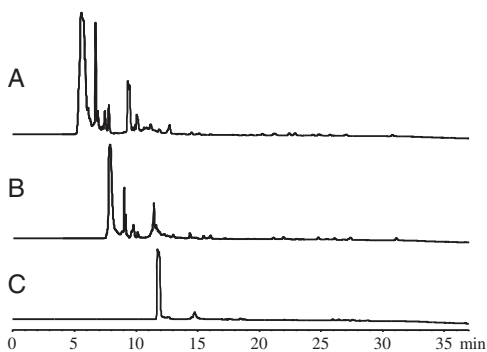


Figure 6. Influence of the washing time in the chromatograms of an unspiked urine sample: (A) 3 min, (B) 5 min, and (C) 10 min. Sample volume injected: 1500 μL . Y-axis at the same scale.

analyzed, and it was concluded that there were no significant differences in any case, such that it can be affirmed that spiking before or after freezing does not affect the results of the method.

We also studied the relationship between the analytical signal and the concentration of each of the compounds studied. For all the analytes assayed, linear relationships were observed between the peak areas and the concentrations within the range studied: 10–200 ng/mL. Table 4 shows the analytical characteristics of the method applied. The limits of detection, determined for a signal-to-noise ratio of 3, varied between 1 ng/mL for Din and DiClAnil, and 10 ng/mL for BPF, Cbl and TCPL improving one order of magnitude from the 100- μL injection results. These limits can be compared with those obtained by LC-MS/MS methods [28]. In both cases, limits in the low ng/mL level have been achieved. For CMPU, the most polar compound, the limit of detection determined was higher (50 ng/mL) owing to the strong matrix signal obtained from 12 to 19 min, as can be seen in Fig. 7. For this reason the method developed would not be appropriate for the determination of CMPU and other more polar analytes. The limits of quantification, determined for a signal-to-noise ratio of 10, ranged from 3 ng/mL for Din and DiClAnil to 20 ng/mL for Cbl and TCPL.

The RSD was determined by analyzing low (20 ng/mL) and medium concentrations (100 ng/mL) of spiked urine samples ($n = 6$). Intraday precision for low concentration was in the range 2.6–8.9% for BPF and Atz, respectively (Table 4).

Figure 7 shows a chromatogram corresponding to the injection of 1500 μL of urine spiked at a concentration level of 20 ng/mL. The interday precision, at this level, was also determined by analyzing injections (8 each day) carried out

Table 4. Analytical characteristics of online proposed method obtained by the analysis of spiked urine samples. Injection volume: 1500 μL

Analyte	λ (nm)	Intercept (MAU)	Slope (MAU/ng/mL)	r^2	LOD ^{a)} (ng/mL)	LOQ ^{b)} (ng/mL)	RSD ^{c)} (%)	
							20 ng/mL	100 ng/mL
ClAnil ^{d)}	214	-2 ± 12	2.9 ± 0.1	0.998	3	10	5.4	3.2
BPF ^{e)}	214	0 ± 30	1.8 ± 0.3	0.995	10	19	2.6	3.9
Atz ^{d)}	214	-3 ± 22	3.9 ± 0.2	0.996	4	13	8.9	7.6
Clt ^{d)}	244	-11 ± 20	2.7 ± 0.2	0.997	7	19	7.1	7.1
Cbl ^{e)}	214	-32 ± 120	11 ± 1	0.996	10	20	7.7	2.7
2,4,5-T ^{e)}	214	21 ± 36	2.2 ± 0.3	0.995	9	19	6.1	6.1
Din ^{d)}	244	7 ± 10	2.7 ± 0.1	0.998	1	3	3.4	2.5
2,4,5-TP ^{d)}	214	-9 ± 33	5.0 ± 0.3	0.996	3	11	4.8	3.0
1NPL ^{d)}	214	-46 ± 20	6.3 ± 0.2	0.999	4	13	3.6	4.5
DiClAnil ^{d)}	244	-6 ± 13	2.3 ± 0.1	0.997	1	3	4.5	9.6
TCPL ^{e)}	214	-25 ± 46	4.5 ± 0.4	0.995	10	20	5.5	8.5

a) Limit of detection for a signal-to-noise ratio of 3.

b) Limit of quantification for a signal-to-noise ratio of 10.

c) RSD (intraday, $n = 6$).

d) Concentration range: 10–200 ng/mL.

e) Concentration range: 40–200 ng/mL.

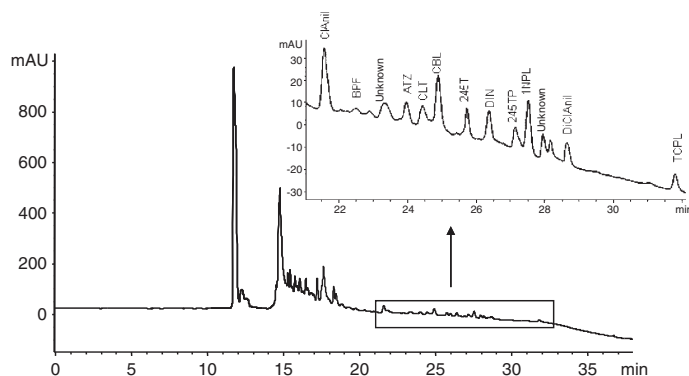


Figure 7. Chromatogram obtained in the analysis of a urine sample spiked at 20 ng/mL. Sample volume injected: 1500 μ L.

over three consecutive days which was in the range from 7.2% for BPF to 14.3% for TCPL.

As no reference materials are available, recovery studies were carried out to validate the accuracy of the proposed method [29]. Urine samples that had not been used previously in the method were analyzed. These samples were spiked at two levels: 20 and 100 ng/mL. The signal obtained for each of the analytes was introduced into the corresponding matrix-matched calibration line. In the case of urine spiked with 100 ng/mL, the recoveries varied between $90 \pm 5\%$ for TCPL and $104 \pm 7\%$ for Cbl. For the urine spiked with 20 ng/mL, they varied between $87 \pm 10\%$ for ClAnil and $107 \pm 12\%$ for Clt. In all cases, satisfactory recoveries were obtained.

4 Concluding remarks

The analytical methodology proposed here allows the detection and quantification of contaminants with different chemical structures and provenances (different pesticides, metabolites, and industrial products) in urine. The online configuration developed means that manual sample manipulation is minimum (freezing and filtration); this has a positive effect on precision and affords a shorter analysis time. Additionally, the development of a procedure based on the injection of large sample volumes (up to 1500 μ L) allowed limits of detection at the low ng/mL level to be achieved.

The method described here is a suitable (rapid, reliable, and accessible) tool for the determination of these compounds in a short time, with good sensitivity. According to 2002/657/EC Decision, this LC-full scan DAD methodology can be used as a suitable confirmatory method for organic residues or contaminants. The method is therefore appropriate for its application within the context of the biological monitoring of contaminants.

This work was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain (Project CTQ 2008-02200/BQU) and Junta de Castilla y León (Grupo de Excelencia GR-65). Diego

García-Gómez gratefully acknowledges financial assistance from a Formación de Profesorado Universitario (FPU) grant of the Ministerio de Educación.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Aprea, C., Colosio, C., Mammone, T., Monoia, C., Maroni, M., *J. Chromatogr. B* 2002, **769**, 191–219.
- [2] Norrgran, J., Bravo, R., Bishop, A. M., Restrepo, P., Whitehead, R. D., Needham, L. L., Barr, D. B., *J. Chromatogr. B* 2006, **830**, 185–195.
- [3] Zao, R. S., Wang, X., Yuan, J. P., Wang, X. D., *J. Sep. Sci.* 2009, **32**, 630–636.
- [4] Baker, S. E., Olsson, O., Needham, L. L., Barr, D. B., *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, **383**, 963–976.
- [5] Chalányová, M., Hutta, M., Pagác, M., *J. Sep. Sci.* 2010, **33**, 133–142.
- [6] Kanda, T., Kutsuna, H., Ohtsu, Y., Yamaguchi, M., *J. Chromatogr. A* 1994, **672**, 51–57.
- [7] Sadílek, P., Satinsky, D., Solich, P., *Trends Anal. Chem.* 2007, **26**, 375–384.
- [8] Machtejevas, E., Marko-Varga, G., Lindberg, C., Lubda, D., Hendriks, R., Unger, K. K., *J. Sep. Sci.* 2009, **32**, 2223–2232.
- [9] Souverain, S., Rudaz, S., Veuthey, J. L., *J. Chromatogr. B* 2004, **801**, 141–156.
- [10] Preuss, R., Koch, H. M., Angerer, J., *J. Chromatogr. B* 2005, **816**, 269–280.
- [11] Sambe, H., Hoshina, K., Haginaka, J., *J. Chromatogr. A* 2007, **1152**, 130–137.
- [12] Preuss, R., Koch, H. M., Angerer, J., *J. Chromatogr. B* 2004, **801**, 307–316.
- [13] Amini, N., Crescenzi, C., *J. Chromatogr. B* 2003, **795**, 245–256.
- [14] Liu, M., Hashi, Y., Pan, F., Yao, J., Song, G., Lin, J. M., *J. Chromatogr. A* 2006, **1133**, 142–148.

- [15] Zielhuis, R. L., *Am. J. Ind. Med.* 1985, 8, 515–516.
- [16] WHO, *Environmental Health Criteria 222*, World Health Organization 2001, Geneva.
- [17] Angerer, J., Ewers, U., Wilhelm, M., *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2007, 210, 201–228.
- [18] Petersen, G. O., Leite, C. E., Chatkin, J. M., Thiesen, F. V., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 516–521.
- [19] Barr, D. B., Barr, J. R., Maggio, V. L., Whitehead Jr, R. D., Sadowski, M. A., Whyatt, R. M., Needham, L. L., *J. Chromatogr. B* 2002, 778, 99–111.
- [20] Kiely, T., Donaldson, D., Grube, A., *Pesticide Industry Sales and Usage 2000 and 2001 Market Estimates*, US Environmental Protection Agency, 2004.
- [21] WHO, *Environmental Health Criteria 153 Carbaryl*, World Health Organization 1994, Geneva.
- [22] European Commission, *Decision 2455/2001/CE*, European Union 2001 Brussels.
- [23] Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Revilla-Ruiz, P., Domínguez-Álvarez, J., *J. Chromatogr. A* 2003, 990, 291–302.
- [24] Jana, S. K., Okamoto, T., Kugita, T., Namba, S., *Appl. Catal. A* 2005, 288, 80–85.
- [25] Collins, J. J., Bodner, K., Haidar, S., Wilken, M., Burns, C. J., Lamparski, L. L., Budinsky, R. A., Martin, G. D., Carson, M. L., *Chemosphere* 2008, 73, S284–S289.
- [26] Barr, D. B., Needham, L. L., *J. Chromatogr. B* 2002, 778, 5–29.
- [27] Baeyens, W. R. G., Van Der Weken, G., Haustraete, J., Aboul-Enein, H. Y., Corveleyn, J. P., Remon, J. P., García-Campaña, A. M., Deprez, P., *J. Chromatogr. A* 2000, 871, 153–161.
- [28] Rodríguez-Gonzalo, E., García-Gómez, D., Carabias-Martínez, R., *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 40–48.
- [29] European Commission, *Decision 657/2002/EC*, *Off. J. Eur. Commun. L* 221/8 (2002).

5.A.4. Determinación cromatográfica de biomarcadores de exposición en orina: RAM-RPLC-MS/MS (IT)

5.A.4.1. Optimización de los parámetros de la trampa iónica

La trampa iónica requiere la optimización de ciertos parámetros instrumentales, para poder así maximizar la señal de los analitos, lo que redundaría en una mayor sensibilidad instrumental. Pueden distinguirse dos grandes grupos de factores a optimizar: por una parte, los parámetros generales de la trampa iónica y, por otra, los parámetros dependientes de cada analito particular y que están principalmente relacionados con la etapa de fragmentación.

Los parámetros generales a optimizar están en gran parte ligados a la correcta formación del spray en la fuente de ionización. Dado que ésta depende principalmente del flujo de fase móvil, que viene impuesto por la separación cromatográfica, la posible variación de dichos parámetros está muy restringida. Por lo tanto, se tomaron como parámetros óptimos los tabulados por el fabricante para un flujo de fase móvil de 0.8 mL min^{-1} . Así, los parámetros fijados fueron:

- Voltaje del capilar: 3500 V
- Flujo de gas de secado (N_2): 10 L min^{-1}
- Temperatura de gas de secado (N_2): 350°C
- Presión de nebulización: 50 psi

Otros parámetros generales que deben ser fijados son el intervalo de masas de barrido, el tiempo máximo de acumulación, el máximo de iones en la trampa (*smart target*) y el ancho de la ventana de aislamiento.

Para el barrido de masas se seleccionó un intervalo de 60 u a 400 u acorde con los analitos de bajo peso molecular estudiados. El tiempo máximo de acumulación y el *smart target* se fijaron en los valores habituales en espectrometría de masas de 200 ms y de 50000 a 100000 iones. El ancho de la ventana de aislamiento se fijó en 4 u, valor óptimo cuando se busca maximizar la sensibilidad.

Además de los parámetros generales es necesario optimizar una serie de factores que dependen de la naturaleza propia de cada analito.

Para ello se instaló una unión T en el sistema de manera que en la fuente de ionización confluyeron dos caudales: uno de fase móvil a 0.8 mL min^{-1} , proveniente del cromatógrafo y otro de una disolución estándar ($5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) del analito a estudiar, a 1 mL h^{-1} inyectado a través de una jeringa manual. Bajo esta configuración se optimizaron los siguientes factores:

- *Polaridad del ESI:* La fuente de ionización permite trabajar en modo positivo o negativo lo que conlleva la conducción al analizador de masas de cationes o aniones, respectivamente. Puede determinarse la polaridad óptima de antemano puesto que los analitos ácidos tienden a formar aniones y los básicos cationes. Sin embargo, este hecho debe ser verificado experimentalmente puesto que no puede descartarse la formación de especies protonadas en medio básico o de especies desprotonadas en medio ácido.
- *Fragmentación en la trampa:* Para cada analito, se seleccionó el ion más abundante que se tomó como ion precursor en la fragmentación. La energía a transmitir a dicho ion para fragmentarlo se determinó como la amplitud (en voltios) que produjo la fragmentación de un 90 % del ion, manteniéndose, en la medida de lo posible, una señal para el ion precursor de aproximadamente un 10 % de la original. El primer ion de fragmentación más abundante se seleccionó como ion producto para la transición de identificación y el segundo más abundante como ion producto para la transición de confirmación.
- *Ventanas de detección:* El proceso de detección de un analito en la trampa iónica requiere el aislamiento del ion precursor, su fragmentación y el posterior aislamiento del ion producto, lo que conlleva un tiempo no despreciable. Si se prefijan de este modo demasiados analitos existe el riesgo de obtener pocas señales por cada pico cromatográfico, lo que conduce a la obtención de picos de forma muy poco definida, imposibilitando la cuantificación. Este problema puede solucionarse trabajando con analizadores de masas ultrarrápidos o utilizando la estrategia de las ventanas prefijadas. Una vez conocidos los tiempos de retención cromatográficos, se fijaron las correspondientes ventanas,

tomando como criterio la presencia del menor número posible de analitos por ventana, siempre que la separación entre los picos cromatográficos fuera lo suficientemente clara como para establecer una línea divisoria.

En la Tabla V.1 (Pág. 233) se muestran los parámetros optimizados para cada analito. Cabe destacar que ClAnil, Atz, Cbl, 1NPL y DiClAnil no presentaron ninguna transición satisfactoria debido, principalmente, a la pobre fragmentación que mostraron estos compuestos en la trampa iónica.

5.A.4.2. Optimización de la separación cromatográfica

Las condiciones de trabajo encontradas en el método desarrollado con detección con barrera de diodos (RAM-LC-DAD) no pueden ser trasladadas directamente a un nuevo método con detección con espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Se optimizó un gradiente de separación más compatible con la detección por espectrometría de masas para lo cual se sustituyó, como fase orgánica, el acetonitrilo por el metanol ya que la mezcla acuorgánica agua/metanol muestra mayor compatibilidad con el detector²⁰². También se eliminó totalmente el tampón, ya que la presencia de sales influye negativamente en la ionización de algunos analitos en el ESI²⁰³. Adicionalmente, se redujo el flujo cromatográfico de fase móvil desde 1.0 mL min⁻¹ a 0.8 mL min⁻¹, debido principalmente a las altas presiones que producen las mezclas agua/metanol y que podrían superar el límite máximo recomendado para la columna (245 bar). La reducción del flujo también resulta positiva para la ionización ya que el electrospray se produce de forma más eficiente, tanto por ser menor el flujo, como por la necesidad de aumentar el porcentaje de fase orgánica en el gradiente para obtener tiempos de análisis no demasiado altos. El gradiente así optimizado varía desde un 30 % hasta un 100 % de fase orgánica con un tiempo total de análisis de 28 minutos. En la Figura 5.3 se muestran el cromatograma obtenido a 214 nm para una mezcla patrón de los analitos para los que se

²⁰² F. Straub, R.D. Voyksner, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 4 (1993) 578. "Negative ion formation in electrospray mass spectrometry"

²⁰³ L. Wörmer, J.S. Lipp, J.M. Schröder, K.U. Hinrichs, Org. Geochem. 59 (2013) 10. "Application of two new LC-ESI-MS methods for improved detection of intact polar lipids (IPLs) in environmental samples"

encontró al menos una transición satisfactoria con el método RAM-RPLC-MS/MS (8 de los 13 biomarcadores), inyectados en agua ultrapura a una concentración de 500 ng mL⁻¹. Se observa un importante descenso en los tiempos de retención para el 245T y el 245TP si se comparan con los obtenidos en el trabajo anterior utilizando una fase móvil con un gradiente de ACN y un tampón formado por ácido fórmico / formiato amónico 2.5 mM de pH 3.5. Este comportamiento es debido a que en el medio sin tamponar estos analitos están presentes como especies cargadas.

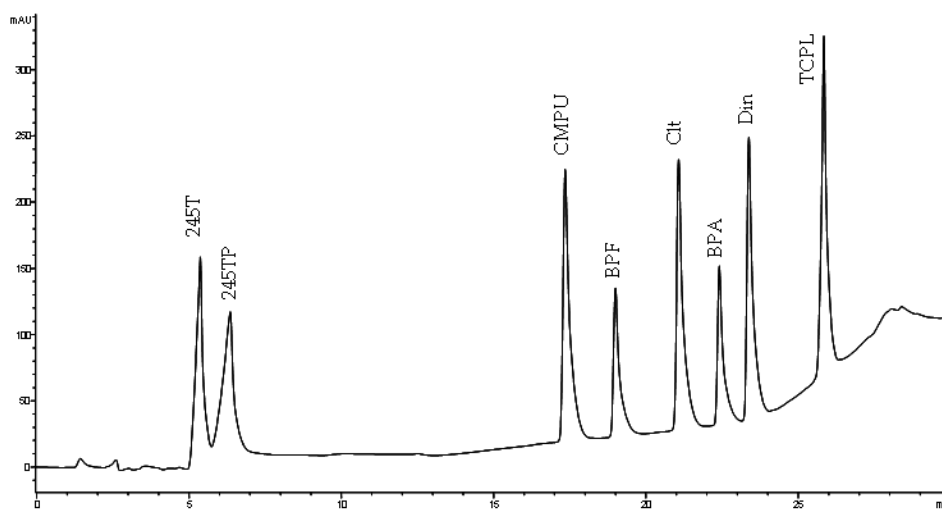


Figura 5.3. Cromatograma LC-DAD correspondiente a una mezcla patrón de 500 ng mL⁻¹ obtenido con el gradiente de agua ultrapura sin tamponar y metanol. Detección con barrera de diodos (DAD), 214 nm

5.A.4.3. Influencia del volumen de inyección

En el método RAM-LC-DAD desarrollado se encontró que trabajando con un volumen de inyección de 1500 µL de orina se produce la preconcentración de los analitos en el RAM y se logra una mayor sensibilidad. Dicho volumen ha de ser nuevamente optimizado cuando se trabaja con detección de MS/MS puesto que existe la posibilidad de saturar el detector. Por lo tanto, para estudiar dicho efecto, se inyectaron muestras de orina de concentración y volumen crecientes. La Figura V.3 (Pág. 235) muestra las señales obtenidas para

tres analitos (245TP, BPA y TCPL) para tres niveles de concentración (400 ng mL^{-1} , 100 ng mL^{-1} y 10 ng mL^{-1}). Puede observarse como la señal tiende a alcanzar un valor constante al incrementarse el volumen inyectado. Dicho efecto es especialmente acusado para las muestras de concentración más alta (400 ng mL^{-1}). Para esta concentración, la señal normalizada, es prácticamente constante e independiente del volumen de muestra inyectado. Por lo tanto, se seleccionó un volumen de inyección de $100 \mu\text{L}$ dado que es este el volumen más alto que puede inyectarse sin que se produzca la saturación de la señal para el intervalo de concentraciones a estudiar (de 10 a 200 ng mL^{-1}).

Como resultado de la reducción del volumen inyectado desde 1500 a $100 \mu\text{L}$ para adaptar el método al detector de masas, se estudió de nuevo la posible preconcentración de los analitos en el RAM. Para ello, se comparó la señal obtenida al inyectar una muestra de agua UHQ dopada con 100 ng mL^{-1} según la metodología propuesta (RAM-LC-MS/MS) con la que se obtiene al inyectar la misma muestra directamente en el sistema LC-MS/MS. La misma experiencia se repitió con una muestra más diluida (20 ng mL^{-1}). Para ambos niveles de concentración, las áreas de los picos de los analitos obtenidas, bien con la metodología propuesta o con la inyección directa, no mostraron diferencias significativas. Este hecho indica, por lo tanto, que al inyectar un volumen de muestra de $100 \mu\text{L}$ no se produce preconcentración de los analitos en el RAM.

5.A.4.4. Estudio del efecto de matriz

El análisis por cromatografía líquida de matrices complejas (orina, plasma, etc.) requiere frecuentemente una etapa previa de tratamiento de muestra para eliminar el efecto de matriz. Con este pretratamiento se mejora la sensibilidad y la selectividad del método a la vez que se alarga la vida de la columna cromatográfica. Esta etapa es especialmente importante en el caso de la detección por espectrometría de masas con electrospray (ESI) dado que, esta fuente de ionización, sufre severas pérdidas de sensibilidad por la presencia de otros compuestos que coeluyen con los analitos de interés.

Con el fin de determinar si, en las condiciones de trabajo, existe efecto de matriz se registraron los cromatogramas de ion total (TIC), resultado de sumar la señal correspondiente a todos los analitos de interés, para una muestra estándar -100 ng mL^{-1} de dichos analitos en agua UHQ (Fig. V.2.a, Pág. 234) y para una muestra de orina dopada con 100 ng mL^{-1} inyectada en primer lugar según la metodología propuesta, RAM-LC-MS/MS (Fig. V.2.b) y finalmente de forma directa en la columna cromatográfica (Fig. V.2.c).

Puede observarse como la señal total de los analitos en el estándar en agua UHQ y en la orina inyectada a través del RAM es similar tanto en forma como en intensidad (Fig. V.2.a y V.2.b). Sin embargo, la señal de los analitos cuando se inyecta directamente orina dopada sufre un fuerte descenso debido a la fuerte supresión iónica (Fig. V.2.c). Estos resultados muestran la efectividad del RAM como etapa de limpieza de la orina. En la Figura 5.4 se muestra la señal obtenida al realizar un cromatograma de ion extraído (EIC), en cada una de las tres experiencias, para cada analito individual.

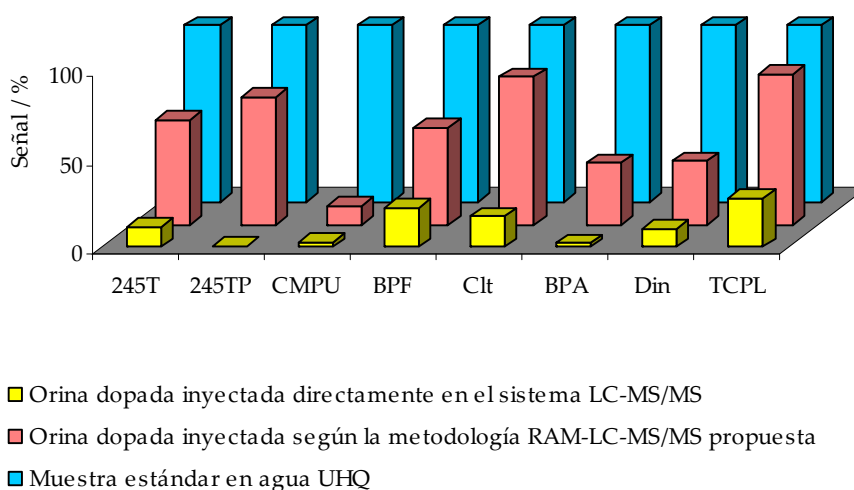


Figura 5.4. Señal, normalizada a la muestra estándar en agua UHQ, para cada uno de los biomarcadores estudiados

Adicionalmente, las supresiones iónicas fueron calculadas cuantitativamente tanto para el método RAM-LC-MS/MS propuesto como para la inyección directa en el sistema cromatográfico. Los porcentajes de supresión iónica al inyectar directamente, en el sistema cromatográfico, una muestra de orina dopada varían entre el 78% y el 99% para BPF y 245TP respectivamente. Sin embargo, usando la metodología propuesta, esta supresión disminuye a valores comprendidos entre el 13% y el 89% para Clt y CMPU, respectivamente, (Tabla V.3, Pág. 236).

Los resultados obtenidos indican que, cuando se realiza la inyección directa, la supresión iónica es muy alta para todos los analitos. Este fenómeno pudo ser corregido en gran medida al aplicar la metodología desarrollada en este trabajo. Sin embargo, aunque la configuración RAM-LC-MS/MS reduce de forma importante la supresión iónica de los analitos, ésta sigue existiendo, lo que hace inadecuada la calibración por patrón externo. Por ello, la calibración se realizó en matriz real (*matrix-matched calibration*).

La Figura V.4 (Pág. 236) compara los calibrados, para cuatro de los analitos estudiados, obtenidos por calibración con patrón externo en agua UHQ y por calibración en orina. Puede observarse que, en matriz real, se produce un descenso de la sensibilidad que, sin embargo, no afecta a la linealidad en el intervalo de concentraciones estudiado.

5.A.4.5. Características analíticas del método RAM-RPLC-MS/MS

El calibrado en matriz real se realizó en el intervalo de concentraciones comprendido entre 10 ng mL^{-1} y 200 ng mL^{-1} para todos los analitos. Se encontraron relaciones lineales entre dichas concentraciones y las áreas de pico para cada compuesto estudiado. En la Tabla V.4 (Pág. 236) se muestran los parámetros del análisis por regresión lineal. Adicionalmente, se calcularon los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) expresados como las concentraciones, en muestras reales, que producirían una relación señal-ruido de 3 y 10, respectivamente. Los valores calculados se recogen en la Tabla V.4. Los límites de detección varían entre 0.2 ng mL^{-1} para el 245T y el 245TP y 3.2

ng mL⁻¹ para el BPF, con la excepción del Din, cuyo límite de detección asciende a 15.5 ng mL⁻¹. Este incremento respecto a los demás analitos, de un orden de magnitud, se debe muy probablemente a la importante diferencia en la relación masa-carga entre el ion precursor y el ion producto (233 → 72). Por su parte, los límites de cuantificación variaron entre 3 y 10 ng mL⁻¹, de nuevo con la excepción del Din que presentó un límite de cuantificación de 50 ng mL⁻¹.

En la Figura V.5 (Pág. 237) se muestran los cromatogramas obtenidos para una muestra de orina dopada con 10 ng mL⁻¹ de cada analito y el ruido generado al inyectar una muestra de orina sin dopar.

5.A.4.6. Validación del método analítico RAM-RPLC-MS/MS

El método analítico RAM-RPLC-MS/MS para el análisis de nueve biomarcadores de exposición en orina fue validado según la Decisión 2002/657 (sección 3.5.1, Pág. 88). La identificación de los analitos se realizó a partir de sus diferentes tiempos de retención y determinando los distintos puntos de identificación (IPs). En el apéndice I de esta memoria de tesis se muestran los espectros de iones precursores, obtenidos en un barrido completo y los espectros de iones productos obtenidos tras producirse la fragmentación del ion más abundante. En el apéndice I se muestran las estructuras más probables de los fragmentos más abundantes.

En la etapa de validación, la trampa iónica se configuró en la modalidad de barrido de iones producto, registrándose un espectro completo de estos iones con el que se comprobó la existencia tanto de las transiciones de cuantificación como de las de confirmación. En estas condiciones de trabajo propuestas, se obtuvieron entre 4 y 5 puntos de identificación para siete de los analitos estudiados (245T, 245TP, CMPU, BPF, Clt, BPA y TCPL). Sin embargo, no fue posible obtener el número mínimo de puntos de identificación para 1NPL y DIN debido, principalmente, a la pobre fragmentación que presentan estos analitos en la trampa iónica. Por lo tanto, estos dos compuestos fueron eliminados del proceso de validación, ya que no cumplían los requisitos de confirmación exigidos por la Decisión 2002/657. Para los siete analitos restantes se obtuvo la señal analítica a través de los

cromatogramas de ion extraído (EIC) de los iones producto correspondientes a las transiciones de confirmación.

Los diferentes parámetros de la validación, para los siete biomarcadores estudiados, son ampliamente discutidos en el artículo de investigación V (Pág. 236). A modo de resumen, cabe destacar que se alcanzaron límites de decisión en el intervalo 4-16 ng mL⁻¹ con recuperaciones entre el 88% y el 112% para una concentración de 12.5 ng mL⁻¹ (Tabla V.6, Pág. 238). Los RSDs variaron del 7% al 12% en el análisis *interday* para una concentración de analito equivalente a cada respectivo límite de cuantificación (Tabla V.5, Pág. 237). Adicionalmente, el RAM utilizado mostró una elevada robustez y vida útil, soportando al menos 190 inyecciones de muestra, equivalentes a 21 mL de orina.

5.A.4.7. Análisis cualitativo no dirigido

Todos los estudios realizados para desarrollar el método cuantitativo propuesto se han realizado fijando previamente los parámetros óptimos para la cuantificación de cada analito. Sin embargo, en un contexto de rastreo general de análisis de biomarcadores en orina (*screening*) no es posible conocer de antemano dichos parámetros. Por lo tanto, se hace necesario comprobar la capacidad del método desarrollado para detectar cualquier tipo de analito no prefijado en el sistema. Con dicho fin, se configuró el *software* del sistema en modo *Data-Dependent Scan*. Este modo no requiere prefijar ningún tipo de parámetro característico de los posibles biomarcadores (transiciones de fragmentación, ventanas de detección, etc.). El detector de masas realiza un barrido de 60 u a 400 u y, cuando la señal sobrepasa un umbral determinado, se inicia la fragmentación registrándose el barrido completo de iones producto. La amplitud óptima de fragmentación se determina automáticamente como el voltaje, entre 0.3 V y 2.0 V, que reduce la señal del ion precursor al 10%. Trabajando bajo esta configuración, con un umbral de señal de 150000 ua, se analizaron muestras en agua UHQ (10 ng mL⁻¹ a 200 ng mL⁻¹) y en matriz real (orina dopada con los analitos a un nivel de 0 ng mL⁻¹ a 1000 ng mL⁻¹). En todos los análisis se determinó si los analitos fueron detectados siguiendo los siguientes criterios:

- Que se produjera la superación del umbral fijado para la señal del detector de masas iniciándose del proceso de fragmentación.
- Que dicho proceso de fragmentación diese lugar al espectro de MS/MS característico del analito, ajustándose al espectro de la librería de referencia previamente construida a partir de muestras patrón.
- Que se obtuviera una relación señal-ruido mayor de 3.

Bajo estas condiciones se asegura la existencia de al menos 4 puntos de identificación (IPs) para cada analito.

La Figura V.6 (Pág. 238) muestra el cromatograma y el espectro de MS/MS obtenidos para una muestra de agua UHQ dopada con 100 ng mL⁻¹ de 245T, tomado como estándar para crear la librería (Fig. V.6.a) y el correspondiente cromatograma y espectro para una muestra de orina dopada con 100 ng mL⁻¹ de 245T (Fig. V.6.b).

Todos los resultados obtenidos bajo esta configuración (*Data-Dependent Scan*) se muestran en la Tabla V.7 (Pág. 239). Puede observarse que ningún biomarcador fue detectado en la orina sin dopar. La confirmación fue correcta para todos los analitos hasta un nivel de concentración de 40 ng mL⁻¹ en agua UHQ y de 60 ng mL⁻¹ en orina dopada. El nivel, en matriz real, es aún mejor para BPF, Clt y TCPL que pueden confirmarse hasta los 40 ng mL⁻¹ y para 245T y 245TP que son confirmados hasta un nivel de 20 ng mL⁻¹. Estos resultados sugieren la utilización del método RAM-LC-MS/MS propuesto, en modo *Data-Dependent Scan*, como método de *screening* general para la confirmación en orina de biomarcadores de exposición de bajo peso molecular.

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN V
Journal of Chromatography A 1217 (2010) 40



Development and validation of a method for the detection and confirmation of biomarkers of exposure in human urine by means of restricted access material-liquid chromatography–tandem mass spectrometry

E. Rodríguez-Gonzalo*, D. García-Gómez, R. Carabias-Martínez

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, Universidad de Salamanca, Plaza Merced s/n, 37008 Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 June 2009

Received in revised form 28 October 2009

Accepted 2 November 2009

Available online 10 November 2009

Keywords:

Biological monitoring

Ion trap-LC-MS/MS

Restricted access material

Human urine

Biomarkers of exposure to xenobiotics

Validation according to 2002/657/EC

ABSTRACT

The present article describes the development and validation of a LC-MS/MS method for the determination and confirmation of biomarkers of exposure to different types of xenobiotics in human urine. The method combines the use of a restricted access material (RAM) coupled on-line to a LC-IT-MS system; in this way, a rapid and efficient matrix cleanup was achieved, reducing manual sample preparation to freezing and sample filtration. The ion trap (IT) mass spectrometry detector provided the selectivity, sensitivity and ruggedness needed for confirmatory purposes. The on-line RAM-LC-MS/MS method developed here has been validated as a quantitative confirmatory method according to the European Union (EU) Decision 2002/657/EC. The validation steps included the verification of linearity, repeatability, specificity, trueness/recovery, reproducibility, stability and ruggedness in fortified urine samples. Repeatability and within-laboratory reproducibility, measured as intraday and interday precisions, were evaluated at two concentration levels, being 12.7% or below at the concentration corresponding to the quantification limits. Matrix effects and non-targeted qualitative analyses were also evaluated in fortified urine samples. Decision limits (CC_{α}) and detection capabilities (CC_{β}) were in the range of 3.6–16.5 and 6.0–28.1 ng mL⁻¹ respectively. The results of the validation process revealed that the proposed method is suitable for reliable quantification and confirmation of biomarkers of exposure to xenobiotics in human urine at low ng mL⁻¹ levels. In addition, working in Data-Dependent Scan mode the proposed method can be used for the screening of these compounds in urine samples.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Human health is affected by all the activities of an individual, who is subject to a continuum of chemical exposures in the external environment, including air, water, soil and food. Biological monitoring involves the measurement and evaluation of chemical compounds or their metabolites (biomarkers of exposure) in biological fluids as a method for assessing the risk to health deriving from exposure to a toxic agent [1]. Biomonitoring may be used to assess the exposure (amount absorbed or internal dose) and the effects of chemicals and the susceptibility of individuals, and it may be applied regardless of whether such exposure has been from dietary, environmental or occupational sources. The data gleaned from biological monitoring studies can be used in conjugation with other data in clinical diagnosis, health risk assessment, and for risk management programs. Although many methods for measuring pesticides and industrial chemicals in human matrices have been

reported, most of them refer to a limited number of compounds or analytes belonging to the same chemical group. There is an important need for validated methods that will allow the unequivocal identification and quantification of an important variety of xenobiotics of different chemical natures for application in the context of biomonitoring [2].

The analytical methodology used in the biological monitoring of exposure to pesticides and other chemicals is mainly based on chromatographic techniques. The application of liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) in occupational and environmental toxicology has proved to be a very useful tool in the determination of biomarkers of exposure as well as in metabolism studies aimed at investigating new biomarkers [3,4].

In this context, tandem mass spectrometry (MS/MS) seems to be the most efficient technique for quantification and identification. The MS/MS detector most widely used is the triple quadrupole (QqQ), used in multiple reaction monitoring (MRM) mode [5–7]. However, in MRM mode the qualitative information necessary for full confirmation of analytes is lost at low concentration levels owing to the low sensitivity of the confirmation transition. Since confirmation of identification is insufficient with a single MS/MS

* Corresponding author. Tel.: +34 923 294483; fax: +34 923 294483/294574.
E-mail address: erg@usal.es (E. Rodríguez-Gonzalo).

transition, it is necessary to perform a second injection to confirm the positive samples [8,9]. Use of an ion trap (IT) has great potential as a confirmatory method because it allows a complete spectrum of the product ions to be obtained. Nevertheless, there are few applications in this field [10,11] owing to the low sensitivity of ITs when the number of analytes to be determined is high and to their poor reliability in complex matrices [12]. One good approach for addressing these limitations is by coupling the chromatographic system to an on-line preconcentration step [13]. This coupling also automates prior sample treatment, which in many cases is the limiting step in the analysis time.

Restricted access materials (RAMs) can be satisfactorily used for the on-line pretreatment of biological fluids in the analysis of low-molecular weight substances since they permit liquid–solid extraction and the concentration of small molecules. These materials act by limiting the access of macromolecules to the sorbent by means of a porous membrane [14], thereby achieving a highly efficient cleanup of the biological matrix. Souverain et al. [15] have reviewed a large number of applications in which endogenous and pharmaceutical compounds were purified in different biological matrices, such as plasma, urine, saliva and milk.

The aim of the present work was to develop and validate a sensitive and specific multiresidue method based on LC–IT–MS for the detection and confirmation of a broad variety of biomarkers of exposure to xenobiotics in human urine. The xenobiotics and their respective biomarkers of exposure used were selected on the basis of their importance in environmental studies: several pesticides, such as Carbaryl, one of the most popular domestic insecticides [16] and its metabolite, 1-naphthol; 2,4,5-T and 2,4,5-TP phenoxyacids, which are the herbicides most used domestically [17]; chlortoluron and diuron, which are phenylureas and are designated “priority hazardous substances” by the EU [18] and one of their metabolites, 3-chloro-4-methylphenylurea [19]. Several xenobiotics of industrial origin were also included, such as bisphenol-A and bisphenol-F, which are widely used in the preparation of epoxy resins and polycarbonates [20], trichlorophenol, associated with the always dangerous dioxins [21], and the already mentioned 1-naphthol, a metabolite of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) [3]. All these analytes and their metabolites are well known to be excreted in urine after environmental exposure [22–26].

To accomplish this, here we propose a combination of RAMs for a fast on-line sample treatment of the urine samples with the high selectivity of IT–MS, thus affording a rapid, automatic and sensitive multi-residue method that will permit the determination of a broad range of biomarkers of exposure to pesticides and industrial compounds, all fulfilling the requisites concerning full validation and identification legislated by the European Union [27].

In addition, a Data-Dependent Scan procedure for non-targeted qualitative analysis was developed. To our knowledge, this methodology has not been applied to the multiresidue analysis of biomarkers of exposure of very different chemical natures.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Analytical standards of *chlortoluron* (CLT), 3-(3-chloro-4-methyl)-1,1-dimethylurea, CAS RN [15545-48-9]; *CMPU* (CMPU), 1-(3-chloro-4-methylphenyl)urea, CAS RN [13142-64-8]; *diuron* (DIN), 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, CAS RN [330-54-1] and *1-naphthol* (1NPL), 1-hydroxynaphthalene, CAS RN [90-15-3] were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). *Bisphenol-A* (BPA), 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane, CAS RN [80-05-7]; *bisphenol-F* (BPF), bis-(4-hydroxyphenyl)methane, CAS RN [620-92-8]; *trichlorophenol* (TCPL), 2,4,5-trichlorophenol,

CAS RN [95-95-4]; 2,4,5-T (245T), 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, CAS RN [93-76-5] and 2,4,5-TP (245TP), 2-(2,4,5-trichlorophenoxy)propionic acid, CAS RN [93-72-1] were obtained from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany).

The organic solvents—acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH)—were of HPLC grade (Merck, Darmstadt, Germany) and were used as received. Ultra-high quality (UHQ) water was obtained with an Elgastat UHQ water purification system.

All chemicals used for the preparation of the buffer and all other chemicals were of analytical reagent grade.

2.2. Instrumentation

HPLC analyses were performed on a HP 1100 Series chromatograph from Agilent (Waldbronn, Germany) equipped with a binary pump, an additional isocratic pump, a membrane degasser, an autosampler (equipped with a 1500- μ L capillary seat), a six-port valve, and a diode-array detector (DAD). The system was controlled by a HP ChemStation which also performed data collection from the mass spectrometer and quantitative measurements. The restricted access material (RAM) used was a LiChroCART 25-4LiChrospher RP4 ADS (25 μ m, 25 mm \times 4 mm) from Merck (Darmstadt, Germany). The analytical column was a 150 \times 4.60 mm Luna PPP(2) packed with 3 μ m particles (Phenomenex, Torrance, CA, USA).

The clean-up isocratic mobile phase, impelled by the isocratic pump, consisted of a 2.5 mM ammonium formate buffer (pH 2.9) with 10% ACN. The separation mobile phase, impelled by the binary pump, consisted of an unbuffered UHQ water (solvent A) and methanol (Solvent B) gradient from 70% to 0% of A. The analytical column was thermostated at 25 $^{\circ}$ C.

2.2.1. Mass spectrometry

The LC/MSD Trap XCT ion trap mass spectrometer (Agilent, Waldbronn, Germany) was equipped with an electrospray (ESI) source with a nebulizer spacer. The ESI settings were a capillary voltage of 3500 V; a drying gas flow of 10 L min^{-1} at a temperature of 350 $^{\circ}$ C, and a nebulizer pressure of 50 psi. Optimization of the ionization and fragmentation parameters was achieved manually while injecting standard solutions of each analyte (5 μ g mL^{-1}) with a syringe pump at a flow rate of 1 mL/h; these solutions were mixed with the mobile phase at 0.3 mL/min by means of a T piece. The trap parameters were set at a smart target of 50,000–100,000 and a maximum accumulation time of 200 ms at an m/z range from 60 to 400 u. A narrow isolation width of 4u was selected. The optimized parameters and retention times for each analyte are listed in Table 1.

2.3. Sample collection

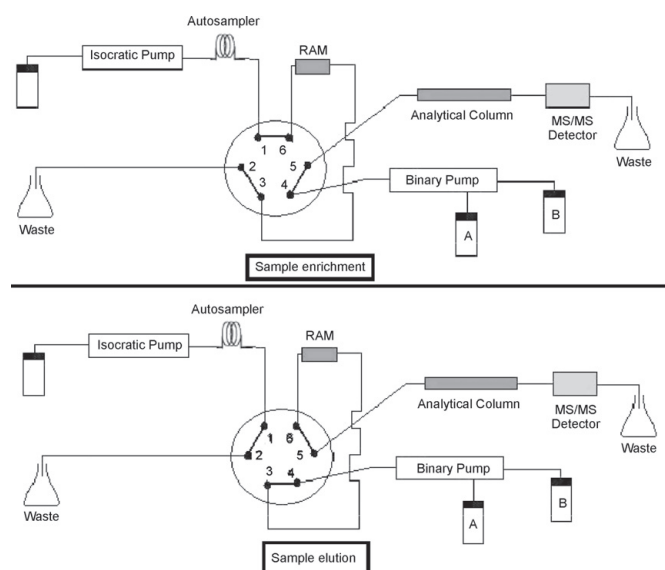
Urine samples collected from two healthy volunteers were used for method development and the preparation of calibration standards. Urine samples were collected in 250-mL brown glass bottles and frozen immediately until analysis. Before use, the samples were thawed at room temperature. An appropriate amount of urine was spiked with dilute analytical standards daily. Samples were filtered through 0.45 μ m filters to remove precipitated proteins. Creatinine was determined in order to normalize the results with respect to the concentration and to rule out overdiluted or overconcentrated samples, the concentration values proving to be 87.7 and 126.8 mg dL^{-1} .

2.4. On-line sample preparation and HPLC separation

The experimental setup for RAM-LC–MS/MS is shown in Fig. 1, and the schedule for clean-up and chromatographic separation is shown in Table 2. First, a predetermined volume of urine was

Table 1
Ion trap tandem mass spectrometer parameters optimized for the studied biomarkers of exposure.

Analyte	t_R (min)	Quantification transition	Confirmation transition	Fragmentation amplitude (V)	ESI mode	Window
245T	19.8	253 \Rightarrow 195	255 \Rightarrow 197	0.70	–	18–25 min
245TP	23.4	267 \Rightarrow 195	269 \Rightarrow 197	0.64	–	18–25 min
CMPU	26.4	185 \Rightarrow 142	185 \Rightarrow 168	0.98	+	25–27 min
BPF	27.9	199 \Rightarrow 93	199 \Rightarrow 123	1.10	–	27–29.5 min
CLT	30.7	211 \Rightarrow 166	211 \Rightarrow 140	0.95	–	29.5–33 min
BPA	31.3	227 \Rightarrow 212	227 \Rightarrow 133	0.95	–	29.5–33 min
1NPL	32.3	143 ^a	– ^a	– ^a	–	29.5–33 min
DIN	33.8	233 \Rightarrow 72	– ^b	0.70	+	33–34 min
TCPL	36.1	195 \Rightarrow 159	197 \Rightarrow 161	0.95	–	34–39 min

^a No satisfactory fragmentation was found for 1NPL.^b Only one satisfactory fragmentation was found for DIN.**Fig. 1.** RAM-LC-MS/MS instrumental setup. Top: switching valve in “sample enrichment” position. Bottom: valve in “sample elution” position (backflush mode).

injected with the autosampler and the isocratic pump was immediately started to pump the clean-up mobile phase at 1 mL min^{-1} for 10 min with the system in the “sample enrichment” position. While the matrix components of the urine were washed to waste, the xenobiotic compounds studied were withheld in the RAM. At 10 min, the system setup was changed to “sample elution” position and the separation gradient (binary pump), shown in Table 2, eluted the analytes at a flow rate of 0.8 mL min^{-1} in backflush mode to the analytical column, where they were separated and finally

detected by the mass spectrometer. During this time, the isocratic pump changed the flow rate to 0.3 mL min^{-1} in order to save solvent until the next injection. At 37 min, the separation ended and the gradient was returned to the initial conditions. The flow rate of the isocratic pump was changed to 1 mL min^{-1} . At 39 min, the system was switched to “sample enrichment” mode and a 3-min post-run program was started, keeping the system in the initial conditions, in order to equilibrate the analytical column for the next analysis.

Table 2
Time procedure and valve events of RAM-LC-MS/MS method.

Time (min)	Isocratic pump ^a flow (mL min^{-1})	Binary pump ^{b,c} % A	Six-port valve position	Event
0–10	1	70	Enrichment	RAM charging and cleanup
10–11	1 \Rightarrow 0.3	70	Elution	Analyte transfer
11–12	0.3	70 \Rightarrow 50	Elution	Analyte separation
12–19	0.3	50	Elution	Analyte separation
19–30	0.3	50 \Rightarrow 30	Elution	Analyte separation
30–35	0.3	30 \Rightarrow 0	Elution	Analyte separation
35–37	0.3	0	Elution	Analyte separation
37–39	0.3 \Rightarrow 1	0 \Rightarrow 70	Elution	Re-equilibrating
39–42	1	70	Enrichment	Equilibrating

^a Mobile phase: ammonium formate buffer 2.5 mM (pH 2.9) with 10% ACN.^b Flow rate: 0.8 mL min^{-1} .^c Mobile phase: A: UHQ water B: MeOH.

2.5. Standard preparation and calibration procedure

Individual stock solutions of the analytical standards, at $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, were prepared by dissolving 12.5 mg of each analyte in 25 mL of acetonitrile. These stock solutions were stored at 4°C in brown glass bottles. Matrix-matched standards were prepared by adding the appropriate amount of each stock solution to urine. Calibration standards for quantification were prepared in the $10\text{--}200 \text{ ng mL}^{-1}$ range. The standards were filtered before analysis with a Cameo ($0.45 \mu\text{m}$ Nylon) filter. Calibration curves were obtained by plotting the peak areas of the analytes *versus* concentration using matrix-matched standards.

2.6. Method validation

The method was validated, according to the pertinent legislation [27], by evaluating the following parameters:

- Specificity: by calculating ion suppressions, comparing patterns with matrix-matched samples, and developing a non-targeted analysis.
- Determination of the statistical parameters and the quality of the linear regression, using the transition confirmation. The matrix-matched calibrations (five calibration points) were obtained in the $30\text{--}150 \text{ ng mL}^{-1}$ range. The decision limit (CC_α) and the detection capability (CC_β) were also calculated.
- Repeatability and within-laboratory reproducibility were determined as intraday and interday precisions by analyzing urine samples at two concentrations levels (10 ng g^{-1} and at the respective limits of quantification).
- The recoveries and RSD% were determined at two concentration levels (25 and 12.5 ng mL^{-1}).

- Ruggedness: evaluating sample preparation by analyzing spiked urine samples before and after freezing and the possible memory effect of the system by analyzing blanks after high-concentration samples.
- Stability: by controlling the storage conditions of the analytes and samples, keeping them in the range in which stability is guaranteed by the manufacturer.

3. Results and discussion

Chromatographic separation was optimized, with the achievement of a satisfactory separation in 27 min on using a water/MeOH gradient. This mobile phase was chosen for the proposed method (Table 2) because it showed greater compatibility with the mass detector [28] than water/ACN mixtures. Additionally, no buffer was employed, since the presence of salts negatively affects the ionization of some analytes in the ESI [29].

3.1. Study of the behavior of the RAM coupled on-line to LC-MS/MS

Liquid chromatography analysis of complex matrices (urine, plasma, etc.) usually requires a previous sample treatment step to eliminate large amounts of interferences from the matrices, which positively affects selectivity and sensitivity and at the same time prolongs columns life and preserves the integrity of the instrumental setup. This step is especially important when mass spectrometry with electrospray (ESI) is used as detector since this source of ionization undergoes severe losses of sensitivity (ion suppression) owing to the presence of interferences. Among the different strategies described to minimize such suppression [30] the following are important: modification of the ionization conditions; the use of a suitable internal standard, usually a stable isotope-labeled ana-

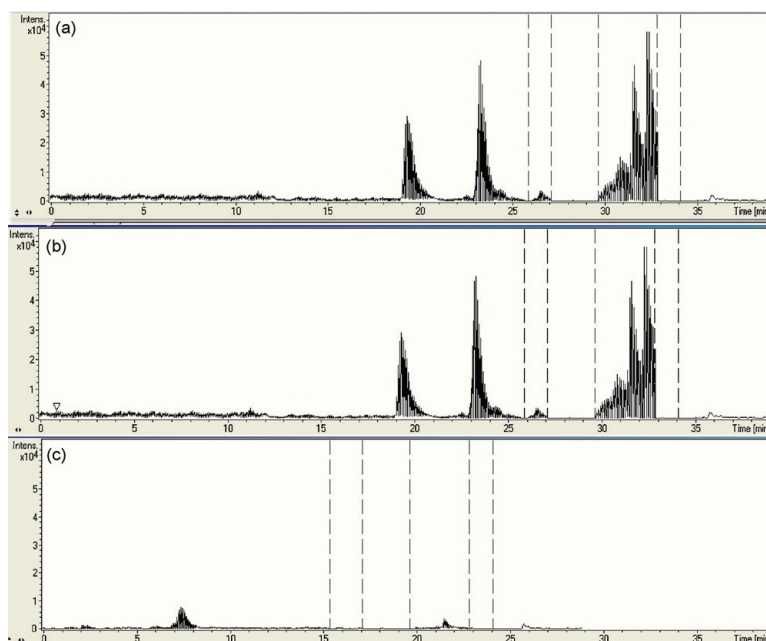


Fig. 2. Total ion chromatograms (TICs) of UHQ standard and urine samples spiked with 100 ng mL^{-1} . (a) UHQ standard, (b) urine injected through the RAM, (c) urine injected directly in the LC-MS/MS system. Dashed lines represent the windows for IT-MS/MS detection.

logue; strong dilution of the sample, or a clean-up step. In our case, we propose a clean-up step using a RAM. Attending to the different chemical natures of the target compounds, the optimization of the behaviour of the RAM column is an important step in the development of the method. The efficiency of the RAM as a clean-up step is mainly affected by the solvent used to eliminate the matrix interferences. The mobile phase impelled by the isocratic pump acts as a washing solvent and at the same time transports the sample through the RAM. The composition of the mobile phase is thus a decisive factor for achieving an efficient washing of the sample matrix with no elimination of the compounds of interest. Different washing solutions based on ammonium formate buffer–ACN mixtures were assayed. It was decided to use one with a composition of 2.5 mM ammonium formate buffer (pH 2.9) –10% ACN, since this was the one offering the best cleaning without producing appreciable losses of the target compounds.

Fig. 2 shows the total ion chromatograms (TICs), the result of summing the signals corresponding to all the analytes, for a standard of 100 ng mL⁻¹ in UHQ (Fig. 2a.) and for samples of urine spiked with 100 ng mL⁻¹, injected through the RAM according to the proposed methodology (Fig. 2b) or directly into the analytical columns (Fig. 2c). It may be seen that the signals of the standard in UHQ and the urine sample injected through the RAM are very similar both in shape and in signal intensity. However, when direct injection of urine sample was carried out the signals of all the analytes underwent a strong decrease owing to interferences from the matrix. These observations point to the effectiveness of the proposed clean-up step.

The use of the RAM coupled on-line with the chromatographic system serves not only as a clean-up method but has also been described to be a valid preconcentration step [31]. Accordingly, in order to increase sensitivity, a study was made of the possibility of injecting volumes up to 1500 µL. Fig. 3 shows the normalized signals obtained for three of the analytes (245TP, BPA and TCPL) upon injecting increasing volumes of samples spiked at different concentrations (400, 100 and 10 ng mL⁻¹). It may be seen that the signal becomes saturated upon increasing the volume injected, this effect being especially pronounced in the samples with higher concentrations. Therefore, an injection volume of 100 µL was selected since this was the greatest volume for which there was no signal saturation in the concentration range studied (3–200 ng mL⁻¹). So, to study the possible preconcentration achieved for each analyte upon injecting 100 µL, UHQ water samples spiked with 100 and 20 ng mL⁻¹ were injected through the RAM and also injected directly into the LC–MS/MS system. At both levels, the peaks areas of the analytes obtained through RAM and directly were not significantly different, indicating that no analyte preconcentration was occurring in the RAM. This was probably due to the low sample volume injected (100 µL).

3.2. Evaluation of matrix effects

Quantitative determinations using ESI–MS/MS for detection may be affected by the ion suppression that occurs in the electrospray device, mainly due to the co-elution of matrix interferences with the analytes. This suppression can be calculated via equation [13]: ion suppression (%) = $A_S - (A_{SU} - A_{USU}) / A_S$, where A_S is the analyte peak area in spiked UHQ water; A_{SU} is the analyte peak area in urine, and A_{USU} is the analyte peak area, if present, in unspiked urine. Ion suppression was calculated for each analyte, both in direct injection mode and with the proposed instrumental configuration, RAM–LC–MS/MS (Table 3), obtaining values from 77.7% to 99.6% for direct injection and between 13% and 89% for the proposed method. Very high degrees of ion suppression were observed in the case of direct injection of urine samples, which to a large extent was corrected with the use of the RAM. The trend shown

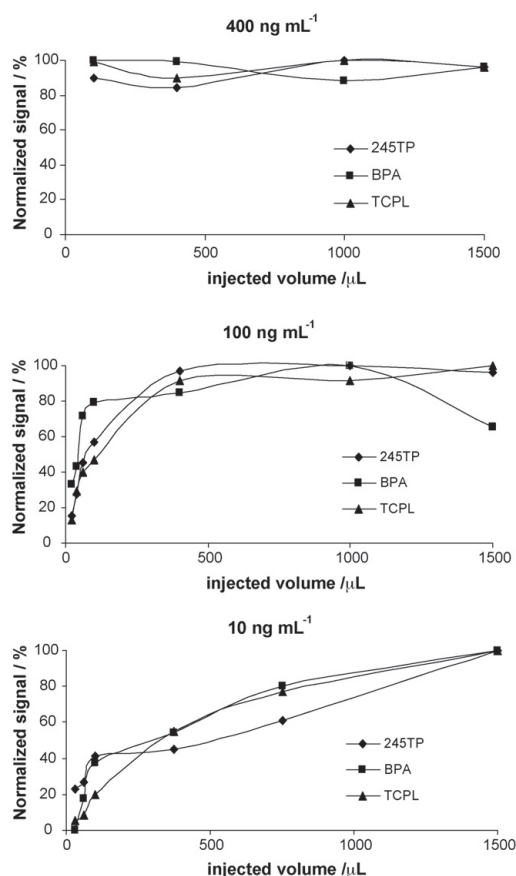


Fig. 3. Influence of the injected urine on the RAM–LC–MS/MS. Analyte response expressed as the signal normalized to the largest peak (%). Urine samples spiked at 400, 100 and 10 ng mL⁻¹, from top to bottom. Analyte identification as seen from Section 2.1.

by these values does not seem to be related to the retention times and hence to the polarity of the analytes; this relationship has been described for other matrices [13]. The use of the RAM–LC–MS/MS configuration afforded a marked decrease in ion suppression but it still persisted, rendering quantification via an external standard inadequate. Therefore, calibration was performed with the matrix-matched method. Fig. 4 compares the calibrations carried out with an external standard in UHQ water and in matrix-matched mode. It may be seen that in fortified urine, sensitivity was decreased, but that this did not affect linearity.

3.3. Limits of detection (LODs) and quantification (LOQs) of the RAM–LC–MS/MS method

Starting out from the optimized parameters, a study was made of the analytical characteristics of the method. Linear relationships were established between the peak areas and the concentration of the analytes for the range studied (10–200 ng mL⁻¹). Table 4 shows the analytical characteristics of the proposed method.

The limits of detection were determined working with the ion trap (IT) in Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode, isolat-

Table 3
Ion suppressions for the biomarkers studied obtained by analyzing spiked urine samples.

Analyte	245T	245TP	CMPU	BPF	CLT	BPA	1NPL	DIN	TCPL
Directly in LC-MS/MS	88.5	99.6	97.7	77.7	82.7	97.8	– ^a	90.1	72.2
RAM-LC-MS/MS	40.5	27.3	89.4	43.3	16.4	64.3	36.3	59.1	12.7

^a No signal was found for 1NPL when urine was directly injected.

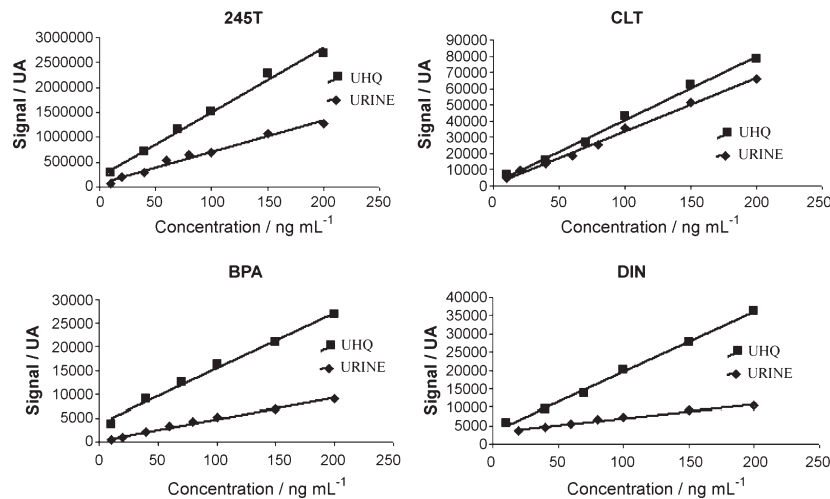


Fig. 4. Comparison of calibration curves for UHQ standards and fortified urine samples. Analyte identification as seen from Section 2.1.

ing the most abundant fragmented ion (quantification transition) and setting six different windows, as shown in Table 1. The chromatograms of the urine samples spiked with 10 ng mL^{-1} and the noise generated by an unspiked urine sample are shown in Fig. 5. The limits of detection were calculated as the concentration for which a signal-to-noise ratio of 3 would be obtained in a real sample. The values thus obtained for all the analytes are shown in Table 4, and they range between 0.2 ng mL^{-1} for 245T and 245TP, and 3.2 ng mL^{-1} for BPF, with the exception of DIN, which had a limit of detection of 15.5 ng mL^{-1} , probably due to the important difference in the mass/charge ratio between the precursor ion and the product ion ($233 \Rightarrow 72$). Likewise, the limits of quantification were calculated, in real samples, as the concentration for which a signal-to-noise ratio of 10 would be obtained (Table 4). In this case, values between 3 and 10 ng mL^{-1} were obtained, again with the exception of DIN which had a limit of 50 ng mL^{-1} .

3.4. Method validation

As a confirmatory criterion, the EU Decision suggests the use of at least three points of identification [27]. One of the greatest advantages of tandem mass spectrometry is that it is possible to record a complete spectrum of product ions, thus being able to analyze both the quantification transition and that of confirmation from a single injection, which ensures the presence of at least one precursor and two product ions. With the proposed methodology, four identification points were achieved (one precursor and two products) for CMPU, BPF, CLT and BPA, and five (two precursors and two products) for 245T, 245TP and TCPL. However, for DIN and 1NPL it was not possible to find more than 2.5 (one precursor and one product) and 1 points of identification (one precursor), respectively, such that they were removed from the validation step. This is due to the poor fragmentation that these analytes present by collision-induced dissociation (CID) in the ion trap.

Table 4
Analytical characteristics of RAM-LC-MS/MS method calculated by the analysis of fortified urine samples.

Analyte	Intercept (area units (au))	Slope ($\text{au ng}^{-1} \text{ mL}$)	LOD ^c (ng mL^{-1})	LOQ ^d (ng mL^{-1})
245T ^a	$(8.1 \pm 8.5) \times 10^4$	$(6.3 \pm 0.8) \times 10^3$	0.2	3
245TP ^a	$(0.2 \pm 1.3) \times 10^5$	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^4$	0.2	3
CMPU ^a	$(2.6 \pm 2.1) \times 10^2$	(28 ± 2)	3.0	10
BPF ^a	$(-0.8 \pm 1.4) \times 10^2$	(19 ± 1)	3.2	10
CLT ^a	$(1.2 \pm 2.6) \times 10^3$	$(3.3 \pm 0.3) \times 10^2$	2.0	10
BPA ^a	$(3.6 \pm 3.9) \times 10^2$	(44 ± 4)	1.4	5
1NPL ^a	$(1.1 \pm 1.0) \times 10^5$	$(8.6 \pm 1.0) \times 10^3$	0.7	5
DIN ^b	$(3.4 \pm 0.5) \times 10^3$	(37 ± 5)	15.5	50
TCPL ^a	$(2.4 \pm 2.9) \times 10^3$	$(4.1 \pm 0.5) \times 10^2$	2.6	10

^a Concentration range from 10 to 200 ng mL^{-1} .

^b Concentration range from 20 to 200 ng mL^{-1} .

^c Limit of detection (LOD) for a signal-to-noise ratio of 3 from quantification transition in MRM mode.

^d Limit of quantification (LOQ) for a signal-to-noise ratio of 10 from quantification transition in MRM mode.

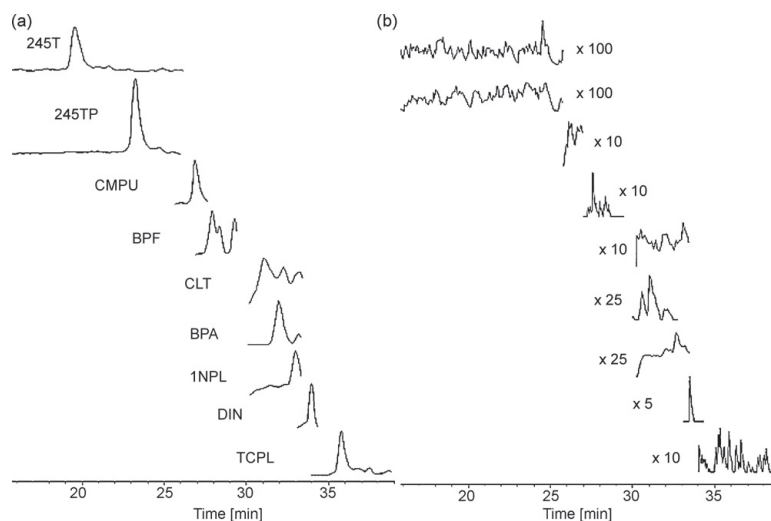


Fig. 5. LC-MS/MS chromatograms of: (a) a urine sample spiked at 10 ng mL^{-1} (except from DIN at 20 ng mL^{-1}) and (b) a blank urine sample (magnified). Analyte identification as seen from Section 2.1.

3.4.1. Calibration curves, decision limits and detection capabilities

Two analytical limits are recommended in the European Decision 657/2002/EC: the decision limit (CC_{α}), which is defined as “the lowest concentration level of the analyte that can be detected in a sample with a chance of 1% of a false positive decision”, and the detection capability (CC_{β}), which is “the smallest content of the analyte that can be detected in a sample with a chance of 5% of a false negative decision” [27].

To determine these limits, urine samples were studied in MRM mode, recording the full spectrum of product ions. Then, after verifying the existence of both transitions (quantification and confirmation transitions) and ratios according to the EU criteria, an extracted ion chromatogram (EIC) was made of the ion that was the product of the confirmation transition. Thus a calibration of five points ranging between 30 and 150 ng mL^{-1} was built; its characteristics are shown in Table 6. CC_{α} and CC_{β} were estimated using the calculations described by Verdon et al. [32]. The values calculated are shown in Table 6. It may be seen that the CC_{α} values varied between 3.6 ng mL^{-1} for 245T and 16.5 ng mL^{-1} for BPA, and the CC_{β} values between 6.0 ng mL^{-1} for 245T and 28.1 ng mL^{-1} for BPA.

3.4.2. Repeatability and reproducibility

Keeping the same instrumental configuration as that used to calculate the LODs, the repeatability and reproducibility of the proposed method were evaluated. To accomplish this, urine samples spiked with two different concentrations were analyzed: first at 10 ng mL^{-1} of each analyte, and then with each analyte spiked at its limit of quantification (LOQs, Table 4). Repeatability, as intraday precision, was assessed with eight injections performed on the same day and reproducibility, as interday precision, was determined by analyzing injections (eight each day) carried out over three consecutive days. The values of the different precisions are shown in Table 5. The lowest values were obtained for the sample spiked with 10 ng mL^{-1} in the intraday assay, with precisions between 1.0% for 245T and 5.1% for CLT. The highest values were found upon evaluating the interday precision in samples spiked at the limit of quantification,

values of between 7.1% for CMPU and 11.5% for BPA being recorded.

3.4.3. Recoveries

As an additional analysis to validate the method, urine samples that had not been used previously in the method were analyzed. These samples were spiked at two levels: 12.5 and 25 ng mL^{-1} . The signal obtained for each of the analytes in MRM mode by measuring the quantification transition was introduced into the corresponding calibration. For both samples, the results shown in Table 6 were obtained. In the case of urine spiked with 25 ng mL^{-1} , the precisions varied between 7.7% for CLT and 12.5% for 245TP. For the urine spiked with 12.5 ng mL^{-1} they varied between 8.3% for 245T and 18.2% for CLT. In all cases, satisfactory recoveries were obtained.

3.4.4. Ruggedness

Only sample pretreatment was investigated because the LC-MS device was regularly subjected to checks and maintenance, ensuring its ruggedness [33]. Additionally, the method developed is characterized by involving minimum sample pretreatment, such that it is only necessary to evaluate the spiking of the samples

Table 5

Repeatability, evaluated as intraday precision, and within-laboratory reproducibility, evaluated as interday precision, of developed RAM-LC-MS/MS method obtained by analyzing spiking urine samples.

Analyte	RSD ^a (%)			
	Intraday ^b at 10 ng mL^{-1}	Interday ^c at 10 ng mL^{-1}	Intraday ^b at LOQ	Interday ^c at LOQ
245T	1.0	3.1	5.2	9.6
245TP	1.1	4.2	6.3	8.8
CMPU	2.5	7.1	2.5	7.1
BPF	4.9	11.3	4.9	11.3
CLT	5.1	10.4	5.1	10.4
BPA	4.0	8.4	5.3	11.5
TCPL	3.9	10.1	3.9	10.1

^a RSD, relative standard deviation.

^b Intraday precision (repeatability) was determined by eight injections.

^c Interday precision (reproducibility) was determined in three consecutive days (eight injections each day).

Table 6Statistic and performance characteristics of the proposed RAM-LC-MS/MS method obtained by analyzing fortified urine samples^a.

Analyte	Intercept (au)	Slope (au ng ⁻¹ mL)	r ²	CC _α (ng mL ⁻¹)	CC _β (ng mL ⁻¹)	Recoveries	
						At 25 ng mL ⁻¹	At 12.5 ng mL ⁻¹
245T	(-0.09 ± 3.02) × 10 ⁴	(4.61 ± 0.03) × 10 ³	0.999	3.6	6.0	25 ± 3	12 ± 1
245TP	(-0.2 ± 1.1) × 10 ⁵	(1.1 ± 0.1) × 10 ⁴	0.999	5.0	8.6	24 ± 3	11 ± 2
CMPU	(1.8 ± 2.2) × 10 ²	(8.3 ± 2.3)	0.996	14.4	24.5	23 ± 2	12 ± 2
BPF	(-0.7 ± 1.6) × 10 ²	(8.6 ± 1.7)	0.998	10.3	17.5	27 ± 3	12 ± 2
CLT	(5.7 ± 4.4) × 10 ³	(1.6 ± 0.5) × 10 ²	0.996	15.2	25.9	26 ± 2	11 ± 2
BPA	(-0.4 ± 5.2) × 10 ²	(17.1 ± 5.4)	0.995	16.5	28.1	25 ± 3	14 ± 2
TCPL	(-0.3 ± 4.5) × 10 ³	(2.7 ± 0.5) × 10 ²	0.998	9.0	15.4	24 ± 3	13 ± 2

^aConcentration range from 30 to 150 ng mL⁻¹ (five calibration points).

because this is performed after freezing and must be compared with samples spiked prior to freezing, in the sense that this latter situation would correspond to a real contaminated sample.

Two urine samples spiked at 100 ng mL⁻¹ were prepared and subjected to freezing before and after spiking, respectively. The signal of each of the analytes was analyzed, and it was concluded that there were no significant differences in any case, such that it can be affirmed that spiking before or after freezing does not affect the results of the method.

One of the disadvantages of the use of on-line preconcentration with the same sorbent for different samples is possible contamination among them. This may be especially relevant when RAMs are used, because they have a long half-life. In order to study such a possibility, a high (1500 μL) volume of a high-concentration (200 ng mL⁻¹) sample of urine was analyzed. Following this, a blank of UHQ water was injected and no signal was observed for any of the analytes. Accordingly, the washing to which the RAM had been subjected was effective, since even under the most unfavourable conditions the system did not display carryover.

3.5. Non-targeted screening analysis

All the studies performed using the proposed method led to the presetting of the most suitable parameters for the quantification of each analyte (Table 1). In order to check that the method can be used for screening purposes, it is necessary to check its ability to detect any other type of analyte that has not been preset in the chromatographic program. To accomplish this, the Data-Dependent Scan

mode (called "Auto Ms(n)" in the software used [34]) was implemented. This mode does not require the presetting of any type of parameter characteristics of the analytes (transitions, windows, etc.). The detector performs a mass scan from 60 to 400 u and, when the signal surpasses a given threshold, it starts the fragmentation, recording the whole MS/MS spectrum. The optimum fragmentation amplitude was determined empirically in an automatic way as the voltage, between 0.3 and 2.0 V, that reduced the signal of the precursor ion to 10%. Working in this mode, with a signal threshold of 150,000 ua, samples were analyzed in UHQ water—from 10 to 200 ng mL⁻¹—and in real matrices using urine spiked at 0–1000 ng mL⁻¹. In all cases we analyzed whether each of the analytes was detected, taking as a criterion: (i) whether fragmentation would begin or not and (ii) whether the characteristic MS/MS spectrum of the analyte would match the home-made library reference, (iii) observing a signal/noise ratio greater than 3. In that conditions a minimum of four identification points was assured. Fig. 6 shows the chromatogram and the spectrum obtained for a urine sample spiked with 100 ng mL⁻¹ of 245T (Fig. 6b) and the corresponding chromatogram and spectrum of the standard (Fig. 6a). All the results thus obtained are shown in Table 7. It may be seen that there are no false negatives and that the identification was correct for all the analytes up to a concentration level of 40 ng mL⁻¹ in UHQ and 60 ng mL⁻¹ in urine; these limits were improved in the case of 245T and 245TP up to levels of 10 and 20 ng mL⁻¹ respectively. Such results suggest the use of Data-Dependent Scan as a general screening method for the detection of low-molecular weight xenobiotics in urine.

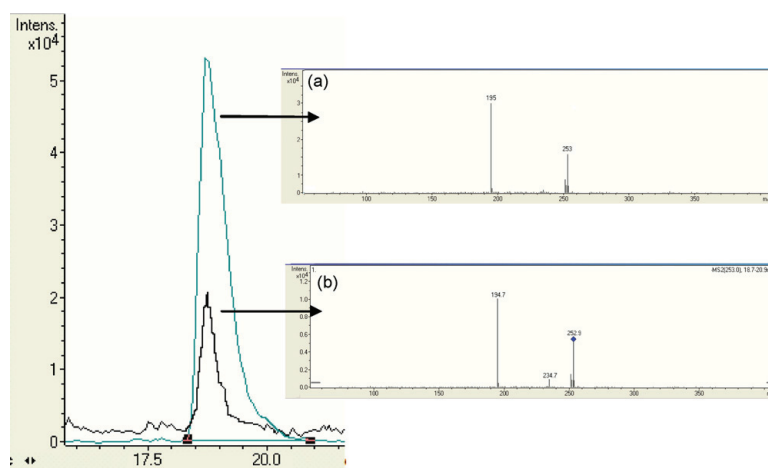


Fig. 6. Non-targeted qualitative analysis: 245T MS/MS chromatograms and spectra obtained from (a) an UHQ standard used as home-made library and (b) a urine sample spiked at 100 ng mL⁻¹.

Table 7

Performance of proposed non-targeted screening analysis for fortified UHQ water and urine samples^a.

Analyte	245T	245TP	CMPU	BPF	CLT	BPA	1NPL	DIN	TCPL
Precursor ion	253	267	185	199	211	227	143	233	195
Product ion	195	195	142	93	166	212		72	159
UHQ (ng mL ⁻¹)									
10	◆	◆	▽	▽	▽	▽	▽	▽	▽
40	◆	◆	◆	◆	◆	◆	▽	▽	◆
100	◆	◆	◆	◆	◆	◆	▽	◆	◆
200	◆	◆	◆	◆	◆	◆	▽	◆	◆
Urine (ng mL ⁻¹)									
Blank	▽	▽	▽	▽	▽	▽	▽	▽	▽
10	▽	▽	▽	▽	▽	▽	▽	▽	▽
20	◆	◆	▽	▽	▽	▽	▽	▽	▽
40	◆	◆	▽	◆	◆	▽	▽	▽	◆
60	◆	◆	◆	◆	◆	◆	▽	◆	◆
80	◆	◆	◆	◆	◆	◆	▽	◆	◆
100	◆	◆	◆	◆	◆	◆	▽	◆	◆
150	◆	◆	◆	◆	◆	◆	▽	◆	◆
200	◆	◆	◆	◆	◆	◆	▽	◆	◆
1000	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆	◆

^a ◆: Identified analyte; ▽: unidentified analyte.

4. Conclusions

The on-line configuration developed, incorporating a RAM, means that sample treatment is minimum (freezing and filtration); this has a positive effect on precision and affords a shorter analysis time. The configuration has advantages such as automation, high sensitivity and an important reduction in ion suppression. Another advantage is cost, since the half-life of the RAM allowed the injection of at least 190 samples of urine, involving a total volume 20.7 mL of urine. The method described, RAM-LC-MS/MS, is a sensitive, selective, and precise automated tool for the determination and confirmation of several different biomarkers of exposure to xenobiotic compounds in a complex matrix such as human urine. The method has been validated as a quantitative confirmatory method in accordance with the Commission Decision 2002/657/EC. Additionally, IT-MS/MS detection provided high sensitivity and selectivity, allowing limits of detection to be achieved at the low ng mL⁻¹ level. The method is therefore appropriate for application within the context of the biological monitoring of these biomarkers and as a general screening method.

Acknowledgements

The *Ministerio de Ciencia e Innovación*, Spain, (Project CTQ 2008-02200/BQU) and *Junta de Castilla y León* (Project SA017A08) are gratefully acknowledged for financial support of this work. The authors thank Dr. C. Raposo (Servicio General de Espectrometría de Masas, Universidad de Salamanca) for assessment and technical support.

References

- [1] R.L. Zielhuis, Am. J. Ind. Med. 8 (1985) 515.
- [2] L.L. Needham, A.M. Calafat, D.B. Barr, Int. J. Hyg. Environ. Health 210 (2007) 229.
- [3] D.B. Barr, L.L. Needham, J. Chromatogr. B 778 (2002) 5.
- [4] C. Aprea, C. Colosio, T. Mammone, C. Minoia, M. Maroni, J. Chromatogr. B 769 (2002) 191.

- [5] X. Ye, Z. Kukenyik, L.L. Needham, A.M. Calafat, Anal. Chem. 77 (2005) 5407.
- [6] M. Kellert, K. Scholz, S. Wagner, W. Dekant, W. Völkel, J. Chromatogr. A 1131 (2006) 58.
- [7] R. Tuyttem, F. Lemièrre, W.V. Dongen, E. Witters, E.L. Esmans, R.P. Newton, E. Dudley, Anal. Chem. 80 (2008) 1263.
- [8] F. Hernandez, M. Ibañez, J.V. Sancho, O.J. Pozo, Anal. Chem. 76 (2004) 4349.
- [9] A.A. Stolker, W. Niesing, E.A. Hogendoorn, J.F. Versteegh, R.U.A. Fuchs, Th. Brinkman, Anal. Bioanal. Chem. 378 (2004) 955.
- [10] R.L. Fitzgerald, J.D. Rivera, D.A. Herold, Clin. Chem. 45 (1999) 1224.
- [11] F. Hernandez, J.V. Sancho, M. Ibañez, C. Guerrero, Trends Anal. Chem. 26 (2007) 466.
- [12] V. Andreu, Y. Pico, Anal. Chem. 76 (2004) 2878.
- [13] J. Feitosa-Felizzola, B. Temine, S. Chiron, J. Chromatogr. A 1164 (2007) 95.
- [14] P. Sadilek, D. Satinsky, P. Solich, Trends Anal. Chem. 26 (2007) 375.
- [15] S. Souverain, S. Rudaz, J.L. Veuthey, J. Chromatogr. B 801 (2004) 141.
- [16] WHO, 1994 WHO, Environmental Health Criteria 153. Carbaryl, World Health Organization, Geneva (1994).
- [17] T. Kiely, D. Donaldson, A. Grube, US Environmental Protection Agency Pesticide Industry Sales and Usage 2000 and 2001 Market Estimates, 2004.
- [18] European Commission Decision 2455/2001/EC. Off. J. Eur. Commun. L 331/1 (2001).
- [19] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, P. Revilla-Ruiz, J. Domínguez-Álvarez, J. Chromatogr. A 990 (2003) 291.
- [20] S.K. Jana, T. Okamoto, T. Kugita, S. Namba, Appl. Catal. A 288 (2005) 80.
- [21] J.J. Collins, K. Bodner, S. Haidar, M. Wilken, C.J. Burns, L.L. Lamparski, R.A. Budinsky, G.D. Martin, M.L. Carson, Chemosphere 73 (2008) 284.
- [22] R. Bravo, L.M. Caltabiano, C. Fernández, K.D. Smith, M. Gallegos, R.D. Whitehead Jr., G. Weerasekera, P. Restrepo, A.M. Bishop, J.J. Perez, L.L. Needham, D.B. Barr, J. Chromatogr. B 820 (2005) 229.
- [23] D.B. Barr, J. Chem. Health Saf. 15 (2008) 20.
- [24] P. Panuwet, T. Prapamontol, S. Chantara, D.B. Barr, Int. J. Hyg. Environ. Health 212 (2009) 288.
- [25] W. Völkel, T. Colnot, G.A. Csanady, J.G. Filser, W. Dekant, Chem. Res. Toxicol. 15 (2002) 1281.
- [26] F. Onyemauwa, S.M. Rappaport, J.R. Sobus, D. Gajdosová, R. Wu, S. Waidyanatha, J. Chromatogr. B 877 (2009) 1117.
- [27] European Commission Decision 657/2002/EC. Off. J. Eur. Commun. L 221/8 (2002).
- [28] R.F. Straub, R.D. Voyksner, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 4 (1993) 578.
- [29] R. Kostianinen, T.J. Kauppila, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 685.
- [30] S. Wang, M. Cyronak, E. Yang, J. Pharm. Biomed. Anal. 43 (2007) 701.
- [31] K.S. Boos, C.T. Fleischer, Fresen. J. Anal. Chem. 371 (2001) 16.
- [32] E. Verdon, D. Hurtaud-Pessel, P. Sanders, Accred. Qual. Assur. 11 (2006) 58.
- [33] R. Zeleny, S. Harbeck, H. Schimmel, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 249.
- [34] LC/MSD Trap software (6.0). Agilent Technologies Inc.

**5.B. DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES
DE EFECTO MEDIANTE CROMATOGRFÍA
HIDROFÍLICA ZWITTERIÓNICA**

5.B.1. Objeto

El objeto de este apartado de la tesis es el desarrollo de un método de análisis para la separación, identificación y cuantificación a nivel de traza de biomarcadores de efecto, en particular nucleósidos y nucleobases, en muestras biológicas mediante cromatografía hidrofílica zwitteriónica. El objetivo del trabajo es desarrollar una metodología analítica automática, rápida y eficaz que permita evaluar la posible utilización de los compuestos estudiados como marcadores oncológicos.

En primer lugar, se realizará un estudio detallado del comportamiento cromatográfico, de un número limitado de nucleósidos y nucleobases, en una columna de fase inversa (PFP) y en dos columnas de interacciones hidrofílicas, una no cargada (Luna HILIC) y otra cargada (ZIC-HILIC). A la vista de los resultados obtenidos se estudiará el mecanismo de retención que tiene lugar en la fase estacionaria hidrofílica zwitteriónica (ZIC-HILIC). Se evaluará la aportación cuantitativa de las interacciones electrostáticas a la retención, para dilucidar hasta qué punto la columna objeto de estudio presenta un mecanismo de retención mixto. En resumen, se pretende explorar en profundidad los beneficios y limitaciones inherentes a la utilización de cromatografía ZIC-HILIC para el análisis de nucleósidos y nucleobases. En nuestro conocimiento, es la primera vez que se plantea un estudio de los mecanismos de retención para la separación de nucleósidos y nucleobases en ZIC-HILIC.

Seguidamente, se desarrollará una metodología analítica que incluye el acoplamiento de un RAM de naturaleza polar al sistema de cromatografía líquida (RAM-ZIC-HILIC). Este acoplamiento, que posibilita la inyección directa de la muestra biológica en el sistema cromatográfico, conlleva serias dificultades debido a la incompatibilidad entre los disolventes necesarios para eluir los analitos retenidos en el RAM y la fase móvil utilizada en ZIC-HILIC. En nuestro conocimiento, es la primera vez que se propone un acoplamiento *on-line* de dicha naturaleza. Además, el método desarrollado se validará según las normas vigentes para métodos bioanalíticos. Finalmente, el método propuesto se utilizará para analizar muestras de pacientes oncológicos con el fin de determinar el posible potencial de dicho método para ser

utilizado con fines clínicos como el diagnóstico o la monitorización del progreso de la enfermedad oncológica y la respuesta a la terapia.

A partir de los conocimientos adquiridos en el desarrollo de este apartado de la tesis se realizará un trabajo de revisión bibliográfico. En dicha revisión se mostrará el estado del arte y las nuevas tendencias en el desarrollo y aplicación de nuevos materiales para ser usados como fases estacionarias en la separación de nucleobases, nucleósidos y nucleótidos mediante cromatografía hidrofílica.

5.B.2. Introducción

5.B.2.1. Nucleósidos y nucleobases como biomarcadores

A lo largo de la última década la biología de sistemas se ha consolidado como una nueva plataforma de investigación, ocupando una posición privilegiada dentro de la investigación biomédica²⁰⁴. Una vez terminada la secuenciación del genoma han ganado interés otras ramas de la biología sistémica como la transcriptómica, la proteómica o la metabolómica. El ser humano está compuesto por unos treinta mil a cincuenta mil genes, ciento cincuenta mil a trescientos mil transcriptomas, sobre un millón de proteínas pero tan sólo de tres mil quinientos a diez mil metabolitos²⁰⁵. Comparado con el transcriptoma y el proteoma, el número de metabolitos es relativamente pequeño; sin embargo, están afectados por un gran número de dependencias, lo que conlleva que los perfiles metabólicos tengan una interpretación multidimensional. Gracias al desarrollo de las técnicas analíticas así como de los métodos bioinformáticos avanzados es posible interpretar razonablemente el metaboloma y explicar, a través de él, algunos procesos biológicos²⁰⁶. La metabolómica se ha utilizado en estudios toxicológicos²⁰⁷, en diagnóstico de errores innatos del metabolismo²⁰⁸, en diagnóstico de esclerosis lateral amiotrófica²⁰⁹ y para la identificación de metabolitos en plantas²¹⁰. Por otra parte, la metabolómica se utiliza

²⁰⁴ W. Struck, D. Siluk, A. Yumba-Mpanga, M. Markuszewski, R. Kaliszan, M.J. Markuszewski, J. Chromatogr. A 1283 (2013) 122. "Liquid chromatography tandem mass spectrometry study of urinary nucleosides as potential cancer markers"

²⁰⁵ J.O. Lay Jr., R. Liyanage, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 1046. "Problems with the "omics""

²⁰⁶ J.K. Nicholson, J.C. Lindon, Nature 455 (2008) 1054. "Systems biology: Metabonomics"

²⁰⁷ J.C. Lindon, J.K. Nicholson, E. Holmes, H. Antti, M.E. Bollard, H. Keun, O. Beckonert, T.M. Ebbels, M.D. Reily, D. Robertson, G.J. Stevens, P. Luke, A.P. Breau, G.H. Cantor, R.H. Bible, U. Niederhauser, H. Senn, G. Schlotterbeck, U.G. Sidelmann, S.M. Laursen, A. Tymiak, B.D. Car, L. Lehman-McKeeman, J.M. Colet, A. Loukaci, C. Thomas, Toxicol. Appl. Pharmacol. 187 (2003) 137. "Contemporary issues in toxicology the role of metabonomics in toxicology and its evaluation by the COMET project"

²⁰⁸ M.A. Constantinou, E. Papakonstantinou, M. Spraul, S. Sevastiadou, C. Costalos, M.A. Koupparis, K. Shulpis, A. Tsantili-Kakoulidou, E. Mikros, Anal. Chim. Acta 542 (2005) 169. "¹H NMR-based metabonomics for the diagnosis of inborn errors of metabolism in urine"

²⁰⁹ A. Kumar, B. Lakshmi, J. Kalita, U.K. Misra, R.L. Singh, C.L. Khetrpal, B.G. Nagesh, Clin. Chim. Acta 411 (2010) 563. "Metabolomic analysis of serum by (1) H NMR spectroscopy in amyotrophic lateral sclerosis"

²¹⁰ O. Fiehn, J. Kopka, R.N. Trethewey, L. Willmitzer, Anal. Chem. 75 (2000) 3573. "Identification of Uncommon Plant Metabolites Based on Calculation of Elemental Compositions Using Gas Chromatography and Quadrupole Mass Spectrometry"

cada vez más como herramienta para el diagnóstico de cáncer²¹¹ y para monitorizar la progresión de la enfermedad en respuesta a la terapia²¹².

El cáncer es una de las enfermedades más impredecibles, especialmente cuando se diagnostica en una etapa avanzada²¹³. Se han propuesto muchos marcadores para el diagnóstico del cáncer pero no se ha demostrado que ninguno de ellos sea suficientemente sensible. Por ejemplo, el antígeno carcinoembrionario, los antígenos carbohidrato 199 y 125 y la α -fetoproteína se utilizan, a día de hoy, como diagnóstico para un único tipo de cáncer, no mostrando sensibilidad suficiente como marcador general. Por otra parte, otros test de diagnóstico, como el test para el antígeno prostático específico (*PSA, Prostate-specific Antigen*), presentan escasa sensibilidad (35% de falsos negativos para PSA).

Frente al enfoque bioquímico, que se centra en un único marcador, la metabolómica, al tener en cuenta un amplio grupo de metabolitos, debería presentar mejores resultados para los falsos negativos. Además, un enfoque holístico (analizando perfiles metabólicos como reflejo del estado de salud individual) debería resultar en una respuesta más segura sobre la presencia o ausencia de cáncer.

Se ha observado que los metabolitos del ARN, esto es nucleósidos y nucleobases, pueden tener un papel significativo en la carcinogénesis y, así, el nivel de nucleósidos y nucleobases en la orina puede ser un posible marcador oncológico. La justificación de esta hipótesis está relacionada con un proceso metabólico fundamental denominado recambio del ARN. En procesos patológicos como desórdenes sanguíneos, procesos inflamatorios, SIDA y tumores malignos, la degradación del ARN es más rápida. La presencia de cáncer también produce un incremento en la actividad de la enzima metiltransferasa. Como resultado de ambos procesos (recambio del ARN y actividad

²¹¹ H. Wu, R. Xue, L. Dong, T. Liu, C. Deng, H. Zeng, X. Shen, *Anal. Chim. Acta* 648 (2009) 98. "Metabolomic profiling of human urine in hepatocellular carcinoma patients using gas chromatography/mass spectrometry"

²¹² S.H. Cho, M.H. Choi, W.Y. Lee, B.C. Chung, *Clin. Biochem.* 42 (2009) 540. "Evaluation of urinary nucleosides in breast cancer patients before and after tumor removal"

²¹³ W. Struck, M. Waszczuk-Jankowska, R. Kaliszan, M.J. Markuszewski, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 2039. "The state-of-the-art determination of urinary nucleosides using chromatographic techniques "hyphenated" with advanced bioinformatic methods"

enzimática) los nucleósidos sin modificar son reutilizados o sufren degradación metabólica hasta ácido úrico, β -alanina o β -aminoisobutirato²¹⁴. Sin embargo, los nucleósidos modificados no son degradados ni reutilizados al no existir enzimas específicas. Son, por lo tanto, desechados al torrente sanguíneo para, posteriormente, ser eliminados en la orina sin sufrir modificación previa. Las modificaciones más habituales incluyen metilación, isomerización, reducción, tiolación y desaminación.

En conclusión, los niveles anormales de nucleósidos en orina pueden correlacionarse con un incremento de recambio metabólico del ARN, en particular del ARN de transferencia (tARN), o de la actividad de la metiltransferasa, procesos ambos causados por el cáncer. En este sentido, se han encontrado más de noventa y tres nucleósidos y nucleobases diferentes en la orina²¹⁵. No obstante, esta conclusión no es clara ni definitiva. No puede concluirse inequívocamente que los pacientes con una degradación rápida del ARN sufran cáncer ya que pueden sufrir otros desórdenes asociados con un alto recambio celular como hepatitis crónica o cirrosis²¹⁶. Este hecho puede llevar a obtener falsos positivos. Sin embargo, de acuerdo con la bibliografía existente, los nucleósidos son mucho más específicos y selectivos que los marcadores tumorales empleados habitualmente.

Otro grupo importante de biomarcadores oncológicos es el formado por los productos y metabolitos del ADN dañado. De entre los posibles tipos de daño, la oxidación por especies reactivas de oxígeno (*ROS, Reactive Oxygen Species*) se considera una de las más importantes a la hora de contribuir a enfermedades oncológicas, coronarias y demás enfermedades relacionadas con el envejecimiento. Se conocen más de veinte productos de oxidación del ADN²¹⁷ siendo de especial relevancia la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OH2dG),

²¹⁴ P.A. Limbach, P.F. Crain, J.A. McCloskey, *Nucleic Acids Res* 22 (1994) 2183. "Summary: the modified nucleosides of RNA"

²¹⁵ B. Kammerer, A. Frickenschmidt, C.E. Müller, S. Laufer, C.H. Gleiter, H. Liebich, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1017. "Mass spectrometric identification of modified urinary nucleosides used as potential biomedical markers by LC-ITMS coupling"

²¹⁶ J. Yang, G. Xu, Y. Zheng, H. Kong, T. Pang, S. Lv, Q. Yang, *J. Chromatogr. B* 813 (2004) 59. "Diagnosis of liver cancer using HPLC-based metabonomics avoiding false-positive result from hepatitis and hepatocirrhosis diseases"

²¹⁷ C. Richter, J.W. Park, B.N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 (1988) 6465. "Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive"

identificada como biomarcador urinario de diferentes tipos de cáncer^{218,219}.

Un número importante de artículos de investigación han resaltado la utilización de los nucleósidos y nucleobases urinarios, especialmente los modificados, como herramienta de diagnóstico en varios tipos de cáncer, como por ejemplo leucemia²²⁰, linfoma²²¹, cáncer de mama²²², colorrectal²²³, de vejiga²²⁴, ovárico²²⁵, tiroideo²²⁶, pulmonar²²⁷ o carcinoma hepatocelular²¹⁶. Cabe destacar que el nivel de nucleósidos parece que no depende de la edad ni del sexo²²⁸ lo que sugiere que estas variables no necesitan ser tenidas en cuenta para el desarrollo de test diagnósticos. En las Tablas 5.2 y 5.3 se muestran las concentraciones encontradas para diversos nucleósidos y nucleobases urinarios en algunas publicaciones relevantes de la última década que utilizan técnicas cromatográficas, tanto para muestras control como para muestras de pacientes oncológicos.

²¹⁸ W. Gan, B. Nie, F. Shi, X.M. Xu, J.C. Qian, Y. Takagi, H. Hayakawa, M. Sekiguchi, J.P. Cai, *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2012) 1700. "Age-dependent increases in the oxidative damage of DNA, RNA, and their metabolites in normal and senescence-accelerated mice analyzed by LC-MS/MS: Urinary 8-oxoguanosine as a novel biomarker of aging"

²¹⁹ S. Mei, Q. Yao, C. Wu, G. Xu, *J. Chromatogr. B* 827 (2005) 83. "Determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by two approaches—capillary electrophoresis and GC/MS: An assay for in vivo oxidative DNA damage in cancer patients"

²²⁰ C.G. Zambonin, A. Aresta, F. Palmisano, G. Specchia, V. Liso, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 1045. "Liquid chromatographic determination of urinary 5-methyl-2'-deoxycytidine and pseudouridine as potential biological markers for leukaemia"

²²¹ T. Rasmunson, G.R. Björk, *Acta Oncol.* 34 (1995) 61. "Urinary Excretion of Pseudouridine and Prognosis of Patients with Malignant Lymphoma"

²²² Y.F. Zheng, H.W. Kong, J.H. Xiong, S. Lv, G.W. Xu, *Clin. Biochem.* 38 (2005) 24. "Clinical significance and prognostic value of urinary nucleosides in breast cancer patients"

²²³ P. Seidel, A. Seidel, O. Herbarth, *Neural Netw.* 20 (2007) 646. "Multilayer perceptron tumour diagnosis based on chromatography analysis of urinary nucleosides"

²²⁴ S. Wang, X. Zhao, Y. Mao, Y. Cheng, *J. Chromatogr. A* 1147 (2007) 254. "Novel approach for developing urinary nucleosides profile by capillary electrophoresis–mass spectrometry"

²²⁵ K.R. Kim, S. La, A. Kim, J.H. Kim, H.M. Liebich, *J. Chromatogr. B* 754 (2001) 97. "Capillary electrophoretic profiling and pattern recognition analysis of urinary nucleosides from uterine myoma and cervical cancer patients"

²²⁶ S. La, J.H. Cho, J.H. Kim, K.R. Kim, *Anal. Chim. Acta* 486 (2003) 171. "Capillary electrophoretic profiling and pattern recognition analysis of urinary nucleosides from thyroid cancer patients"

²²⁷ J.E. McEntire, K.C. Kuo, M.E. Smith, D.L. Stalling, J.W. Richens, R.W. Zumwalt, C.W. Gehrke, B.W. Papermaster, *Cancer Res.* 49 (1989) 1057. "Classification of Lung Cancer Patients and Controls by Chromatography of Modified Nucleosides in Serum"

²²⁸ H.M. Liebich, S. Müller-Hagedorn, M. Bacher, H.G. Scheel-Walter, X. Lu, A. Frickenschmidt, B. Kammerer, K.R. Kim, H. Gérard, *J. Chromatogr. B* 814 (2005) 275. "Age-dependence of urinary normal and modified nucleosides in childhood as determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography"

Tabla 5.2. Concentraciones medias de nucleósidos urinarios ($\mu\text{mol} / \text{mM}$ creatinina). Grupo Control²¹³

Nucleósido	Métodos cromatográficos				
	Feng ²²⁹	Zheng ²³⁰	Seidel ²²³	Cho ²¹²	Cho ²³¹
	n:62	n: 60	n: 41	n: 150	n: 30
Pseudouridina	22.74	22.08	52.20	13.72	13.28
Uridina	0.29	0.30	7.22	0.18	0.20
5-metil-Uridina	0.01	0.04	4.73	-	-
Citidina	0.14	0.15	26.12	0.12	0.11
N-Ac-Citidina	0.66	0.69	-	-	-
Inosina	0.29	0.28	6.83	-	-
Guanosina	0.09	0.09	-	0.07	0.07
Dimetil-Guanosina	1.23	1.25	0.56	0.29	0.34
Xantosina	-	-	27.38	-	-
Adenosina	0.51	0.52	6.56	0.21	0.23
1-metil-Adenosina	2.03	2.04	7.49	1.66	1.62
6-metil-Adenosina	0.03	0.04	0.89	-	-
1-metil-Inosina	1.19	1.25	5.22	-	-
1-metil-Guanosina	0.79	0.82	1.81	-	-
2-Metilguanosa	0.55	0.55	2.28	-	-

²²⁹ B. Feng, M.H. Zheng, Y.F. Zheng, A.G. Lu, J.W. Li, M.L. Wang, J.J. Ma, G.W. Xu, B.Y. Liu, Z.H. Zhu, J. Gastroenterol. Hepatol. 20 (2005) 1913. "Normal and modified urinary nucleosides represent novel biomarkers for colorectal cancer diagnosis and surgery monitoring"

²³⁰ Y.F. Zheng, J. Yang, X.J. Zhao, B. Feng, H.W. Kong, Y.J. Chen, S. Lv, M.H. Zheng, G.W. Xu, World J. Gastroenterol. 11 (2005) 3871. "Urinary nucleosides as biological markers for patients with colorectal cancer"

²³¹ S.H. Cho, B.H. Jung, S.H. Lee, W.Y. Lee, G. Kong, B.C. Chung, Biomed. Chromatogr. 20 (2006) 1229. "Direct determination of nucleosides in the urine of patients with breast cancer using column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry"

Tabla 5.3. Concentraciones medias de nucleósidos urinarios ($\mu\text{mol} / \text{mM}$ creatinina). Pacientes oncológicos²¹³

Nucleósido	Métodos cromatográficos				
	Feng ²²⁹	Zheng ²³⁰	Seidel ²²³	Cho ²¹²	Cho ²³¹
	n:52	n: 52	n: 68	n: 150	n: 30
Pseudouridina	39.63	42.19	79.73	11.14	18.17
Uridina	0.25	0.31	9.96	0.20	0.20
5-metil-Uridina	0.11	0.13	6.83	-	-
Citidina	0.3	0.43	141.64	0.13	0.11
N-Ac-Citidina	0.85	0.84	-	-	-
Inosina	0.43	0.50	5.56	-	-
Guanosina	0.08	0.10	-	0.10	0.09
Dimetil-Guanosina	1.71	1.81	3.96	0.55	0.49
Xantosina	-	-	22.52	-	-
Adenosina	0.66	0.66	10.59	0.27	0.24
1-metil-Adenosina	2.76	2.74	15.54	2.83	2.54
6-metil-Adenosina	0.04	0.07	1.54	-	-
1-metil-Inosina	2.16	2.76	12.42	-	-
1-metil-Guanosina	1.37	1.44	3.35	-	-
2-Metilguanósina	0.62	0.63	4.52	-	-

Por otro parte, es importante señalar que también pueden encontrarse niveles altos de nucleósidos y nucleobases en orina en ciertos estados fisiológicos, no patológicos, como pueden ser el embarazo o en etapas de crecimiento. Debe también enfatizarse que el uso clínico de los nucleósidos urinarios en el diagnóstico del cáncer está aún en fase de estudio y confirmación, obteniéndose aún resultados dispares (Tablas 5.2 y 5.3), y que cualquier resultado obtenido debe ser respaldado con otros métodos habituales de diagnóstico.

5.B.2.2. Nucleósidos y nucleobases estudiados

El gran número de nucleósidos y nucleobases modificados conocidos (≈ 100) hace necesario realizar una selección previa. En este estudio, se han elegido compuestos modificados por metilación e hidroxilación dado que estas son las modificaciones más comunes, así

como compuestos sin modificar. En las Figuras 5.5, 5.6 y 5.7 se muestran los analitos estudiados en este trabajo.

Nucleósidos y nucleobases sin modificar

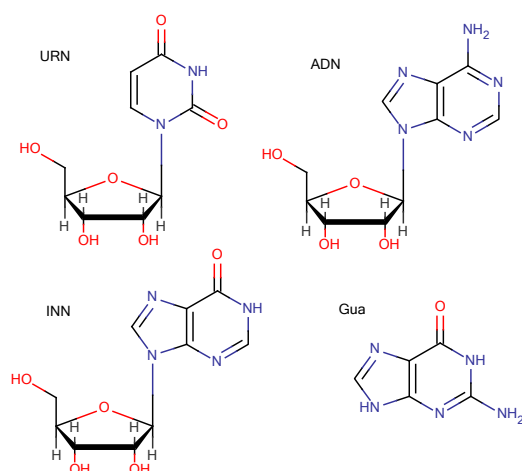


Figura 5.5. Nucléosidos y nucleobases sin modificar estudiados en este trabajo: Uridina (URN), Adenosina (ADN), Inosina (INN) y Guanina (Gua)

Nucleósidos y nucleobases modificados por metilación

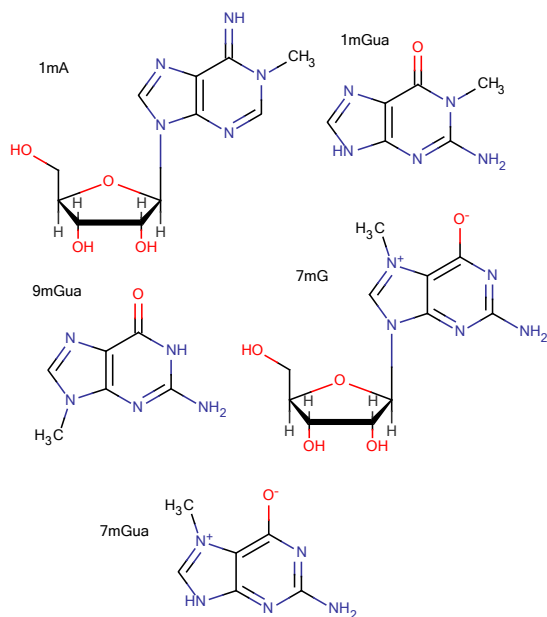


Figura 5.6. Nucléosidos y nucleobases modificados por metilación estudiados en este trabajo: 1-metiladenosina (1mA); metilguaninas (mGua) y 7-metilguanosina (7mG)

Nucleósidos y nucleobases modificados por hidroxilación

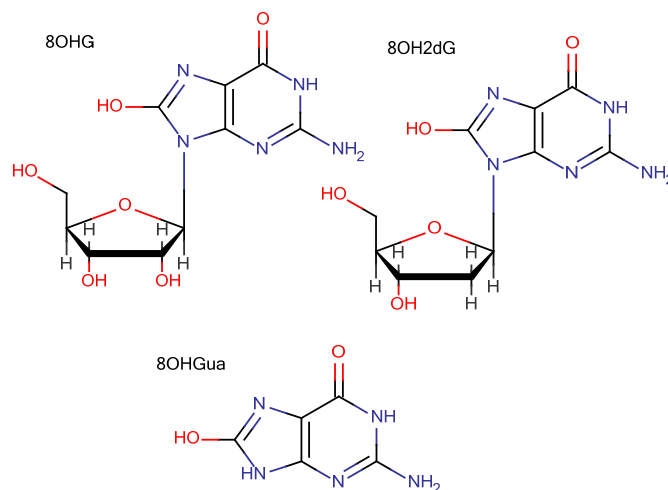


Figura 5.7. Nucléosidos y nucleobases modificados por hidroxilación estudiados en este trabajo: 8-hidroxi-guanosina (8OHG), 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OH2dG) y 8-hidroxi-guanina (8OHGua)

En todos los casos, los compuestos estudiados han sido previamente propuestos en bibliografía como posibles marcadores de diversos procesos oncológicos, así como otras dolencias.

La primera determinación de nucleósidos y nucleobases en orina fue propuesta por Gehrke et al.²³² en 1978. Estos autores describieron la determinación de seis nucleósidos mediante HPLC con detección espectrofotométrica. Desde entonces se han propuesto diversos métodos basados en inmunoensayo²³³, electroforesis capilar²³⁴ y, principalmente, cromatografía líquida²⁰⁴. Respecto a esta última técnica, la separación de los nucleósidos, altamente polares, presenta importantes dificultades para su separación en RPLC, debido a la pobre retención que presentan estos analitos en la fase estacionaria. Como alternativa, HILIC ha demostrado ser una alternativa viable para la determinación en orina de compuestos de polaridad similar²³⁵.

²³² C.W. Gehrke, K.C. Kuo, G.E. Davis, R.D. Suits, T.P. Waalkes, E. Borek, J. Chromatogr. 150 (1978) 455. "Quantitative high-performance liquid chromatography of nucleosides in biological materials"

²³³ A.J. Sasco, F. Rey, C. Reynaud, J.Y. Bobin, M. Clavel, A. Nivelau, Cancer Lett. 108 (1996) 157. "Breast cancer prognostic significance of some modified urinary nucleosides"

²³⁴ Y. Jiang, Y. Ma, Anal. Chem. 81 (2009) 6474. "A Fast Capillary Electrophoresis Method for Separation and Quantification of Modified Nucleosides in Urinary Samples"

²³⁵ F. Qin, Y.Y. Zhao, M.B. Sawyer, X.F. Li, Anal. Chem. 80 (2008) 3404. "Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Determination of Estrogen Conjugates in Human Urine"

Respecto al tratamiento de muestra, la mayoría de los procedimientos propuestos están basados en la aplicación de SPE de afinidad^{236,237}. El sorbente utilizado está formado por grupos fenilborónicos que retienen a los compuestos con un grupo cis-diol, lo que proporciona una gran selectividad. Sin embargo, este procedimiento no permite el análisis de nucleósidos que no presentan el grupo cis-diol, como por ejemplo 8OH2dG, ni de nucleobases, como 7mGua, entre otras²³⁸.

En cuanto a la detección, en la actualidad la espectrometría de masas es el método más utilizado, debido a su sensibilidad y exactitud. En estudios no dirigidos, centrados en analizar cambios en la huella metabólica y encontrar nuevos metabolitos, el analizador de tiempo de vuelo es el más utilizado²³⁹. En el caso de estudios dirigidos específicamente al análisis de nucleósidos y nucleobases, el analizador más utilizado es el triple cuadropolo, debido principalmente a que estos estudios generalmente están enfocados a la cuantificación y a la búsqueda de diferencias cuantitativas. El número de publicaciones con este enfoque es amplio, algunas de las cuales se centran específicamente en estudiar los patrones de fragmentación y la identificación de los nucleósidos y nucleobases^{240,241}.

²³⁶ E. Dudley, S. El-Sharkawi, D.E. Games, R.P. Newton, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 19 (2000) 545. "Development of a Purification Procedure for the Isolation of Nucleosides from Urine Prior to Mass Spectrometric Analysis"

²³⁷ R. Tuytten, F. Lemière, E.L. Esmans, W.A. Herrebout, B.J. van der Veken, B.U.W. Maes, E. Witters, R.P. Newton, E. Dudley, *Anal. Chem.* 79 (2007) 6662. "Role of Nitrogen Lewis Basicity in Boronate Affinity Chromatography of Nucleosides"

²³⁸ H.Y. Li, S.M. Wang, H.M. Liu, S.S. Bu, J. Li, D. Han, M.Z. Zhang, G.Y. Wu, *J. Mass Spectrom.* 44 (2009) 641. "Separation and identification of purine nucleosides in the urine of patients with malignant cancer by reverse phase liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry"

²³⁹ E.J. Want, I.D. Wilson, H. Gika, G. Theodoridis, R.S. Plumb, J. Shockcor, E. Holmes, J.K. Nicholson, *Nat. Protocols* 5 (2010) 1005. "Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC-MS"

²⁴⁰ E. Dudley, F. Lemière, W. van Dongen, R. Tuytten, S. El-Sharkawi, A.G. Brenton, E.L. Esmans, R.P. Newton, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 2730. "Analysis of urinary nucleosides. IV. Identification of urinary purine nucleosides by liquid chromatography/electrospray mass spectrometry"

²⁴¹ A. Bond, E. Dudley, F. Lemière, R. Tuytten, S. El-Sharkawi, A.G. Brenton, E.L. Esmans, R.P. Newton, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 137. "Analysis of urinary nucleosides. V. Identification of urinary pyrimidine nucleosides by liquid chromatography/electrospray mass spectrometry"

5.B.3. Estudio sobre la aplicación de cromatografía HILIC zwitteriónica para la separación de nucleósidos y nucleobases modificados

Se considera que el mecanismo de retención en HILIC está basado en el reparto entre la fase móvil, rica en componente orgánico, y la capa de agua inmovilizada sobre la fase estacionaria³. Sin embargo, en muchos casos, el mecanismo de retención es mixto, apareciendo otra clase de interacciones como enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas e interacciones dipolo-dipolo que contribuyen significativamente a la separación⁹.

Cualquier fase estacionaria polar con capacidad para retener agua es susceptible de ser utilizada en HILIC. Aunque las primeras aplicaciones se basaron en la utilización de sílice sin modificar, el creciente interés en el análisis de compuestos polares impulsó rápidamente el desarrollo de fases estacionarias más específicas¹¹. Así, el mecanismo de retención en HILIC depende tanto de las características de la fase estacionaria como de las interacciones específicas que pueden presentar los analitos estudiados²³.

Entre las diferentes columnas disponibles comercialmente, un grupo interesante es el formado por las que presentan ligandos zwitteriónicos unidos a sílice (ZIC-HILIC) o a un sustrato polimérico (ZIC-pHILIC). Introducidas por SeQuant/Merck, estas columnas están formadas por grupos cargados de signo opuesto presentando, de forma global, naturaleza neutra. Por ejemplo, la columna ZIC-HILIC de SeQuant/Merck está formada por un grupo de amonio cuaternario y un grupo sulfonato (sulfobetaina, Figura 5.8).

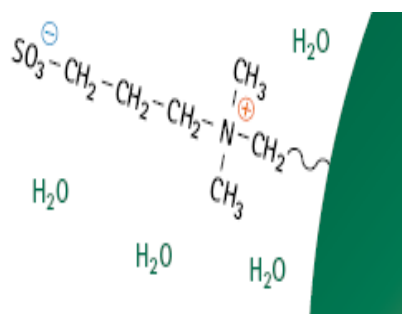


Figura 5.8. Naturaleza de la fase estacionaria en una columna ZIC-HILIC de SeQuant/Merck

Se ha demostrado que este tipo de fases estacionarias presentan, para analitos iónicos, interacciones electrostáticas débiles además de la interacción HILIC habitual. Gracias a esto, la fase estacionaria ZIC-HILIC ha sido aplicada con éxito en el análisis de compuestos ácidos, básicos y zwitteriónicos²⁴². Aunque el mecanismo de retención en ZIC-HILIC ha sido estudiado previamente^{243,244}, estos estudios son aún escasos, pudiendo considerarse que el mecanismo de retención en esta fase estacionaria aún no ha sido completamente dilucidado.

Como analitos-prueba para este estudio se han seleccionado compuestos modificados por metilación e hidroxilación dado que estas son las modificaciones más comunes. Como estructura de la base se seleccionó guanina, por ser la más estudiada y abundante. Se seleccionaron así: 1-metil-guanina (1mGua), 7-metil-guanina (7mGua), 9-metil-guanina (9mGua), 8-hidroxi-guanina (8OHGua), 8-hidroxi-guanosina (8OHG) y 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OH2dG). En la Tabla VI.2 (Pág. 273) se muestran algunas propiedades físicas y químicas de los compuestos estudiados. Una propiedad clave para justificar el comportamiento de estos compuestos es su valor de pK_a en el medio en el que tiene lugar la separación cromatográfica. Los valores encontrados en bibliografía abarcan un gran intervalo; hecho causado, principalmente, porque los nucleósidos y nucleobases modificados

²⁴² R.I. Chirita, C. West, S. Zubrzycki, A.L. Finaru, C. Elfakir, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 5939. "Investigations on the chromatographic behaviour of zwitterionic stationary phases used in hydrophilic interaction chromatography"

²⁴³ Y. Guo, S. Gaiki, J. Chromatogr. A 1074 (2005) 71. "Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography"

²⁴⁴ D.V. McCalley, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 3408. "Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionised solutes in hydrophilic interaction chromatography"

(MNN, *Modified Nucleosides and Nucleobases*) presentan múltiples formas tautoméricas con diferentes valores microscópicos de pK_a . Se han encontrado valores en el intervalo 3.1–3.3 para la guanina y -0.1–0.2 para MNN hidroxilados^{245,246}. Adicionalmente a los datos encontrados en bibliografía, se calcularon experimentalmente los valores de pK_a , en el medio en el que tiene lugar la separación cromatográfica: 80% ACN / 20% H₂O. La determinación espectrofotométrica se realizó siguiendo el método de Albert y Serjeant²⁴⁷. Para ello se midieron los valores de absorbancia al variar el pH de la disolución. En todo este estudio se midieron valores de w^w pH, obtenidos calibrando el pHmetro con tampones acuosos y realizando las medidas antes de la adición del componente orgánico. No se midió, en ningún caso, el pH aparente obtenido tras la adición de la fase orgánica (w^s pH). Se encontraron valores de pK_a 3.2, 3.3 y 3.9 para 7mGua, 9mGua y 1mGua, respectivamente. Sin embargo, no fue posible determinar experimentalmente los valores de pK_a de los MNN hidroxilados, lo que pone de manifiesto que estos analitos no se encuentran cargados a los valores de w^w pH estudiados.

5.B.3.1. Separación cromatográfica de MNN y compatibilidad con ESI-MS en RPLC, HILIC y ZIC-HILIC

Se realizó, en primer lugar, un estudio comparativo de la separación cromatográfica de los MNN seleccionados en columnas de fase inversa (PFP), HILIC (Luna HILIC) y ZIC-HILIC. Las características de las columnas utilizadas se muestran en la Tabla VI.1 (Pág. 272).

Los resultados obtenidos en este estudio comparativo se muestran en la Figura VI.1 (Pág. 274). Puede observarse como, en RPLC, una fase móvil formada por un 90% de componente acuoso (Fig. VI.1.a₁) no produjo una separación satisfactoria de los analitos, que presentaron una retención muy pobre ($k < 0.8$). Fue necesario aumentar el componente

²⁴⁵ Y.H. Jang, W.A. Goddard III, K.T. Noyes, L.C. Sowers, S. Hwang, D.S. Chung, Chem. Res. Toxicol. 15 (2002) 1023. "First Principles Calculations of the Tautomers and pK_a Values of 8-Oxoguanine: Implications for Mutagenicity and Repair"

²⁴⁶ V. Verdolino, R. Cammi, B.H. Munk, H.B. Schlegel, J. Phys. Chem. B 112 (2008) 16860. "Calculation of pK_a Values of Nucleobases and the Guanine Oxidation Products Guanidinohydantoin and Spiroiminodihydantoin using Density Functional Theory and a Polarizable Continuum Model"

²⁴⁷ A. Albert, E.P. Serjeant, Chapman and Hall (1984). "The determination of ionization constants: a laboratory manual"

acuoso hasta el 95% para obtener retenciones aceptables ($0.2 < k < 2.2$) y, aun en estas condiciones, se produjo la coelución de los dos MNN retenidos en menor medida (Fig. VI.1.a₂).

En el caso de la columna Luna HILIC, al emplear una fase móvil formada por un 80% de ACN y un 20% de una disolución acuosa 2.6 mM de ácido fórmico ($w^w\text{pH}$: 3.1), los analitos estudiados mostraron una mayor retención que en RPLC ($k < 1.2$). Sin embargo, la resolución encontrada no fue satisfactoria (Fig. VI.1.b₁). El incremento del ACN hasta el 90% produjo aún mayores retenciones ($1.6 < k < 3.0$) pero sin producir un aumento apreciable de la resolución, manteniéndose la coelución de dos parejas de analitos (Fig. VI.1.b₂).

Finalmente, con una fase móvil formada por un 80% de ACN y un 20% de una disolución acuosa 2.6 mM de ácido fórmico ($w^w\text{pH}$: 3.1), la columna ZIC-HILIC presentó retenciones aceptables ($1.6 < k < 3.2$). Cabe destacar la alta selectividad mostrada por la columna ZIC-HILIC en comparación con PFP y Luna HILIC, produciéndose la resolución de los seis MNN estudiados en un tiempo inferior a 14 minutos (Fig. VI.1.c).

Para los seis compuestos estudiados el orden de elución fue diferente en la columna de RPLC, en comparación con el obtenido en las columnas HILIC y ZIC-HILIC. Este hecho pone ya de manifiesto la importancia de las interacciones hidrofílicas en la separación para dichas columnas. Cabe destacar que no se encontró relación directa entre el número de grupos hidroxilo de la molécula y la retención obtenida, relación que sí se ha encontrado para otras moléculas²⁴⁸.

En resumen, las mejores condiciones en cuanto a la separación cromatográfica de los seis MNN estudiados se encontraron con RPLC (separación de cinco MNN) y ZIC-HILIC (separación de seis MNN). Sin embargo, con RPLC, es necesario utilizar un alto contenido de componente acuoso en la fase móvil (95%). Este hecho tiene un efecto negativo en la sensibilidad cuando se utiliza ESI dado que la ionización es menos efectiva cuando se introducen disolventes con alto contenido acuoso. La Tabla VI.3 (Pág. 275) muestra las señales obtenidas,

²⁴⁸ A. Yanagida, H. Murao, M. Ohnishi-Kameyama, Y. Yamakawa, A. Shoji, M. Tagashira, T. Kanda, H. Shindo, Y. Shibusawa, J. Chromatogr. A 1143 (2007) 153. "Retention behavior of oligomeric proanthocyanidins in hydrophilic interaction chromatography"

utilizando ESI-MS como detección, cuando el eluyente cromatográfico está formado por un 95% de agua (separación RPLC) o por un 20% (separación ZIC-HILIC). Puede observarse como las señales obtenidas en ZIC-HILIC, con relación a las de RPLC, varían un orden de magnitud, con relaciones entre 10 y 23. De manera similar, las relaciones señal-ruido obtenidas en ZIC-HILIC frente a RPLC presentan relaciones entre 8 y 26.

5.B.3.2. Efecto de la naturaleza y contenido de componente orgánico en la fase móvil en ZIC-HILIC

Se estudió la separación de los seis MNN utilizando como componente orgánico de la fase móvil un disolvente polar prótico (MeOH) y un disolvente polar aprótico (ACN). El MeOH puede actuar como aceptor y dador de enlaces de hidrógeno mientras que el ACN solo puede actuar como aceptor, aunque produce interacciones dipolo-dipolo más fuertes. La importancia de este estudio radica en que algunos autores han sugerido que los disolventes próticos pueden competir por los residuos polares de la fase estacionaria, impidiendo la correcta formación de la capa acuosa ligada necesaria para que se produzca el mecanismo de retención por partición²⁴⁹. Los factores de retención, frente al porcentaje y naturaleza del componente orgánico presente en la fase móvil, se muestran en la Figura 5.9.

²⁴⁹ M. Liu, J. Ostovic, E.X. Chen, N. Cauchon, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 2362. “Hydrophilic interaction liquid chromatography with alcohol as a weak eluent”

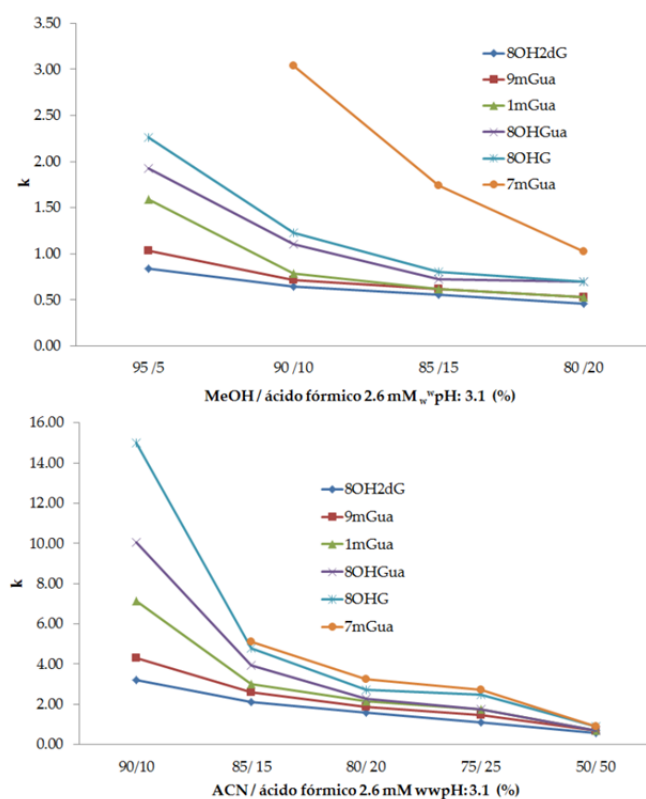


Figura 5.9. Factores de retención (k') obtenidos en la columna ZIC-HILIC para la separación de los seis analitos estudiados según la naturaleza del componente orgánico de la fase móvil

Los resultados demostraron que el MeOH se comporta como un disolvente más fuerte que el ACN. Los factores de retención encontrados fueron siempre menores para el MeOH, no encontrándose variación en el orden de elución de los analitos. El porcentaje de ACN óptimo se fijó en un 80%. Porcentajes superiores produjeron retenciones demasiado fuertes, obteniéndose tiempos de análisis de 40 minutos para un 85% y de 75 minutos para un 90%.

5.B.3.3. Efecto del pH de la fase móvil en ZIC-HILIC

La naturaleza de la fase estacionaria en ZIC-HILIC, basada en sílice, restringe el intervalo de pH que puede estudiarse de 3 a 8. Así, se estudiaron w^w pHs desde 3.1 (ácido fórmico 2.6 mM) hasta 6.7 (formiato

amónico 2.5 mM) con valores intermedios de 3.8, 4.7 y 5.7 (tampón ácido fórmico / formiato amónico 2.5 mM). En todos los casos la concentración de ion amonio se mantuvo constante, en 2.5 mM, añadiendo a la disolución concentraciones variables de perclorato amónico.

La Figura VI.2 (Pág. 275) muestra los cromatogramas obtenidos a w^w pHs de 3.1, 4.8 y 6.7. La identificación de los picos se confirmó, en todos los casos, con ESI-MS. La comparación de los cromatogramas a w^w pH: 3.1 (Fig. VI.2.a) y 4.8-6.7 (Fig. VI.2.b y VI.2.c) permite concluir que los MNN hidroxilados no presentan carga en el intervalo de w^w pH de 3.1 a 6.7. Sin embargo, a w^w pH: 3.1, los MNN metilados presentan carga positiva, como puede deducirse por la variación de sus tiempos de retención. Esta teoría está apoyada por los valores de pK_a encontrados en bibliografía y calculados experimentalmente.

La retención para los MNN metilados es mayor cuando están cargados (Fig. VI.2.a) que cuando no tienen carga (Fig. VI.2.b y VI.2.c). Este comportamiento es consistente con un mecanismo basado en partición dado que las formas cargadas han de presentar mayor solubilidad en la capa acuosa ligada a la fase estacionaria. Igualmente, la interacción electrostática con el residuo de sulfobetaína de la fase estacionaria ha de ser mayor para las moléculas cargadas positivamente. El comportamiento experimental sugiere que la interacción electrostática ocurre principalmente con el grupo sulfónico terminal y no con el grupo amónico interior, muy impedido estéricamente.

En cuanto a la separación de los MNN, puede realizarse a cualquier valor de w^w pH entre 3.1 y 6.7, aunque se obtiene una resolución ligeramente superior a w^w pH más ácidos. Por otra parte, la ionización en ESI es mucho más favorable si los analitos alcanzan dicha fuente de ionización cargados o a pHs a los que puedan cargarse con más facilidad. Así, puede observarse en la Tabla VI.3 (Pág. 275) como el cambio de w^w pH de 3.1 a 6.7, manteniendo constante la concentración de sales, conlleva la obtención de una señal analítica entre 7 y 14 veces menor.

5.B.3.4. Efecto de la concentración de sales en la fase móvil en ZIC-HILIC

Cuando se trabaja con fases estacionarias ZIC-HILIC el número de sales disponibles es muy limitado debido al alto contenido en componente orgánico de la fase móvil. Así, sólo pueden utilizarse sales que presenten una solubilidad aceptable en medio orgánico como percloratos o sales orgánicas.

En HILIC, el incremento en la concentración de sales conlleva, normalmente, un incremento en la retención²⁴³. En ZIC-HILIC pueden aparecer, además, otros efectos debidos a la carga^{250,251}. Para bajas concentraciones de sales se produce un equilibrio, en la fase estacionaria, entre los analitos cargados y los cationes de la fase móvil (intercambio iónico).

Se analizaron estos efectos variando la concentración de sales de 0.25 mM a 200 mM para perclorato amónico y de 0.25 mM a 5.0 mM para perclorato potásico (debido a su baja solubilidad). Ambos estudios se realizaron a w^w pHs de 3.1 y 6.7. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras VI.3 (Pág. 276) y VII.1 (Pág. 283).

Para altas concentraciones de amonio, superiores a 50 mM (Fig. VI.3.a y VII.1.a), se observa un incremento en la retención para todos los MNN estudiados, lo que está de acuerdo con las características de un mecanismo de retención por partición. El alto contenido en componente orgánico de la fase móvil conlleva que las sales se localicen, principalmente, en la fase acuosa ligada a la fase estacionaria. Así, altas concentraciones de sales producirían un incremento en el volumen o hidrofiliidad de la capa acuosa, atrayendo a las analitos solvatados, provocando así una mayor retención.

Para bajas concentraciones (inferiores a 2.5 mM), tanto de amonio como de potasio, los MNN no cargados, es decir los hidroxilados a cualquier w^w pH y los metilados a w^w pH 6.7, presentan valores de retención relativamente constantes (7mGua a w^w pH 6.7 en Fig. VI.3.a; 8OH2dG en Fig. VI.3.a y VI.3.b y Fig. VII.3.b). Sin embargo, los MNN

²⁵⁰ A.J. Alpert, Anal. Chem. 80 (2008) 62. "Electrostatic Repulsion Hydrophilic Interaction Chromatography for Isocratic Separation of Charged Solutes and Selective Isolation of Phosphopeptides"

²⁵¹ G. Marrubini, B.E. Castillo Mendoza, G. Massolini, J. Sep. Sci. 33 (2010) 803. "Separation of purine and pyrimidine bases and nucleosides by hydrophilic interaction chromatography"

cargados, es decir, los metilados a w^w pH 3.1, muestran un importante incremento en su retención (7mGua a w^w pH 3.1 en Fig. VI.3.a y Fig. VI.3.b y Fig. VII.1.a).

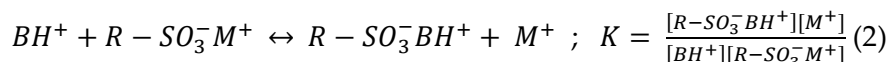
Este incremento, que sólo aparece para MNN cargados (9mGua, 1mGua y 7mGua), demuestra la existencia de un mecanismo de retención por interacciones electrostáticas para estos analitos.

5.B.3.5. Evaluación cuantitativa de la contribución de la interacción electrostática a la retención en ZIC-HILIC

La retención de los analitos cargados (BH^+) en el grupo sulfónico de la columna ZIC-HILIC ($R-SO_3^-$) puede ser descrita por la constante de interacciones electrostáticas, denominada k_{EI} . Esta constante es equivalente, a través de la relación de fases, a la constante de distribución del analito entre la fase estacionaria y la disolución (1).

$$k_{EI} = \frac{[R-SO_3^- BH^+]}{[BH^+ + B]} \quad (1)$$

Puesto que en dicha retención intervienen los cationes de la sal presente en la fase móvil (M^+) puede plantearse el siguiente equilibrio (2) cuya constante es K.



Así, operando con las constantes definidas en (1) y (2), se encuentra que las interacciones electrostáticas deben ajustarse a la ecuación (3), similar a la descrita previamente por McCalley^{244,252}, donde A engloba los valores constantes, siendo K_a la constante de acidez del analito.

$$k_{EI} = A \frac{1}{[M^+]} ; A \propto \frac{K[R-SO_3^- M^+]}{1 + K_a/[H^+]} \quad (3)$$

De acuerdo con (3), la representación de los factores de retención encontrados experimentalmente (k_{exp}) frente al inverso de la concentración de sales en la fase móvil ($[M^+]^{-1}$) debe ser una relación lineal, con una pendiente proporcional a A y con ordenada en el origen

²⁵² A. Kumar, J.P. Hart, D.V. McCalley, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 3854. "Determination of catecholamines in urine using hydrophilic interaction chromatography with electrochemical detection"

igual a cero, siempre y cuando la interacción electrostática sea el único mecanismo de retención presente. Experimentalmente (Fig. VI.4, Pág. 276), los valores encontrados para concentraciones de amonio y potasio entre 0.25 mM y 2.5 mM (que se corresponden con valores de $[M^+]^{-1}$ de 4000 a 400 M^{-1}) se ajustan a una ecuación polinomial de segundo orden (Tabla VII.1, Pág. 283). Cabe destacar que la ordenada en el origen es, en todos los casos, diferente de cero, lo que demuestra la existencia de otros mecanismos de retención además de los electrostáticos.

Por lo tanto, teniendo en cuenta que los factores de retención experimentales (k_{exp}) deben ser la suma de las contribuciones electrostáticas (k_{EI}) y no electrostáticas (k_{NEI}) se puede escribir:

$$k_{exp} = k_{EI} + k_{NEI} \quad (4)$$

Y sustituyendo (3) en (4), se obtiene:

$$k_{exp} = A \frac{1}{[M^+]} + k_{NEI} \quad (5)$$

Así, de acuerdo con las ecuaciones (4) y (5), la ordenada en el origen de los ajustes polinomiales de segundo orden permite calcular la contribución de cualquier mecanismo no electrostático a la retención (k_{NEI}). Cuando $[M^+]^{-1} \rightarrow 0$, existe una hipotética concentración infinita de sales (si $[M^+]^{-1} \rightarrow 0$, entonces $[M^+] \rightarrow \infty$) y, por lo tanto, existiría una hipotética competición infinita de las sales de la fase estacionaria frente a los analitos cargados por los sitios electrostáticamente activos de la fase estacionaria, lo que eliminaría totalmente la contribución electrostática al mecanismo de retención y permitiría calcular los valores de k_{NEI} . Cabe señalar que dichos valores se determinan por extrapolación y, por tanto, tienen una precisión limitada.

A partir de los valores de k_{NEI} pueden calcularse por diferencia (ecuación 4) los valores correspondientes de k_{EI} (Tabla VII.2, Pág. 283) y, a partir de estos, la contribución porcentual (%EI) de la interacción electrostática al mecanismo global de retención (ecuación 6).

$$\%EI = \frac{k_{EI}}{k_{exp}} \cdot 100 \quad (6)$$

Se calculó así el %EI para cada MNN metilado, para un intervalo de concentraciones de sales entre 0.25 y 2.5 mM (Tabla VII.2, Pág. 283). Para la concentración de sales más baja, 0.25 mM, la contribución de la

interacción electrostática varió entre el 25% y el 52% para amonio y entre el 26% y el 49% para potasio. La contribución electrostática disminuye progresivamente al aumentar la concentración de sales obteniéndose, para una concentración de 2.5 mM, contribuciones que variaron entre el 6% y el 23% para amonio y entre el 6% y el 16% para potasio, dependiendo de la nucleobase estudiada. Estos resultados son similares a los descritos por McCalley para cuatro compuestos básicos²⁴⁴ y para catecolaminas²⁵². Cabe destacar que los valores de k_{NEI} han sido calculados a partir de una extrapolación y, de acuerdo con esto, los valores porcentuales de contribución electrostática a la retención deben ser tomados como una aproximación cuantitativa.

En cuanto a la separación, los resultados obtenidos permiten concluir que la presencia de iones cargados positivamente no conlleva una mejora significativa de la separación de los MNN estudiados. Considerando que las sales pueden incrementar la supresión iónica, disminuyendo la sensibilidad, el medio más apropiado para la separación de estos analitos es el que contiene una concentración 2.6 mM de ácido fórmico, de w^w pH: 3.1, sin necesidad de añadir iones de amonio o potasio.

5.B.3.6. Efecto de la temperatura en ZIC-HILIC

Recientemente, Hao et al.²⁵ han propuesto que siempre y cuando el mecanismo de retención sea de partición, los factores de retención al variar la temperatura deben ajustarse a la ecuación de Van't Hoff (7).

$$\ln k = -\frac{\Delta H^\circ}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (7)$$

La Tabla VI.4 (Pág. 276) muestra los resultados obtenidos para temperaturas entre 20°C y 60°C (5 puntos de calibración). Se obtuvo una buena correlación para las nucleobases modificadas por metilación. Los valores de entalpía encontrados para estos tres analitos fueron negativos (lo que indica que el proceso de retención es exotérmico) y compatibles con los valores esperados para un mecanismo de partición. Sin embargo, los resultados para los MNN hidroxilados no se ajustaron a la ecuación de Van't Hoff. Este hecho puede estar relacionado con la presencia de grupos hidroxilo en la molécula y su capacidad para formar enlaces de

hidrógeno. Así, la presencia de un mayor número de grupos hidroxilo (uno en 8OHGua, tres en 8OH2dG y cuatro en 8OHG) producen una mayor desviación del comportamiento ideal esperado para un mecanismo de partición y descrito por la ecuación de Van't Hoff.

En lo que respecta a la separación, la variación en la temperatura no se mostró como un factor crítico. Ni la eficiencia ni la selectividad se vieron significativamente afectadas. Se fijó así una temperatura de 20°C para la separación de los MNN estudiados en ZIC-HILIC.

5.B.3.7. Efecto del flujo cromatográfico en ZIC-HILIC

Como puede deducirse de la ecuación de Van Deemter (8), el flujo cromatográfico afecta directamente a la eficiencia de la columna.

$$HETP = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (8)$$

Se realizó un estudio de este efecto analizando 22 flujos cromatográficos desde 0.1 mL min⁻¹ hasta 2.0 mL min⁻¹ para dos de los analitos estudiados (9mGua y 8OHG). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.10.

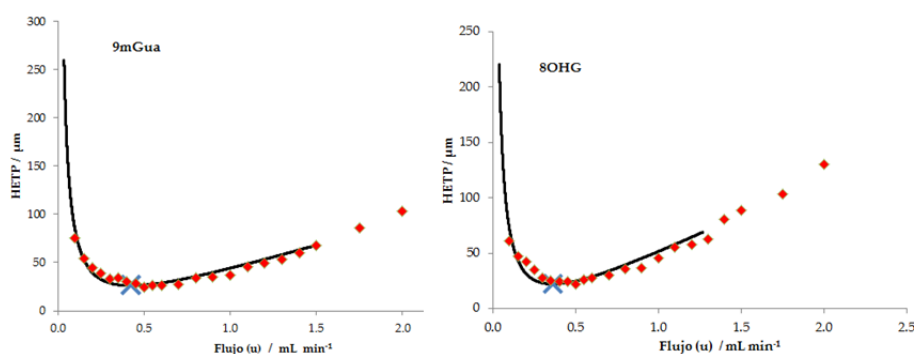


Figura 5.10. Gráficos de Van Deemter obtenidos en el análisis de 9mGua y 8OHG

Los coeficientes de correlación para el ajuste de la curva teórica fueron 0.947 para 9mGua y 0.955 para 8OHG. Para ambos MNN, el mínimo experimental para la altura equivalente de plato teórico (*HETP*, *Height Equivalent to a Theoretical Plate*) se encontró para un flujo

cromatográfico próximo a 0.5 mL min^{-1} . Como efecto lateral, el incremento en el flujo produjo el correspondiente aumento de la presión. Así, para un flujo de 0.5 mL min^{-1} la presión fue de 55 bar, para 1.0 mL min^{-1} de 121 bar y para 2.0 mL min^{-1} de 204 bar. Estos datos experimentales permiten fijar el flujo óptimo de separación en 0.5 mL min^{-1} . Con este flujo cromatográfico se obtiene un valor de HETP de $20 \mu\text{m}$ (equivalente a 50000 N/m), con un tiempo total de análisis de 15 minutos.

5.B.3.8. Efecto de la inyección en ZIC-HILIC

Una ventaja importante de HILIC, comparado con RPLC, es la posibilidad de inyectar muestras con un alto contenido de disolvente orgánico, sin que esto afecte a la separación y simetría de los picos cromatográficos. Los procedimientos habituales de extracción, preconcentración y limpieza de muestra, esenciales para el análisis de compuestos traza en muestras complejas como es el caso del análisis de MNN²⁵³, suelen generar una disolución predominantemente orgánica por lo que se hace necesario incorporar una etapa de evaporación y redisolución. Esta etapa puede evitarse inyectando directamente el extracto orgánico en HILIC. Como disolvente orgánico de inyección, se ha sugerido el uso de ACN como la mejor opción aunque también puede optarse por utilizar mezclas ACN / isopropanol, si se detectan problemas de solubilidad. En todo caso, se ha demostrado que debe evitarse inyectar proporciones de agua superiores al 10%²⁵⁴.

En la Figura VI.5 (Pág. 277) se muestran los cromatogramas obtenidos al efectuar la inyección en distintos medios y con distintos volúmenes. La separación y simetría de los picos fue satisfactoria para las inyecciones en medio 100% orgánico ($5 \mu\text{L}$ de ACN, Fig. VI.5.a y $50 \mu\text{L}$ de ACN, Fig. VI.5.b). El área de pico encontrado mostró una relación lineal frente al volumen inyectado (r^2 de 0.986 a 0.997, 6 puntos de

²⁵³ W.Y. Hsu, W.D. Lin, Y. Tsai, C.T. Lin, H.C. Wang, L.B. Jeng, C.C. Lee, Y.C. Lin, C.C. Lai, F.J. Tsai, Clin. Chim. Acta 412 (2011) 1861. "Analysis of urinary nucleosides as potential tumor markers in human breast cancer by high performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry"

²⁵⁴ J. Ruta, S. Rudaz, D.V. McCalley, J.L. Veuthey, D. Guillarme, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 8230. "A systematic investigation of the effect of sample diluent on peak shape in hydrophilic interaction liquid chromatography"

calibración), demostrando así la capacidad de carga de la columna. Por otra parte, la inyección de 50 μL de ACN / H_2O (1/1, v/v) generó, como era de esperar, un deterioro importante de la separación y de la simetría de los picos (Fig. VI.5.c). Sin embargo, cuando se realiza la inyección de 5 μL en un medio 100% acuoso (Fig. VI.5.d), la separación y simetría de las señales cromatográficas es similar, aunque ligeramente inferior, a la obtenida en medio orgánico.

La Figura VI.6 (Pág. 277) muestra los cromatogramas obtenidos utilizando espectrometría de masas y detección por UV cuando se realiza la inyección de 5 μL de una muestra de orina pretratada según la metodología propuesta por Li et al.²⁵⁵. Para ello, el cartucho de SPE se eluye con fase móvil (80% ACN / 20% ácido fórmico 2.6 mM) y el eluato, sin necesidad de evaporación ni redisolución, se inyecta directamente en HILIC. Los cromatogramas obtenidos indican que ZIC-HILIC puede utilizarse para el análisis de MNN en muestras de orina.

5.B.3.9. Reproducibilidad en ZIC-HILIC

Una de las desventajas más conocidas de NPLC es su falta de reproducibilidad²⁴³. Para determinar la precisión de la separación optimizada con la columna ZIC-HILIC se analizaron tres muestras, durante tres días consecutivos, realizando siete inyecciones por día. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4. Reproducibilidad de algunos parámetros cromatográficos en ZIC-HILIC

MNN	t_r / min	RSD / %	Area / mUA	RSD / %
8OH2dG	7.4	1.2	121	2.7
9mGua	8.2	1.9	1076	0.7
1mGua	8.8	1.2	354	3.1
8OHGua	9.2	2.1	583	1.9
8OHG	10.6	1.2	218	3.7
7mGua	12.4	2.4	501	1.6

²⁵⁵ H.Y. Li, S.M. Wang, H.M. Liu, J. Li, D. Han, S.S. Bu, M.Z. Zhang, Rapid Commun. Mass Spectrom. 22 (2008) 3161. "Analysis of modified nucleosides in the urine of patients with malignant cancer by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry"

Para los tiempos de retención las desviaciones fueron inferiores al 2.5%. En cuanto a la señal analítica, para las áreas de pico cromatográfico, se obtuvieron RSDs inferiores al 4%.

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN VI
Journal of Chromatography A 1218 (2011) 3994



Study of retention behaviour and mass spectrometry compatibility in zwitterionic hydrophilic interaction chromatography for the separation of modified nucleosides and nucleobases

Encarnación Rodríguez-Gonzalo*, Diego García-Gómez, Rita Carabias-Martínez

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 March 2011

Received in revised form 14 April 2011

Accepted 3 May 2011

Available online 11 May 2011

Keywords:

Zwitterionic hydrophilic interaction

chromatography (ZIC-HILIC)

Sulfobetaine stationary phase

Modified nucleosides and nucleobases

Methylguanines

Hydroxyguanosines

Oxidative stress

ABSTRACT

A study has been made of the chromatographic behaviour of modified nucleosides and nucleobases using different stationary phases with functional groups of polar nature, all of them compatible with aquoorganic mobile phases. The stationary phases assayed were a pentafluorophenylpropyl (PFP) column for reverse phase separation, and another two for hydrophilic interaction chromatography (HILIC) separation. Six modified nucleosides and nucleobases (hydroxylated and methylated derivatives) were chosen as the target analytes. In the study, chromatographic resolution as well as the sensitivity in detection by mass spectrometry were taken into account. The results obtained showed that the zwitterionic (ZIC-HILIC) column was the most suitable one for the separation of these analytes. From the study of the different parameters affecting separation it may be concluded that in the ZIC-HILIC column separation is based on a mechanism of partition and interaction through weak electrostatic forces.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Oxidative stress is defined as cellular damage caused by reactive oxygen species (ROS). These species are continually being produced as a result of the cell's metabolism and their production may be increased as a result of exposure to xenobiotics or to radiation [1]. ROS interact with and modify several biomolecules, especially DNA, lipids and proteins [1]. DNA lesions are of special importance because they can alter the sequence of nucleotides. The natural mechanisms for DNA repair involve the excision of the damaged bases or nucleosides [2]. The products thus released cannot be reused and circulate freely through the blood until they are eliminated in the urine [3]. Additionally, the action of hydrolytic enzymes such as ribonucleases and phosphatases releases normal and modified nucleosides during RNA turnover [4], a process that is enhanced by the presence of different types of tumours [5]. Thus, modified nucleosides and nucleobases (MNN) arise mainly from the post-transcriptional modification of the nucleosides forming transfer RNA (tRNA) [6]. Around 100 MNN related to these metabolic processes have been detected to date [7].

Studies have addressed the potential of MNN as markers of several diseases [8,9], and, mainly, as early markers of different types

of cancer [10–14]. Other studies have related the urinary concentration of MNN to different life styles [15].

Among the most widely studied MNN are the methylation or hydroxylation products of guanosine; this is because they are the most abundant [16–18]. Simultaneous determination of both groups of MNN (hydroxylated and methylated) is of great interest since the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis brought about by the oxidation and methylation processes are different [19].

The analytical techniques most widely employed for the simultaneous determination include capillary electrophoresis [20], immunoassay [21] and, mainly, liquid chromatography (HPLC) [22]. UV detection [23] has been replaced by mass spectrometry (MS) [13,24], which allows a surer identification and confirmation as well as affording structural information about the compounds being assayed.

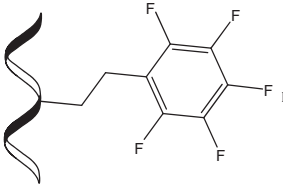
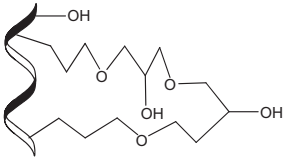
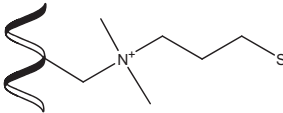
The analysis of highly polar compounds, such as MNN, involves important difficulties in reverse phase liquid chromatography (RPLC) owing to the poor retention of these analytes in the stationary phase. Normal phase liquid chromatography (NPLC) would afford a better retention but is not desirable owing to the difficulty involved in coupling this chromatographic technique with mass spectrometry. Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) is a viable alternative to RPLC for the separation of polar compounds. HILIC, a term coined by Alpert [25], is based on the use of polar stationary phases combined with mobile phases with a high organic content and a small amount of water. In addition, HILIC has the

* Corresponding author. Fax: +34 923 294 574.

E-mail address: erg@usal.es (E. Rodríguez-Gonzalo).

Table 1

Characteristics of the chromatographic columns used for the analysis of the modified nucleosides and nucleobases.

Chromatographic column	Dimensions (mm)	Pore size (Å)	Particle size (µm)	Stationary phase
Luna PFP(2)	150 × 4.6	100	3	 Pentafluorophenylpropyl
Luna HILIC	150 × 4.6	200	3	 Cross-linked diol
ZIC-HILIC	150 × 4.6	100	3.5	 Sulfobetaine

advantage of enhanced detection sensitivity when used in conjunction with MS due to the high organic content of the mobile phase, which allows efficient spraying and desolvation in electrospray ionization (ESI). The applications of HILIC include the analysis of different polar molecules, especially those of biological nature [26]. In recent years, new possibilities have emerged with the development of stationary phases specific to HILIC, such as zwitterionic hydrophilic interaction chromatography (ZIC-HILIC) columns [27].

The aim of the present work was to study the chromatographic behaviour shown by different MNN, compounds of similar and very high polarity, using a pentafluorophenylpropyl (PFP) reverse phase column and two polar columns based on cross-linked diol (Luna-HILIC) and sulfobetaine (ZIC-HILIC). The MNN selected were 8-hydroxy-guanine, 8-hydroxy-guanosine, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 1-methyl-guanine, 7-methyl-guanine and 9-methyl-guanine. The ZIC-HILIC column showed the highest selectivity. The optimum conditions were chosen bearing in mind resolution and sensitivity in later detection by means of mass spectrometry. Using this column, a detailed study was performed to elucidate the mechanisms involved in the retention of the analytes.

In sum, this study explores the benefits and limitations of using HILIC for the analysis of MNN. To our knowledge, no other work has attempted to study the mechanisms of retention, for the separation of MNN using ZIC-HILIC.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Analytical standards of 8-hydroxy-guanine (8OHGua), CAS RN [5614-64-2] and 8-hydroxy-guanosine (8OHG), CAS RN [3868-31-3] were purchased from Cayman Chemical (Michigan, USA). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OH2dG), CAS RN [88847-89-6]; 9-methyl-guanine (9mGua), CAS RN [5502-78-3]; 1-methyl-guanine (1mGua), CAS RN [938-85-2] and 7-methyl-guanine (7mGua), CAS RN [578-76-7] were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

The organic solvents – acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH) – were of HPLC grade (Merck, Darmstadt, Germany) and were used as received. Ultra-high quality (UHQ) water was obtained with a Wasserlab (Noain, Spain) Ultramatic water purification system. All other chemicals were of analytical reagent grade.

2.2. Instrumentation

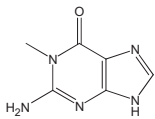
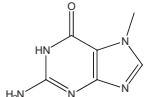
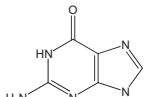
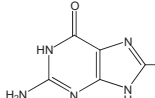
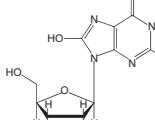
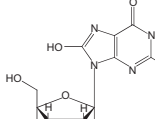
HPLC analyses were performed on a HP 1100 Series chromatograph from Agilent (Waldbronn, Germany). The Diode Array Detector (DAD) recorded the spectra in the 190–400 nm range. The Agilent single quadrupole LC/MSD SL mass spectrometer was equipped with an electrospray (ESI) source. The analytical columns were a reverse phase Luna PFP(2) packed with 3 µm particles and a Luna HILIC packed with 3 µm particles from Phenomenex (Torrance, CA, USA) and a ZIC-HILIC packed with 3.5 µm particles from Merck (Darmstadt, Germany). The characteristics of the chromatographic columns used are shown in Table 1. w^w pH values were determined with a 691 pH Meter from Metrohm (Herisau, Switzerland).

2.3. Preparation of standards

The initial stock solutions for the 1mGua, 7mGua, 9mGua (500 µg mL⁻¹) and for the 8OH2dG and 8OHG standards (150 µg mL⁻¹) were prepared in acidified UHQ water. The stock solution for 8OHGua (150 µg mL⁻¹) was prepared in 0.1 M sodium hydroxide. These stock solutions were stored at 4 °C in brown glass bottles. Working solutions were prepared daily at 5 µg mL⁻¹ for 1mGua, 7mGua and 9mGua, and 3 µg mL⁻¹ for 8OH2dG, 8OHG and 8OHGua.

The mobile phase was a mixture of organic solvent and an aqueous medium at different pH values and with different concentrations of salts. To measure w^w pH values, the pH meter was calibrated using aqueous buffers and pH measurements were performed before the addition of organic solvent. The apparent w^s pH, after adding the organic solvent, was not measured.

Table 2
Physical properties of the modified nucleosides and nucleobases analyzed.

Modified nucleosides and nucleobases	Mw	log D^a_{pH3}	Structure
1-Methyl-guanine (1mGua)	165.07	-1.4	
7-Methyl-guanine (7mGua)	165.07	-1.8	
9-Methyl-guanine (9mGua)	165.07	-1.4	
8-Hydroxy-guanine (8OHGua)	167.04	-1.5	
8-Hydroxy-guanosine (8OHG)	299.09	-1.9	
8-Hydroxy-2'-deoxy-guanosine (8OH2dG)	283.09	-1.3	

^a Calculated using ChemBioDraw Ultra 12.0 from CambridgeSoft by Crippen's and Viswanadhan's fragmentations and Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) software.

3. Results and discussion

The high number of known MNN (approx. 100) means that some of them must be selected as a model to study their behaviour in HILIC. In the present case, we chose hydroxylated and methylated forms because these are the commonest modifications. As the base structure, we chose guanine, the most studied and abundant base as regard a possible relationship between the modified nucleosides and different diseases. Some of the physical and chemical properties of the six MNN studied are shown in Table 2. The pK_a values reported in the literature for these compounds lie within a broad interval. This is because the nucleobases and their derivatives present multiple tautomers with different site-specific microscopic pK_a values. Thus, values of 3.1–3.3 for guanine and values of -0.1 to 0.2 for hydroxylated-MNN were found [28,29]. In addition, pK_a values were experimentally calculated by UV spectrophotometry [30], measuring absorbance at different w^w pH values in a 80% ACN: 20% H₂O medium; values of 3.2, 3.3 and 3.9 for 7mGua, 9mGua and 1mGua, respectively, were found. However, it was not possible to determine the pK_a values for the hydroxylated-MNN.

3.1. Reversed phase chromatography and HILIC for the separation of modified nucleosides and nucleobases

Using the three chromatographic columns indicated in Section 2, a study was made of the chromatographic behaviour of the six analytes selected (Fig. 1).

A mobile phase with an aqueous phase of 90% in RPLC (Fig. 1a₁) did not afford a satisfactory separation of the analytes, retention being almost completely absent ($k < 0.8$) for all the MNN.

It was necessary to increase the aqueous phase up to 95% (Fig. 1a₂) to obtain significant retentions, and even under these conditions the coelution of two sparingly retained analytes occurred ($0.2 < k < 2.2$).

When a Luna HILIC column was used employing 20% formic acid 2.6 mM (w^w pH = 3.1); 80% ACN, the analytes exhibited greater retention than in RPLC ($k < 1.2$), but the resolution was not satisfactory (Fig. 1b₁). A decrease in the proportion of aqueous solvent to 10% (Fig. 1b₂) allowed appropriate retentions to be obtained ($1.6 < k < 3.0$), although two pairs of MNN coeluted.

The ZIC-HILIC column with a mobile phase containing 20% of aqueous phase (Fig. 1c) afforded suitable retentions ($1.6 < k < 3.2$).

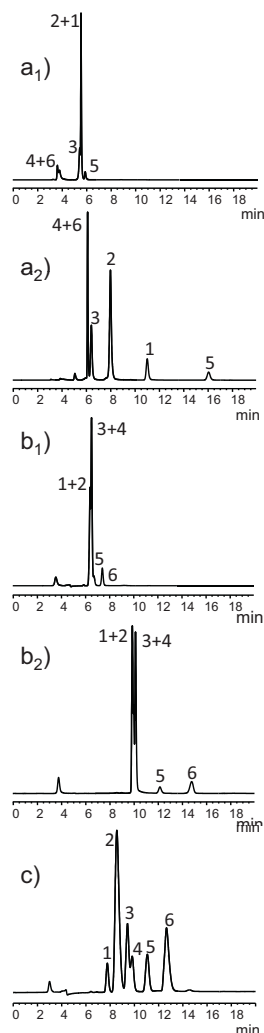


Fig. 1. UV chromatograms obtained by the analysis of the modified nucleosides and nucleobases using isocratic elution. By RPLC using 90% formic acid 2.6 mM w^w pH = 3.1: 10% ACN (a₁) and 95% formic acid 2.6 mM w^w pH = 3.1: 5% ACN (a₂). By Luna HILIC using 20% formic acid 2.6 mM w^w pH = 3.1: 80% ACN (b₁) and 10% formic acid 2.6 mM w^w pH = 3.1: 90% ACN (b₂). By ZIC-HILIC using 20% formic acid 2.6 mM w^w pH = 3.1: 80% ACN (c). Analyte identification: (1) 8OH2dG, (2) 9mGua, (3) 1mGua, (4) 8OHGua, (5) 8OHG and (6) 7mGua. Column temperature: 20 °C. Chromatographic flow rate: 0.5 mL min⁻¹. Detection: DAD 254 nm.

The high selectivity of the ZIC-HILIC column should be noted, since it resolved the six MNN in a total analysis time of less than 14 min.

For all six compounds studied, the order of elution in RPLC was different from that observed in Luna HILIC and ZIC-HILIC columns. In the latter two, hydrophilic interactions play an important role in the separation. No correlation was observed between the number of hydroxyl groups of the molecule and the retention observed, a relationship, however, that has been found for other molecules [31].

For the analytes studied, the best conditions as regard separation were obtained with RPLC (separation of five MNN) and with ZIC-HILIC (separation of all six MNN). However, with RPLC it was

necessary to use a high water content in the mobile phase, usually above 90% (Fig. 1a₂). This has a negative effect in mass spectrometry when it is used as the method of detection because solvents with a high water content produce a less efficient ionization in the electrospray ionization (ESI). Table 3 shows the signal ratio obtained, using mass spectrometry with a single quadrupole, when the chromatographic eluent has a water content of 20% (ZIC-HILIC separation) or of 95% (RPLC separation). The relationship between both signals varied by one order of magnitude, between 10- and 23-fold (ratio I/II). Likewise, the signal/noise ratios observed (data not shown) were between 8- and 26-fold higher with ZIC-HILIC than with RPLC.

3.2. Separation of modified nucleosides and nucleobases in ZIC-HILIC

In light of the results obtained, the ZIC-HILIC column was selected for all the later studies since it seems to offer the optimum possibilities for analysis of the MNN. Alpert proposed a partition mechanism between aqueous layer associated with the stationary phase, and the organic phase to explain separation in HILIC [25]. However, later studies have shown that the mechanism of retention involves more complex equilibria [32]. Moreover, the presence of charged sites in the stationary phase in ZIC-HILIC would propitiate the appearance of other retention mechanisms. All these factors prompted us to study the different factors that could affect the separation of the MNN.

3.2.1. Effect of the nature and content of the organic phase

A study was made of analyte separation in a typical protic polar solvent, in this case MeOH, and an aprotic polar solvent, ACN. MeOH can act as a donor and an acceptor of hydrogen bonds, whereas ACN can act as an acceptor of hydrogen bonds and furthermore provides stronger dipole-dipole interactions. It has been suggested that protic polar solvents are able to compete for the polar sites of the stationary phase disturbing the formation of the aqueous layer required for the partition mechanism [33]. This leads to a more hydrophobic aqueous stationary phase, whose consequence is a poor retention of analytes with a high capacity to form hydrogen bonds. The results obtained, upon varying composition of the mobile phase for ACN or MeOH/2.6 mM formic acid (pH: 3.1) mixtures, show that for all the analytes MeOH acted as a stronger solvent than ACN. Thus the retention factors were always lower with MeOH, although the order of elution persisted in both cases. Optimum separation was achieved with a mobile phase made up of 80% ACN: 20% formic acid 2.6 mM (w^w pH = 3.1). For higher percentages of ACN (>80%), very strong retentions occurred and the analysis time being more than 40 min for a percentage of 85% of ACN and 75 min for a percentage of 90%.

3.2.2. Effect of buffer pH

The nature of the stationary phase in ZIC-HILIC restricts the range that can be used to pH 3–8. We assessed its performance from w^w pH = 3.1 (2.6 mM formic acid) to 6.7 (2.5 mM ammonium formate) with intermediate points at 3.8, 4.7 and 5.7 (2.5 mM formic acid/ammonium formate buffer, setting ammonium concentration to 2.5 mM with ammonium perchlorate). Fig. 2 shows the chromatograms obtained at w^w pH: 3.1, 4.8 and 6.7. In these experiments, confirmation of the identity of the analytes was achieved with ESI-MS. Comparison of the chromatograms at w^w pH = 3.1 (Fig. 2a) and 4.8–6.7 (Fig. 2b and c) allowed us to conclude that hydroxylated-MNN were not charged in the range of pH from 3.1 to 6.7. However, at w^w pH = 3.1, methylated-MNN were positively charged as can be deduced from the variation in their retention times. This theory is supported by the pK_a values found in the literature [28,29], and by those pK_a values obtained experimentally by us. The retention of these MNN is greater in the positively

Table 3

Comparison between mass spectrometric signals of the modified nucleosides and nucleobases studied using different elution solvents in ZIC-HILIC and RPLC separation.

Modified nucleosides and nucleobases	MS signal ^a			Ratio I/II	Ratio I/III
	ZIC-HILIC acid ^b (I)	RPLC acid ^c (II)	ZIC-HILIC neutral ^d (III)		
8OH2dG	4.6×10^7	2.0×10^6	4.6×10^6	23	10
9mGua	3.0×10^9	3.0×10^8	4.1×10^8	10	7.3
1mGua	7.2×10^8	3.2×10^7	5.1×10^7	22	14
8OHGua	1.2×10^8	8.5×10^6	1.3×10^7	14	9.4
8OHG	2.5×10^8	1.1×10^7	3.0×10^7	23	8.3
7mGua	4.0×10^8	2.6×10^7	3.3×10^7	15	12

^a ESI settings: capillary voltage: +3500 V; drying gas flow: 10 L min⁻¹; temperature: 350 °C; nebulizer pressure: 50 psi. Signals as chromatographic areas in Selected Ion Monitoring (SIM) mode for: 284, 166, 168 and 300 m/z.

^b Mobile phase: 20% 2.6 mM formic acid (*w*^wpH = 3.1); 80% ACN.

^c Mobile phase: 95% 2.6 mM formic acid (*w*^wpH = 3.1); 5% ACN.

^d Mobile phase: 20% 2.6 mM ammonium formate (*w*^wpH = 6.7); 80% ACN.

charged form (Fig. 2a) than in their neutral form (Fig. 2b and c). This behaviour is consistent with a mechanism based on partition, since the protonated forms would be more soluble in the aqueous phase retained on the stationary phase. Likewise, the electrostatic interactions with the residue of sulfobetaine of the stationary phase would be greater in the case of positively charged molecules. The electrostatic interactions would thus occur mainly with the terminal sulfonic group and not with the interior ammonium group, which is clearly sterically hindered.

Regarding the separation of the MNN, it can be accomplished at any *w*^wpH values from 3.1 to 6.7, but better resolution was obtained

at more acidic pHs. Moreover, the electrospray ionization is much more favourable if the analytes arrive at the ionization system at a *w*^wpH where they are easily charged. Thus, it is seen that a change in *w*^wpHs from 6.7 to 3.1, maintaining the same concentration of salts, elicited an increase in the signal varying between 7.3- and 14-fold (Table 3, ratio I/III).

3.2.3. Effect of the salt concentration

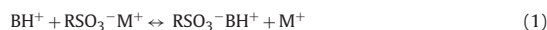
Owing to the high organic content of the mobile phase in ZIC-HILIC, the number of salts available is limited to those showing an acceptable solubility in organic medium, like perchlorate or organic salts.

In HILIC columns, the increase in salt concentration usually leads to an increase in retention [34]. Additionally, other effects may appear in ZIC-HILIC [35,36], since when working at low salt concentrations a displacement equilibrium is established between charged analytes and the cations of the mobile phase in the stationary phase (ion exchange).

These effects were assessed varying the salt concentration from 0.25 to 200 mM for ammonium perchlorate and from 0.25 to 5.0 mM for potassium perchlorate (because of its poor solubility) at *w*^wpHs of 3.1 and 6.7.

At high salt concentrations, above 50 mM (Fig. 3a), an increase in retention occurs for all MNN at any *w*^wpHs, in agreement with the characteristics of a partition mechanism. The high organic content of the mobile phase led the salts to be located mainly in the aqueous phase bound to the stationary phase of the column. Thus, high concentrations could have produced an increase in the volume or hydrophilicity of the aqueous layer, attracting the solvated MNN and causing a greater retention of the analytes.

At low salt concentrations, methylated-MNN at a *w*^wpH where they are not charged (Fig. 3a: 7mGua, *w*^wpH = 6.7) and hydroxylated-MNN at any *w*^wpH (Fig. 3a and b: 8OH2dG) keep relatively constant retention values. However, for positively charged methylated-MNN (Fig. 3a and b: 7mGua, *w*^wpH = 3.1), an increase in retention occurs, indicating that if analytes are in its protonated form, an electrostatic interaction occurs. Starting out from equilibrium (1), whose equilibrium constant is *K*, where BH⁺ are the charged analytes, whose acid–base ionization constant is *K_a*, and M⁺ represents the cations of the salts present:



It has been reported [32] that electrostatic interactions fit Eq. (2):

$$k_{el} = A \frac{1}{[\text{M}^+]} \quad (2)$$

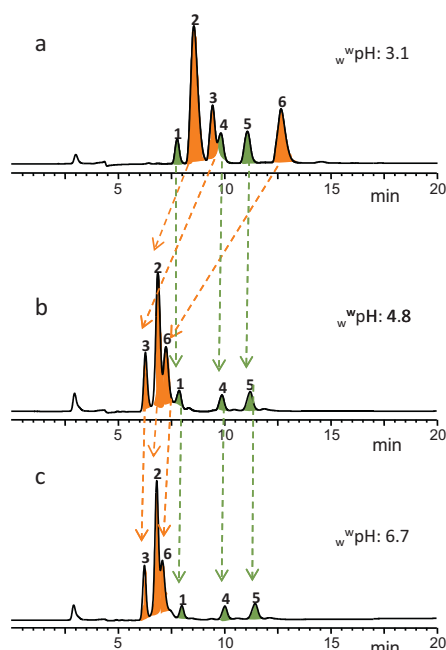


Fig. 2. UV chromatograms, normalized to the highest peak, obtained using isocratic elution 20% formic acid: 80% ACN at *w*^wpH = 3.1 (a); 20% formic acid/ammonium formate buffer 2.5 mM: 80% ACN at *w*^wpH = 4.8 (b); and 20% ammonium formate 2.5 mM: 80% ACN at *w*^wpH = 6.7 (c). Analyte identification as in Fig. 1. Column temperature: 20 °C. Chromatographic flow rate: 0.5 mL min⁻¹. Detection: DAD 254 nm. Peak identification confirmed by ESI-MS.

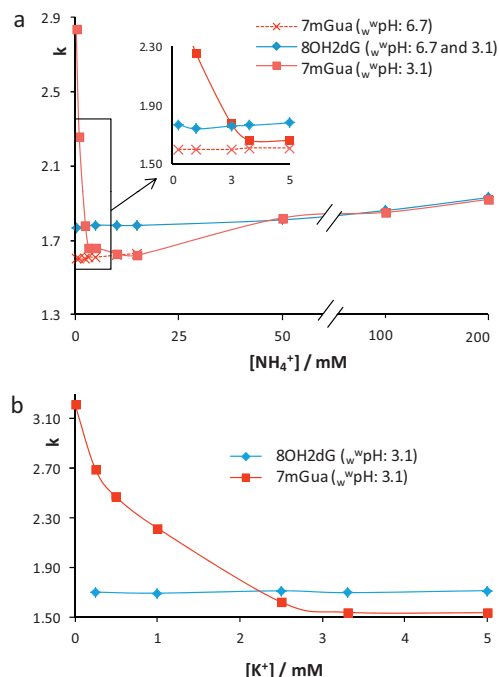


Fig. 3. Retention factors for 7mGua and 8OH2dG, plotted versus salt concentration, obtained using 20% ammonium perchlorate: 80% ACN (a) and 20% potassium perchlorate: 80% ACN (b). Column temperature: 20 °C. Chromatographic flow rate: 0.5 mL min⁻¹.

where A is a constant similar to that described by McCalley [32]:

$$A \propto \frac{K[\text{RSO}_3^- \text{M}^+]}{1 + K_a/[\text{H}^+]} \quad (3)$$

Accordingly, a plot of the experimental retention factors (k_{exp}) against the inverse of the salt concentration ($[\text{M}^+]^{-1}$) should be a straight line, proportional to A , with the ordinate at the origin being zero if electrostatic interactions are the only retention mechanism (Eq. (2)). Experimentally, the values found for ammonium and potassium salt concentrations of 0.25–2.5 mM (corresponding to $[\text{M}^+]^{-1}$ values ranging from 4000 to 400 M⁻¹) fitted a second-order polynomial equation (Fig. 4). The presence of other non-electrostatic retention mechanisms (e.g. partition mechanism) was indicated by the fact that values for the ordinate at the origin are different from zero and a straight line was not obtained.

The results obtained show that the presence of salt and the increase in its concentration do not elicit any significant improvement in the separation of the MNN. If it is also considered that the presence of salts can increase ion suppressions in the possible detection by mass spectrometry, sensitivity thus decreasing, it is possible to set 2.6 mM formic acid in the absence of salts as the most appropriate medium for these analytes.

3.2.4. Effect of temperature

The Van't Hoff equation has been proposed as a way to relate the retention factor and temperature. Likewise, it has been suggested that if the retention mechanism in HILIC is a mechanism of partition, then the Van't Hoff equation must be fulfilled [37]. Table 4 shows the results obtained upon modifying the column

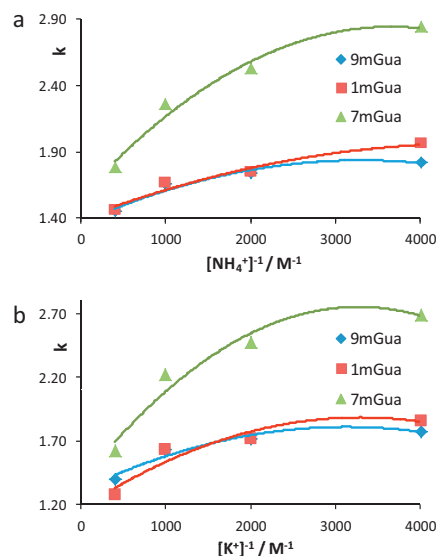


Fig. 4. Retention factors for methylated-MNN, plotted versus the inverse of salt concentration, obtained using 20% ammonium perchlorate (with formic acid, 2.6 mM at $w^w\text{pH}$ =3.1): 80% ACN (a), and 20% potassium perchlorate (with formic acid 2.6 mM at $w^w\text{pH}$ =3.1): 80% ACN (b). Column temperature: 20 °C. Chromatographic flow rate: 0.5 mL min⁻¹.

temperature between 20 °C and 60 °C (5 calibration points). A good correlation was obtained for the nucleobases modified by methylation, negative enthalpy values being observed for the three analytes. Accordingly, the retention process is exothermic, and its values seem to be compatible with a partition mechanism. However, the nucleosides and the nucleobases modified by hydroxylation do not fit the Van't Hoff equation. This can be related to the presence of hydroxyl groups and their ability to form hydrogen bonds. Thus, the presence of a greater number of hydroxyl groups (one in 8OHGua, three in 8OH2dG and four in 8OHG) produces a larger deviation from the ideal behaviour of a partition mechanism that could be described by the Van't Hoff equation.

Regarding separation, variations in temperature did not seem to be critical. Neither the efficiency nor the selectivity of the separation was significantly affected. Thus, a temperature of 20 °C can be considered optimum for performing the separation of the MNN studied.

Table 4

Effect of temperature on ZIC-HILIC separation of the modified nucleosides and nucleobases analyzed. Thermodynamic parameters calculated from the Van't Hoff equation.^a

Modified nucleosides and nucleobases	r^2	Slope (K)	ΔH° (kJ mol ⁻¹)
8OH2dG	0.430	–	–
9mGua	0.987	480	–4.0
1mGua	0.900	325	–2.7
8OHGua	0.739	–	–
8OHG	0.288	–	–
7mGua	0.970	440	–3.7

^a Isocratic elution: 80% ACN: 20% formic acid 2.6 mM ($w^w\text{pH}$ =3.1). Temperature: variable from 20 to 60 °C. Flow rate: 0.5 mL min⁻¹. Injection: 50 μ L in ACN.

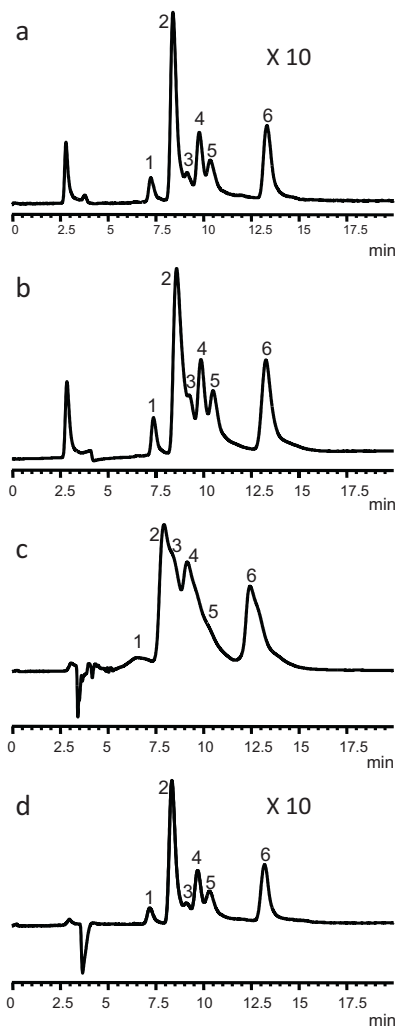


Fig. 5. UV chromatograms obtained using isocratic elution 20% formic acid 2.6 mM w/w pH=3.1: 80% ACN for a working standard solution at $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ for methylated-MNN and $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ for hydroxylated-MNN. Column temperature: 20°C . Chromatographic flow rate: 0.5 mL min^{-1} . Detection: DAD 254 nm. Injection of $5 \mu\text{L}$ in ACN (a); $50 \mu\text{L}$ in ACN (b); $50 \mu\text{L}$ in 50% water (c); and $5 \mu\text{L}$ in water (d). Analyte identification as in Fig. 1.

3.2.5. Effect of chromatographic flow rate

The flow rate directly affects the efficiency of the column, as may be deduced from the equation of Van Deemter. For two of the analytes (9mGua and 8OHG), a study was made of the effect of the chromatographic flow rate, analyzing 22 flow rates ranging from 0.1 mL min^{-1} to 2 mL min^{-1} . The correlation coefficients (r^2) for the theoretical curve ($\text{HETP} = A + B/u + C \cdot u$) were 0.947 for 9mGua and 0.955 for 8OHG. For both analytes, the minimum experimental value for the HETP was seen at 0.5 mL min^{-1} . As a side effect, the increase in flow produced a corresponding increase in column pressure. Thus, for a flow rate of 0.5 mL min^{-1} the pressure was 55 bar; for 1.0 mL min^{-1} it was 121 bar, and for 2.0 mL min^{-1} it was 204 bar. These observations allowed a flow rate of 0.5 mL min^{-1} to

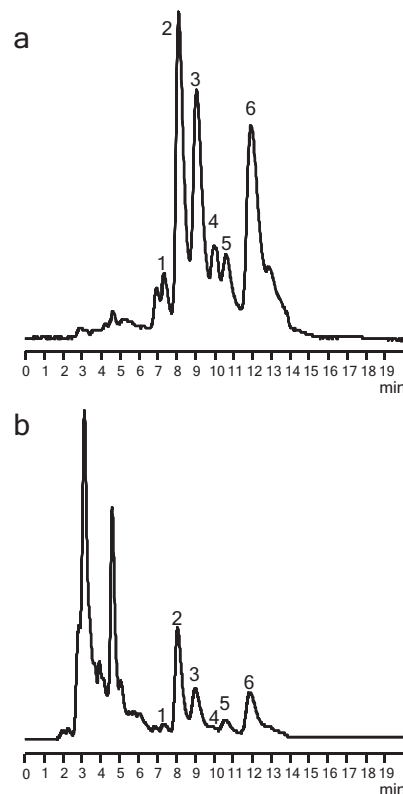


Fig. 6. (a) Total Ion Chromatogram (TIC) and (b) UV chromatogram obtained from a urine sample fortified at $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ for methylated-MNN and $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ for hydroxylated-MNN using isocratic elution 20% formic acid 2.6 mM w/w pH=3.1: 80% ACN. Column temperature: 20°C . Chromatographic flow rate: 0.5 mL min^{-1} . Analyte identification as in Fig. 1.

be selected as optimum for separation. With this flow rate value, HETP of around $20 \mu\text{m}$ were obtained (equivalent to $50,000 \text{ N/m}$) with a total analysis time of 15 min.

3.3. Injection in ZIC-HILIC

Another important advantage of HILIC as compared with RPLC is the possibility of injecting samples with a high content of organic solvent, without this affecting the separation and the symmetry of the chromatographic peaks. The usual procedures of extraction, preconcentration and sample cleaning, which are essential for the analysis of trace amounts of compounds in complex samples, as is the case of the analysis of MNN [38], generate a solution that contains the analytes dissolved in predominantly organic media, which means that it is necessary to incorporate an evaporation/redissolution step. This step can be sidestepped by injecting the organic extract directly in HILIC. As organic solvent, ACN has been suggested as the best choice although ACN/isopropanol mixtures could be used in case of solubility issues. In addition, proportion of water greater than 10% in the sample diluent should be avoided to maintain sharp peaks [39].

The separation and symmetry of peaks obtained were satisfactory when injections of $5 \mu\text{L}$ and $50 \mu\text{L}$ were performed in a 100% organic medium (Fig. 5a and b) thus showing the injection

volume capacity of the column. The correlation coefficients (r^2) between the volume injected and the peak area obtained (6 calibration points) for the analytes studied varied between 0.986 and 0.997.

Injections of 50 μ L with different water contents showed a deterioration in the separation and symmetry of the peaks as expected (Fig. 5c). However, when 5 μ L were injected in a 100% aqueous medium (Fig. 5d), the separation and symmetry of the peaks were satisfactory and very similar to those obtained in totally organic medium. Nevertheless, injection of 5 μ L in ACN afforded a better separation and peak shape.

Fig. 6 shows the injection of 5 μ L of a real urine sample purified following the procedure proposed by Li et al. [40], eluting the SPE cartridge with mobile phase (80% ACN: 20% formic acid 2.6 mM) and sidestepping the evaporation/redissolution step.

3.4. Reproducibility in ZIC-HILIC

One of the best-known disadvantages of NPLC is its lack of reproducibility [34]. To determine the precision of the separation achieved with the ZIC-HILIC column, three samples (prepared daily) were analyzed along three consecutive days, performing 7 injections per day (21 injection in all). The relative standard deviations (RSD) were lower than 2.5% for the retention times and lower than 3.5% for the adjusted retention times. Regarding the analytical signal obtained, measured as chromatographic peak areas, the corresponding RSD remained below 4%.

4. Conclusions

It has been showed that ZIC-HILIC is a suitable alternative for the chromatographic analysis of MNN. A mobile phase containing 80% ACN and 20% of formic acid (2.6 mM) allowed appropriate resolution to be achieved. Additionally, the characteristics of ZIC-HILIC mean that the compatibility between chromatographic separation and detection by mass spectrometry is very high, allowing the injection of volumes up to 50 μ L in a completely organic medium, leading to high sensitivity and compatibility with the usual methods of extraction/preconcentration used for the analysis of MNN. The retention of these compounds in ZIC-HILIC occurs through a mechanism of partition between the aqueous phase bound to stationary phase and the organic component of the mobile phase; however, the mechanism is complex, and it presumably involves other processes such as retention of the MNN with hydroxyl groups by hydrogen bonding or electrostatic interactions, for positively charged analytes.

Acknowledgements

The Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain, (Project CTQ 2008-02200/BQU) and Junta de Castilla y León (Grupo de Excelencia GR-65) are gratefully acknowledged for financial support of this work. D.G.G. gratefully acknowledges financial assistance from Ministerio de Educación, Spain (FPU grant).

References

- [1] S.M. Cooke, R. Olinski, S. Loft, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17 (2008) 3.
- [2] M. Harri, H. Kasai, T. Mori, J. Tornaues, K. Savela, K. Peltonen, *J. Chromatogr. B* 853 (2007) 242.
- [3] H.M. Liebich, S. Müller-Hagedorn, F. Klaus, K. Meziene, K.R. Kim, A. Frickenschmidt, B. Kammerer, *J. Chromatogr. A* 1071 (2005) 271.
- [4] H. Topp, R. Duden, G. Schöch, *Clin. Chim. Acta* 218 (1993) 73.
- [5] E. Borek, B.S. Baliga, C.W. Gehrke, C.W. Kuo, S. Belman, W. Troll, T.P. Waalkes, *Cancer Res.* 37 (1977) 3362.
- [6] D. Jégourel, R. Delépée, F. Breton, A. Rolland, R. Vidal, L.A. Agrofoglio, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 8932.
- [7] B. Kammerer, A. Frickenschmidt, C.E. Müller, S. Laufer, C.H. Gleiter, H. Liebich, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1017.
- [8] S.H. Lee, I. Kim, B.C. Chung, *Clin. Biochem.* 40 (2007) 936.
- [9] G. la Marca, S. Malvagía, B. Casetta, E. Pasquini, I. Pela, M. Hirano, M.A. Donati, E. Zammarchi, *J. Mass Spectrom.* 41 (2006) 586.
- [10] D. Bullinger, H. Fröhlich, F. Klaus, H. Neubauer, A. Frickenschmidt, C. Henneges, A. Zell, S. Laufer, C.H. Gleiter, H. Liebich, B. Kammerer, *Anal. Chim. Acta* 618 (2008) 29.
- [11] W.Y. Hsu, W.T. Chen, W.D. Lin, F.J. Tsai, C.T. Lin, W.Y. Lo, L.B. Jeng, C.C. Lai, *Clin. Chim. Acta* 402 (2009) 31.
- [12] K. Roszkowski, D. Gackowski, R. Rozalski, T. Dziaman, A. Siomek, J. Guz, A. Szpila, M. Foksinski, R. Olinski, *Int. J. Cancer* 123 (2008) 1964.
- [13] H.Y. Li, S.M. Wang, H.M. Liu, S.S. Bu, J. Li, D. Han, M.Z. Zhang, G.Y. Wu, *J. Mass Spectrom.* 44 (2009) 641.
- [14] L.B. Jeng, W.Y. Lo, W.Y. Hsu, W.D. Lin, C.T. Lin, C.C. Lai, F.J. Tasi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 1543.
- [15] K. Tamae, K. Kawai, S. Yamasaki, K. Kawanami, M. Ikeda, K. Takahashi, T. Miyamoto, N. Kato, H. Kasai, *Cancer Sci.* 100 (2009) 715.
- [16] R. Mateos, L. Bravo, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 175.
- [17] L.H. Lin, M.R. Chao, C.W. Hu, M.L. Ho, J.Y. Huang, H.S. Lee, C.C. Chen, R.H. Wong, *Toxicology* 260 (2009) 1.
- [18] M.R. Chao, C.J. Wang, H.H. Yang, L.W. Chang, C.W. Hu, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 2427.
- [19] A. Seidel, S. Brunner, P. Seidel, G.I. Fritz, O. Herbarth, *Br. J. Cancer* 94 (2006) 1726.
- [20] Y. Jiang, Y. Ma, *Anal. Chem.* 81 (2009) 6474.
- [21] A.J. Sasco, F. Rey, C. Reynaud, J.Y. Bobin, M. Clavel, A. Niveleau, *Cancer Lett.* 108 (1996) 157.
- [22] R. Tuytten, F. Lemièrre, E.L. Esmans, W.A. Herrebout, B.J. van der Veken, B.U.W. Maes, E. Witters, R.P. Newton, E. Dudley, *Anal. Chem.* 79 (2007) 6662.
- [23] D.L. Walters, D.L. Jacobs, J.E. Tomaszewski, S.J. Graves, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19 (1999) 955.
- [24] R. Tuytten, F. Lemièrre, W. Van Dongen, E. Witters, E.L. Esmans, R.P. Newton, E. Dudley, *Anal. Chem.* 80 (2008) 1263.
- [25] A.J. Alpert, *J. Chromatogr.* 499 (1990) 177.
- [26] F. Qin, Y.Y. Zhao, M.B. Sawyer, X.F. Li, *Anal. Chem.* 80 (2008) 3404.
- [27] S. Myslising, G. Palmisando, P. Højrup, M. Thaysen-Andersen, *Anal. Chem.* 82 (2010) 5598.
- [28] Y.H. Jang, W.A. Goddard III, K.T. Noyes, L.C. Sowers, S. Hwang, D.S. Chung, *Chem. Res. Toxicol.* 15 (2002) 1023.
- [29] V. Verdolino, R. Cammi, B.H. Munk, H.B. Schlegel, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 16860.
- [30] A. Albert, E.P. Serjeant, *The Determination of Ionization Constants: A Laboratory Manual*, 3rd edition, Chapman & Hall, London, 1984.
- [31] A. Yanagida, H. Murao, M. Ohnishi-Kameyama, Y. Yamakawa, A. Shoji, M. Tagashira, T. Kanda, H. Shindo, Y. Shibusawa, *J. Chromatogr. A* 1143 (2007) 153.
- [32] D.V. McCalley, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3408.
- [33] M. Liu, J. Ostovic, E.X. Chen, N. Cauchon, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2362.
- [34] Y. Guo, S. Gai, *J. Chromatogr. A* 1074 (2005) 71.
- [35] J.A. Alpert, *Anal. Chem.* 80 (2008) 62.
- [36] G. Marrubini, B.E.C. Mendoza, G. Massolini, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 803.
- [37] Z. Hao, B. Xiao, N. Weng, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1449.
- [38] E. Dudley, S. El-Shakawi, D.E. Games, R.P. Newton, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 19 (2000) 545.
- [39] J. Ruta, S. Rudaz, D.V. McCalley, J.L. Veuthey, D. Guilleme, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 8230.
- [40] H.Y. Li, S.M. Wang, H.M. Liu, J. Li, D. Han, S.S. Bu, M.Z. Zhang, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 3161.

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN VII
ISRN Analytical Chemistry *Volume 2012, Article ID 308062*

Research Article

Evaluation of the Electrostatic Contribution to the Retention of Modified Nucleosides and Nucleobases by Zwitterionic Hydrophilic Interaction Chromatography

Diego García-Gómez, Encarnación Rodríguez-Gonzalo, and Rita Carabias-Martínez

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

Correspondence should be addressed to Encarnación Rodríguez-Gonzalo, erg@usal.es

Received 20 December 2011; Accepted 10 January 2012

Academic Editors: T. Bolanca, A. M. Haji Shabani, and K. Ohyama

Copyright © 2012 Diego García-Gómez et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

This work explores the benefits and limitations, on a quantitative basis, of using zwitterionic hydrophilic interaction chromatography (ZIC-HILIC) for the separation of several modified nucleosides and nucleobases of clinical interest. The target compounds were hydroxylated and methylated derivatives: 8-hydroxy-guanine, 8-hydroxy-guanosine, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 1-methyl-guanine, 7-methyl-guanine, and 9-methyl-guanine. A quantitative evaluation of the electrostatic interaction based on a systematic study of the nature and concentration of the salts in the mobile phase has been carried out. From the obtained results, it may be concluded that separation is based on a mechanism of partition and interaction through weak electrostatic forces: the contribution of the electrostatic interaction to the retention of the charged analytes reaching values between 25 and 52% at low salt concentration. However, the electrostatic contribution decreased progressively as the salt concentration rose.

1. Introduction

Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) is a mode of chromatography in which polar compounds are retained using hydrophilic stationary phases combined with mobile phases with a high concentration of organic solvent and a small amount of water [1]. A partition mechanism between the aqueous layer associated with the stationary phase and the organic component of the mobile phase has been proposed to explain the type of separation that occurs in HILIC [1]. However, later studies have shown that the mechanism of retention involves more complex equilibria [2]. Moreover, the presence of charged sites in the stationary phase in zwitterionic hydrophilic chromatography (ZIC-HILIC) would propitiate the appearance of other retention mechanisms [3, 4].

Despite the many applications described in the literature, the retention mechanism in ZIC-HILIC is still under debate [2, 4–14].

The chromatographic behaviour of several modified nucleosides and nucleobases (MNNs) with different stationary

phases in HILIC mode has been described previously [15], the zwitterionic stationary phase being the most suitable one for their separation. The MNNs selected were hydroxylated and methylated derivatives, used as biological markers of several diseases: 8-hydroxy-guanine (8OHGua), 8-hydroxy-guanosine (8OHG), 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OH2dG), 1-methyl-guanine (1mGua), 7-methyl-guanine (7mGua), and 9-methyl-guanine (9mGua). The results obtained from the study of the different parameters affecting separation—content of organic solvent in the mobile phase, pH, salt concentration, and temperature inside the column—showed that separation in the ZIC-HILIC column was based on a mechanism of partition between the aqueous phase bound to stationary phase and the organic compound of mobile phase. However, the mechanism is complex, and it presumably involves other processes such as retention of the MNN with hydroxyl groups by hydrogen bonding or interaction through weak electrostatic forces for charged analytes.

In this work, we describe a quantitative evaluation of these electrostatic interactions in ZIC-HILIC in order to elucidate the contribution of the interactions to the retention

of the target analytes. The evaluation was based on a detailed study of the influence of the type and concentration of the salt used.

Thus, the aim of the present work was to contribute to a better understanding of the retention mechanism of these compounds in ZIC-HILIC mode.

2. Experimental

2.1. Chemicals. Analytical standards of *8-hydroxy-guanine* (8OHGua), CAS RN [5614-64-2]; and *8-hydroxy-guanosine* (8OHG), CAS RN [3868-31-3] were purchased from Cayman Chemical (Michigan, USA). *8-hydroxy-2'-deoxyguanosine* (8OH2dG), CAS RN [88847-89-6]; *9-methyl-guanine* (9mGua), CAS RN [5502-78-3]; *1-methyl-guanine* (1mGua), CAS RN [938-85-2]; and *7-methyl-guanine* (7mGua), CAS RN [578-76-7] were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

Working solutions were daily prepared at $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ for 1mGua, 7mGua, and 9mGua, and at $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ for 8OH2dG, 8OHG, and 8OHGua.

Acetonitrile (ACN) was of HPLC grade (Merck, Darmstadt, Germany). Ultrahigh-quality (UHQ) water was obtained with a Wasserlab (Noain, Spain) Ultramatic water purification system. All other chemicals were of analytical reagent grade.

2.2. Instrumentation. HPLC analyses were performed on a HP 1100 Series chromatograph from Agilent (Waldbronn, Germany). The Diode Array Detector (DAD) recorded the spectra in the 190–400 nm range. The analytical column was a ZIC-HILIC packed with $3.5 \mu\text{m}$ particles from Merck (Darmstadt, Germany). Analyses were performed in isocratic elution: 80% ACN: 20% formic acid (2.6 mM, $w^w\text{pH} = 3.1$) with variable concentration of ammonium or potassium perchlorate. Column temperature was set to 20°C , flow rate at 0.5 mL min^{-1} , and an injection volume of $50 \mu\text{L}$ in ACN was selected.

3. Results and Discussion

Application of the ZIC-HILIC mode to the separation of MNN has been described previously [15]. A mobile phase containing 80% ACN and 2.5 mM formic acid ($w^w\text{pH} 3.1$) allowed appropriate resolution to be achieved. At that pH value, only methylated MNNs were in the protonated form, and hence electrostatic interactions with the sulfobetaine groups in the stationary phase could be expected for these analytes. Hydroxylated MNNs were not charged at $w^w\text{pH} 3.1$, and therefore different behavior that for methylated MNN would be expected.

3.1. Effect of the Nature and Salt Concentration in the Mobile Phase. Owing to the high organic content of the mobile phase in ZIC-HILIC, the number of salts available is limited to those showing acceptable solubility in organic medium, such as perchlorate or organic salts.

In HILIC mode, increases in salt concentrations usually lead to an increase in analyte retention [16]. Additionally, other effects may appear in ZIC-HILIC: for eluents with low salt concentration, ion exchange equilibrium should be established between the cations of the mobile phase in the stationary phase and the charged analytes.

We have previously reported the behavior of the target compounds in ZIC-HILIC mode for salt concentrations in the 0.25–200 mM range for ammonium perchlorate and 0.25–5.0 mM for potassium perchlorate (because of its poor solubility) [15]. Briefly, two zones showing different behaviour were observed: at low salt concentrations (0–2.5 mM), a strong decrease occurred in the retention of all the charged MNNs studied (methylated MNN at $w^w\text{pH} 3.1$), indicating that a decrease in electrostatic retention had taken place (Figure 1(a)). The electrostatic nature of this decrease was confirmed by the behaviour of hydroxylated MNNs, which were not charged at $w^w\text{pH}: 3.1$ (Figure 1(b)), and by carrying out the same experiment at $w^w\text{pH}: 6.7$, where both the methylated and hydroxylated MNN were uncharged; both experiments resulted in the disappearance of this zone, confirming the electrostatic nature of the decrease. The other zone appeared at high salt concentrations (15–200 mM), pointing to an increase in retention and in agreement with the characteristics observed for a partition mechanism.

3.1.1. Quantitative Evaluation of the Electrostatic Contribution to Retention. The retention of a charged analyte (BH^+) on the sulfonic group (R-SO_3^-) of the stationary phase can be described according to



where M^+ represents the cation of the salt present in the eluent.

It has been reported [2, 4] that electrostatic interactions fit (2):

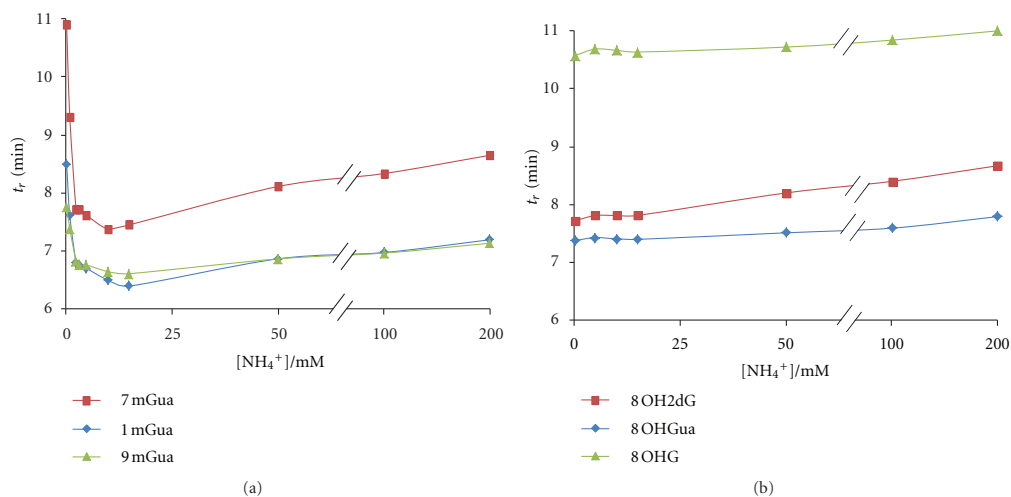
$$k_{\text{EI}} = A \frac{1}{[\text{M}^+]}, \quad (2)$$

where A is a constant similar to that described by McCally [2, 4]:

$$A \propto \frac{K[\text{RSO}_3^- \text{M}^+]}{1 + K_a/[\text{H}^+]}, \quad (3)$$

K being the equilibrium constant of (1), and K_a , the acid-base ionization constant of the analyte (BH^+).

Accordingly, a plot of the experimental retention factors (k_{exp}) against the inverse of the salt concentration ($[\text{M}^+]^{-1}$) should be a straight line, proportional to A , with the ordinate at the origin being zero if electrostatic interactions are the only retention mechanism (2). Experimentally, the values found for salt concentrations in the 0.25–2.5 mM range (values of $[\text{M}^+]^{-1}$ ranging from 4000 to 400 M^{-1}) fit a second-order polynomial equation, with r^2 values between 0.945 and 0.989 for NH_4^+ and between 0.913 and 0.957 for K^+ , indicating the existence of a minor additional effect (Table 1). The presence of other nonelectrostatic retention mechanisms

FIGURE 1: Plots of retention time (t_r) versus ammonium perchlorate concentration for methylated MNNs (a) and hydroxylated MNNs (b).TABLE 1: Parameters of the equation for the second-order polynomial fitting of the experimental retention factors (k_{exp}) versus the inverse of the salt concentration ($[\text{M}^+]^{-1}$)^(a).

Modified nucleosides and nucleobases	$k_{\text{exp}} = a/[\text{M}^+]^2 + b/[\text{M}^+] + c$			
	R^2	M^+ : Ammonium perchlorate		
		a	b	c
9mGua	0.9538	$-4E-5$	0.3	1.3667
1mGua	0.9681	$-3E-5$	0.2	1.3969
7mGua	0.9782	$-1E-4$	0.7	1.5624
	R^2	M^+ : Potassium perchlorate		
		a	b	c
9mGua	0.9392	$-5E-5$	0.3	1.3109
1mGua	0.9127	$-7E-5$	0.4	1.1628
7mGua	0.9574	$-1E-4$	0.8	1.3724

(a) Isocratic elution: 80% ACN: 20% formic acid (2.6 mM, w pH = 3.1) with variable concentrations of ammonium or potassium perchlorate. Temperature: 20°C. Flow: 0.5 mL min^{-1} . Injection: 50 μL in CAN.

TABLE 2: Contribution of electrostatic interactions to the ZIC-HILIC retention of the positively charged MNNs, at different salt concentrations^(a).

Charged MNN	% of electrostatic interaction in retention				
	Ammonium perchlorate				$(k_{\text{EI}})_{0.25\text{mM}}$
	0.25 mM	0.50 mM	1.00 mM	2.50 mM	
9mGua	25	21	17	6	0.45
1mGua	28	20	16	4	0.75
7mGua	52	46	39	23	1.66
	Potassium perchlorate				$(k_{\text{EI}})_{0.25\text{mM}}$
	0.25 mM	0.50 mM	1.00 mM	2.50 mM	
9mGua	26	24	20	6	0.54
1mGua	38	32	29	9	0.99
7mGua	49	44	38	16	1.85

(a) Isocratic elution: 80% ACN: 20% formic acid (2.6 mM, w pH = 3.1) with variable concentrations of ammonium or potassium perchlorate. Temperature: 20°C. Flow: 0.5 mL min^{-1} . Injection: 50 μL in ACN.

(e.g., partition mechanism) is indicated by the fact that values for the ordinate at the origin are different from zero (Table 1) and a straight line was not obtained.

Therefore, bearing in mind that the experimental retention factors (k_{exp}) must be the sum of the contribution of the electrostatic (k_{EI}) and nonelectrostatic (k_{NEI}) interactions:

$$k_{\text{exp}} = k_{\text{EI}} + k_{\text{NEI}}, \quad (4)$$

and substituting (2) in (4), we have

$$k_{\text{exp}} = A \frac{1}{[M^+]} + k_{\text{NEI}}. \quad (5)$$

According to (4) and (5), extrapolation of the second-order polynomial fittings to the ordinate at the origin ($[M^+]^{-1} \rightarrow 0$) allows the retention factor due to any mechanism other than electrostatic interactions (k_{NEI}) to be calculated, since when $[M^+]^{-1} \rightarrow 0$, then $k_{\text{EI}} = 0$. For a hypothetical infinite concentration of salts (when $[M^+]^{-1} \rightarrow 0$ then $[M^+] \rightarrow \infty$), there would be “infinite competition” (of the salts against the target analytes) for the electrostatically active sites of the stationary phase; this would completely eliminate the electrostatic contribution to the retention mechanism of the analytes.

From these calculated k_{NEI} values, the percentage of contribution of the electrostatic interaction (%EI) to the overall retention was calculated, according to (6), for each analyte and for the different of salt concentrations studied (Table 2):

$$\%EI = \frac{k_{\text{EI}}}{k_{\text{exp}}} \cdot 100. \quad (6)$$

For the lowest salt concentration, 0.25 mM, the contribution of the electrostatic interactions to the retention mechanism varied between 25% and 52% for NH_4^+ , and between 26% and 49% for K^+ . These decreased progressively as the salt concentration rose, observing, for a salt concentration of 2.5 mM, contributions between 6% and 23% for NH_4^+ and between 6% and 16% for K^+ . These results are in good agreement with those found by McCalley working with four basic compounds [2] and by Kumar et al. for catecholamines [4].

The retention factors due to electrostatic interactions at a salt concentration of 0.25 mM ($k_{\text{EI}}_{0.25 \text{ mM}}$) were also calculated (Table 2). These values can be determined for (4) as the difference between the experimental retention factors at 0.25 mM (k_{exp}) and the retention factors for an infinite concentration of salts (k_{NEI}). Here, it should be recalled that these k_{NEI} values were estimated by extrapolation to zero of the experimental data (Table 1). Accordingly, the percentage values (Table 2) should be seen as a quantitative approximation to the electrostatic contribution to the overall retention.

4. Conclusions

The results obtained in the present work show that for charged MNNs separation in the ZIC-HILIC column is based on a shared mechanism of partition and interaction through weak electrostatic forces. The electrostatic contribution to

retention was about 25–50% at low salt concentration in the eluent, although it should be noted that this contribution decreased significantly as the salt concentration rose. In order to exploit these interactions with a view to enhancing selectivity and resolution in ZIC-HILIC separations, the use of mobile phases at low salt concentrations should be considered.

Acknowledgments

The Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain (Project CTQ 2011-24075), and Junta de Castilla y León (Grupo de Excelencia GR-65) are gratefully acknowledged for financial support. D. García-Gómez gratefully acknowledges financial assistance from Ministerio de Educación, Spain (FPU grant).

References

- [1] A. J. Alpert, “Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds,” *Journal of Chromatography*, vol. 499, pp. 177–196, 1990.
- [2] D. V. McCalley, “Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionised solutes in hydrophilic interaction chromatography,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1217, no. 20, pp. 3408–3417, 2010.
- [3] S. Mysling, G. Palmisano, P. Hojrup, and M. Thaysen-Andersen, “Utilizing ion-pairing hydrophilic interaction chromatography solid phase extraction for efficient glycopeptide enrichment in glycoproteomics,” *Analytical Chemistry*, vol. 82, no. 13, pp. 5598–5609, 2010.
- [4] A. Kumar, J. P. Hart, and D. V. McCalley, “Determination of catecholamines in urine using hydrophilic interaction chromatography with electrochemical detection,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, no. 25, pp. 3854–3861, 2011.
- [5] A. J. Alpert, “Electrostatic repulsion hydrophilic interaction chromatography for isocratic separation of charged solutes and selective isolation of phosphopeptides,” *Analytical Chemistry*, vol. 80, no. 1, pp. 62–76, 2008.
- [6] D. V. McCalley, “Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds?” *Journal of Chromatography A*, vol. 1171, no. 1-2, pp. 46–55, 2007.
- [7] J. Ruta, S. Rudaz, D. V. McCalley, J. L. Veuthey, and D. Guilleme, “A systematic investigation of the effect of sample diluent on peak shape in hydrophilic interaction liquid chromatography,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1217, no. 52, pp. 8230–8240, 2010.
- [8] Y. Guo and S. Gaiki, “Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, no. 35, pp. 5920–5938, 2011.
- [9] P. Jandera, “Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 692, no. 1-2, pp. 1–25, 2011.
- [10] Z. Hao, B. Xiao, and N. Weng, “Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC),” *Journal of Separation Science*, vol. 31, no. 9, pp. 1449–1464, 2008.
- [11] A. E. Karatapanis, Y. C. Fiamegos, and C. D. Stalikas, “A revisit to the retention mechanism of hydrophilic interaction liquid

- chromatography using model organic compounds," *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, no. 20, pp. 2871–2879, 2011.
- [12] R.-I. Chirita, C. West, S. Zubrzycki, A. -L. Finaru, and C. Elfakir, "Investigations on the chromatographic behaviour of zwitterionic stationary phases used in hydrophilic interaction chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, no. 35, pp. 5939–5963, 2011.
- [13] B. Buszewski and S. Noga, "Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 402, no. 1, pp. 231–247, 2011.
- [14] K. Jinno, N. S. Quiming, N. L. Denola, and Y. Saito, "Modeling of retention of adrenoceptor agonists and antagonists on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography: a review," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 393, no. 1, pp. 137–153, 2009.
- [15] E. Rodríguez-Gonzalo, D. García-Gómez, and R. Carabias-Martínez, "Study of retention behaviour and mass spectrometry compatibility in zwitterionic hydrophilic interaction chromatography for the separation of modified nucleosides and nucleobases," *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, no. 26, pp. 3994–4001, 2011.
- [16] Y. Guo and S. Gaiki, "Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 1074, no. 1-2, pp. 71–80, 2005.

5.B.4. Determinación cromatográfica de nucleósidos en orina: RAM-ZIC-HILIC-MS/MS (QqQ). Aplicación potencial en diagnóstico clínico

5.B.4.1. Optimización de la separación cromatográfica

La separación cromatográfica de los nucleósidos y nucleobases estudiados se llevó a cabo en una columna ZIC-HILIC utilizando una fase móvil formada por acetonitrilo y tampón ácido fórmico / formiato amónico a una concentración de 2.5 mM (pH 3.4). La baja concentración de electrolitos busca evitar que éstos afecten a la ionización de los analitos en el ESI. Al pH de separación los analitos están presentes en forma catiónica, incrementándose así la señal y la retención. El gradiente optimizado con dicha mezcla varió desde un 70% hasta un 50% de ACN, alcanzándose así una separación satisfactoria en menos de 25 minutos.

5.B.4.2. Optimización de los parámetros del triple cuadrupolo

Los parámetros a optimizar que afectan a la fuente de ionización (ESI) están en gran parte ligados a la correcta formación del spray en la fuente de ionización. Se tomaron como parámetros óptimos los tabulados por el fabricante para un flujo de fase móvil de 0.5 mL min⁻¹. Así, los parámetros fijados fueron:

- Voltaje del capilar: +3500 V
- Flujo del gas de secado (N₂): 12 L min⁻¹
- Temperatura del gas de secado: 350 °C
- Presión de nebulización: 35 psi

Otros parámetros generales que deben ser fijados son: el tiempo máximo de acumulación y el ancho de ventana de aislamiento. Estos se fijaron en los valores habituales en espectrometría de masas, el tiempo máximo de acumulación en 200 ms y el ancho de la ventana de aislamiento en 1 u. El modo de adquisición de datos fue SRM.

Además de los parámetros generales es necesario optimizar una serie de factores que dependen de la naturaleza propia de cada analito:

- *Polaridad del ESI*: La fuente de ionización permite trabajar en modo positivo o negativo lo que conlleva la conducción al analizador de masas de cationes o aniones respectivamente. Los nucleósidos y nucleobases tienen uno o más átomos de nitrógeno que pueden protonarse, dando así lugar a la correspondiente molécula protonada $[M+H]^+$. Por lo tanto, todos los compuestos se analizaron en forma positiva.
- *Fragmentación en el triple cuadrupolo*: Para cada analito se seleccionó la molécula protonada $[M+H]^+$ como ion precursor. El equipo optimiza la energía a transmitir al ion precursor para su fragmentación, eligiendo la energía de colisión (en voltios) adecuada para que la sensibilidad de los distintos fragmentos sea lo mayor posible. El ion de fragmentación más abundante se seleccionó como ion producto para la transición de cuantificación y el resto de transiciones se utilizaron con fines de confirmación.

Todos los parámetros optimizados, característicos de cada analito, se muestran en la Tabla VIII.1 (Pág. 308). En el apéndice I se recogen los espectros de MS y MS/MS.

5.B.4.3. Optimización del tratamiento de muestra: RAM de naturaleza polar

La elevada polaridad de los analitos estudiados dificulta su retención en columnas de extracción basadas en interacciones hidrofóbicas, como es el caso de ADS-RAM. Se probaron, en este trabajo, cuatro columnas de extracción *on-line*: un RAM ADS-C4, una columna Oasis HLB formada por un copolímero de devinilbenceno y N-vinilpirrolidona, una columna Isolute ENV+ formada por un copolímero de estireno y devinilbenceno hidroxilados y un RAM polimérico MSpak PK formado por un copolímero hidrofílico que contiene N-vinilacetamida. Se eligieron, para este estudio, cuatro de los nucleósidos estudiados, cubriendo el intervalo completo de polaridad de todos los nucleósidos y nucleobases estudiados. Se seleccionaron así 8OH2dG, INN, 7mGua y 1mA cuyos valores de $\log D_{pH:3}$ son -1.3, -1.4, -1.8 y -2.1, respectivamente.

La Figura VIII.1 (Pág. 305) muestra las señales obtenidas en el detector de masas normalizadas a la señal más sensible, en este caso 8OH2dG. En dicha Figura se muestran las variaciones de las señales obtenidas al acoplar directamente la columna de extracción con el espectrómetro de masas. Puede observarse como las señales obtenidas para el RAM-C4 indican que existe una muy pobre retención de los analitos estudiados. La columna polimérica HLB presentó mejores resultados, especialmente para los nucleósidos de menor polaridad. En el caso del sorbente ENV+, las señales son aún mayores, alcanzándose el máximo de área normalizada para el nucleósidos menos polar, 8OH2dG. Sin embargo, el más polar de los estudiados, 1mA, alcanza sólo un 27% del área normalizada. Finalmente, el RAM-MSpak proporcionó las mayores señales normalizadas para cada uno de los cuatro analitos estudiados. A la vista de los resultados, se decidió utilizar la columna de extracción *on-line* RAM-MSpak para todos los estudios posteriores.

Una vez elegida la columna más apropiada para la retención de los analitos objeto de estudio se optimizaron los diferentes parámetros que afectan al proceso de eliminación de interferentes, principalmente dos: el disolvente y el tiempo de lavado.

Los parámetros estudiados respecto al disolvente incluyeron su composición, pH y concentración de electrolito.

En cuanto a la composición, se estudiaron diferentes proporciones de ACN como componente orgánico (Figura 5.11).

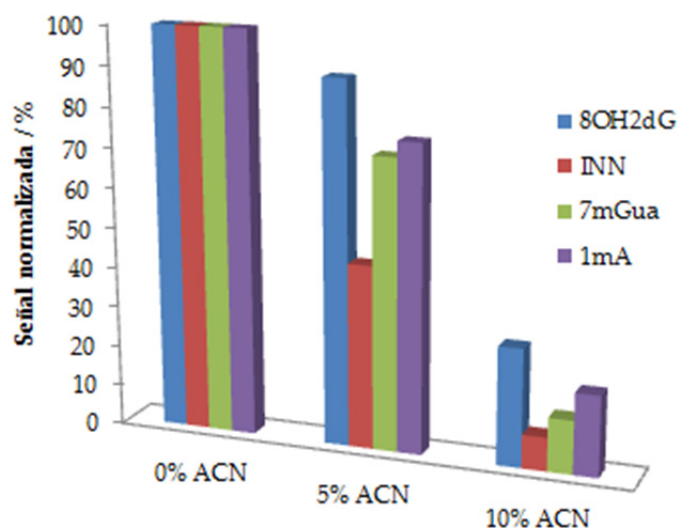


Figura 5.11. Señales normalizadas obtenidas para diferentes porcentajes de ACN en el disolvente de lavado. Condiciones de lavado: MSPak-RAM, agua ultrapura y ACN, 0.5 mL min⁻¹, 1 minuto. Todas las señales normalizadas frente a la obtenida en ausencia de ACN

Puede observarse como proporciones de ACN de un 5% ya producen pérdida de los analitos de interés, efecto aún más acusado para un 10% de ACN. Se decidió, por lo tanto, con el fin de evitar una pérdida apreciable en la recuperación de los nucleósidos, utilizar agua como disolvente de lavado.

Respecto al pH, se ensayaron pHs en el intervalo de 3.0 a 9.0 (Figura 5.12).

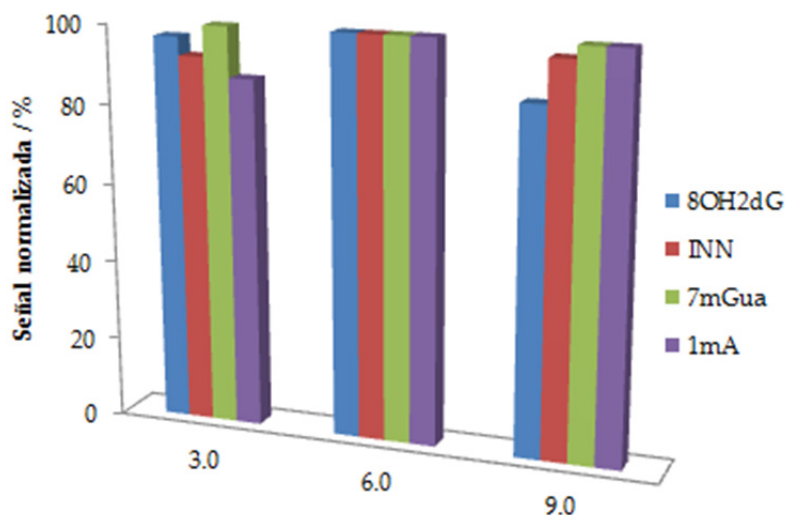


Figura 5.12. Señales normalizadas obtenidas para diferentes pHs del disolvente de lavado. Condiciones de lavado: MSPak-RAM, agua ultrapura, 0.5 mL min⁻¹, 1 minuto. Todas las señales normalizadas frente a las obtenidas a pH: 6.0

Los resultados obtenidos mostraron que el pH del disolvente no tiene influencia significativa en el proceso de lavado, por lo que se decidió no tamponar el disolvente de lavado.

Finalmente, se estudió la influencia que tiene en el proceso la concentración de formiato amónico hasta 250 mM. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura VIII.2 (Pág. 306). La presencia de formiato amónico produjo la elución de los analitos menos polares, reduciéndose la señal para 8OH2dG, para una concentración 250 mM de formiato amónico, a menos del 33%. A la vista de los resultados se seleccionó como óptimo un disolvente de lavado sin formiato amónico.

El otro factor significativo en el proceso de extracción, el tiempo de lavado, se estudió ensayando tiempos desde 0.5 minutos a 10 minutos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.13.

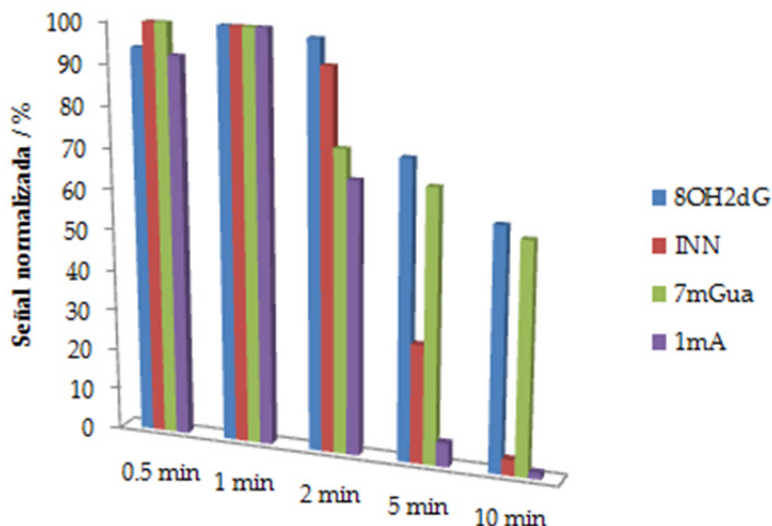


Figura 5.13. Señales normalizadas obtenidas para diferentes tiempos de lavado para MSPak-RAM. Condiciones de lavado: Agua ultrapura, 0,5 mL min⁻¹. Todas las señales normalizadas frente a las obtenidas con 1 minuto de lavado

Los resultados obtenidos muestran que se obtiene un máximo para las señales de los analitos para un tiempo de 1 minuto. Tiempos de lavado mayores producen la pérdida de los analitos más polares. Así, para un tiempo de lavado de 10 minutos, la señal normalizada para 8OH2dG se mantiene en un 60% mientras que para 1mA es inferior al 1%.

5.B.4.3.1. Disolvente de elución y transferencia

Como ya se ha indicado, un factor importante a considerar en los métodos de extracción *on-line* es el disolvente utilizado para eluir y transferir los analitos desde la columna de extracción a la columna analítica. Dicho disolvente debe eluir eficientemente a los analitos a la vez que debe ser compatible con la separación cromatográfica. Mientras que en RPLC no existen problemas de compatibilidad, en HILIC, al ser el agua el disolvente fuerte, la compatibilidad supone un grave inconveniente. Para evitar dicha incompatibilidad se redujo lo máximo posible el volumen muerto asociado con la columna de extracción y la válvula de seis vías, minimizando así el agua que

alcanza la columna ZIC-HILIC y que podría perturbar la separación. Para ello, se conectó el RAM a la válvula de seis vías utilizando tubos PEEK (*PolyEther Ether Ketone*) de 100 mm x 0.12 mm, lo que supuso un volumen de 1.2 μ L para cada conexión.

Además, para una correcta separación cromatográfica, el proceso de elución debe generar un perfil de elución estrecho y el disolvente debe ser compatible con el gradiente cromatográfico. En este trabajo se estudiaron diferentes porcentajes de ACN como disolventes de elución. En la Figura VIII.3.a (Pág. 306) se muestran los perfiles de elución obtenidos (sin columna cromatográfica) con disolventes que contienen porcentajes desde el 95% al 70% de ACN. En la Figura VIII.3.b se muestran los respectivos cromatogramas para cada perfil de elución. Dichos cromatogramas se han obtenido manteniendo el porcentaje de ACN del disolvente de transferencia durante 5 minutos y aplicando posteriormente el gradiente de separación.

Los resultados obtenidos indican que, cuando se trabaja con altos porcentajes de ACN, se obtiene un perfil de elución muy ancho (w_b : 5.5 minutos, Fig. VIII.3.a.1 y a.2). Estos perfiles de elución conllevan una transferencia inadecuada a la columna cromatográfica dando lugar a cromatogramas no bien resueltos (Fig. VIII.3.b.2). El incremento en la proporción de fase acuosa en el disolvente de elución produce perfiles de elución más estrechos (Fig. VIII.3.a.3 y a.4) mejorando consecuentemente la separación cromatográfica (Fig. VIII.3.b.3 y b.4). Finalmente, un disolvente de elución y transferencia formado por un 70% de ACN produjo un perfil de elución estrecho (w_b : 1.0 minutos, Fig. VIII.3.a.5), mostrando además muy buena compatibilidad con la separación cromatográfica (Fig. VIII.3.b.5). Además, al ser esta mezcla la de mayor proporción acuosa de las estudiadas, también presenta buena compatibilidad con el volumen muerto de agua que alcanza la columna.

La Tabla 5.5 muestra, a modo de resumen, la tabla de tiempos recomendada para efectuar la etapa de tratamiento *on-line* utilizando el RAM de naturaleza polar.

Tabla 5.5. Tabla de tiempos del método RAM-HILIC-MS/MS desarrollado según la configuración instrumental mostrada en la Figura 1.14 (Pág. 43)

Tiempo /min	Bomba 1 ^a Flujo / mL min ⁻¹	Bomba 2 ^{b,c} B / %	Válvula de 6 vías	Evento
0-1	0.5	70	Carga	Inyección (10 µL) y limpieza
1-10	0.1	70	Elución	Transferencia y separación
10-11	0.1	70 → 50	Elución	Separación de analitos
11-30	0.1	50	Elución	Separación de analitos
30-42	0.1 → 0.5	70	Carga	Equilibrando

a. Fase móvil: Agua ultrapura

b. Flujo: 0.5 mL min⁻¹

c. Fase móvil: A: tampon ácido fórmico / formiato amónico 2.5 mM (pH: 3.4) B: ACN

En la Figura VIII.4.a (Pág. 307) se muestra el TIC y los cromatogramas SRM obtenidos al inyectar una mezcla patrón de los analitos estudiados a una concentración de 2-4 µg mL⁻¹.

5.B.4.4. Validación del método analítico RAM-HILIC-MS/MS

El método RAM-ZIC-HILIC-MS/MS desarrollado fue validado según la Guía de validación de métodos bioanalíticos de la EMEA (sección 3.5.2., Pág. 90). En la etapa de validación el triple cuadrupolo se configuró en la modalidad de SRM, registrándose para cada analito tanto la transición de cuantificación como las de confirmación.

Se realizó un estudio detallado de los efectos de matriz, expresados como factores de matriz (MF). Para ello se llevaron a cabo tres experiencias: A: inyección de una disolución de patrones directamente en el sistema ZIC-HILIC-MS/MS; B: inyección de una muestra de orina dopada directamente en el sistema ZIC-HILIC-MS/MS; y C: inyección de una muestra de orina dopada siguiendo el método desarrollado (RAM-ZIC-HILIC-MS/MS). A partir de las áreas de pico obtenidas en estas tres experiencias se calcularon los MF para el análisis directo (B/A × 100) y para el método desarrollado sin normalizar las señales frente a ILIS (C/A × 100) y normalizándolas con

ILIS ($(C/C_{ILIS}) / (A/A_{ILIS}) \times 100$). Los MFs así obtenidos se muestran en la Figura VIII.5 (Pág. 308). Puede observarse como la inyección directa de orina (Fig. VIII.5.a) resulta en MFs inferiores al 10%. El método desarrollado (Fig. VIII.5.b) mejora los MFs hasta valores en el intervalo 60%-80%, es decir, la etapa de limpieza incorporada mediante RAM reduce el efecto de matriz en un orden de magnitud. Los valores de MFs normalizados con patrón interno (Fig. VIII.5.c) presentan valores no significativamente diferentes del 100%, pudiéndose relacionar los valores superiores a este valor con la concentración endógena de nucleósidos. Además, los MFs obtenidos se correlacionan con la estructura molecular de los analitos diferenciándose dos categorías: nucleósidos y nucleobases. Este hecho evidencia la necesidad de utilizar dos ILIS en la cuantificación, ^{13}C -ADN y ^{13}C -Gua, respectivamente. Por lo tanto, gracias a la utilización de ambos ILIS, pueden corregirse totalmente los efectos de matriz, lo que permitió realizar la cuantificación construyendo calibrados acuosos normalizando las señales frente a las obtenidas para los dos ILIS. En la Figura VIII.4.b (Pág. 307) se muestran el TIC y los cromatogramas SRM obtenidos en el análisis de una muestra de orina sin dopar.

El resto de características analíticas evaluadas en la validación fueron: las curvas de calibrado, el límite de cuantificación, la precisión, la exactitud, la selectividad y la estabilidad de los analitos y de los patrones internos en la matriz biológica, así como de las disoluciones *stock* en las condiciones de almacenamiento y procesado. Estos parámetros son ampliamente discutidos en el artículo de investigación VIII (Pág. 308).

Las curvas de calibrado, utilizando el ILIS correspondiente en cada caso, se construyeron entre 30 ng mL^{-1} y $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ obteniéndose límites de detección en el intervalo de 0.1 ng mL^{-1} a 10 ng mL^{-1} (Tabla VIII.1, Pág. 308).

La precisión se evaluó en muestras de orina sin dopar, donde los analitos están presentes de forma natural en concentraciones bajas (8OHG, 7mG y 8OH2dG), medias (URN, INN y Gua) y altas (1mA, ADN y 7mGua) como se muestra en la Tabla VIII.2, Pág. 309. Los valores fueron, en todos los casos, inferiores al 15% para los análisis

between-run y no mostraron una mejora significativa al ser corregidos con el patrón interno.

También cabe destacar el análisis de la exactitud, calculada para seis matrices diferentes (H1-H6), por comparación de los valores obtenidos por calibración acuosa con patrón interno (Tabla VIII.3.B, Pág. 310) con los valores obtenidos por adición estándar (Tabla VIII.3.A). Se utilizó esta metodología ya que no pudieron prepararse muestras de concentración conocida, dada la naturaleza endógena de los analitos estudiados. Las exactitudes así calculadas variaron entre el 87% y el 110% del valor nominal. Como en el caso de la precisión, el análisis de muestras de orina sin dopar demuestra la validez del método a concentraciones bajas, medias y altas. Además, la comparación de las pendientes del método propuesto y la adición estándar no reflejaron diferencias significativas.

Finalmente, otro parámetro destacable es la selectividad, confirmada mediante la cuantificación de tres de los analitos a través de las transiciones SRM de confirmación (1mA: 282 → 133, ADN: 268 → 119 y 7mGua: 166 → 124). Las concentraciones encontradas no fueron significativamente diferentes a las obtenidas con las transiciones SRM de cuantificación. También se determinó la estabilidad de los analitos en los ciclos de congelación y descongelación de las muestras obteniéndose resultados satisfactorios y el efecto de memoria del RAM que, en todos los casos, fue inferior al 5% del LLOQ (30 ng mL⁻¹) para un blanco inyectado tras una muestra de orina dopada a alta concentración (2 µg mL⁻¹).

5.B.4.5. Aplicación del método RAM-HILIC-MS/MS desarrollado al análisis de muestras reales: reconocimiento de pautas.

Se analizaron, según el método RAM-ZIC-HILIC-MS/MS validado, 12 muestras de orina, 6 pertenecientes a voluntarios sanos (H1-H6) y 6 pertenecientes a pacientes oncológicos (C1-C6) cuyos resultados se muestran en la Tabla 5.6.

Tabla 5.6. Concentraciones encontradas, según el método RAM-ZIC-HILIC-MS/MS desarrollado y expresadas como nmol μmol^{-1} de creatinina, para las 12 muestras de orina analizadas

	URN	8OH2dG	INN	8OHG	ADN	Gua	7mGua	1mA	7mG
H1	0.206	0.062	0.395	0.041	0.514	0.750	2.253	0.781	0.072
H2	0.149	0.013	0.590	0.070	1.064	1.310	3.951	1.015	0.071
H3	0.294	0.154	0.277	0.147	0.982	0.320	1.515	0.746	0.059
H4	0.459	0.027	0.350	0.106	1.091	0.234	3.617	0.716	0.110
H5	0.271	0.011	1.016	0.089	1.118	0.170	2.085	1.053	0.223
H6	0.113	0.030	0.565	0.257	1.670	0.150	2.482	0.785	0.145
C1	1.954	0.016	1.106	0.497	1.655	0.847	7.973	1.269	0.447
C2	1.375	0.025	1.880	1.096	4.869	0.944	12.00	2.287	0.817
C3	1.664	0.019	1.814	1.109	4.641	0.897	6.768	3.152	0.737
C4	1.213	0.036	1.538	0.667	3.267	0.891	7.942	1.630	0.792
C5	2.536	0.060	0.884	0.607	3.296	0.889	7.164	2.206	0.334
C6	2.305	0.029	1.400	0.732	3.967	1.211	10.61	2.133	1.027

El análisis de muestras biológicas suele conllevar la obtención de un gran volumen de datos complejos que requieren diversos tratamientos estadísticos y técnicas de visualización asistidas por ordenador. En este trabajo se aplicaron gráficos de dispersión y de estrella²²⁶, así como análisis de componentes principales (*PCA*, *Principal Component Analysis*), análisis de agrupamiento jerárquico (*HCA*, *Hierarchical Cluster Analysis*) y modelado suave independiente por analogía de clases (*SIMCA*, *Soft Independent Modelling of Class Analogy*) como herramientas para la discriminación entre muestras de orina, analizadas según el método desarrollado, de voluntarios sanos y pacientes oncológicos.

5.B.4.5.1. Gráficos de dispersión y de estrella

La Figura VIII.6 (Pág. 310) muestra los gráficos de dispersión y de estrella obtenidos para este estudio. Los gráficos de dispersión (Fig. VIII.6.a) representan las concentraciones de nucleótidos y nucleobases encontradas según el método propuesto, corregidas frente a la concentración de creatinina, para las muestras de voluntarios sanos (H1-H6, rombos azules) y de pacientes oncológicos (C1-C6, rombos

rojos). Puede observarse como el nivel de varios de estos analitos en orina es superior en el caso de las muestras de pacientes oncológicos.

En el gráfico de estrella (Fig. VIII.6.b) las concentraciones se convierten a porcentajes respecto a la concentración en las muestras correspondientes a voluntarios sanos. Estos porcentajes relativos, calculados para cada analito, son representados mediante una línea que parte de un punto central común y que se une para formar el gráfico de estrella. Este tipo de gráfico representa mejor el incremento en la concentración de analitos ya que la normalización permite que compuestos a muy diferente concentración presente en el mismo peso. En el gráfico de estrella puede observarse que URN (concentración intermedia) y 8OHG y 7mGua (baja concentración) son, dentro de los nucleósidos y nucleobases estudiados, los que mejor permiten discriminar entre ambos grupos.

5.B.4.5.2. Reconocimiento de pautas

Previamente al análisis de reconocimiento de pautas, las concentraciones de nucleósidos y nucleobases encontradas y corregidas frente a la creatinina fueron estandarizadas (autoescalado).

En primer lugar, se aplicaron dos métodos de reconocimiento de pautas sin supervisar: PCA y HCA. El primer componente principal del análisis PCA explicó un 80% de la varianza total, resultado que aumenta hasta el 90% para los dos primeros componentes. Las puntuaciones (*scores*) de las muestras en estos dos primeros componentes (PC-1 y PC-2) se representan en la Figura VIII.7.a (Pág. 310). Puede observarse como las muestras de voluntarios sanos forman un grupo compacto a la izquierda del gráfico mientras que las muestras de pacientes oncológicos forman un grupo más disperso a la derecha. En todo caso, los dos primeros componentes principales separan claramente ambos grupos. Las cargas (*loadings*) principales para estos dos primeros componentes principales fueron 8OHG (0.7), URN (0.5) y 7mG (0.4) para PC-1 y URN (0.8) y 8OH2dG (0.2) para PC-2. HCA se aplicó utilizando unión completa (*complete linkage*) y distancia euclídea al cuadrado (*squared euclidean distance*). El dendograma generado se muestra en la Figura VIII.7.b (Pág. 310).

Puede observarse como se produce una adecuada separación, formándose dos grupos en una distancia relativa inferior a 4 y sin que se produzca ningún error.

Finalmente, se aplicó también una técnica de reconocimiento de pautas supervisada, SIMCA. Se contruyeron así dos modelos, uno para las muestras de voluntarios sanos (H1-H5) y otro para las muestras de pacientes oncológicos (C1-C5). Las muestras H6 y C6 no se utilizaron en el modelo sino que se reservaron para la predicción posterior. El gráfico de Coomans (Fig. 5.14) mostró la separación entre grupos, localizándose cada uno de ellos en su respectiva caja. Las muestras H6 y C6 fueron correctamente predichas. Los analitos con mayores cargas en cada modelo fueron 8OH2dG (0.9585 para H1-H5) y 8OHG (0.7709 para C1-C5). Por su parte, los de mayor poder discriminante fueron: 8OHG (9.9682), URN (8.0543), 7mG (6.0277) y ADN (5.2008). Estos datos están en buena concordancia con los encontrados anteriormente, demostrándose la viabilidad potencial del método con fines clínicos, siendo 8OHG, URN y 7mG los nucleósidos que mostraron mayor potencial en su aplicación a la separación de grupos.

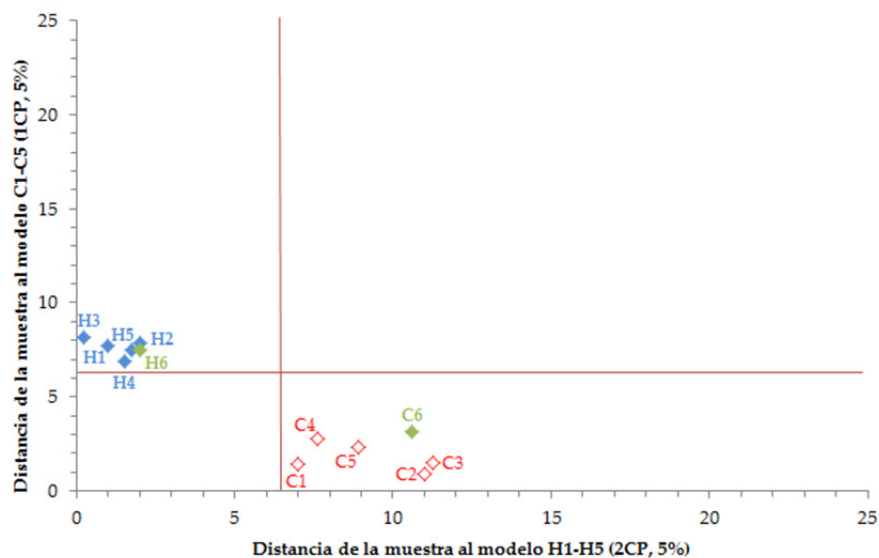


Figura 5.14. Diagrama de Coomans para el análisis SIMCA de las muestras estudiadas

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN VIII
Journal of Chromatography A 1218 (2011) 9055



Development and validation of a hydrophilic interaction chromatography–tandem mass spectrometry method with on-line polar extraction for the analysis of urinary nucleosides. Potential application in clinical diagnosis

Encarnación Rodríguez-Gonzalo*, Diego García-Gómez, Rita Carabias-Martínez

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 July 2011
Received in revised form
22 September 2011
Accepted 5 October 2011
Available online 12 October 2011

Keywords:

Restricted-access material (RAM)
Zwitterionic hydrophilic interaction
chromatography (ZIC-HILIC)
On-line sample extraction
Bioanalytical method validation
Urine
Cancer diagnosis

ABSTRACT

The present paper describes the development, validation and application of a quantitative method for the determination of endogenous nucleosides and nucleobases in urine based on the on-line coupling of a solid-phase extraction step with hydrophilic interaction chromatography–tandem mass spectrometry. The method combines the use of a highly polar restricted-access material (RAM), based on an N-vinylacetamide copolymer, for efficient analyte extraction and matrix removal, with separation by zwitterionic hydrophilic interaction chromatography (ZIC-HILIC), that revealed a satisfactory retention of the polar analytes studied. Detection using a triple quadrupole analyser allowed reliable identification and high-sensitivity quantitation of the target compounds. The on-line configuration developed, RAM-ZIC-HILIC-MS/MS, provides a convenient approach to automate the application to urine analysis, with minimum sample manipulation. The whole method was validated according to European Legislation for bioanalytical methods. The validation steps included the verification of matrix effects, calibration curve, precision, accuracy, selectivity, stability and carry-over in real samples. The results of the validation process revealed that the proposed method is suitable for the reliable determination of nucleosides and nucleobases in human urine, showing limits of detection from 0.1 to 1.3 ng mL⁻¹. The application to clinical samples was also checked; the results obtained in analyses of urine samples from healthy volunteers and cancer patients using Principal Component Analysis, Hierarchical Cluster Analysis and Soft Independent Modeling of Class Analogy are also shown.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The degradation products of nucleic acids form a particular class of compounds present in human urine [1,2]. Modified nucleosides are widely known as the metabolites of ribonucleic acids (RNA), in particular transfer-RNA (tRNA). Simple structural modifications such as base or ribose methylation, base isomerization, reduction, thiolation or deamination are the most frequent [3]. This primary source of modified nucleosides is enhanced by the presence of different types of tumours [3]. These modified nucleosides cannot be reutilized or further degraded but are excreted in the urine as intact molecules. Therefore, any malignant disease, such as cancer or metabolic imbalances affecting RNA breakdown or turnover, alters the urinary levels of excreted modified nucleosides. More than 93 modified nucleosides have been reported in urine for all forms of RNA [3]. In recent decades, modified nucleosides excreted

in human urine have been studied to examine their biomedical significance as possible biomarkers of cancer and other degenerative diseases [4,5].

Another type of important biomarker for cancers is damaged deoxyribonucleic acid (DNA) and its products/metabolites, especially 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OH2dG). Among all the different types of DNA damage, oxidative damage by reactive oxygen species is considered to be one of the most important contributors to diseases such as cancer, aging, heart disease and other age-related diseases. Of more than 20 known products of oxidative DNA damage [6] 8OH2dG has been identified as a biomarker for a few types of cancers, including breast, lung and liver cancer [7]. Because 8OH2dG is excreted in urine without any further metabolism [8], the determination of urinary 8OH2dG levels has been considered as a non-invasive method for the diagnosis of cancer.

Different analytical techniques have been reported for the determination of modified nucleosides, immunoassay [9], capillary electrophoresis [10] and, mainly, liquid chromatography [11] being the most widely employed. However, most of the proposed

* Corresponding author. Tel.: +34 923 294483; fax: +34 923 294 574.
E-mail address: erg@usal.es (E. Rodríguez-Gonzalo).

methods are relatively complicated and/or need time-consuming procedures for analyte extraction and clean-up prior to analysis. The analysis of highly polar compounds such as nucleosides involves important difficulties in reverse-phase liquid chromatography (RPLC) owing to the poor retention of these analytes in the stationary phase. Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) has been shown to be a viable alternative to RPLC for the separation of such polar compounds [12–14].

Here we developed a procedure for the extraction and clean-up of nucleosides from urine based on solid-phase extraction (SPE) with a restricted-access material (RAM) [15,16] of polar nature (N-vinylacetamide copolymer) that can be applied to a broad range of nucleosides. In most methods reported, nucleosides were isolated from urine by SPE in affinity mode using an immobilized phenylboronic acid group [11,17], which specifically binds cis-diols. However, this is not applicable to non-cis-diol nucleosides (other nucleosides that do not have vicinal hydroxyl groups in their structure) or nucleobases, as in the case of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 7-methyl-guanine, and guanine [18]. Nevertheless, on-line coupling of polar restricted-access material and the ZIC-HILIC column is the main problem to be solved; this is because of the requirement that the solvent used in the elution step must be compatible with the chromatographic separation media used for later separation. It should be noted that in most on-line SPE-LC systems proposed in the literature, LC in reverse-phase was used for the separation of analytes eluted from SPE sorbents [3,4,18,19]; other modes of LC, such as HILIC, have been little used because the solvents required for sorbent elution may not be compatible with the mobile phase employed in HILIC. To our knowledge, this is the first time that an on-line coupling of a RAM of polar nature to a HILIC column has been proposed.

In light of the above, the main aim of this work was to develop a fast and reliable method for the separation, identification, and quantification of modified nucleosides and nucleobases in human urine. This method could easily be used for clinical purposes such as the early diagnosis of cancer and other diseases, and also for monitoring the progression of disease and the response to therapy. This target was addressed in two ways: (i) through the development of a simple on-line treatment for analyte isolation and matrix removal based on a solid-phase extraction step with a RAM device of polar nature (MSPak) coupled on-line to the HILIC column; and (ii) validation of the automated method, RAM-ZIC-HILIC-MS/MS, according to current legislation for bioanalytical methods [20].

Here the potential application of the proposed approach in clinical areas was tested by analysing real samples from cancer patients. Several endogenous modified nucleosides and nucleobases were detected and quantified in the urine samples and the urinary levels were related to the presence of malignant disease.

2. Experimental

2.1. Chemicals

The analytical standard of 8-hydroxy-guanosine (8OHG), CAS RN [3868-31-3] was purchased from Cayman Chemical (Michigan, USA). Uridine (URN), CAS RN [58-96-8]; 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OH2dG), CAS RN [88847-89-6]; inosine (INN), CAS RN [58-63-9]; adenosine (ADN), CAS RN [58-61-7]; guanine (Gua), CAS RN [73-40-5]; 7-methyl-guanine (7mGua), CAS RN [578-76-7]; 1-methyl-adenosine (1mA), CAS RN [15763-06-1] and 7-methyl-guanosine (7mG), CAS RN [20244-86-4] were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Isotopically Labeled Internal Standards (ILIS)-8-13C-guanine (¹³C-Gua), 98% and ribose-2-13C-adenosine (¹³C-ADN), 99% – were purchased from Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Massachusetts, USA).

Acetonitrile (ACN) was of HPLC grade (Merck, Darmstadt, Germany) and was used as received. Ultra-high quality (UHQ) water was obtained with a Wasserlab (Noain, Spain) Ultramatic water purification system. All other chemicals were of analytical grade.

2.2. Instrumentation

The liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) system consisted of an Agilent Technologies (Waldbronn, Germany) 1200 series HPLC system with a binary pump, an additional isocratic pump, a membrane degasser, an autosampler, a six-port valve, a diode-array detector (DAD) and a 6410 LC/MS triple quadrupole (QqQ) mass spectrometer. The DAD recorded the spectra in the 190–400 nm range. The triple quadrupole mass spectrometer was equipped with an electrospray (ESI) source. The nebulizer pressure and voltage were set at 35 psi and +3500 V, respectively. Nitrogen was used as the drying (12 L min⁻¹, 350 °C) and collision gas. The separation of analytes was performed on a ZIC-HILIC column (150 mm × 4.6 mm) packed with 3.5 μm particles from Merck (Darmstadt, Germany). For on-line sample treatment, two restricted-access materials (RAM) were used as on-line extraction columns: a LiChroCARTTM 25-4LiChrospher Alkyl-Diol-Silica (ADS, 25 μm, 25 mm × 4.0 mm) RP4 from Merck (Darmstadt, Germany) and a MSPakTM PK-4A (N-vinylacetamide copolymer, 10 mm × 4.0 mm) from Shodex (Kawasaki, Japan). Other on-line sorbents used were a 25 mm × 4.0 mm home-made IsoluteTM ENV+ packed with 100 μm particles from International Sorbent Technology (Cambridge, UK) and a 20 mm × 4.6 mm OasisTM HLB packed with 25 μm particles from Waters (Massachusetts, USA).

2.3. Preparation of standards

The initial stock solutions for the ADN, 7mGua, 1mA (500 μg mL⁻¹), Gua, ¹³C-Gua and ¹³C-ADN (250 μg mL⁻¹), and 8OHG (100 μg mL⁻¹) standards were prepared in acidified UHQ water (HCl 0.1 M). The stock solutions for the URN, INN, 7mG (500 μg mL⁻¹) and 8OH2dG (100 μg mL⁻¹) standards were prepared in UHQ water. These stock solutions were stored at 4 °C in brown glass bottles. Working solutions were prepared daily.

2.4. Sample collection

Urine samples collected from six healthy volunteers (numbered from H1 to H6) were used for the development and validation of the method. The samples were collected in 250-mL brown glass bottles and frozen immediately until analysis. Before use, the samples were thawed at room temperature. Samples were filtered through 0.22 μm filters.

Urine samples collected from six hospitalized cancer patients (numbered from C1 to C6) were kindly supplied by the Teaching Hospital of Salamanca and were used in the application of the method to clinical samples.

To compensate for variations in urine concentrations, all analyte concentrations were normalized against creatinine and expressed as nmol analyte/μmol creatinine. Urinary creatinine levels were determined with the Jaffe method [21], based on the reaction between creatinine and picric acid, using photometric detection.

2.5. On-line sample preparation and LC-MS/MS separation

A similar experimental setup for on-line extraction-LC-MS/MS has been reported previously [22]. Briefly, 10 μL of urine were injected and the isocratic pump was started immediately to pump the clean-up mobile phase (UHQ water) at 0.5 mL min⁻¹ for 1 min. While the matrix components of the urine were washed to waste, the compounds studied were withheld in the extraction column. At

1 min, the six-port valve position was changed and the separation gradient (binary pump, A: ACN, B: 2.5 mM formic acid/ammonium formate buffer – pH 3.4; 1–10 min 30% B, 11–30 min 50% B) eluted the analytes at a flow rate of 0.5 mL min^{-1} in backflush mode to the analytical column, where they were separated and finally detected by the DAD and MS/MS. At 30 min, the separation ended and the gradient and the six-port valve were returned to the initial conditions. A 12-min post-run program was started, keeping the system in the initial conditions in order to equilibrate the analytical column for the next analysis. The system dead volume associated with the extraction column was minimized in order to avoid the disturbance to the chromatographic separation produced by the water from the on-line sample preparation. To accomplish this, the ends of the RAM were connected to the six-port valve using two polyether ether ketone (PEEK) tubes $100 \text{ mm} \times 0.12 \text{ mm}$ (approximately $1.2 \mu\text{L}$ each).

2.6. Method validation

The method was validated according to “Draft guideline on validation of bioanalytical methods” published by the European Medicines Agency (EMA) [20]. The guideline defines the main characteristics of a bioanalytical method that are essential to ensure the acceptability of the performance and the reliability of analytical results. These are: selectivity, lower limit of quantitation (LLOQ), the response function (calibration curve performance), accuracy, precision, matrix effects and stability of the analytes and of any internal standard in the biological matrix, and the stock and working solutions under the entire period of storage and processing conditions. Matrix effects were calculated as matrix factors (MF) according to the following experiments: (A) peak areas obtained in a standard solution injected directly into the ZIC-HILIC-MS/MS system; (B) peak areas obtained for a spiked urine sample injected directly into the ZIC-HILIC-MS/MS system, and (C) peak areas obtained for a spiked urine sample injected according to the RAM-ZIC-HILIC-MS/MS method developed. Urine sample were spiked at a level at which endogenous concentrations can be considered negligible. Thus, three different parameters were calculated: the matrix effects for the ZIC-HILIC-MS/MS system $((B/A) \times 100)$, the matrix effects using the RAM-ZIC-HILIC-MS/MS developed method $((C/A) \times 100)$, and normalized matrix effects calculated using ILIS $((C/C_{ILIS})/(A/A_{ILIS}) \times 100)$.

2.7. Graphic and statistical analyses for pattern recognition

Graphical analysis was carried out as proposed by La et al. [23] using MicrosoftTM Excel 14.0 from MicrosoftTM Office Professional Plus 2010. Briefly, each creatinine-corrected concentration of the nucleosides measured for the cancer patients and healthy volunteers were plotted to produce scatter plots and a star plot. Statistical analyses were performed using The UnscramblerTM X 10.1 from CAMOTM software. The pattern recognition techniques used were Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA) as unsupervised methods, and Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA) as a supervised method. In these techniques, the data were standardized to a common scale so that no variable would dominate over the others.

3. Results and discussion

3.1. Method development: on-line sample extraction

Liquid chromatography analysis of a matrix as complex as urine usually requires a previous sample-treatment step to eliminate large amounts of interferents from the matrix, which positively affects selectivity and sensitivity and at the same time prolongs

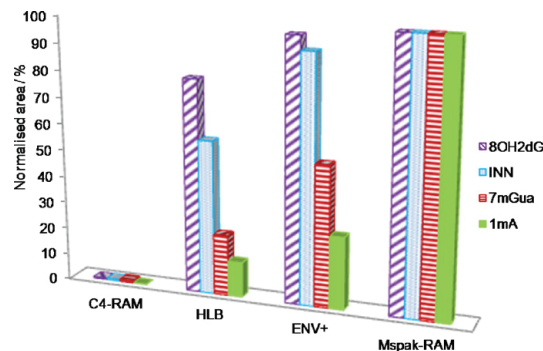


Fig. 1. MS/MS signals, normalized to the highest peak, obtained for 8OH2dG, INN, 7mGua and 1mA, working with different on-line extraction columns: C4-RAM, HLB, ENV+ and MSpak-RAM. Washing conditions: 25 mM ammonium formate – pH 6.0, 0.5 mL min^{-1} , 2 min.

column life. This step is especially important when mass spectrometry with electrospray interface (ESI) is used for detection since this source of ionization undergoes severe losses of sensitivity (ion suppression) owing to the presence of matrix compounds that co-elute with the analytes. Several authors have proposed different strategies to extract nucleosides from urine. Affinity chromatography with phenylboronic acid gel (Affigel 601TM, Bio-Rad), showing selectivity for cis-diol compounds, has been tested in off-line [24] and on-line configurations [25]. OasisTM HLB [18] and MCX [26], more general sorbents capable of extracting cis-diol and non-cis-diol nucleosides, have been tested off-line. MSpak, a highly polar restricted-access material based on an N-vinylacetamide copolymer, has shown good results coupled on-line with RPLC columns [19].

3.1.1. Selection of on-line extraction column

The high polarity of the nucleosides studied hinders their retention in extraction columns where retention is achieved by hydrophobic interactions. Four different extraction columns were selected: an Oasis HLB divinylbenzene-N-vinylpyrrolidone copolymer; an IsoluteTM ENV+ hydroxylated styrene-divinylbenzene copolymer and two restricted-access materials: an ADS-C4 (butyl-diol-silica) and a MSpak (N-vinylacetamide copolymer). Four different nucleosides were chosen for the study, covering the expected range of polarity: 8OH2dG, INN, 7mGua and 1mA ($\log D_{\text{pH } 3}$: -1.3 , -1.4 , -1.8 and -2.1 , respectively, calculated using ChemBioDraw Ultra 12.0 from CambridgeSoftTM). Analyses were carried out by directly coupling the extraction columns with the mass spectrometer. Fig. 1 shows the results obtained. As may be observed, C4-RAM provided a poor retention of the four analytes studied. The HLB polymeric column afforded better results, especially with the less polar nucleosides. The ENV+ sorbent resulted in higher areas for all nucleosides, reaching almost the maximum area for the least polar of them, 8OH2dG, although the most polar one, 1mA, only reached 27% of its maximum area. Finally, MSpak-RAM provided the highest individual areas obtained for the four extraction columns tested. In light of these results, it was decided to use the MSpak-RAM extraction column for later studies.

3.1.2. Optimization of extraction parameters

Once the most suitable extraction column for the target analytes had been selected, different factors that might improve the cleaning of the sample by eliminating possible interferents were studied. The washing process is affected by two main factors: the solvent used and the washing time, both being decisive factors for achieving an

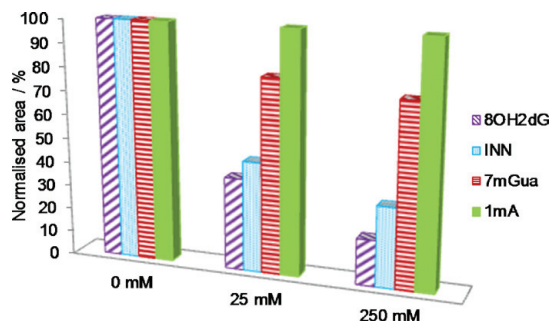


Fig. 2. MS/MS signals, normalized to the highest peak, obtained for 8OH2dG, INN, 7mGua and 1mA, working with different concentrations of ammonium formate: 0, 25 and 250 mM. Washing conditions: MSPak-RAM, 0.5 mL min⁻¹, 1 min.

efficient washing of the sample matrix with no elimination of the compounds of interest. The solvent parameters studied were the proportion of organic component, the pH, and the salt concentration. Regarding the proportion of organic component, it should be noted that when the proportion of organic solvent is high the effect of the washing of the interferents in the RAM is favoured, but the possibility of the removal of the target compounds also increases. To optimize the composition of the washing solvent, UHQ water: ACN mixtures were assayed and the content in ACN was modified from 0 to 10%. It was observed that increasing amounts of ACN produced a loss of the nucleosides, so a washing solvent without organic solvent was selected since this was the choice offering the best cleaning results without producing appreciable losses of the more polar analytes. pH was assayed from 3.0 to 9.0. The results showed that pH has no influence on the analyte washing process. Finally, the concentration of salt, in the form of ammonium formate, was studied from 0 to 250 mM. It was found that increasing amounts of salt in the washing solvent resulted in the elution of the less polar analytes (Fig. 2). As may be observed, while the 1mA signal remained constant, the signals of 8OH2dG and INN were reduced to less than 33% for 250 mM. Thus, with these results in mind, a washing solvent of UHQ water with no organic solvent or salts was selected as optimum.

The other main factor in the extraction process, the washing time, was assayed from 0.5 to 10 min. The analyses revealed a maximum for the analyte signals when the washing solvent was pumped through the extraction column for 1 min. When longer times were assayed, a loss of the more polar nucleosides was observed. Thus, for a clean-up time of 10 min the signal obtained for 8OH2dG was 60% of that found for a time of 1 min; this loss of signal was even more marked for 1mA, whose signal for 10 min of clean-up was reduced to 1% of that obtained with 1 min of clean-up.

Another important parameter in on-line extraction methods is the solvent used for elution and transfer of the analytes from the extraction column to the analytical column. The solvent must both elute the analytes and be compatible with the chromatographic separation. Furthermore, in HILIC mode ACN acts as weak chromatographic solvent, water being the strong one. Accordingly, it was important to reduce the aqueous dead volume associated with the coupling of the extraction column (MSPak-RAM) to the six-port valve in order to minimize the water that would reach the ZIC-HILIC column, disturbing the separation. In addition, for an adequate analysis the elution process should result in a narrow elution band and should be compatible with the gradient applied for subsequent chromatographic separation. As elution solvent, different mixtures of A: ACN and B: 2.5 mM formic acid/ammonium formate buffer – pH 3.4 – were assayed. Fig. 3a shows the elution profiles of

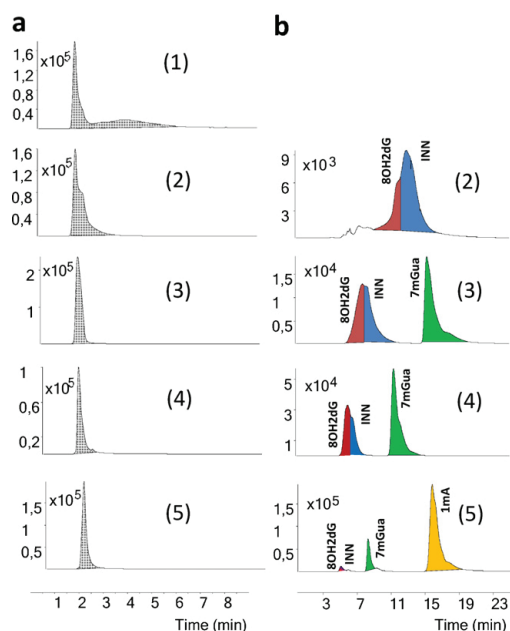


Fig. 3. MS/MS Total Ion Chromatogram (TIC) obtained with RAM-MS/MS (a, elution profiles) or with the RAM-ZIC-HILIC-MS/MS coupling developed (b) for 8OH2dG, INN, 7mGua and 1mA. MSPak-RAM on-line extraction column eluted with mixtures of 95:5 (1), 90:10 (2), 85:15 (3), 80:20 (4) and 70:30 (5) of ACN: 2.5 mM formic acid/ammonium formate buffer – pH 3.4. Washing conditions: UHQ water, 0.5 mL min⁻¹, 1 min.

mixtures ranging from 95% to 70% of ACN (obtained by bypassing the chromatographic column) and Fig. 3b shows the corresponding chromatograms (which were collected by maintaining the elution solvent constant for 5 min and then applying the separation gradient). As may be observed, high percentages of ACN produced a very broad elution peak (Fig. 3a.1 and a.2, w_b : 5.5 min), which resulted in an inadequate transfer to the ZIC-HILIC column, yielding a very poorly defined chromatogram (Fig. 3b.2). The increase in the UHQ water proportion afforded narrower elution peaks (Fig. 3a.3 and a.4), resulting in better transfer and chromatographic separation (Fig. 3b.3 and b.4). A mixture of 70% ACN: 30% 2.5 mM formic acid/ammonium formate buffer – pH 3.4 – was selected since this mixture afforded a minimum of elution peak width (Fig. 3a.5, w_b : 1.0 min). Furthermore, this mixture allowed adequate transfer to the chromatographic column and later separation (Fig. 3b.5). In addition, this mixture with 30% of aqueous phase was the mixture with the highest aqueous proportion assayed. Therefore, it resulted in a high compatibility with the residual UHQ water that reached the ZIC-HILIC column from the dead volume of the extraction column.

3.1.3. Optimization of chromatographic separation

Chromatographic separation of the nucleosides and nucleobases studied was optimized in the ZIC-HILIC column with (A) ACN and (B) 2.5 mM formic acid/ammonium formate buffer – pH 3.4 – as solvents. A low-concentration buffer was employed, since the presence of salts negatively affects the ionization of some analytes in the ESI. Furthermore, the use of acid pH results in the analytes being positively charged, thereby increasing the mass spectrometer signals and the column retentions [14]. A gradient was set, starting with the optimized conditions for the extraction column

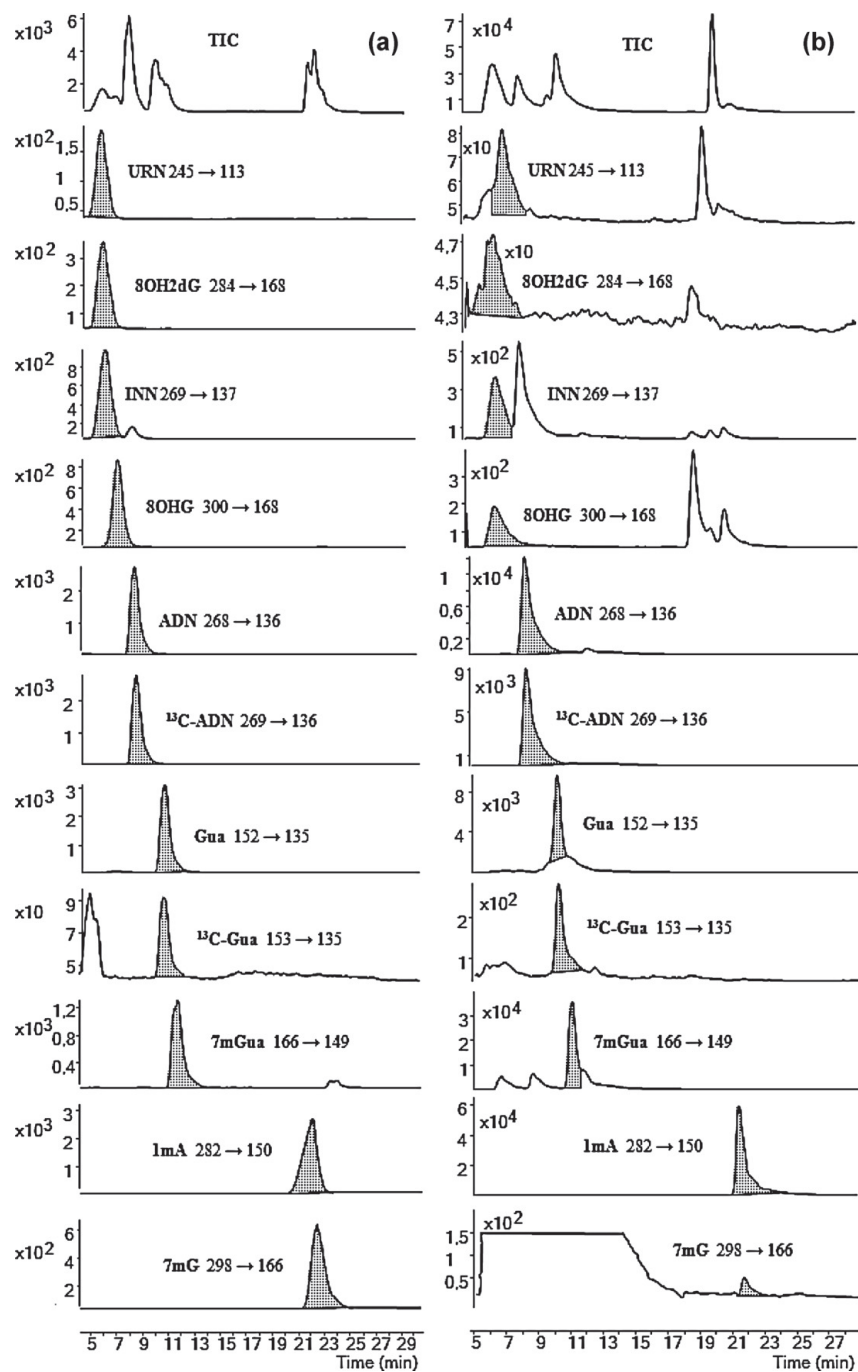


Fig. 4. LC-MS/MS Total Ion Chromatogram (TIC) and Selective Reaction Monitoring (SRM) transitions obtained by the analysis with the proposed RAM-ZIC-HILIC-MS/MS method of (a) a standard sample ($2\text{--}4\ \mu\text{g mL}^{-1}$) and (b) unspiked urine H1.

Table 1
HPLC–MS/MS and calibration curve parameters for the developed RAM–ZIC–HILIC–MS/MS method.

	URN	8OH2dG	INN	8OHG	ADN	Gua	7mGua	1mA	7mG
HPLC–MS/MS ^a									
t_R /min	5.9	6.0	6.2	7.2	8.3	10.4	11.3	22.9	23.6
Fragmentor/V	80	80	80	80	80	120	120	80	80
Quantification transition	245 → 113 (8)	284 → 168 (8)	269 → 137 (4)	300 → 168 (12)	268 → 136 (16)	152 → 135 (16)	166 → 149 (16)	282 → 150 (16)	298 → 166 (8)
Confirmation transition	245 → 96 (40)	284 → 140 (20)	269 → 119 (40)	300 → 140 (28)	268 → 119 (40)	152 → 110 (20)	166 → 124 (20)	282 → 133 (40)	298 → 149 (40)
Calibration curve ^b									
Slope × 10 ² /mL ng ⁻¹	0.4 ± 0.02	3.0 ± 0.1	3.5 ± 0.1	6.7 ± 0.1	6.5 ± 0.1	8.9 ± 0.4	5.7 ± 0.1	19.0 ± 1.9	3.3 ± 0.2
Intercept	0.0 ± 0.1	0.3 ± 0.6	0.2 ± 0.9	1 ± 3	1 ± 4	1 ± 3	1 ± 1	-3 ± 6	0.9 ± 1.6
R ²	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.998	0.999
S/N at LLOQ	81	642	343	1560	1335	708	409	1298	297
LOD/ng mL ⁻¹	1.3	0.2	0.3	0.1	0.2	0.2	0.4	0.1	0.9
ILIS	¹³ C-ADN	¹³ C-ADN	¹³ C-ADN	¹³ C-ADN	¹³ C-ADN	¹³ C-Gua	¹³ C-Gua	¹³ C-ADN	¹³ C-ADN

^a ZIC–HILIC column. A: ACN, B: 2.5 mM formic acid/ammonium formate buffer (pH 3.4). Gradient from 30 to 50% B in 30 min. Flow rate: 0.5 mL min⁻¹. Column temperature: 20 °C. Detection: triple quadrupole in Selective Reaction Monitoring (SRM) mode; collision energy in brackets. ESI nebulization in positive mode with N₂ as drying gas at 12 L min⁻¹ (350 °C). Nebulizer voltage: +3500 V. Nebulizer pressure: 35 psi. Collision gas: N₂.

^b Six points calibration curve in UHQ water with isotopically labeled internal standards (ILIS). S/N at LLOQ, signal to noise ratio at lower limit of quantitation (30 ng mL⁻¹); LOD, limits of detection calculated for a signal to noise ratio of 3.

(70% A: 30% B) and ending with 50% A: 50% B; with this, a satisfactory separation was achieved in less than 25 min. Quantitation was carried out using a Selective Reaction Monitoring (SRM) transition for each analyte and two isotopically labeled compounds as Internal Standards (ILIS). The HPLC–MS/MS parameters are listed in Table 1. Fig. 4a shows the Total Ion Chromatogram (TIC) and the nine SRMs obtained for the analysis of the nucleosides and nucleobases studied in a standard mixture (2–4 µg mL⁻¹). In Fig. 4b, the TIC and SRMs of a real unspiked sample are shown.

3.2. Method validation

The RAM–ZIC–HILIC–MS/MS method developed was validated according to the “Draft guideline on validation of bioanalytical methods” [22]. This guideline provides the requirements for the validation of bioanalytical methods, the main objective being “to demonstrate the reliability of a particular method for the determination of an analyte concentration in a specific biological matrix, such as blood, plasma, urine, saliva or tissue”.

The characteristics explored were: matrix effects, the response function (calibration curve performance), the lowest limit of quantitation (LLOQ), the precision, accuracy, selectivity and stability of the analytes and any internal standard in the biological matrix, and the stock and working solutions along the entire period of the storage and processing conditions.

3.2.1. Matrix effect

Quantitative determinations, using ESI as an ion source, may be affected by the ion suppression that mainly occurs due to the co-elution of matrix compounds with the analytes. These matrix effects were calculated as matrix factors (MF), as stated in Section 2.6. Fig. 5 shows the MF obtained for the ZIC–HILIC–MS/MS system (a), for the RAM–ZIC–HILIC–MS/MS method developed (b) and normalized MF, calculated using ILIS (c). As may be observed, MF below 10% were obtained when the urine samples were injected directly into the ZIC–HILIC column (Fig. 5a). On-line coupling of the separation column with the MSpak–RAM improved the MF up to 60–80% (Fig. 5b); in other words, the matrix effects were reduced almost 10-fold. From the normalized MF values (Fig. 5c) it is clear that 8OHG, 7mG, 8OH2dG, 1mA, INN, ADN and URN should be normalized with ¹³C-AND, and that 7mGua and Gua should be normalized with ¹³C-Gua, because of the pairing of MF values. This pairing was correlated with the molecular structure of the analytes; on one hand, 8OHG, 7mG, 8OH2dG, 1mA, INN, ADN and URN are nucleosides like ¹³C-AND, and, on the other hand, 7mGua and Gua are nucleobases, like ¹³C-Gua. It was also found that the normalized MF

values were not significantly different for 100% (differences above 100% can be correlated with the endogenous occurrence of nucleosides). This points to the notion that ILIS could be used to correct matrix effects in the method developed. Thus, quantification via standards prepared in UHQ water would be adequate if the signals were corrected with an appropriate ILIS.

3.2.2. Calibration curve

An ILIS calibration curve was built from six standards prepared in UHQ water, covering the expected range from 30 ng mL⁻¹ to 10 µg mL⁻¹, spiking with ILIS at 500 ng mL⁻¹. The ILIS calibration curve parameters for each analyte are shown in Table 1. The lowest limit of quantitation (LLOQ) was assessed using water standards at 30 ng mL⁻¹, the lowest concentration in the calibration curve. Precisions for the LLOQ ranged from 4.1% to 6.7% with signal-to-noise ratios ranging from 81 to 1560. The back-calculated concentrations of the calibration standards were in all cases within ±15% of the nominal value. The limits of detection (LOD), calculated as three times the signal-to-noise ratio, were in the 0.1–1.0 ng mL⁻¹ range.

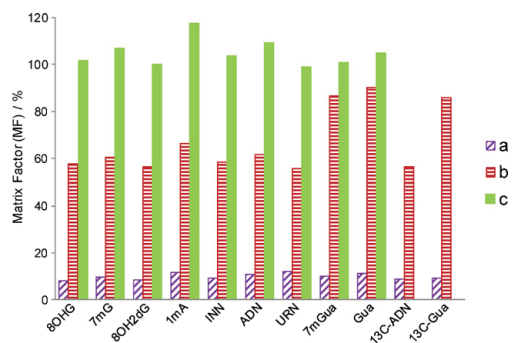


Fig. 5. Matrix effects, calculated as matrix factors (MF) for: (a) ratio between peak areas obtained for a spiked urine sample injected directly into the ZIC–HILIC–MS/MS system and peak areas obtained in standard solutions, (b) ratio between peak areas obtained for a spiked urine sample injected according to the RAM–ZIC–HILIC–MS/MS method developed and peak areas obtained in standard solutions, and (c) ratio between peak areas obtained for a spiked urine sample injected according to the RAM–ZIC–HILIC–MS/MS method developed normalized to their corresponding ILIS and peak areas obtained in standard solutions normalized to their corresponding ILIS.

Table 2

Signal precisions obtained by the analysis of an unspiked urine sample (H1) by the developed RAM-ZIC-HILIC-MS/MS method.

Analytes	Coefficient of variation (CV) ^a /%				[Analyte] ^d /ng mL ⁻¹
	Within-run ^b		Between-run ^c		
	a	b	a	b	
URN	2.3	2.6	4.6	4.1	660 ± 30
8OH2dG	1.5	1.6	5.9	4.8	230 ± 10
INN	1.5	1.6	5.8	4.6	1390 ± 30
8OHG	2.3	1.7	7.5	5.4	160 ± 20
ADN	1.8	1.7	9.6	7.8	1800 ± 30
Gua	2.1	2.2	4.9	4.4	1480 ± 30
7mGua	1.8	1.9	7.9	5.1	4870 ± 40
1mA	2.6	2.2	15	13	2890 ± 80
7mG	4.5	4.4	11	10	280 ± 20

^a Precision, calculated using analysis of variance (ANOVA), expressed as coefficient of variation (CV).^b Within-run precision: 8 consecutive injections of unspiked urine H1 without (a) and with (b) ILIS correction.^c Between-run precision: 8 consecutive injections, in 3 different days, of unspiked urine H1 without (a) and with (b) ILIS correction.^d Concentration of analytes in unspiked urine H1 obtained by calibration in UHQ water with ILIS.

3.2.3. Precision

Signal precision was evaluated by analyzing an unspiked urine sample (H1). For each analyte, the within-run and between-run precisions were calculated, always with respect to the ILIS used (Table 2). The values were obtained from eight consecutive injections on three different days of unspiked urine H1. As endogenous compounds, nucleosides were present in unspiked urine at low (8OHG, 7mG and 8OH2dG), medium (URN, INN and Gua) and high (1mA, ADN and 7mGua) levels, and hence the analysis of precision in an unspiked urine sample allowed the performance of the system to be checked over a broad concentration range. The concentrations calculated, expressed in ng mL⁻¹, are shown in Table 2. Within-run values varied in the 1–5% range and between-run values were in the 4–15% range (Table 2). Correction with ILIS did not afford a significant improvement in the precision of the signals obtained.

3.2.4. Accuracy

Accuracy, assessed in samples spiked with known amounts of the analyte (quality control samples, QC), must be determined by replicate analysis using a minimum of 5 determinations at a minimum of 4 concentration levels that cover the calibration curve range. However, this approach cannot be used in the case of endogenous compounds, since quality control samples cannot be prepared owing to the lack of blank matrix samples. A well-known approach to circumvent this problem and one that has been widely applied over many years is application of the standard addition method [27]. Thus, the accuracy was checked by analyzing six different matrices (H1–H6) by standard additions (quality control samples, QC) and comparing the results with those obtained by the RAM-ZIC-HILIC-MS/MS method developed. As in the case of precision, the analysis of unspiked urine samples demonstrated accuracy over a broad range of concentrations. The accuracy results are shown in Table 3; as may be observed, values within 13% of the nominal values for the QC samples were found.

Furthermore, the slopes of the standard addition and proposed methods were compared for each nucleoside in the six samples through a two-tailed paired *t*-test. In all cases *p* values > 0.05 were found, suggesting that there were no significant differences between the two methods.

3.2.5. Selectivity, stability, and carry-over

One of the main advantages of tandem mass spectrometry is its good ability to differentiate the analytes of interest and ILIS from endogenous components in the matrix, when working in SRM mode. Selectivity was checked by using six different matrix samples (H1–H6), which were analyzed and evaluated individually for interference. Selectivity was also confirmed by reanalyzing three

of the nucleosides studied with secondary SRM transitions (1mA: 282 → 133, ADN: 268 → 119 and 7mGua: 166 → 124). The concentrations found were not significantly different from those obtained with the primary SRM transitions, confirming that no interferences were present in the transitions used for quantification.

The stabilities of the standards and stock solutions were guaranteed by the manufacturer under the appropriate storage conditions. Working solutions were prepared daily. The stability of the samples was tested as regards freeze and thaw stability. A urine sample was analyzed just after collection and after 5 cycles of freezing–thawing. No significant differences were found for the analytical signals obtained.

One of the disadvantages of the use of an on-line extraction column for different samples is possible carry-over among them. This may be especially relevant when RAMs are used, because they have a long half-life. Carry-over was assessed by injecting a blank sample after twelve urine samples, the last one being a high-concentration sample (urine spiked at 2 μg mL⁻¹). Signals, when found, were under 5% of the LLOQ.

3.3. Method application: pattern recognition

The analysis of biological samples usually affords very complex data that require computer-aided graphic analysis and statistical methods, such as pattern-recognition techniques, to discriminate among samples. Here, scatter and star plots [23] and PCA, HCA and SIMCA are suggested as adequate tools for discriminating between urine samples from healthy volunteers and cancer patients.

3.3.1. Scatter and star plots

Fig. 6 shows the scatter and star plots. The scatter plots (Fig. 6a) represent the creatinine-corrected concentrations from healthy volunteers (samples H1–H6, represented with filled diamonds) and cancer patients (samples from C1 to C6, represented with open diamonds) obtained by the proposed RAM-ZIC-HILIC-MS/MS method. As may be seen, the level of several nucleosides was higher for cancer patients. In the star plot (Fig. 6b) the concentrations were converted to a percentage of the corresponding concentration in healthy volunteers. The percent relative concentration of each nucleoside was plotted as a line radiating from a common central point and the lines were joined together to produce the star plot for each group average. Star plots represent the increase in level in a better way, since normalization allows both the minor and major nucleosides to have the same weight. Thus, URN (medium concentration) and 8OHG and 7mG (low concentration) can be considered as the main nucleosides to discriminate between groups.

Table 3
Accuracy for the developed RAM-ZIC-HILIC-MS/MS method calculated with addition standard as reference. Analysis of unspiked urine samples (H1–H6).

	H1			H2			H3			H4			H5			H6		
	A ^a	B ^b	Acc ^c /%	A ^a	B ^b	Acc ^c /%	A ^a	B ^b	Acc ^c /%	A ^a	B ^b	Acc ^c /%	A ^a	B ^b	Acc ^c /%	A ^a	B ^b	Acc ^c /%
URN	0.19	0.206	106	0.17	0.149	89	0.30	0.294	97	0.42	0.459	110	0.29	0.271	93	0.10	0.113	107
8OH2dG	0.06	0.062	100	0.01	0.013	100	0.15	0.154	102	0.03	0.027	92	0.01	0.011	87	0.03	0.030	88
INN	0.40	0.395	100	0.59	0.590	100	0.29	0.277	97	0.42	0.350	89	1.07	1.016	88	0.58	0.565	95
8OHG	0.05	0.041	89	0.07	0.070	100	0.15	0.147	96	0.12	0.106	88	0.10	0.089	90	0.27	0.257	96
ADN	0.51	0.514	100	1.10	1.064	97	0.99	0.982	99	1.10	1.091	99	1.06	1.118	106	1.59	1.670	103
Gua	0.73	0.750	102	1.31	1.310	100	0.34	0.320	95	0.27	0.234	86	0.18	0.170	93	0.16	0.150	93
7mGua	2.30	2.253	99	3.92	3.951	101	1.41	1.515	106	3.50	3.617	104	2.12	2.085	102	2.41	2.482	104
1mA	0.81	0.781	97	0.92	1.015	107	0.72	0.746	101	0.68	0.716	106	1.04	1.053	101	0.79	0.785	99
7mG	0.07	0.072	104	0.08	0.071	88	0.06	0.059	100	0.12	0.110	94	0.24	0.223	92	0.16	0.145	93

^a A: concentration of analytes in unspiked urines, expressed as nmol μmol⁻¹ of creatinine, obtained by standard addition with the proposed method.
^b B: concentration of analytes in unspiked urines, expressed as nmol μmol⁻¹ of creatinine, obtained by calibration in UHQ water with ILIS.
^c Accuracy calculated using standard addition as quality control.

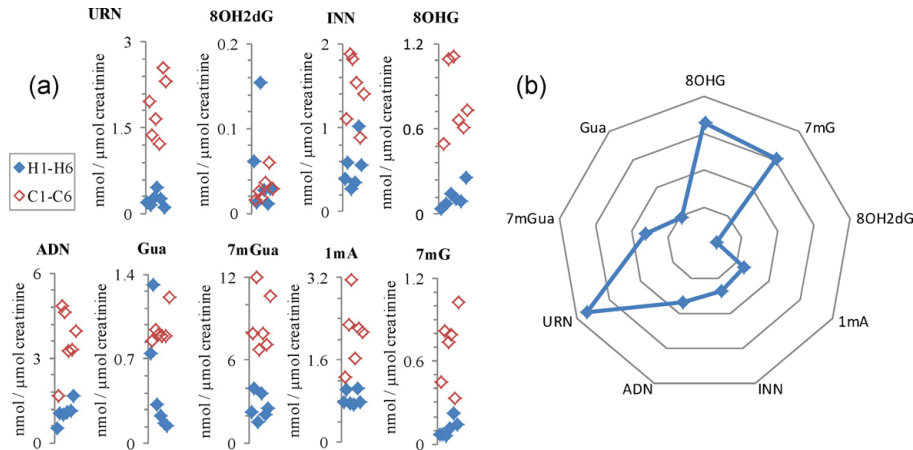


Fig. 6. Scatter plots (a) and star plot (b) obtained by analysis of urine samples from H1 to H6 (healthy volunteers) and C1 to C6 (cancer patients) with the proposed RAM-ZIC-HILIC-MS/MS method.

3.3.2. Pattern recognition

Standardized and creatinine-corrected concentrations were used for statistical pattern recognition. First, unsupervised methods, PCA and HCA, were applied. PCA showed that the total variance explained by the first PC was 80% whereas the second PC explained 90% of it. The scores of the samples in these two dimensions (PC-1 and PC-2) are plotted in Fig. 7a. The healthy volunteer samples

grouped close on the left of the graph while the cancer patient samples formed a looser cluster on the right. In any case, taking into account only the two first PCs, the samples were clearly separated in two groups. The main loadings for these two PCs were 8OHG (0.7), URN (0.5) and 7mG (0.4) for PC-1 and URN (0.8) and 8OH2dG (0.2) for PC-2. HCA was applied using complete linkage and squared Euclidean distance. The dendrogram generated (Fig. 7b)

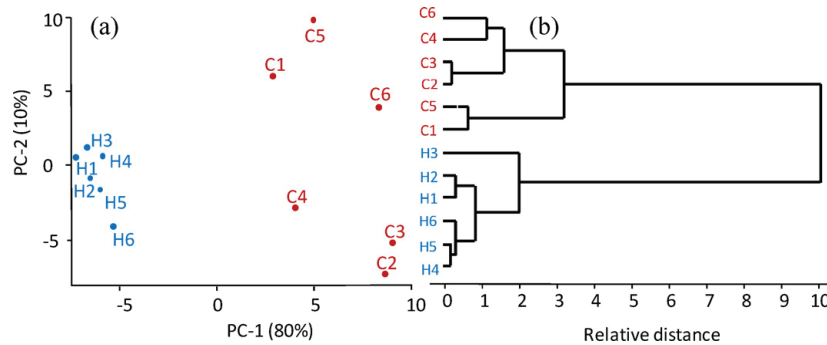


Fig. 7. Principal Component Analysis (PCA) scores of the two first PCs (PC-1 and PC-2) (a) and complete linkage, squared Euclidean distance dendrogram obtained by Hierarchical Cluster Analysis (HCA) (b). H1–H6: healthy volunteer urine samples. C1–C6: cancer patient urine samples.

showed an adequate separation, forming two groups at a relative distance lower than 4. Not a single wrong linkage was observed.

Finally, SIMCA, a supervised pattern-recognition method, was applied to the data. Two models were constructed: one for the healthy volunteer samples – from H1 to H5 – using two PCs, and another one for the cancer patient samples – from C1 to C5 – using one PC. The H6 and C6 samples, not included in the model, were subsequently used for prediction. Coomans' diagram revealed the two sets to be separated, each in its own box. The H6 and C6 samples were correctly predicted. The nucleosides with the highest loadings in each model were 8OH2dG (0.9585 for H1–H5) and 8OHG (0.7709 for C1–C5). The analytes with the highest discriminant power were as follows: 8OHG (9.9682), URN (8.0543), 7mG (6.0277) and ADN (5.2008). These results are in good agreement with those obtained with the star plot.

4. Conclusions

This work proposes the coupling of a restricted-access material (RAM), based on N-vinylacetamide copolymer, with a ZIC-HILIC column. This novel coupling allows the on-line extraction of urine and subsequent separation, detection and confirmation of urinary nucleosides and nucleobases up to the low-ng mL⁻¹ level. This configuration means that sample treatment is minimum, affording shorter analysis times, more automation, and lower costs than off-line methods.

The method was successfully applied to the analysis of urine samples from cancer patients. These samples had increased levels of nucleosides and nucleobases in comparison with the control urine samples. The application of pattern-recognition methods, such as PCA, HCA and SIMCA, allowed correct grouping of the samples studied, 8OHG, URN and 7mG the being the nucleosides that showed the highest discriminatory power. These results show that the method developed could potentially be used as a control method for clinical purposes such as early diagnosis and therapeutic response monitoring.

Acknowledgements

The Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain (Project CTQ2008-02200/BQU) and Junta de Castilla y León (Grupo de Excelencia

GR-65) are gratefully acknowledged for financial support for this work. D.G.G. gratefully acknowledges financial assistance from the Ministerio de Educación, Spain (FPU grant).

References

- [1] M. Harri, H. Kasai, T. Mori, J. Tornaues, K. Savela, K. Peltonen, J. Chromatogr. B 853 (2007) 242.
- [2] H.M. Liebich, S. Müller-Hagedorn, F. Klaus, K. Meziane, K.R. Kim, A. Frickenschmidt, B. Kammerer, J. Chromatogr. A 1071 (2005) 271.
- [3] B. Kammerer, A. Frickenschmidt, C.E. Müller, S. Laufer, C.H. Gleiter, H. Liebich, Anal. Bioanal. Chem. 382 (2005) 1017.
- [4] D. Bullinger, H. Fröhlich, F. Klaus, H. Neubauer, A. Frickenschmidt, C. Hennege, A. Zell, S. Laufer, C.H. Gleiter, H. Liebich, B. Kammerer, Anal. Chim. Acta 618 (2008) 29.
- [5] L.B. Jeng, W.Y. Lo, W.Y. Hsu, W.D. Lin, C.T. Lin, C.C. Lai, F.J. Tasi, Rapid Commun. Mass Spectrom. 23 (2009) 1543.
- [6] C. Richter, J.W. Park, B.N. Ames, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 (1988) 6465.
- [7] K. Otsuka, S. Terabe, J. Chromatogr. A 875 (2000) 163.
- [8] S. Schmalzing, W. Nashabeh, Electrophoresis 18 (1997) 2184.
- [9] A.J. Sasco, F. Rey, C. Reynaud, J.Y. Bobin, M. Clavel, A. Nivelau, Cancer Lett. 108 (1996) 157.
- [10] Y. Jiang, Y. Ma, Anal. Chem. 81 (2009) 6474.
- [11] R. Tuytten, F. Lemièrre, E.L. Esmans, W.A. Herrebout, B.J. van der Veken, B.U.W. Maes, E. Witters, R.P. Newton, E. Dudley, Anal. Chem. 79 (2007) 6662.
- [12] A.J. Alpert, J. Chromatogr. 499 (1990) 177.
- [13] F. Qin, Y.Y. Zhao, M.B. Sawyer, X.F. Li, Anal. Chem. 80 (2008) 3404.
- [14] E. Rodríguez-Gonzalo, D. García-Gómez, R. Carabias-Martínez, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 3994.
- [15] P. Sadílek, D. Satinsky, P. Solich, Trends Anal. Chem. 26 (2007) 375.
- [16] N.M. Cassiano, V.V. Lima, R.V. Oliveira, A.C. de Pietro, Q.B. Cass, Anal. Bioanal. Chem. 384 (2006) 1462.
- [17] E. Dudley, S. El-Shakawi, D.E. Games, R.P. Newton, Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 19 (2000) 545.
- [18] H.Y. Li, S.M. Wang, H.M. Liu, S.S. Bu, J. Li, D. Han, M.Z. Zhang, G.Y. Wu, J. Mass Spectrom. 44 (2009) 641.
- [19] S. Cho, B.H. Jung, S.H. Lee, W. Lee, G. Kong, B.C. Chung, Biomed. Chromatogr. 20 (2006) 1229.
- [20] European Medicines Agency (EMA), Guideline on validation of bioanalytical methods, CHMP/EWP/192217/2009.
- [21] M. Jaffe, Z. Physiol. Chem. 10 (1886) 391.
- [22] E. Rodríguez-Gonzalo, D. García-Gómez, R. Carabias-Martínez, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 40.
- [23] S. La, J. Cho, J. Kim, K. Kim, Anal. Chim. Acta 486 (2003) 171.
- [24] X. Zhao, W. Wang, J. Wang, J. Yang, G. Xu, J. Sep. Sci. 29 (2006) 2444.
- [25] R. Tuytten, F. Lemièrre, W. Van Dongen, E. Witters, E.L. Esmans, R.P. Newton, E. Dudley, Anal. Chem. 80 (2008) 1263.
- [26] W. Hsu, W.T. Chen, W. Lin, F. Tsai, Y. Tsai, C. Lin, W. Lo, L. Jeng, C. Lai, Clin. Chim. Acta 402 (2009) 31.
- [27] N.C. van de Merbel, Trends Anal. Chem. 27 (2008) 924.

5.B.5. Revisión bibliográfica: fases estacionarias para la separación de nucleobases, nucleósidos y nucleótidos mediante cromatografía de interacciones hidrofílicas

En este apartado de la tesis se ha realizado una profunda revisión bibliográfica sobre el estado del arte del uso y preparación de fases estacionarias para la separación de nucleobases, nucleósidos y nucleótidos mediante cromatografía hidrofílica usando distintas fases estacionarias comerciales de sílice sin modificar, fases estacionarias hidroxiladas, de amida o amina, cargadas, etc. En la revisión se ha dedicado una especial atención a mostrar las nuevas tendencias en el desarrollo de fases estacionarias comerciales. Dichas tendencias incluyen la reducción del tamaño de partícula, el uso de de fases móviles “verdes” o de columnas con base polimérica.

En la revisión se recogen también los estudios realizados utilizando columnas no comerciales. Cabe destacar, en este campo, las diferentes propuestas presentadas para la preparación de columnas hidrofílicas monolíticas, basadas tanto en esqueletos de sílice como poliméricos.

En todos los casos se discute el rendimiento de las diferentes columnas en términos de resolución, sensibilidad y velocidad; buscando alcanzar separaciones más eficientes y rápidas.

Finalmente, se muestran las diferentes aplicaciones propuestas para la separación y análisis de estos analitos mediante cromatografía hidrofílica en campos como la biología, la industria alimentaria o la medicina.

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Trends in Analytical Chemistry (TrAC) 47 (2013) 111

Stationary phases for separation of nucleosides and nucleotides by hydrophilic interaction liquid chromatography

D. García-Gómez, E. Rodríguez-Gonzalo, R. Carabias-Martínez

This review describes recent trends in novel stationary phases for hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC), focusing on separation of nucleosides and nucleotides. The performance of these novel HILIC stationary-phases is discussed in terms of resolution, separation, improved sensitivity and increased speed in order to achieve more efficient, faster chromatographic separations.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Column technology; Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC); Monolith; Nucleobase; Nucleoside; Nucleotide; Resolution; Sensitivity; Separation; Stationary phase

Abbreviations: AAC-co-BA, Acrylic acid-co-n-butylacrylate ester; AAPBA, 3-acrylamidophenylboronic acid; ACN, Acetonitrile; APS, Aminopropylsilica; BACM, 4-aminocyclohexylmethylcyclohexylamine; BVPE, 1,2-bis(p-vinylphenyl)ethane; CMCH, Carboxymethyl chitosan; CNP, Carbon nanoparticle; CTSAP, Click triazole-amino stationary phase; DBN, 1,5-diazabicyclo[4.3.0] non-5-ene; EDMA, Ethylene dimethacrylate; ERLIC, Electrostatic repulsion liquid chromatography; EtOH, Ethanol; Et(OH)₂, 1,2-ethanediol; GNP, Gold nanoparticle; HA, Humic acid; HILIC, Hydrophilic interaction liquid chromatography; HMAA, N-(hydroxymethyl) methacrylamide; HTMA, 2-hydroxyl-3-[4-(hydroxymethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl]propyl 2-methylacrylate; MAA, Methacrylic acid; ME, 2-mercaptoethanol; MEO, Oxidized 2-mercaptoethanol; MeOH, Methanol; MS, Monolith silica; MSA, [2-(methacryloyloxy)-ethyl]dimethyl-(3-sulfopropyl)ammonium hydroxide; NAHAM, N-acryloyl-tris(hydroxymethyl)-aminomethane; PA, Polyacrylamide; PAA, Polyacrylic acid; PEI, Polyethyleneimine; PETA, Pentaerythritoltriacylate; PHA, Polyhydroxyethylaspartamide; pNA-SIL, Poly[N-acryloyl-tris(hydroxymethyl)-aminomethane]-coated silica; PSA, Polysulfoethyl; TG, 1-thioglycerol; RAM, Restricted access material; RF, Retention factor; SPE, N,N-dimethyl-N-methacryloxyethyl-N-3(sulfopropyl)-ammonium betaine; TCM, Traditional chinese medicine; TEPIIC, Tris(2,3-epoxypropyl) isocyanurate; TGO, Oxidized 1-thioglycerol; ZIC, Zwitterionic interaction chromatography; 6TG, 6-thioguanine

D. García-Gómez,
E. Rodríguez-Gonzalo*,
R. Carabias-Martínez
Departamento de Química
Analítica,
Nutrición y Bromatología,
Facultad de Química,
Universidad de Salamanca,
37008 Salamanca, Spain

1. Introduction

In recent years, hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) has been established as the appropriate chromatographic mode for the retention and the separation of polar and hydrophilic compounds. The combination of the retention of polar compounds and the high organic content in the mobile phase makes this mode of chromatography suited to high-sensitivity, quantitative analysis based on applying liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS).

It has been accepted that partitioning between the aqueous layer associated with the stationary phase and the organic component of the mobile phase is the main

retention mechanism. However, the participation of secondary interactions (e.g., dipole-dipole, hydrogen bonding and ion-exchange) can play an important role in separation, leading to changes in selectivity.

As the HILIC mode is becoming more popular for the chromatographic analysis of polar and ionic analytes, a wider range of HILIC stationary phases is available on the market. Novel materials with different types of polar functional groups (including amide, amino, diol, cyano, zwitterionic and other charged and non-charged groups) are continually being developed and assessed as stationary phases under HILIC conditions.

The increasing interest in this chromatographic mode as a viable alternative to reversed-phase LC (RPLC) can be seen

*Corresponding author.
Tel./Fax: +34 923 294 483;
E-mail: erg@usal.es

in recent reviews that have appeared in the literature. In recent years, 26 review articles have been published on the topic, some of them general [1–6]. The applications of HILIC include the analysis of different polar molecules, such as toxic residues – antibiotics [7] and other pharmaceuticals [8] in foods and pesticides in environmental matrices [9]. HILIC also seems to be a promising alternative to more traditional LC methods in bioanalysis. In particular, the analysis of highly polar metabolites, such as nucleosides and nucleobases, involves important difficulties in RPLC, due to the poor retention of these analytes in the stationary phase. Normal-phase LC (NPLC) would afford a better retention but is not desirable, due to the difficulty involved in coupling this chromatographic technique with MS.

Nucleobases, nucleosides and nucleotides are the basic components of all cells, forming the different nucleic acids. Their clinical interest in bioanalysis has expanded considerably in recent decades, so nucleosides are investigated as potential biomarkers of oncological processes, being excreted with or without modifications through the urinary tract [10–13]. Apart from in field of biology, nucleobases, nucleosides and nucleotides are also important in other avenues of enquiry. In foods, monophosphate nucleotides are nutrients of special importance during periods of rapid growth or after injury, hence the importance of the supplementary contribution of such nutrients in neonatal feeding [14–16].

The aim of this article is to discuss current trends and advances in the development and the evaluation of the different approaches recently proposed for new HILIC stationary phases, which may allow selectivity and/or sensitivity to be enhanced, or faster separations to be achieved. It summarizes the information published in more than 75 papers in the literature, mostly in the period 2008–12, with the main focus on recent advances and trends in the HILIC approach for nucleoside and nucleotide analysis.

Also, we consider new trends in column technology (e.g., reduction in particle size down to 1.7 μm , the use of superficially-porous particles, and the use of monolithic columns of different types) as applied to the separation of nucleotides, nucleosides and their bases.

2. Commercial columns

2.1. Unmodified silica

The simplest stationary phase, the first to be used in HILIC, is that formed by unmodified silica (bare silica). The separation mechanism proposed for this stationary phase is based on a partition equilibrium between the aquo-organic phase (usually mixtures of water as the minor component and acetonitrile (ACN) as the major component), and a phase – mainly aqueous – bound to the stationary phase.

The different separations proposed for the compounds studied here have a high percentage of organic compo-

nents in the mobile phase, which is usual in the stationary phases of bare silica (Table 1). Thus, it has been possible to separate four nucleobases and four nucleosides on Atlantis HILIC Silica, formed by bare silica, in 14 min [17].

The low retention factors (RFs) usually found for these compounds in bare silica columns can be improved by varying the nature of the composition of the mobile phase. Working with an isocratic regime with 90% of ACN, the replacement of the water by $\text{Et}(\text{OH})_2$, MeOH and EtOH leads the RFs to increase in the following order: $\text{H}_2\text{O} < \text{Et}(\text{OH})_2 < \text{MeOH} < \text{EtOH}$. Thus, an order of elutropic strength of a protic modifier of EtOH $< \text{MeOH} < \text{Et}(\text{OH})_2 < \text{H}_2\text{O}$ could be established [18]. This can be explained in terms of the fact that the replacement of water molecules by organic solvent may modify the formation of the semi-stationary layer.

2.2. Hydroxylated stationary phases

The low selectivity and retentions shown by HILIC columns made of bare silica can be improved by introducing functional polar groups. One of the simplest modifications consists of introducing alkyl chains with hydroxyl functional groups. The separation mechanism is based, as in the case of bare silica columns, on partition equilibrium, although the presence of hydroxyl residues allows the appearance of interactions via hydrogen bridges, leading to an increase in selectivity.

Within the columns with hydroxylated stationary phases, Luna-HILIC, formed by a cross-linked diol phase (Fig. 1a), is the one most used for the separation of the compounds of interest, offering a neutral stationary phase that allows a water-rich layer to form readily on the surface [19,20]. For this Luna HILIC column, plots of $\log k_0$ versus \log of the percentage of water in the mobile phase resulted in a linear fit in the range 45–55% water in the mobile phase, consistent with an adsorptive mechanism. At around 45% water composition in the mobile phase, a slight curvature of the line was observed, suggesting that a partitioning mechanism was taking hold as the column became saturated. Those authors [19,20] suggested that, during gradient elution at higher amounts of water, the adsorptive mechanism may be more prevalent and the separation will fall under conditions more common in RPLC.

In this phase, the replacement of water by $\text{Et}(\text{OH})_2$, MeOH and EtOH has also been studied [18]. The gain in retention upon reducing the polarity of the protic modifier was stronger for nucleobases, although the general trend of increasing retention upon reducing the polarity of the modifier was not so evident for all solutes.

Other columns modified by hydroxylation tested for separation were polyhydroxyethylaspartamide (PHA, Fig. 1b) and Pronto-SIL-DIOL (Fig. 1c). Using PHA, the authors concluded that, in comparison with amine-bonded phases, the functionalization of stationary phases with hydroxy groups resulted in less retentive

Table 1. Commercial HILIC columns proposed for the analysis of nucleosides and nucleotides

Analytes	HILIC column	Column dimensions/mm	Separation Time/min	Mobile phase	Flow/mL/min	Detection	Ref.
Four nucleobases and four nucleosides	Atlantis HILIC Silica (Bare)	150 × 4.6 (5 μm)	14	90% ACN 10% AF:FA 200 mM	1.0	DAD: 260 nm	[17]
Four nucleobases and nine nucleosides	DAISOGE (Bare silica)	150 × 4 (5 μm)	30/15/8/10	90% ACN AA 5 mM 10% EtOH/MeOH/Et(OH) ₂ /H ₂ O	1.0	DAD: 254 nm	[18]
Five nucleobases and nine nucleosides	Luna-HILIC	150 × 4.6 (5 μm)	7	90% ACN 10% AA 10 mM (pH: 5)	1.0	UV: 254 nm	[19]
Four polynucleotides	Luna-HILIC	150 × 2.0 (3 μm)	25	A: ACN B: AA 5 mM (pH: 5.8) 0-2.5 min: 85%-70% A 2.5-17.5 min: 70%-40% A	0.1	ICP-MS: ³¹ P ¹⁶ O ⁺	[20]
Four nucleobases and nine nucleosides	Luna-HILIC	150 × 4.6 (5 μm)	30/20/10/7	90% ACN AA 5 mM 10% EtOH / MeOH / Et(OH) ₂ / H ₂ O	1.0	DAD: 254 nm	[18]
Five nucleobases and ten nucleosides	PHA	100 × 2.1 (3 μm)	25	90% ACN 10% AA 20 mM (pH: 4.7)	0.1	UV: 254 nm	[21]
Four nucleobases and nine nucleosides	Pronto-SIL-DIOL	150 × 4 (5 μm)	35/20/10/7	90% ACN AA 5 mM 10% EtOH / MeOH / Et(OH) ₂ / H ₂ O	1.0	DAD: 254 nm	[18]
Five polynucleotides	TSK-Gel-NH ₂ 100	150 × 2.0 (3 μm)	30	A: MeOH B: AF:FA 30 mM (pH: 2.5) 0-10 min: 15% A 10.1-30 min: 2% A	0.2	MS/MS (QqQ)	[22]
Six nucleobases and thirteen nucleosides	TSK-Gel Amide 80	150 × 2.0 (3 μm)	110	95% ACN 5% B: AA 10 mM (pH: 6.8)	0.2	DAD: 260 nm	[23]
Four nucleosides	TSK-Gel Amide 80	150 × 4.6 (3 μm)	50	90% ACN 10% SA:AAc 20 mM (pH: 4.4)	0.6	UV: 262 nm	[24]
Five nucleobases and ten nucleosides	TSK-Gel Amide-80	150 × 4.6 (5 μm)	40	90% ACN 10% AA 20 mM (pH: 4.7)	0.5	UV: 254 nm	[21]
Six nucleobases and six nucleosides	TSK-Gel Amide 80	150 × 2.1 (5 μm)/(3 μm)	80	A: ACN B: AF 10 mM (pH: 4) 0-20 min: 95% A 20-40 min: 95%-90% A 40-80 min: 90%-85% A	0.15/0.1	DAD: 260 nm	[25]
Four polynucleotides	TSK-Gel Amide 80	150 × 2.0 (3 μm)	25	A: ACN B: AA 5 mM (pH: 5.8) 0-2.5 min: 85%-70% A 2.5-17.5 min: 70%-40% A	0.1	ICP-MS: ³¹ P ¹⁶ O ⁺	[20]
Four nucleosides and four nucleotides	XBridge Amide	150 × 4.6 (3.5 μm)	60	85% ACN 15% AP 5 mM	1.0	UV: 262 nm	[26]
Five nucleobases and nine nucleosides	XBridge Amide	150 × 3	16	90% ACN 10% AA 10 mM (pH: 5)	0.6	UV: 254 nm	[19]
Four nucleobases and four nucleosides	VENUSIL HILIC	150 × 4.6 (5 μm)	23	90% ACN 10% AF:FA 200 mM	1.0	DAD: 260 nm	[17]

continued on next page

Table 1. *continued*

Analytes	HILIC column	Column dimensions/mm	Separation Time/min	Mobile phase	Flow/mL/min	Detection	Ref.
Seven nucleobases and nine nucleosides	VENUSIL HILIC	250 × 4.6 (5 μm)	75	A: ACN B: FA 0.2%, AF 20 mM 0-15 min: 95% A 15-20 min: 95%-90% A 20-30 min: 90% A 30-50 min: 90%-80% A 50-60 min: 80%-60% A 60-65 min: 60%-50% A 67-75 min: 50% A 90% ACN	0.8	MS (TOF)	[27]
Five nucleobases and ten nucleosides	COSMOSIL HILIC	150 × 4.6 (5 μm)	30	10% AA, 20 mM (pH: 4.7) 80% ACN	0.5	UV: 254 nm	[21]
Two nucleobases	ZIC-HILIC	50 × 4.6 (5 μm)	2.5	20% AF, 2.5 mM	0.5	DAD: 254 nm	[32,33]
Five nucleobases	ZIC-HILIC	150 × 2.1 (5 μm)	0.5	FA 25 mM	2.0	DAD: 254 nm	[32,33]
Four nucleobases and two nucleosides	ZIC-HILIC	150 × 4.6 (3.5 μm)	15	80% ACN 20% AF, 2.5 mM	0.1	DAD: 254 nm	[32,33]
Five nucleobases and ten nucleosides	ZIC-HILIC	150 × 4.6 (5 μm)	13	FA 25 mM 80% ACN	0.5	DAD: 254 nm	[29,34]
Six nucleobases and six nucleosides	ZIC-HILIC	150 × 4.6 (5 μm)	30	20% AF:FA 2.5 mM (pH: 3) 90% ACN	0.5	MS (Q) UV: 254 nm	[21]
Two nucleobases and six nucleosides	ZIC-HILIC	150 × 2.1 (5 μm)	60	10% AA, 20 mM (pH: 4.7) A: ACN B: AF 10 mM (pH: 4)	0.15	DAD: 260 nm	[25]
Five nucleobases and eleven nucleosides	ZIC-HILIC	150 × 4.6 (3.5 μm)	25	0-10 min: 95%-85% A 10-60 min: 85% A	0.5	MS/MS (QqQ)	[35]
Twelve nucleotides	PSA	200 × 4.6 (5 μm)	35	A: ACN B: AF:FA 2.5 mM (pH: 3.1) 0-10 min: 70% A 10-30 min: 50% A	1.0	DAD: 254 nm	[36]
				A: ACN B: AP 15 mM (pH: 6) 0-18 min: 97%-95% A 18-19 min: 95%-90% A 19-30 min: 90%-80% A 84% ACN 16% 80 mM TEAP pH: 3.0	1.0	UV: 260 nm	[31]

ACN, Acetonitrile; AF, Ammonium formate; FA, Formic acid; AA, Ammonium acetate; AP, Ammonium phosphate; SA, Sodium acetate; AC, Ammonium carbonate; TEAP, Triethylammonium phosphate. Other abbreviations: see Fig. 1.

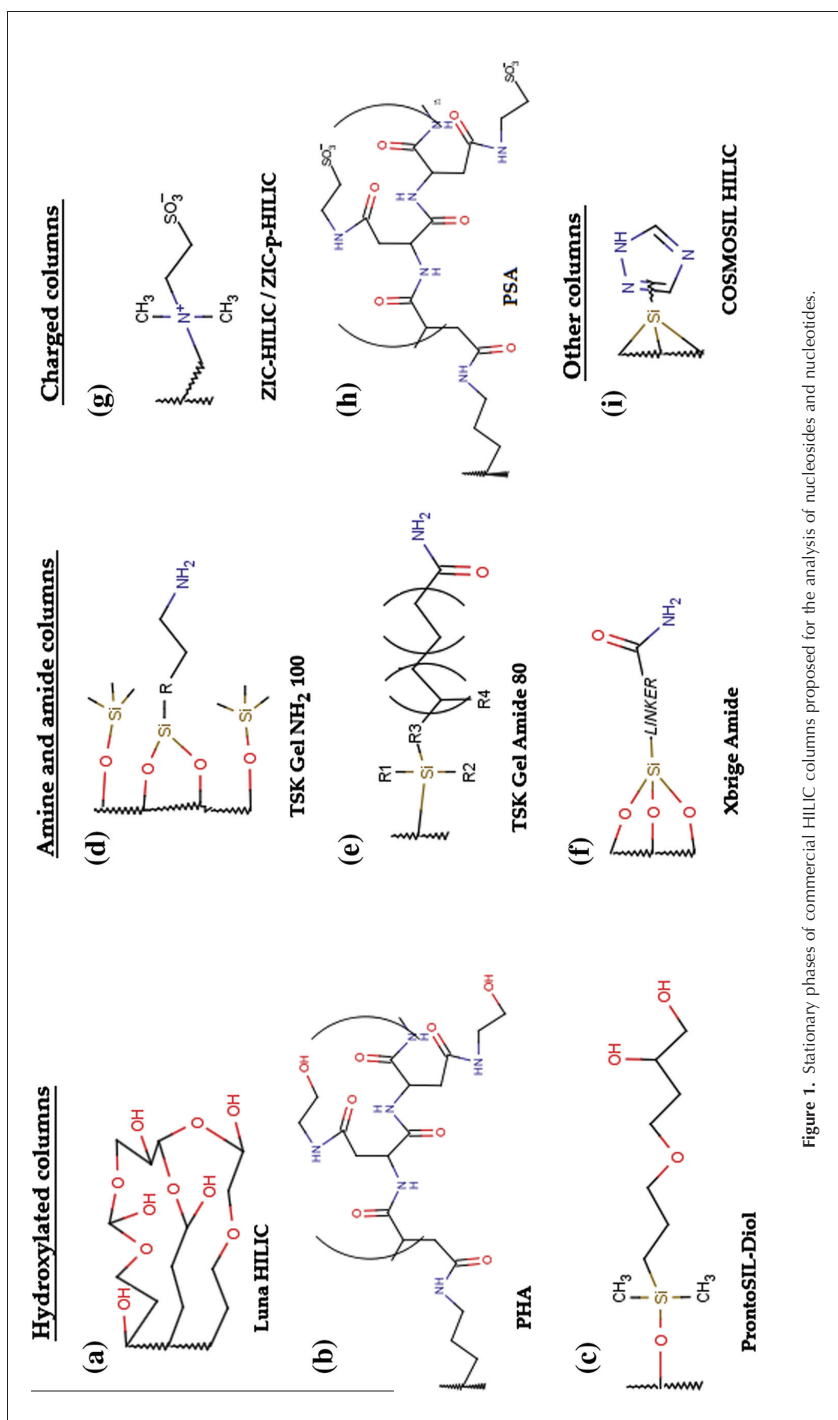


Figure 1. Stationary phases of commercial HILIC columns proposed for the analysis of nucleosides and nucleotides.

and less selective HILIC phases [21]. Using a Pronto-SIL-DIOL column, the separation of nucleosides and nucleobases with mixtures of ACN and H₂O, Et(OH)₂, MeOH and EtOH, respectively, has been studied [18]. The trends in changes of selectivity for adenosine/uridine, guanosine/adenosine, as well as cytidine/adenosine as a function of the type of modifier were in good agreement for the two commercial diol-type columns studied by those authors (Luna-HILIC and Pronto-SIL-DIOL).

2.3. Amine and amide stationary phases

Another usual modification used to increase selectivity is derivatization with amine and amide terminal groups. As in the case of columns modified by hydroxylation, the separation mechanism involves a partition equilibrium in which the appearance of hydrophilic interactions leads to an increase in selectivity. These stationary phases allow interactions by hydrogen bonding as donor and acceptor. It may be seen that, depending on the pH of the mobile phase, the amine stationary phase could be positively charged and, therefore, as well as partition phenomena, additional ionic interaction mechanisms may take place.

Inoue et al. [22] studied the retention of nucleotides in HILIC columns with amine residues. The separation of five nucleotides revealed strong retention in a TSK Gel NH₂-100 column (Fig. 1d). In comparison, it was difficult to determine the separation of adenosine monophosphate and uridine monophosphate in a TSK-gel Amide-80 column.

Among the best studied stationary phases in HILIC for the separation of nucleobases, nucleosides and nucleotides are those based on amide residues. Unlike amine-based columns, amide columns are not susceptible to Schiff-base formation, thus improving accuracy of quantitation. The results showed that Amide-HILIC was superior to RPLC for the separation of nucleosides and nucleobases [20,21,23–25]. It was also observed that TSK Gel Amide-80 columns (Fig. 1e) have good chemical and mechanical stability, although the separation of adenine and hypoxanthine could not be achieved.

XBridge Amide columns (Fig. 1f) have been used by different authors [19,26]. It was observed that on using this column a partition mechanism would be involved during oligonucleotide separation.

It has been reported [17] that, in a VENUSIL HILIC column packed with acrylamide-bonded silica, the elution order of peaks differed from that in other HILIC columns [27].

Finally, the separation of the compounds studied on a COSMOSIL HILIC (Fig. 1i) was tested. In this, the silica was modified with triazole groups [21]. This phase can be categorized as weakly hydrophilic, exhibiting less retention than amide columns.

2.4. Charged stationary phases

The search for new stationary phases with a view to increasing selectivity in HILIC has led to the development of charged stationary phases. In these, the silica is mod-

ified with different alkyl chains containing residues with positive and/or negative charged groups. The retention mechanism in this case is mixed. On one hand, the partition equilibrium typical of HILIC is maintained, but, on the other, weak electrostatic interactions occur between those charged analytes and the stationary phase. The contribution to retention of this mechanism has been studied in depth [28,29] and, to a large extent, it depends on the nature of the analytes and on the concentration of salts present in the mobile phase. This type of stationary phase is of special interest as regards the separation of nucleobases and nucleotides, which are found as cations at pH values lower than 3, and for nucleotides, present in anionic form across a broad pH range.

The most widely studied charged stationary phase in the separation of the compounds studied is ZIC-HILIC, whose stationary phase is zwitterionic, showing at the same time a quaternary ammonium group and a sulfonic group (Fig. 1g). However, several authors have shown that, due to steric hindrance, the interaction with the quaternary ammonium residue is negligible [30], giving rise to an electrostatic interaction with the analytes through the negatively-charged sulfonic group. Thus, the positively-charged analytes (nucleobases and nucleosides) undergo electrostatic attraction while the negatively-charged ones (nucleotides) undergo electrostatic repulsion-hydrophilic interactions (ERLIC) [31]. Thus, ERLIC is defined for HILIC separations where the surface chemistry of the ionic column is used to repel a common ionic polar group on an analyte or within a set of analytes, to facilitate separation by the remaining polar groups.

The first application of charged stationary phases dates back to 2004 [32,33]. In later references [29,34], the authors confirmed that the retention of these compounds in ZIC-HILIC occurs through a mechanism of partition between the aqueous phase bound to the stationary phase and the organic component of the mobile phase. However, the mechanism is complex, and it presumably involves other processes (e.g., the retention of the nucleosides and nucleobases with hydroxyl groups by hydrogen bonding or electrostatic interactions, the latter in the case of positively-charged analytes). The electrostatic contribution to retention was about 25–50% at low salt concentrations in the eluent, although it should be noted that this contribution decreased significantly as the salt concentration rose. In order to exploit these interactions with a view to enhancing selectivity and resolution in ZIC-HILIC separations, the use of mobile phases at low salt concentrations should be considered. It has also been suggested that the flow rate of the mobile phase should be raised to 5.0 mL/min, [32,33], still with acceptable back-pressure levels, which demonstrates its suitability for high-throughput separations. The ZIC-HILIC phase [21] exhibited greater selectivity than the amide-bonded phases, the latter giving peak fronting under the separation conditions. ZIC-HILIC

Table 2. New trends in commercial HILIC columns proposed for the analysis of nucleosides and nucleotides

Analytes	HILIC column	Column dimensions/mm	Separation Time/min	Mobile phase	Flow/ml/min	Detection	Ref
Eight nucleosides	KINETEX HILIC core-shell (bare silica)	50 × 4.6 (2.6 μm)	4	94% ACN 6% H ₂ O	2	DAD	[37]
Four nucleobases and four nucleosides	BEH HILIC (Bare silica)	100 × 2.1 (1.7 μm)	4	90% ACN 10% AF:FA 200 mM	0.2	DAD: 260 nm	[17]
One nucleobase	BEH HILIC (Bare silica)	50 × 2.1 (1.7 μm)	3	95% ACN 5% AF 10 mM, FA 160 mM	0.3	MS/MS (QqQ)	[38]
Eleven nucleotides	Bare titanium	150 × 4.6 (3 μm)	40	A: ACN B: 10 mM PB (pH: 6.0) 0-6 min: 75% A 6-40 min: 65% A	1.0	UV: 254 nm	[39]
Five nucleosides	PHA	150 × 0.3	50	A: ACN B: 0.2% FA, 10 mM AF 95%-50% A	0.005	MS/MS (QTrap)	[40]
One nucleobase and seven nucleosides	ZIC-HILIC	250 × 0.1	35	5% AF:FA 25 mM (pH: 3.8) 95% ACN	0.0008	DAD: 254 nm	[41]
Two nucleotides	ZIC-pHILIC	150 × 4.6 (5 μm)	4	A: ACN B: 10 mM AC (pH: 4.4) 0-1 min: 63%-20% A 1-2 min: 20% A	0.5	MS/MS (IT)	[42]
Eight nucleotides	ZIC-pHILIC	150 × 2.1 (5 μm)	20	70% ACN 30% AC 100 mM (pH: 8.9)	0.2	UV: 254 nm	[43]
Eight nucleotides	2 coupled in series ZIC-pHILIC	150 × 2.1 (5 μm)	35/70	70% ACN 30% AC 100 mM (pH: 8.9)	0.2/0.1	UV: 254 nm	[43]
Five nucleobases	Zorbax Rx-SIL (Bare silica)	250 × 4.6 (5 μm)	8	95% EtOH 5% AF:FA 20 mM (pH:3) 1.5 mL/min CO ₂	1.0	DAD: 254 nm	[44]
Four nucleosides	TSK-Gel Amide 80	150 × 4.6 (3 μm)	16	90% MeOH 10% SA:AAc 20 mM (pH: 4-4) 0.2 mole fraction CO ₂	0.4	UV: 262 nm	[24]
Four nucleosides and four nucleotides	XBridge Amide	150 × 4.6 (3.5 μm)	8	90% MeOH 10% AP 75 mM + DBN 5mM + NaCl 200 mM + 0.15 mole fraction CO ₂	1.0	UV: 262 nm	[26]

ACN, Acetonitrile; AF, Ammonium formate; FA, Formic acid; PB, Phosphate buffer; AC, Ammonium carbonate; TEAP, Triethylammonium phosphate; DBN, 1,5-Diazabicyclo(4.3.0)non-5-ene. Other abbreviations: see Fig. 1.

provided the best selectivity for those analytes for all the stationary phases studied.

Also, gradient separation was found to be more versatile [25,35,36], highlighting the notion that only the ZIC-HILIC column provided full resolution of the selected compounds and that, although the 5- μm and 3- μm TSK Gel Amide-80 columns had demonstrated great chemical and mechanical stability, they were unable to separate all the analytes under the conditions applied. In one of those investigations, the throughput of the assay was improved by the use of 96-well and 384-well plates.

A column with polysulfoethyl groups (PSA, Fig. 1h) has been used for the separation of nucleotides [31]. Under these conditions, all nucleotides are retained through hydrophilic interaction, despite being repelled by the stationary phase to some extent (ERLIC). With mixtures of solutes that differ greatly in charge, repulsion effects can be exploited to antagonize selectively the retention of the solutes that would normally be retained most. This permits the isocratic resolution of mixtures that normally require gradients, including peptides, amino acids, and nucleotides.

2.5. New trends in commercial columns

In the present decade, new types of HILIC stationary phases are continually being released, and other "classic" stationary phases [e.g., bare silica and materials with amide, poly(succinimide)-derived, and sulfoalkylbetaine functional groups] have been improved in their separation efficiency thanks to down-sizing the particles and the internal diameter, apart from changes in the composition of mobile phases in the search for greener HILICs (Table 2).

One way of increasing the efficiency of separation in bare silica columns is to use stationary phases with particle diameter less than 3 μm . In this way, it is possible to achieve the separation of up to eight nucleosides in a KINETEX HILIC core-shell (2.6 μm) column in 4 min [37]. However, the results showed that, with the increase in the percentage of organic solvent, the peaks become more asymmetric. The RFs are greater with the increase of ACN in the mobile phase, and consequently the polar interactions occurring in HILIC mode are also more significant; this explains why the peaks become asymmetric.

A greater reduction in particle size down to 2 μm requires the separations to be adapted to the UHPLC technique. A BEH HILIC column, with a particle size of 1.7 μm , separated eight analytes in 4 min [17,38]. The elution order was the same with an Atlantis HILIC and a BEH HILIC column. The retention times of the nucleobases and nucleosides in the BEH HILIC column were shorter, but good separation was achieved due to the use of the 1.7- μm packings.

Another new avenue of enquiry consists of replacing the silica by titania as the stationary phase. Titania is attracting increasing interest as a chromatographic packing material. It has greater mechanical and pH

stability (pH 1–14) than silica. It acts as an anion exchanger at low pH and a cation exchanger at high pH. More importantly, the unsaturated titanium(IV) ions are strong Lewis-acid sites, which have an affinity for compounds donating electron pairs. In contrast, silica behaves as a cation exchanger only and does not have any ligand-exchange properties [39]. The results showed that the separation was governed by a HILIC mechanism of partitioning, in which the main retention mechanism was not ion exchange.

As in other chromatographic modes, one of the new fields now being developed is the use of capillary chromatography. With capillary columns (PHA-HILIC), good resolution is obtained for nucleoside isomers {e.g., 1-methyl-guanosine and 2-methyl-guanosine are baseline separated, permitting their unambiguous identification, since their ESI product-ion spectra are not discriminatory [40]}.

Similarly, the use of a commercial ZIC-HILIC capillary monolithic silica (MS) column has been proposed. This column had zwitterionic functionality and measured 0.1 mm i.d., with a mobile-phase flow rate of 0.8 $\mu\text{L}/\text{min}$ [41]. Also, separation could be improved by applying a temperature pulse of about 15 s in duration (40°C to 120°C) in the capillary columns, demonstrating that temperature pulsing provides a useful tool for the optimization of resolution in capillary HILIC, since the chromatographic retention and selectivity in discrete sections of the chromatograms can be manipulated to yield improvements in resolution.

The use of polymer-based columns is also gaining ground. Thus, for the separation of nucleotides [42,43], a polymer-based column has been proposed (ZIC-pHILIC); this allows the use of mobile phases with more extreme pH values than the common range for silica-based columns. A study has also been made of the coupling in series of two ZIC-pHILIC columns [43], since solvent optimization did not result in complete separation of the eight nucleotide triphosphates in a single column. Two identical ZIC-pHILIC columns were coupled in series to increase the number of plates from 1941 to 4252 ($N/m = 12,927$ and 14,159, respectively). It was observed that ZIC-pHILIC columns provided better separations than silica-based ZIC-HILIC columns, confirming the differences in performance and selectivity. In addition, the behavior of nucleotide retention when temperature is increased can be explained in terms of the dissociation of analyte/water clusters.

Other authors have focused their attention on modifying the composition of the mobile phase. In this sense, the replacement of ACN by EtOH has been proposed in a Zorbax Rx-SIL column [44]. The addition of CO_2 to a mobile phase composed of ethanol/buffer allowed ACN/buffer to be replaced in HILIC separation. The disposal of CO_2 not only converts HILIC into a green chromatographic method, but also offers the opportunity to work in the enhanced-fluidity mode for all chromatographic modes and to perform supercritical or

sub-critical fluid chromatography. The same approach has been tested in both TSK-Gel Amide 80 and Xbridge Amide columns, with the observation that the replacement of ACN by MeOH and CO₂ significantly reduces the separation times [24,26]. These studies show that the difference in the solvent strength of ACN compared to that of methanol leads to differences in the order of elution, selectivity and RFs, expanding the elution window when CO₂ is used in the mobile phase.

The use of 1,5-diazabicyclo[4,3,0] non-5-ene (DBN) proved to be valuable for improving peak shape. Methanol/H₂O mobile phases are not commonly used in HILIC, due to increased viscosity and lower selectivity in comparison with ACN/H₂O; however, the addition of salt is a valuable asset to the formation of the water-enriched layer, allowing for selective partitioning of the analytes. Coupled to the addition of CO₂, which lowers the viscosity and increases the change in entropy of many analytes, selectivity was greatly improved. These studies showed that a CO₂/methanol/water mixture provides an interesting alternative to ACN/water as a mobile phase in HILIC and that such a mixture is better suited than ACN/water to the separation of compounds with large differences in polarity.

3. Non-commercial columns

The rapid development of HILIC over the past decade has been accompanied by the appearance of different commercial stationary phases. However, these continue to be scarce, their variety clearly being less than that available for RPLC. Furthermore, knowledge of the mechanisms of retention involved in HILIC is still limited, with reports of significant differences among the different stationary phases studied. Accordingly, several groups have focused their attention on the development of new stationary phases that can be applied in HILIC. These special separation materials for HILIC demonstrate good selectivity and reproducibility for the separation of polar compounds. Furthermore, the preparation procedure is usually complicated and difficult, due to the complex structures and active groups on the bonded stationary phases (Table 3). In general, synthesis is based on derivatization, in one or more steps, introducing different types of polar residues, although the use of silica or polymeric monolithic columns has also been proposed.

3.1.1. Non-charged hydroxylated stationary phases

One of the most common modifications in non-commercial columns is that based on the introduction of hydroxylated residues into the stationary phase, since these provide important added selectivity upon interacting with the analytes through hydrogen bridges. In its simplest configuration, it comprises an alkyl chain bound to the silica, showing a diol group at the opposite end. Three such columns have been tested for the separation of the compounds of interest [45].

The simplest one comprised an 11-carbon-atom chain (C1, Fig. 2a) although an ether-bridged column (C2, Fig. 2b) and a stable cross-linked (ethylene-bridged) diol phase have also been proposed. The authors reported that the retention and the selectivity profiles of polar packings containing structurally quite related ligands, being tested under similar elution conditions, could vary considerably.

Another option in the synthesis of hydroxylated stationary phases is the introduction of a linker in an intermediate step of the synthesis. The nature of the linker is usually polar, providing an added selectivity factor. Thus, studies have been conducted using columns with a thioether linker [45] and its sulfoxide oxidation equivalent [18] with terminal hydroxyl groups (ME and MEO, Fig. 2c) and diol (TG and TGO, Fig. 2d). As may be seen, a differential introduction of phase polarity, by converting embedded sulfide groups to sulfoxides and/or increasing the amount of hydroxyl groups on the chromatographic ligand, effectively changes the HILIC characteristics. Each of these functionalities may add increments in specific retention and selectivity and hence the presence of different non-ionic polar motifs in a single ligand may lead to quasi-mixed-mode HILIC.

The study of TG and TGO was broadened by replacing the aqueous phase by Et(OH)₂ and MeOH [18]. The authors believed that, in particular, the type of protic modifier is an attractive yet scarcely explored mobile-phase parameter that can be used conveniently to adjust chromatographic selectivity for polar probes in a dedicated manner and suggested that, in analogy to RP chromatography, a plethora of adsorptive and partitioning mechanisms seem to contribute to the global retention process of HILIC.

Another widely-used linker is based on a triazole organic group. In this group, there are single OH columns (Fig. 2e), multi-OH columns (Fig. 2f) [17] with the elution order of the analytes being similar, and Poly(HTMA) columns (Fig. 2g). The Poly(HTMA) column, including a terminal molecule of triazole and a hydroxylated residue, was synthesized by an epoxide-azide-Cu(I)-catalyzed cycloaddition reaction of glycidyl methacrylate and propargyl alcohol to provide a β -alcohol in a one-pot process. The retention of the solutes in this column was mainly controlled by hydrogen bonding under HILIC conditions [46].

Another hydroxylated column that also has a complex structure is pNA-SIL (poly[N-acryloyltris(hydroxymethyl)aminomethane]-coated silica (Fig. 2h) [47], which has amide bonds and terminal amine and cyano groups. This novel hydrophilic polymer-coated silica sorbent was prepared using the radical "grafting from" polymerization method through surface-bound azo [47]. In this column, the retention of nucleosides was mainly based on the HILIC mechanism, exhibiting good reproducibility and stability.

3.1.2. β -cyclodextrin stationary phases

Among the various hydroxylated columns, one particular group comprises residues of β -cyclodextrins (Fig. 2i)

Table 3. Non-commercial HILIC columns proposed for the analysis of nucleosides and nucleotides

Analytes	HILIC column	Column dimensions/mm	Separation Time /min	Mobile phase	Flow/ mL/min	Detection	Ref.
Two nucleobases and five nucleosides	C1/C2/C3	150 × 4	5/10/9	90% ACN 10% AA 150 mM	1.0	DAD: 254 nm	[45]
Two nucleobases and five nucleosides	ME/MEO	150 × 4	4/7	90% ACN 10% AA 150 mM	1.0	DAD: 254 nm	[45]
Two nucleobases and five nucleosides	TG/TGO	150 × 4	6/9	90% ACN 10% AA 150 mM	1.0	DAD: 254 nm	[45]
Five nucleobases and nine nucleosides	TG	150 × 4	20/15/10/7	90% ACN 10% EtOH/MeOH/Et(OH) ₂ /H ₂ O	1.0	DAD: 254 nm	[18]
Five nucleobases and nine nucleosides	TGO	150 × 4	45/15/10	90% ACN AA 5 mM 10% MeOH/Et(OH) ₂ /H ₂ O	1.0	DAD: 254 nm	[18]
Four nucleobases and four nucleosides	Single OH	150 × 4.6 (5 μm)	6	90% ACN 10% AF:FA 200 mM	1.0	DAD: 260 nm	[17]
Four nucleobases and four nucleosides	Multi OH	150 × 4.6 (5 μm)	10	90% ACN 10% AF:FA 200 mM	1.0	DAD: 260 nm	[17]
Two nucleobases and three nucleosides	Poly(HTMA)	100 × 4.6	70	10% AF:FA 200 mM A: ACN B: AF 20 mM	1.0	UV: 254 nm	[46]
Five nucleosides	pNA-sil	150 × 4.6	12	0-30 min: 95% A 30-60 min: 95-70% A 60-80 min: 70% A 85% ACN	1.0	UV: 254 nm	[47]
Four nucleobases and four nucleosides	β-Cyclodextrin	150 × 4.6 (5 μm)	12	15% AF 20 mM (pH: 6.1) 90% ACN	1.0	DAD: 260 nm	[17]
Nine nucleosides	β-Cyclodextrin	150 × 4.6	15	10% AF:FA 200 mM A: ACN B: AA 10 mM	1.0	DAD: 260 nm	[3]
Two nucleobases and three nucleosides	Amino	150 × 4.6	7	0-8 min: 85%-80% A 8-15 min: 80%-57% A 83% ACN	1.0	UV: 248 nm	[48]
Five nucleobases and nine nucleosides	APS 5μ-1	150 × 4	15	17% AF 5 mM 90% ACN	1.0	UV:254 nm	[19]
Three nucleobases and three nucleotides	CTSAP	100 × 4.6	10	10% AA 10 mM (pH: 5) 90% ACN	1.0	UV: 254 nm	[49]
Four nucleosides	Poly(AAc-co-BA)	150 × 4.6	14	10% AF 10 mM (pH: 3.15) 95% ACN 5% SA 10 mM	1.0	DAD: 254 nm	[50]
Three nucleobases and three nucleosides	Tetrazole	150 × 4.6	9	90% ACN 10% AF 100 mM (pH: 7)	1.0	UV: 254 nm	[51]
Five nucleobases and five nucleosides	EC-HA-APS	100 × 4.6	40	90% ACN 10% H ₂ O	0.5	DAD: 254 nm	[52]
Three nucleobases and three nucleosides	Glycosylphenyl glycine	100 × 2.1	20	90% ACN 10% H ₂ O	0.2	UV: 254 nm	[53]
Five nucleobases and nine nucleosides	C-Choc	150 × 4	15	90% ACN 10% AA 10 mM (pH: 5)	1.0	UV:254 nm	[19]
Two nucleobases and three nucleosides	CNPs	150 × 4.6	10	83% ACN 17% AF 5 mM	1.0	UV: 248 nm	[48]

ACN, Acetonitrile; AF, Ammonium formate; FA, Formic acid; AA, Ammonium acetate; SA, Sodium acetate. Other abbreviations: see Figs. 2 and 3.

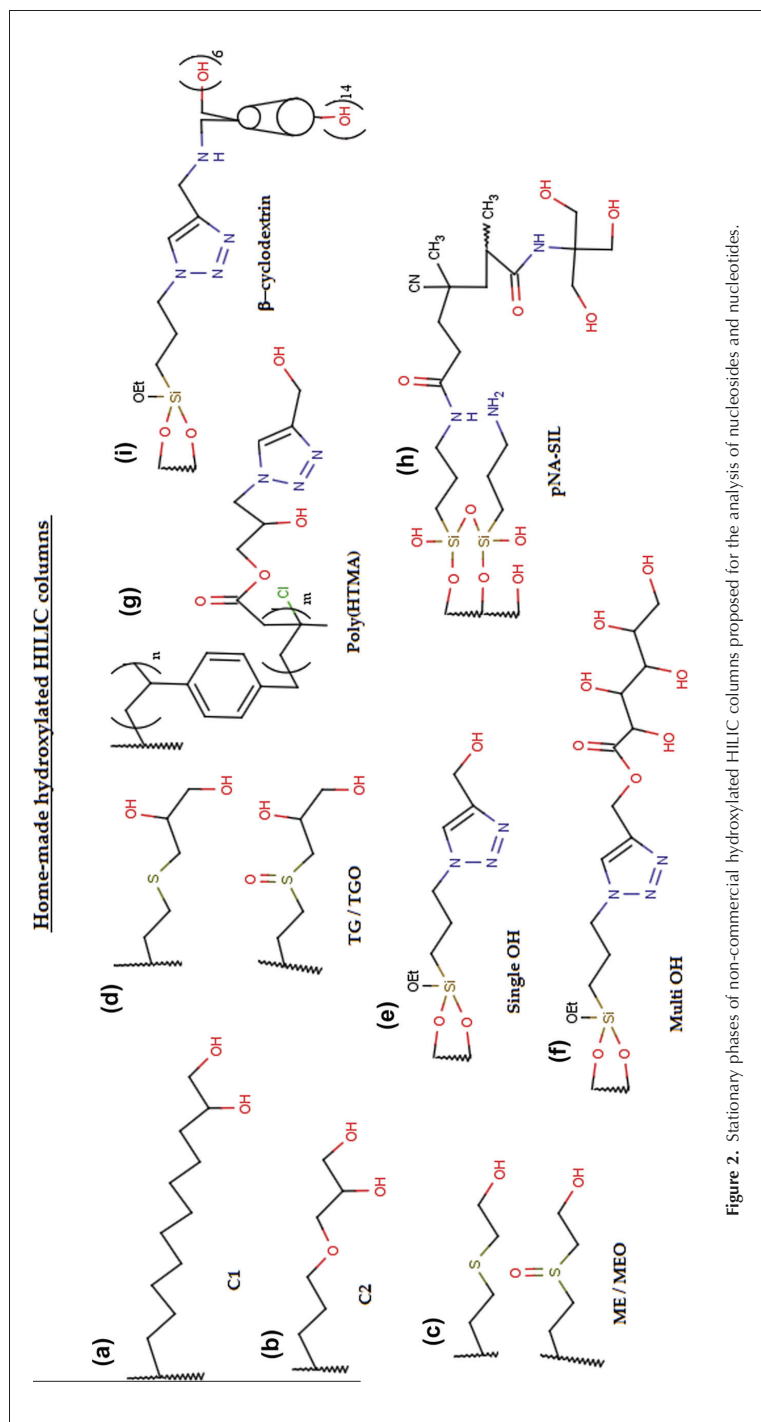


Figure 2. Stationary phases of non-commercial hydroxylated HILIC columns proposed for the analysis of nucleosides and nucleotides.

The presence of cyclodextrins may elicit an additional degree of selectivity due to the different interaction of the analytes (even enantiomers) with the internal cavity of the β -cyclodextrin column [17].

Another column proposed, formed by β -cyclodextrins as the stationary phase, is included in what is known as click chemistry [3]. The stationary phase was prepared by covalently bonding β -cyclodextrins on silica particles via a dipolar cycloaddition between the organic azide and the terminal alkyne. The resulting click β -cyclodextrin material exhibited the typical chromatographic behavior of HILIC, mainly providing a partitioning mechanism and some other interactions (e.g., ion exchange and electrostatic repulsion effects).

3.2. Amine stationary phases

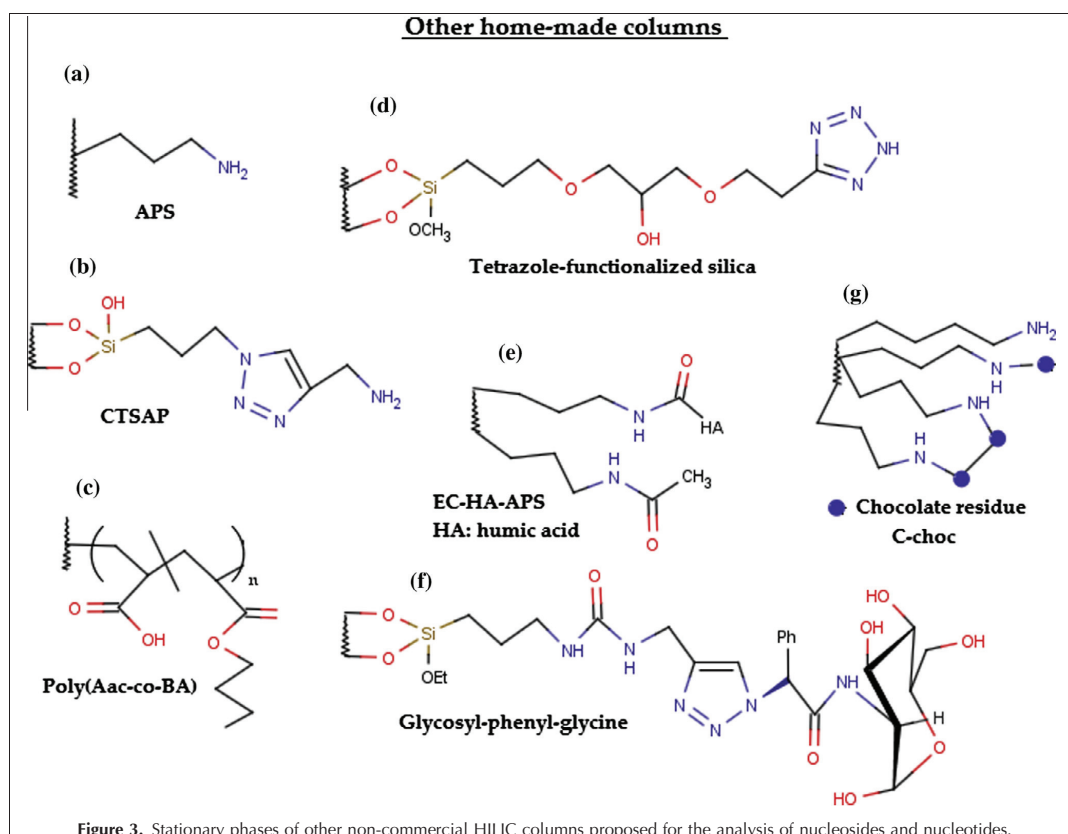
As in the case of commercial columns, columns with terminal amino groups have been prepared. The simplest are those formed by amino [48] and aminopropyl silica (APS, Fig. 3a) [19]. This APS column was prepared by the reaction of bare silica with 1.7 mmol 3-aminopropyltrimethoxysilane per gram of silica. These columns were used at slightly acidic pH values, which could be

responsible for electrostatic or ion-exchange interactions.

A CTSAP (Fig. 3b) column has also been assayed, prepared by the immobilization of propargylamine on azide-silica via click chemistry [49]. The retention mechanism was found to match the typical HILIC retention well. The retention of all analytes increased with the increase in the salt concentration, due to the enhancement of the polarity of the water-rich layer resulting from high salt concentration. Nevertheless, at low salt concentrations, the retention decreased with the increase of salt concentration, which could be explained by the ion-exchange mechanism dominating the separation process.

3.3. Other non-charged stationary phases

Although columns prepared with hydroxyl and amine residues are the most common, other types of column have been developed. In these, the goal is to use another class of polar residues {e.g., a mixed column of acid and ester groups (polyacrylic acid-co-n-butylacrylate ester, Fig. 3c) [50]}. Poly(Aac-co-BA) was covalently bonded onto the surface of silica by the "grafting from" polymerization method. The surface characteristics of the



polymer-grafted silica were strongly related to the environmental pH. The hydrophobic surface of the polymer-grafted silica can be obtained at lower pH, while the hydrophilic surface is obtained at higher pH.

Dai et al. [51] prepared a tetrazole-functionalized column (Fig. 3d). The effect of the organic modifier, buffer pH and ionic strength further supported the viewpoint that the retention of the solutes was mainly controlled by hydrogen bonding between the solutes and the tetrazole group on the surface of the stationary phase under HILIC conditions.

It is also possible to find columns in which the formation and the nature of the polar residues are more complex. Thus, there are columns with humic acids (HAs) [52], glycosyl groups [53] and groups arising from the Maillard reaction [19] as polar residues. In the column formed by HAs (Fig. 3e), the authors concluded that this stationary phase, which was obtained by immobilization of HA to APS via chemical bond formation and a subsequent end-capping process, exhibited mixed-mode RPLC/HILIC behavior towards some nucleosides and nucleobases [52].

The column formed by glycosyl groups (Fig. 3f) was prepared using click chemistry. This material showed typical HILIC characteristics in the separation of nucleosides and nucleobases, and no buffer was required, making it much easier to apply this kind of stationary phase to LC-MS. Based on its hydrophilic characteristics and special interaction, enhanced by structures similar to glycopeptides, it has great potential to enrich glycosylated peptides, and other applications in the separation of highly-polar compounds, showing longer retention times and better separation ability than the commercial Atlantis HILIC column [53].

Finally, the C-choc column (Fig. 3g) is prepared via the Maillard reaction of cellobiose derivatives. Of all the sugars investigated, cellobiose was found to be the most promising primer, resulting in the most efficient packing material. The reaction cascade using cellobiose resulted in an efficient chromatographic material, which further served as a Chocolate HILIC column (chocolate refers to the fact that these phases are brownish). Cellobiose is composed of two glucose sub-units that are clearly superior to other reducing sugars in the course of Maillard-product formation on a surface. The Chocolate HILIC column even outperformed the efficiency of the commercial Luna HILIC column [19].

Columns formed of carbon nanoparticles (CNPs) obtained by refluxing corn-stalk soot in nitric acid are of a different nature [48]. In this refluxing treatment process, $-OH$ and $-CO_2H$ groups are generated on the surface of the CNPs, conferring a hydrophilic nature. All the components were well resolved and the nucleosides displayed stronger retention on the new column than on an amino column. It was reasonable to assume that the surface carboxylic groups on the new phase might interact with the basic adenine, thus leading to stronger retention and greater tailing for adenine.

3.4. Monolithic stationary phases

One approach for developing high-throughput HPLC methods is to use monolithic columns. In contrast to conventional HPLC columns, monolithic columns are formed from a single piece, affording them greater porosity and permeability than conventional particle columns. Based upon the nature of their construction materials, monolithic columns can be classified as organic polymer-based or silica-based columns. Both types have been addressed in depth [54–57], as has their general application in HILIC [58,59].

3.4.1. Silica monolithic columns. Silica monolithic columns, which appeared before polymeric columns, are prepared via a sol-gel process that begins with the generation of $Si(OR)_4$ to form Si-O-Si polymers. Once formed, the silica monolith can be functionalized chemically to obtain the desired stationary phase. These silica-based monolithic columns were first developed by the team of Nakanishi and Tanaka in the 1990s. However, they were not applied in HILIC until much later, when the chemical functionalization of silica allowed the introduction of polar groups, typical of hydrophilic stationary phases (Table 4).

Only four proposals for the use of monolithic columns based on silica functionalized for the separation of nucleobases, nucleosides and nucleotides have been put forward, two of them from the team of Nakanishi and Tanaka.

Ikegami et al. [60] polymerized acrylamide on an MS capillary column to obtain the polyacrylamide-coated MS capillary column that they designated PAMS(100), in which the value in brackets refers to the i.d. of the column in μm . It was found to be useful for HILIC-mode separation due to the high column efficiency and higher permeability in comparison with a particle-packed HILIC column (TSK Gel Amide 80) for the separation of several nucleosides.

The same authors [61] also prepared a poly(acrylic acid)-coated MS column that they call MS-200T-PAA. This column showed much higher separation efficiency than a commercially-available HILIC-type particle-packed column. Based on the high permeability and small-sized skeletons, the MS column was able to provide high efficiency even with very fast elutions.

Lü et al. [62] have proposed a novel cationic hydrophilic interaction monolithic stationary phase based on the chemical modification of carboxymethyl chitosan (CMCH) to the MS skeleton using carbodiimide as an activation reagent. The performance of the chitosan-functionalized monolithic column was superior to that of the non-modified native silica column. However, compared with the reported hydrophilic interaction monolithic columns, the chitosan-functionalized monolithic column showed relatively low column efficiency.

More recently, the preparation of organic-silica hybrid capillary monolithic columns was proposed by Lin et al. [63]. These monoliths have the advantage of being prepared in a single step, using a simple “one-pot” thermal

Table 4. Monolithic columns (silica and polymer based) proposed for the analysis of nucleosides and nucleotides

Analytes	Functional group	Column dimensions/mm	Mobile phase	Separation Time/min	Comments	Ref.
Five nucleobases and four nucleosides	Acrylamide	380 × 0.1	90% ACN 10% H ₂ O	17	Silica modified with N-(3-trimethoxy-silylpropyl) methacrylamide	[60]
Three nucleosides	Acrylic acid	200 × 0.2	90% ACN 10% FA 0.2%	17/1.4	Silica modified with 3-methacrylamidopropyl silyl as anchor	[61]
Four nucleosides	Carboxymethyl-chitosan	400 × 0.2	90% / 70% ACN 10% / 30%	8/15	Carbodiimide as an activation reagent	[62]
Four nucleobases and three nucleosides	Zwitterionic (MSA)	486 × 0.075	10 mM PB (pH: 5.6) 80% ACN	13	"one-pot" approach by replacing the cross-linker silane with γ -MAPS	[63]
Four nucleobases and four nucleosides	Epoxy (TEPIC)	364 × 0.1	20% 10 mM AA 90% ACN	10	A chiral column could be prepared using a chiral TEPIC	[64]
Four nucleobases	Zwitterionic (SPE)	285 × 0.1	95% ACN 5% 5 mM AF (pH:3.0)	13	In order to provide anchoring sites for the polymer, the capillaries were treated with γ -MAPS	[65]
Five nucleobases	Zwitterionic (MPC)	290 × 0.1	92% ACN 8% 5 mM AF (pH: 6.4)	9	Methanol/THF mixture proved to be a good porogen	[66]
Three oligonucleotides	Acrylamide	180 × 0.32	94% ACN Decreasing 0.12% /min 6% TEAA 100 mM	35	Porogenic system composed of propanol and butane-1,4-diol	[67]
Five nucleosides	Hydroxy (NAHAM)	300 × 0.1	95% ACN 5% FA (pH: 3.5)	10	In situ polymerization. Polyethylene glycol (PEG) in dimethyl sulfoxide (DMSO) as the porogen	[68]
Five nucleosides	Methacrylic acid	300 × 0.1	86% ACN 14% H ₂ O	15	One-step polymerization. PEG in DMSO as the porogen	[69]
Four nucleosides	Zwitterionic (SPE)	109 × 0.1	90% ACN	8	Thiolene click chemistry	[70]
One nucleobase and four nucleosides	Cysteine	165 × 0.1	10% 20 mM AF (pH: 3.2) 90% ACN	18	10 nm GNP dual-layer as intermediate ligand	[71]
Six nucleobases	Zwitterionic (SPE)	275 × 0.2	10% 25 mM AF (pH: 3.2) 95% to 50% ACN	10	Enlarged flow-channels and the presence of a higher proportion of mesopores provided a larger surface area	[72]

ACN, Acetonitrile; FA, Formic acid; PB, Phosphate buffer; AF, Ammonium formate; AA, Ammonium acetate; TEAA, Triethylammonium acetate. Other abbreviations: see text.

treatment. A zwitterionic organic-silica monolithic column was successfully synthesized by using [2-(methacryloyloxy)-ethyl]dimethyl-(3-sulfopropyl)ammonium hydroxide (MSA). The optimized MSA monolith could not only develop hydrophilic interactions with polar and charged analytes but also offered the possibility of weak electrostatic interactions with charged analytes. Four purines and pyrimidines and three nucleosides were baseline-separated under the optimized chromatographic conditions.

3.4.2. Polymeric monolithic columns. The use of polymeric monolithic columns is one of the main new trends in LC. Nevertheless, despite their broad use in RPLC, polymeric monolithic columns for HILIC remain scarce as the result of several factors, since polar monomers are not very soluble in the usual porogenic solvents, and few polar monomers are available commercially. Further, the developments in this field have focused on the separation of biomacromolecules rather than on small analytes, such as those studied here. Thus, there have been few proposals for the separation of nucleobases, nucleosides and nucleotides using polymeric monolithic columns, and many of these were only published very recently (Table 4).

Hosoya et al. [64], used an epoxy resin-based polymer, called TEPIC-BACM, which is obtained by reacting the monomer tris(2,3-epoxypropyl) isocyanurate (TEPIC) with 4-aminocyclohexylmethylcyclohexylamine (BACM) in the presence of polyethylene glycol. This column afforded really high performance, based on it containing hydroxyl and amine groups as functional groups and that its homogeneous co-continuous structure has a μ -sized skeleton and sub- μ m-sized pores. In the separation of nucleosides, this column showed up to 60,000 plates.

Jiang et al. [65] prepared a hydrophilic zwitterionic monolith by thermoinitiated copolymerization of N,N-dimethyl-N-methacryloxyethyl-N-3(sulfopropyl)ammonium betaine (SPE) and ethylene dimethacrylate (EDMA) to generate the poly(SPE-co-EDMA) monolith. Typical HILIC retention was observed at high organic-solvent contents (ACN > 60%). The polar zwitterionic monolith provided an environment not only capable of hydrophilic interaction with polar and charged analytes but also offering the possibility of weak electrostatic interaction with analytes bearing positive or negative charges.

This same research team [66] has proposed another hydrophilic zwitterionic monolith prepared by polymerization of zwitterionic monomer 2-(methacryloyloxy)-ethyl]dimethyl-(3-sulfopropyl)ammonium hydroxide (MSA) and 3-methacryloxypropyltrimethoxysilane (γ -MAPS). Like SPE, this MSA monolith could not only have hydrophilic interactions with polar and charged analytes but also offer the possibility of weak electrostatic interactions with charged analytes.

Using N-(hydroxymethyl) methacrylamide as a monomer, an HMMAA monolithic column has been

designed [67]. The HMMAA monolithic stationary phases are advantageous due to their easy preparation, since silanization of the inner wall of capillaries is unnecessary and the porogenic system is simplified from a ternary mixture to a binary one.

Chen et al. [68] have proposed the preparation of a polymeric column starting with N-acryloyltris(hydroxymethyl)aminomethane (NAHAM) and pentaerythritol-triacrylate (PETA). This novel poly(NAHAM-co-PETA) column was applied in capillary HILIC (cHILIC).

The same authors also proposed [69] another polymeric column based on methacrylic acid (MAA) and ethylene glycol dimethacrylate (EDMA). This poly(MAA-co-EDMA) monolith was used in HILIC mode and five nucleosides were baseline separated.

Lv et al. have proposed [70] the use of a thiolene click reaction to prepare a monolith with zwitterionic functionalities using SPE as monomer, and they demonstrated the application of this functionalized monolith in the chromatographic separation of nucleotides in HILIC mode. This monolithic column did not offer very high efficiency, because the surface area of the monolith was one order of magnitude less than that of silica-based monolithic columns.

One emerging area is the incorporation of nanostructures into the polymeric base for application in RP, ion-exchange and affinity chromatography. Recently, Svec et al. [71] combined the hyper-cross-linking of hydrophobic poly(4-methylstyrene-co-vinylbenzyl chloride-co-divinylbenzene) monoliths with the formation of a hydrophilic layered structure, including gold nanoparticles (GNPs) embedded in a polyethyleneimine (PEI) layer, and functionalized with cysteine, enabling the preparation of a very efficient monolithic stationary phase for the separation of small molecules in HILIC mode. The technique was more complex than single-step reactions. However, the results further demonstrate the versatility of functionalization approaches for monoliths relying on GNPs, which serve as a "universal" intermediate ligand that several research groups are currently developing.

Recently, Foo et al. [72] proposed a novel HILIC stationary phase prepared by the co-polymerization of SPE and cross-linker 1,2-bis(p-vinylphenyl)ethane (BVPE) in the presence of porogens toluene and methanol. This highly hydrophilic porous monolith, poly(SPE-co-BVPE), was successfully applied to the rapid, high-resolution separation of pyrimidine and purine nucleobases.

4. Applications

Despite the large number of authors addressing the separation of nucleobases, nucleosides and nucleotides in HILIC, most have used these analytes as a model for polar compounds without applying the separation in real analyses. However, the determination of nucleobases,

Table 5. Applications of HILIC columns in the analysis of nucleobases, nucleosides and nucleotides in real samples		
Application	Column	Ref.
8 NS in urine and serum	KINETEX HILIC core shell	[37]
5 NS in urine samples	PHA	[40]
2 NB and 6 NS in urine of healthy and cancer patients	ZIC-HILIC	[35]
5 NS in urine	Home-made Poly(NAHAM-co-PETA)	[68]
2 NT in vitro (cells)	ZIC-pHILIC	[42]
8 NT in <i>Escherichia coli</i> cell samples	ZIC-pHILIC	[43]
6-Thioguanine in DNA	HILIC BEH	[38]
9 NS in traditional Chinese medicines	Home-made β -cyclodextrin	[3]
4 NB and 4 NS in safflower (<i>C. tinctorius</i>)	Home-made β -cyclodextrin	[17]
2 NB and 3 NS in safflower (<i>C. tinctorius</i>)	Home-made CNPs	[48]
7 NB and 9 NS in marine organisms	VENU SIL HILIC	[27]
6 NB and 13 NS in aqueous extracts of Geosaurus and Leech	TSK-Gel-Amide 80	[23]
5 NT in infant formula	TSK-Gel-NH ₂ -100	[22]
5 NB and 11 NS to evaluate the quality of <i>Ganoderma</i> (mushroom)	ZIC-HILIC	[36]

NS, Nucleosides; NB, Nucleobases; NT, Nucleotides. Other abbreviations: see text and figures.

nucleosides and nucleotides has found applications in biology, the food industry and medicine (Table 5).

In biology, the role of these compounds is crucial, since they form part of RNA and DNA. Thus, their determination in both those macromolecules and biological fluids (e.g., urine or serum) is of special importance in the study of nucleic acids. It should be noted that the measurement of certain modified nucleobases and nucleosides in urine has been proposed as a diagnostic and treatment-assessment method in different types of cancer [73–76].

In the food industry, the determination of nucleobases, nucleosides and nucleotides is important, because they are the primary constituents of nucleic acids. Nucleotide monophosphates are essential in infant foods, to which they are added to address the concentrations of these analytes in cow's milk being lower than they are in maternal milk [77–79].

4.1. Determination of nucleobases and nucleosides in blood and urine

A proposal has been made to use a bare silica column (KINETEX core-shell) in UHPLC mode for the determination of eight nucleosides in synthetic urine and blood samples, with spectrophotometric determination [37]. The results of nucleoside identification in serum were successful, with low LOQ values, so the method developed is suitable for routine analysis of these compounds in serum. In contrast, the results obtained in the case of urine were not as promising as those for serum.

Tuytten et al. [40] have proposed an on-line system formed by coupling aprotic boronic-acid chromatography with a hydroxylated HILIC column for the determination of five nucleosides in urine samples. The method developed represents the first workable on-line method with SPE-LC-ESI-MS-(/MS) for urinary nucleosides and has potential as a basis for a high-throughput automated means to profile urinary nucleosides.

We [35] have proposed the use of a highly polar restricted-access material (RAM), based on an N-vinylacetamide copolymer, for efficient analyte extraction and matrix removal, with separation by zwitterionic HILIC (ZIC-HILIC) for the determination of two nucleobases and six nucleosides. The application to clinical samples was also checked, observing that the method developed could be used as a control method for clinical purposes (e.g., early diagnosis and therapeutic-response monitoring).

Finally, an on-line system, in this case capillary, involving the combination of the poly(NAHAM-co-PETA) home-made monolith with a poly(AAPBA-co-EDMA) extraction monolith has also been proposed. This on-line SPME-cLC system was successfully applied for the rapid, sensitive determination of four nucleosides from urine samples, with spectrophotometric detection. This method also offers a potential application for clinical diagnoses [68].

4.2. Determination of nucleotides in cells

In 2010, Goutier et al. [42] presented for the first time the successful development, validation and application of a novel, robust, sensitive HILIC-MS/MS method for the simultaneous determination of two nucleotides, adenosine triphosphate (ATP) and cyclic adenosine monophosphate (cAMP), in biological samples to study receptor activity using a ZIC-pHILIC column. The method does not require extensive sample preparation, making it suitable for routine analyses, and it is amenable to 96-well technology.

Later, Johnsen et al. [43] proposed the separation of eight nucleotides applied to *Escherichia coli* cell samples. In these complex cell culture samples, NTP was separated selectively (also from other matrix compounds) in 70 min using two 15-cm ZIC-pHILIC columns coupled in series.

Also in this scenario, in 2012 Jacobsen et al. [38] proposed the determination of the pharmacological end-point of thiopurines [e.g., 6-thioguanine (6TG)] in chromosomal DNA using a BEH HILIC column with a particle size of

1.7 μm . Purine nucleobases were released from DNA, etheno-derivatized with chloroacetaldehyde, separated by HILIC, and quantified by tandem MS using endogenous chromosomal guanine as the internal standard. The method was easily applicable, and provided a fast, precise analysis to measure 6TG contents in genomic DNA without the need for enzymes or multiple incubations.

4.3. Determination of nucleobases and nucleosides in traditional Chinese medicine

For thousands of years, traditional Chinese medicine (TCM) has used different plant preparations (phytotherapy). The high polarity of these preparations means that HILIC is ideal for their analysis, especially in the case of the determination of the compounds addressed here.

In 2009, Guo et al. [3] analyzed nine nucleosides in a TCM compound called toad skin using a column made of β -cyclodextrins. A similar column was applied to the determination of four nucleobases and four nucleosides in Safflower (*C. tinctorius* L.) collected from Ta County, China [17]. Safflower has been widely used in China for thousands of years and is a popular TCM for the treatment of cardiovascular and hypertensive disease because of its reputation for facilitating blood circulation and dispersing blood stasis. More recently, with the same matrix, two nucleobases and three nucleosides were determined using a column formed by CNPs [48]. On a C18 column, the components in the safflower injection were not retained due to their hydrophilic character. A dozen compounds were well resolved and showed good retention in the new phase and in a commercial amine column.

Zhao et al. [27] have proposed the determination of seven nucleobases and nine nucleosides in medicinal marine organisms using a commercial Venusil HILIC column. The method was suitable for the separation of highly-polar nucleosides and nucleobases. The coupling of HILIC separation with the accurate-mass measurement of TOF provided a candidate tool for identification and determination of low concentrations of highly-polar nucleosides and nucleobases in marine organisms. In particular, they can be used for further identification of unknown non-target compounds.

Also, Chen et al. [23] determined six nucleobases and 15 nucleosides in two TCMs, the annelids *Geosaurus* and *Leech*. The results clearly suggested that the HILIC method could be employed as a useful tool for the quality assessment of *Geosaurus* and *Leech* using certain nucleosides and nucleobases as markers. Setting a minimum limit to the amount of these compounds would be helpful for the quality control of *Geosaurus* and *Leech* preparations.

4.4. Determination of nucleobases, nucleosides and nucleotides in foods

In the food industry, nucleotides have been identified as essential nutrients.

In 2010, Inoue et al. [22] determined five nucleotides in infant formulas using a TSK-Gel-NH₂-100 column. This screening assay allowed the discovery of interesting results in infant formulas, the concentrations of total nucleotides being considered reasonable and appropriate in comparison with referenced human-milk levels.

Also in food, Chen et al. [36] proposed the determination of five nucleobases and 11 nucleosides to assess the quality of *Ganoderma lucidum*, a nutritional mushroom, using a ZIC-HILIC column. With this method, for the first time, nucleosides and bases in *G. atrum* were quantified and discriminated from another two species of *Ganoderma* (*G. lucidum* and *G. sinense*). This HILIC method is simple, rapid and sensitive, and it offers an alternative to the older non-specific techniques, which are laborious and time consuming, and which cannot detect all those nucleosides and nucleobases simultaneously.

5. Conclusions and perspectives

HILIC has been shown to have great potential applications for the separation of polar biomolecules (e.g., nucleobases, nucleosides and nucleotides), so explaining its increasing importance in research fields (e.g., proteomics and bioanalysis). In order to enhance separation selectivity, a wide range of HILIC stationary phases were recently proposed to exploit the retention of these hydrophilic compounds effectively. The developments in stationary phases cover the introduction of new chemistries and new column geometries in order to obtain high resolution and selectivity, at the same time reducing the analysis time. In the years to come, we expected that investigations into new HILIC stationary phases will continue.

Zwitterionic, amide and amine stationary phases occupy a special position among the sorbents designed for HILIC separation of nucleotides, nucleosides and their bases. The presence of these groups enables the existence of the mixed-mode retention mechanisms in such a way that the order of elution can be altered to a certain extent by variations in the composition and the pH of the mobile phase. This affords greater selectivity. In all cases, particle-packed columns are available commercially and also zwitterionic monolithic capillary columns have been described.

Monoliths are seen to be a more convenient approach for efficient, economic and fast analysis, but their application remains limited, due to the restricted availability of stationary-phase chemistries. Monolithic columns are broadly accepted in other types of LC and future efforts should be directed to develop commercially-available monolithic phases for HILIC applications.

Acknowledgements

Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain, (Project CTQ 2011-24075) is gratefully acknowledged for financial support of this work. D.G.G. gratefully acknowledges

financial assistance from *Ministerio de Educación*, Spain (FPU Grant).

References

- [1] P. Hemstroem, K. Irgum, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1784.
- [2] P. Jandera, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1421.
- [3] Z. Guo, Y. Jin, T. Liang, Y. Liu, Q. Xu, X. Liang, et al., *J. Chromatogr.*, A 1216 (2009) 257.
- [4] P. Jandera, *Anal. Chim. Acta* 692 (2011) 1.
- [5] B. Buszewski, S. Noga, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 231.
- [6] M.R. Gama, R.G. da Costa Silva, C.H. Collins, C.B.G. Bottoli, *Trends Anal. Chem.* 37 (2012) 48.
- [7] L. Mora, A. Hernández-Cázares, M.C. Aristoy, F. Toldrá, M. Reig, *Food Anal. Methods* 4 (2011) 121.
- [8] B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 698.
- [9] T. Hayama, H. Yoshida, K. Todoroki, H. Nohta, M. Yamaguchi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 2203.
- [10] A. Frickenschmidt, H. Fröhlich, D. Bullinger, A. Zell, S. Laufer, C.H. Gleiter, et al., *Biomarkers* 13 (2008) 435.
- [11] C.M. Galmarini, J.R. Mackey, C. Dumontet, *Lancet Oncol.* 3 (2002) 415.
- [12] A. Seidel, S. Brunner, P. Seidel, G.I. Fritz, O. Herbarth, *Br. J. Cancer* 94 (2006) 1726.
- [13] W. Struck, M. Waszczuk-Jankowska, R. Kaliszczan, M. Markuszewski, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 2039.
- [14] J.D. Carver, *Am. J. Clin. Nutr.* 77 (2003) 1550S.
- [15] E. Schlimme, D. Martin, H. Meisel, *Br. J. Nutr.* 84 (2000) 859.
- [16] M. Sugawara, N. Sato, T. Nakano, T. Idota, I. Nakajima, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 41 (1995) 409.
- [17] G. Jin, Z. Guo, F. Zhang, X. Xue, Y. Jin, X. Liang, *Talanta* 76 (2008) 522.
- [18] W. Bicker, J. Wu, M. Lämmerhofer, W. Lindner, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 2971.
- [19] G. Schuster, W. Lindner, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 2539.
- [20] R.N. Easter, K.K. Kroning, J.A. Caruso, P.A. Limbach, *Analyst* (Cambridge, UK) 135 (2010) 2560.
- [21] Y. Kawachi, T. Ikegami, H. Takubo, Y. Ikegami, M. Miyamoto, N. Tanaka, *J. Chromatogr.*, A 1218 (2011) 5903.
- [22] K. Inoue, R. Obara, T. Hino, H. Oka, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 9918.
- [23] P. Chen, W. Li, Q. Li, Y. Wang, Z. Li, Y. Ni, et al., *Talanta* 85 (2011) 1634.
- [24] J.W. Treadway, G.S. Philibert, S.V. Olesik, *J. Chromatogr.*, A 1218 (2011) 5897.
- [25] G. Marrubini, B.E.C. Mendoza, G. Massolini, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 803.
- [26] G.S. Philibert, S.V. Olesik, *J. Chromatogr.*, A 1218 (2011) 8222.
- [27] H. Zhao, J. Chen, Q. Shi, X. Li, W. Zhou, D. Zhang, et al., *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 2594.
- [28] D.V. McCalley, *J. Chromatogr.*, A 1217 (2010) 3408.
- [29] D. García-Gómez, E. Rodríguez-Gonzalo, R. Carabias-Martínez, *ISRN Anal. Chem.* (2012) 308062.
- [30] S. Di Palma, P.J. Boersema, A.J.R. Heck, S. Mohammed, *Anal. Chem.* 83 (2011) 3440.
- [31] A.J. Alpert, *Anal. Chem.* 80 (2007) 62.
- [32] T. Jonsson, P. Appelblad, *LC-GC Eur.* (2004) 40.
- [33] T. Jonsson, P. Appelblad, *LCGC North Am.* (2004) 72.
- [34] E. Rodríguez-Gonzalo, D. García-Gómez, R. Carabias-Martínez, *J. Chromatogr.*, A 1218 (2011) 3994.
- [35] E. Rodríguez-Gonzalo, D. García-Gómez, R. Carabias-Martínez, *J. Chromatogr.*, A 1218 (2011) 9055.
- [36] Y. Chen, W. Bicker, J. Wu, M. Xie, W. Lindner, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 4243.
- [37] S. Studzińska, B. Buszewski, *J. Chromatogr.*, B 887–888 (2012) 93.
- [38] J.H. Jacobsen, K. Schmiegelow, J. Nersting, *J. Chromatogr.*, B 881–882 (2012) 115.
- [39] T. Zhou, C.A. Lucy, *J. Chromatogr.*, A 1187 (2008) 87.
- [40] R. Tuytten, F. Lemiere, W. Van Dongen, E. Witters, E.L. Esmans, R.P. Newton, et al., *Anal. Chem.* 80 (2008) 1263.
- [41] T.J. Causon, H.J. Cortes, R.A. Shellie, E.F. Hilder, *Anal. Chem.* 84 (2012) 3362.
- [42] W. Goutier, P.A. Spaans, M.A.W. van der Neut, A.C. McCreary, J.H. Reinders, *J. Neurosci. Meth.* 188 (2010) 24.
- [43] E. Johnsen, S.R. Wilson, I. Odsbu, A. Krapp, H. Malerod, K. Skarstad, et al., *J. Chromatogr.*, A 1218 (2011) 5981.
- [44] A. dos Santos Pereira, A. Jiménez Girón, E. Admasu, P. Sandra, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 834.
- [45] J. Wu, W. Bicker, W. Lindner, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1492.
- [46] X. Dai, Y. He, Y. Wei, B. Gong, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 3115.
- [47] X.-T. Peng, B.-F. Yuan, Y.-Q. Feng, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 3123.
- [48] Y. Li, L. Xu, T. Chen, X. Liu, Z. Xu, H. Zhang, *Anal. Chim. Acta* 726 (2012) 102.
- [49] Y. Liu, Q. Du, B. Yang, F. Zhang, C. Chu, X. Liang, *Analyst* (Cambridge, UK) 137 (2012) 1624.
- [50] Q. Ma, M. Chen, H.-R. Yin, Z.-G. Shi, Y.-Q. Feng, *J. Chromatogr.*, A 1212 (2008) 61.
- [51] X. Dai, X. Qian, B. Gong, Y. Wei, *Chromatographia* 73 (2011) 865.
- [52] O. Gezici, H. Kara, *Talanta* 85 (2011) 1472.
- [53] H. Huang, H. Guo, M. Xue, Y. Liu, J. Yang, X. Liang, et al., *Talanta* 85 (2011) 1642.
- [54] G. Guiochon, *J. Chromatogr.*, A 1168 (2007) 101.
- [55] O. Nuñez, K. Nakanishi, N. Tanaka, *J. Chromatogr.*, A 1191 (2008) 231.
- [56] K. Štulík, V. Pacáková, J. Suchánková, P. Coufal, *J. Chromatogr.*, B 841 (2006) 79.
- [57] F. Svec, *J. Chromatogr.*, A 1228 (2012) 250.
- [58] T. Ikegami, K. Tomomatsu, H. Takubo, K. Horie, N. Tanaka, *J. Chromatogr.*, A 1184 (2008) 474.
- [59] Z. Jiang, N.W. Smith, Z. Liu, *J. Chromatogr.*, A 1218 (2011) 2350.
- [60] T. Ikegami, H. Fujita, K. Horie, K. Hosoya, N. Tanaka, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 578.
- [61] K. Horie, T. Ikegami, K. Hosoya, N. Saad, O. Fiehn, N. Tanaka, *J. Chromatogr.*, A 1164 (2007) 198.
- [62] Z. Lü, P. Zhang, L. Jia, *J. Chromatogr.*, A 1217 (2010) 4958.
- [63] H. Lin, J. Ou, Z. Zhang, J. Dong, M. Wu, H. Zou, *Anal. Chem.* 84 (2012) 2721.
- [64] K. Hosoya, N. Hira, K. Yamamoto, M. Nishimura, N. Tanaka, *Anal. Chem.* 78 (2006) 5729.
- [65] Z. Jiang, N.W. Smith, P.D. Ferguson, M.R. Taylor, *Anal. Chem.* 79 (2006) 1243.
- [66] Z. Jiang, J. Reilly, B. Everatt, N.W. Smith, *J. Chromatogr.*, A 1216 (2009) 2439.
- [67] P. Holdšvendová, J. Suchánková, M. Bunčák, V. Bačková, P. Coufal, *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 23.
- [68] M.L. Chen, S.-S. Wei, B.-F. Yuan, Y.-Q. Feng, *J. Chromatogr.*, A 1228 (2012) 183.
- [69] M.L. Chen, L.-M. Li, B.-F. Yuan, Q. Ma, Y.-Q. Feng, *J. Chromatogr.*, A 1230 (2012) 54.
- [70] Y. Lv, Z. Lin, F. Svec, *Analyst* (Cambridge, UK) 137 (2012) 4114.
- [71] Y. Lv, Z. Lin, F. Svec, *Anal. Chem.* 84 (2012) 8457.
- [72] H.C. Foo, J. Heaton, N.W. Smith, S. Stanley, *Talanta* 100 (2012) 344.
- [73] A.J. Sasco, F. Rey, C. Reynaud, J.-Y. Bobin, M. Clavel, A. Niveleau, *Cancer Lett.* 108 (1996) 157.
- [74] K.H. Schram, *Mass Spectrom. Rev.* 17 (1998) 131.
- [75] K. Nakano, T. Nakao, K.H. Schram, W.M. Hammargren, T.D. McClure, M. Katz, et al., *Clin. Chim. Acta* 218 (1993) 169.
- [76] B.O. Feng, M.-H. Zheng, Y.-F. Zheng, A.-G. Lu, J.-W. Li, M.-L. Wang, et al., *Hepatology* 20 (2005) 1913.
- [77] L. Thorell, L.-B. Sjöberg, O. Hernell, *Pediatr. Res.* 40 (1996) 845.
- [78] L.K. Pickering, D.M. Granoff, J.R. Erickson, M.L. Masor, C.T. Cordle, J.P. Schaller, et al., *Pediatrics* 101 (1998) 242.
- [79] B.D. Gill, H.E. Indyk, *Int. Dairy J.* 17 (2007) 596.

**CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA
BIDIMENSIONAL HILIC-RPLC
PARA LA DETERMINACIÓN DE
BIOMARCADORES EN ORINA.
ESTUDIOS PRELIMINARES**

6

6.1. Objeto

El objetivo de este capítulo de la tesis es investigar las posibilidades de acoplamiento de la cromatografía de interacciones hidrofílicas (HILIC) con la cromatografía en fase inversa (RPLC) dirigido a desarrollar un método de cromatografía líquida bidimensional (2D-LC) que permita la determinación simultánea de metabolitos endógenos de alta polaridad junto con compuestos exógenos de polaridad media y baja.

La diferente naturaleza y estructura química de ambos tipos de compuestos hace poco eficaz el uso de una única modalidad cromatográfica para su determinación conjunta en fluidos biológicos. En este capítulo se describe el desarrollo de un acoplamiento instrumental de tipo bidimensional basado en los conocimientos adquiridos en la determinación de biomarcadores de exposición (polaridad media y baja) mediante cromatografía en fase inversa (capítulo 5.A, pág. 185) y de biomarcadores de efecto (polaridad muy alta) mediante la modalidad de intracciones hidrofílicas (capítulo 5.B, pág. 241).

Los estudios desarrollados están centrados en la optimización de los parámetros instrumentales que permitan el acoplamiento instrumental de las dos modalidades cromatográficas, tales como el tipo de fase estacionaria, la compatibilidad de fases móviles, el volumen transferido y las dimensiones de columna más adecuadas, lo cual es crítico en una separación bidimensional.

Así mismo, y también partiendo de los conocimientos previamente adquiridos a lo largo de esta tesis, se plantea el acoplamiento en línea de una etapa de tratamiento de muestra basada en materiales de acceso restringido, compatible con el sistema bidimensional de cromatografía líquida.

Finalmente, se comprobará el potencial del sistema propuesto RAM-HILIC-RPLC-MS/MS para la determinación simultánea de ambos tipos de biomarcadores en orina, sin manipulación ni tratamiento manual de la muestra.

6.2. Introducción

6.2.1. Cromatografía líquida bidimensional (2D-LC)

La necesidad de analizar muestras cada vez más complejas requiere la aplicación de técnicas de separación cada vez con mayor capacidad de separación. En este sentido, se han realizado importantes progresos en cromatografía líquida monodimensional, como la reducción del tamaño de partícula por debajo de 2 μm ²⁵⁶, el acoplamiento de columnas en serie²⁵⁷ o la aplicación de elevadas temperaturas²⁵⁸. Más recientemente, las fases estacionarias parcialmente porosas han permitido alargar la longitud de la columna²⁵⁹. Sin embargo, estos progresos están muy limitados en cuanto al poder de resolución y siempre resultan en el sacrificio de otros parámetros como, por ejemplo, el tiempo de análisis o la necesidad de equipos más sofisticados.

El parámetro básico que representa el poder de separación en cromatografía es la capacidad de pico (n_c), definida como el número máximo de picos en un cromatograma, desde el volumen muerto hasta el último pico de interés, resueltos con un valor de resolución de uno. Así, la capacidad de pico refleja el número máximo de componentes que pueden resolverse en un análisis cromatográfico simple. Sin embargo, dado que en realidad la distribución de picos en el cromatograma no es uniforme, la capacidad de pico ha de ser significativamente mayor que el número de componentes de la muestra para obtener una separación satisfactoria. Davis y Giddings²⁶⁰, utilizando técnicas estadísticas, demostraron la estrecha relación existente entre la separación y la capacidad de pico. Para resolver al menos un 98% de los componentes la capacidad de pico debe exceder al número de compuestos en dos

²⁵⁶ A. de Villiers, F. Lestremau, R. Szucs, S. Gelebart, F. David, P. Sandra, J. Chromatogr. A 1127 (2006) 60. "Evaluation of ultra performance liquid chromatography: Part I. Possibilities and limitations"

²⁵⁷ A. Vaast, J. de Vos, K. Broeckhoven, M. Verstraeten, S. Eeltink, G. Desmet, J. Chromatogr. A 1256 (2012) 72. "Maximizing the peak capacity using coupled columns packed with 2.6 μm core-shell particles operated at 1200 bar"

²⁵⁸ F. Lestremau, A. Cooper, R. Szucs, F. David, P. Sandra, J. Chromatogr. A 1109 (2006) 191. "High-efficiency liquid chromatography on conventional columns and instrumentation by using temperature as a variable: I. Experiments with 25 cm \times 4.6 mm I.D., 5 μm ODS columns"

²⁵⁹ X. Wang, W.E. Barber, P.W. Carr, J. Chromatogr. A 1107 (2006) 139. "A practical approach to maximizing peak capacity by using long columns packed with pellicular stationary phases for proteomic research"

²⁶⁰ J.M. Davis, J.C. Giddings, Anal. Chem. 55 (1983) 418. "Statistical theory of component overlap in multicomponent chromatograms"

órdenes de magnitud²⁶¹. Estas investigaciones ponen de manifiesto que la aplicación de una única modalidad cromatográfica puede ser insuficiente cuando se persigue la separación completa de muestras complejas.

El término cromatografía líquida bidimensional (2D-LC) se refiere a la aplicación de dos modalidades cromatográficas independientes en la misma muestra²⁶². La evolución del desarrollo teórico y práctico de esta técnica ha sido cuidadosamente revisada por Schure²⁶³. Los primeros trabajos descritos en este campo corresponden a Erni y Frei²⁶⁴ en 1978. Sin embargo, la investigación en 2D-LC no despegó hasta los inicios del siglo XXI, gracias en parte a su aplicabilidad en el campo de la proteómica²⁶⁵. En 1990, Bushey et al.²⁶⁶ describieron una separación bidimensional de proteínas, de seis horas de duración, en un sistema cromatográfico con una capacidad de pico de 100. En 2006, Stoll et al.²⁶⁷ propusieron un sistema cromatográfico bidimensional con una capacidad de pico en torno a 1000 que permitía llevar a cabo la separación en un tiempo de aproximadamente 30 minutos.

La aplicación de cromatografía líquida bidimensional (2D-LC) implica que la muestra debe ser sometida a dos mecanismos de separación diferentes. Se produce así un gran aumento de la capacidad de pico que se refleja en la reducción del solapamiento. Teóricamente, la capacidad de pico en 2D-LC es igual al producto de las capacidades individuales. Sin embargo, este hecho sólo es cierto cuando los mecanismos de separación proveen selectividades completamente diferentes, disminuyendo el potencial de separación drásticamente al aumentar la correlación entre los mecanismos de retención. Esta

²⁶¹ J.C. Giddins, J. Chromatogr. A 703 (1995) 3. "Sample dimensionality: A predictor of order-disorder in component peak distribution in multidimensional separation"

²⁶² I. François, K. Sandra, P. Sandra, Anal. Chim. Acta 641 (2009) 14. "Comprehensive liquid chromatography: Fundamental aspects and practical considerations- A review"

²⁶³ M.R. Schure, Wiley (2008) Nueva York. "Multidimensional Liquid Chromatography: Theory, Instrumentation and Applications"

²⁶⁴ F. Erni, R.W. Frei, J. Chromatogr. 149 (1978) 561. "Two-dimensional column liquid chromatographic technique for resolution of complex mixtures"

²⁶⁵ D.A. Wolters, M.P. Washburn, J.R. Yates III, Anal. Chem. 73 (2001) 5683. "An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics"

²⁶⁶ M.M. Bushey, J.W. Jorgenson, Anal. Chem. 62 (1990) 161. "Automated instrumentation for comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography of proteins"

²⁶⁷ D.R. Stoll, J.D. Cohen, P.W. Carr, J. Chromatogr. A 1122 (2006) 123. "Fast, comprehensive online two-dimensional high performance liquid chromatography through the use of high temperature ultra-fast gradient elution reversed-phase liquid chromatography"

correlación entre las columnas utilizadas en la separación bidimensional se denomina ortogonalidad.

Desde un punto de vista práctico, 2D-LC puede dividirse en dos categorías, de acuerdo al modo en que se produce la transferencia de la primera a la segunda columna:

- Cromatografía líquida bidimensional sin acoplamiento instrumental (*off-line* 2D-LC), si las fracciones de la primera columna cromatográfica (1ª dimensión) son recogidas manualmente, o con un colector de fracciones, y se inyectan posteriormente en la segunda columna cromatográfica (2ª dimensión). Esta es una de las modalidades más empleadas por su sencillez.
- Cromatografía líquida bidimensional con acoplamiento instrumental (*on-line* 2D-LC), si las dos columnas cromatográficas están conectados a través de una interfaz apropiada. Puede aquí distinguirse entre dos subcategorías, cromatografía bidimensional parcial o fraccionada (LC-LC, *heart-cutting chromatography*) y cromatografía bidimensional exhaustiva (LCxLC, *comprehensive chromatography*). La principal diferencia entre ambas subcategorías es la cantidad de efluente que es transferido desde la primera dimensión a la segunda. En LC-LC (*heart-cutting* 2D-LC) se transfiere una única fracción, o un número limitado de fracciones, de la 1ª a la 2ª dimensión. En LCxLC (*comprehensive* 2D-LC) se produce una transferencia secuencial de todo el efluente de la 1ª columna a la 2ª columna en pequeñas fracciones.

De forma general, los equipos de 2D-LC constan de dos bombas cromatográficas, dos columnas, un inyector, una interfaz y un detector. La interfaz suele estar constituida por una válvula de 6/8/10 vías de alta presión en la que se recogen las fracciones que eluyen de la primera columna y que son reinyectadas de forma automática en la segunda. Es importante destacar que, antes de la inyección de una segunda fracción, debe haberse producido el análisis completo de la primera. Este hecho es especialmente importante en LCxLC, modalidad en la que un aspecto crítico es que el tiempo de análisis en la segunda dimensión ha de ser

igual o inferior al tiempo de recogida de fracciones de la primera dimensión.

6.2.1.1. Interfaces en cromatografía bidimensional

El elemento principal de un equipo de cromatografía líquida bidimensional es la interfaz que automatiza la transmisión de fase móvil entre las dos dimensiones, especialmente cuando dicho acoplamiento presenta dificultades. A lo largo de los años se han presentado diferentes alternativas, cada una con sus ventajas y desventajas siendo aún hoy, la mejora y desarrollo de nuevas interfaces para 2D-LC, un campo abierto de investigación. Los diferentes diseños estudiados y su construcción, pros y contras han sido ampliamente revisados^{268,262}.

La interfaz más común es la formada por una o varios bucles montados sobre una válvula de 6, 8 o 10 vías, respectivamente. En la Figura 6.1 se representa la interfaz más habitualmente utilizada en LCxLC, formada por una válvula de 8 vías y dos bucles de inyección.

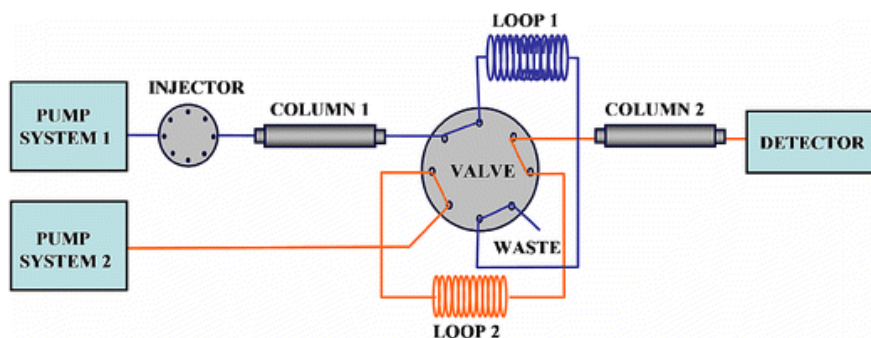


Figura 6.1. Configuración instrumental habitual para LCxLC

²⁶⁸ J. Pól, T. Hyötyläinen, Anal. Bioanal. Chem. 391 (2008) 21. "Comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry"

6.2.1.2. Problemas asociados a la cromatografía bidimensional

Las diferentes modalidades de cromatografía líquida ofrecen una amplia variedad de mecanismos de separación (fase normal, fase inversa, reparto, exclusión por tamaño, intercambio iónico, afinidad...) caracterizadas por presentar diferentes selectividades. Así, teóricamente, son muchas las combinaciones disponibles en 2D-LC que debieran incrementar la capacidad de pico, al presentar las diferentes modalidades una alta ortogonalidad. Sin embargo, la combinación de ciertas de estas modalidades presenta una serie de importantes dificultades técnicas como, por ejemplo, la compatibilidad de fases.

- *Compatibilidad entre fases móviles*

La compatibilidad entre fases móviles²⁶⁹ es, posiblemente, la mayor dificultad a afrontar en cromatografía líquida bidimensional *on-line*. La fase móvil que eluye de la primera columna ha de ser, idealmente, débil en la fase estacionaria de la segunda dimensión para que se produzca focalización de los picos cromatográficos²⁷⁰. Aún se presentan mayores dificultades cuando las fases móviles de las dos dimensiones no son totalmente miscibles. Este es el caso, por ejemplo, cuando la primera dimensión es fase inversa (RPLC), de interacciones hidrofílicas (HILIC) o intercambio iónico, donde la fase móvil tiene una fracción acuosa y la segunda dimensión es fase normal (NPLC) o exclusión por tamaño, cuyas fases móviles están formadas por disolventes orgánicos. Así, el acoplamiento entre NPLC y RPLC, de elevada ortogonalidad, presenta grandes dificultades debido a la inmiscibilidad del hexano de NPLC con la fase acuosa de RPLC^{271,272}.

²⁶⁹ P. Dugo, F. Cacciola, T. Kumm, G. Dugo, L. Mondello, J. Chromatogr. A 1184 (2008) 353. "Comprehensive multidimensional liquid chromatography: Theory and applications"

²⁷⁰ N.E. Hoffman, S.L. Pan, A.M. Rustum, J. Chromatogr. A 465 (1989) 189. "Injection of elutes in solvents stronger than the mobile phase in reversed-phase liquid chromatography"

²⁷¹ P. Dugo, O. Favoino, R. Luppino, G. Dugo, L. Mondello, Anal. Chem. 76 (2004) 2525. "Comprehensive Two-Dimensional Normal-Phase (Adsorption)-Reversed-Phase Liquid Chromatography"

²⁷² I. François, A. de Villiers, P. Sandra, J. Sep. Sci. 29 (2006) 492. "Considerations on the possibilities and limitations of comprehensive normal phase-reversed phase liquid chromatography (NPLC × RPLC)"

- *Volumen muerto*

El diseño y montaje del sistema bidimensional es una de las etapas más críticas y delicadas en LC-LC. La transferencia de las fracciones eluidas de la primera dimensión a la segunda ha de realizarse de una manera rápida y eficaz. Especialmente importante es el volumen muerto de los tubos, conexiones y partes internas de las válvulas, que debe minimizarse para evitar el ensanchamiento de los picos cromatográficos y la transferencia de disolventes incompatibles. La reproducibilidad se incrementa sensiblemente cuando se utilizan diseños que permiten automatizar el proceso.

- *Dilución y sensibilidad*

La dilución es un factor importante en LC debido a que influye directamente en la sensibilidad y, por lo tanto, en los límites de detección. Aunque siempre se produce dilución en LC, esta es especialmente relevante en LC multidimensional debido a que tiene lugar, principalmente, en la transferencia de fracciones a la segunda dimensión. Existen diversas soluciones enfocadas a resolver el problema de dilución en la transferencia. Las principales son la instalación de bucles de inyección de gran volumen, de bucles rellenos de fase estacionaria que atrapen analitos o de interfaces que produzcan la evaporación parcial del disolvente de la fase móvil, concentrando así las fracciones transferidas²⁶².

6.2.2. Características generales de los acoplamientos HILIC x RPLC

Un sistema de cromatografía líquida bidimensional formado por una combinación de HILIC y RPLC muestra, en principio, importantes ventajas a la hora de elevar la capacidad de pico del sistema²⁷³. La causa principal de este hecho es la elevada ortogonalidad ofrecida por estos dos mecanismos cromatográficos. En muchos casos, el orden de elución

²⁷³ P. Jandera, T. Hájek, M. Stanková, K. Vynuchalová, P. Cesla, J. Chromatogr. A 1268 (2012) 91. "Optimization of comprehensive two-dimensional gradient chromatography coupling in-line hydrophilic interaction and reversed phase liquid chromatography"

de los analitos es justamente inverso, siendo de menor a mayor polaridad en la modalidad de interacciones hidrofílicas y, por el contrario, de polaridad decreciente en la modalidad de fase inversa. Cabe destacar que, en general, cuando se combinan dos columnas de diferente polaridad, los mejores resultados se encuentran al utilizar la columna más polar en la primera dimensión y la más apolar en la segunda²⁷⁴.

Sin embargo, la compatibilidad entre HILIC y RPLC presenta importantes dificultades debido a la diferencias en la fuerza de elución de los disolventes requeridos en ambos casos. Las fases móviles con altas concentraciones de acetonitrilo, utilizadas habitualmente en HILIC, suponen una fase móvil con un fuerte poder de elución en RPLC. Este hecho conlleva una disminución en la retención y elevadas asimetrías de pico en la segunda dimensión. Se han propuesto diferentes estrategias para superar esta incompatibilidad. Una opción es evaporar el disolvente que eluye de la primera dimensión, realizando así cromatografía bidimensional *off-line*^{275,276}. Otra opción utilizada, y que permite realizar el proceso *on-line*, es la introducción de un flujo de disolvente débil entre las dos dimensiones que permita reducir la fuerza de elución del disolvente transferido. Este sistema requiere de bombas y válvulas adicionales, además de producir una ligera dilución de la muestra^{277,278,279}. Una aproximación más sencilla consiste en utilizar pequeños volúmenes de tal manera que el disolvente de transferencia se disperse en la segunda dimensión, minimizando los efectos adversos y aumentando así la compatibilidad. Esta opción no requiere aumentar el nivel de complejidad de la instrumentación pero produce importantes pérdidas de sensibilidad para *heart-cutting* 2D-LC ya que sólo una

²⁷⁴ P. Jandera, P. Cesla, T. Hájek, G. Vohralík, K. Vynuchalová, J. Fischer, J. Chromatogr. A 1189 (2008) 207. "Optimization of separation in two-dimensional high-performance liquid chromatography by adjusting phase system selectivity and using programmed elution techniques"

²⁷⁵ K.M. Kallili, A. de Villiers, J. Sep. Sci. 33 (2010) 853. "Off-line comprehensive 2-dimensional hydrophilic interaction reversed phase liquid chromatography analysis of procyanidins"

²⁷⁶ Y. Liu, X. Xue, Z. Guo, Q. Xu, F. Zhang, X. Liang, J. Chromatogr. A 1208 (2008) 133. "Novel two-dimensional reversed-phase liquid chromatography/hydrophilic interaction chromatography, an excellent orthogonal system for practical analysis"

²⁷⁷ Y. Wang, X. Lu, G. Xu, J. Sep. Sci. 31 (2008) 1564. "Simultaneous separation of hydrophilic and hydrophobic compounds by using an online HILIC-RPLC system with two detectors"

²⁷⁸ A. Mihailova, H. Malerod, S.R. Wilson, B. Karaszewski, R. Hauser, E. Lundanes, T. Greibrokk, J. Sep. Sci. 31 (2008) 459. "Improving the resolution of neuropeptides in rat brain with on-line HILIC-RP compared to on-line SCX-RP"

²⁷⁹ A. Liu, J. Tweed, C.E. Wujcik, J. Chromatogr. B 877 (2009) 1873. "Investigation of an on-line two-dimensional chromatographic approach for peptide analysis in plasma by LC-MS-MS"

pequeña fracción de analito alcanza la segunda dimensión, salvo que en la primera dimensión se utilice una columna estrecha (*narrow-bore*)²⁸⁰ o de naturaleza capilar²⁸¹. Una última propuesta consiste en la utilización de un bucle de inyección relleno de fase estacionaria, lo que permite cambiar la naturaleza del disolvente entre las dos dimensiones²⁸².

²⁸⁰ F. Qin, Y.Y. Zhao, M.B. Sawyer, X.F. Li, Anal. Chem. 627 (2008) 91. "Column-switching reversed phase-hydrophilic interaction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for determination of free estrogens and their conjugates in river water"

²⁸¹ P. Jandera, J. Fischer, H. Lahovská, K. Novotná, P. Cesla, L. Kolárová, J. Chromatogr. A 1119 (2006) 3. "Two-dimensional liquid chromatography normal-phase and reversed-phase separation of (co)oligomers"

²⁸² Y. Wang, R. Lehmann, X. Lu, X. Zhao, G. Xu, J. Chromatogr. A 1204 (2008) 28. "Novel, fully automatic hydrophilic interaction/reversed-phase column-switching high-performance liquid chromatographic system for the complementary analysis of polar and apolar compounds in complex samples"

6.3. Estudio preliminar del acoplamiento HILIC-RPLC para la determinación simultánea de biomarcadores de exposición y efecto en orina

Los estudios desarrollados en este apartado están basados en la modalidad denominada *heart-cutting* 2D-LC y se orientan hacia la búsqueda de las condiciones y configuración del sistema bidimensional, que permitan soslayar los problemas de incompatibilidad de los disolventes, con la dificultad añadida de que se busca la incorporación *on-line* de la etapa de tratamiento de muestra de forma que el proceso global implique una mínima manipulación de la muestra. Tampoco hay que olvidar que las fases móviles empleadas han de ser volátiles y compatibles con el sistema de detección, espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (ESI-MS/MS).

El objetivo final es desarrollar una metodología analítica rápida y eficaz que permita evaluar simultáneamente en muestras de orina metabolitos endógenos, de interés clínico como marcadores biológicos, junto con compuestos exógenos utilizados como biomarcadores de exposición a compuestos xenobióticos. Como analitos modelo se eligieron tres compuestos de media-baja polaridad: dos fenilureas, Clortolurón (Clt) y Diuron (Din), junto a uno de sus metabolitos, clorometilfenilurea (CMPU); y cuatro compuestos de alta polaridad: dos nucleobases (adenina y guanina) y dos nucleósidos modificados (7-metilguanina y 8-hidroxiguanosina). En la Tabla 6.1 se describen estos analitos modelo junto con las columnas cromatográficas y los dispositivos RAM ensayados.

Tabla 6.1. Analitos modelo, columna cromatográficas y dispositivos RAM ensayados en el desarrollo del método RAM-HILIC-RPLC-MS/MS

	<i>Baja polaridad</i>	<i>Alta polaridad</i>
Analitos modelo	Clortolurón (Clt) Diurón (Din) clorometilfenilurea (CMPU)	Adenosina (ADN) Guanina (Gua) 7-metilguanina (7mGua) 8-hidroxiguanosina (8OHG)
	<i>Fase inversa</i>	<i>Interacciones hidrofílicas</i>
Columnas cromatográficas	Pentafluorofenilo (PFP) Octadecilo-PFP (C18-PFP)	Sulfobetaina (ZIC-HILIC) Amida (Amida-HILIC)
	<i>Apolar</i>	<i>Polar</i>
Dispositivos RAM	Alquil-Diol-Sílice (ADS-C4)	N-vinilacetamida (MSpak)

6.3.1. Separaciones cromatográficas monodimensionales

Se comprobó inicialmente la separación cromatográfica de los analitos seleccionados en columnas independientes. Para ello se inyectó, en el medio adecuado en cada caso, una mezcla patrón de los siete compuestos, tanto en las columnas de fase inversa como de interacciones hidrofílicas.

Se constató que en las columnas de fase inversa se produce la correcta separación de los compuestos de baja y media polaridad. Sin embargo, los compuestos de mayor polaridad no fueron retenidos en esta fase estacionaria apareciendo junto al frente de elución. Constituirían estos analitos, por lo tanto, la fracción a separar en una 2ª dimensión.

Por el contrario, en las columnas de interacciones hidrofílicas, se separaron satisfactoriamente los compuestos de polaridad elevada mientras que, en este caso, el frente de elución lo constituyen los tres analitos de baja-media polaridad. Sería esta, por tanto, la fracción a transferir a la 2ª dimensión.

Los resultados obtenidos muestran que las selectividades aportadas por ambas columnas son muy diferentes por lo que es de esperar que el sistema bidimensional HILIC-RPLC presente elevada ortogonalidad.

6.3.2. Configuración instrumental

La configuración instrumental utilizada para realizar el acoplamiento *heart-cutting* HILIC-RPLC consta de una interfaz que contiene un bucle de inyección montado sobre una válvula de 6 vías. La incorporación *on-line* del dispositivo RAM como etapa de tratamiento de muestra requiere una segunda válvula de 6 vías, incorporada según la configuración utilizada previamente (Figura 1.14, Pág. 43). En la Figura 6.2 se muestra, esquemáticamente, el sistema planteado.

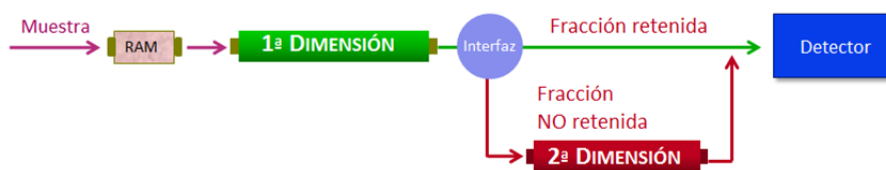


Figura 6.2. Configuración instrumental utilizada en el acoplamiento RAM-HILIC-RPLC

6.3.3. Naturaleza del RAM

Debido a la distinta polaridad de los analitos modelo, en primer lugar, se estudió su retención simultánea en un dispositivo RAM con un sorbente de tipo apolar (C4) y en un RAM de naturaleza polar (MSpak). Para ello, se acopló directamente el RAM al espectrómetro de masas. Los resultados obtenidos mostraron que el RAM-C4 produce la retención de los analitos de baja-media polaridad pero no de los analitos más polares, lo que es coherente con los resultados obtenidos en el apartado 5.B (Figura VIII.1, Pág. 305). Por otra parte, en el RAM de naturaleza polar se retuvieron todos los analitos ensayados, incluidos los de menor polaridad. Por lo tanto, se seleccionó este dispositivo MSpak-RAM como sorbente para el pretratamiento *on-line* en el sistema bidimensional.

6.3.4. Selección de la columna de la primera dimensión

Dentro del diagrama de flujo del acoplamiento instrumental representado en la Figura 6.2, se observa que la selección de la columna

adecuada para la primera dimensión está condicionada por la compatibilidad del acoplamiento entre el dispositivo RAM y la columna cromatográfica.

Se ensayaron las columnas cromatográficas indicadas en la Tabla 6.1 (Pág. 347): dos de fase inversa y dos de HILIC. En ambos casos se ensayaron columnas de dos dimensiones, 2.1 x 100 mm y 4.6 x 150 mm, debido a la importancia que tiene el tamaño de columna en este tipo de configuración.

Los resultados obtenidos indican que:

- El acoplamiento del RAM con columnas HILIC no es compatible para las columnas de menores dimensiones (Figura 6.3), pero sí lo es para columnas con dimensiones convencionales (Figura 6.4) aunque, en todo caso, el volumen máximo inyectado admitido fue de 5 μ L. Ello es debido al volumen de agua que eluye del RAM, muy alto para las columnas de pequeñas dimensiones, lo que perturba la separación.
- El acoplamiento del RAM con columnas de fase inversa (Figura 6.5) es completamente compatible para ambas columnas (PFP y C18-PFP) para los dos tamaños estudiados, admitiendo volúmenes de inyección de hasta 100 μ L.

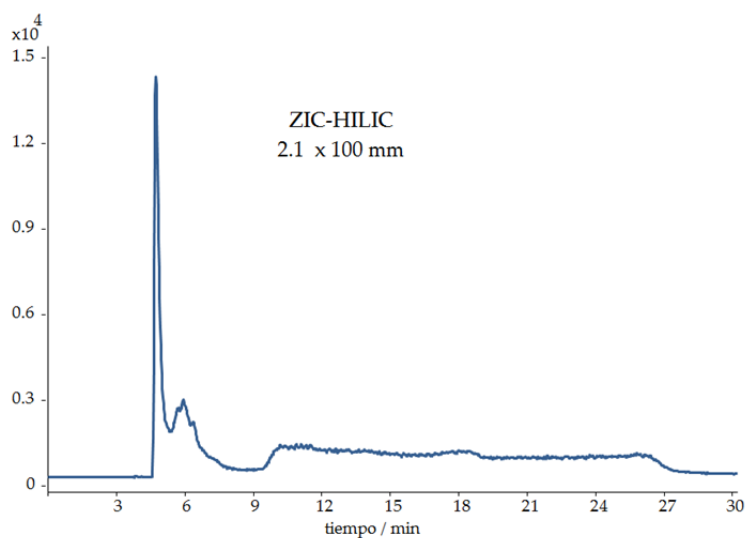


Figura 6.3. TIC obtenido para el acoplamiento del RAM a la columna ZIC-HILIC de 2.1 x 100 mm. Fase móvil: 90% ACN, 10% HCOOH (pH: 3.1). Flujo: 0.1 mL min⁻¹. Inyección: 5 µL. MSpak: 0.5 mL min⁻¹, 1 minuto. Resultados similares se obtuvieron para la columna Amida-HILIC

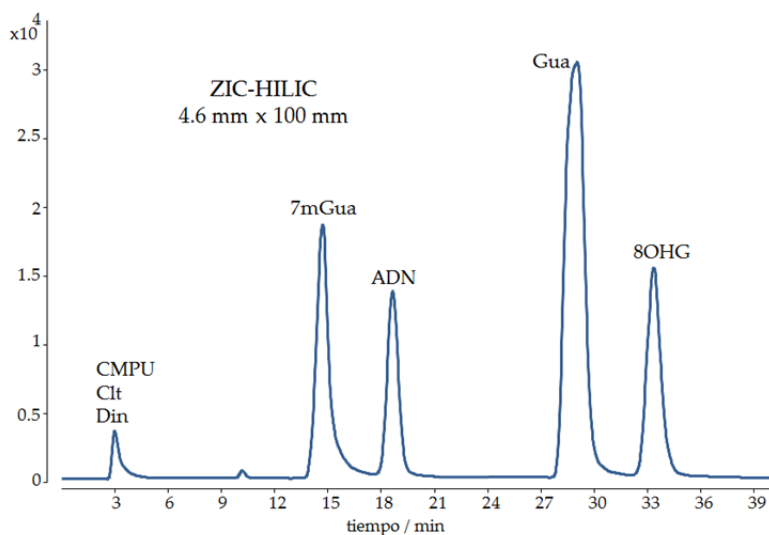


Figura 6.4. TIC obtenido para el acoplamiento del RAM a la columna ZIC-HILIC de 4.6 x 150 mm. Fase móvil: 90% ACN, 10% HCOOH (pH: 3.1). Flujo: 0.5 mL min⁻¹. Inyección: 5 µL. MSpak: 0.5 mL min⁻¹, 1 minuto

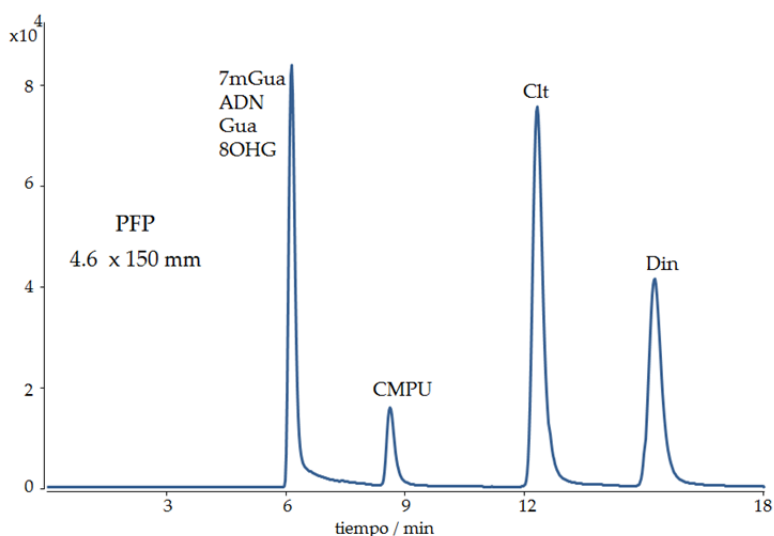


Figura 6.5. TIC obtenido para el acoplamiento del RAM a la columna PFP de 4.6 x 150 mm. Fase móvil: 40% ACN, 60% HCOOH (pH: 3.1). Flujo: 0.5 mL min⁻¹. Inyección: 5 µL. MSpak: 0.5 mL min⁻¹, 1 minuto. Resultados similares se obtuvieron para 2 x 100 mm y para la columna C18-PFP

6.3.5. Selección de la columna de la segunda dimensión

El estudio del acoplamiento entre la 1^a y la 2^a dimensión es de gran importancia en LC-LC debido a que es en esta interfaz donde surgen los mayores problemas técnicos, derivados principalmente de la incompatibilidad entre fases móviles. En nuestro caso, la elección de la modalidad cromatográfica de la 2^a dimensión estará condicionada por el volumen del efluente que puede ser transferido desde la primera a la segunda columna.

Para estudiar dicha transferencia se trabajó con una configuración instrumental sencilla LC-MS/MS simulando en la inyección las fracciones que serían transferidas desde una supuesta 1^a dimensión. Es decir, se inyectaron en la columna ZIC-HILIC volúmenes variables de una mezcla patrón de los analitos más polares en la fase móvil utilizada para la separación en RPLC. Igualmente, se inyectaron en las columnas de RPLC volúmenes variables de una mezcla patrón de los analitos de media y baja polaridad en la fase móvil utilizada para la separación en ZIC-HILIC. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 6.6 y 6.7, respectivamente.

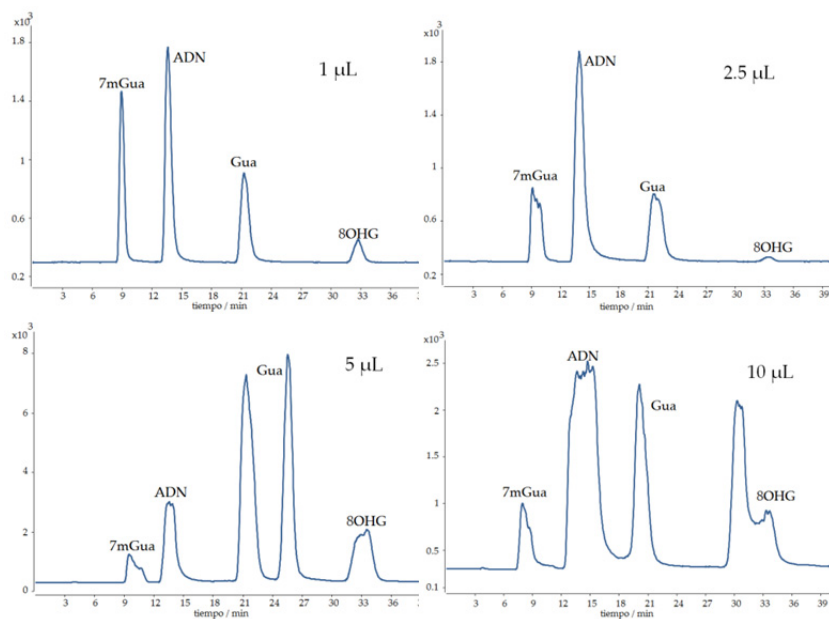


Figura 6.6. TICs obtenidos en la columna ZIC-HILIC (4.6 x 150 mm) para diferentes volúmenes de inyección simulando la transferencia desde la 1ª dimensión

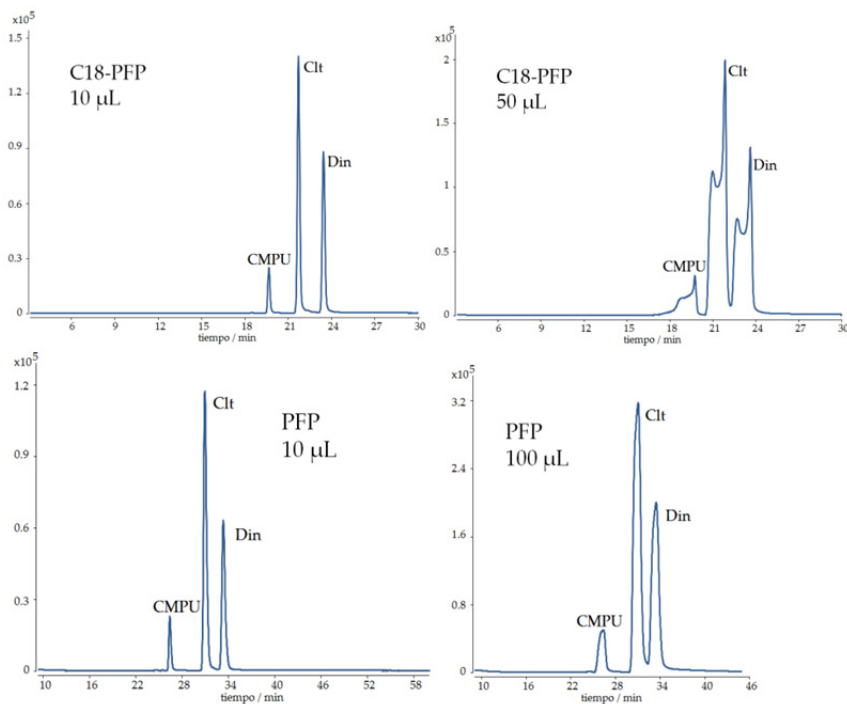


Figura 6.7. TICs obtenidos en las columnas C18-PFP (2.1 x 100 mm) y PFP (4.6 x 150 mm) para diferentes volúmenes de inyección simulando la transferencia desde la 1ª dimensión

De los resultados obtenidos puede deducirse que:

- La columna ZIC-HILIC, como 2ª dimensión, sólo admite volúmenes de transferencia de hasta 1 μL . Para volúmenes mayores se produce una fuerte deformación de los picos debido al elevado contenido acuoso de la fracción transferida. Este hecho limitaría en gran medida la sensibilidad del sistema bidimensional dado que, un volumen de 1 μL , conlleva la transferencia de solo una pequeña fracción de los analitos objeto de estudio, al eluir estos de la 1ª dimensión en un volumen aproximado de 33 μL .
- La columna C18-PFP, como 2ª dimensión, admite volúmenes de transferencia de hasta 10 μL . La transferencia de volúmenes mayores produce distorsiones en los picos cromatográficos. La columna PFP, de mayor tamaño (4.6 x 150 mm), admite volúmenes de transferencia de hasta 100 μL sin se que produzca un deterioro significativo de los picos.

A la vista de estos resultados se seleccionó para todos los estudios posteriores la columna ZIC-HILIC de 4.6 mm x 150 mm como 1ª dimensión y la columna PFP, también de 4.6 mm x 150 mm, como 2ª dimensión. Se construyó así el sistema de cromatografía líquida bidimensional, incluyendo el pretratamiento *on-line*, RAM-ZIC-HILIC-PFP-MS/MS que se muestra esquemáticamente en la Figura 6.8. El volumen de transferencia seleccionado fue de 100 μL .

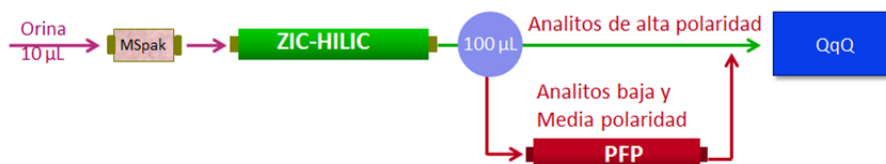


Figura 6.8. Configuración instrumental utilizada en el acoplamiento RAM-ZIC-HILIC-PFP-MS/MS

6.3.6. Sistema bidimensional RAM-ZIC-HILIC-PFP-MS/MS

La configuración instrumental propuesta para el sistema bidimensional HILIC-RPLC con pretratamiento *on-line* se basa en el montaje de los siguientes dispositivos:

- Una primera válvula que incluye el dispositivo RAM y esta conectada directamente con la columna ZIC-HILIC. Esta válvula es automática y, por tanto, está totalmente controlada por el *software*.
- Una segunda válvula incluye el bucle de transferencia y está conectada a la columna PFP. En este estudio se ha trabajado con una válvula de control manual.
- Un detector de barrera de diodos (DAD) se intercala entre la 1ª y la 2ª dimensión con el fin de monitorizar la transferencia de los analitos no retenidos.
- Una conexión T hace confluir, finalmente, los diferentes flujos en el detector de espectrometría de masas en tándem (QqQ).

El sistema completo se muestra en la Figura 6.9. El funcionamiento incluye tres etapas:

- En la primera etapa (A) se inyecta la muestra, que es impulsada por una bomba hasta el RAM donde se produce la retención de los analitos. Las macromoléculas son percoladas hasta desecho al no poder atravesar la barrera de exclusión molecular. Además, durante un tiempo determinado, se produce el lavado del RAM.
- Tras el tiempo de lavado del RAM se inicia la segunda etapa (B) al cambiar de posición la válvula de 6 vías. Entonces una segunda bomba de alta presión eluye, en contraflujo, a los analitos del RAM y los conduce hasta la columna ZIC-HILIC, donde se inicia la separación cromatográfica. Los analitos no retenidos, detectados por el DAD, llenan el bucle de transferencia a la 2ª dimensión.
- La tercera etapa (C) implica el giro de la segunda válvula con lo que otra bomba de alta presión transfiere el contenido del bucle de transferencia a la columna PFP, donde se produce la

separación. La detección se lleva a cabo de forma secuencial al alcanzar el detector los efluentes de las dos columnas, tras converger en una conexión T.

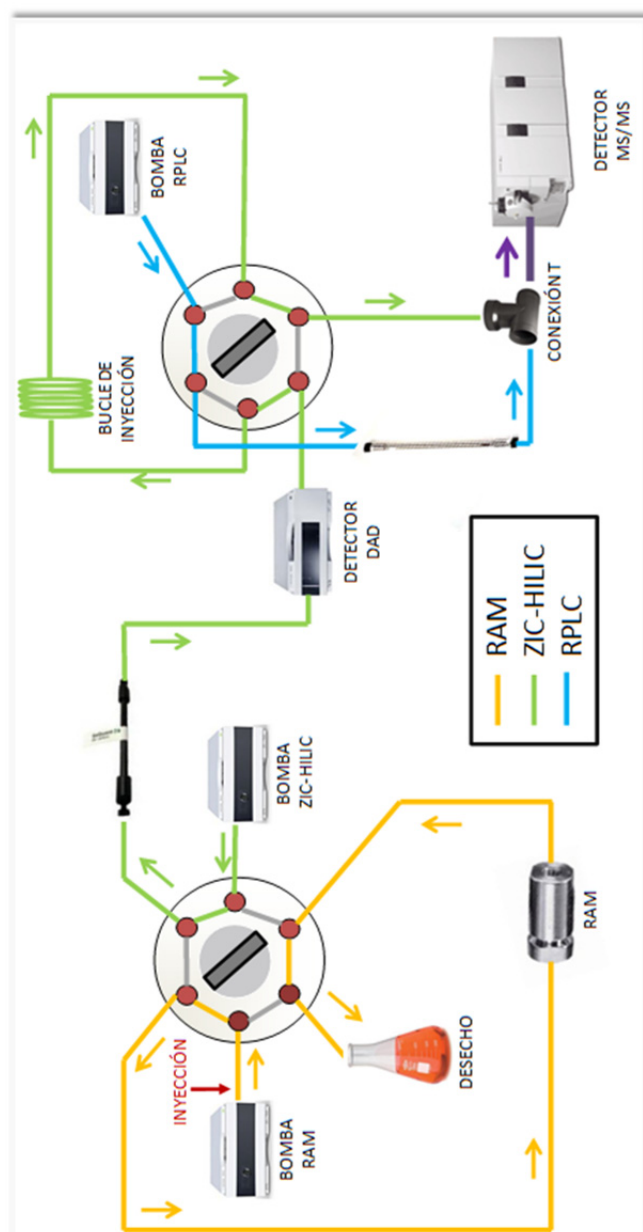


Figura 6.9.A. Sistema RAM-ZIC-HILIC-PPF-MS/MS. Inyección y pretratamiento en el RAM

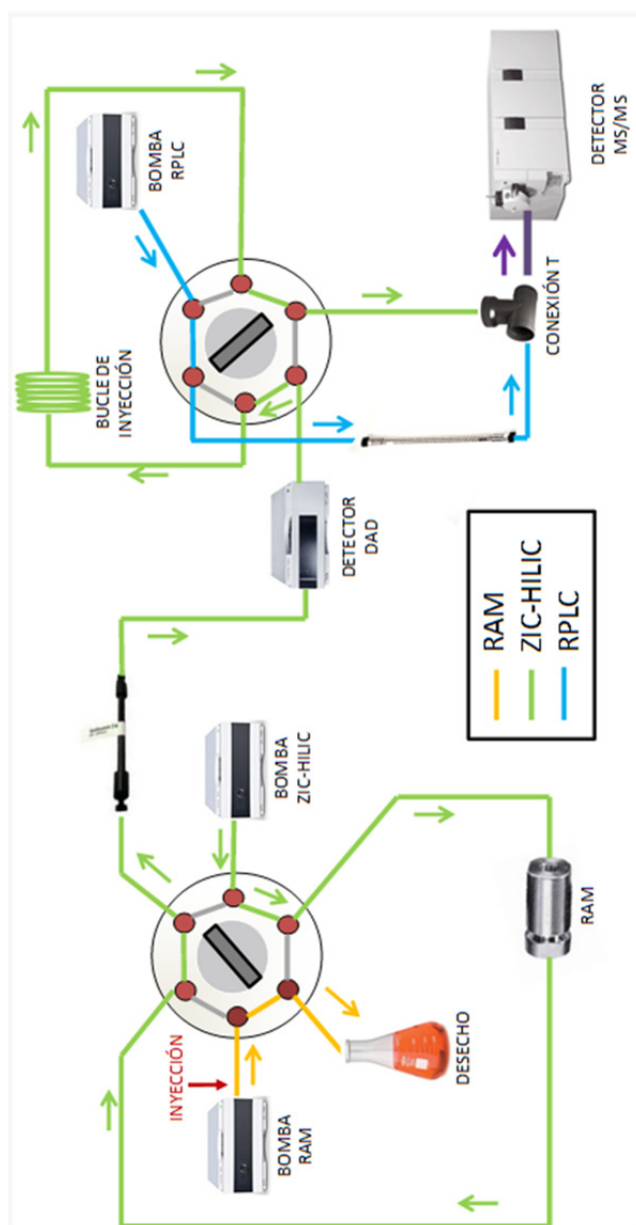


Figura 6.9.B. Sistema RAM-ZIC-HILIC-PPF-MS/MS. Elución del RAM, separación HILIC y carga del bucle de transferencia

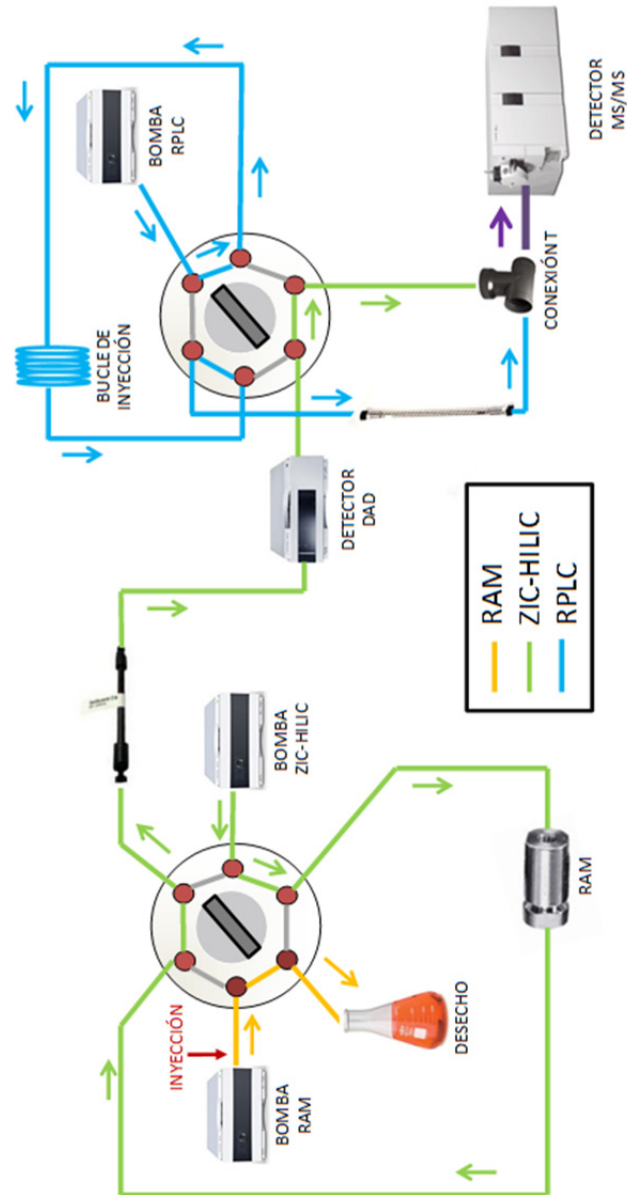


Figura 6.9.C. Sistema RAM-ZIC-HILIC-PPP-MS/MS. Separación RPLC v detección MS/MS

En la Figura 6.10 se muestra el cromatograma de ion total obtenido para una muestra patrón a un nivel de concentración de 2 ng mL⁻¹ a 10 ng mL⁻¹. Se variaron ligeramente las condiciones cromatográficas de la 1ª dimensión sustituyendo la elución isocrática por un gradiente, con el fin de limpiar de forma más efectiva la columna entre inyecciones consecutivas. Adicionalmente, se incluyó como analito 8OH2dG, ya que este es el compuesto de menor polaridad (dentro de los de elevada polaridad estudiados) por lo que podría resultar interesante conocer su comportamiento.

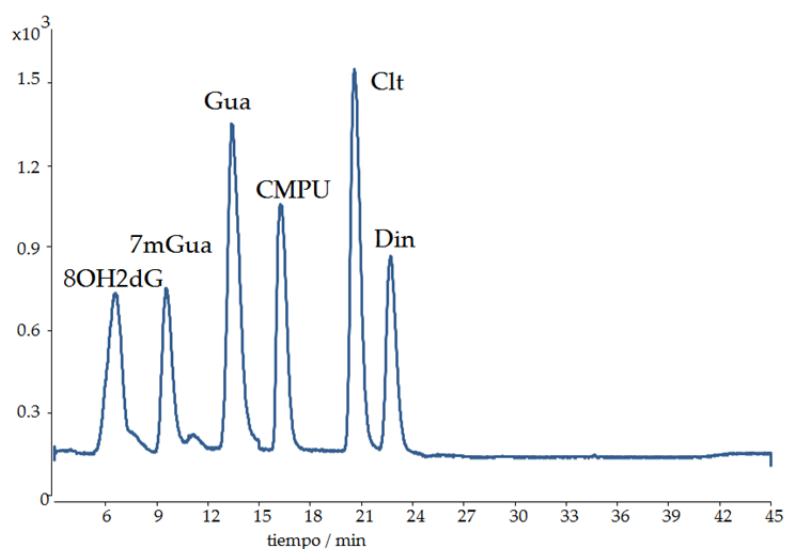


Figura 6.10. TIC obtenido para la inyección en el sistema RAM-ZIC-HILIC-PFP-MS/MS de una muestra patrón de 2-10 ng mL⁻¹. Condiciones cromatográficas: MSpak: 0.5 mL min⁻¹, 1 minuto, 10 µL de muestra. ZIC-HILIC: 0.5 mL min⁻¹. Fase móvil: gradiente de 90% a 50% de ACN. PFP: 0.2 mL min⁻¹. Fase móvil: 60% ACN, 40% HCOOH (pH: 3.1), 100 µL transferidos desde ZIC-HILIC

Finalmente, para mostrar la aplicabilidad del sistema propuesto, se analizaron muestras de orina. En primer lugar se inyectó una muestra sin dopar cuyos resultados se muestran en la Figura 6.11.

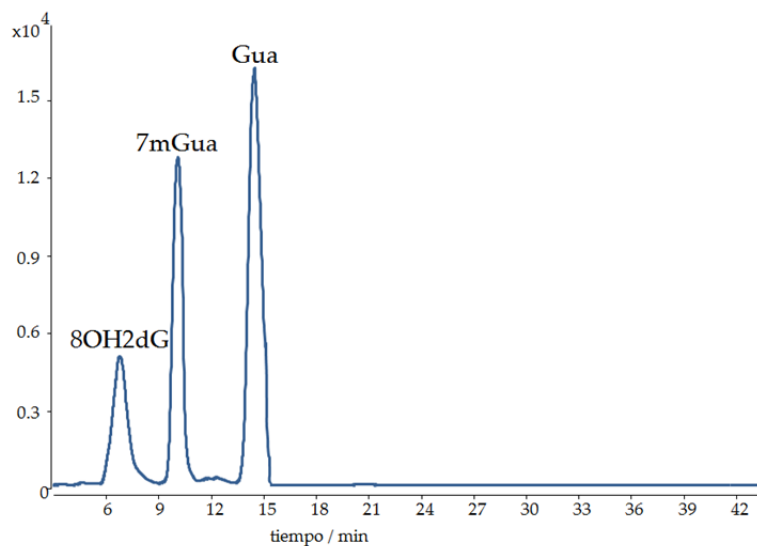


Figura 6.11. TIC para una muestra de orina sin dopar inyectada en el sistema bidimensional RAM-ZIC-HILIC-PPF-MS/MS

Se observa como se detectan los biomarcadores de alta polaridad preseleccionados, compuestos endógenos y, por lo tanto, presentes de forma natural en la muestra. Dado que no se detectaron compuestos exógenos se procedió a dopar la muestra de orina con dichos biomarcadores de exposición a un nivel de concentración de 2 ng mL⁻¹ a 10 ng mL⁻¹. Los resultados para esta muestra de orina dopada se recogen en la Figura 6.12.

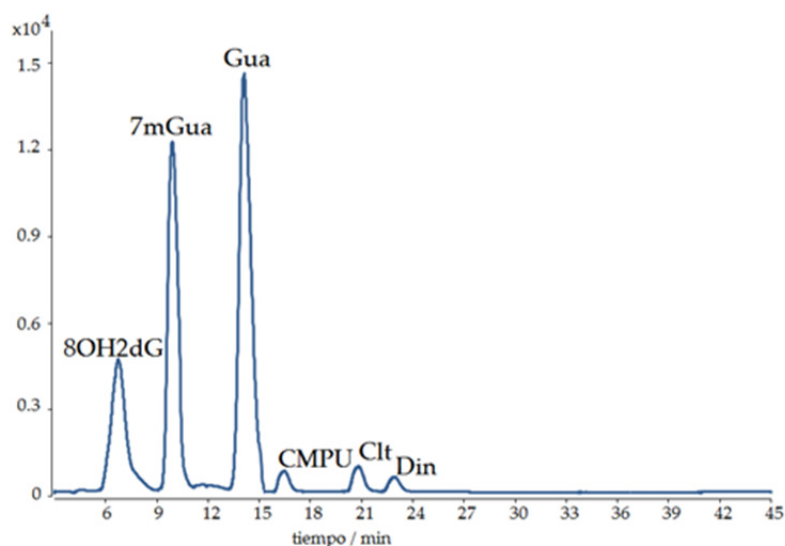


Figura 6.12. TIC para una muestra de orina dopada con los biomarcadores de exposición a un nivel de concentración de 2 ng mL⁻¹ a 10 ng mL⁻¹ inyectada en el sistema bidimensional RAM-ZIC-HILIC-PFP-MS/MS

Puede observarse como se detectan los compuestos tanto de alta como de media y baja polaridad, presentando una separación satisfactoria que no pudo alcanzarse utilizando una única dimensión cromatográfica. Se demuestra así la aplicabilidad del método bidimensional desarrollado para la determinación de biomarcadores de muy diversa polaridad en muestras de orina.

CONCLUSIONES

Puede concluirse que se ha alcanzado el objetivo principal de esta tesis al desarrollarse satisfactoriamente nuevas metodologías analíticas, basadas en el acoplamiento de la espectrometría de masas a técnicas separativas de alta eficacia, que han permitido resolver problemas de especial interés en el campo de la seguridad alimentaria y de la sanidad ambiental. Con estas nuevas metodologías se ha conseguido simplificar los procedimientos analíticos en la etapa de tratamiento de muestra así como cuantificar y realizar una correcta e inequívoca identificación de los analitos estudiados.

El acoplamiento *on-line* de materiales de acceso restringido (RAM) con la cromatografía líquida ha permitido llevar a cabo la automatización del tratamiento de muestra. Este acoplamiento ha mostrado una gran versatilidad, generando una limpieza adecuada en matrices tan complejas como alimentos o muestras biológicas, presentado valores de recuperación satisfactorios para analitos de muy diversa naturaleza. Además, cabe destacar que la vida útil de los RAM es elevada, no mostrando problemas de efecto memoria. Todos estos factores permiten concluir que el acoplamiento de RAM a cromatografía líquida o a electroforesis capilar es una alternativa muy adecuada en las etapas de tratamiento de muestra.

La cromatografía de interacciones hidrofílicas (HILIC) ha mostrado su potencial como técnica de separación para compuestos de elevada polaridad. El estudio detallado del mecanismo de retención en ZIC-HILIC permite concluir que la separación de los analitos estudiados, nucleósidos y nucleobases, transcurre por un mecanismo múltiple, en el que las interacciones electrostáticas tienen una contribución importante bajo ciertas condiciones experimentales.

Adicionalmente y de forma preliminar, se ha demostrado la capacidad y las posibilidades analíticas que presenta el acoplamiento HILIC-RPLC (cromatografía bidimensional) en el análisis de biomarcadores endógenos y exógenos en muestras biológicas. El uso de esta metodología amplía las posibilidades de análisis de analitos de naturaleza muy diferente, con una única inyección cromatográfica.

La espectrometría de masas en tándem, en sus diferentes modalidades, ha permitido desarrollar métodos de elevada sensibilidad, trabajando tanto con trampa iónica como con triple cuadrupolo.

Además, cabe destacar que el estudio de los patrones de fragmentación de los compuestos de interés permite realizar el seguimiento de diferentes transiciones asegurándose la identificación inequívoca de los analitos al nivel exigido por las correspondientes legislaciones.

En general, se puede concluir que los métodos desarrollados son rápidos, sensibles y selectivos, tanto en el análisis de residuos tóxicos en alimentos como de biomarcadores en muestras biológicas. Todos ellos han mostrado su capacidad para ser utilizados como métodos cuantitativos de confirmación, superando las diferentes etapas de validación exigidas por las pertinentes legislaciones europeas.

En cuanto a conclusiones más concretas puede indicarse que, en la determinación de contaminantes en alimentos, se han obtenido limpiezas muy eficientes utilizando RAM de cadenas alquílicas de C4, tanto para el análisis de muestras de miel como de leche. Se ha demostrado así las posibilidades que muestran estos materiales en el campo de la seguridad alimentaria donde raramente han sido utilizados anteriormente. En la determinación de biomarcadores exógenos en muestras biológicas, el acoplamiento de materiales RAM, de naturaleza apolar, a la separación cromatográfica permite efectuar el tratamiento *on-line* de la muestra y realizar la determinación cuantitativa de una forma automática; cabe destacar el desarrollo de una metodología de *screening* que permite realizar un seguimiento general de la exposición a pesticidas y tóxicos de origen industrial. En la determinación de biomarcadores endógenos es necesario utilizar un RAM polimérico de naturaleza polar. El método desarrollado, aplicado al análisis de muestras de control y a muestras de enfermos oncológicos, ha mostrado el potencial que presenta el análisis de los biomarcadores endógenos como método de diagnóstico y seguimiento en procesos oncológicos.

Para finalizar, se puede concluir que se han alcanzado las innovaciones metodológicas que se pretendían abordar, en especial las asociadas a los estudios usando HILIC y a la automatización de las etapas de tratamiento de muestra resolviendo problemas actuales asociados a la seguridad alimentaria y a la sanidad ambiental y demostrando la aplicabilidad de las metodologías desarrolladas y validadas.

SUMMARY IN ENGLISH

8

TABLE OF CONTENTS



1.AIM.....	371
2. DETERMINATION OF XENOBIOTIC COMPOUNDS IN FOODSTUFF....	377
3. DETERMINATION OF BIOMARKERS IN BIOLOGICAL SAMPLES.....	381
4. CONCLUSIONS.....	385

1. AIM

This thesis focuses on the development of new analytical methods based on the coupling of mass spectrometry and high-efficiency separation techniques, such as capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography. These couplings were applied to the resolution of problems of special interest as regards food safety and environmental health. Thus, the author was interested in the determination of toxic residues in foods and the assessment of endogenous and exogenous compounds used as biomarkers in biological samples.

The overall aim of the thesis is the development of new methodologies that will meet the demands currently addressed in the field of analytical chemistry such as the simplification of analytical procedures, both in the sample treatment steps, which are especially tedious and time-consuming, and in aspects related to separation-quantification and identification.

In particular the author aims to develop new strategies for sample treatment (extraction-preconcentration-clean-up) using sorbents formed of restricted access materials in on-line configurations that will facilitate or reduce the steps in the global process. Special attention is devoted to the methodological development of these sample treatment steps based on the use of these sorbents to be able, where possible, to perform automated sample treatment. These materials exclude macromolecules such as proteins and other polar substances thanks to a mechanism of molecular exclusion and their surface polarity. Accordingly, one of the objectives of the thesis is to show that the use of these materials allows the automation of sample treatment with matrices of great complexity such as foods and biological samples since they provide suitable cleaning for later chromatographic or electrophoretic analysis.

A second aim is the study of new chromatographic mechanisms that will allow the number of analyzable compounds to be expanded. This aspect covers study of the chromatography of hydrophilic interactions for the separation of high-polarity compounds. In this section, the author performs a detailed study of the retention mechanisms that arise in hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) when used in the separation of high-polarity

compounds. Of special relevance is the quantitative evaluation of the electrostatic contribution to the retention mechanism. A study is also made of the possible coupling of hydrophilic interaction liquid chromatography to reversed-phase chromatography (HILIC-RPLC) with a view to carrying out the simultaneous and automatic determination of endogenous compounds (usually high-polarity compounds) and of exogenous compounds used as biomarkers of exposure to xenobiotic compounds (of intermediate and low polarity).

In the different methods developed, mass spectrometric detection in different modes is used (quadrupole, triple quadrupole, ion trap) to optimize the detection and identification of analytes, studying the fragmentation processes and the transitions that can provide unequivocal identification.

Finally, an important point is that from the methodological point of view the thesis is self-contained in its scope since the methodological innovations addressed focus on the establishment of rapid, sensitive and selective analytical methods that are also able to meet the criteria set by the legislation for validation as quantitative confirmatory methods in the analysis of compounds of interest. The compounds of interest in the different matrices studied in this thesis can be divided into pollutants in foods (chapter 2) and biomarkers in biological samples (chapter 3).

Among the specific aims is the development of new automated and validated methodologies for the determination of different endocrine-disrupting agents in honey samples using chromatographic and electrophoretic methods. Another study encompassed in this section is the optimization of and automated method for the determination of several different benzimidazoles in milk samples.

A further avenue of enquiry addressed is the development of different methods of analysis for the separation, identification and quantification, at trace levels in urine samples, of biomarkers of exposure to exogenous compounds using reversed-phase chromatography (RPLC), and biomarkers of effect, or endogenous markers, using hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) with a zwitterionic stationary phase. The exogenous biomarkers studied are xenobiotic compounds of special relevance owing to their

wide use in agricultural and industrial activities. The endogenous biomarkers studied are related to alterations in DNA/RNA: nucleosides modified by methylation (1-methylguanine, 7-methylguanine, 9-methylguanine, 7-methylguanosine and 1-methyladenosine) and hydroxylation (8-hydroxiguanine, 8-hydroxyguanosine and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine). The method developed is applied to the analysis of samples from oncologic patients in order to determine the potential of these biomarkers in the diagnosis or monitoring of the progress of the oncologic disease.

2. DETERMINATION OF XENOBIOTIC COMPOUNDS IN FOODSTUFF

2.A. DETERMINATION OF ENDOCRINE DISRUPTORS IN HONEY

RESEARCH ARTICLE I:

A confirmatory method for the determination of phenolic endocrine disruptors in honey using restricted-access material–liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Analytical and Bioanalytical Chemistry 398 (2010) 1239-1247..... 115

RESEARCH ARTICLE II:

Determination of endocrine disruptors in honey by CZE-MS using restricted access materials for matrix cleanup

Electrophoresis 31 (2010) 2279-2288..... 137

2.B. DETERMINATION OF ANTHELMINTIC BENZIMIDAZOLES IN MILK

RESEARCH ARTICLE III:

A fast and reliable method for the quantitative determination of benzimidazoles and metabolites in milk by LC-MS/MS with on-line sample treatment

Analytical and Bioanalytical Chemistry 404 (2012) 2909-2914..... 175

3. DETERMINATION OF BIOMARKERS IN BIOLOGICAL SAMPLES

3.A. DETERMINATION OF BIOMARKERS OF EXPOSURE TO XENOBIOTIC COMPOUNDS

RESEARCH ARTICLE IV:

Automated sample treatment with the injection of large sample volumes for the determination of contaminants and metabolites in urine

Journal of Separation Science 33 (2010) 2240-2249..... 207

RESEARCH ARTICLE V:

Development and validation of a method for the detection and confirmation of biomarkers of exposure in human urine by means of restricted access material–liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Journal of Chromatography A 1217 (2010) 40-48..... 229

3.B. DETERMINATION OF BIOMARKERS OF EFFECT BY ZWITTERIONIC HYDROPHILIC LIQUID CHROMATOGRAPHY

RESEARCH ARTICLE VI:

Study of retention behaviour and mass spectrometry compatibility in zwitterionic hydrophilic interaction chromatography for the separation of modified nucleosides and nucleobases

Journal of Chromatography A 1218 (2011) 3994-4001..... 269

RESEARCH ARTICLE VII:

Evaluation on the electrostatic contribution to the retention of modified nucleosides and nucleobases by zwitterionic hydrophilic interaction chromatography

ISRN Analytical Chemistry, Volume 2012, Article ID 308062, 5 pages..... 279

RESEARCH ARTICLE VIII:

Development and validation of a hydrophilic interaction chromatography–tandem mass spectrometry method with on-line polar extraction for the analysis of urinary nucleosides. Potential application in clinical diagnosis

Journal of Chromatography A 1218 (2011) 9055-9063..... 301

REVIEW ARTICLE:

Stationary phases for separation of nucleosides and nucleotides by hydrophilic interaction liquid chromatography

Trends in Analytical Chemistry 47 (2013) 111-128..... 315

4. CONCLUSIONS

It may be concluded that the main aim of the thesis has been achieved, namely that there has been a satisfactory development of new analytical methodologies based on coupling of mass spectrometry and high-efficiency separation techniques, which have allowed problems of special interest in the field of food safety and environmental health to be overcome. With these new methodologies, it has been possible to simplify the analytical procedures involved in the sample treatment step and to quantify and perform a correct, unequivocal identification of the analytes studied.

The on-line coupling of restricted access materials (RAM) and liquid chromatography have allowed the author to automate the sample treatment step. This coupling is highly versatile, permitting a suitable clean-up in matrices as complex as foods and biological samples. It has satisfactory recovery values for analytes of very different natures. Additionally, it should be noted that the useful life of RAMs is long, with no memory effects. All these factors mean that the coupling of RAMs to liquid chromatography or capillary electrophoresis is a promising alternative in sample treatment steps.

Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) is seen to have good potential as a technique for the separation of high-polarity compounds. A detailed study of the retention mechanism in ZIC-HILIC shows that the separation of the analytes studied, nucleosides and nucleobases, occurs via a multiple mechanism in which electrostatic interactions play an important role under certain experimental conditions.

Additionally, although in a preliminary stage, the author highlights the capacity and analytical possibilities of the coupling of HILIC and RPLC (two-dimensional chromatography) in the analysis of endogenous and exogenous biomarkers in biological samples. The use of this methodology broadens the possibilities of the analysis of analytes of very different types by performing only a single chromatographic injection.

Tandem mass spectrometry, in its different modes, has allowed the development of highly sensitive methods, working with both an ion trap and a triple quadrupole. A further positive point is that study of the fragmentation patterns of the compounds of interest allows the follow-

up of different transitions, ensuring the unequivocal identification of the analytes at the level demanded by the corresponding legislations.

Overall, it may be concluded that the methods developed are rapid, sensitive and selective, both in the analysis of toxic residues in foods and biomarkers in biological samples. All the methods have proved to be suitable as quantitative confirmatory methods, meeting the different validation steps demanded by the pertinent European laws.

With respect to more concrete conclusions, the work carried out along the development of this thesis shows that in the determination of food pollutants highly efficient clean-ups can be obtained using C4 alkyl-chain RAMs for the analysis of both honey and milk samples. The author also demonstrates the possibilities of these materials (RAMs) in the field of food safety, an area in which they have rarely been used previously. In the determination of exogenous biomarkers in biological samples, the coupling of RAM materials, with an apolar nature, and chromatographic separation allows on-line sample treatment and automated quantitative determination. Of special importance is the development of a screening method that allows the development of a general follow-up of exposure to pesticides and toxic products of industrial origin. In the determination of endogenous biomarkers it is necessary to use a polar polymeric RAM. The method developed, applied to the analysis of control samples and samples from oncologic patients, has revealed the potential of the analysis of endogenous biomarkers as a method for diagnosis and follow-up in oncologic processes.

To conclude, the author has achieved the aims set, in particular those associated with studies using HILIC and the automation of the sample treatment steps, solving current problems linked to food safety and environmental toxicology, and showing the applicability of the methods developed and validated.

APÉNDICE: ESPECTROS DE MS/MS

I

Se muestran en este apéndice I los espectros de masas (MS) y de fragmentación (MS/MS) de los diferentes compuestos estudiados en esta tesis.

Para cada uno de ellos se encuentra, en la parte izquierda, la señal obtenida en un barrido de masas simple (sin fragmentación). Se señala, en todos los casos, la estructura más probable del ion más abundante.

En la parte derecha, se muestra la señal obtenida en un barrido de iones producto correspondiente a la fragmentación del ion mayoritario en el barrido de masas simple (ion precursor). Se señala de nuevo, en todos los casos, la estructura más probable del ion producto más abundante.

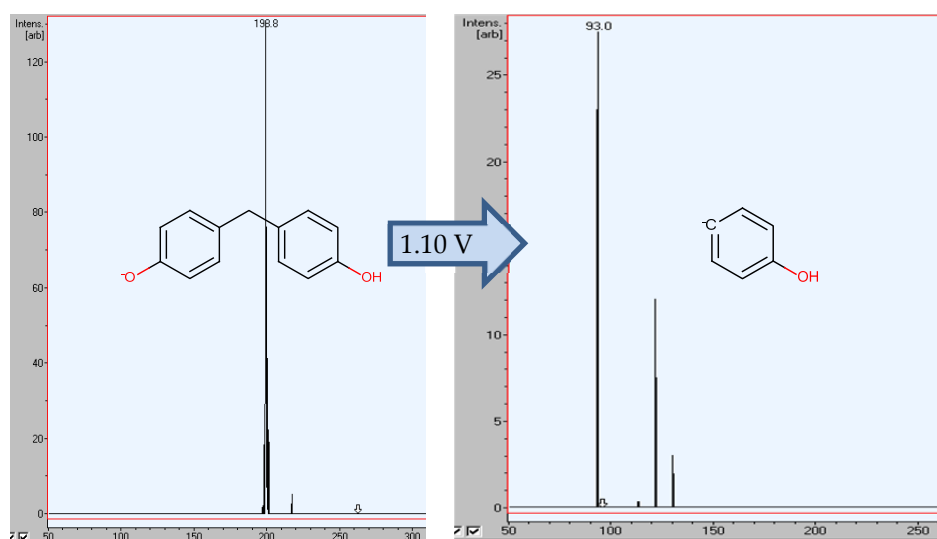
Las condiciones de trabajo fueron, en cada caso, las siguientes:

- A.FENOLES: Trampa iónica. ESI negativo (-3.5 kV). Gas de secado: N₂ a 350°C y 10 L min⁻¹. Presión de nebulización: 50 psi. Voltaje de cono: 60 V. Gas de fragmentación: He.
- B.BENZIMIDAZOLES: Triple cuadrupolo. ESI positivo (3.5 kV). Gas de secado: N₂ a 350°C y 12 L min⁻¹. Presión de nebulización: 35 psi. Voltaje de cono: 90-140 V. Gas de fragmentación: N₂.
- C.CONTAMINANTES Y PESTICIDAS INDUSTRIALES: Trampa iónica. ESI positivo (3.5 kV) y negativo (-3.5 kV). Gas de secado: N₂ a 350°C y 10 L min⁻¹. Presión de nebulización: 50 psi. Voltaje de cono: 60 V. Gas de fragmentación: He.
- D. NUCLEÓSIDOS Y NUCLEOBASES: Triple cuadrupolo. ESI positivo (3.5 kV). Gas de secado: N₂ a 350°C y 12 L min⁻¹. Presión de nebulización: 35 psi. Voltaje de cono: 80-120 V. Gas de fragmentación: N₂.

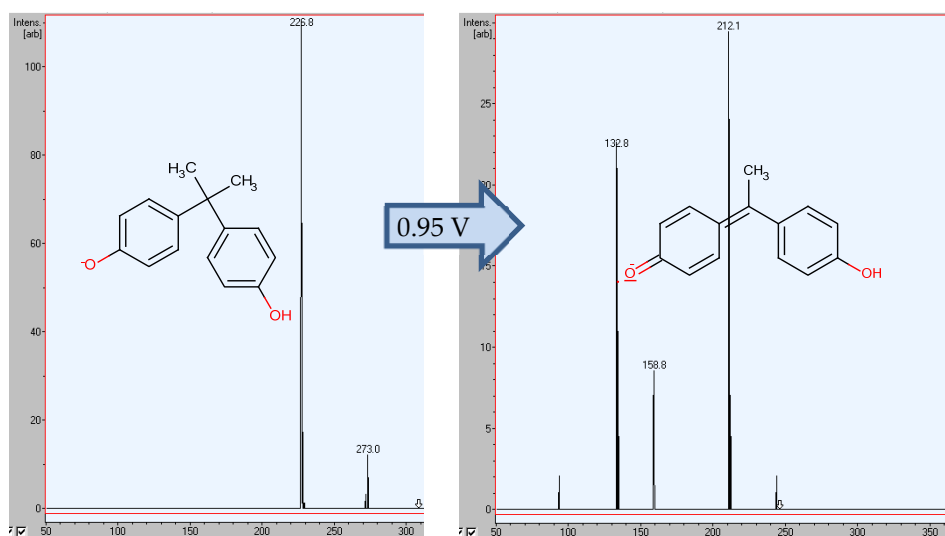
A. FENOLES

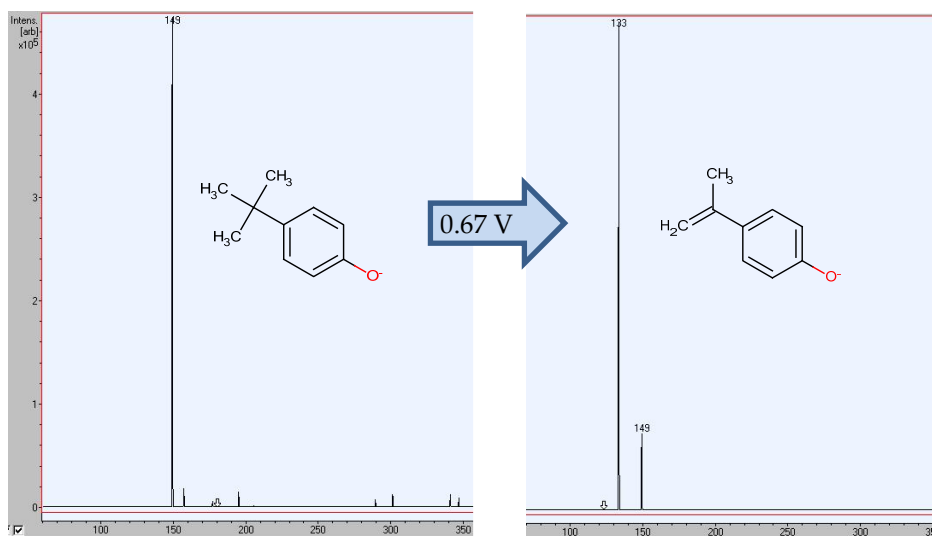
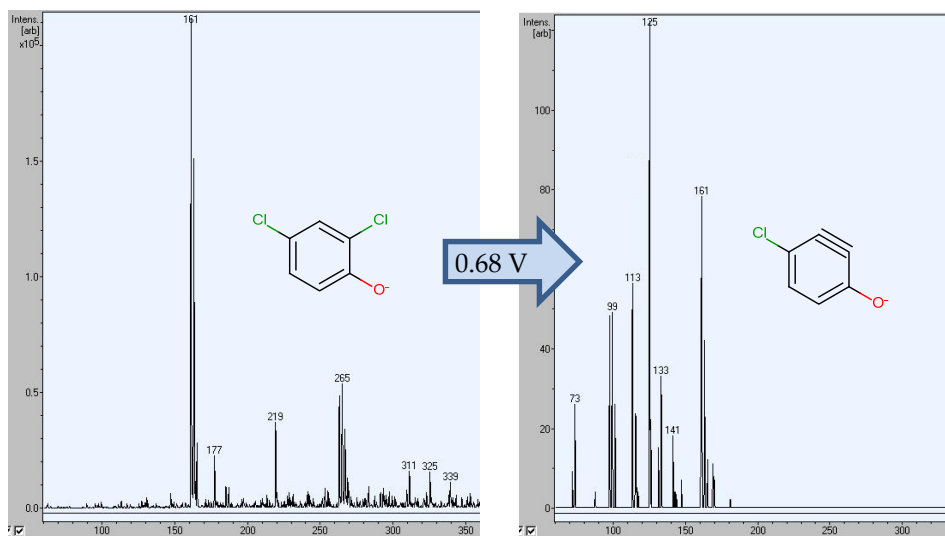


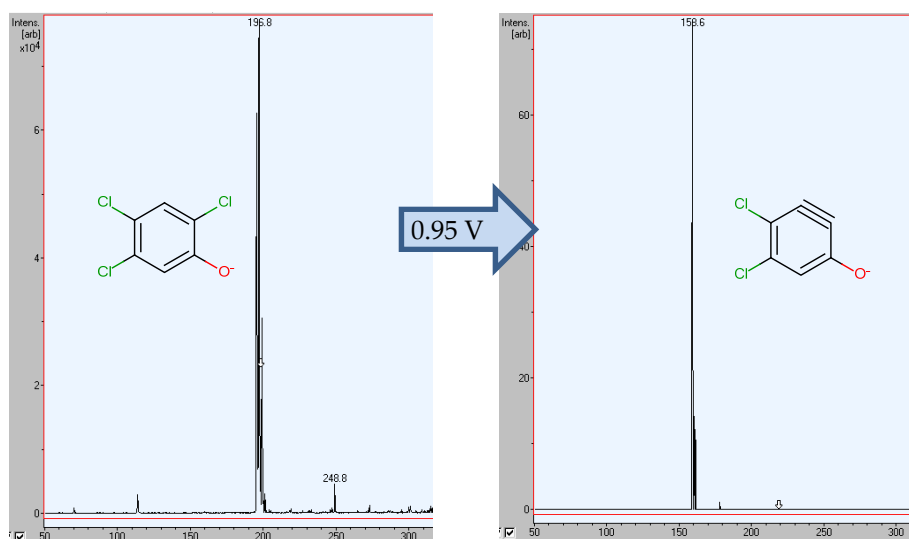
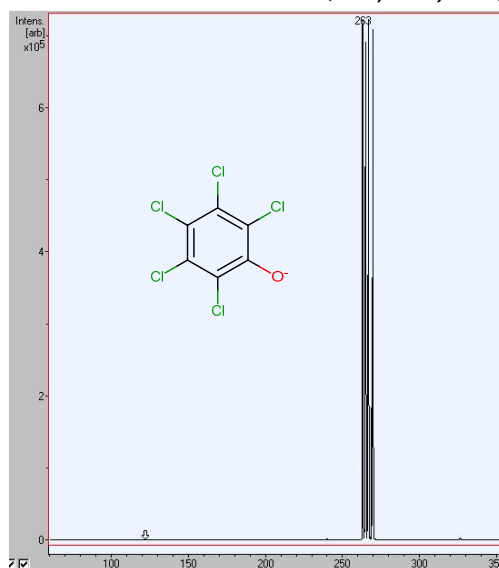
BISFENOL F (199 → 93)

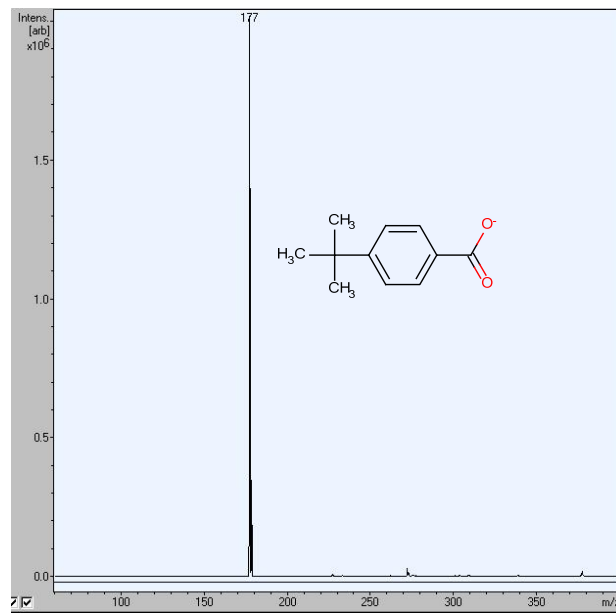
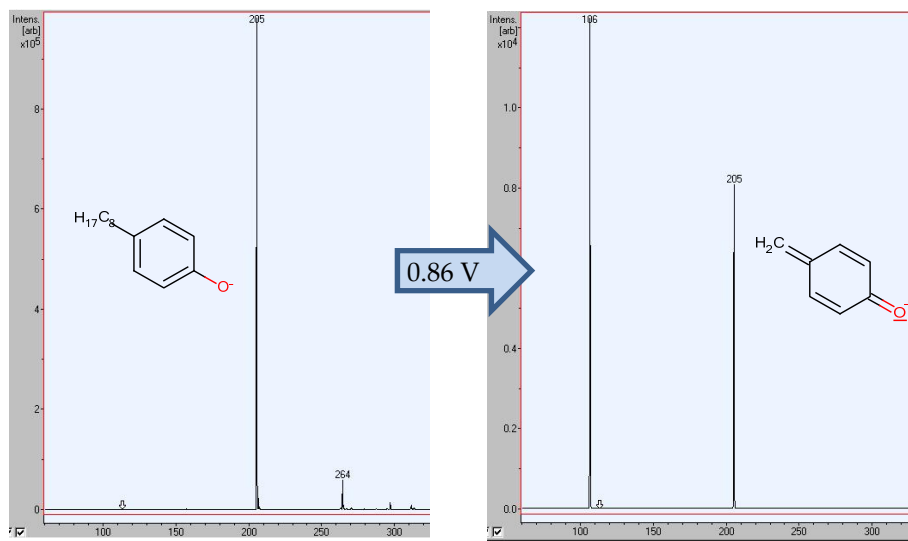


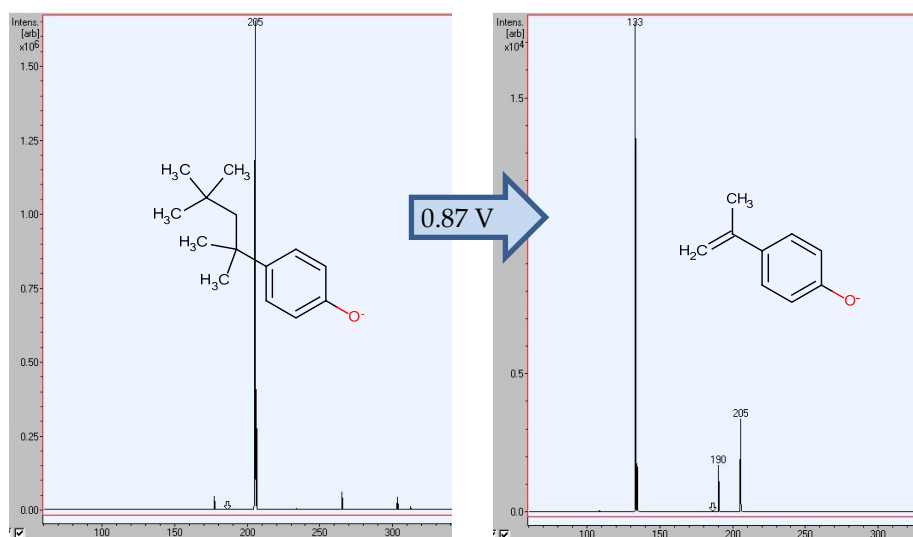
BISFENOL A (227 → 212)



tert-BUTILFENOL (149 → 133)**DICLOROFENOL (161 → 125)**

TRICLOROFENOL (195 → 159)**PENTACLOROFENOL (265, 267, 263)**

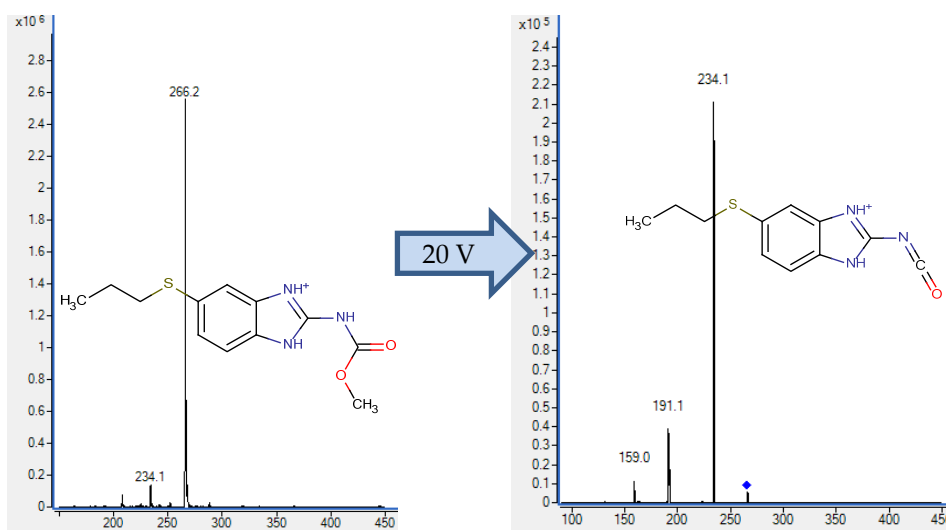
ÁCIDO tert-BUTILBENZOICO (177)**n-OCTILFENOL (205 \rightarrow 106)**

tert-OCTILFENOL (205 → 133)

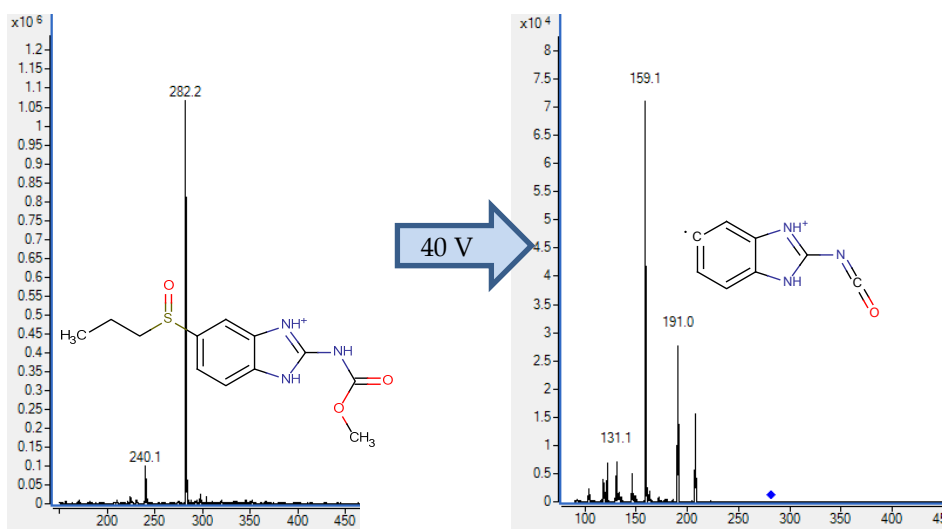
B. BENZIMIDAZOLES

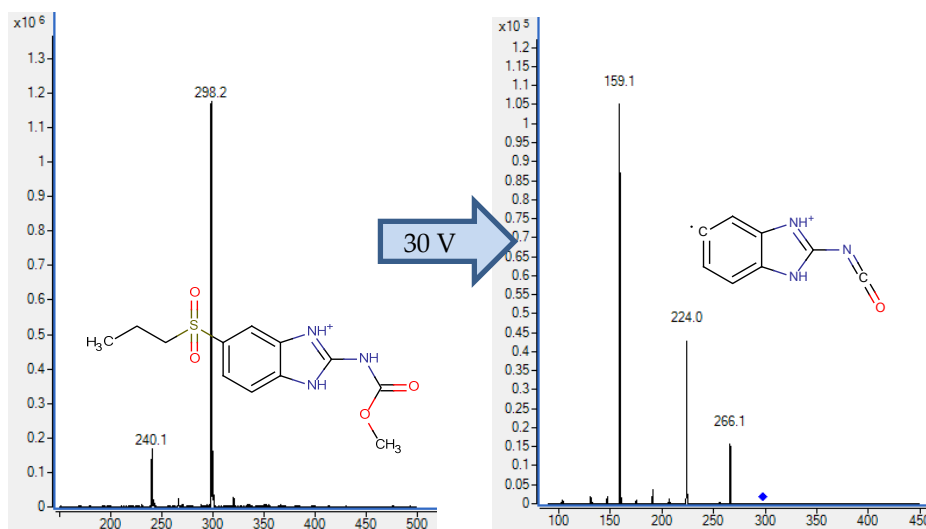
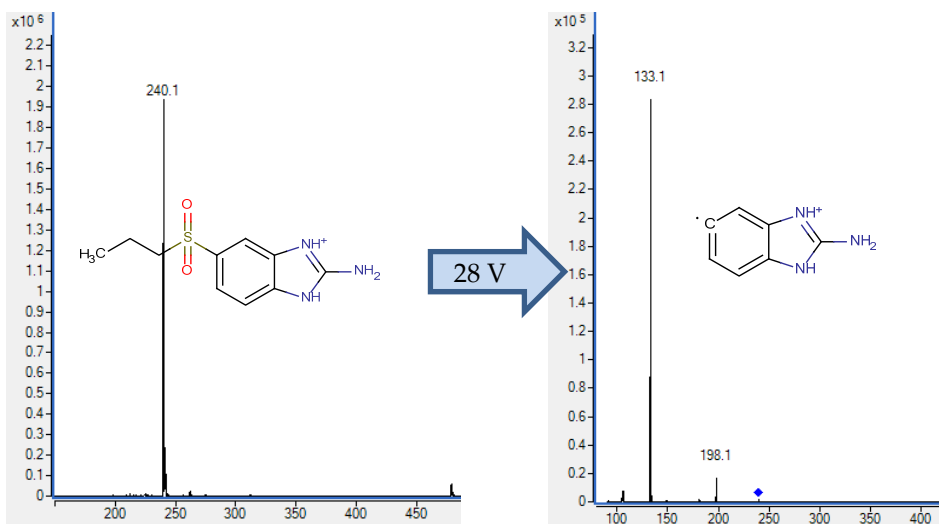


ALBENDAZOL (266 → 234)

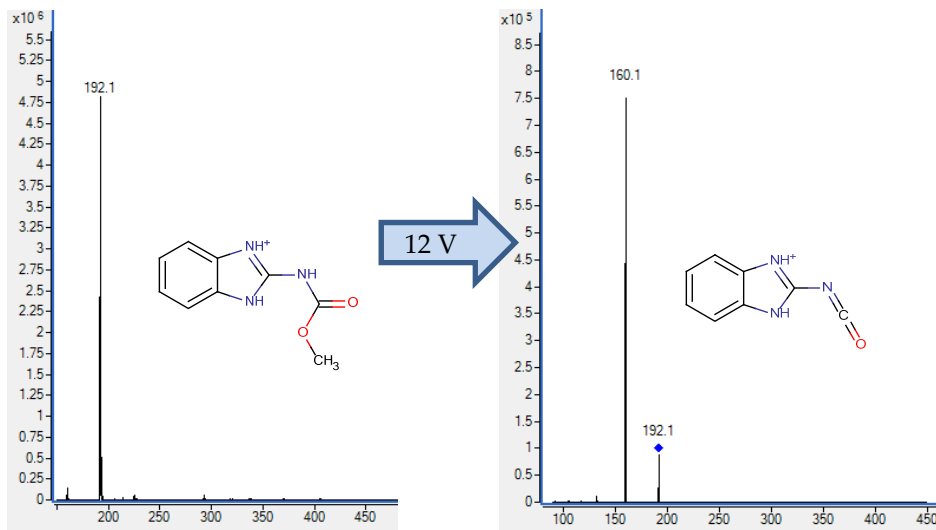


ALBENDAZOL-SULFÓXIDO (282 → 159)

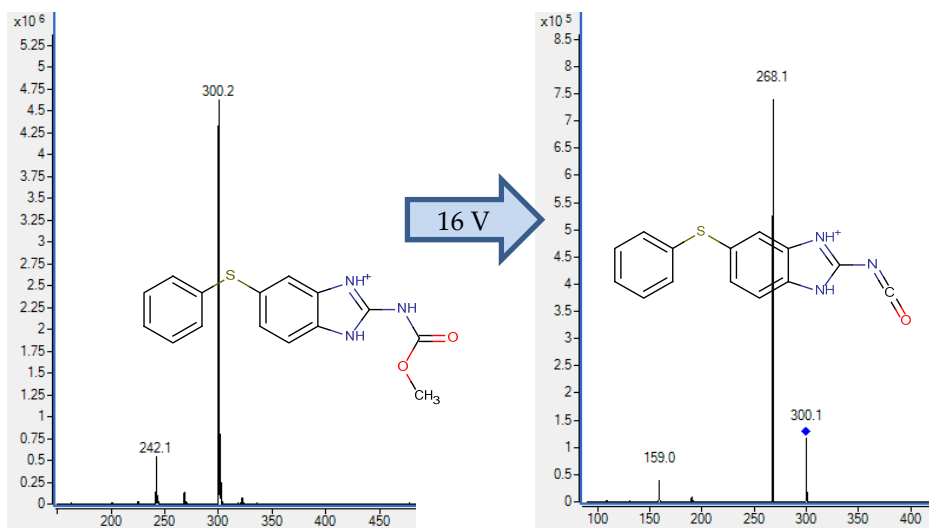


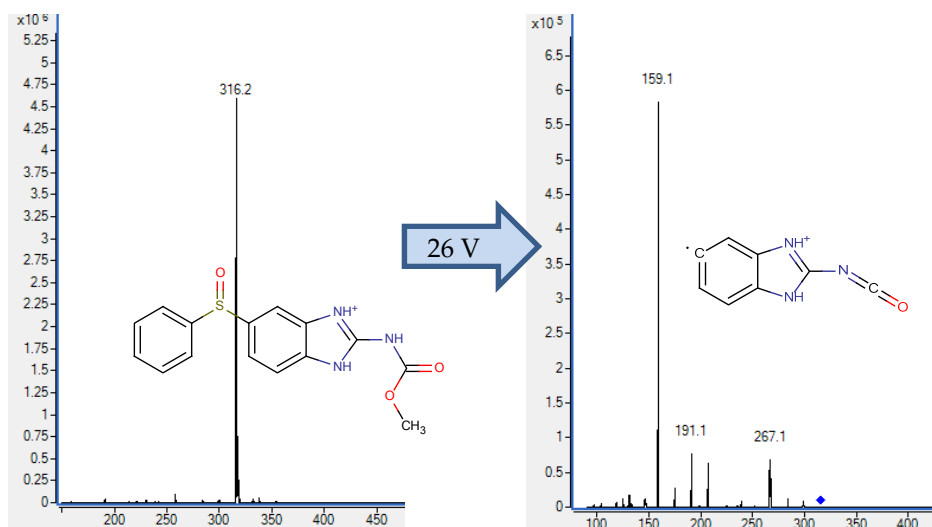
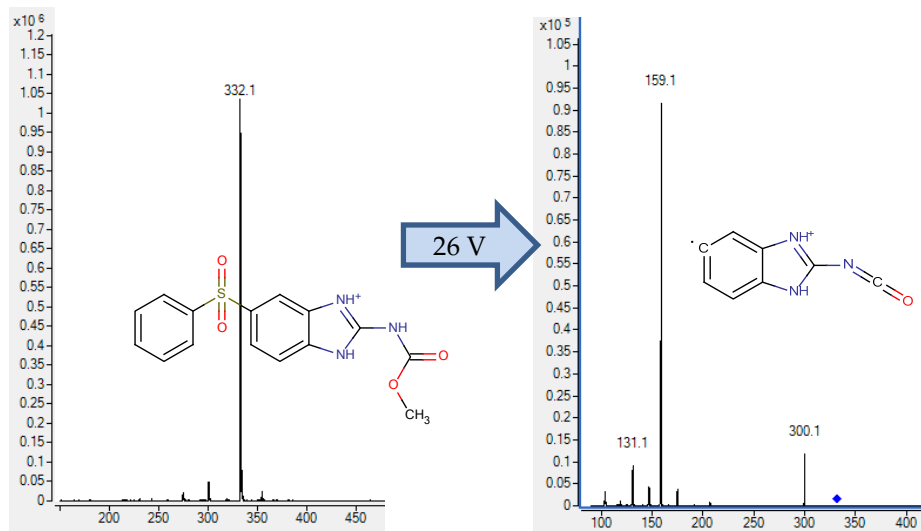
ALBENDAZOL-SULFONA (298 → 159)**ALBENDAZOL-2-AMINOSULFONA (240 → 133)**

CARBENDAZIM (192 → 160)

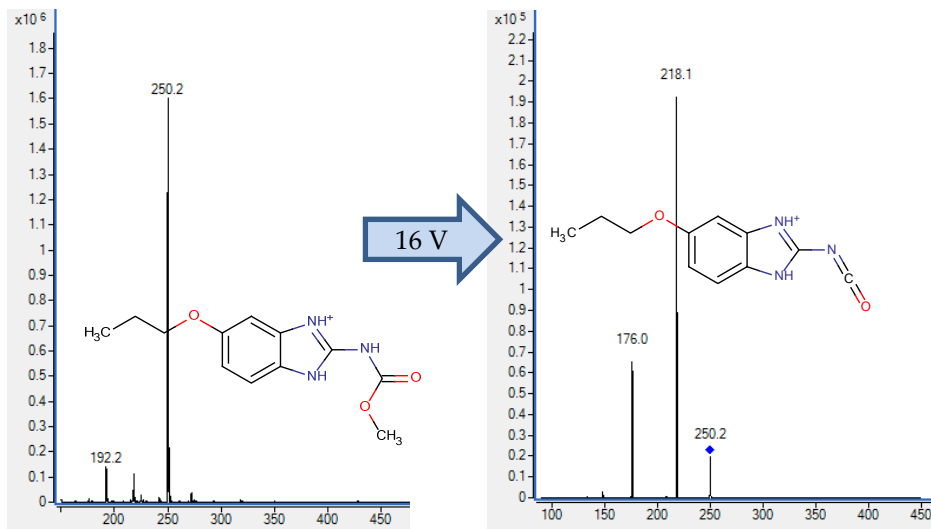


FENBENDAZOL (300 → 268)

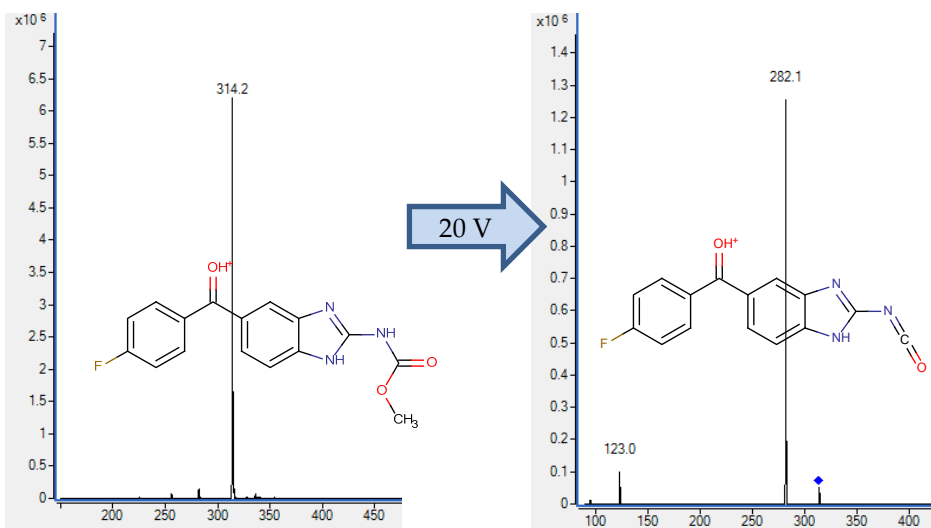


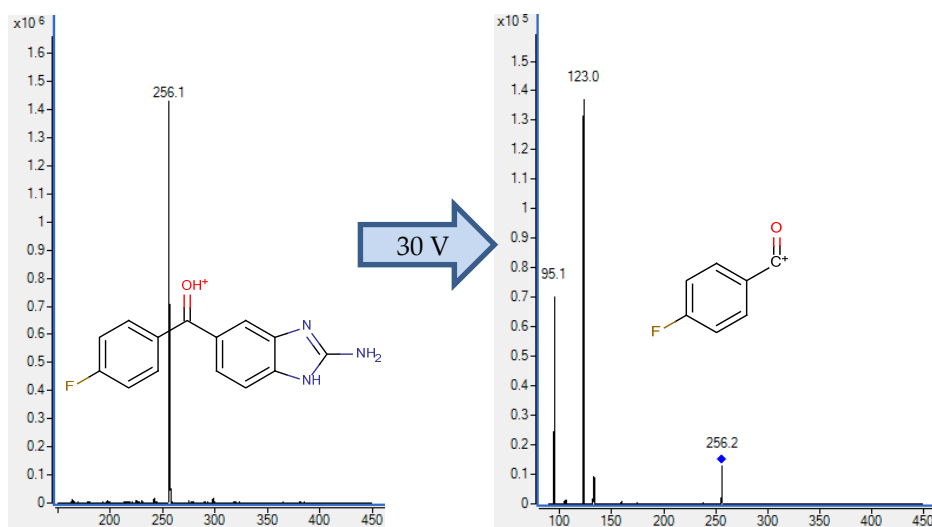
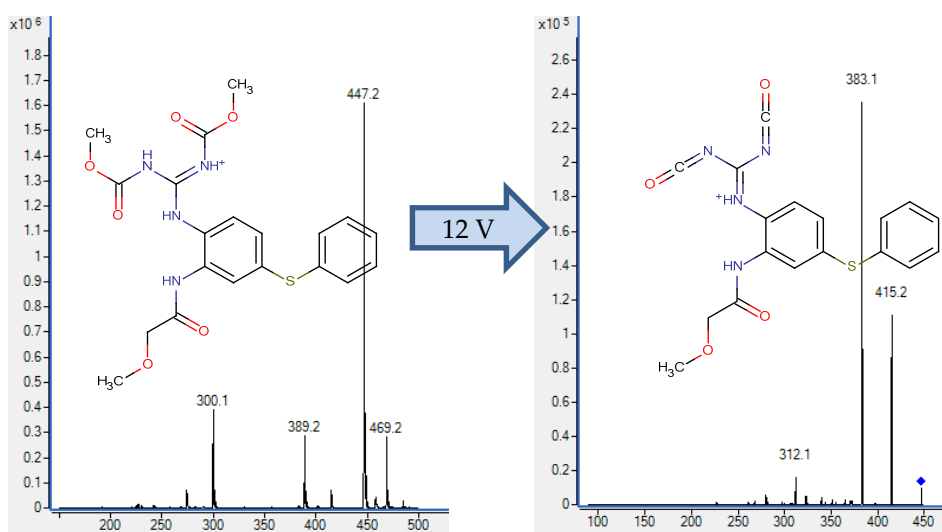
OXFENDAZOL (316 → 159)**FENBENDAZOL-SULFONA (332 → 159)**

OXIBENDAZOL (250 → 218)



FLUBENDAZOL (314 → 282)

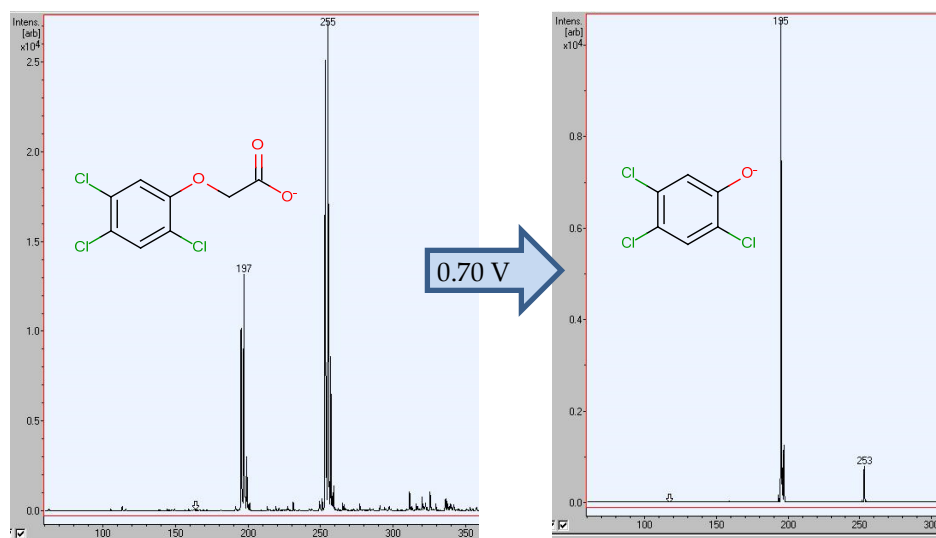


2-AMINO-FLUBENDAZOL (256 → 123)**FEBANTEL (447 → 383)**

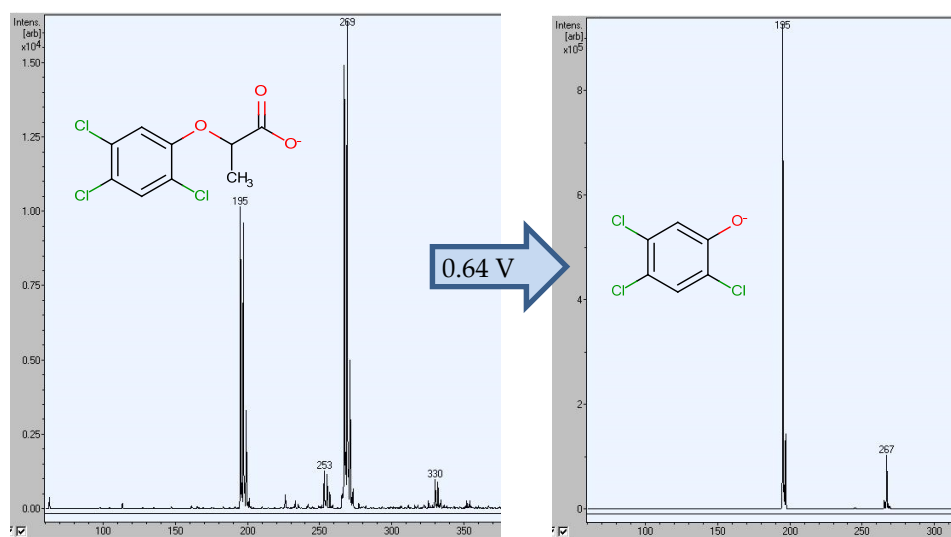
**C. PESTICIDAS Y CONTAMINANTES
INDUSTRIALES**



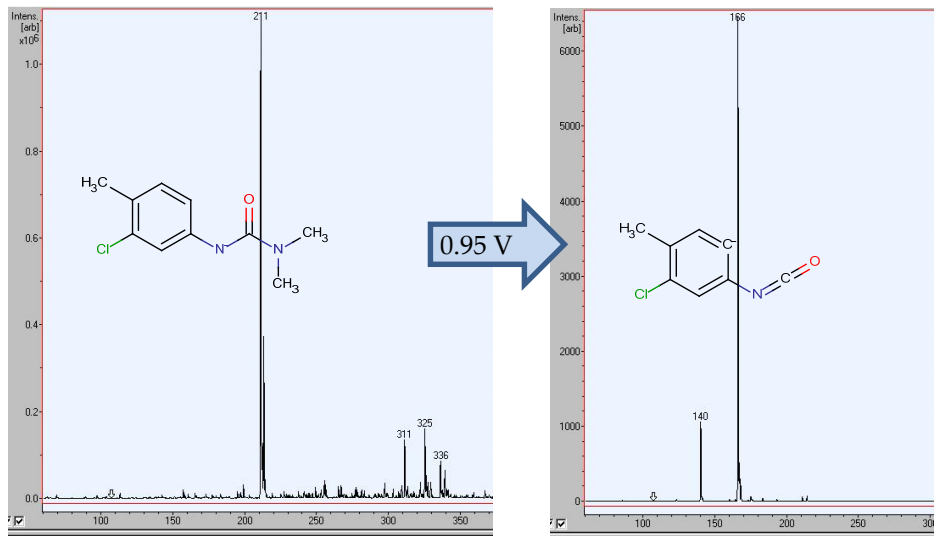
2,4,5-T (253 → 195)



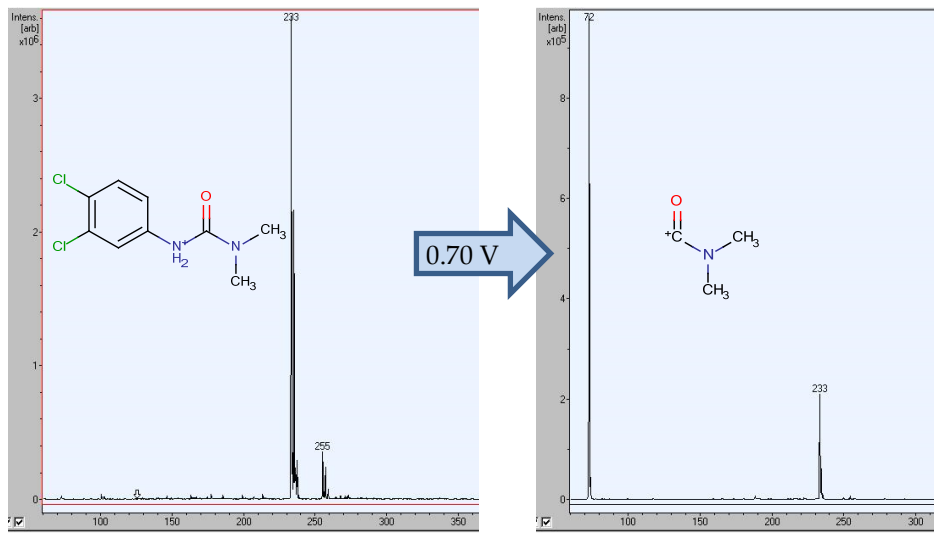
2,4,5-TP (267 → 195)



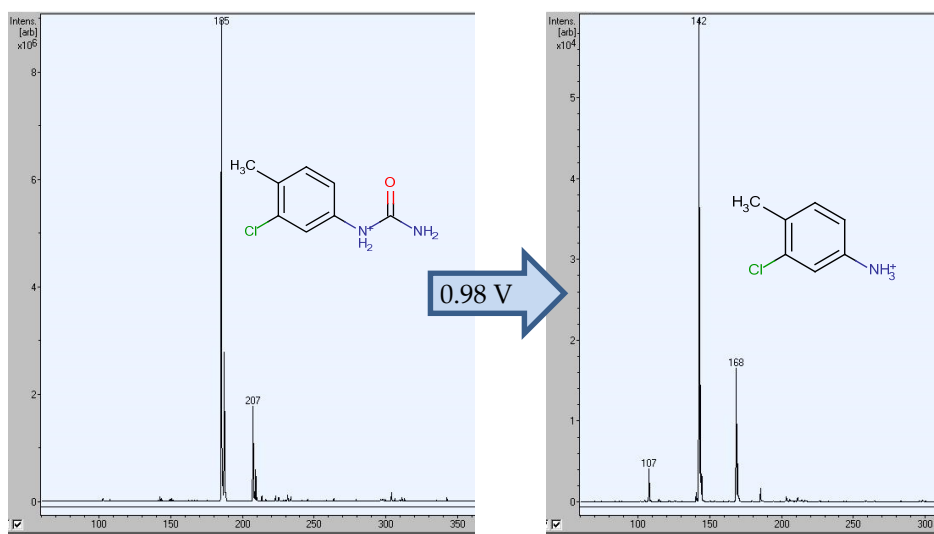
CLORTOLURÓN (211 → 166)



DIURÓN (233 → 72)



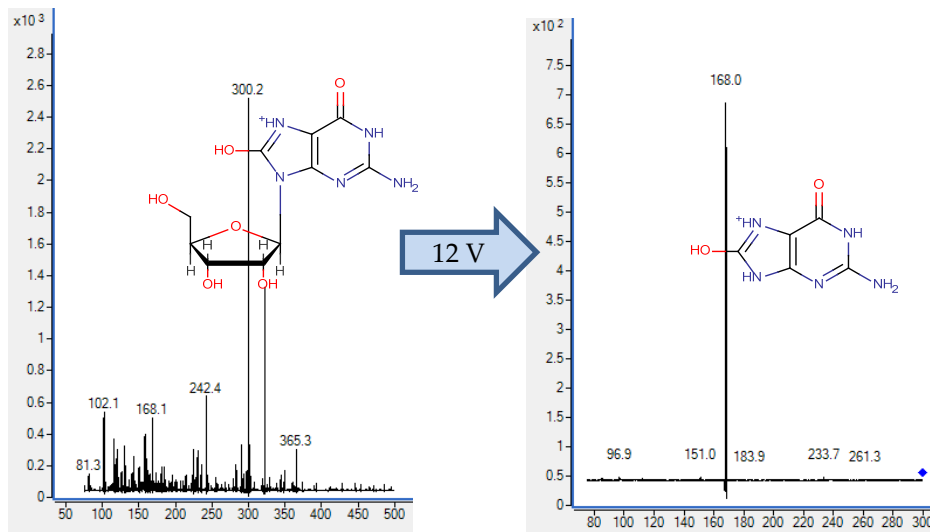
CMPU (185 → 142)



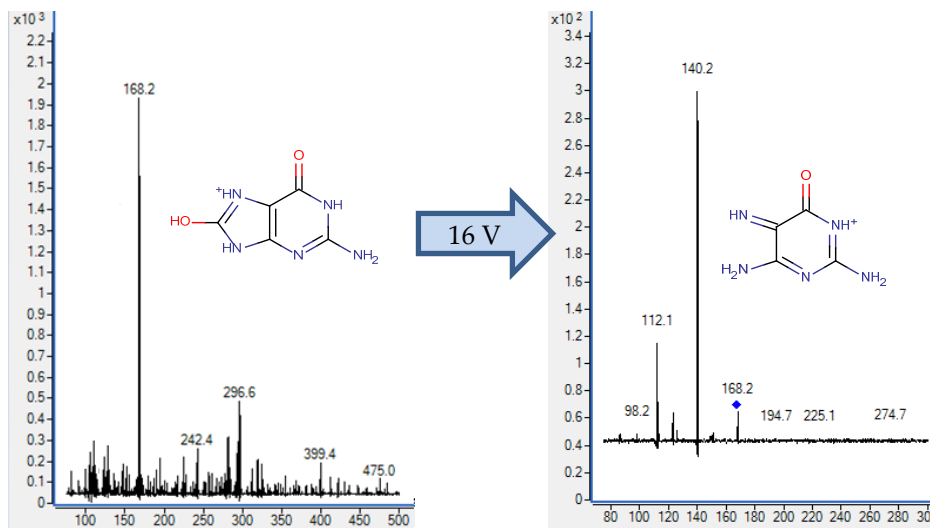
D. NUCLEÓSIDOS Y NUCLEOBASES

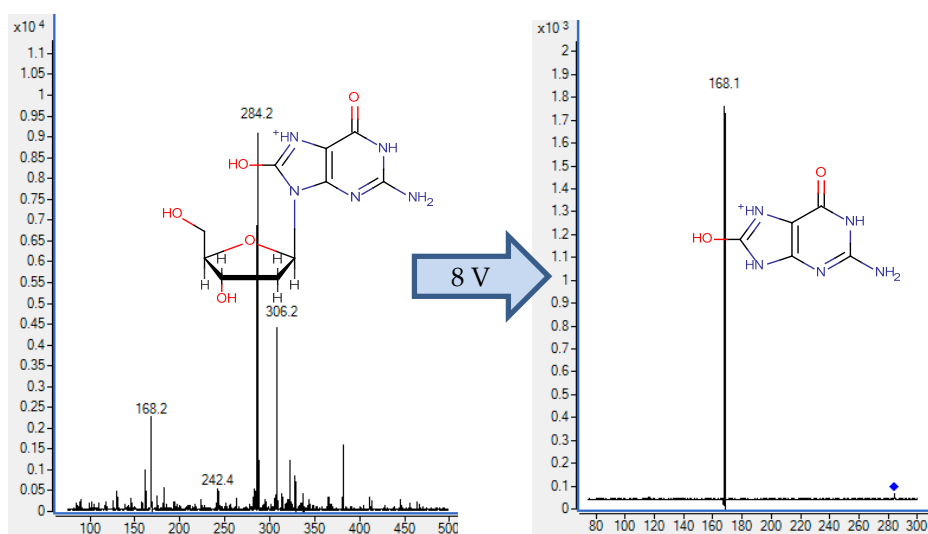
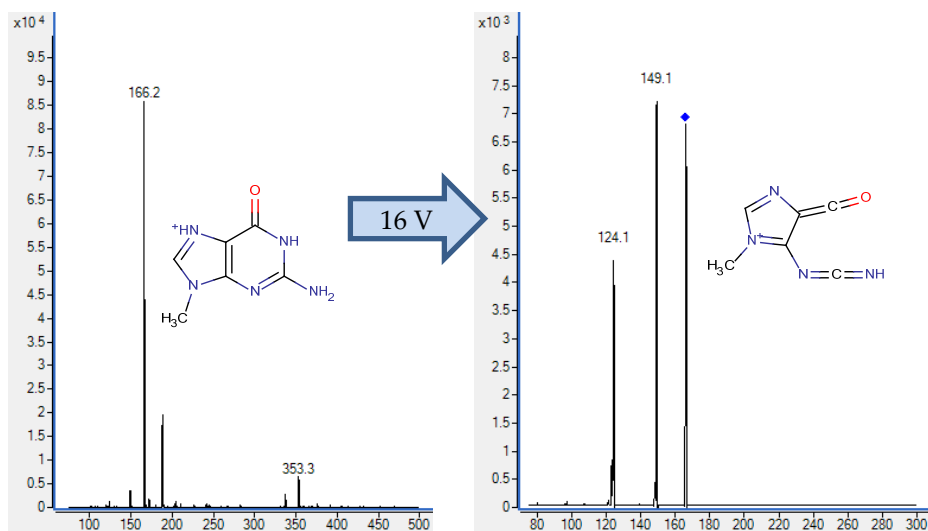


8-HIDROXI-GUANOSINA (300 → 168)

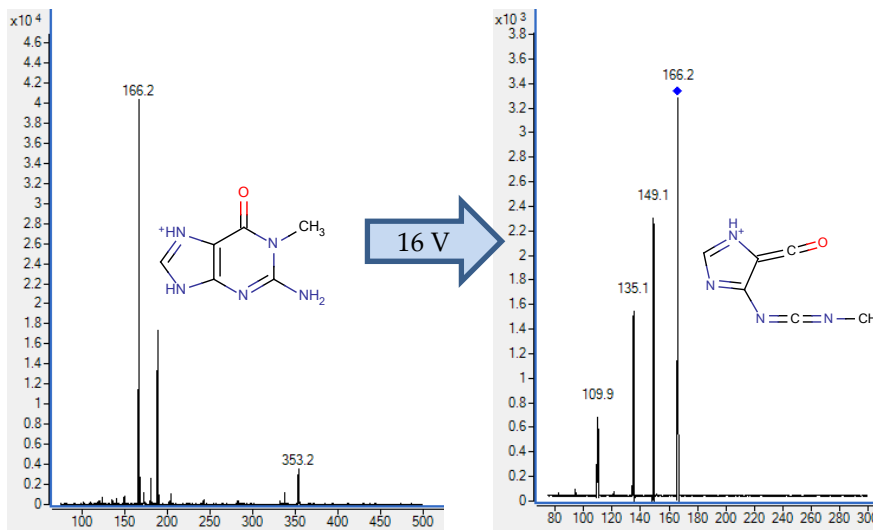


8-HIDROXI-GUANINA (168 → 140)

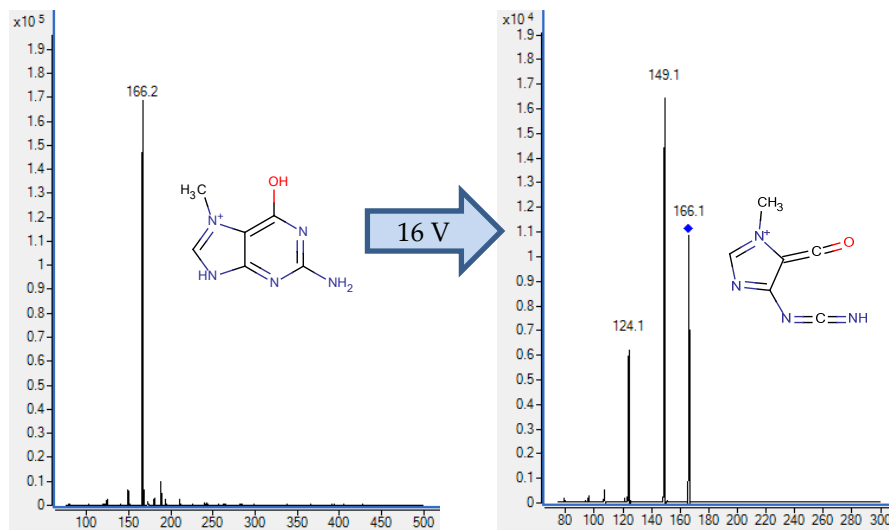


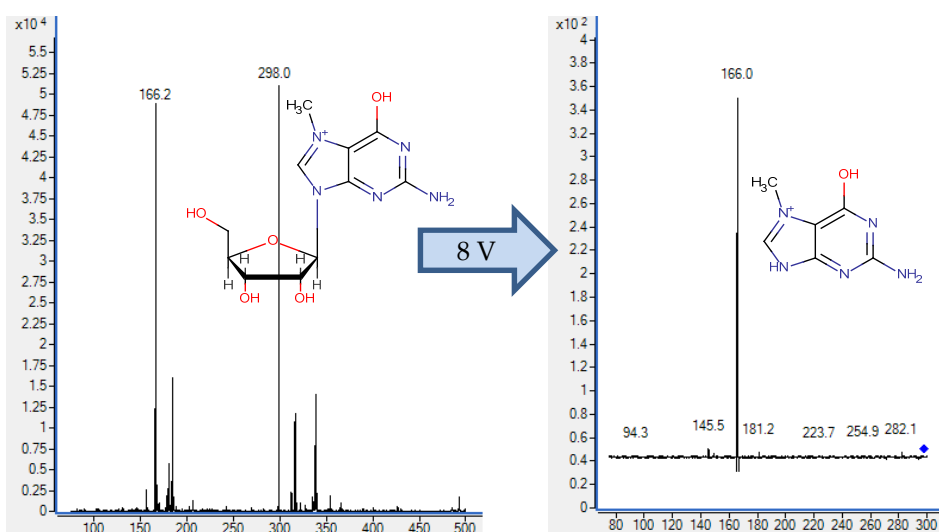
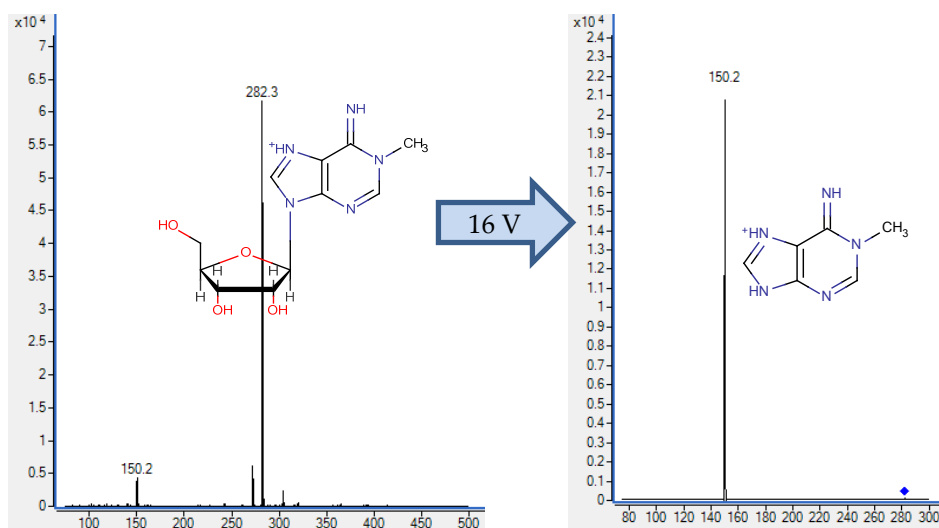
8-HIDROXI-2'-DEOXI-GUANOSINA (284 → 168)**9-METIL-GUANINA (166 → 149)**

1-METIL-GUANINA (166 → 149)

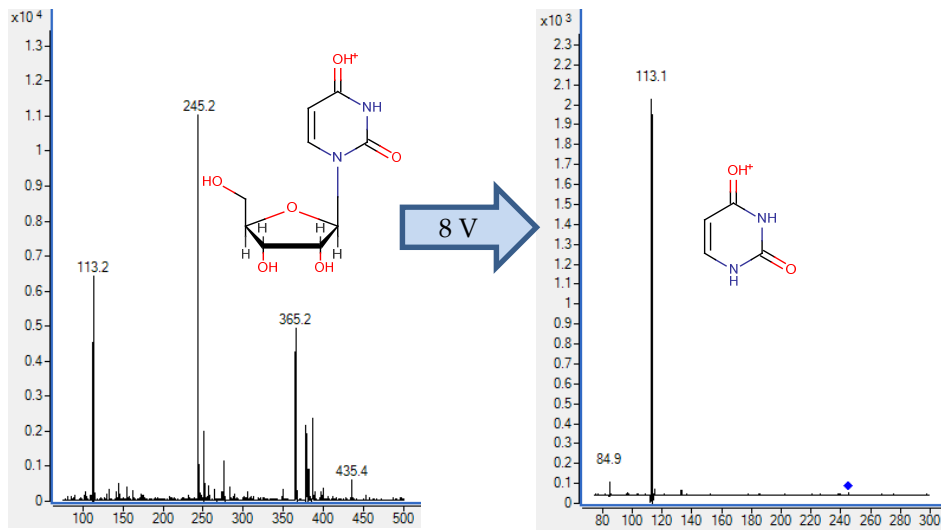


7-METIL-GUANINA (166 → 149)

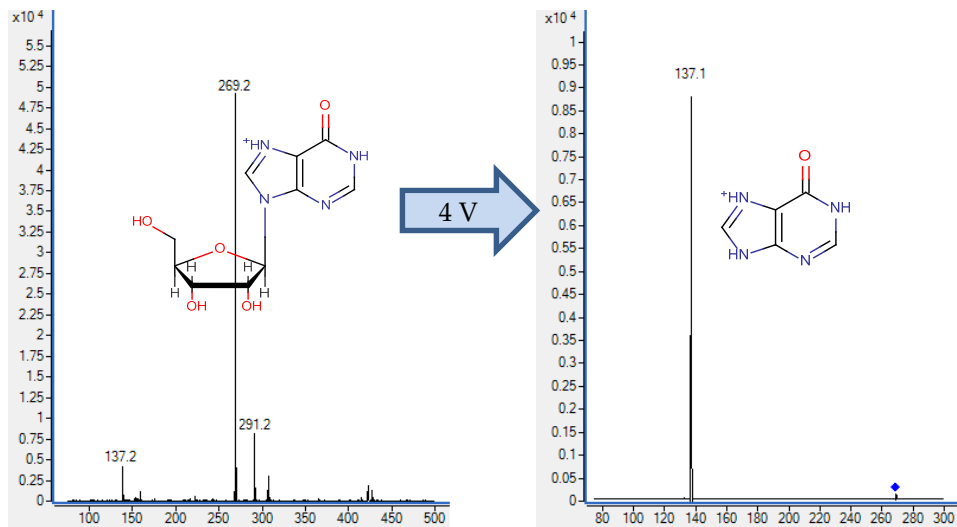


7-METIL-GUANOSINA (298 → 166)**1-METIL-ADENOSINA (282 → 150)**

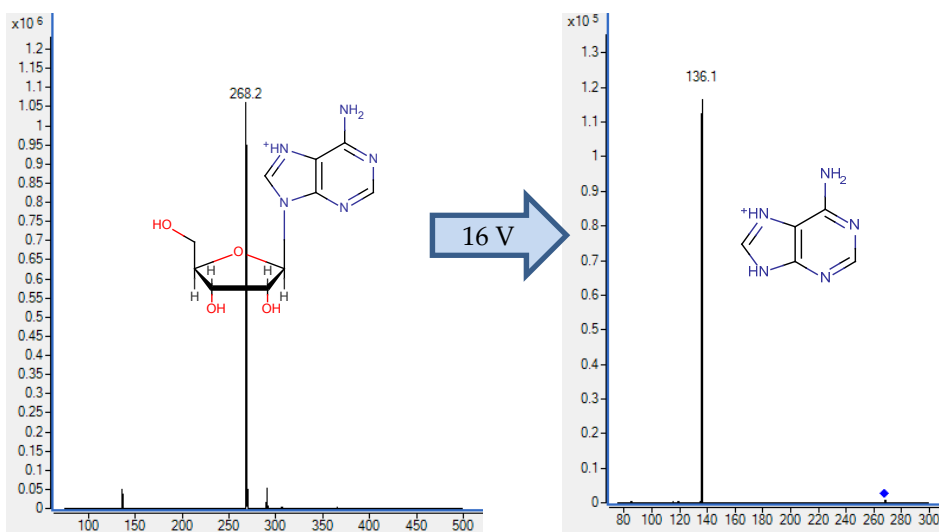
URIDINA (245 → 113)



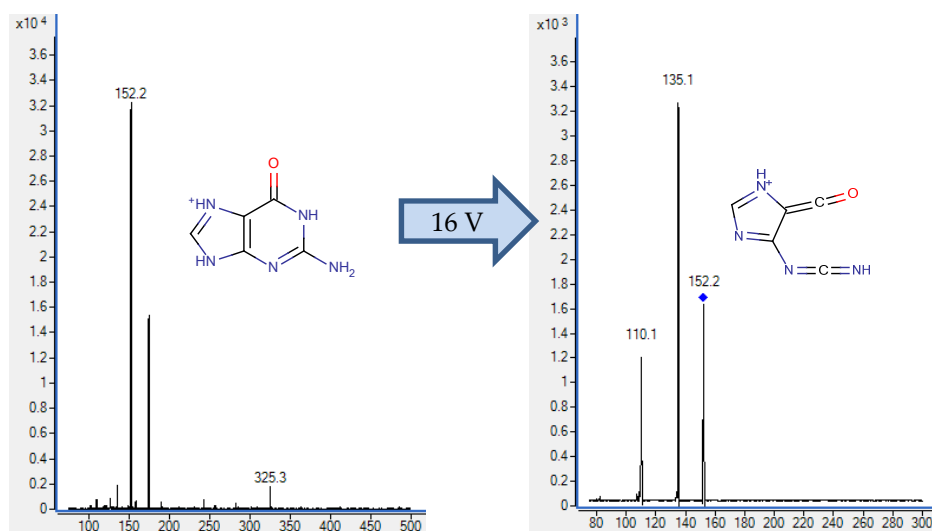
INOSINA (269 → 137)



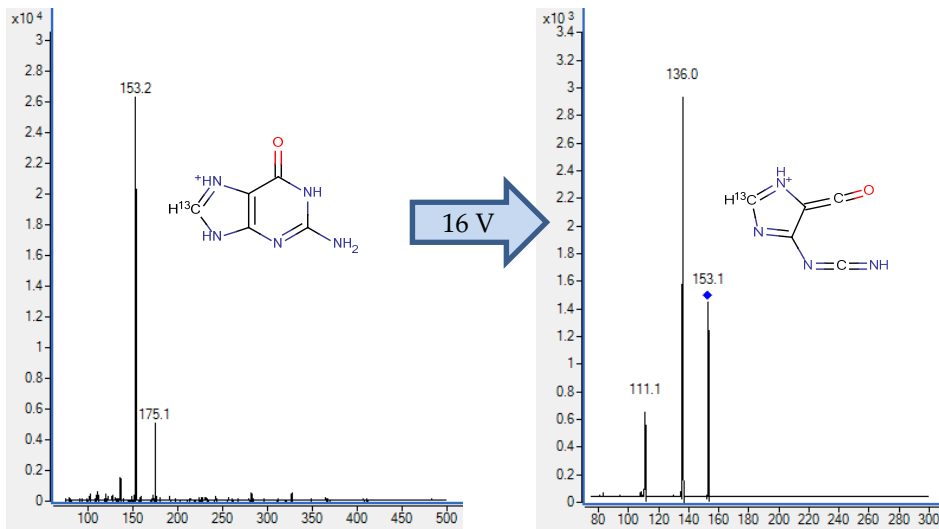
ADENOSINA (268 → 136)



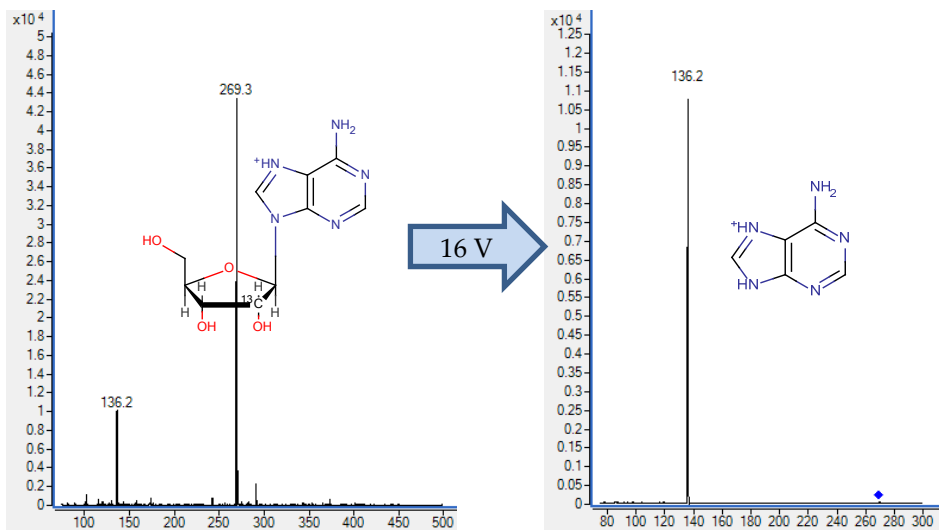
GUANINA (152 → 135)



¹³C-GUANINA (153 → 136)



¹³C-ADENOSINA (269 → 136)



**APÉNDICE: MENCIÓN
“DOCTORADO EUROPEO”**

II

Con la elaboración y defensa de esta memoria de tesis se pretende optar a la obtención de la mención “Doctorado Europeo”, al considerar que el doctorando reúne los requisitos para optar a tal mención:

- El doctorando ha realizado una estancia de quince semanas en el King’s College London (Reino Unido) relacionada con la presente tesis.
- Esta memoria incluye un resumen en inglés, incluyendo objetivo y conclusiones.
- La tesis cuenta con los informes favorables de dos doctores expertos pertenecientes a instituciones de educación superior de la Unión Europea.
- Uno de los miembros que ha de formar parte del tribunal evaluador de la tesis es un experto perteneciente a una institución de educación superior de la Unión Europea.

Se incluyen, en este apéndice, los pertinentes informes favorables así como la certificación de la estancia breve.

**PROGRAMA NACIONAL DE FORMACIÓN DE
PROFESORADO UNIVERSITARIO**

DOCUMENTOS DE LA ESTANCIA BREVE

1. Becario/ Applicant:
Nombre y apellidos/ Name: Diego García Gómez
D.N.I./ National identity Card: 70878710R
Centro de aplicación de la beca/ Home Institution: Universidad de Salamanca
2. Centro en el que se realiza la estancia/ Host institution:
Nombre/ Name: King's College London
Dirección/ Adress: Franklin-Wilkins Building 150 Stamford Street
Localidad/ Country: Londres (Reino Unido) / London (UK)
3. Investigador responsable en el centro / Person in charge of the Host institution:
Institución/ Institution: Institute of Pharmaceutical Science
Nombre/ Name: Professor Peter Hylands
Cargo/ Post: Head of Institute of Pharmaceutical Science
CERTIFICO: que el becario arriba mencionado ha realizado una estancia en este centro, relacionada con su Tesis, durante las siguientes fechas: desde 07/ enero / 2012 / hasta 14/ abril / 2012
THIS IS TO CERTIFY: that this Institution accepted the above mentioned applicant, during his temporary stay related with his Thesis, in the following dates: from: 07/ January / 2012 To 14/ April / 2012
Lugar y fecha/ City and date: London
Firma y Sello/ Signature & Stamp





CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE
ISTITUTO DI METODOLOGIE CHIMICHE

AREA DELLA RICERCA DI ROMA
Via Salaria, Km 29,300 – 00015 Monterotondo (RM)
TEL. 06-90625111 – 06-90672641 FAX 06-90672519
E-Mail imc@imc.cnr.it

Rome, May 15, 2013

To Whom It may Concern

Report for the PhD thesis entitled:

"TANDEM MASS SPECTROMETRY COUPLED TO LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH ON-LINE PRETREATMENT: DETERMINATION OF XENOBIOTICS IN FOODSTUFF AND BIOMARKERS IN BIOLOGICAL SAMPLES"

presented by DIEGO GARCÍA GÓMEZ, UNIVERSITY OF SALAMANCA - SCHOOL OF CHEMICAL SCIENCES

This PhD thesis presents very interesting and valuable results regarding the development of modern analytical methods to be applied to the analysis of toxic residues present in food samples. Analytical techniques such as high-performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE), both coupled with mass spectrometry (MS) were investigated. In addition to this study, the candidate also carried out research dealing with sample preparation in order to concentrate and purify analytes. Investigations about the chromatographic mechanisms involved in the separation process were also addressed considering polar compounds.

Moreover, the obtained results are successful and productive with 8 scientific articles included in this thesis, all of them published in international and highly-repute journals place at the first quartile of their respective areas such as Journal of Chromatography A, Electrophoresis or Analytical Bioanalytical Chemistry. In addition a review paper was reported in Trends Analytical Chemistry. Considering the high scientific reputation of the mentioned Journals, it can be remarked that the work done is of very high quality.

Therefore, based on the considered data, I can confirm that the quality of the work presented is excellent, it fulfills all the requirements for a PhD thesis contributing definitely to the field of analytical chemistry and the proposed methodologies can be advantageously applied to solve important topics in the environmental and food research areas. It is my opinion that the presentation of this thesis work for getting the PhD degree is highly recommended.

Yours sincerely,
Salvatore Fanali



Dr. Salvatore Fanali, PhD
Institute of Chemical Methodologies
Consiglio Nazionale delle Ricerche
Via Salaria Km 29,300
00015 Monterotondo (Rome), Italy
tel. +39 0690672256,
e-mail: salvatore.fanali@cnr.it



REPORT ON THESIS SUMMARY OF DIEGO GARCÍA GÓMEZ

Thesis summary entitled "Tandem mass spectrometry coupled to liquid chromatography with on-line pretreatment: determination of xenobiotics in foodstuff and biomarkers in biological samples" is written on 128 pages and organized within three main chapters, plus Aim and Conclusions.

Objectives of this work were very well defined bearing in mind extreme importance of analysis of xenobiotics and especially biomarkers of their exposure. Both classes of compounds, endocrine disruptors and antihelminthic benzimidazoles are real threat for human beings since, when present in higher concentrations than allowed, they could cause serious health disorders. Honey and milk and biological samples, on the other hand, are excellent samples for analysis of xenobiotics because they are still challenging for analytical chemists because of the complexity of their matrices and a lot of unsolved problems in sample preparation and analysis as well. In that course, establishing of new methodologies for their analysis is a significant contribution to both analytical chemistry and public health care, related to food safety and environmental health.

New strategies for simple pretreatment with analytical methods based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry, capillary electrophoresis-mass spectrometry in on-line configurations will certainly make those analysis in foodstuff and biological samples less tedious and time-consuming enabling high efficiency of whole process of separation, identification and quantification.

Additional value of this work is presented by its contribution to explanation of new chromatographic mechanisms that will extend applicability to analysis of high-polarity compounds, making possible determination a lot of endogenous compounds. Also, exogenous compounds of low and intermediate polarity, used as biomarkers of exposure to xenobiotics, could be also analyzed. There are extended possibilities for trace analysis of biomarkers (in urine samples) of exposure to exogenous compounds by reversed-phase chromatography endogenous markers by hydrophilic interaction liquid chromatography with zwitterionic stationary phases.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ
СРБИЈА



UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY
SERBIA

The determination of potential of these biomarkers in the diagnosis or, at least, monitoring of the progress of different types of carcinoma is certainly promising issue and in that sense, clinical studies are of special importance.

By stressing eight publications in high ranking journals my conclusion to this report is going into favor to the confirmation of an exceptional contribution to analytical sciences.

Slavić

Prof. Dr. Slavica Ražić

In Belgrade, May 23, 2013.

11221 БЕОГРАД
ВОЈВОДЕ СТЕПЕ 450
П. Ф. 146
СРБИЈА

phone: +381 11 3951380 fax: +381 11 3972840
DEKAN/DEAN: (+381 11) 24-73-224
e-mail: info@pharmacy.bg.ac.rs
web site: www.pharmacy.bg.ac.rs

11221 BELGRADE
VOJVODE STEPE 450
P.O. Box 146
SERBIA

Matičini broj fakulteta: 7001975

PIB: 101746950

Žiro-račun: 840-1127666-05