



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA,  
NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA**

**NUEVAS APLICACIONES DE LA  
ELECTROFORESIS CAPILAR ACOPLADA A  
ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA  
EVALUACIÓN DE METABOLITOS ENDÓGENOS  
DE INTERÉS CLÍNICO EN ORINA**

---

**NEW APPLICATIONS OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS  
COUPLED WITH MASS SPECTROMETRY FOR THE  
EVALUATION OF ENDOGENOUS METABOLITES  
OF CLINICAL INTEREST IN URINE**

**Raquel Hernández Prieto**

**2015**





**UNIVERSIDAD  
DE SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología**

**NUEVAS APLICACIONES DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR**

**ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA**

**EVALUACIÓN DE METABOLITOS ENDÓGENOS**

**DE INTERÉS CLÍNICO EN ORINA**

**NEW APPLICATIONS OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS COUPLED WITH**

**MASS SPECTROMETRY FOR THE EVALUATION OF ENDOGENOUS**

**METABOLITES OF CLINICAL INTEREST IN URINE**

**RAQUEL HERNÁNDEZ PRIETO**

**2015**



Memoria que para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca presenta la licenciada Raquel Hernández Prieto.

Salamanca, 12 de Noviembre de 2015

A handwritten signature in blue ink, reading "Raquel H. Prieto". The signature is written in a cursive style with a horizontal line underneath.

Fdo: Raquel Hernández Prieto



D.<sup>a</sup> Encarnación Rodríguez Gonzalo y D.<sup>a</sup> Rita Carabias Martínez ambas Catedráticas de Química Analítica de la Universidad de Salamanca y directoras del trabajo “NUEVAS APLICACIONES DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA EVALUACIÓN DE METABOLITOS ENDÓGENOS DE INTERÉS CLÍNICO EN ORINA”, realizado por la licenciada Raquel Hernández Prieto 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, 12 de Noviembre de 2015

Fdo: Encarnación Rodríguez Gonzalo

Fdo: Rita Carabias Martínez



Deseo expresar mi agradecimiento al Ministerio de Educación por la concesión de una ayuda Predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI, BES-2009-019923).

Este trabajo, realizado en el Dpto. de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Salamanca, ha sido financiado por los proyectos CTQ 2008-02200 y CTQ 2011-24075 del Ministerio de Ciencia e Innovación.



Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a las Catedráticas Dña. Encarnación Rodríguez Gonzalo y Dña. Rita Carabias Martínez por la confianza puesta en mí para la realización de esta Tesis Doctoral y sobre todo por el apoyo a nivel personal. De forma más particular querría darle las gracias a Encarna. Durante seis años ha sido directora de este trabajo, pero ha sido en la última etapa cuando he sentido mucho más su apoyo, su comprensión y su dedicación. Me siento muy afortunada de haberla tenido como directora. Muchas gracias, Encarna, por hacer posible esta Tesis.

A continuación querría dar las gracias al resto de los miembros que componen el departamento de Química Analítica. De cada uno de ellos me llevo un grato recuerdo, siempre han hecho sentirme muy querida. Muchas gracias por vuestra ayuda, preocupación, ánimos y apoyos recibidos durante estos años. En particular querría darle las gracias a Bernardo. Gracias por todo: por tu preocupación, por tu cercanía y sobre todo por tus consejos. Muchas gracias de todo corazón.

También quisiera agradecer a todas y cada una de las personas con las que he compartido estos seis años de mi vida. Me considero muy afortunada por haber estado en un Departamento por el que ha pasado tanta gente y con la que ha sido un placer compartir horas de trabajo, cafés y celebraciones. Muchas gracias por toda la ayuda recibida y los buenos momentos pasados juntos. Gracias.

En particular querría expresar mi más sincero agradecimiento a todos mis compañeros del grupo de investigación: Diego, Lara, Marta, María, Crisfer, Mayte y Leti. Muchas gracias a todos por vuestra ayuda y vuestro apoyo en los momentos duros de la investigación. Siempre estabais cerca para animarme y hacerme sonreír. Muchas gracias por todo lo que he aprendido de vosotros tanto a nivel profesional como a nivel personal. Muchas gracias de todo corazón.

También quisiera mostrar mi agradecimiento a los demás integrantes del grupo de investigación: Milagros, Javi y Myriam. Muchas gracias por vuestra ayuda desinteresada, vuestra preocupación y por vuestro apoyo. Me habéis ayudado mucho. Muchas gracias.

Quisiera dar las gracias a las cuarenta y ocho personas que de forma desinteresada han donado las muestras que han permitido el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Sin vuestra ayuda no hubiese sido posible este trabajo.

Por último, a nivel académico, querría agradecer a Cristina todo lo aprendido bajo su dirección y lo compartido a nivel personal. Nunca olvidaré aquellos cafés en su despacho y la Carrot Cake. Muchas gracias por todo Cristina. Y gracias al Brownie Club. Fue genial conoceros, compartir tres meses con vosotras y formar parte de ese selecto club.

Gracias a mi familia. Por vosotros soy lo que soy y sé que voy a poder superar cualquier dificultad porque siempre contaré con vuestro apoyo, consejo y amor. Sois lo más importante de mi vida. Nunca dejará de sorprenderme lo fuertes que hemos sido y lo unidos que hemos estado. Os quiero mucho.

Mani, ya lo sabes, eres mi Mani y eso es mucho, lo es todo. Papis adoptivos: gracias por vuestra ayuda. Siempre que lo he necesitado estabais ahí para escucharme y darme un fuerte achuchón. Sé que a veces no me he portado como una buena hija adoptiva pero espero que no penséis en desheredarme por ello.

Gracias a Héctor, mí chico. Nunca me hubiese imaginado que la vuelta a casa significase reencontrarme contigo. Gracias por tu paciencia, tus ánimos y por todo lo que me has dado y, sobre todo, por estar a mi lado.

Las siguientes personas a las que quisiera mostrar mis agradecimientos son Juan, Suri y Blue eyes. Habéis sido un gran apoyo a nivel personal y todo lo que diga de vosotros es poco. Me habéis demostrado que estaréis a mi lado por mucha que sea la distancia que nos separe y eso muestra lo buenísimas personas que sois. Me siento muy afortunada por teneros como amigos.

Quisiera también darle las gracias a mis amigos Ana, Pablis y Jorge. Gracias, Ana, por “obligarme” a echar los papeles de la beca; Pablis, por ser como eres; y gracias, Jorge, por entrar en mi vida, mejor tarde que nunca. Y gracias a los tres por ser los mejores amigos, compañeros de viaje, de gym, de despedida y de lo que haga falta. Muchas gracias chicos.

A mi madre



## ACRÓNIMOS

---



---

<b>BGE</b>	<i>BackGround Electrolyte</i> Medio de Separación Electroforético
<b>CE</b>	<i>Capillary Electrophoresis</i> Electroforesis Capilar
<b>CEC</b>	<i>Capillary ElectroChromatography</i> ElectroCromatografía Capilar
<b>CZE</b>	<i>Capillary Zone Electrophoresis</i> Electroforesis Capilar Zonal
<b>DAD</b>	<i>Diode-Array Detector</i> Detector de Barrera de Diodos
<b>ESI</b>	<i>ElectroSpray Ionization</i> Ionización por ElectroSpray
<b>HMDB</b>	<i>Human Metabolome DataBase</i> Base de Datos del Metaboloma Humano
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> Cromatografía Líquida de Alta Resolución
<b>ICH</b>	<i>International Conference on Harmonisation</i> Conferencia Internacional de Coordinación o Armonización
<b>ILIS</b>	<i>Isotope Labeled Internal Standard</i> Patrón Interno Marcado Isotópicamente
<b>LC</b>	<i>Liquid Chromatography</i> Cromatografía Líquida
<b>LCxLC</b>	<i>Comprehensive Bidimensional Liquid Chromatography</i> Cromatografía Bidimensional Exhaustiva
<b>LOD o LD</b>	<i>Limit of Detection</i> Límite de Detección
<b>MEKC</b>	<i>Micellar ElectroKinetic Chromatography</i> Cromatografía ElectroCinética Micelar
<b>MRM o SRM</b>	<i>Multiple Reaction Monitoring or Selected Reaction Monitoring</i> Seguimiento de Reacción Múltiple

## ACRÓNIMOS

---

<b><i>MS</i></b>	<i>Mass Spectrometry</i> Espectrometría de Masas
<b><i>MS/MS</i></b>	<i>Tandem Mass Spectrometry</i> Espectrometría de Masas en Tándem
<b><i>PCA</i></b>	<i>Principal Component Analyses</i> Análisis de Componentes Principales
<b><i>PLS</i></b>	<i>Partial Least Squares Analyses</i> Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales
<b><i>PNP</i></b>	<i>Programed Nebulizing-gas Pressure</i> Presión Programada del Gas de Nebulización
<b><i>OPLS-DA</i></b>	<i>Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analyses</i> Análisis Discriminante Ortogonal mediante Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales
<b><i>Q</i></b>	<i>Quadrupole</i> Cuadrupolo
<b><i>QC</i></b>	<i>Quality Control samples</i> Muestras para Control de Calidad
<b><i>QQQ</i></b>	<i>Triple Quadrupole</i> Triple Cuadrupolo
<b><i>RAM</i></b>	<i>Restricted Access Material</i> Material de Acceso Restringido
<b><i>RPLC</i></b>	<i>Reversed Phase Liquid Chromatography</i> Cromatografía Líquida de Fase Inversa
<b><i>RSD o SD</i></b>	<i>Relative Standard Deviation</i> Desviación Estándar Relativa
<b><i>SIM</i></b>	<i>Selected Ion Monitoring</i> Seguimiento de Ion Seleccionado
<b><i>SPE</i></b>	<i>Solid Phase Extraction</i> Extracción en Fase Sólida
<b><i>TIC</i></b>	<i>Total Ion Chromatogram</i> Cromatograma de Ion Total

<b><i>TIE</i></b>	<i>Total Ion Electropherogram</i> Electroferograma de Ion Total
<b><i>TOF</i></b>	<i>Time Of Flight</i> Analizador de Tiempo de Vuelo
<b><i>UHQ</i></b>	<i>Ultra High Quality Water</i> Agua Ultrapura
<b><i>UPLC</i></b>	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> Cromatografía Líquida de Ultra Resolución
<b><i>UV</i></b> <b><i>(metabólica)</i></b>	<i>UniVariate (scale)</i> UniVariante (Escalado)
<b><i>UV-VIS</i></b>	<i>Ultraviolet-visible (spectrophotometry)</i> Ultravioleta-visible (espectrofotometría)
<b><i>ZIC-HILIC</i></b>	<i>Zwitterionic Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i> Cromatografía Líquida Zwitterionica de Interacciones Hidrofílicas



# ÍNDICE

---



<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS DE INTERÉS EN MATRICES BIOLÓGICAS.....	4
1.2. NUCLEÓSIDOS Y NUCLEOBASES MODIFICADOS COMO MARCADORES BIOLÓGICOS.....	11
1.2.1. Marcadores oncológicos.....	12
1.2.2. Marcadores de daño oxidativo.....	14
1.2.3. Nucleósidos y nucleobases estudiados.....	19
1.2.4. Propiedades ácido–base de los nucleósidos y nucleobases.....	21
1.3. ELECTROFORESIS CAPILAR COMO TÉCNICA DE SEPARACIÓN.....	27
1.4. TRATAMIENTO DE MUESTRA PREVIO A ELECTROFORESIS CAPILAR.....	33
1.4.1. Extracción en fase sólida (SPE).....	34
1.4.2. Materiales de acceso restringido (RAM).....	37
1.5. ACOPLAMIENTO DE ELECTROFORESIS CAPILAR CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON IONIZACIÓN POR ELECTROSPRAY...	43
1.6. ELECTROFORESIS CAPILAR EN EL ANÁLISIS DE NUCLEÓSIDOS Y NUCLEOBASES MODIFICADOS. ANTECEDENTES.....	51
1.7. ANÁLISIS METABOLÓMICO.....	57
1.7.1. La metabolómica.....	58
1.7.2. El experimento metabolómico.....	62
<b>II. OBJETO DEL TRABAJO.....</b>	<b>79</b>
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>83</b>
3.1. ANALITOS Y REACTIVOS.....	85
3.1.1. Patrones.....	85
3.1.2. Disolventes y reactivos.....	86
3.2. DISOLUCIONES ESTÁNDAR.....	87

3.3. MATERIAL E INSTRUMENTACIÓN.....	89
3.3.1. Extracción en fase sólida (SPE).....	89
3.3.2. Material de acceso restringido (RAM).....	90
3.3.3. Equipo de espectrofotometría ultravioleta–visible.....	90
3.3.4. Equipo de concentración de muestras.....	90
3.3.5. Configuración de los equipos empleados.....	91
3.4. MUESTRAS ANALIZADAS.....	95
3.4.1. Determinación de creatinina en orina.....	96
3.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	100
3.5.1. Separación electroforética.....	100
3.5.2. Separación electroforética con detección por Espectrometría de Masas (CE–MS). ..	103
3.5.3. Extracción en fase sólida (SPE).....	104
3.5.4. Material de acceso restringido (RAM).....	107
<b>IV. DETERMINACIÓN DE NUCLEÓSIDOS MEDIANTE CE–ESI–MS EN MODO POSITIVO.....</b>	<b>109</b>
4.1. COMPORTAMIENTO ELECTROFORÉTICO DE NUCLEÓSIDOS Y NUCLEOBASES MODIFICADOS.....	111
4.2. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA.....	115
4.2.1. Influencia del voltaje aplicado en la separación.....	115
4.2.2. Optimización del medio electroforético de separación.....	117
4.2.3. Estudio de la modalidad de inyección.....	120
4.3. ACOPLAMIENTO ELECTROFORESIS CAPILAR–ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	125
4.3.1. Optimización de los parámetros que afectan al electrospray.....	126
4.4. APLICACIÓN DEL MÉTODO DESARROLLADO: MUESTRAS DE ORINA.....	130
4.4.1. Cuantificación mediante adición estándar.....	133

4.4.2. Validación mediante LC-MS/MS.....	140
4.4.3. Calibración externa: Patrones acuosos y matriz sintética.....	143
4.4.4. Calibrado en matriz sintética: Predicción.....	146
4.5. DESARROLLO DE UNA ETAPA DE PRECONCENTRACIÓN MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.....	147
4.5.1. Elección del sorbente y del medio de elución.....	148
4.5.2. Influencia del volumen de muestra preconcentrado.....	151
4.5.3. Adición del patrón interno durante la etapa de extracción en fase sólida.....	156
4.5.4. Aplicación del método a una muestra de orina.....	164
4.6. CONCLUSIONES.....	166
<b>V. DETERMINACION DE NUCLEÓSIDOS MEDIANTE CE-ESI-MS EN MODO NEGATIVO.....</b>	<b>171</b>
5.1. ELECCIÓN DE LOS ANALITOS Y LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN Y DETECCIÓN MEDIANTE CE-ESI(-)MS.....	173
5.1.1. Separación electroforética.....	175
5.1.2. Acoplamiento Electroforesis Capilar-Espectrometría de Masas.....	177
5.2. ELECCIÓN DEL CAPILAR EMPLEADO EN LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA EN FUNCIÓN DE SU DIÁMETRO INTERNO.....	179
5.2.1. Capilar con diámetro interno de 75 $\mu\text{m}$ .....	179
5.2.2. Capilar con diámetro interno de 100 $\mu\text{m}$ .....	186
5.2.3. Capilar con diámetro interno de 50 $\mu\text{m}$ .....	193
5.2.4. Resumen de los estudios realizados en capilares de distinto diámetro interno....	201
5.3. APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE ORINA.....	203
5.4. ETAPAS DE TRATAMIENTO DE MUESTRA PREVIAS AL ANÁLISIS.....	206
5.4.1. Desarrollo de una etapa mediante extracción en fase sólida (SPE).....	206
5.4.2. Desarrollo de una etapa mediante material de acceso restringido (RAM).....	232

5.5. APLICACIÓN DEL MÉTODO <i>RAM/CE-MS</i> AL ESTUDIO DE METABOLITOS ASOCIADOS AL CONSUMO DE TABACO EN MUESTRAS DE ORINA.....	256
5.6. CONCLUSIONES.....	270
<b>VI. ANÁLISIS METABOLÓMICO.....</b>	<b>275</b>
6.1. OBJETO DEL ESTUDIO.....	277
6.2. ESTUDIOS PREVIOS. OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA LC-TOF.....	279
6.2.1. <i>Optimización de la separación cromatográfica</i> .....	279
6.2.2. <i>Detección mediante un analizador de Tiempo de Vuelo (TOF)</i> .....	283
6.3. APLICACIÓN AL ESTUDIO DE METABOLITOS ASOCIADOS AL CONSUMO DE TABACO.....	285
6.4. CONCLUSIONES.....	306
<b>VII. CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>309</b>
<b>VIII. ARTÍCULOS PUBLICADOS.....</b>	<b>315</b>
<b>IX. <i>SUMMARY IN ENGLISH</i>.....</b>	<b>347</b>
<b>APÉNDICE I: ESPECTROS DE <i>MS/MS</i>.....</b>	<b>373</b>
<b>APÉNDICE II: MENCIÓN “DOCTORADO INTERNACIONAL” .....</b>	<b>379</b>

I

# INTRODUCCIÓN

---



La detección y cuantificación de ciertos metabolitos endógenos presentes en una muestra biológica como orina, sangre o saliva, ha adquirido un gran interés en los últimos años por su potencial utilidad como método no invasivo de diagnóstico y/o seguimiento de determinadas patologías (procesos tumorales, enfermedades degenerativas...) y de forma general, como contribución al conocimiento de la respuesta metabólica de los organismos vivos a estímulos fisiopatológicos.

Existe una creciente preocupación por los efectos que, sobre la salud humana, puede tener la exposición ambiental a compuestos tóxicos debido a la contaminación de agua, aire, suelo y alimentos. El desarrollo industrial y la agricultura intensiva son responsables de la síntesis, utilización y liberación al medio ambiente de alrededor de 120.000 compuestos químicos diferentes. Para muchas de estas sustancias se tiene evidencia de la peligrosidad para organismos superiores.

De ello deriva la necesidad de disponer de métodos analíticos que permitan la determinación en matrices biológicas, de la presencia y concentración de compuestos tóxicos y/o metabolitos endógenos relacionados con sus efectos bioquímicos o fisiológicos en seres vivos. Este proceso, que se conoce como seguimiento biológico<sup>1,2,3,4</sup> (*biological monitoring* o *biomonitoring*), es un campo de especial relevancia por su implicación directa en la salud humana. El seguimiento biológico está experimentando actualmente un gran desarrollo, tanto en los aspectos relacionados con el estudio y validación de biomarcadores adecuados, como en la puesta a punto de metodologías analíticas rápidas y eficaces que permitan una identificación y cuantificación fiable. Las innovaciones en ambos aspectos inciden positiva y directamente en el desarrollo de estrategias de diagnóstico precoz, así como de control y prevención de riesgos en la salud humana.

Este trabajo se centra en el desarrollo de un método analítico para la determinación de un grupo de metabolitos endógenos, nucleósidos, nucleobases y derivados metilados e hidroxilados, que presentan interés clínico por su potencial utilidad como marcadores biológicos de patologías acompañadas por fuertes desórdenes metabólicos como cáncer, SIDA y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. Existen también estudios que relacionan la concentración de

---

<sup>1</sup> J. Angerer, U. Ewers, M. Wilhelm, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 210 (2007) 201. "Human biomonitoring: State of the art".

<sup>2</sup> L. L. Needham, A. M. Calafat, D. B. Barr, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 210 (2007) 229. "Uses and issues of biomonitoring".

<sup>3</sup> D. Paustenbach, D. Galbraith, *Regul. Toxicol. Pharm.* 44 (2006) 249. "Biomonitoring: Is body burden relevant to public health?".

<sup>4</sup> D. B. Barr, L. L. Needham, *J. Chromatogr. B* 778 (2002) 5. "A multi-analyte method for the quantification of contemporary pesticides in human serum and plasma using high-resolution mass spectrometry".

nucleósidos modificados en orina con ciertos hábitos de vida como fumar, fatiga, estrés y con la exposición a compuestos tóxicos.

A diferencia de los métodos clásicos de diagnóstico, basados en la determinación de marcadores bioquímicos únicos (como los marcadores tumorales específicos), existe una creciente tendencia en utilizar los estudios de metabolómica (relacionados con el conjunto de metabolitos presentes en la matriz biológica) con fines diagnósticos, bien mediante la evaluación de un número elevado de metabolitos preseleccionados, o bien, mediante el análisis de perfiles metabólicos como un reflejo del estado de salud personal. Esta alternativa parece poder proporcionar una respuesta más fiable a la presencia o ausencia de una determinada enfermedad.

### 1.1. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS DE INTERÉS EN MATRICES BIOLÓGICAS.

Las primeras determinaciones de compuestos químicos en fluidos biológicos fueron llevadas a cabo por el área de medicina ocupacional para evaluar la salud de los trabajadores expuestos a ciertas sustancias químicas. La determinación de metabolitos del plomo (Kehoe y col., 1933) y del benceno (Yant y col., 1936) en sangre y orina son un buen ejemplo de los comienzos del seguimiento biológico de analitos de interés.

La primera definición del concepto de seguimiento biológico fue aportada por Zielhuis<sup>5</sup> en 1984 que lo definió como:

*“Una actividad sistemática de recogida de muestras biológicas para el análisis de la concentración de tóxicos, metabolitos o parámetros biológicos que permitan valorar la exposición y el riesgo para la salud de la población comparando los datos obtenidos con niveles de referencia y –si es necesario- tomar las oportunas medidas correctoras”.*

---

<sup>5</sup> R. L. Zielhuis, *Am. J. Ind. Med.* 8 (1985) 515. “*Biological monitoring: Confusion in terminology*”.

Otra forma de evaluar la exposición a sustancias químicas es lo que se denomina seguimiento ambiental que consiste en la determinación de las sustancias químicas en matrices medioambientales como aire, agua, suelos, alimentos, etc. El seguimiento ambiental es especialmente necesario a la hora de identificar las fuentes de exposición a los compuestos tóxicos 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, además de tener en cuenta todas las rutas—ingestión, inhalación, vía dérmica— y todas las posibles fuentes de exposición.

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

1. Disponibilidad de la matriz biológica adecuada.
2. Disponibilidad de parámetros capaces de reflejar la exposición interna o sus efectos bioquímicos o biológicos en el organismo: los llamados biomarcadores.
3. Disponibilidad de métodos analíticos apropiados, fiables y robustos.

### 1. Matrices biológicas.

Dentro de las posibles matrices biológicas, la orina se convierte en la matriz por excelencia a la hora de determinar metabolitos. Además, la orina presenta otras importantes ventajas: su adquisición es sencilla, 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 una de las matrices biológicas más utilizadas a la hora de realizar seguimientos biológicos.

## I. INTRODUCCIÓN

---

### 2. Biomarcadores.

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”.

En sentido estricto la palabra biomarcador hace referencia a la respuesta biológica del organismo frente a la agresión de un xenobiótico. Sin embargo, es indudable que la medida del xenobiótico o uno de sus metabolitos en una matriz biológica es un indicador biológico de exposición y por tanto, debe ser considerado bajo este concepto.

En sentido amplio, biomarcador se puede definir 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 muestra<sup>6</sup>. Silbergeld y Davis<sup>7</sup> 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 ser utilizados en campos como la evaluación de riesgos para la salud, el diagnóstico clínico o con fines de seguimiento de la eficacia de una terapia. Pueden utilizarse para evaluar una alteración fisiopatológica concreta y sus efectos en el organismo y permiten elucidar relaciones causa–efecto y dosis–efecto.

Un biomarcador ideal debería de cumplir los siguientes requisitos<sup>8</sup>:

- ⇒ 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.

---

<sup>6</sup> F. G. Hernández, *Rev. Toxicol.* 17 (2000) 19. “El papel de los biomarcadores en Toxicología humana”.

<sup>7</sup> E. K. Silbergeld, D. L. Davis, *Clin. Chem.* 40 (1994) 1363. “Role of biomarkers in identifying and understanding environmentally induced disease”.

<sup>8</sup> P. Granjean, S. S. Brown, P. Reavey, D. S. Young, *Clin. Chem.* 40 (1994) 1360. “Biomarkers of chemical exposure: state of the art”.

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 ( $\delta$ -aminolevulinata) por el plomo, hasta los muy inespecíficos como los aductos de ADN o los marcadores de respuesta inmune.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), clasifica los marcadores biológicos para el seguimiento de la exposición a agentes biológicos en tres categorías<sup>9</sup>:

- ⇒ 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, dependiendo de la magnitud, puede ser reconocida o asociada con una posible o establecida alteración de la salud”.
- ⇒ 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.

---

<sup>9</sup> WHO *International Programme of Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 155, WHO, 1993, Geneva.*

## I. INTRODUCCIÓN

---

La Tabla 1.1 muestra algunos ejemplos de diferentes biomarcadores y su categoría. En la Figura 1.1 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 1.1. Algunos ejemplos de biomarcadores según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>9</sup>.

Biomarcadores de Exposición	<ul style="list-style-type: none"><li>- Plomo en sangre</li><li>- P-Nitrofenol en orina: biomarcador de organofosforados</li><li>- <math>\alpha</math>-Naftol en orina: biomarcador de hidrocarburos policíclicos aromáticos</li></ul>
Biomarcadores de Efecto	<ul style="list-style-type: none"><li>- Aumento de proteínas</li><li>- Aductos de ADN</li><li>- Nucleósidos hidroxilados p. ej. 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina</li></ul>
Biomarcadores de Susceptibilidad	<ul style="list-style-type: none"><li>- Actividad de ciertas enzimas p. ej. Acetiltransferasa</li><li>- Inhibición de Acetilcolinesterasa (biomarcador de carbamatos)</li></ul>

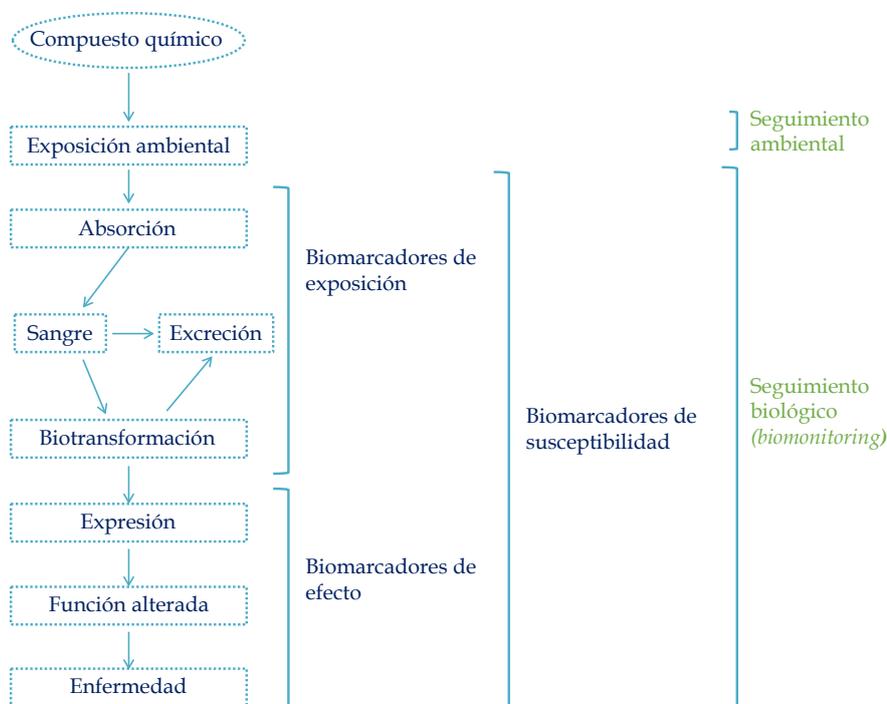


Figura 1.1. Representación esquemática del proceso desencadenado por exposición a un tóxico<sup>4</sup>.

### 3. Métodos analíticos para el análisis de biomarcadores.

En la determinación de biomarcadores en este caso, de nucleósidos excretados en la orina, se utilizan varias técnicas, entre las que cabe destacar las de inmunoensayo<sup>10,11,12</sup> y fundamentalmente, técnicas cromatográficas como la

<sup>10</sup> S. Ishiwata, K. Itoh, K. T. Yamaguchi, N. Ishida, M. Mizugaki, J. Tohoku, *Exp. Med.* 176 (1995) 61. "Comparison of serum and urinary levels of modified nucleoside, 1-methyladenosine, in cancer patients using a monoclonal antibody-based inhibition ELISA".

<sup>11</sup> A. J. Sascó, 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".

<sup>12</sup> K. Koshida, J. Harmenberg, U. Stendahl, B. Wahren, E. Borgstrom, L. Helstrom, L. Andersson, *Urol. Res.* 13 (1985) 213. "Urinary modified nucleosides as tumor markers in cancer of the urinary organs or female genital tract".

cromatografía líquida tanto con detección espectrofotométrica<sup>13,14,15,16,17,18,19,20,21</sup> como acoplada a espectrometría de masas<sup>22,23,24,25</sup>. También se ha utilizado la electroforesis capilar<sup>26,27,28,29,30,31</sup> aunque su aplicación es aún escasa.

Una revisión detallada de los métodos electroforéticos se describirá posteriormente.

- 
- <sup>13</sup> F. Oerlemans, F. Lange, *Gynecol. Obstet. Invest.* 22 (1986) 212. "Major and modified nucleosides as markers in ovarian cancer: A pilot study".
- <sup>14</sup> T. Rasmuson, G. R. Bjork, L. Damber, L. Jacobsson, A. Jeppsson, T. Stigbrand, G. Westman, *Acta Oncol.* 26 (1987) 261. "Tumor markers in mammary carcinoma. An evaluation of carcinoembryonic antigen, placental alkaline phosphatase, pseudouridine and CA-50".
- <sup>15</sup> T. Rasmuson, G. R. Bjork, *Acta Oncol.* 34 (1995) 61. "Urinary excretion of pseudouridine and prognosis of patients with malignant lymphoma".
- <sup>16</sup> 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".
- <sup>17</sup> E. Kvist, K. E. Sjolín, J. Iversen, K. Nyholm, *Urol. Nephrol.* 27 (1993) 45. "Urinary excretion patterns of pseudouridine and beta-aminoisobutyric acid in patients with tumours of the urinary bladder".
- <sup>18</sup> K. Nakano, T. Nakao, K. H. Schram, W. M. Hammargren, T. D. McClure, E. Petersen, *Clin. Chim. Acta* 218 (1993) 169. "Urinary excretion of modified nucleosides as biological marker of RNA turnover in patients with cancer and AIDS".
- <sup>19</sup> G. Xu, H. R. Schmid, H. M. Liebich, P. Lu, *Biomed. Chromatogr.* 14 (2000) 459. "Excretion pattern investigation of urinary normal and modified nucleosides of breast cancer patients by RP-HPLC and factor analysis method".
- <sup>20</sup> J. Yang, G. W. Xu, Y. F. Theng, H. Kong, T. Pang, S. Lv, Q. Yang, *J. Chromatogr. B* 813 (2004) 59. "Diagnosis of liver cancer using HPLC-based metabolomics avoiding false-positive result from hepatitis and hepatocirrhosis diseases".
- <sup>21</sup> M-L Chen, S-S Wei, B-F Yuan, Y-Q Feng, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 183. "Preparation of methacrylate-based monolith for capillary hydrophilic interaction chromatography and its application in determination of nucleosides in urine".
- <sup>22</sup> E. Dudley, F. Lemiere, W. R. Van Dongen, R. S. Tuytten, S. El-Sharkawi, A. G. Brenton, 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".
- <sup>23</sup> S. H. Lee, B. H. Jung, S. Y. Kim, B. C. Chung, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 973. "A rapid and sensitive method for quantitation of nucleosides in human urine using liquid chromatography/mass spectrometry with direct urine injection".
- <sup>24</sup> S. Studzinska, B. Buszewski, *J. Chromatogr. B* 887-888 (2012) 93. "A new way to fast and high resolution determination of modified nucleosides".
- <sup>25</sup> W. Struck, D. Siluk, A. Yumba-Mpanga, M. Markuszewski, R. Kaliszán, M. J. Markuszewski, *J. Chromatogr. A* 1283 (2013) 122. "Liquid chromatography tandem mass spectrometry study of urinary nucleosides as potential cancer markers".
- <sup>26</sup> R. G. Zhao, G. B. Xu, B. Yue, H. M. Liebich, Y. Zhang, *J. Chromatogr. A* 828 (1998) 489. "Artificial neural network classification based on capillary electrophoresis of urinary nucleosides for the clinical diagnosis of tumours".
- <sup>27</sup> 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".
- <sup>28</sup> Y. F. Zheng, G. W. Xu, D. Y. Liu, J. H. Xiong, P. D. Zhang, C. Zhang, Q. Yang, S. Lv, *Electrophoresis* 23 (2002) 4104. "Study of urinary nucleosides as biological marker in cancer patients analyzed by micellar electrokinetic capillary chromatography".
- <sup>29</sup> H. M. Liebich, G. Xu, C. D. Stefano, R. Lehmann, *J. Chromatogr. A* 793 (1998) 341. "Capillary electrophoresis of urinary normal and modified nucleosides of cancer patients".
- <sup>30</sup> H. M. Liebich, R. Lehmann, G. Xu, H. G. Wahl, H. U. Häring, *J. Chromatogr. B* 745 (2000) 189. "Application of capillary electrophoresis in clinical chemistry: the clinical value of urinary modified nucleosides".
- <sup>31</sup> 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".

## 1.2. NUCLEÓSIDOS Y NUCLEOBASES MODIFICADOS COMO MARCADORES BIOLÓGICOS.

Los nucleósidos y nucleobases modificados son productos de degradación de los ácidos nucleicos presentes de forma natural en la orina humana. Esto se debe a un proceso metabólico fundamental denominado recambio metabólico del ácido ribonucleico (ARN), durante el cual, la acción de enzimas hidrolíticas como las ribonucleasas y las fosfatasa, liberan nucleósidos normales y modificados durante la regeneración del ARN, principalmente el de transferencia (ARNt). Los nucleósidos sin modificar sufren reutilización y degradación, transformándose en ácido úrico (como es el caso de los analitos adenosina y guanosina), en  $\beta$ -alanina (en el caso de citidina y uridina) y  $\beta$ -aminoisobutirato<sup>32,33</sup>. Los nucleósidos modificados, por otro lado, no pueden ser reutilizados ni sufrir una posterior degradación por lo que circulan libremente por el torrente sanguíneo hasta su eliminación por la orina. Este proceso metabólico natural es exaltado en presencia de fenómenos asociados al envejecimiento celular, carcinogénesis y neurodegeneración, así como a otras enfermedades que transcurren con fuertes desórdenes metabólicos. Se ha descrito la existencia de unos 100 nucleósidos modificados en orina procedentes de todas las formas de ARN.

Los nucleósidos y nucleobases modificados también se generan por reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN) como resultado del daño por estrés oxidativo, es decir, el daño celular causado por especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS). Estas especies interactúan con diversas biomoléculas llegando a alterarlas, fundamentalmente ADN, lípidos y proteínas. Las lesiones del ADN son de especial importancia porque pueden alterar la secuencia de nucleótidos. Los mecanismos naturales de reparación de ADN implican la escisión de los nucleósidos o nucleobases dañadas que no pueden ser reutilizados y son eliminados en la orina como moléculas intactas. Se han descrito más de 20 productos del daño por estrés oxidativo al ADN; entre ellos, el compuesto 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OH2dG)<sup>34</sup> es uno de los que despierta mayor interés ya que ha sido identificado

<sup>32</sup> P. A. Limbach, P. F. Crain, J. A. McCloskey, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 2183. "Summary: the modified nucleosides of RNA".

<sup>33</sup> J. A. M. Giménez, G. T. Sáez, R. T. Seisdedos, *J. Theor. Biol.* 194 (1998) 485. "On the Function of Modified Nucleosides in the RNA World".

<sup>34</sup> E. Rodríguez-Gonzalo, D. García-Gómez, R. Carabias-Martínez, *J. Chromatogr. 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?".

en ciertos tipos de cáncer, como el cáncer de mama, de hígado y de pulmón. Puesto que este compuesto, 8OH2dG, se excreta en la orina sin ningún tipo de transformación, su determinación en ella puede ser considerada de interés como un método no invasivo en el diagnóstico precoz del cáncer.

En las últimas décadas se ha incrementado notablemente el interés por la utilización de los nucleósidos y nucleobases modificados excretados en orina como posibles biomarcadores<sup>35</sup> en ciertas enfermedades y principalmente, como marcadores tempranos de diversos tipos de cáncer.

### 1.2.1. MARCADORES ONCOLÓGICOS.

El cáncer es una de las enfermedades más impredecibles, especialmente cuando se diagnostica en una etapa avanzada<sup>36</sup>. Se han propuesto muchos marcadores para el diagnóstico del cáncer pero no se ha demostrado que alguno de ellos sea lo suficientemente sensible. Por ejemplo, el antígeno carcinoembrionario, los antígenos carbohidrato 199 y 125 y la  $\alpha$ -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 (*prostate-specific antigen, PSA*), presentan escasa sensibilidad (35% de falsos negativos para *PSA*).

Frente al enfoque bioquímico habitual, que se centra en el análisis de un único marcador, la tendencia actual implica tener en cuenta un amplio grupo de metabolitos, lo que debería presentar mejores resultados. 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 pueden tener un papel significativo en la carcinogénesis y así, el nivel de nucleósidos y nucleobases en la

---

<sup>35</sup> 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".

<sup>36</sup> W. Struck, M. Waszczuk-Jnkowska, 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 bioinformatics methods".

orina puede ser un posible marcador oncológico<sup>37</sup>. La justificación de esta hipótesis está relacionada con el hecho de que en procesos patológicos como desórdenes sanguíneos, procesos inflamatorios, SIDA y tumores malignos, la degradación del ARN es más rápida, aumentando el recambio metabólico del ARN. La presencia de cáncer también produce un incremento en la actividad de la enzima metiltransferasa. Como resultado de ambos procesos (recambio de ARN y actividad enzimática) la concentración de nucleósidos en orina aumenta.

En conclusión, los niveles anormales de nucleósidos en orina pueden correlacionarse con un incremento de recambio metabólico del ARN, en particular ARN de transferencia (ARNt), o de la actividad de la metiltransferasa, procesos ambos causados por el cáncer. No obstante, esta conclusión no es clara ni definitiva. No puede concluirse 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 cirrosis<sup>20</sup>. Además, se han descrito alteraciones de los niveles en orina de nucleósidos y nucleobases modificados en presencia de enfermedades más benignas y en diversos hábitos de vida (fumar, practicar deporte extremo, estrés, mala alimentación...).

Por tanto, la utilización de estos compuestos como biomarcadores carece de la especificidad suficiente para poder ser utilizados como prueba diagnóstica única. Por ello es importante resaltar que el uso clínico de los nucleósidos y nucleobases modificados en el campo de diagnóstico de procesos tumorales es complementario a métodos de diagnóstico ya conocidos como son diversas pruebas radiológicas o de resonancia magnética nuclear, citologías, histopatologías, ultrasonografías, etc.

Otro de los posibles usos de interés de estos marcadores biológicos es para el seguimiento de pacientes que están siendo tratados contra el cáncer, así como en recurrencias postoperatorias. Si un marcador o grupo de marcadores están disponibles para un tipo concreto de cáncer, es mucho más fácil comprobar la eficacia del tratamiento siguiendo la evolución de estos compuestos en lugar de repetir otras pruebas mucho más costosas como las tomografías computerizadas, gammagrafías u otras pruebas. De ahí que actualmente, una gran parte de los estudios estén dirigidos a evaluar la posibilidad de utilizar ciertos nucleósidos y nucleobases modificados para diferenciar cáncer de otro tipo de enfermedades.

---

<sup>37</sup> S. H. Choi, 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".

### 1.2.2. MARCADORES DE DAÑO OXIDATIVO.

El estrés oxidativo es un proceso de daño celular, desencadenado por radicales libres, principalmente de oxígeno, que puede afectar a uno o a varios componentes de la célula (proteínas, carbohidratos, lípidos y/o ácidos nucleicos) y alterar seriamente sus funciones. Los radicales libres se producen continuamente en el organismo por medio de reacciones bioquímicas de oxidación-reducción con oxígeno, que tienen lugar por el metabolismo normal de las células, y también como respuesta a exposiciones externas a radiaciones ionizantes, rayos ultravioletas, contaminación ambiental, humo de tabaco, hiperoxia, exceso de ejercicio e isquemia.

Las especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) a pesar de ser productos normales del metabolismo celular<sup>38</sup>, pueden lesionar los componentes celulares, causando su mutación o incluso la muerte de la célula<sup>39</sup>. Estas especies pueden clasificarse en 2 tipos: (a) radicales libres, como el radical superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) y el radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) y (b) especies no radicales como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), el oxígeno singlete ( $\text{O}_2^1$ ), el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) y el ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ). La medida directa de estas especies reactivas de oxígeno es imposible debido a su corta vida media; por ejemplo, se estima que la vida media del radical hidroxilo, el más dañino de las ROS, es de menos de 1 nanosegundo<sup>40</sup>.

Los organismos están dotados de un elaborado sistema biológico, el sistema antioxidante, que protege a los tejidos de los efectos de los radicales libres. Este sistema está formado por varias enzimas como la catalasa, superoxidodismutasa y glutatión peroxidasa, para defender al organismo contra el daño oxidativo, pero no con una eficacia del 100%. Cuando la producción de ROS supera las capacidades antioxidantes de la célula, es decir, anula sus defensas antioxidantes naturales, es cuando se produce el daño oxidativo. Por tanto, la inhibición de algunas de estas enzimas es considerado una evidencia de un incremento en la producción de ROS o estrés oxidativo.

---

<sup>38</sup> H. Sova, A. Jukkola-Vuorinen, U. Puistola, S. Kauppila, P. Karihtala, *Brit. J. Cancer* 102 (2010) 1018. "8-Hydroxydeoxyguanosine: a new potential independent prognostic factor in breast cancer".

<sup>39</sup> D. J. Howard, R. B. Ota, L. A. Briggs, M. Hampton, C. A. Pritsos, *Cancer Epidem. Biomar.* 7 (1998) 141. "Environmental tobacco smoke in the workplace induces oxidative stress in employees, including increased production of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine".

<sup>40</sup> M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, C. J. Rhodes, J. Telsler, *Mol. Cell. Biochem.* 266 (2004) 37. "Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence".

Por tanto, el estrés oxidativo se genera por desequilibrio entre la producción y la eliminación de ROS a favor de su formación<sup>41</sup>. Si la producción excesiva de ROS persiste y no es reparada adecuadamente, pueden generarse compuestos citotóxicos o procesos mutagénicos<sup>39</sup>.

El daño oxidativo que sufre el ADN debido a las especies reactivas de oxígeno, ROS, es un proceso bien documentado que provoca alteraciones en las bases nitrogenadas y en el azúcar. En los últimos años, este proceso se ha asociado, cada vez con más frecuencia, a los mecanismos patogénicos de diferentes enfermedades entre las que se encuentran las enfermedades cardiovasculares, desórdenes neurodegenerativos, distintos tipos de cáncer, diabetes, artritis reumatoide, fibrosis pulmonar, arterosclerosis, etc, y a procesos fisiológicos como el envejecimiento<sup>42</sup>. Se ha calculado que si no funcionasen los mecanismos de reparación del ADN, del 1–5% del ADN humano podría oxidarse en un corto periodo de tiempo, años, algo que resulta incompatible con la vida<sup>43</sup>.

En la actualidad hay un gran interés en desarrollar estudios relacionados con el daño oxidativo provocado por los radicales libres sobre el ADN, con objeto de encontrar medios adecuados para la detección precoz de enfermedades graves<sup>44</sup>.

Como marcadores del estrés oxidativo, y del consiguiente daño oxidativo en el ADN, se encuentran numerosas enzimas y más recientemente, un derivado del ADN, 8–hidroxi–2’–deoxiguanosina, 8OH2dG. Este compuesto es la forma oxidada del nucleósido 2’–deoxiguanosina (2dG)<sup>45</sup>. Se considera que 8OH2dG es un marcador adecuado del daño al ADN por varias razones: es uno de los productos más abundantes del ADN oxidado, es soluble en agua, se excreta en la orina sin metabolizar<sup>46</sup> y es capaz de reflejar bajos niveles de daño oxidativo<sup>39</sup>.

---

<sup>41</sup> P. M. W. Lam, V. Mistry, T. H. Marczylo, J. C. Konje, M. D. Evans, M. S. Cooke, *Free Radical Bio. Med.* 52 (2012) 2057. “Rapid measurement 8–oxo–7,8–dihydro–2’–deoxyguanosine in human biological matrices using ultra–high–performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry”.

<sup>42</sup> A. Weimann, D. Belling, H. E. Poulsen, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 2. “Quantification of 8–oxo–guanine and guanine as the nucleobase, nucleoside and deoxynucleoside forms in human urine by high–performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry”.

<sup>43</sup> T. Henriksen, P. R. Hillestrom, H. E. Poulsen, A. Weimann, *Free Radical Bio. Med.* 47 (2009) 629. “Automated method for the direct analysis of 8–oxo–guanosine and 8–oxo–2’–deoxyguanosine in human urine using ultra–performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry”.

<sup>44</sup> L. Sabatini, A. Barbieri, M. Tosi, A. Roda, F. S. Violante, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 147. “A method for routine quantitation of urinary 8–hydroxy–2’–deoxyguanosine based on solid–phase extraction and micro–high–performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry”.

<sup>45</sup> S. Loft, P. Moller, *Antioxid. Redox Sign.* 8 (2006) 1021. “Oxidative DNA damage and human cancer: need for cohort studies”.

<sup>46</sup> T. Yano, F. Shoji, H. Baba, T. Koga, T. Shiraishi, H. Orita, H. Kohno, *Lung Cancer* 63 (2009) 111. “Significance of the urinary 8–OHdG level as an oxidative stress marker in lung cancer patients”.

## I. INTRODUCCIÓN

---

Los primeros estudios sobre el daño por estrés oxidativo, se basaron en determinar la concentración de ciertas enzimas que eran las encargadas de reparar el daño generado en el ADN a causa de los radicales libres, ROS<sup>39</sup>. A partir de la década de los noventa se empezó a utilizar este derivado hidroxilado, 8OH2dG, como marcador de estrés oxidativo. Se ha descrito la determinación de 8OH2dG por ELISA<sup>38</sup> o por técnicas cromatográficas con detección espectrofotométrica o electroquímica en suero o muestras de orina<sup>47</sup>. Si bien en los primeros estudios se llevaba a cabo la medida de 8OH2dG mediante un análisis de ADN<sup>48</sup>, posteriormente se comprobó que era más adecuado medir el 8OH2dG en plasma o en orina, debido a que durante el aislamiento del ADN se producía la oxidación de 2dG, llevando a la detección de niveles erróneos de 8OH2dG<sup>44</sup>.

### Estrés oxidativo y consumo de tabaco.

El humo del tabaco se considera una de las fuentes más importantes de radicales libres<sup>49</sup>. La composición química del humo de tabaco es compleja. Han sido identificados alrededor de 3800 compuestos en el humo de tabaco incluyendo fenoles, quinonas, aldehídos, cetonas, hidrocarburos aromáticos, algunos de los cuales son capaces de generar ROS durante su metabolismo<sup>39</sup>. Estudios *in vitro* han demostrado que el humo del tabaco puede generar peróxido de hidrógeno y residuos de deoxiguanosina hidroxilada<sup>50</sup> en el ADN aislado, así como en las células pulmonares humanas cultivadas. *In vivo*, se ha encontrado un mayor daño oxidativo en el ADN de leucocitos y ADN de espermatozoides de los fumadores en comparación con el de no fumadores.

La modificación oxidativa del ADN incluye una variedad de oxidaciones de las bases. La hidroxilación del C-8 de la base guanina en el ADN es reparada de forma rápida y casi completa por un mecanismo de ruptura. El compuesto eliminado, 8OH2dG, se excreta sin ninguna modificación en la orina.

---

<sup>47</sup> M. S. Cooke, S. Loft, R. Olinski, *Cancer Epidem. Biomar.* 17 (2008) 3. "Measurement and meaning of oxidatively modified DNA lesions in urine".

<sup>48</sup> J. L. Ravanat, B. Duret, A. Guiller, T. Douki, J. J. Cadet, *Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 715 (1998) 349. "Isotope dilution high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay for the measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in biological samples".

<sup>49</sup> D. F. Church, W. A. Pryor, *Environ. Health Persp.* 64 (1985) 111. "Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications".

<sup>50</sup> B. K. Puri, I. H. Treasaden, M. Cocchi, S. Tsaluchidu, L. Tonello, B. M. Ross, *BMC Psychiatry* 8 (2008) S1:S4. "A comparison of oxidative stress in smokers and non-smokers: an *in vivo* human quantitative study of n-3 lipid peroxidation".

Es importante tener en cuenta que aunque el 8OH2dG es un marcador de estrés oxidativo también es un mutágeno, por lo que la acumulación de este compuesto en el ADN podría incrementar el riesgo de generar una mutación estable, ya que participa en al menos dos tipos de errores transcripcionales<sup>51</sup>, tiene efectos negativos en el funcionamiento de la célula generando la inestabilidad y la aceleración del acortamiento telomérico y por lo tanto, incrementando el riesgo de desarrollar una enfermedad<sup>52,53,54,55,56,57,58</sup>. 8OH2dG está presente en el ADN de células malignas<sup>59</sup> y su concentración se ve incrementada en procesos de carcinogénesis y en los leucocitos de personas fumadoras<sup>60</sup>.

Por consiguiente, el consumo de tabaco y la exposición al humo de tabaco ambiental<sup>61</sup> se ha relacionado con un incremento de los procesos de estrés oxidativo, resultando en un incremento en el daño oxidativo del ADN y por tanto, con un incremento del riesgo de desarrollar ciertas enfermedades crónicas degenerativas.

Sin embargo la relación entre los niveles de 8OH2dG en orina y el consumo del tabaco es un aspecto altamente controvertido. Se ha demostrado que los fumadores excretan en orina de un 35 a un 50% más de este compuesto que los no fumadores<sup>62,63</sup>. Sin embargo, otras diferencias en el estilo de vida entre fumadores y no fumadores, además del hábito de fumar, podrían explicar estas variaciones en la

<sup>51</sup> K. C. Cheng, D. S. Cahill, H. Kasai, S. Nishimura, L. A. Loeb, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 166. "8-Hydroxyguanine. An abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and A-C substitutions".

<sup>52</sup> B. N. Ames, *Science* 221 (1983) 1256. "Dietary carcinogens and anti-carcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases".

<sup>53</sup> P. A. Southorn, G. Powis, *Mayo Clin. Proc.* 63 (1988) 390. "Free radicals in medicine".

<sup>54</sup> M. K. Shigenaga, C. J. Gimeno, B. N. Ames, *P. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 9697. "Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage".

<sup>55</sup> R. A. Floyd, *FASEB J.* 4 (1990) 2578. "Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia".

<sup>56</sup> M. K. Shigenaga, B. N. Ames, *Free Radical Bio. Med.* 10 (1991) 211. "Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage".

<sup>57</sup> C. A. Rice-Evans, A. T. Diplock, *Free Radical Bio. Med.* 15 (1993) 77. "Current status of antioxidant therapy".

<sup>58</sup> B. Halliwell, C. E. Cross, *Environ. Health Persp.* 102 (Suppl. 10) (1994) 5. "Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress".

<sup>59</sup> K. Okamoto, S. Toyokuni, K. Uchida, O. Ogawa, J. Takenawa, Y. Kakehi, H. Kinoshita, Y. Hattori-Nakakuki, H. Hiari, O. Yoshida, *Int. J. Cancer* 58 (1994) 825. "Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in human renal-cell carcinoma".

<sup>60</sup> H. Kiyosawa, M. Suko, H. Okudaira, K. Murata, T. Miyamoto, M-H Chung, H. Kasai, S. Nishimura, *Free Radical Res. Com.* 11 (1990) 23. "Cigarette smoking induces formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, one of the oxidative DNA damages in human peripheral leukocytes".

<sup>61</sup> J. L. Witztum, *Lancet* 344 (1994) 793. "The oxidation hypothesis of atherosclerosis".

<sup>62</sup> S. Loft, K. Vistisen, M. Ewertz, A. Tjønneland, K. Overvad, H-E Poulsen, *Carcinogenesis* 13 (1992) 2241. "Oxidative DNA-damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index".

<sup>63</sup> S. Loft, A. Astrup, B. Buemann, H. E. Poulsen, *FASEB J.* 8 (1994) 534. "Oxidative DNA damage correlates with oxygen consumption in humans".

## I. INTRODUCCIÓN

---

excreción de 8OH2dG<sup>64</sup>. Por otro lado, Gackowski<sup>65</sup> describe que la excreción de 8OH2dG urinario era similar entre pacientes con cáncer de pulmón, fumadores sanos y no fumadores sanos, aunque el nivel de 8OH2dG en ADN aislado de los leucocitos de pacientes con cáncer de pulmón fue significativamente más alta que en el ADN aislado de los otros dos grupos, por lo que se sugiere que sucedía una deficiencia en los mecanismos de reparación de aquellos pacientes que padecen cáncer de pulmón.

Por tanto, aunque hay estudios en los que se asocia la exposición al humo de tabaco con un aumento en el estrés oxidativo y por tanto un aumento en la concentración del marcador 8OH2dG en sangre<sup>65</sup>, no puede decirse lo mismo con respecto a los niveles en orina.

Como conclusión a destacar, indicar que no hay estudios claros que indiquen que, en individuos sanos, la concentración de estos nucleósidos modificados en orina sea diferente entre fumadores y no fumadores. La mayoría de los estudios descritos sobre estrés oxidativo son estudios que relacionan este proceso de oxidación del ADN en pacientes con una determinada enfermedad diagnosticada, como puede ser un determinado tipo de cáncer o enfermedades neurodegenerativas. En ellos, se comparan los niveles de ciertos nucleósidos modificados, como 8OH2dG, de enfermos fumadores y no fumadores, con respecto a los niveles de individuos sanos, con hábitos de consumo de tabaco similares.

---

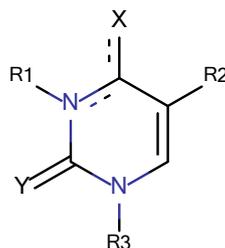
<sup>64</sup> H. E. Poulsen, S. Loft, K. Vistisen, *J. Sports Sci.* 14 (1996) 343. "Extreme exercise and oxidative DNA modification".

<sup>65</sup> D. Gackowski, E. Speina, M. Zielinska, J. Kowalewski, R. Rozalski, A. Siomek, T. Paciorek, B. Tudek, R. Olinski, *Cancer Res.* 63 (2003) 4899. "Products of oxidative DNA damage and repair as possible biomarkers of susceptibility to lung cancer".

## 1.2.3. NUCLEÓSIDOS Y NUCLEOBASES ESTUDIADOS.

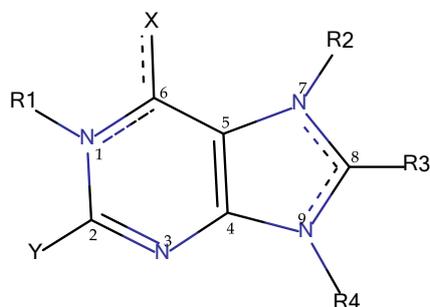
Las bases nitrogenadas (nucleobases) son compuestos orgánicos cíclicos, que incluyen dos o más átomos de nitrógeno. Son parte fundamental de los nucleósidos, nucleótidos, nucleótidos cíclicos (mensajeros intracelulares), dinucleótidos (poderes reductores) y ácidos nucleicos. Biológicamente existen seis bases nitrogenadas principales (en realidad hay muchas más), que se clasifican en dos grupos, púricas o purínicas (derivadas de la estructura de la purina) y bases pirimidínicas (derivadas de la estructura de la pirimidina).

En el presente trabajo se va a trabajar con los derivados de las bases púricas y pirimidínicas que se indican a continuación.

Estructuras Pirimidínicas.

Nombre	X	Y	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Uridina (U)	O	O	H	H	Ribosa
5-metiluridina (5mU)	O	O	H	CH <sub>3</sub>	Ribosa
Citidina (Cyt)	NH <sub>2</sub>	O	-	H	Ribosa

Estructuras Púricas.



Nombre	X	Y	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Adenosina (A)	NH <sub>2</sub>	H	-	-	H	Ribosa
1-metiladenosina (1mA)	NH	H	CH <sub>3</sub>	-	H	Ribosa
Guanina (Gua)	O	NH <sub>2</sub>	H	-	H	H
1-metilguanina (1mGua)	O	NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	-	H	H
7-metilguanina (7mGua)	O	NH <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	-
9-metilguanina (9mGua)	O	NH <sub>2</sub>	H	-	H	CH <sub>3</sub>
Guanosina (G)	O	NH <sub>2</sub>	H	-	H	Ribosa
7-metilguanosina (7mG)	O	NH <sub>2</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	Ribosa
2'-deoxiguanosina (2dG)	O	NH <sub>2</sub>	H	-	H	Deoxiribosa
8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OH2dG)	O	NH <sub>2</sub>	H	-	OH	Deoxiribosa
8-hidroxiguanosina (8OHG)	O	NH <sub>2</sub>	H	-	OH	Ribosa
Inosina (INN)	O	H	H	-	H	Ribosa

1.2.4. PROPIEDADES ÁCIDO–BASE DE LOS NUCLEÓSIDOS Y NUCLEOBASES<sup>66</sup>.

Los nucleósidos y nucleobases con estructura púrica y pirimidínica, que contienen el grupo  $\text{-NH}_2$ , son débilmente básicos. El ácido conjugado, catiónico y protonado, de los analitos citidina, adenosina y guanosina, tiene valores de  $\text{pK}_a$  de 4.2, 3.5 y 2.7 respectivamente. El equilibrio ácido–base para la citidina se muestra en la Figura 1.2.

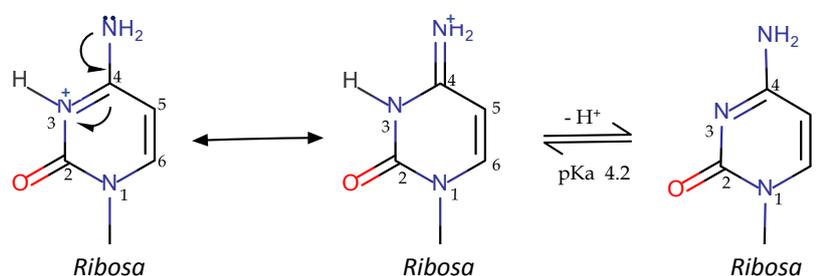


Figura 1.2. Comportamiento ácido–base del analito citidina.

Puede comprenderse este comportamiento si se considera que la base tiene un comportamiento sustancialmente aromático. En la anilina (aminobenceno), los electrones del grupo amino son compartidos con el anillo aromático descendiendo así la basicidad del grupo  $\text{-NH}_2$  ( $\text{pK}_a$  4.6).

De forma similar, los electrones de los grupos  $\text{-NH}_2$  de citidina, adenosina y guanina, son compartidos con los anillos púricos y pirimidínicos como muestran las flechas curvadas de la estructura de la izquierda en la Figura 1.2. Este efecto es incluso mayor que en la anilina, principalmente por la presencia de átomos de nitrógeno en los anillos. En el analito citosina, el N–3 es el que actúa principalmente como aceptor de electrones. Como consecuencia, este nitrógeno es más básico que

<sup>66</sup> “Biochemistry: The chemical reactions of living cells”. Vol. 1, Capítulo 2: “Acid–Base Chemistry and Tautomerism”. D. E. Metzlev, C. M. Metzlev.

el grupo  $\text{-NH}_2$  y es el principal sitio de protonación. En la Figura 1.2 se muestra que la carga positiva es compartida por resonancia con el grupo amino exocíclico.

El analito adenosina es similar a citidina en su comportamiento ácido-base. El N-1 adyacente al grupo  $\text{-NH}_2$  es el principal sitio de protonación. También se forma, en una pequeña cantidad, un tautómero protonado en N-3.

Por otra parte, el analito guanosina presenta una estructura electrónicamente más compleja, protonándose principalmente en el N-7 y en menos extensión en el N-3. Este comportamiento puede entenderse considerando la interacción electrónica con el oxígeno adyacente como se indica en la estructura resonante de la derecha en la Figura 1.3.

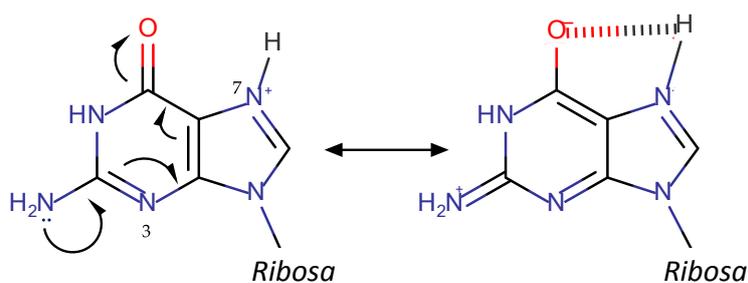


Figura 1.3. Comportamiento ácido-base de guanosina.

Bajo condiciones básicas, el protón en N-3 del analito uridina y timina o en N-1 de guanina, puede dissociarse con un valor de pKa de aproximadamente 9.2 (Figura 1.4). También se conoce que puede tener lugar la disociación de un protón de un grupo hidroxilo de la ribosa (con valores de pKa de 12.4).

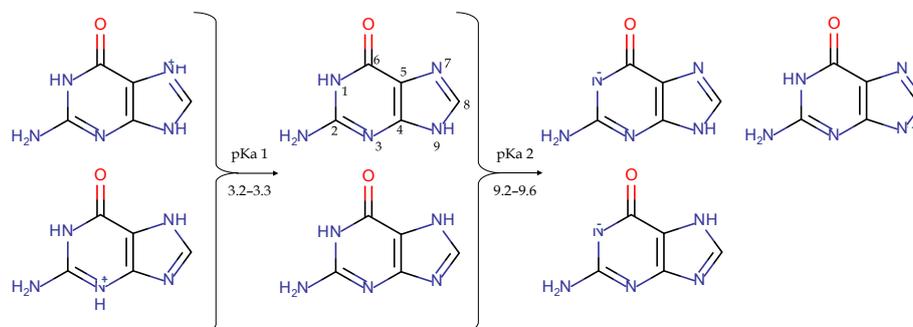


Figura 1.4. Comportamiento ácido-base de guanina.

A continuación, en la Tabla 1.2 se presenta la estructura de los nucleósidos y nucleobases estudiados así como algunas de sus propiedades.

## I. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.2. Propiedades de los nucleósidos y nucleobases estudiados.

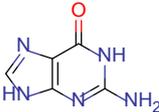
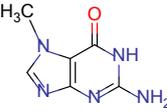
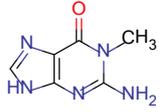
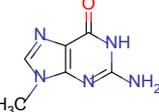
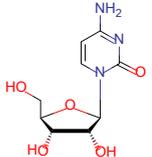
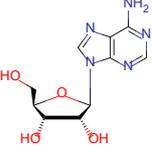
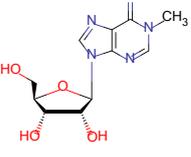
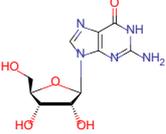
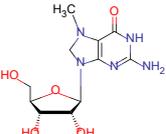
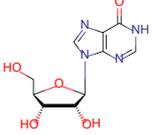
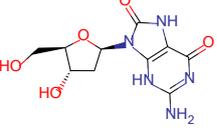
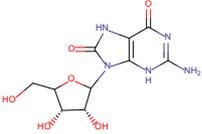
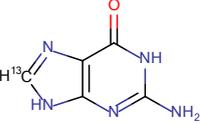
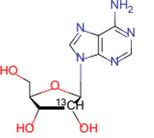
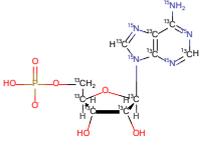
Nombre	Fórmula	M	CAS RN	pKa
Guanina (Gua)		151	73-40-5	3.2
				9.6
				12.4
7-metilguanina (7mGua)		165	578-76-7	~0
				3.5
				9.9
1-metilguanina (1mGua)		165	938-85-2	~0
				3.1
				10.5
9-metilguanina (9mGua)		165	5502-78-3	~0
				3.5
				9.9
Citidina (Cyt)		243	65-46-3	4.2
				12.5
Adenosina (A)		267	58-61-7	3.5
				12.5
1-metiladenosina (1mA)		281	15763-06-1	

Tabla 1.2 (Continuación). Propiedades de los nucleósidos y nucleobases estudiados.

Nombre	Fórmula	M	CAS RN	pKa
Guanosina (G)		283	118-00-3	2.7
				9.2
7-metilguanósina (7mG)		298	15313-37-8	7.0
5-metiluridina (5mU)		258	1463-10-1	9.7
2'-deoxiguanosina (2dG)		267	961-07-9	2.5
				12.0
Inosina (INN)		268	58-63-9	1.2
				8.8
8-hidroxi- 2'-deoxiguanosina (8OH2dG)		283	88847-89-6	8.6
				11.7

## I. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.2 (Continuación). Propiedades de los nucleósidos y nucleobases estudiados.

Nombre	Fórmula	M	CAS RN	pKa
8-hidroxi-guanosina (8OHG)		299	3868-31-3	
<sup>13</sup> C-Guanina ( <sup>13</sup> C-Gua)		152	—	
<sup>13</sup> C-Adenosina ( <sup>13</sup> C-A)		268	—	
Adenosina- <sup>13</sup> C <sub>10</sub> <sup>15</sup> N <sub>5</sub> 5'- monofosfato ( <sup>13</sup> C <sub>10</sub> <sup>15</sup> N <sub>5</sub> -AMP)		362	961-07-9	

### 1.3. ELECTROFORESIS CAPILAR COMO TÉCNICA DE SEPARACIÓN.

En los últimos años, la electroforesis capilar (CE) está consolidándose como una técnica analítica de enorme versatilidad que puede complementar a las técnicas cromatográficas.

La electroforesis fue introducida como técnica de separación por Tiselius en el año 1937. El hecho puntual que marca el inicio de las técnicas electroforéticas capilares es el trabajo publicado en 1981 por Jorgenson y Lukacs<sup>67</sup>. Desde este primer trabajo, la electroforesis capilar ha evolucionado pasando de ser un método de baja resolución y aplicación relativamente limitada, a presentar una extensa variedad de modalidades de incomparable poder de resolución y excepcional versatilidad.

La instrumentación básica para realizar separaciones electroforéticas es relativamente sencilla y consta de cinco elementos fundamentales: una fuente de alto voltaje, un capilar de sílice fundida donde tiene lugar la separación, viales que contengan el electrolito soporte (*background electrolyte*, BGE) que actúa como medio electroforético de separación, dos electrodos inertes y un detector. Un montaje artesanal de este tipo permitiría buenas separaciones. Sin embargo, la precisión sería bastante deficiente debido a la falta de control de la temperatura y a la escasa automatización del sistema. Actualmente los sistemas comerciales solventan todos estos problemas y dotan a esta técnica de una gran precisión analítica.

La separación mediante electroforesis capilar tiene lugar en columnas capilares de pequeño diámetro interno (10–200  $\mu\text{m}$ ) construidas con materiales químicos y eléctricamente inertes, transparentes a la luz UV–visible, flexibles y robustos. Actualmente los capilares más utilizados son los de sílice fundida.

Los dos parámetros clave en los que se fundamenta la separación electroforética son: la velocidad electroforética de un analito considerado y la velocidad electroosmótica de la disolución de electrolito soporte (BGE) que rellena el capilar.

---

<sup>67</sup> J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1298. “Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries”.

### Velocidad electroforética.

La velocidad electroforética se define como el movimiento que experimentan las especies cargadas en presencia de un campo eléctrico. Al actuar un campo eléctrico sobre una partícula cargada, ésta experimenta una fuerza de tipo eléctrico que la comienza a mover y una fuerza en sentido contrario, debido al rozamiento de ésta entre las láminas del fluido que viene determinada por la Ley de Stockes.

Prácticamente desde el comienzo del análisis se puede considerar que se consigue un estado estacionario y por lo tanto la partícula se mueve a una velocidad electroforética constante.

La velocidad de un ion puede expresarse como:

$$v = \mu_e E$$

Donde:  $v$  = velocidad del ion.

$\mu_e$  = velocidad electroforética.

$E$  = campo eléctrico aplicado.

El balance de la fuerza eléctrica y de la fuerza de rozamiento, suponiendo la aproximación de la partícula a una esfera, puede definirse como:

$$q E = 6\pi\eta r v$$

Donde:  $q$  = carga del ion.

$\eta$  = viscosidad de la solución.

$r$  = radio del ion.

$v$  = velocidad del ion.

Teniendo en cuenta ambas ecuaciones obtenemos una expresión que nos describe la movilidad electroforética en términos de parámetros físicos:

$$\mu_e = \frac{q}{6 \pi \eta r}$$

De esta ecuación se deduce que las especies pequeñas y de mayor carga tendrán mayor movilidad electroforética que las de menor carga y mayor tamaño.

#### Velocidad electrosmótica.

En la separación electroforética el movimiento de la disolución a través del capilar es debido al fenómeno electrosmótico que se origina en el interior de éste. Este flujo del disolvente se produce porque la pared del capilar se encuentra cargada y se establece una diferencia de potencial con respecto al seno de la disolución, conocida como potencial zeta ( $\zeta$ ), consecuencia de la naturaleza del capilar. La superficie del capilar se carga negativamente a valores de pH superiores a 3 y provoca la formación de una doble capa eléctrica (Figura 1.5). Los aniones son repelidos mientras que los cationes más próximos se adsorben sobre la pared del capilar formando una capa, capa de Stern, estrecha e inmóvil incluso bajo la influencia de un campo eléctrico.

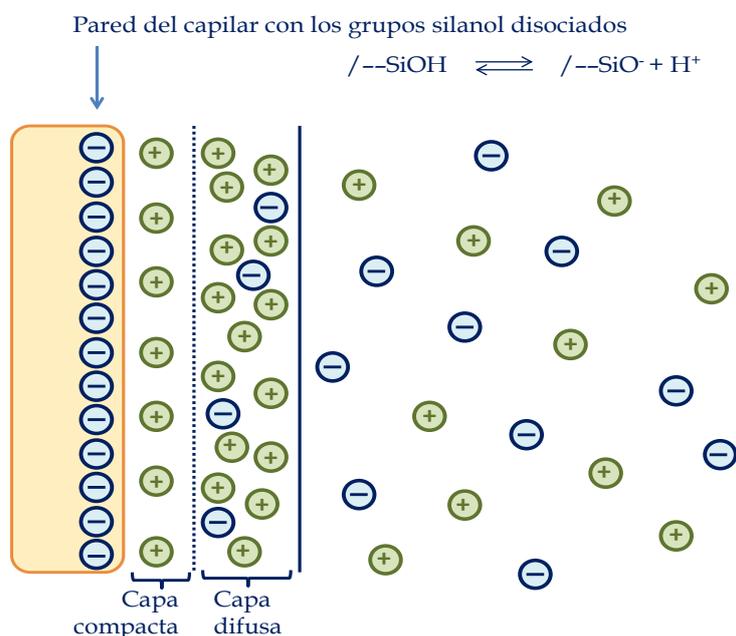


Figura 1.5. Doble capa eléctrica respecto a la pared del capilar.

## I. INTRODUCCIÓN

---

A continuación, existe una capa difusa y móvil con carácter sustancialmente catiónico conocida como la capa de Gouy–Chapman. A mayor distancia de la pared, la solución es eléctricamente neutra y no se manifiesta el potencial  $\zeta$ .

Cuando se aplica una diferencia de potencial entre los electrodos, las cargas positivas de la capa difusa migran hacia el cátodo y como estos iones están solvatados, arrastran al grueso de la disolución. De esta forma, la dirección y la velocidad del flujo electroosmótico depende de la polaridad y magnitud del potencial  $\zeta$  en la pared del capilar. La velocidad del flujo electroosmótico puede expresarse:

$$v_{eo} = (\varepsilon\zeta/\eta) E$$

Donde:  $v_{eo}$  = velocidad del flujo electroosmótico.

$\varepsilon$  = constante dieléctrica.

$\zeta$  = potencial zeta.

$\eta$  = viscosidad de la disolución.

El potencial zeta creado a través de la capa difusa viene dado por la siguiente expresión:

$$\zeta = 4\pi\eta\delta/\varepsilon$$

Siendo:  $\eta$  = la viscosidad del medio.

$\delta$  = el espesor de la doble película o radio iónico de Debye. Sabiendo que  $\delta = [3 \cdot 10^7 |Z| C^{1/2}]^{-1}$ .

Donde:

$Z$  = número de electrones de valencia.

$C$  = concentración de la disolución tampón de separación.

$\varepsilon$  = la constante dieléctrica.

El flujo electroosmótico se origina en la zona difusa de la doble capa y aunque ésta sea muy estrecha se transmite a través del diámetro del capilar, presumiblemente por enlaces de hidrógeno de las moléculas de agua o interacciones de Van der Waal's

de los constituyentes del tampón, generando un perfil de flujo plano. Este perfil plano presenta grandes ventajas frente al perfil parabólico propio del flujo a presión, ya que se minimizan las variaciones de la velocidad de flujo en la sección del capilar. Esto se traduce en una reducción de la dispersión axial de los analitos separados consiguiéndose una alta eficacia de pico, frecuentemente superior a  $10^5$  platos teóricos.

La existencia simultánea en el interior del capilar del flujo electroosmótico y de la migración electroforética hace que la velocidad de desplazamiento a lo largo del capilar de las especies (cationes, aniones y moléculas neutras) sea la resultante de la suma vectorial de sus distintas movilidades electroforéticas con la movilidad electroosmótica.

### Modalidades de separación.

#### Electroforesis capilar zonal (CZE).

Es el modo más sencillo de electroforesis capilar desde un punto de vista instrumental. Las separaciones son llevadas a cabo en un electrolito soporte (BGE) homogéneo. Los componentes iónicos se separan en bandas discretas cuando la movilidad individual de cada soluto es suficientemente diferente de todos los otros. De esta forma se consiguen separaciones de iones, moléculas de síntesis farmacéutica, plaguicidas péptidos, etc. En el interior del capilar se encuentra únicamente el tampón de separación que puede contener ciertos aditivos para mejorar la separación. De este modo al aplicar el voltaje las sustancias con carga se separarán en el interior del capilar en función de su movilidad electroforética, que está relacionada directamente con su relación carga/masa.

#### Cromatografía electrocinética micelar capilar (MEKC).

La cromatografía electrocinética micelar (MEKC) desarrollada en 1984 por Terabe y col.<sup>68</sup> surgió en un esfuerzo por ampliar la aplicabilidad de la electroforesis capilar (CE) a los compuestos neutros. Esta técnica se basa en el fenómeno

---

<sup>68</sup> S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.* 56 (1984) 111. "Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries".

## I. INTRODUCCIÓN

---

electrocinético propio de la electroforesis capilar zonal (*CZE*) y en el uso de los principios básicos de la cromatografía para llevar a cabo la separación de los solutos. En ambas técnicas el flujo electroosmótico es el encargado de transportar la fase móvil y los analitos a través del capilar, la diferencia entre ambas radica en la naturaleza del medio electroforético de separación (*BGE*) utilizado. En *MEKC* se añade un tensioactivo iónico, generalmente aniónico al tampón de separación en concentración superior a su concentración micelar crítica (*CMC*). Bajo estas condiciones las moléculas de tensioactivo forman micelas que están en equilibrio con sus monómeros en el seno de la disolución, cuya concentración es aproximadamente la *CMC*. Al introducir una muestra en el sistema los componentes se distribuyen entre las fases micelar y acuosa. La posición de los equilibrios que resultan depende de la polaridad de los solutos y condiciona la separación.

### Electrocromatografía capilar (*CEC*).

Modalidad de separación híbrida entre la electroforesis capilar y la cromatografía líquida. La técnica consiste en la utilización de un capilar relleno de una fase estacionaria, mientras que el movimiento de la fase móvil se realiza mediante el flujo electroosmótico.

## 1.4. TRATAMIENTO DE MUESTRA PREVIO A ELECTROFORESIS CAPILAR.

Una adecuada preparación de muestra es un aspecto clave en cualquier procedimiento analítico. El análisis de sustancias de bajo peso molecular como fármacos, xenobióticos o metabolitos endógenos, en muestras biológicas (orina, plasma, etc...) conlleva habitualmente una manipulación de la matriz con objeto de evitar la interferencia de especies macromoleculares y, a la vez, preservar el equipo instrumental.

En la determinación de compuestos a nivel de trazas, estos tratamientos previos no sólo están dirigidos 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.

La extracción líquido-líquido (*LLE*) ha sido durante varios años la técnica más utilizada en la preparación de muestras líquidas. Sin embargo presenta ciertos inconvenientes como la necesidad de varios pasos de limpieza para obtener una selectividad adecuada y, en algunos casos, utilizar grandes cantidades de disolventes orgánicos.

Hoy en día la extracción líquido-líquido (*LLE*) tradicional está siendo remplazada por técnicas de extracción y preconcentración más selectivas, rápidas y eficaces que no requieren el uso de tales cantidades de disolventes orgánicos. Dentro de estas, la extracción en fase sólida (*Solid phase extraction, SPE*) se ha establecido como una de las técnicas de preparación de muestra más ampliamente utilizada, tanto para la extracción y el enriquecimiento de analitos traza como en la limpieza de la matriz.

Los tratamientos de muestra constituyen la etapa limitante, en cuanto a tiempo, del proceso analítico global, además de requerir de una importante manipulación por parte del analista. En los últimos años, se ha estado desarrollando una solución atractiva para la etapa de preparación de la muestra que consistía en el uso de sorbentes especiales de extracción como son los materiales de acceso restringido (*restricted access materials, RAM*).

A continuación se van a desarrollar de una manera más exhaustiva dos de los tratamientos de muestra indicados anteriormente dado que han sido las modalidades empleadas a lo largo de este trabajo. En primer lugar, se utilizó la extracción en fase

sólida (*SPE*) como etapa de limpieza y preconcentración en aquellas muestras analizadas mediante *CE-MS* con ionización por electrospray en modo positivo *ESI(+)*. En segundo lugar, se utilizó un material de acceso restringido (*RAM*) como etapa de tratamiento de muestra previo al análisis mediante *CE-MS* con ionización por electrospray en modo negativo *ESI(-)*.

### 1.4.1. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (*SPE*).

La electroforesis capilar zonal (*CZE*) se ha convertido en una herramienta analítica muy potente a la hora de separar analitos cargados de diversas muestras, debido a la alta eficacia de la columna, a su tiempo de análisis relativamente corto y a los bajos volúmenes de muestra consumidos en comparación con cromatografía líquida de alta resolución (*HPLC*).

Un aspecto menos favorable de la electroforesis capilar, reside en que el paso óptico está limitado al pequeño diámetro interno de la columna capilar (25–100  $\mu\text{m}$ ) por lo que la detección UV es difícil en muestras que contienen analitos a baja concentración.

Actualmente, una de las formas de conseguir este aumento de sensibilidad es realizar una preconcentración “*off-line*”, es decir, la preconcentración se convierte en una etapa de preparación de muestra independiente del siguiente análisis electroforético.

La extracción en fase sólida (*SPE*) se ha establecido como una de las técnicas de preparación de muestra más ampliamente utilizada, como etapa previa a electroforesis capilar. Este tipo de extracción puede tener dos modalidades:

- ⇒ La extracción selectiva del analito disuelto en la matriz de muestra.
- ⇒ La retención selectiva de componentes de la matriz bajo condiciones en las que los analitos de interés no sean retenidos.

Los pasos habituales que se siguen en este tipo de extracción se describen a continuación:

1. Acondicionamiento del sorbente.

Este paso se realiza con el fin de eliminar pequeñas partículas del material de empaquetamiento, eluir cualquier contaminante procedente de la fábrica y principalmente, para acondicionar la fase sólida permitiendo el máximo contacto entre el analito o componentes de interés y los grupos funcionalizados del sorbente.

2. Paso de muestra.

En esta etapa se lleva a cabo el paso de la muestra por el sorbente a un flujo adecuado que permita la retención de los analitos.

3. Elución de interferencias.

El sorbente se lava con un disolvente o mezcla de disolventes con el fin de llevar a cabo la elución de interferencias de la matriz quedando retenidos los analitos de interés.

4. Elución de los analitos de interés.

El sorbente se trata con un disolvente adecuado para la elución de los componentes de interés empleando el menor volumen posible del mismo. Es conveniente que el eluyente sea compatible con los siguientes pasos del análisis que se deseen llevar a cabo.

A continuación se esquematiza el conjunto de pasos seguidos en la etapa de extracción en fase sólida, indicados anteriormente, Figura 1.6.

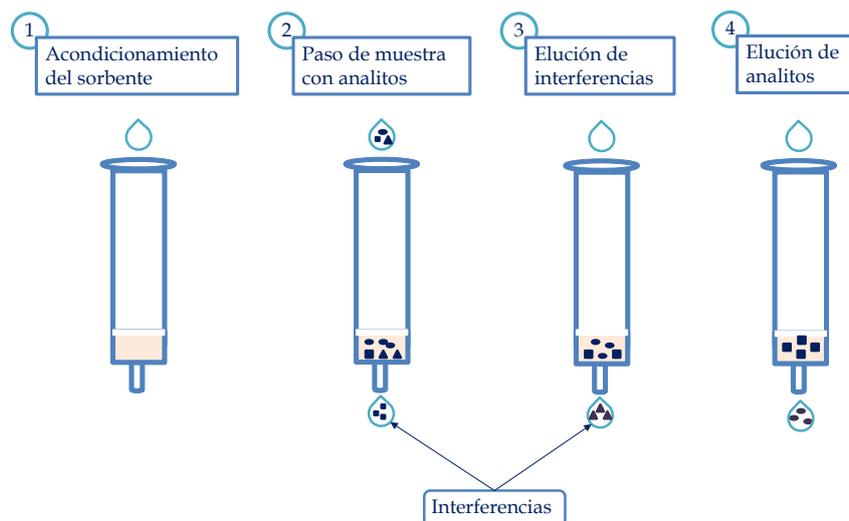


Figura 1.6. Esquema de los pasos habituales que se siguen en la extracción en fase sólida.

Un paso clave es la elección del sorbente adecuado que dependerá del conocimiento del mecanismo de interacción entre el sorbente y el/los analitos de interés en función de las propiedades de ambos. Estos mecanismos de interacción pueden incluir interacciones polares (puentes de hidrógeno, fuerzas dipolo), interacciones no polares o hidrofóbicas (fuerzas de Van der Waal's), interacciones de tipo tamiz molecular e interacciones de intercambio iónico.

Los sorbentes de sílice enlazado a grupos alquilo ( $C_8$  y  $C_{18}$ ) han sido ampliamente utilizados. Sin embargo, en la actualidad, una amplia variedad de sorbentes poliméricos han sido introducidos en el mercado posibilitando la gran versatilidad que presenta hoy en día esta técnica de tratamiento de muestra.

#### 1.4.2. MATERIALES DE ACCESO RESTRINGIDO (RAM).

La denominación de material de acceso restringido (*restricted access material*, *RAM*) es un término acuñado por Desilets y col. en 1991<sup>69</sup> y designa a toda una familia de materiales de estructura porosa que conjuga las características de los sorbentes de extracción en fase sólida con mecanismos de exclusión por tamaño. Aunque existen *RAM* de muy diferentes estructuras, el mecanismo de funcionamiento es idéntico para todos ellos: una barrera hidrofílica permite el paso de moléculas de bajo peso molecular a su través y su posterior acceso a la fase estacionaria hidrofóbica, mientras que las macromoléculas, como las proteínas, no pueden superar la barrera y son excluidas de la fase estacionaria. Así, la selectividad proviene de dos mecanismos diferenciados, por una parte la exclusión molecular aportada por la barrera y por otra la interacción hidrofóbica de las moléculas que superan dicha barrera con la fase estacionaria interna.

Existen dos grandes tipos de barreras: las de naturaleza física que excluyen a las macromoléculas por su tamaño (el diámetro de poro más habitual es de 60Å) y las de naturaleza química, en las que la exclusión se produce al formarse una barrera de difusión creada por una red proteica o polimérica en la superficie exterior del material.

Atendiendo al tipo de barrera y a la naturaleza de la fase estacionaria interior Boos y Rudolphi dividieron los *RAM* en siete categorías<sup>70</sup> mostradas en la Tabla 1.3.

---

<sup>69</sup> C. P. Desilets, M. A. Rounds, F. E. Regnier, *J. Chromatogr.* 544 (1991) 25. “*Semipermeable–surface reversed–phase media for high–performance liquid chromatography*”.

<sup>70</sup> K. S. Boos, A. Rudolphi, R. E. Majors, *LC GC* 15 (1997) 602. “*The use of restricted–access media in HPLC, Part I–Classification and review*”.

## I. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.3. Clasificación general de los RAM<sup>70</sup>.

	Barrera	Fase estacionaria	Denominación	Desarrollo
<b>RAM</b>	Física	Tripéptido hidrofóbico	<i>ISRP</i>	Hagestam <sup>71</sup> 1985
		Cadenas alquílicas	<i>ADS</i>	Vielhauer <sup>72</sup> 1995
		Sílice porosa + ligando	<i>Biomatrix</i>	ChromSpher® <sup>73</sup>
	Química	Superficie semipermeable	<i>SPS</i>	Perry <sup>74</sup> 1990
		Sílice recubierta por proteínas	<i>BioTrap®</i>	Hermansson <sup>75</sup> 1994
		Funcionalización mixta	<i>MF</i>	Kanda <sup>76</sup> 1994
		Hidrofóbica protegida	<i>SHP</i>	Gisch <sup>77</sup> 1988

### Materiales de acceso restringido: familia alquil–diol–sílice (ADS).

Los materiales de acceso restringido basados en alquil–diol–sílice (ADS) son, sin duda, los RAM más utilizados desde su introducción en 1995 por Vielhauer. Al igual que los de fase inversa (*internal surface reverse phase, ISRP*) están constituidos por partículas de sílice porosa de 60Å de tamaño de poro lo que conlleva la exclusión de cualquier macromolécula de más de 10 000 Da<sup>78</sup>. Además, la existencia de grupos hidrofílicos –glicerilpropil– en la superficie externa de las partículas evita la posible adsorción de dichas macromoléculas sobre el RAM. La fase estacionaria interna, de

<sup>71</sup> H. Hagestam, T. C. Pinkerton, *Anal. Chem.* 57 (1985) 1757. “Internal surface reversed–phase silica supports for liquid chromatography”.

<sup>72</sup> 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”.

<sup>73</sup> ChromSpher 5 BioMatrix. Direct HPLC Injection of Protein–Rich Samples, V. ARLAN, Harbor City, CA, USA.

<sup>74</sup> J. A. Perry, L. J. Glunz, T. J. Szczerba, J. D. Rateike, *LC GC* 8 (1990) 832. “A comparative study of Restricted Access Media in High Performance Liquid Chromatography”.

<sup>75</sup> 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”.

<sup>76</sup> 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”.

<sup>77</sup> D. J. Gisch, B. T. Hunter, B. Feibush, *J. Chromatogr.* 433 (1988) 264. “Shielded hydrophobic phase: a new concept for direct injection analysis of biological fluids by high–performance liquid chromatography”.

<sup>78</sup> 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”.

naturaleza alquílica, puede estar constituida por cadenas butílicas (C<sub>4</sub>), caprílicas (C<sub>8</sub>) o esteáricas (C<sub>18</sub>)<sup>72</sup>. En las Figuras 1.7 y 1.8 se muestran la naturaleza química y el funcionamiento de un RAM-ADS.

Recientemente se han desarrollado RAM en los que la fase interna está formada por grupos sulfónicos<sup>79</sup> (SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) o dietilaminoetil<sup>80</sup> (DEAE) lo que implica interacciones por intercambio catiónico fuerte y aniónico débil respectivamente. Se denominan de intercambio-diol-sílice (XDS) y se han aplicado en el análisis de compuestos endógenos y farmacéuticos.

Los RAM-ADS han mostrado su versatilidad al ser utilizados satisfactoriamente con una importante gama de matrices biológicas como plasma, suero, orina, saliva, secreciones bronquiales y tejidos<sup>81</sup>, tolerando volúmenes de muestra biológica de hasta 100.0 mL<sup>82</sup>.

#### RAM basados en materiales poliméricos.

Desarrollados y comercializados por Shimadzu estos RAM, formados por columnas empaquetadas con materiales poliméricos, se comercializan en dos líneas diferenciadas: MSpak PK y MSpak GF.

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.

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.

---

<sup>79</sup> P. Chiap, O. Rbeida, B. Christiaens, Ph. 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".

<sup>80</sup> O. Rbeida, B. Christiaens, 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".

<sup>81</sup> P. Sadílek, D. Satínsky, 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".

<sup>82</sup> W. R. G. Baeyens, G. Van der Weken, J. Haustraete, H. Y. 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".

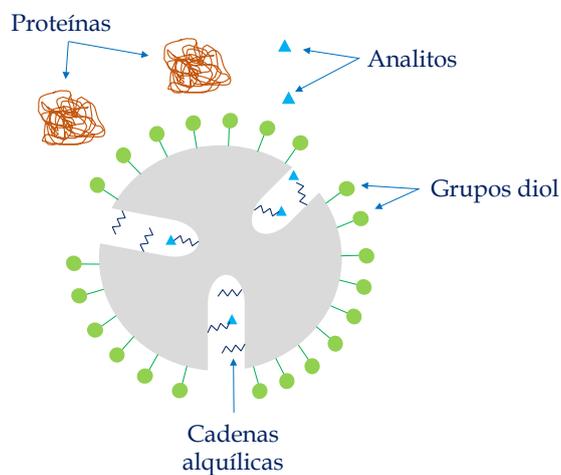


Figura 1.7. Representación del funcionamiento de un R4M-ADS<sup>83</sup>.

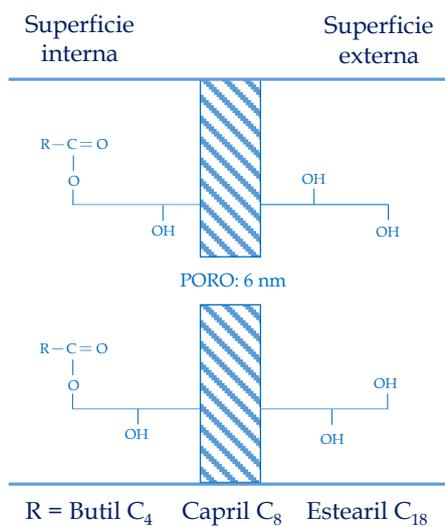


Figura 1.8. Representación esquemática de la naturaleza química de un R4M-ADS<sup>78</sup>.

<sup>83</sup> 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?".

### Configuración instrumental de los RAM.

En general, los materiales RAM se han utilizado en muy diversas configuraciones a la hora de realizar el análisis directo de muestras biológicas. En su versión más sencilla, el RAM puede integrarse en un sistema de flujo no separativo como en el análisis por inyección de flujo (FLA) o en el análisis por inyección secuencial (SLA). Sin embargo, la presión necesaria para mantener el flujo a través del RAM es alta e incompatible con las bombas peristálticas de FLA. En SLA, 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 SLA-RAM es muy limitada siendo utilizada simplemente para monitorizaciones sencillas.

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

i. Modalidad directa o de columna única.

En la configuración en modo directo el fluido biológico se inyecta en el RAM en el medio apropiado que permita la retención de los analitos sin producir la desnaturalización de las proteínas. En esta primera etapa de extracción, los analitos son retenidos en el sorbente mientras que los compuestos endógenos macromoleculares (principalmente proteínas) son eluidos hacia el detector. Seguidamente, se pasa por el RAM una fase móvil que permita la elución y separación de los analitos, que alcanzan el detector, libres de interferencias endógenas.

ii. Modalidad de intercambio de columna o de columnas acopladas.

Esta configuración de intercambio de columna (*column switching*) permite simultáneamente eliminar las proteínas y preconcentrar los analitos de bajo peso molecular sobre el dispositivo RAM. Estos analitos son posteriormente separados en una columna cromatográfica. Las restricciones sólo afectan al medio en el que la matriz biológica se carga en el sistema. En esta modalidad la muestra biológica se carga en el RAM que retiene los analitos de bajo peso molecular mientras que las proteínas son eliminadas a desecho. El sistema permite la inyección de altos volúmenes de muestra lo que redundará en importantes factores de preconcentración. Cuando los componentes no retenidos han sido eliminados a desecho, una válvula cambia la conexión del RAM a una segunda bomba de alta presión que eluye los

analitos del *RAM* y los introduce en la columna analítica donde se produce la separación para dar paso, seguidamente, a la detección. Frente a sus múltiples ventajas sobre la modalidad directa, cabe destacar como principal desventaja la mayor complejidad instrumental ya que son necesarias al menos dos bombas de alta presión y una válvula de seis vías sincronizada con las mismas.

iii. Modalidad *off-line* empleada en este estudio.

Debido a la imposibilidad de realizar un acoplamiento entre el *RAM* y la columna capilar utilizada en el equipo de electroforesis capilar (*CE*) se desarrolló una modalidad *off-line* basada en la metodología de intercambio de columna pero con ciertas modificaciones. Entre las semejanzas se encuentran el empleo de un inyector automático y de dos bombas de alta presión. Las modificaciones consistieron en el uso de dos válvulas de inyección de seis vías y la eliminación de la conexión con la columna cromatográfica, en su lugar se adaptó un dispositivo que permitiese la recogida manual de la muestra directamente en un vial. Al igual que en la modalidad de intercambio de columna, en esta configuración también se produce la eliminación de las proteínas de alto peso molecular (conducidas a desecho) presentes en la muestra biológica y la retención de los analitos de bajo peso molecular en el *RAM*. Mediante una segunda bomba, los analitos son eluidos del *RAM* y recogidos en un vial adecuado para su posterior análisis.

Como se ha indicado anteriormente, en esta modalidad *off-line* se elimina la conexión con la columna cromatográfica, por lo que las muestras recogidas de forma manual, pueden ser analizadas mediante cualquier técnica de separación. En este caso fueron analizadas en un equipo de electroforesis capilar (*CE*) en el cual se va a producir la separación de los analitos de interés y su posterior detección mediante espectrometría de masas (*MS*). Con esta modalidad *off-line* el sistema también permite la inyección de altos volúmenes de muestra por lo que permite la posibilidad de llevar a cabo la preconcentración si fuera necesario.

## 1.5. ACOPLAMIENTO DE ELECTROFORESIS CAPILAR CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON IONIZACIÓN POR ELECTROSPRAY.

La utilización de espectrometría de masas (*MS*) como sistema de detección acoplada a electroforesis capilar fue descrita por primera vez en 1987 por el grupo de Smith y col.<sup>84,85</sup> mediante una interfaz de ionización por electrospray (*electrospray ionization, ESI*). Este acoplamiento instrumental presenta un notable interés ya que aúna las características de dos técnicas analíticas sumamente potentes<sup>86</sup>. Por un lado, la electroforesis capilar (*CE*), que presenta una elevada eficacia como técnica de separación, pero cuya sensibilidad con detectores espectrofotométricos está limitada por el pequeño paso óptico condicionado al diámetro interno del capilar de separación. Por otro lado, la espectrometría de masas (*MS*), técnica de detección de gran selectividad y sensibilidad, con tiempos de respuesta rápidos, cuya capacidad para alcanzar bajos límites de detección a la vez que proporcionar información estructural sobre los analitos ha sido ampliamente demostrada en su utilización como detector en cromatografía líquida<sup>87</sup>.

En comparación con el acoplamiento entre espectrometría de masas y cromatografía líquida (*LC-MS*), el acoplamiento con electroforesis capilar 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, la primera descripción del acoplamiento *CE-MS* propuesta por Smith y col. en 1987 utilizaba una envoltura metálica alrededor del extremo de salida del capilar, que sustituía al electrodo terminal de la configuración *CE* tradicional<sup>84</sup> 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*.

---

<sup>84</sup> 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".

<sup>85</sup> R. D. Smith, J. A. Olivares, N. T. Nguyen, H. R. Udseth, *Anal. Chem.* 60 (1988) 436. "Capillary zone electrophoresis-mass spectrometry using an electrospray ionization interface".

<sup>86</sup> E. J. Maxwell, D. D. Y. Chen, *Anal. Chim. Acta* 627 (2008) 25. "Twenty years of interface development for capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry".

<sup>87</sup> 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".

Este diseño inicial fue modificado rápidamente por estos mismos autores<sup>85</sup> 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 electro spray estable.

En estos últimos 25 años se han descrito una amplia variedad de modificaciones en las interfaces con objeto de maximizar la potencialidad del acoplamiento *CE-MS*. De forma genérica, estos desarrollos se pueden estructurar en dos grupos: interfaces basadas en la utilización o no de un líquido adicional.

### Interfaces que emplean un líquido adicional.

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. En la Figura 1.9 se muestran los tres tipos de interfaces que emplean un líquido adicional<sup>86</sup>.

Este flujo adicional tiene varias funciones. La primera es establecer contacto eléctrico entre el electrodo y el electrolito de fondo (*BGE*) 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 electro spray y por tanto con la detección por espectrometría de masas. Además, el líquido adicional aporta estabilidad al electro spray ya que el flujo electroforético no es capaz de mantener por sí mismo un electro spray estable salvo que se trabaje en condiciones extremas que maximicen el flujo electroosmótico.

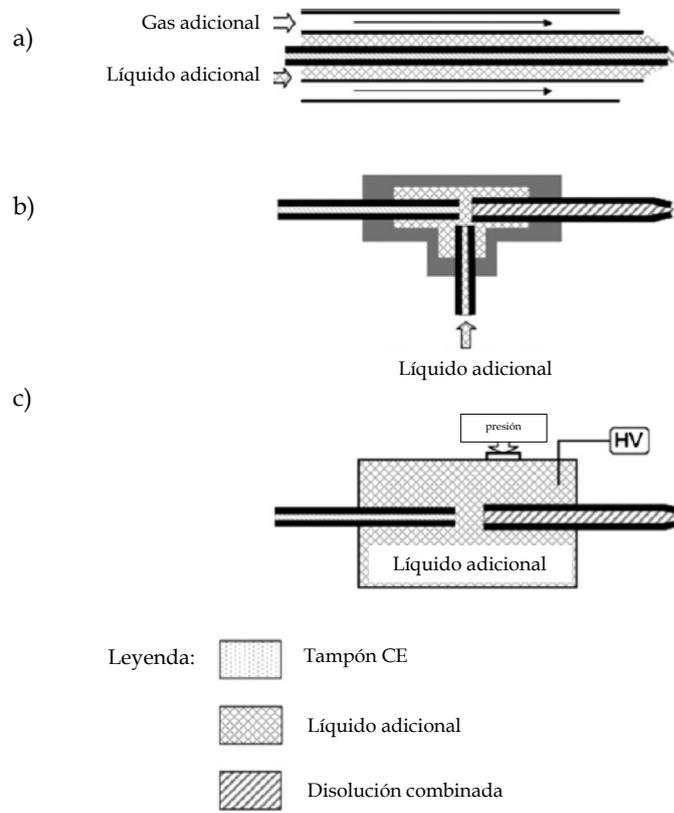


Figura 1.9. Configuración de las interfaces que emplean un líquido adicional.

a) Interfaz de líquido adicional coaxial con gas envolvente.

b) Interfaz de unión líquida.

c) Interfaz de unión líquida presurizada. (*HV*: Alto voltaje).

La configuración más común de este tipo de interfaz es la que implica un diseño coaxial (Figura 1.9.a) donde un flujo continuo de líquido adicional es distribuido a través de un tubo que rodea el final del capilar de separación.

Las interfaces comerciales actuales emplean un diseño coaxial de tres tubos concéntricos que se muestra de forma detallada en la Figura 1.10. El tubo más interno es el capilar de separación que sobresale ligeramente ( $\sim 2 \mu\text{m}$ ) 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 gas necesario para mejorar la nebulización y el proceso de desolvatación, aumentando aún más la estabilidad del electrospray.

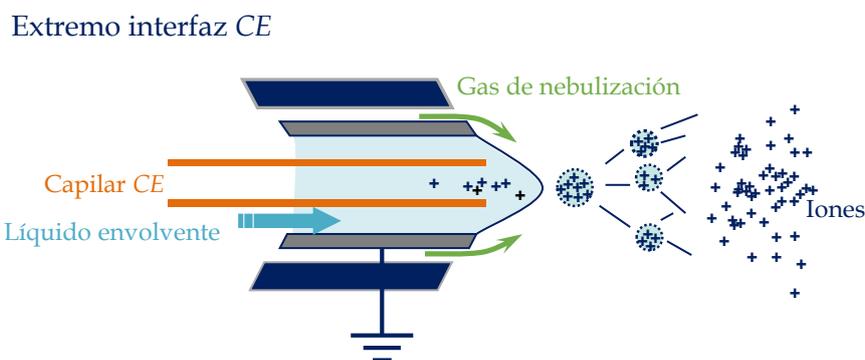


Figura 1.10. Configuración de tubos concéntricos por los que circula el líquido adicional y el gas de nebulización.

La ventaja de la configuración coaxial es que no existe volumen muerto, por lo que la separación obtenida en el capilar no se ve alterada por flujos adicionales hasta que los analitos han salido de él. Como desventaja, se requieren altos flujos del líquido adicional ( $\sim 2 \mu\text{L min}^{-1}$ ) para trabajar de forma estable en esta configuración, lo que conlleva la dilución de los analitos. Además, el flujo adicional alrededor del capilar puede crear succión lo que puede conllevar perfiles de flujo parabólico y menores resoluciones.

Con el fin de reducir el efecto de dilución, manteniendo los beneficios de la interfaz con líquido adicional, se han planteado diversas configuraciones alternativas. Una de ellas es la de unión líquida, ilustrada en la Figura 1.9.b, donde el líquido adicional se añade al flujo electroforético en una unión en forma de T a través de un espacio estrecho (25–50  $\mu\text{m}$ ) comprendido entre el capilar y la aguja del electrospray<sup>88,89</sup>. Desafortunadamente el proceso de mezcla ortogonal produce un ensanchamiento de los picos y reduce la eficiencia de la separación<sup>90,91</sup>.

Más recientemente se han desarrollado interfaces de líquido adicional que utilizan flujos mucho menores (en algunos casos menores de 200  $\text{nL min}^{-1}$ ). Una de estas configuraciones, la de unión líquida presurizada, es similar al diseño de la unión líquida original; sin embargo, la unión es ligeramente más ancha (hasta 300  $\mu\text{m}$ ) y se localiza en un reservorio presurizado de líquido adicional, tal como se muestra en la Figura 1.9.c. La adición de presión ayuda a prevenir la desfocalización del flujo electroforético en el espacio de unión líquida, lo que conlleva una menor pérdida en la resolución. Para evitar que se produzcan contraflujos, debido a la diferencia de presión, el extremo inicial del capilar debe estar presurizado. El líquido del reservorio establece el contacto eléctrico entre el BGE y el electrodo y también mantiene un flujo constante en la punta del electrospray si el flujo electroforético no es suficiente<sup>92</sup>. El flujo adicional en esta “unión presurizada” también introduce un factor de dilución, aunque inferior al que se produce en el caso del diseño coaxial.

A pesar de la dilución inherente a las interfaces con líquido adicional éstas ofrecen importantes ventajas. Dado que la disolución que sale de la interfaz está principalmente formada por líquido adicional, es posible utilizar electrolitos o aditivos en la separación electroforética que de otra manera serían incompatibles con ESI-MS. Además, la utilización del líquido adicional simplifica la necesidad de crear contacto eléctrico en el extremo del capilar electroforético. Finalmente, las interfaces de líquido adicional son generalmente robustas y se adaptan bien a la comercialización, lo que ha ayudado a que la técnica se haya expandido. El diseño

<sup>88</sup> T. Wachs, R. L. Sheppard, J. Henion, *J. Chromatogr. B* 685 (1996) 335. “Design and applications of a self-aligning liquid junction–electrospray interface for capillary electrophoresis–mass spectrometry”.

<sup>89</sup> M. Jussila, K. Sinervo, S. P. Porras, M. L. Riekkola, *Electrophoresis* 21 (2000) 3311. “Modified liquid junction interface for nonaqueous capillary electrophoresis–mass spectrometry”.

<sup>90</sup> W. M. A. Niessen, U. R. Tjaden, J. van der Greef, *J. Chromatogr.* 636 (1993) 3. “Capillary electrophoresis–mass spectrometry”.

<sup>91</sup> S. Pleasance, P. Thibault, J. Kelly, *J. Chromatogr.* 591 (1992) 325. “Comparison of liquid–junction and coaxial interfaces for capillary electrophoresis–mass spectrometry with application to compounds of concern to the aquaculture industry”.

<sup>92</sup> S. Fanali, G. D’Orazio, F. Foret, K. Kleparnik, Z. Aturki, *Electrophoresis* 27 (2006) 4666. “On–line CE–MS using pressurized liquid junction nanoflow electrospray interface and surface–coated capillaries”.

de tipo coaxial sigue siendo el más utilizado, en posición ortogonal al cono muestreador del espectrómetro de masas, Figura 1.11.

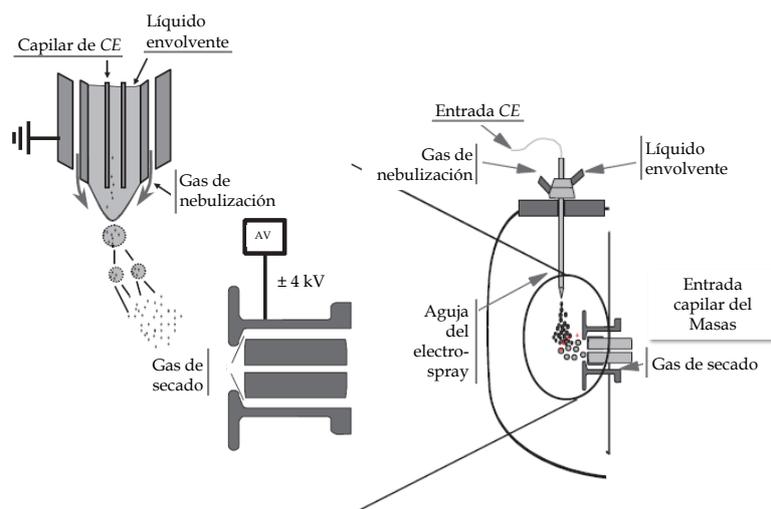


Figura 1.11. Interfaz comercial de conexión *CE-MS*. (AV: Alto voltaje).

### Interfaces sin líquido adicional.

Aunque la primera interfaz descrita por Olivares y col. en 1987 para el acoplamiento *CE-ESI-MS* fue de hecho, una interfaz sin líquido adicional<sup>84</sup>, este diseño fue rápidamente reemplazado por las interfaces con líquido adicional. Recientemente las interfaces que no utilizan líquido adicional están ganando nuevamente popularidad debido a la búsqueda constante de una mejora en los límites de detección con dispositivos en los que no se produzca dilución de la muestra. Se han propuesto diversas modificaciones instrumentales en este sentido, cuyas mejoras se relacionan con una de estas tres características fundamentales del acoplamiento *CE-MS*: la estrategia para establecer el contacto eléctrico, la forma de la punta del

extremo de salida del capilar y la robustez del montaje de los diferentes componentes, como requisito importante para su comercialización.

La forma de establecer el contacto eléctrico en este tipo de interfaces se basa en recubrir la superficie exterior del extremo de salida del capilar con una fina capa de metal, normalmente de oro. El objetivo es crear un contacto eléctrico estable en el extremo del capilar, de forma que sirva de electrodo terminal para CE en ausencia de vial de salida y también, de electrodo emisor para la formación del electrospray. Este tipo de puntas no se fabrican comercialmente por lo que han de ser creadas manualmente por el operario. Los materiales más comunes de construcción son vidrio y sílice, aunque también se han fabricado puntas de acero inoxidable.

El contacto eléctrico se crea fácilmente en el caso de puntas metálicas; sin embargo, en el caso mucho más general de puntas de vidrio-sílice se han seguido distintas estrategias. El método más utilizado para establecer el contacto eléctrico es recubrir la superficie externa de la punta de emisión con un material conductor como oro<sup>93,94,95</sup>, plata<sup>96</sup>, cobre<sup>97</sup>, níquel<sup>98</sup> o grafito<sup>99,100,101,102,103</sup>.

Desafortunadamente, la vida de estas puntas recubiertas es muy limitada debido a los altos campos eléctricos que se aplican al metal que recubre la punta. En

---

<sup>93</sup> R. S. Ramsey, S. A. McLuckey, *J. Microcolumn Sep.* 7 (1995) 461. "Capillary electrophoresis/electrospray ionization ion trap mass spectrometry using a sheathless interface".

<sup>94</sup> S. Nilsson, O. Klett, M. Svedberg, A. Amirkhani, L. Nyholm, *Rapid Commun. Mass Sp.* 17 (2003) 1535. "Gold-coated fused-silica sheathless electrospray emitters based on vapor-deposited titanium adhesion layers".

<sup>95</sup> Z. Kele, G. Ferenc, T. Klement, G. K. Toth, T. Janaky, *Rapid Commun. Mass Sp.* 19 (2005) 881. "Design and performance of a sheathless capillary electrophoresis/mass spectrometry interface by combining fused-silica capillaries with gold-coated nanoelectrospray tips".

<sup>96</sup> Y. R. Chen, G. R. Her, *Rapid Commun. Mass Sp.* 17 (2003) 437. "A simple method for fabrication of silver-coated sheathless electrospray emitters".

<sup>97</sup> A. D. Zamfir, N. Dinca, E. Sisu, J. Peter-Katalinic, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 414. "Copper-coated microsyringe interface for on-line sheathless capillary electrophoresis electrospray mass spectrometry of carbohydrates".

<sup>98</sup> L. Bendahl, S. H. Hansen, J. Olsen, *Rapid Commun. Mass Sp.* 16 (2002) 2333. "A new sheathless electrospray interface for coupling of capillary electrophoresis to ion-trap mass spectrometry".

<sup>99</sup> Y. Z. Chang, G. R. Her, *Anal. Chem.* 72 (2000) 626. "Sheathless capillary electrophoresis/electrospray mass spectrometry using a carbon-coated fused-silica capillary".

<sup>100</sup> Y. Z. Chang, Y. R. Chen, G. R. Her, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5083. "Sheathless capillary electrophoresis/electrospray mass spectrometry using a carbon-coated tapered fused-silica capillary with a beveled edge".

<sup>101</sup> S. Nilsson, M. Wetterhall, J. Bergquist, L. Nyholm, K. E. Markides, *Rapid Commun. Mass Sp.* 15 (2001) 1997. "A simple and robust conductive graphite coating for sheathless electrospray emitters used in capillary electrophoresis/mass spectrometry".

<sup>102</sup> X. F. Zhu, S. Thiam, B. C. Valle, I. M. Warner, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5405. "A colloidal graphite coated emitter for sheathless capillary electrophoresis-nanoelectrospray ionization mass spectrometry".

<sup>103</sup> A. P. Dahlin, M. Wetterhall, G. Liljegren, S. K. Bergstrom, P. Andrén, L. Nyholm, K. E. Markides, J. Bergquist, *Analyst* 130 (2005) 193. "Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry from a polymer modified poly (dimethylsiloxane) microchip with an integrated graphite electrospray tip".

la mayoría de los casos solo pueden utilizarse unos pocos días, antes de que el deterioro inutilice el sistema.

Con respecto a la forma de la punta del capilar hay que indicar que, en esta configuración, como el líquido que llega al electrospray es sólo el correspondiente al flujo electroosmótico, es necesario estrechar el diámetro interno del extremo de salida del capilar para que acabe en un orificio muy pequeño y, de esta manera, obtener un electrospray estable incluso a caudales tan bajos.

En general, las interfaces sin líquido adicional requieren la sustitución frecuente de la punta del capilar, lo que conlleva una cuidadosa atención de la alineación y posicionamiento de ésta con respecto a la entrada del electrospray. Así, estas interfaces, no son útiles para su aplicación en laboratorios de rutina debido a la falta de interfaces disponibles comercialmente y la escasa reproducibilidad en el proceso de modelado, fabricación y manejo de estos dispositivos<sup>104</sup>. En la Figura 1.12 se muestran diferentes métodos para crear contacto eléctrico en interfaces sin líquido adicional<sup>86</sup>.

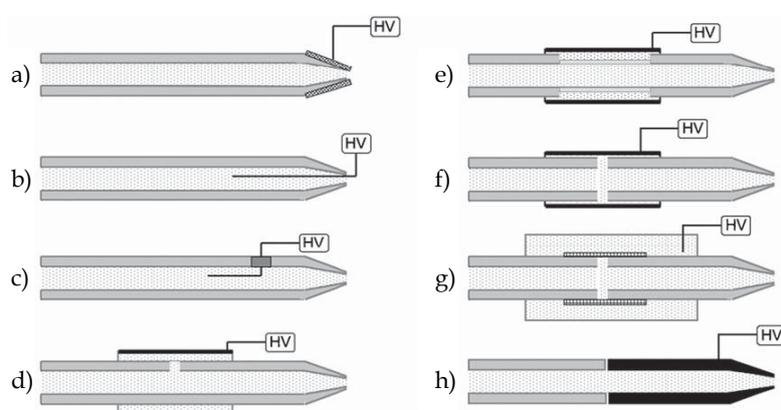


Figura 1.12. Métodos para crear contacto eléctrico en las interfaces sin líquido adicional.

a) Revestimiento conductor aplicado a la punta. b) Alambre insertado en la punta. c) Alambre insertado a través de un orificio. d) Interfaz de flujo dividido con envoltura metálica. e) Pared del capilar poroso con funda metálica. f) Unión con funda metálica. g) Unión con microdiálisis. h) Unión con punta conductora. (HV: Alto voltaje).

---

<sup>104</sup> C. W. Klampfl, *Electrophoresis* 30 (2009) S83. “CE with MS detection: a rapidly developing hybridized technique”.

Como conclusión global sobre el acoplamiento entre *CE* y *ESI-MS* puede decirse que este acoplamiento instrumental ha experimentado un notable desarrollo en las últimas dos décadas, hasta el punto en que se utiliza de forma rutinaria en laboratorios de investigación en química analítica. A ello han contribuido las interfaces disponibles comercialmente. Sin embargo, la incorporación de esta técnica en otros campos de investigación es relativamente lenta, debido a varios retos que se presentan con respecto a la utilización de muchos tipos de electrolitos y aditivos, que todavía son incompatibles con el sistema *CE-MS*.

## 1.6. ELECTROFORESIS CAPILAR EN EL ANÁLISIS DE NUCLEÓSIDOS Y NUCLEOBASES MODIFICADOS. ANTECEDENTES.

Para la determinación de los niveles de nucleósidos y nucleobases modificados en orina se han propuesto diferentes técnicas, principalmente basadas en inmunoensayo y en cromatografía líquida.

La aplicación de electroforesis capilar también ha sido descrita, aunque la mayoría de los procedimientos propuestos se basan en la aplicación de la modalidad de “cromatografía electrocinética micelar” (*MEKC*)<sup>27,28,29,30,31,105,106,107</sup>, lo que implica el uso de tensioactivos en el medio de separación. La presencia de tensioactivos no volátiles en el tampón de separación limita la utilización de la espectrometría de masas (*MS*) como técnica de detección.

Debido al creciente interés por el empleo de los nucleósidos y nucleobases como biomarcadores tumorales muchos de los trabajos actuales se han centrado en

---

<sup>105</sup> P. Wang, J. Ren, *J. Pharm. Biom. Anal.* 34 (2004) 277. “Separation of purine and pyrimidine bases by capillary electrophoresis using  $\beta$ -cyclodextrin as an additive”.

<sup>106</sup> F. Carlucci, A. Tabucchi, A. Aiuti, F. Rosi, F. Floccari, R. Pagani, E. Marinello, *Clin. Chem.* 49 (2003) 1830. “Capillary electrophoresis in diagnosis and monitoring of adenosine deaminase deficiency”.

<sup>107</sup> 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”.

la determinación, mediante estudios quimiométricos<sup>108,109,110,111,112</sup>, de cuál de estos nucleósidos o nucleobases modificados son los que tienen más peso a la hora de ser elegidos como biomarcadores.

En la determinación de nucleósidos y nucleobases modificados utilizando *MEKC*, en la mayoría de ellos, la detección empleada es espectrofotometría de barrera de diodos (*diode array detector, DAD*). También existe una referencia que emplea *CEC* y en cuatro de ellas se trabaja en modo *CZE*.

Con respecto a la extracción de los analitos de la muestra de orina, la mayoría de los métodos descritos en bibliografía se basan en la utilización de un sorbente de afinidad denominado Affi-gel 601<sup>113,114,115,116</sup>.

El Affi-gel 601 es un sorbente de tipo polimérico formado por poliacrilamida con grupos inmovilizados de ácido fenilborónico. Este sorbente se une selectivamente a los grupos cis-diol del glucósido como se muestra en la Figura 1.13.

---

<sup>108</sup> E. Szymanska, M. J. Markuszewski, X. Capron, A. M. van Nederkassel, Y. Vander Heyden, M. Markuszewski, K. Krajka, R. Kaliszán, *J. Pharmaceut. Biomed.* 43 (2007) 413. "Increasing conclusiveness of metabonomic studies by cheminformatic preprocessing of capillary electrophoretic data on urinary nucleoside profiles".

<sup>109</sup> Y. Shan, R. Zhao, G. Xu, H. M. Liebich, Y. Zhang, *Anal. Chim. Acta* 471 (2002) 77. "Application of probabilistic neural network in the clinical diagnosis of cancers based on clinical chemistry data".

<sup>110</sup> Y. X. Zhang, *Talanta* 73 (2007) 68. "Artificial neural networks based on principal component analysis input selection for clinical pattern recognition analysis".

<sup>111</sup> E. Szymanska, M. J. Markuszewski, Y. V. Heyden, R. Kaliszán, *Electrophoresis* 30 (2009) 3573. "Efficient recovery of electrophoretic profiles of nucleoside metabolites from urine samples by multivariate curve resolution".

<sup>112</sup> E. Szymanska, M. J. Markuszewski, X. Capron, A-M van Nederkassel, H. Y. Vander, M. Markuszewski, K. Krajka, R. Kaliszán, *Electrophoresis* 28 (2007) 2861. "Evaluation of different warping methods for the analysis of CE profiles of urinary nucleosides".

<sup>113</sup> E. Szymanska, M. J. Markuszewski, K. Bodziach, R. Kaliszán, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 1118. "Development and validation of urinary nucleosides and creatinine assay by capillary electrophoresis with solid phase extraction".

<sup>114</sup> Y. Jiang, Y. Ma, *Anal. Chem.* 81 (2009) 6474. "A fast capillary electrophoresis method for separation and quantification of modified nucleosides in urinary samples".

<sup>115</sup> H. M. Liebich, S. Müller-Hagedorn, F. Klaus, K. Meziane, K-R Kim, A. Frickenschmidt, B. Kammerer, *J. Chromatogr. A* 1071 (2005) 271. "Chromatographic, capillary electrophoretic and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of urinary modified nucleosides as tumor markers".

<sup>116</sup> Y. Mao, X. Zhao, S. Wang, Y. Cheng, *Anal. Chim. Acta* 598 (2007) 34. "Urinary nucleosides based potential biomarker selection by support vector machine for bladder cancer recognition".

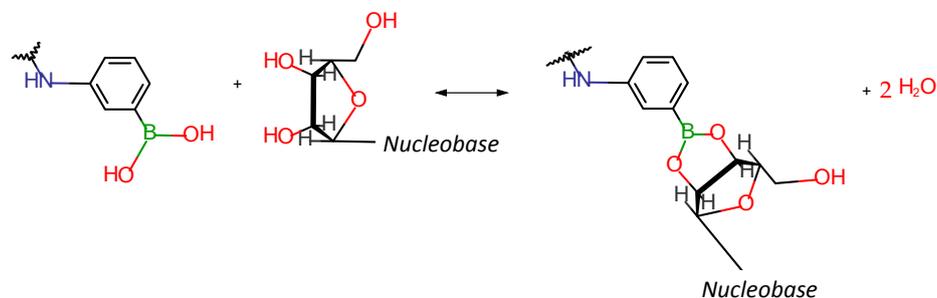


Figura 1.13. Mecanismo de retención del Affi-gel 601<sup>117</sup>.

Estos enlaces se forman solo en aquellos nucleósidos que poseen grupos cis-dioles en la posición C-2 y C-3 de la ribosa. Los nucleósidos que en esas posiciones presentan un H y un OH, como son los compuestos 2'-deoxiguanosina, y la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina<sup>118,119</sup>, así como las nucleobases, no van a ser retenidos por este material, por lo que no podrán ser extraídos de la orina siendo necesario buscar una alternativa para su extracción.

Hay que resaltar que en la revisión bibliográfica realizada solo se ha encontrado una alternativa al uso de Affi-gel 601 en la etapa de extracción. En ella se emplea un sorbente de sílice C<sub>18</sub><sup>118</sup>.

Como ya se ha indicado anteriormente el tipo de detector empleado suele ser barrera de diodos, aunque los artículos más recientes ya están introduciendo otros tipos de detectores más sensibles, como es la detección por espectrometría de

<sup>117</sup> 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. "Role of nitrogen lewis basicity in boronate affinity chromatography of nucleosides".

<sup>118</sup> D. J. Weiss, C. E. Lunte, *Electrophoresis* 21 (2000) 2080. "Detection of a urinary biomarker for oxidative DNA damage 8-hydroxydeoxyguanosine by capillary electrophoresis with electrochemical detection".

<sup>119</sup> 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".

## I. INTRODUCCIÓN

---

masas<sup>116,120</sup>, ya sea acoplado a un cuadrupolo simple, a un triple cuadrupolo o a un detector de tiempo de vuelo<sup>115</sup>.

A la vista de los resultados bibliográficos, donde abundan las referencias que emplean el Affi-gel 601 en el proceso de extracción, en este trabajo se pretende desarrollar un modo de extracción empleando sorbentes de tipo polimérico que permita la retención tanto de los nucleósidos que poseen grupos cis-diol, como aquellos que no los poseen.

En la Tabla 1.4 se recogen los antecedentes encontrados con respecto a la aplicación de la electroforesis capilar en la determinación de nucleósidos y nucleobases modificados.

---

<sup>120</sup> 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".

Tabla 1.4. Antecedentes bibliográficos de la determinación de nucleósidos y nucleobases en muestras de orina.

Analito	Preconcentración Extracción	Separación Detección	LD <sup>c</sup>	Patrón Interno	Ref
7 nsm <sup>a</sup> 5 nmt <sup>b</sup>	Affi-gel 601	MEKC/DAD	–	3-Deazauridina	[27]
7 nsm 6 nmt	Affi-gel 601	MEKC/DAD	3.1–74.2	3-Deazauridina	[28]
8 nsm 6 nmt	Affi-gel 601	MEKC/DAD	–	3-Deazauridina	[29]
8 nsm 6 nmt	Affi-gel 601	MEKC/DAD	1.7–9.2	3-Deazauridina	[30]
8 nsm 6 nmt	Affi-gel 601	MEKC/DAD	4.8–12.2	3-Deazauridina	[31]
4 nsm	Inyección directa	MEKC/DAD	0.8–2.9	–	[106]
8 nsm 6 nmt	Affi-gel 601	MEKC/DAD	1.8–7.1	3-Deazauridina	[107]
7 nsm 2 nmt	Affi-gel 601	MEKC/DAD	–	–	[108]
8 nsm 6 nmt	Affi-gel 601	MEKC/DAD	–	3-Deazauridina	[109]
8 nsm 6 nmt	Affi-gel 601	MEKC/DAD	–	3-Deazauridina	[110]
4 nsm 4 nmt	Affi-gel 601	MEKC/DAD	–	8-bromoguanosina	[111]
7 nsm 2 nmt	Affi-gel 601	MEKC/DAD	–	–	[112]
7 nsm 4 nmt	Affi-gel 601	MEKC/DAD	0.2–2.3	8-bromoguanosina	[113]

<sup>a</sup>. nsm: Nucleósidos sin modificar.

<sup>b</sup>. nmt: Nucleósidos metilados.

<sup>c</sup>. LD: Límites de detección expresados en micromolar ( $\mu\text{M}$ ), salvo que se indique lo contrario.

\*. En patrones acuosos.

## I. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.4 (Continuación). Antecedentes bibliográficos de la determinación de nucleósidos y nucleobases en muestras de orina.

Analito	Preconcentración Extracción	Separación Detección	LD <sup>c</sup>	Patrón Interno	Ref
7 nsm <sup>a</sup> 3 nmt <sup>b</sup>	Affi-gel 601	MEKC/DAD	0.6–1.7	–	[114]
7 nsm 6 nmt	Affi-gel 601	MEKC/ MALDI- TOF-MS	10 <sup>2</sup> –10 <sup>4</sup>	Isoguanosina	[115]
8OH2dG	C <sub>18</sub>	CEEC/DAD	0.05*	–	[118]
5 nsm	Inyección directa (hidrostática)	CZE/DAD	0.8–1.8 µg L <sup>-1</sup>	Timina	[105]
2 nsm	Inyección directa	CZE/DAD	0.04 y 0.09	–	[119]
Barrido	–	CZE-MS	–	–	[116]
5 nsm 3 nmt	Affi-gel 601	CZE-MS	0.009–3.8	Catequina	[120]
5 nsm	Microextracción en fase sólida <i>on-line</i> (SPME)	LC-UV (capilar)	40–52 ng mL <sup>-1</sup>	–	[21]
3 nsm 5 nmt	–	UHPLC-UV (Kinetex C <sub>18</sub> )	23–36 ng mL <sup>-1</sup>	–	[24]
6 nsm 6 nmt	Ácido fenilborónico (PBA)	LC-MS/MS (C <sub>18</sub> )	40–180 ng mL <sup>-1</sup>	8-bromoguanosina	[25]

<sup>a</sup>. nsm: Nucleósidos sin modificar.

<sup>b</sup>. nmt: Nucleósidos metilados.

<sup>c</sup>. LD: Límites de detección expresados en micromolar (µM), salvo que se indique lo contrario.

\*. En patrones acuosos.

## 1.7. ANÁLISIS METABOLÓMICO.

Desde finales del siglo pasado, la utilización de la terminología “-ómica” ha sufrido una notable expansión en el estudio e investigación de las ciencias de la vida. Las técnicas “ómicas” son un conjunto de tecnologías analíticas de alto rendimiento empleadas en diferentes disciplinas. Entre ellas, la *genómica*, la *transcriptómica*, la *proteómica* y la *metabolómica*. Todas ellas, dirigidas al entendimiento de los procesos biológicos en células y órganos, así como del organismo en su conjunto a nivel molecular.

La *genómica* se encarga del estudio del conjunto de los genes (genoma) de un organismo. Dicho estudio comprende desde el análisis, la identificación y la cuantificación del genoma, hasta la investigación de las interacciones que se producen entre los genes de un organismo, o bien entre los genes con el medio ambiente. La *transcriptómica* se centra en el estudio de las moléculas intermediarias (ARNm) que constituyen los productos de la transcripción del ADN, a partir de los cuales se sintetizan las proteínas. La *proteómica* se encarga del estudio de las proteínas y péptidos codificados por un organismo (proteoma), así como de los efectos de su modificación, interacción y actividad en un sistema biológico.

La tecnología “ómica” de más reciente aparición es la *metabolómica*, capaz de revelar la respuesta de los sistemas biológicos a la influencia genética, nutricional y ambiental a través del análisis del conjunto de metabolitos (metaboloma).

Los avances en las técnicas analíticas han sido cruciales para el desarrollo de las tecnologías “ómicas”. Al mismo tiempo, la aparición de herramientas bioinformáticas ha sido una pieza clave tanto para el avance de dichas técnicas como para la interpretación e integración de los resultados obtenidos<sup>121</sup>. Todo esto unido a la mejora de las bases de datos *on-line*, en las que se recoge la información obtenida de los experimentos realizados mediante el empleo de estas tecnologías, ha contribuido al progreso de todas estas “ómicas”. Con todo esto queda demostrado el enfoque multidisciplinar requerido por estas técnicas.

---

<sup>121</sup> G. Blekherman, R. Laubenbacher, D. F. Cortes, P. Mendes, F. M. Toti, S. Akman, S. V. Torti, V. Shulaev, *Metabolomics* 7 (2011) 329. “Bioinformatics tools for cancer metabolomics”.

### 1.7.1. LA METABOLÓMICA.

La metabolómica ha sido definida como la medida cuali- y cuantitativa del metaboloma o conjunto de metabolitos de un determinado sistema biológico. Los metabolitos pueden definirse como los compuestos de bajo peso molecular (< 1500 Da) sintetizados por un sistema biológico (célula, tejido, fluido, órgano, organismo, etc.) en un determinado estado fisiológico. El metaboloma representa la expresión final del genoma, transcriptoma y proteoma, dando así cuenta de la interrelación existente entre los distintos niveles del flujo de información en biología, Figura 1.14. Este flujo de información se inicia en el ADN, concretamente en la información genética que contiene, y que transcrita a través del ARN determina la síntesis de proteínas y éstas a su vez, la síntesis de los metabolitos presentes en cierto sistema biológico.

Hasta el momento se ha dedicado un considerable esfuerzo a la determinación del genoma y proteoma para varios sistemas, pero se ha prestado mucha menos atención a los conocimientos de los productos finales de la expresión genética, los metabolitos.

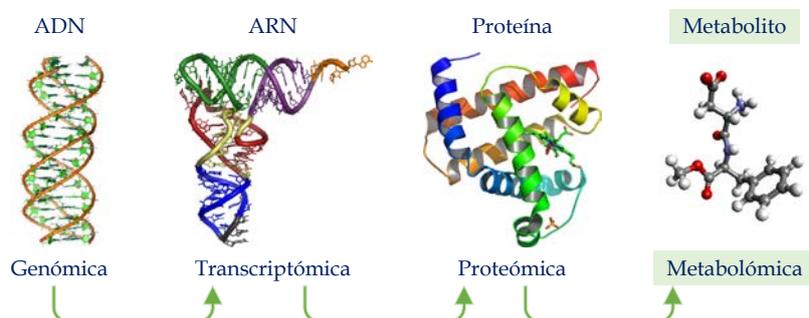


Figura 1.14. Flujo de información en biología.

El metaboloma refleja los efectos combinados de muchas influencias (fármacos, factores ambientales, estado de salud, nutrición, modificaciones genéticas, etc) sobre el estado fisiológico, resultando muy sensible e indicativo de la

naturaleza de cualquier cambio en los sistemas biológicos<sup>122</sup>, por lo que su determinación contribuye también a mejorar el conocimiento de la bioquímica a nivel celular. Dado el potencial de esta disciplina, el número de investigaciones que emplean una aproximación metabolómica ha aumentado exponencialmente en la última década.

Dentro del análisis metabolómico se pueden distinguir diferentes metodologías:

- ⇒ Análisis de metabolitos específicos (*metabolite target analysis*): Hace referencia a la determinación de uno o un número limitado de compuestos de interés para la investigación que se pretende. Se suele utilizar para el análisis de compuestos que requieran gran sensibilidad y con el fin de mejorar la relación señal/ruido junto con el empleo de tratamientos de muestra de purificación que eliminen las posibles interferencias asociadas a la matriz de la muestra.
- ⇒ Perfil metabólico (*metabolic profiling*): Permite la cuantificación de una serie de metabolitos conocidos y relacionados, bien por su semejanza estructural o funcional, bien por estar implicados en una ruta metabólica específica. En este caso la preparación de la muestra y la adquisición de los datos pueden focalizarse en las propiedades químicas de estos compuestos, con la ventaja de reducir las interferencias asociadas a efectos de matriz y proporcionar elevada sensibilidad.
- ⇒ Huella metabólica (*metabolic fingerprinting*): Hace referencia al análisis de metabolitos en una muestra con fines de clasificación, es decir, se pretende la diferenciación entre muestras correspondientes a distintas poblaciones o la clasificación de muestras desconocidas en grupos identificables. Es primordial obtener una gran cantidad de información fiable, aunque el hecho de obtener señales para un número muy elevado de metabolitos dificulte, e incluso impida, su identificación. Estos análisis requieren un mínimo pretratamiento de muestra.

---

<sup>122</sup> J. K. Nicholson, J. C. Lindon, *Nature* 455 (2008) 1054. “*Systems biology: Metabonomics*”.

## I. INTRODUCCIÓN

---

Puesto que el objetivo de la metabolómica es el análisis cualitativo y cuantitativo de un conjunto o de todos los metabolitos de un sistema biológico, tanto el tratamiento de muestra, como la adquisición de los datos deben de estar orientados a cubrir el mayor intervalo de compuestos presentes en la muestra. Además, el método analítico debe ser, suficientemente sensible, independiente de la matriz y rápido. Dado que la información generada es compleja se necesitan herramientas informáticas para manejar, almacenar y evaluar los datos adquiridos.

Debido al desarrollo de las herramientas “ómicas”, en la actualidad se está observando una evolución progresiva que engloba desde el estudio de los aspectos más puramente clínicos que identifican las diferencias entre individuos sanos o enfermos, hasta la investigación biomédica, que pretende profundizar en los mecanismos moleculares por lo que se desencadena, progresa o se trata una determinada patología. La metabolómica posee un gran potencial en estudios clínicos ya que permite asociar perfiles metabólicos a distintas situaciones fisiológicas y fisiopatológicas. Por lo tanto, juega un papel esencial en el conocimiento y diagnóstico de enfermedades<sup>36</sup> ya que ha demostrado una gran eficacia en la detección de afecciones respiratorias<sup>123</sup>, diabetes<sup>124</sup>, enfermedades cardiovasculares<sup>125</sup>, y cáncer<sup>126</sup>, entre otras muchas patologías.

Una de las principales dificultades en el desarrollo de métodos analíticos siguiendo una estrategia metabolómica radica en la naturaleza heterogénea de los metabolitos de cualquier sistema biológico (iones inorgánicos, aminoácidos, ácidos orgánicos, lípidos, etc), los cuales presentan un amplio intervalo de polaridades, tamaños moleculares, diferentes formas iónicas al pH fisiológico, etc. Otro factor restrictivo es la acusada diferencia en sus concentraciones, que se estima que puede variar incluso hasta 7–9 órdenes de magnitud (pmol–mmol)<sup>127</sup>. Dada esta heterogeneidad, no existe un método de separación de muestra ni una técnica analítica universal que permita la detección de todos los metabolitos presentes en una determinada muestra biológica. Por otro lado, dada la gran resolución y sensibilidad de la instrumentación actual empleada en los estudios metabolómicos,

---

<sup>123</sup> S. Snowden, S-E Dahlén, C. E. Wheelock, *Bioanalysis* 4 (2012) 2265. “Application of metabolomics approaches to the study of respiratory diseases”.

<sup>124</sup> N. Friedrich, *J. Endocrinol* 215 (2012) 29. “Metabolomics in diabetes research”.

<sup>125</sup> T. Senn, S. L. Hazen, W. H. Wilson–Tang, *Prog. Cardiovasc. Dis.* 55 (2012) 70. “Translating metabolomics to cardiovascular biomarkers”.

<sup>126</sup> E. G. Armitage, C. Barbas, *J. Pharmaceut. Biomed.* 87 (2014) 1. “Metabolomics in cancer biomarker discovery: Current trends and future perspectives”.

<sup>127</sup> W. B. Dunn, D. I. Ellis, *Trends Analyt. Chem.* 24 (2005) 285. “Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies”.

se puede llegar a generar miles de señales analíticas para cada muestra con la dificultad que conlleva su manejo e interpretación<sup>128</sup>. Los análisis metabolómicos de muestras biológicas se traducen en una enorme cantidad de datos que requieren mucho tiempo de análisis computacional<sup>129</sup>. Por este motivo el procesamiento y análisis de los datos obtenidos en metabolómica es un reto que requiere el uso de herramientas bioinformáticas específicas como *MZmine*, lenguaje R, *IDEOM*, etc. Para obtener una información válida y útil de los datos ya procesados se hace necesaria la aplicación posterior de herramientas estadísticas adecuadas. El uso del análisis estadístico multivariante está muy extendido en metabolómica, debido a la capacidad que posee de seleccionar, de entre todos los metabolitos detectados, aquellos más importantes (los que diferencian distintos grupos de muestras) y que son, por tanto, posibles biomarcadores. Otra dificultad reside en la identificación de los metabolitos a partir de las señales generadas por las diferentes técnicas analíticas. La identificación se suele llevar a cabo mediante comparación de los datos experimentales con los datos teóricos publicados en bases de datos especializadas (*HMDB*, *METLIN*, *PubChem*, *LipidMaps*, *KEGG*, *MassBank*).

---

<sup>128</sup> R. Goodacre, S. Vaidyanathan, W. B. Dunn, G. G. Harrigan, D. B. Kell, *Trends Biotechnol.* 22 (2004) 245. “*Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data*”.

<sup>129</sup> H. J. Issaq, Q. N. Van, T. J. Waybright, G. M. Muschik, T. D. Veenstra, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 2183. “*Analytical and statistical approaches to metabolomics research*”.

### 1.7.2. EL EXPERIMENTO METABOLÓMICO.

Un experimento metabolómico abarca desde la toma de muestra y el análisis de la misma mediante una técnica analítica de alto rendimiento adecuada al objeto de análisis; pasando por el tratamiento de los datos mediante técnicas estadísticas multivariantes; la interpretación de los mismos y validación de los modelos resultantes. Finalmente se busca identificar aquellos metabolitos que potencialmente se han visto alterados debido a la patología objeto de estudio, que es lo que se conoce como metabolitos discriminantes.

El hecho de que un metabolito sea discriminante entre dos grupos de individuos no le convierte en biomarcador de la patología y para considerarlo como biomarcador candidato debería de mostrar una relación biológica clara con ésta. Por lo que a continuación es necesario realizar una validación analítica y biológica de este metabolito. El estudio debe realizarse por tanto con un amplio número de individuos y validarlo en individuos nuevos con la misma patología.

El objetivo último es averiguar el significado biológico de ese biomarcador o grupo de posibles biomarcadores, y situarlo dentro de la ruta metabólica de la que proceda. Sin embargo, el paso clave antes de alcanzar la categoría de biomarcador candidato es estudiar la selectividad.

En la Figura 1.15 se observa un esquema de las etapas que conforman el estudio metabolómico.

<b>1</b>	<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b>
	<p>Descripción del modelo experimental</p> <p>Determinación del número de muestras totales</p> <p>Selección de la técnica analítica y optimización del método</p> <p>Recogida, almacenamiento y tratamiento de las muestras</p> <p>Análisis de las muestras</p>
<b>2</b>	<b>TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS</b>
	<p>Obtención de los datos</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Adquisición de los datos</li> <li>• Pretratamiento de los datos <ul style="list-style-type: none"> <li>• Corrección de la línea base</li> <li>• Multilineamiento de perfiles</li> <li>• Normalización</li> </ul> </li> </ul> <p>Análisis y validación del modelo</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Generación del modelo (<i>PLS-DA</i>, <i>OPLS-DA</i>)</li> <li>• Validación del modelo</li> </ul> <p>Identificación de biomarcadores</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Búsqueda en las bases de datos/confirmación con patrones</li> <li>• Validación analítica y biológica del posible biomarcador</li> </ul>

Figura 1.15. Esquema de las etapas que conforman un estudio metabolómico.

### Preparación de la muestra.

La elección del método de preparación de la muestra es de suma importancia ya que afectará al contenido final de metabolitos en la muestra purificada, y por consiguiente, a la interpretación biológica de los resultados obtenidos del estudio. El método de preparación ideal debería ser lo menos selectivo, y lo más sencillo y rápido posible para evitar la pérdida o degradación de compuestos durante el tratamiento de la muestra.

El tipo de tratamiento de la muestra, previo al análisis metabolómico, dependerá del tipo de muestra biológica y de la técnica analítica elegida para su análisis. Entre los fluidos biológicos humanos más comúnmente empleados en un estudio metabolómico se encuentra la sangre (plasma y suero), la orina y el líquido cefalorraquídeo. Por lo general el tratamiento previo de la muestra está dirigido hacia la eliminación de macromoléculas, como proteínas, para evitar interferencias en el análisis químico y/o supresión de las señales analíticas de los metabolitos.

La orina, como matriz biológica, presenta un contenido bajo de proteínas y una cantidad relativamente pequeña<sup>130</sup> de compuestos de alto peso molecular, por lo que el procedimiento más extendido de tratamiento de muestra consiste en una centrifugación, para eliminar las partículas en suspensión, seguida de una dilución de la muestra en función del tipo de técnica analítica empleada<sup>131</sup>, y en ocasiones, se emplea un paso previo de filtración<sup>132</sup>. También la extracción en fase sólida (SPE)<sup>25,133</sup> es una técnica de tratamiento de muestra especialmente útil en el análisis de perfiles metabólicos en orina y plasma, ya que se considera un procedimiento más selectivo que los métodos mencionados anteriormente<sup>134</sup>.

---

<sup>130</sup> R. F. J. Kemperman, P. L. Horvatovich, B. Hoekman, T. H. Reijmers, F. A. J. Muskiet, R. Bischoff, *J. Proteome. Res.* 6 (2007) 194. “Comparative urine analysis by liquid chromatography–mass spectrometry and multivariate statistics: method development, evaluation, and application to Proteinuria”.

<sup>131</sup> J. V. Alberice, A. F. S. Amaral, E. G. Armitage, J. A. Lorente, F. Algaba, E. Carrilho, M. Márquez, A. García, N. Malats, C. Barbas, *J. Chromatogr. A* 1318 (2013) 163. “Searching for urine biomarkers of bladder cancer recurrence using a liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis–mass spectrometry metabolomics approach”.

<sup>132</sup> M. C. Y. Wong, W. T. K. Lee, J. S.Y. Wong, G. Frost, J. Lodge, *J. Chromatogr. B* 871 (2008) 341. “An approach towards method development for untargeted urinary metabolite profiling in metabonomic research using UPLC/QToF MS”.

<sup>133</sup> E. Szymańska, M. J. Markuszewski, M. Markuszewski, R. Kaliszan, *J. Pharmaceut. Biomed.* 53 (2010) 1305. “Altered levels of nucleoside metabolite profiles in urogenital tract cancer measured by capillary electrophoresis”.

<sup>134</sup> F. Michopoulos, L. Lai, H. Gika, G. Theodoridis, I. Wilson, *J. Proteome. Res.* 8 (2009) 2114. “UPLC–MS–Based analysis of human plasma for metabonomics using solvent precipitation or solid phase extraction”.

### Técnicas analíticas utilizadas en el análisis de metabolitos.

Actualmente no existe una plataforma analítica universal que permita el estudio de todos los metabolitos contenidos en una determinada muestra biológica, aunque los avances técnicos en la instrumentación, así como, la hibridación de técnicas analíticas están aportando una información metabolómica cada vez más compleja. Esta situación sigue siendo un gran reto desde el punto de vista analítico.

Idealmente una técnica analítica aplicada a estudios metabolómicos debería ser capaz de proporcionar perfiles o huellas metabólicas en tiempos de análisis razonablemente pequeños. A su vez, debería poder analizar muestras con el menor pretratamiento posible; debería ser de alto rendimiento y con capacidad para analizar toda clase de metabolitos, con una alta sensibilidad, asegurando su robustez experimental y reproducibilidad. Además debería poder cubrir el alto rango de concentraciones de moléculas endógenas presentes en la muestra y ser capaz de proporcionar datos cuantitativos de todos los componentes presentes en la misma. Finalmente, proporcionaría datos estructurales que permitirían al investigador identificar el analito o grupo de analitos previamente detectados por medio de técnicas estadísticas de análisis multivariante<sup>135</sup>.

La espectroscopía **de resonancia magnética de protón** (RMN-<sup>1</sup>H) es especialmente adecuada para metabolómica ya que es una técnica no destructiva que permite el análisis de muestras muy complejas con un mínimo (o ningún) tratamiento previo. Además, es rápida y no destructiva, y no presenta restricciones relativas a volatilidad, polaridad o existencia de cromóforos. Se estableció como la técnica de referencia en metabolómica por tratarse de una técnica que proporciona información tanto estructural como cuantitativa<sup>136</sup>. A pesar de las ventajas que presenta, la principal limitación de la técnica es su baja sensibilidad en comparación con la espectrometría de masas, lo que hace que en la mayor parte de los estudios por RMN sólo se detecten los metabolitos más abundantes de las muestras.

---

<sup>135</sup> E. M. Lenz, I. D. Wilson, *J. Proteome Res.* 6 (2007) 443. “Analytical strategies in metabolomics”.

<sup>136</sup> K-B Kim, J-Y Yang, S. J. Kwack, H. S. Kim, D. H. Ryu, Y-J Kim, J. Y. Bae, D. S. Lim, S. M. Choi, M. J. Kwon, D. Y. Bang, S. K. Lim, Y. W. Kim, G-S Hwang, B-M Lee, *J. Appl. Toxicol.* 33 (2013) 1251. “Potential metabolomics biomarkers for evaluation of adriamycin efficacy using a urinary <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy”.

Entre todas las técnicas empleadas en el análisis químico, la cromatografía de gases (*GC*), la cromatografía líquida (*LC*) y la electroforesis capilar (*CE*) son las técnicas de separación más utilizadas debido a su elevado poder de resolución. También el acoplamiento entre las técnicas de separación anteriormente mencionadas y técnicas como la resonancia magnética nuclear (*RMN*) y la espectrometría de masas (*MS*) son la base de muchos estudios metabólicos, siendo estas las más empleadas debido a su alta sensibilidad y selectividad<sup>121</sup>.

La **espectrometría de masas** (*MS*) es una técnica que permite la separación de compuestos en función de su relación masa/carga (*m/z*). Permite obtener información cualitativa, cuantitativa y estructural de los compuestos analizados así como su identificación por determinación de masa exacta o su patrón de fragmentación. La selectividad, sensibilidad e información estructural que proporciona esta técnica hacen de ella una herramienta eficaz en análisis metabólicos. El empleo de analizadores de masas de alta y ultra-alta resolución (tiempo de vuelo (*TOF*)<sup>137,138</sup>, espectrómetro de masas de resonancia de ion-ciclotrón con transformada de Fourier (*FT-ICR-MS*)<sup>139</sup>, *Orbitrap*®) son necesarios en metabolómica debido a la gran complejidad del metaboloma de cualquier muestra biológica, cuya elucidación requiere una elevada exactitud en la determinación de los valores de *m/z*, sólo proporcionada por los mencionados analizadores de masas de alta resolución. Además el empleo de espectrómetros de masas en tándem (*MS/MS*) permite adquirir espectros de fragmentación de masas de alta y ultra-alta resolución proporcionando información estructural adicional para su aplicación posterior en el proceso de identificación de los metabolitos de interés. A continuación se hará una breve descripción de las estrategias y de las técnicas de espectrometría de masas más empleadas.

---

<sup>137</sup> T. Zhang, X. Wu, C. Ke, M. Yin, Z. Li, L. Fan, W. Zhang, H. Zhang, F. Zhao, X. Zhou, G. Lou, K. Li, *J. Proteome Res.* 12 (2013) 505. "Identification of potential biomarkers for ovarian cancer by urinary metabolomic profiling".

<sup>138</sup> S. F. Graham, O. P. Chevallier, D. Roberts, C. Hölscher, C. T. Elliot, B. D. Green, *Anal. Chem.* 85 (2013) 1803. "Investigation of the human brain metabolome to identify potential markers for early diagnosis and therapeutic targets of Alzheimer's disease".

<sup>139</sup> F. Li, X. Qin, H. Chen, L. Qiu, Y. Guo, H. Liu, G. Chen, G. Song, X. Wang, F. Li, S. Guo, B. Wang, Z. Li, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27 (2013) 24. "Lipid profiling for early diagnosis and progression of colorectal cancer using direct-infusion electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry".

### Análisis directo mediante MS

Está adquiriendo cada vez más importancia y esto se debe a la rapidez del análisis. Se pueden obtener huellas metabólicas en unos pocos segundos, lo cual presenta una ventaja considerable cuando el número de muestras a analizar es elevado. Este tipo de introducción de la muestra por infusión directa requiere una purificación previa de la fracción metabólica que debe estar disuelta en un disolvente adecuado. Entre las desventajas que presenta el análisis directo está la falta de sensibilidad debido a los fenómenos de supresión iónica<sup>140</sup> y la baja eficiencia en la ionización.

### Acoplamientos GC-MS, LC-MS y CE-MS

Con el fin de disminuir la complejidad espectral y adquirir la mayor información metabólica posible la espectrometría de masas suele ir acoplada a técnicas de separación previas como cromatografía de gases (GC) y cromatografía líquida (LC) junto con la todavía incipiente electroforesis capilar (CE).

La utilización de la espectrometría de masas como sistema de detección acoplado a estas técnicas de separación presenta como principales ventajas una mayor fiabilidad y un aumento de selectividad con respecto a los detectores universales, así como la obtención de información estructural sobre los compuestos separados. El acoplamiento GC-MS se emplea en metabolómica<sup>141</sup> debido a su gran capacidad de separación, robustez instrumental y repetibilidad de los espectros de masas. Es particularmente apropiada para el análisis de compuestos orgánicos volátiles<sup>142</sup>. Sin embargo, muchos compuestos de interés son poco volátiles para su análisis directo por GC y requieren una etapa previa de derivatización en la que dichos compuestos se transforman en derivados menos polares y más volátiles. Esta etapa de pretratamiento de la muestra es el principal inconveniente en cromatografía de gases (GC) dado el elevado número de muestras a analizar.

La cromatografía líquida (LC) presenta una resolución inferior a la que proporciona la cromatografía de gases, permite la separación de compuestos de baja volatilidad y de mayor polaridad sin la necesidad de una etapa previa de

---

<sup>140</sup> L. Lin, Q. Yu, X. Yan, W. Hang, J. Zheng, J. Xing, B. Huang, *Analyst* 135 (2010) 2970. "Direct infusion mass spectrometry or liquid chromatography mass spectrometry for human metabolomics? A serum metabolomic study of kidney cancer".

<sup>141</sup> K. A. Kouremenos, M. Johansson, P. J. Marriott, *J. Cancer* 3 (2012) 404. "Advances in gas chromatographic methods for the identification of biomarkers in cancer".

<sup>142</sup> J. M. Halket, D. Waterman, A. M. Przyborowska, R. K. P. Patel, P. D. Fraser, P. M. Bramley, *J. Exp. Bot.* 56 (2005) 219. "Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS".

derivatización<sup>143</sup>. El acoplamiento *LC-MS* habitual utiliza una fuente de ionización por electrospray (*ESI*) adecuada para la ionización de especies en estado condensado.

Por su parte, la electroforesis capilar (*CE*) permite la separación de muy diversos compuestos (desde iones inorgánicos hasta macromoléculas<sup>144</sup>, e incluso partículas y células) con eficacias muy elevadas, difíciles de analizar mediante las otras técnicas. La interfase *ESI* es la más utilizada en la actualidad para llevar a cabo el acoplamiento a un detector tan selectivo como es un espectrómetro de masas. Este acoplamiento da como resultado una potente herramienta de análisis aunque su aplicación actual a los estudios metabólicos se encuentra menos extendida que *GC-MS* o *LC-MS*.

El empleo de sistemas de espectrometría de masas en tándem (*MS/MS*)<sup>145</sup> contribuye a la mejora de los aspectos cuantitativos y a la elucidación estructural, resultando de gran utilidad en la identificación de nuevos o inusuales metabolitos, o en la caracterización de metabolitos conocidos en casos donde existe ambigüedad.

### Tratamiento de los datos.

El tratamiento de los complejos datos obtenidos en metabolómica generalmente comprende una etapa previa de procesado de la información (tratamiento del ruido, corrección de la línea base, normalización, alineamiento entre cromatogramas o electroferogramas, etc.), y otra etapa posterior de análisis estadístico.

### Métodos de preprocesado de datos.

Los datos proporcionados por las técnicas analíticas en un análisis metabólico requieren de un tratamiento previo al análisis estadístico multivariante. Este preprocesado se debe a que es necesario reducir el posible

---

<sup>143</sup> A. Zhang, H. Sun, P. Wang, Y. Han, X. Wang, *Analyst* 137 (2012) 293. "Modern analytical techniques in metabolomics analysis".

<sup>144</sup> C. Barbas, E. P. Moraes, A. Villaseñor, *J. Pharmaceut. Biomed.* 55 (2011) 823. "Capillary electrophoresis as a metabolomics tool for non-targeted fingerprinting of biological samples".

<sup>145</sup> W-Y Hsu, W. T-L Chen, W-D Lin, F-J Tsai, Y. Tsai, C-T Lin, W-Y Lo, L-B Jeng, C-C Lai, *Clin. Chim. Acta* 402 (2009) 31. "Analysis of urinary nucleosides as potential tumor markers in human colorectal cancer by high performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry".

“ruido” introducido en los datos al comienzo y al final del perfil<sup>146,147</sup>. Además los datos metabolómicos sufren “el problema de la correspondencia”, es decir, se observa que los picos que corresponden a los mismos metabolitos no aparecen en el mismo tiempo, por lo tanto es muy importante el alineamiento de los perfiles. Se han desarrollado algoritmos, *software* y diversas herramientas capaces de solucionar esta situación. Sin embargo, el pretratamiento se ve condicionado por la naturaleza de los datos, que será distinta en función de la técnica de la que procedan. La mayoría de los métodos computacionales sugeridos para el alineamiento de datos se basan en el empleo de patrones internos con elución similar a la de los picos de interés. Dichos patrones pueden añadirse a la muestra, o ser elegidos de entre algunos de sus componentes, cuya presencia sea común a la totalidad de las muestras. Este procedimiento presenta como ventajas el que los patrones están sometidos exactamente a las mismas condiciones experimentales que el resto de picos y la rapidez en el procesado de los datos. Su principal limitación consiste en la dificultad para encontrar dichos marcadores en los casos de desplazamientos significativos de la señal.

Una vez que los datos obtenidos han sido alineados se realiza la normalización de los perfiles. Con ella se igualan las diferencias de concentración existentes, de forma natural, en muestras puntuales de orina, que están al margen de la variabilidad con auténtico sentido biológico y que es la que realmente se busca en el análisis.

El siguiente paso es el escalado, conocido como la operación de asignar numéricamente una serie de pesos a cada variable para que al minimizar los errores de la proyección de cada objeto sobre las componentes tengan el mismo valor estadístico<sup>148</sup>.

Las operaciones de normalización y escalado son equivalentes, pero la primera se aplica al conjunto de los datos de una muestra y la segunda a todas las variables equivalentes de los individuos estudiados.

---

<sup>146</sup> W. Wang, H. Zhou, H. Lin, S. Roy, T. A. Shaler, L. R. Hill, S. Norton, P. Kumar, M. Anderle, C. H. Becker, *Anal. Chem.* 75 (2003) 4818. “*Quantification of proteins and metabolites by mass spectrometry without isotopic labeling or spiked standards*”.

<sup>147</sup> H. Zhang, E. C. Yi, X. J. Li, P. Mallick, K. S. Kelly–Spratt, C. D. Masselon, D. G. Camp 2nd, R. D. Smith, C. J. Kemp, R. Aebersold, *Mol. Cell. Proteomics* 4 (2005) 144. “*High throughput quantitative analysis of serum proteins using glycopeptide capture and liquid chromatography mass spectrometry*”.

<sup>148</sup> R. A. van den Berg, H. C. J. Hoefsloot, J. A. Westerhuis, A. K. Smilde, M. J. van der Werf, *BMC Genomics* 7 (2006) 142. “*Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data*”.

### Análisis estadístico.

Los métodos de análisis estadístico multivariante resultan extremadamente útiles en los estudios metabolómicos al ser capaces de reducir la dimensionalidad de los datos sin perder información.

Se hace necesario el uso de técnicas de análisis que sean capaces de hacer frente a un volumen muy grande de datos, y que extraigan la información relevante de cada problema. Por ello se necesita eliminar el ruido, como factor de enmascaramiento de la señal; y la colinealidad de los datos, que tampoco aporta nada nuevo a la señal porque únicamente introducen información redundante. Para ello los procedimientos matemáticos empleados son los análisis multivariante.

El análisis multivariante trabaja, con diferentes técnicas, sobre la matriz de datos, ordenada de forma que cada fila recoge los datos de un mismo individuo, y cada columna la de una misma variable. Entre los objetivos principales del análisis multivariante se encuentran:

- a) Resumir y visualizar el contenido de la matriz de los datos.
- b) Clasificar, y por lo tanto, discriminar, sobre la pertenencia o no a una determinada clase cada uno de los individuos.
- c) Encontrar relaciones cuantitativas entre las variables.

Estos objetivos se extienden a distintos tipos de datos, ya sea con muchas o pocas variables e individuos, o con matrices completas o incompletas.

El análisis multivariante es esencial en el estudio de huellas metabólicas, al permitir visualizar con fines de clasificación la similitud de una muestra dada con otras de diferentes grupos, pero es también útil en todo tipo de estudios donde se lleve a cabo la cuantificación de metabolitos individuales.

Las técnicas multivariantes se clasifican según diferentes criterios, pero el más utilizado es el de si introducen o no información previa al análisis sobre si los individuos pertenecen a una clase dada.

### Reconocimiento de pautas no supervisadas.

Tienen como objetivo determinar la relación entre muestras sin tener conocimiento previo de dicha relación. También se conocen como técnicas de visualización o de proyección de datos.

#### ⇒ Análisis de componentes principales (PCA)

Se trata de un proceso matemático que pretende reducir la complejidad de los datos<sup>149,150</sup>, identificar la tendencia inherente en un conjunto de medidas experimentales y clasificar las muestras en función de sus similitudes y diferencias, sin un conocimiento *a priori* del tipo de muestra, es decir, no se conoce, o se ignora deliberadamente, la existencia de categorías.

Básicamente, una matriz de datos definida como  $X$  contiene  $N$  filas (siendo cada fila un individuo, muestra, objeto o electroferograma perteneciente a un individuo concreto) y  $K$  variables (cada una de las propiedades que medimos en todos los individuos). Actualmente sobre esta matriz, *PCA* intenta encontrar puntos, líneas, planos e hiperplanos en el espacio de las  $K$  variables, en torno a las cuales se agrupan los datos, es decir, intenta encontrar tendencias inherentes en los datos reduciendo la dimensionalidad, de manera que la matriz de datos se comprime sin apenas perder información. Por esta razón, el *PCA* genera una primera componente principal (un eje) que pasa por el centro de gravedad de la nube de puntos (individuos) en el espacio  $K$  dimensional, de tal forma que la suma de los cuadrados de las distancias de todos los puntos a ese eje sea mínima; en otras palabras, la primera componente sigue la dirección de máxima variabilidad (dispersión) de los datos. Posteriormente genera una segunda componente principal que cumple que: (1) también pasa por el centro de gravedad, (2) es ortogonal a la primera componente, (3) sigue la dirección de máxima variabilidad remanente. Y así sucesivamente la tercera y demás componentes, según las mismas reglas.

En términos matemáticos más precisos, *PCA* genera unas nuevas variables, combinación lineal de las de partida, obtenidas como autovectores de la matriz de varianzas, y esas son las direcciones (ejes) que explican el máximo de variabilidad de la nube de puntos, y que reciben el nombre de componentes principales. Las nuevas variables pueden expresarse como combinación lineal de las antiguas y los coeficientes de la combinación lineal reciben el nombre de “*loadings*” (cargas),

---

<sup>149</sup> J. E. Jackson (1999) “*A user’s guide to principal components*” John–Wiley & Sons Inc.

<sup>150</sup> H. Matens, T. Naes (1991) “*Multivariate Calibration*” John–Wiley & Sons Inc.

además, en el espacio representado con los nuevos ejes cada individuo tiene unas coordenadas denominadas “*scores*” (puntuaciones).

Por similitud al espacio tridimensional al que estamos acostumbrados, frecuentemente se seleccionan tres componentes principales para explicar los datos. Si se seleccionan dos, se define un plano de dos dimensiones en el que se proyectan todos los datos, y se genera un diagrama que se conoce con el nombre de “*scores plot*” o diagrama de puntuaciones en el que los individuos pueden aparecer formando grupos en función de su similitud o diferencia en sus correspondientes puntuaciones. Su correspondiente “*loadings plot*” o diagrama de cargas muestra las variables que han tenido mayor peso en cada una de las componentes principales, y por lo tanto, mayor peso en el proceso de agrupamiento (discriminación) generado con el *PCA*. Además también nos da información sobre la similitud entre variables, entendida como variables que han contribuido de una forma parecida en el proceso de discriminación.

### Reconocimiento de pautas supervisadas.

En este tipo de técnicas se utiliza la información sobre las clases a las que pertenecen un grupo de individuos para generar un modelo matemático que optimice la separación entre clases y permite predecir la clase a la que pertenecerán nuevos individuos<sup>151</sup>.

⇒ Análisis discriminante mediante regresión parcial por mínimos cuadrados (*Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA*).

El *PLS-DA* es una técnica discriminante supervisada que supone un caso particular de regresión parcial por mínimos cuadrados, *PLS*. Por lo tanto, para entender su funcionamiento, previamente analizamos los fundamentos de la regresión parcial por mínimos cuadrados, *PLS*.

*PLS* es una forma de regresión multivariante que extiende los conceptos del *PCA* en problemas en los que tenemos una matriz de datos  $X$ , de variables independientes y pretendemos hacer una estimación de los valores de una serie de variables dependientes, también expresadas en forma de matriz que llamaremos  $Y$ <sup>152</sup>. Para ello sigue un proceso similar al del *PCA* de generación de unas nuevas variables

---

<sup>151</sup> M. Otto (1999) “*Chemometrics: statistics and chemometrics for analytical chemistry*” John-Wiley & Sons Inc.

<sup>152</sup> A. J. Burnham, J. F. MacGregor, R. Viveros, *Chemometr. Intell. Lab.* 48 (1999) 167. “*Latent variable multivariate regression modeling*”.

(ejes) en la dirección de máxima variabilidad de la nube de puntos, pero hay que tener en cuenta que ahora no interesan tanto las direcciones que explican un máximo de variables de X sino aquellas que explican la variable relacionada con las variables que se pretenden predecir, contenidas en la matriz de variables dependientes Y; es decir, que ahora interesa la variabilidad de X que está relacionada con la variabilidad de Y. Para cuantificar esa covarianza (variabilidad común a X e Y) se utiliza la matriz de covarianza o su correspondiente matriz de correlaciones, de tal forma que, en términos matemáticos más precisos, el *PLS* busca las direcciones de máxima covariabilidad, las cuales vienen dadas por los autovectores de la matriz de covarianza entre las variables X y las de Y.

El *PLS-DA* consiste en una regresión *PLS* clásica donde las variables dependientes (matriz Y) son categóricas y expresan la pertenencia o no a una clase concreta (para cada clase una variable con dos únicos valores: 0 indica que el individuo considerado no pertenece a la clase y 1 que sí)<sup>153</sup>.

*PLS-DA* genera una serie de direcciones (ejes) de máxima covariabilidad, de forma que cada individuo presenta una puntuación (*score*) en cada uno de los nuevos ejes, que en realidad son nuevas variables, combinación lineal de las de partida; y cada una de las nuevas variables se puede expresar como combinación lineal de las antiguas en forma de “cargas” (*loadings*). Por tanto, esta técnica también permite la obtención de gráficos en los que los individuos aparecen o no agrupados en función de su similitud (*scores plot*), e igualmente con las variables (*loadings plot*).

⇒ Análisis discriminante ortogonal mediante regresión por mínimos cuadrados parciales (*Orthogonal Signal Corrected Projection to Latent Structure Discriminant analysis, OPLS-DA*):

Su funcionamiento es similar al del *PLS-DA*, no obstante, la separación entre clases suele ser más efectiva ya que, mediante un proceso de filtro o corrección, se logra separar la parte de variabilidad de la matriz X que no presenta relación con la Y; es decir; la variabilidad sistemática del bloque X se divide en dos partes: una primera que modela la variabilidad de X según Y, y una segunda parte que capta la variación sistemática en X que es ortogonal a Y. Posteriormente se trabaja únicamente con la parte de X que verdaderamente está relacionada con Y (componentes predictivas). Después de encontrar las direcciones de máxima

<sup>153</sup> L. Stahle, S. Wold (1986) “*PLS Discriminant Plots. In Pattern Recognition in Practice IP*” E. S. Gelsema & L. N. Kanal (Editors) Elsevier Amsterdam.

## I. INTRODUCCIÓN

---

covarianza, se obtienen pesos y cargas (*scores y loadings*) de la misma forma que en *PLS-DA*.

Aunque los modelos *PLS-DA* y *OPLS-DA* son muy parecidos, el *OPLS-DA* presenta la ventaja de que concentra en la primera componente la separación entre clases, por lo que permite una interpretación más clara.

### Validación de los resultados obtenidos en el estudio metabolómico.

Es crucial la capacidad del método para proporcionar señales identificables de tantos metabolitos como sea posible por lo tanto con el paso del tiempo, los estudios de metabolitos deben ser más cuidadosos en el proceso de elección de metabolitos como biomarcadores<sup>154,155</sup>.

Los modelos de análisis multivariante obtenidos deben de tener la habilidad de hacer predicciones relacionadas con muestras independientes, caracterizadas de acuerdo a modelos de muestras; siendo el análisis por *PLS-DA* capaz de proporcionar modelos robustos, con capacidad predictiva que permiten encontrar las diferencias entre dos poblaciones de muestras.

La validación de los modelos de datos metabolómicos es esencial para comprobar si son fiables las conclusiones obtenidas basándonos en la información proporcionada por el modelo. Es decir, es necesario validar quimiométrica y biológicamente el modelo.

### Validación de los parámetros.

El primer paso es la valoración de los parámetros de  $R^2$ , varianza total explicada por el modelo, y  $Q^2$ , capacidad predictiva del modelo; ya que una vez se ha generado el modelo, los valores de  $R^2$  y  $Q^2$  informan sobre su calidad y por tanto sobre la conveniencia de utilizar o no el modelo para el análisis estadístico. En la

---

<sup>154</sup> A. Koulman, G. A. Lane, S. J. Harrison, D. A. Volmer, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 663. "From differentiating metabolites to biomarkers".

<sup>155</sup> P. Jonsson, S. J. Bruce, T. Moritz, J. Trygg, M. Sjöström, R. Plumb, J. Granger, E. Maibaum, J. K. Nicholson, E. Holmes, H. Antti, *Analyst* 130 (2005) 701. "Extraction, interpretation and validation of information for comparing samples in metabolic LC/MS data sets".

Tabla 1.5 se recogen los valores de  $R^2$  y  $Q^2$  con los que se clasifican los modelos como válidos o no. Estos valores de  $R^2$  y  $Q^2$  se calculan por validación cruzada<sup>156,157</sup>.

Tabla 1.5. Valores de  $R^2$  y  $Q^2$  considerados aceptables.

Modelo	Tipo	Valores
PLS-DA	Supervisado	$Q^2 \geq 0.5$ [Bueno]
		$Q^2 \geq 0.9$ [Excelente]
		$R^2-Q^2 \leq 0.2-0.3$
OPLS-DA	Supervisado	$Q^2 \geq 0.5$ [Bueno]
		$Q^2 \geq 0.9$ [Excelente]
		$R^2-Q^2 \leq 0.2-0.3$

#### Validación de los modelos supervisados siguiendo el proceso de “scrambling”.

El *software* SIMCA P+ en su última versión permite realizar un tipo de validación automática de los modelos supervisados que se basa en el proceso de “scrambling”.

El objetivo es demostrar que el hecho de que el modelo sea bueno, de acuerdo a los parámetros de  $R^2$  y  $Q^2$ , no es una cuestión de azar. La idea de esta validación es comparar los valores de  $R^2$  y  $Q^2$  del modelo inicial con los valores de los modelos generados al permutar aleatoriamente unas 100 veces las observaciones de la matriz Y mientras que la matriz X permanece intacta.

<sup>156</sup> L. Eriksson, E. Johansson, N. Kettaneh-Wold, J. Trygg, C. Wikström, S. Wold (2006) “*Multivariate and Megavariate Data Analysis Advanced Application and Method Extension (Part II)*” Umetrics Academy.

<sup>157</sup> S. Wold, *Technometrics* 20 (1978) 397. “*Cross-validatory estimation of the number of components in factor and principal components models?*”.

En la gráfica resultante de una validación siguiendo el proceso de “*scrambling*” se observan en la parte superior derecha los valores de  $R^2$  y  $Q^2$  del modelo original y desde ahí hacia la izquierda, los valores de  $R^2$  y  $Q^2$  de los modelos tras las permutaciones. Para que la validación sea correcta los modelos, tras la permutación, deben presentar valores de  $R^2$  y  $Q^2$  inferiores a los del modelo original y la línea de  $Q^2$  debe cortar en el eje Y por debajo de 0.05.

En el caso contrario significaría que el modelo a validar no es bueno y la validación sería considerada negativa.

### Identificación de los metabolitos.

Una vez llevado a cabo el análisis estadístico, las señales (o metabolitos) estadísticamente significativas, empleadas para la clasificación de los grupos (posibles biomarcadores), se identifican para intentar asociar la variación observada en dichos compuestos con una explicación biológica coherente. Para ello normalmente se llevan a cabo procesos de identificación tentativa. La identificación de los metabolitos de interés comienza con una búsqueda en bases de datos de metabolitos, algunas de las más empleadas son las ya mencionadas *HMDB*, *METLIN*, *PubChem*, *LipidMaps*, *KEGG*, *MassBank*. En dichas bases de datos se coteja la masa obtenida a partir del valor de  $m/z$  proporcionado por el espectrómetro de masas y las masas teóricas de los metabolitos contenidos en dichas bases de datos. Lógicamente, cuanto mayor sea la exactitud del valor  $m/z$  proporcionado por el espectrómetro de masas para un determinado metabolito, mayor será la posibilidad de obtener una correcta identificación, de ahí la necesidad de utilizar espectrómetros de masas de alta resolución que proporciona valores de  $m/z$  con errores de unas pocas partes por millón e incluso inferiores. La mayoría de los programas de adquisición de datos *MS* generan una lista de posibles fórmulas moleculares, por lo que sumando esta información a la obtenida a partir de las bases de datos anteriormente mencionadas se puede realizar una identificación tentativa de los metabolitos.

### Las técnicas cromatográficas y su aplicación a los estudios metabólicos.

A pesar de que la mayoría de los estudios de análisis de perfiles y huellas metabólicas en fluidos biológicos se han desarrollado mediante RMN, las técnicas cromatográficas acopladas a masas han avanzado notablemente en los últimos años, hasta un punto en que debido a su mayor sensibilidad son una importante herramienta analítica en estudios metabólicos.

En las investigaciones basadas en la espectrometría de masas, las huellas metabólicas se describen mediante valores de  $m/z$  y de las correspondientes abundancias de los iones detectados, además en las técnicas cromatográficas aparece un nuevo parámetro que es el tiempo de retención.

La cromatografía líquida es especialmente adecuada en el análisis de metabolitos de baja volatilidad<sup>158,159</sup>. Lo más frecuente es el uso de la cromatografía líquida de fase inversa, utilizando columnas de  $C_{18}$  con partículas de entre 3 y 5  $\mu\text{m}$ . Sin embargo el HPLC en fase inversa es a menudo insuficiente en la separación de metabolitos en muestras biológicas complejas, siendo la resolución uno de los puntos críticos a mejorar. Los analizadores de masas más utilizados son el de tiempo de vuelo (TOF)<sup>129</sup>, el cuadrupolo con tiempo de vuelo (Q-TOF)<sup>160,161,162</sup>, la trampa iónica (Ion Trap)<sup>163</sup> y el cuadrupolo con trampa iónica (Q-Trap) entre otros.

En este trabajo se han empleado técnicas multivariantes como PCA, PLS-DA y OPLS-DA para el análisis estadístico de los resultados obtenidos en el análisis de muestras de orina mediante un acoplamiento LC-TOF.

---

<sup>158</sup> H. Idborg-Björkman, P. O. Edlund, O. M. Kvalheim, I. Schuppe-Koistinen, S. P. Jacobsson, *Anal. Chem.* 75 (2003) 4784. "Screening of biomarkers in rat urine using LC/electrospray ionization-MS and two-way data analysis".

<sup>159</sup> T. J. Waybright, Q. N. Van, G. M. Muschik, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, H. J. Issaq, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 29 (2006) 2475. "LC-MS in Metabonomics: optimization of experimental conditions for the analysis of metabolites in human urine".

<sup>160</sup> R. Plumb, J. Granger, C. Stumpf, I. D. Wilson, J. A. Evans, E. M. Lenz, *Analyst* 128 (2003) 819. "Metabonomic analysis of mouse urine by liquid-chromatography-time of flight mass spectrometry (LC-TOF/MS): detection of strain, diurnal and gender differences".

<sup>161</sup> E. M. Lenz, J. Bright, R. Knight, I. D. Wilson, H. Major, J. Pharm. Biomed. Anal. 35 (2004) 599. "Cyclosporin A-induced changes in endogenous metabolites in rat urine: a metabonomic investigation using high field  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy, HPLC-TOF/MS and chemometrics".

<sup>162</sup> R. S. Plumb, C. L. Stumpf, J. H. Granger, J. Castro-Perez, J. N. Haselden, G. J. Dear, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 2632. "Use of liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and multivariate statistical analysis shows promise for the detection of drug metabolites in biological fluids".

<sup>163</sup> 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".



II

## OBJETO DEL TRABAJO

---



Uno de los campos actuales dentro de la Química Analítica de aplicación clínica, es la puesta a punto de métodos de análisis rápidos y eficaces para la determinación de metabolitos endógenos de interés clínico en fluidos biológicos.

En este contexto se sitúan los nucleósidos y nucleobases libres y modificados, compuestos que se excretan de forma natural en la orina como productos de la regeneración del ARN de transferencia (ARNt) y de la reparación del ADN como resultado del daño por estrés oxidativo. Sus niveles en orina aumentan de forma anómala bajo ciertas patologías como procesos tumorales y enfermedades neurodegenerativas, de forma que estas sustancias son de gran interés en química clínica como biomarcadores. Se ha descrito la potencial utilidad de los nucleósidos libres y modificados como marcadores biológicos de enfermedades tan diversas como artritis reumatoide, Alzheimer o SIDA, y principalmente, como marcadores tempranos de muy diversos tipos de cáncer.

Existen también estudios que relacionan los niveles en orina de nucleósidos modificados con otras enfermedades benignas y con diversos hábitos de vida, como tabaquismo, fatiga, estrés, mala alimentación, exposición a compuestos tóxicos, etc.

Por ello, la mayoría de estos compuestos, de interés como marcadores biológicos, carecen de especificidad por lo que no pueden usarse como prueba única de diagnóstico; en cambio, si son de utilidad para el diagnóstico precoz de ciertas enfermedades, en el control de la eficacia de un tratamiento o una terapia específica y en el seguimiento de recurrencias postoperatorias.

El objeto de este trabajo es el desarrollo de metodologías analíticas rápidas y eficaces que puedan ser aplicables a la separación, identificación y cuantificación de un amplio conjunto de nucleósidos libres y modificados en fluidos biológicos. Se elige la orina como matriz por ser una muestra de tipo no invasivo de fácil obtención.

Como técnica de análisis se utilizará la electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas (*CE-MS*) que aúna las ventajas inherentes de la electroforesis capilar como técnica de separación de alta eficacia, con el poder de identificación de la detección mediante espectrometría de masas. Además la electroforesis capilar es muy apropiada para su aplicación en el análisis de muestras biológicas ya que es una técnica compatible con medios acuosos y adecuada para la separación de compuestos de gran polaridad, iónicos o ionizables, requisitos que se ajustan a la mayoría de los metabolitos encontrados en fluidos biológicos como la orina.

## II. OBJETO DEL TRABAJO

---

Para su aplicación a una matriz compleja como es la orina se requiere el desarrollo de procedimientos de extracción/limpieza/preconcentración con objeto de favorecer la detección y cuantificación de los analitos y de preservar el equipo instrumental. Se estudió la aplicación de una técnica de amplio uso como es la extracción en fase sólida (*SPE*) y, también, una modalidad menos frecuente basada en el uso de un material de acceso restringido (*RAM*) debido a la capacidad que presentan estos materiales para excluir las macromoléculas, gracias a un mecanismo de exclusión molecular.

Finalmente se pretende verificar la aplicabilidad de las metodologías desarrolladas en el análisis de muestras de orina de donantes sanos, fumadores y no fumadores. Este estudio tiene por objeto comprobar si el consumo de tabaco influye en los niveles de estos nucleósidos en orina, con respecto a los niveles de referencia de individuos sanos no fumadores. Así se podría determinar si el consumo de tabaco es un factor adicional en el contenido de estos nucleósidos en orina.

Por último, se realizará una búsqueda de nuevos metabolitos asociados al consumo de tabaco, adaptando los estudios desarrollados al campo de la metabolómica. Para ello se plantea un estudio no dirigido, utilizando un detector de espectrometría de masas de elevada exactitud y resolución, como el analizador de tiempo de vuelo (*TOF*) para el análisis de muestras de orina de fumadores y no fumadores.

III

PARTE EXPERIMENTAL

---



### 3.1. ANALITOS Y REACTIVOS.

#### 3.1.1. PATRONES.

Los nucleósidos, nucleobases y nucleósidos modificados (metilados e hidroxilados) empleados en el desarrollo de este trabajo fueron suministrados por:

⇒ Sigma–Aldrich (Steinheim, Alemania):

- Adenosina (A), CAS RN [58–61–7]
- 1–metiladenosina (1mA), CAS RN [15763–06–1]
- Adenosina- $^{13}\text{C}_{10}^{15}\text{N}_5$  5'–monofosfato ( $^{13}\text{C}_{10}$   $^{15}\text{N}_5$ –AMP), CAS RN [961–07–9]
- Citidina (Cyt), CAS RN [65–46–3]
- Guanina (Gua), CAS RN [73–40–5]
- 7–metilguanina (7mGua), CAS RN [578–76–7]
- 1–metilguanina (1mGua), CAS RN [938–85–2]
- 9–metilguanina (9mGua), CAS RN [5502–78–3]
- Guanosina (G), CAS RN [118–00–3]
- 7–metilguanosina (7mG), CAS RN [20244–83–4]
- 2'–deoxiguanosina monohidrato (2dG), CAS RN [961–07–9]
- 8–hidroxi–2'–deoxiguanosina (8OH2dG), CAS RN [88847–89–6]
- Inosina (INN), CAS RN [58–63–9]
- 5–metiluridina (5mU), CAS RN [1463–10–1]

⇒ Cayman Chemical (Michigan, EEUU):

- 8–hidroxiguanosina (8OHG), CAS RN [3868–31–3]

⇒ Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Massachusetts, EEUU):

- Ribosa–2'– $^{13}\text{C}$ –adenosina ( $^{13}\text{C}$ –A), 99%
- 8– $^{13}\text{C}$ –guanina ( $^{13}\text{C}$ –Gua), 98%

#### 3.1.2. DISOLVENTES Y REACTIVOS.

⇒ Preparación de los tampones de separación (*BGE*) y fases móviles:

- Agua *UHQ* (18.2 M $\Omega$  cm a 25 °C, COT<10 ppb) obtenida con un sistema de purificación Wasserlab Ultramatic (Noain, España).
- Ácido fórmico puro (>98%) suministrado por Fluka (Steinheim, Alemania).
- Amoníaco concentrado (25%), grado reactivo, suministrado por Scharlau (Barcelona, España).
- Formiato amónico puro (>98%) suministrado por Riedel de Hæn (Hannover, Alemania).
- Acetonitrilo (ACN), grado *HPLC*, suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania).

⇒ Otros disolventes y reactivos:

- Ácido acético puro (>98%) suministrado por Fluka (Steinheim, Alemania).
- Ácido clorhídrico concentrado (37%), para análisis, suministrado por Scharlau (Barcelona, España).
- Ácido pícrico (>98%) suministrado por Sigma–Aldrich (Steinheim, Alemania).
- Creatinina (>98%) suministrada por Sigma–Aldrich (Steinheim, Alemania).
- Hidróxido sódico, grado reactivo, suministrado por Scharlau (Barcelona, España).
- Isopropanol, grado reactivo, suministrado por Scharlau (Barcelona, España).
- Cloruro sódico, grado reactivo, suministrado por Scharlau (Barcelona, España).
- Cloruro potásico, grado reactivo, suministrado por Sigma–Aldrich (Steinheim, Alemania).
- Urea (>99%) suministrado por Probus (Badalona, España).
- Cloruro cálcico, grado reactivo, suministrado por Sigma–Aldrich (Steinheim, Alemania).

- Sulfato de magnesio, grado reactivo, suministrado por Sigma–Aldrich (Steinheim, Alemania).
- Metanol (MeOH), grado *HPLC*, suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania).

### 3.2. DISOLUCIONES ESTÁNDAR.

Se prepararon disoluciones estándar, a partir de los patrones, de cada nucleósido, nucleobase y nucleósido modificado (metilado e hidroxilado), así como de los marcados isotópicamente. Debido a la solubilidad que presentan los compuestos estudiados todas estas disoluciones fueron preparadas en agua *UHQ*, aunque en algunos casos se tuvo que acidificar con HCl 0.1 M para su completa disolución. A continuación se especifica la concentración de cada disolución:

- El analito Gua se preparó en una concentración de 250.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .
- Los analitos A, 1mA, G, 7mG, 7mGua, 1mGua, 9mGua, Cyt, INN, 5mU y 2dG fueron preparados en una concentración de 500.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .
- Los compuestos marcados isotópicamente,  $^{13}\text{C}$ –A y  $^{13}\text{C}$ –Gua, fueron preparados en una concentración de 300.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .
- Los compuestos, 8OH2dG, 8OHG y el marcado isotópicamente,  $^{13}\text{C}_{10}^{15}\text{N}_5$ –AMP, fueron preparados en una concentración de 100.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Todas las disoluciones estándar fueron almacenadas en frascos topacio a 4 °C y a partir de ellas se prepararon, por dilución, las disoluciones de trabajo.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

---

Para la determinación de creatinina mediante el método Jaffè se prepararon disoluciones estándar de ácido pícrico (concentración de 25 mM) y de creatinina (concentración de 0.86 mM, 10 mg dL<sup>-1</sup>), disolviéndose ambas en agua *UHQ*.

La orina sintética fue preparada siguiendo el procedimiento propuesto por Nico C. van de Merbel<sup>164</sup>, cuya composición se muestra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Composición de la orina sintética.

Componente	Concentración
NaCl	14.10 g L <sup>-1</sup>
KCl	2.80 g L <sup>-1</sup>
Urea	17.30 g L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub>	0.60 g L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub>	0.40 g L <sup>-1</sup>
NH <sub>3</sub> (33%)	1.90 mL L <sup>-1</sup>
HCl (37%)	1.70 mL L <sup>-1</sup>
Creatinina	1.0 g L <sup>-1</sup>

---

<sup>164</sup> N.C. van de Merbel, *Trend. Anal. Chem.* 27 (2008) 924. "Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques".

### 3.3. MATERIAL E INSTRUMENTACIÓN.

El material utilizado es el habitual en un laboratorio analítico: balanza analítica, agitadores magnéticos, diferente material volumétrico, pHmetro, jeringa de filtrado de vidrio y filtros de membrana de nylon Cameo *PVDF* (difluoruro de polivinilideno) con un tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  (Scharlab, Barcelona, España).

A continuación, de forma detallada, se va a numerar el resto del material utilizado y la instrumentación empleada durante el desarrollo de este trabajo.

#### 3.3.1. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (*SOLID PHASE EXTRACTION, SPE*).

Para llevar a cabo la extracción en fase sólida (*SPE*) se utilizaron diferentes tipos de materiales comerciales con base polimérica:

- *Oasis® HLB*, copolímero de divinilbenceno y N–vinilpirrolidona, (Waters, Massachusetts, EEUU).
- *Oasis® MCX*, copolímero de divinilbenceno sulfonado y N–vinilpirrolidona, (Waters, Massachusetts, EEUU).
- *LiChrolutEN®*, copolímero de estireno divinilbenceno, (Merck, Darmstadt, Alemania).
- *Isolute® ENV+*, copolímero de estireno hidroxilado y divinilbenceno, (Biotage, Uppsala, Suecia).
- *Isolute® ABN*, copolímero de estireno y divinilbenceno con diversos grupos funcionales, (Biotage, Uppsala, Suecia).

Para las etapas de acondicionamiento, paso de muestra y secado de los cartuchos se empleó una bomba de vacío (Alfa, Barcelona, España) acoplada a un dispositivo para veinte muestras (Varian, Harbor City, EEUU).

#### 3.3.2. MATERIAL DE ACCESO RESTRINGIDO (RAM).

El material de acceso restringido (RAM) utilizado en la etapa de limpieza *off-line* fue un RAM MSpak 4A (Figura 3.1), empaquetado con un copolímero hidrofílico conteniendo N-vinilacetamida y con un tamaño de 10 mm x 4.0 mm suministrado por Shodex (Kawasaki, Japón).



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

#### 3.3.3. EQUIPO DE ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA–VISIBLE.

La determinación de la concentración de creatinina en las muestras de orina de voluntarios sanos se llevó a cabo mediante medidas fotométricas de absorbancia, para ello se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV/Vis 160 suministrado por Shimadzu (Kioto, Japón).

#### 3.3.4. EQUIPO DE CONCENTRACIÓN DE MUESTRAS.

La evaporación del disolvente de las muestras para su posterior redisolución en un medio adecuado para el análisis se llevó a cabo con un dispositivo concentrador de muestras SBHCONC/1, Figura 3.2, suministrado por Bibby Scientific Limited, Stuart, (Staffordshire, Reino Unido).



Figura 3.2. Equipo de concentración de muestras SBHCONC/1 suministrado por Bibby Scientific Limited.

### 3.3.5. CONFIGURACIÓN DE LOS EQUIPOS EMPLEADOS.

#### Equipo de Electroforesis Capilar

La separación electroforética se llevó a cabo en un equipo Hewlett Packard 3D (Waldbronn, Alemania) equipado con un detector espectrofotométrico de barrera de diodos (*diode array detector, DAD*) que permite registrar el espectro de cada pico electroforético en un margen de longitudes de onda de 190 a 400 nm. Este equipo estaba también acoplado a un segundo detector, en este caso un detector de cuadrupolo simple Agilent LC/MSD SL, con una interfaz de electrospray (*electrospray ionization, ESI*) que permitía trabajar en modo positivo y negativo. La 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).

Todo el sistema está controlado por un *software* Agilent HP ChemStation, versión B.04.01 que permite la recogida de los datos procedentes de ambos detectores y su integración.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

---

Los capilares empleados en la separación electroforética fueron de sílice fundida con distintos diámetros internos, 50, 75 y 100  $\mu\text{m}$ . Su longitud varió dependiendo del modo en el que se realizara el análisis, siendo de 58.2 cm en el modo *CE-DAD* y de 87.5 cm en el caso de *CE-MS*. Los capilares fueron suministrados por CM Scientific (Shipley, West Yorkshire, Reino Unido).

Tanto las muestras como los medios de separación y lavado se alojaron en viales para electroforesis capilar con tapón de poliuretano perforado de 1700  $\mu\text{L}$  de capacidad, suministrados por Agilent (Waldbronn, Alemania).

#### Equipo de Cromatografía Líquida.

Los equipos de cromatografía líquida utilizados en este trabajo fueron dos modelos 1100 y un modelo 1200 de Agilent (Waldbronn, Alemania). Estos equipos modulares están formados por:

- ⇒ Bomba de alta presión: una bomba en el caso del modelo 1200 y del modelo 1100 acoplado a un analizador de tiempo de vuelo (*TOF*) y dos bombas en el modelo 1100 utilizado para la etapa de limpieza con el *RAM* previo análisis *CE-ESI(-)MS*.
- ⇒ Automuestreador equipado con un bucle de inyección: en el modelo 1200 y el 1100 acoplado al *TOF* el bucle de inyección es de 1500  $\mu\text{L}$ , mientras que en el modelo 1100 empleado en la etapa de limpieza con el *RAM* previo al análisis *CE-ESI(-)MS* el bucle fue de 500  $\mu\text{L}$ .
- ⇒ Válvula de seis vías: una válvula en el caso del modelo 1200 y 1100 acoplado a un analizador *TOF* y dos válvulas de seis vías en el caso del modelo 1100 empleado en la etapa de limpieza con el *RAM* previo análisis *CE-ESI(-)MS*.
- ⇒ Desgasificador de membrana.
- ⇒ 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 empleado en la etapa de limpieza estaba controlado por el *software* Agilent HP ChemStation, versión B.01.03 y el modelo 1100 acoplado al *TOF*, controlado por el *software* Analyst QS 1.1. Por su parte, el modelo 1200 estaba controlado por el *software* MassHunter, versión B.04.00. Todos ellos permiten la

recogida de los datos procedentes de los detectores y la integración posterior de las señales.

Para la detección por *LC-MS* se emplearon dos espectrómetros: un triple cuadrupolo Agilent 6410 Triple Quad LC/MS y un analizador de tiempo de vuelo QSTAR®-XL QTOF LC-MS/MS de Applied Biosystems. Ambos están equipados con una sonda de electro spray pudiendo trabajar en modo positivo y negativo.

La columna analítica de fase inversa utilizada fue una Kinetex 2.6  $\mu\text{m}$  XB-C<sub>18</sub> de 50 x 3.00 mm y de naturaleza *Core-Shell* suministrada por Phenomenex (Torrance, California, EEUU).

Se utilizaron viales para cromatografía con tapón roscado perforable de 1700  $\mu\text{L}$  de capacidad suministrados por Agilent (Waldbronn, Alemania).

#### Configuración instrumental en el acoplamiento *off-line* RAM/CE.

La configuración instrumental empleada en el acoplamiento *RAM/CE* es de tipo *off-line* y está basada en la utilización de dos válvulas de seis vías y dos bombas de alta presión. Esta configuración instrumental es similar a la modalidad de columna única con la diferencia de que el eluyente del *RAM* no alcanza directamente el detector sino que es recogido de forma manual para su posterior determinación por *CE-MS* (Capítulo I).

Esta configuración se encuentra detallada en la Figura 3.3.

En esta etapa de limpieza la inyección se lleva a cabo mediante un inyector automático que introduce la muestra en el bucle de inyección, etapa (a) “Carga bucle de muestra”, Figura 3.3.a. A continuación la válvula, que se encontraba en la posición (a), cambia a la posición (b) “Inyección en el *RAM* y limpieza” e impulsa el disolvente de la bomba A hacia el bucle de inyección, arrastrando así la muestra hacia el *RAM*, como se recoge en la Figura 3.3.b. La válvula permanece en esta posición durante un tiempo prefijado en el cual se produce la etapa (b), eliminando los compuestos de la matriz biológica. Transcurrido este tiempo, la otra válvula pasa a la posición (c) “Elución del *RAM* y recogida de muestra” impulsando el disolvente de elución mediante la bomba B hacia el *RAM*, arrastrando así los analitos retenidos en él para su recolección de manera manual, Figura 3.3.c. Una vez que se lleva a cabo la recogida de la muestra el equipo sigue funcionando en modo “Elución y recogida”

### III. PARTE EXPERIMENTAL

---

para lavar completamente el *RAM*. Luego el sistema de manera automática vuelve a su posición inicial.

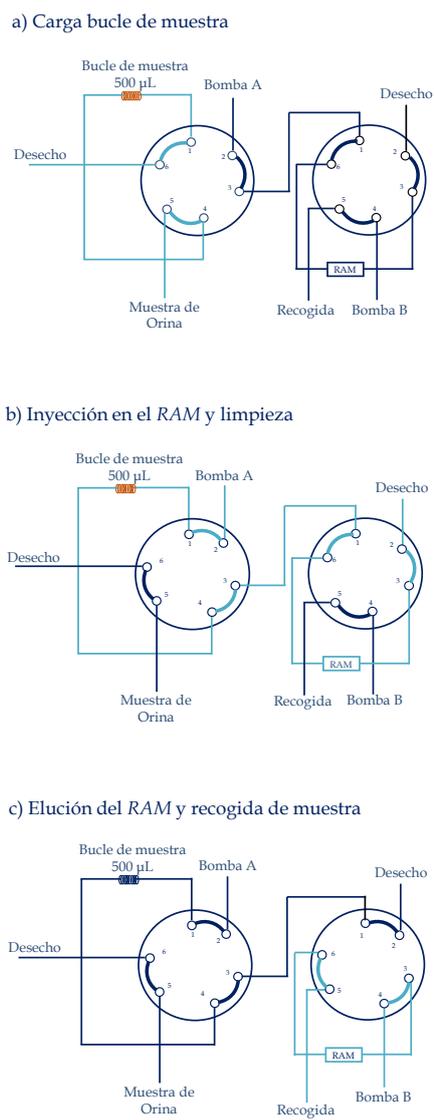


Figura 3.3. Diagrama de las dos válvulas de seis vías empleadas en la configuración instrumental *off-line* *RAM/CE-MS*.

### 3.4. MUESTRAS ANALIZADAS.

Las muestras analizadas en este estudio fueron muestras de orina de voluntarios sanos. Se llevaron a cabo dos muestreos diferentes, que corresponden a las dos partes en las que está estructurado este trabajo.

En la primera parte del trabajo las muestras de orina empleadas procedían de seis voluntarios sanos, tres hombres y tres mujeres, nombradas como H1–H6. En el segundo muestreo se recogieron 42 muestras de orina de voluntarios sanos, 21 de ellos fumadores, por lo que fueron nombradas teniendo en cuenta el consumo de tabaco (F\_01–F\_21 y NF\_01–NF\_21).

Todas las muestras se almacenaron en frascos de vidrio color topacio de 250 mL y se congelaron inmediatamente a  $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ , favoreciendo la precipitación de las proteínas. En el momento previo al análisis fueron descongeladas a temperatura ambiente y filtradas (PVDF  $0.22\text{ }\mu\text{m}$ ).

La elección de los voluntarios sanos, en ambos muestreos, se hizo de forma tal que tanto la edad como el género (hombre o mujer) fuesen lo más similares posibles.

Esta elección se recoge en las Tablas 3.2 y 3.3.

Tabla 3.2. Datos estadísticos para las seis muestras de orina de voluntarios sanos, tres hombres y tres mujeres, H1–H6.

	Edad			Género		
	n	Media	Mediana	Hombre	Mujer	H/M
<b>Voluntarios sanos</b>	6	25	26	3	3	1

### III. PARTE EXPERIMENTAL

---

Tabla 3.3. Datos estadísticos para las 42 muestras de orina de voluntarios sanos, fumadores y no fumadores (F\_01–F\_21 y NF\_01–NF\_21).

	Edad			Género		
	n	Media	Mediana	Hombre	Mujer	H/M
<b>Fumadores</b>	21	39	41	9	12	0.8
<b>No Fumadores</b>	21	30	28	13	8	1.6
<b>Total</b>	42	35	31	22	20	1.1

#### 3.4.1. DETERMINACIÓN DE CREATININA EN ORINA.

Para compensar las variaciones en la concentración de la orina todos los valores de concentración de los analitos fueron normalizados frente a la concentración de creatinina y, por tanto, expresados como nmol de analito frente a  $\mu\text{mol}$  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 pícrico<sup>165</sup>. Este método se basa en la medida colorimétrica a 500 nm de la absorbancia del cromógeno rojo que se forma tras la reacción, en solución alcalina, de la creatinina con el picrato siendo la intensidad del color directamente proporcional a la concentración de creatinina. Se ha demostrado que los cromógenos generados por otros compuestos presentes en la orina, diferentes a la creatinina y que interfieren, se forman en los 30 segundos iniciales de reacción, por lo tanto, entre los 30 segundos y los 5 minutos posteriores al inicio de la reacción el incremento de color se debe exclusivamente a la creatinina.

---

<sup>165</sup> M. Jaffè, *Z. Physiol. Chem.* 10 (1886) 391. “Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins”

Los reactivos empleados fueron:

- Hidróxido sódico (R1): solución de hidróxido sódico 0.2 M.
- Ácido pícrico (R2): solución de ácido pícrico 25 mM.
- Estándar (Sc): solución acuosa de creatinina 0.86 mM o 10 mg dL<sup>-1</sup>.

El procedimiento a seguir en la determinación de creatinina se enumera a continuación:

1. Se mezcla R1 y R2 en una relación 5:1 (v/v).
2. En la cubeta del espectrofotómetro (1) se añaden 2.0 mL de la mezcla R1+R2. Esta disolución se utiliza como blanco.
3. En otra cubeta (2) se añaden 2.0 mL de la mezcla R1+R2 y 400 µL de Sc. Se agita y se realiza la medida recogiendo los datos de absorbancia a 1 minuto ( $A_{Sc0}$ ) y a 6 minutos ( $A_{Sc5}$ ). En la Figura 3.4.a se observa un ejemplo del espectro UV-VIS obtenido para el estándar, medido a 500 nm.
4. En la cubeta (2) se añaden 2.0 mL de la mezcla R1+R2 y 400 µL de la muestra de orina diluida 1:10 (40 µL de la muestra de orina y 360 µL de agua *UHQ*). Se agita y se realiza la medida recogiendo los datos de absorbancia a 1 minuto ( $A_{M0}$ ) y a 6 minutos ( $A_{M5}$ ). En la Figura 3.4.b se observa un ejemplo del espectro UV-VIS obtenido para una muestra de orina medida a 500 nm.

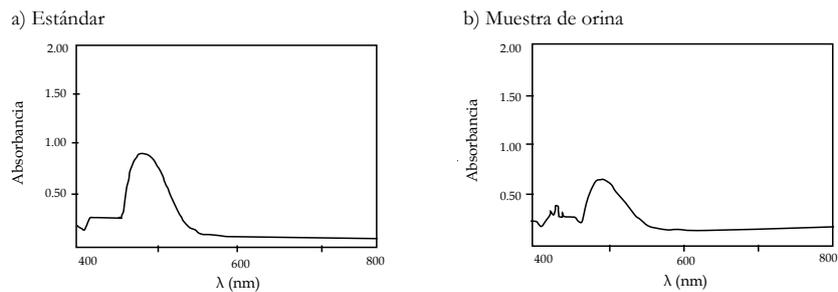


Figura 3.4. Espectros UV-VIS obtenidos a 500 nm, (a) estándar y (b) una muestra de orina, formando complejo con el picrato.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

---

Para finalizar el estudio se calculó la concentración de creatinina de cada muestra de orina realizando el siguiente tratamiento de los datos:

- Se calcula la variación de la absorbancia de la muestra ( $\Delta A_M$ ). Para ello se obtiene la diferencia entre  $A_{M5}$  y  $A_{M0}$ , corrigiéndose así la absorbancia inespecífica.
- A continuación se calcula la variación de la absorbancia del estándar ( $\Delta A_{Sc}$ ). Para ello se obtiene la diferencia entre  $A_{Sc5}$  y  $A_{Sc0}$  del estándar.
- Finalmente se calcula la concentración de creatinina en la muestra a partir de la siguiente expresión:

$$\frac{\Delta A_M}{\Delta A_{Sc}} \times \text{Conc. Estándar} = \text{Conc. Creatinina (mg dL}^{-1}\text{)}$$

Como se ha señalado anteriormente, en el presente trabajo, se emplearon dos grupos de muestreo. En la Tabla 3.4 se recogen los valores de concentración de creatinina para los 6 donantes sanos pertenecientes al primer grupo de muestreo, 3 hombres y 3 mujeres, y en la Tabla 3.5 se pueden observar los valores de concentración de creatinina de las 42 muestras de orina de donantes sanos que pertenecían al segundo grupo de muestreo, 21 fumadores y 21 no fumadores. En la Figura 3.5 se muestran los mismos valores de creatinina para las 42 muestras de orina mediante un diagrama de cajas (*box-plot*).

Tabla 3.4. Datos de concentración de creatinina en las 6 muestras de orina de voluntarios sanos, H1–H6, expresados en mg dL<sup>-1</sup>.

Orina	Concentración (mg dL <sup>-1</sup> )
H1	99
H2	51
H3	51
H4	109
H5	179
H6	74

Tabla 3.5. Datos de concentración de creatinina para las 42 muestras de orina de voluntarios sanos divididos en dos grupos dependiendo del consumo o no de tabaco, F\_01–F\_21 y NF\_01–NF\_21, expresados en mg dL<sup>-1</sup>.

Fumadores		No Fumadores	
Orina	Concentración (mg dL <sup>-1</sup> )	Orina	Concentración (mg dL <sup>-1</sup> )
F_01	202	NF_01	100
F_02	47	NF_02	85
F_03	92	NF_03	103
F_04	18	NF_04	112
F_05	13	NF_05	22
F_06	145	NF_06	34
F_07	179	NF_07	70
F_08	69	NF_08	59
F_09	168	NF_09	77
F_10	72	NF_10	87
F_11	91	NF_11	18
F_12	315	NF_12	44
F_13	38	NF_13	14
F_14	151	NF_14	162
F_15	52	NF_15	123
F_16	65	NF_16	81
F_17	131	NF_17	71
F_18	11	NF_18	170
F_19	59	NF_19	76
F_20	66	NF_20	83
F_21	44	NF_21	22

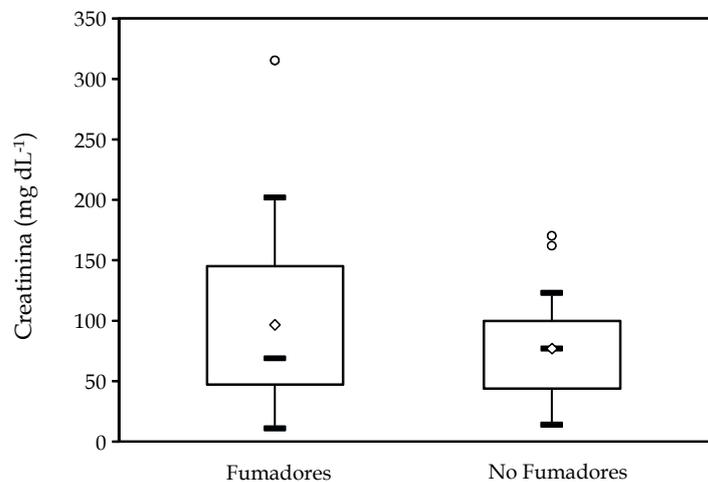


Figura 3.5. Representación de la distribución de creatinina mediante un diagrama de cajas (*box-plot*) para las 42 muestras de voluntarios sanos, fumadores y no fumadores.

### 3.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

#### 3.5.1. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA.

##### Medio ácido.

Los capilares empleados en la separación electroforética en medio ácido fueron de sílice fundida con un diámetro interno de 75  $\mu\text{m}$ . En este caso, al tratarse de *CZE-DAD*, la longitud del capilar fue de 58.2 cm con una longitud efectiva (distancia desde el extremo de entrada hasta el detector) de 49.7 cm.

Los capilares nuevos deben ser acondicionados antes de su utilización. Este tratamiento consiste en:

1. Lavado a presión con NaOH 0.1 M durante 10 minutos.
2. Lavado a presión con agua *UHQ* durante 10 minutos.
3. Lavado a presión con tampón ácido fórmico–formiato amónico, 100 mM, pH 2.5, durante 10 minutos.
4. Aplicación de una diferencia de potencial de 25 kV durante 3 minutos para asegurar que la intensidad de corriente es estable.

Diariamente, antes de comenzar la sesión de trabajo, el capilar se refresca con agua *UHQ* y con el tampón de separación (*BGE*) reduciendo los tiempos a la mitad.

A la hora de hacer análisis consecutivos es conveniente realizar un lavado del capilar entre muestras, así se evitan posibles efectos de memoria. Este proceso consiste en:

1. Lavado a presión con el tampón de separación, antes de cada muestra, durante 3 minutos a una presión de 4 bares.
2. Lavado a presión con agua *UHQ*, después de cada muestra, durante 1 minuto a una presión de 4 bares.

Al finalizar la sesión de trabajo se lava el capilar con agua *UHQ* durante 10 minutos y a continuación se le pasa aire hasta su próxima utilización.

Las condiciones optimizadas para la separación electroforética (modo *CZE*) se indican a continuación.

- El tampón de separación está formado por una disolución de ácido fórmico–formiato amónico 100 mM, pH 2.5.
- La concentración de la muestra de inyección que contiene los nucleósidos y nucleobases de estudio es de 10.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .
- La muestra se introduce en el capilar aplicando una presión positiva, mediante aire comprimido, sobre el vial que contiene la muestra de 50 mbar, durante 8 segundos.
- La separación se realiza aplicando un potencial de 25 kV durante todo el análisis.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

---

La identificación de los analitos se realizó a partir de sus diferentes tiempos de migración y mediante comparación directa de los espectros de UV registrados para cada pico electroforético con los espectros de los analitos de referencia. Se eligió como criterio de confirmación que el ajuste entre espectros fuera igual o superior al 99%.

#### Medio básico.

Los capilares utilizados en la separación electroforética en medio básico fueron de sílice fundida con distintos diámetros internos, 50, 75 y 100  $\mu\text{m}$ . En este caso, al tratarse de *CZE-MS*, la longitud del capilar fue de 87.5 cm. En esta configuración la entrada del detector *DAD* se encuentra a una distancia de 21.5 cm.

En este medio básico la metodología de trabajo, el acondicionamiento de los nuevos capilares y la identificación de los analitos se realizaron de forma similar a la separación electroforética en medio ácido. La única diferencia residía en las condiciones optimizadas para la separación electroforética, las cuales se detallan a continuación.

- El tampón de separación está formado por una disolución de formiato amónico–amoniaco 30 mM, pH 11.0.
- La concentración de la muestra de inyección que contiene los nucleósidos de estudio es de 5.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .
- La muestra se introduce en el capilar aplicando una presión positiva, mediante aire comprimido, sobre el vial que contiene la muestra de 50 mbar, durante 10 segundos.
- La separación se realiza aplicando un potencial de 30 kV durante todo el análisis.

### 3.5.2. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA CON DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS (*CE-MS*).

#### Modo positivo (*CE-ESI(+)*MS).

Los capilares empleados en la separación electroforética acoplada a un espectrómetro de masas fueron de sílice fundida con un diámetro interno de 75  $\mu\text{m}$ . En este caso, al tratarse de *CE-MS*, la longitud del capilar fue de 87.5 cm. En esta configuración la entrada del detector de *DAD* se encuentra a una distancia de 21.5 cm.

La identificación de los analitos se realizó a partir de sus diferentes tiempos de migración y aislando el ion mayoritario procedente de la ionización molecular correspondiente  $[M+H]^+$ . La variable cuantitativa utilizada fue la relación entre el área de pico generada por dicho ion, expresada en unidades arbitrarias y el área de pico generada por el patrón interno marcado isotópicamente. Hay que recordar que se dispone de dos patrones internos,  $^{13}\text{C-Gua}$  y  $^{13}\text{C-A}$ . Cada nucleósido y nucleobase estudiado, dependiendo de su estructura, se va a relacionar con aquel patrón interno que se adecue más a su estructura. Así, para la cuantificación de las nucleobases estudiadas, Gua, 7mGua, 1mGua y 9mGua se va a utilizar el patrón interno que también es una nucleobase,  $^{13}\text{C-Gua}$ . Mientras que para los nucleósidos analizados Cyt, 1mA, A, 7mG y G se va a utilizar el patrón interno  $^{13}\text{C-A}$ , ya que éste también es un nucleósido.

#### Modo negativo (*CE-ESI(-)*MS).

Los capilares empleados en la separación electroforética acoplada a un espectrómetro de masas fueron de sílice fundida, pero esta vez, con un diámetro interno de 50  $\mu\text{m}$ . Al tratarse de *CE-MS* la longitud del capilar fue de 87.5 cm. En esta configuración la entrada del detector de *DAD* se encuentra a una distancia de 21.5 cm.

La identificación de los analitos se realizó a partir de sus diferentes tiempos de migración y aislando el ion mayoritario procedente de la ionización molecular correspondiente  $[M-H]^-$ . La variable cuantitativa utilizada fue la relación entre el área de pico generada por dicho ion, expresada en unidades arbitrarias y el área de pico generada por el patrón interno marcado isotópicamente. Hay que recordar que se

### III. PARTE EXPERIMENTAL

---

dispone de un patrón interno, adenosina- $^{13}\text{C}_{10}^{15}\text{N}_5$  5'-monofosfato,  $^{13}\text{C}_{10}^{15}\text{N}_5$ -AMP.

#### 3.5.3. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE).

##### **Preconcentración mediante SPE previo al análisis CE-ESI(+)-MS.**

El sorbente empleado fue el *Isolute ENV+*, un sorbente de poliestireno-divinilbenceno hidroxilado. Los cartuchos de extracción fueron acondicionados pasando secuencialmente 2.0 mL de ACN y 2.0 mL de agua *UHQ*.

El paso de las muestras de orina, 2.0 mL de muestra, a través del cartucho se llevó a cabo por gravedad. Una vez finalizada la etapa de retención los cartuchos se secan durante 15 minutos con una bomba de vacío de -15 mmHg (1mmHg = 133.322 Pa). La elución de los componentes retenidos se llevó a cabo con 2.0 mL de una mezcla de ACN:NH<sub>3</sub> con una relación 90:10 (v/v). La fase orgánica obtenida se evapora hasta sequedad en un dispositivo de evaporación que emplea una corriente de Nitrógeno (N<sub>2</sub>). El residuo seco se disuelve en 500 µL de agua *UHQ* acidulada con ácido fórmico al 0.1% (v/v).

En la Figura 3.6 se muestra un esquema del procedimiento global de análisis utilizado para la determinación de nucleósidos y nucleobases modificados.

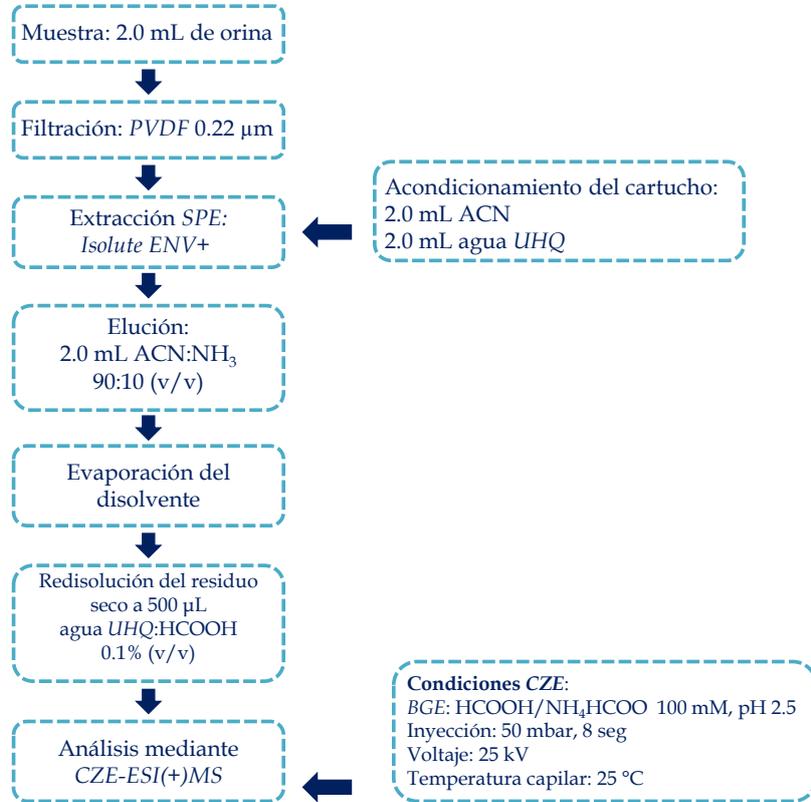


Figura 3.6. Esquema del procedimiento global de análisis para la determinación de nucleósidos y nucleobases modificados.

### Preconcentración mediante SPE previo al análisis CE-ESI(-)MS.

El sorbente empleado fue el *Isolute ENV+*, un sorbente de poliestireno-divinilbenceno hidroxilado. Los cartuchos de extracción fueron acondicionados pasando secuencialmente 5.0 mL de MeOH y 5.0 mL de agua *UHQ*.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

El paso de las muestras, 5.0 mL de orina diluida con agua *UHQ* en una proporción 1:1 (v/v), a través del cartucho se llevó a cabo por gravedad. Una vez finalizada la etapa de retención los cartuchos se secan durante 15 minutos con una bomba de vacío de -15 mmHg (1mmHg = 133.322 Pa). La elución de los componentes retenidos se llevó a cabo con 2.0 mL de una mezcla de MeOH:NH<sub>3</sub> con una relación 90:10 (v/v). La fase orgánica obtenida se evapora hasta sequedad en un equipo de concentración de muestras SBHCONC/1 que emplea una corriente de Nitrógeno (N<sub>2</sub>). El residuo seco se disuelve en 1.0 mL de una mezcla 1:10 (v/v) *BGE*:agua *UHQ*.

En la Figura 3.7 se muestra un esquema del procedimiento global de análisis utilizado para la determinación de nucleósidos y nucleósidos modificados (metilados e hidroxilados).

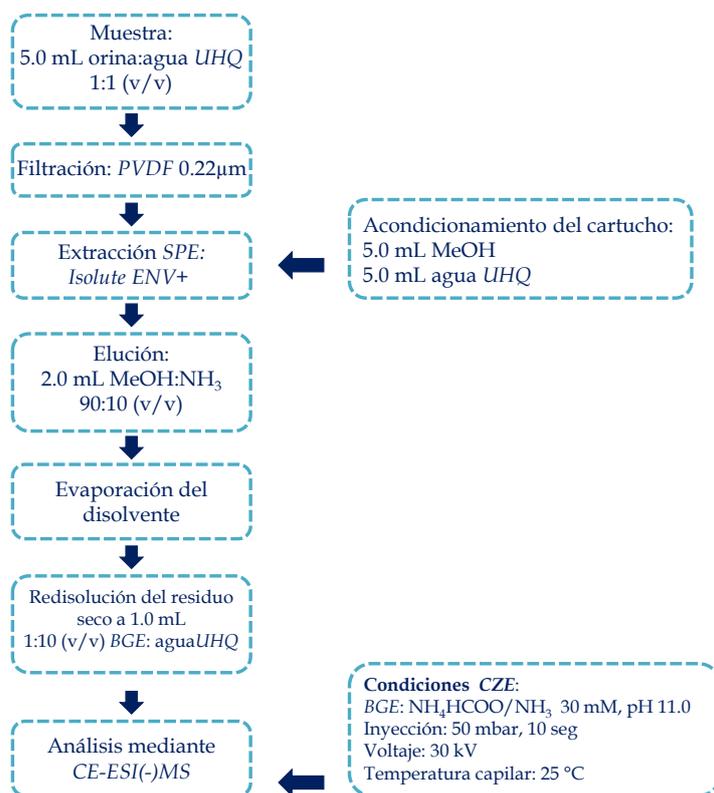


Figura 3.7. Esquema del procedimiento global de análisis para la determinación de nucleósidos y nucleósidos modificados (metilados e hidroxilados).

#### 3.5.4. MATERIAL DE ACCESO RESTRINGIDO (RAM).

Como se ha indicado anteriormente la configuración instrumental empleada en el acoplamiento *RAM/CE* es de tipo *off-line* y es similar a la modalidad de columna única con la diferencia de que el eluyente del *RAM* no alcanza directamente el detector sino que es recogido de forma manual para su posterior determinación por *CE-MS*. Esta configuración se encuentra detallada en la Figura 3.8.

En esta etapa de limpieza la inyección se lleva a cabo mediante un inyector automático que introduce la muestra en el bucle de inyección, etapa (a) “Carga bucle de muestra”, Figura 3.8.a. A continuación la válvula, que se encontraba en posición (a) cambia a la posición (b) “Inyección en el *RAM* y limpieza” e impulsa el disolvente de la bomba A, agua *UHQ*, hacia el bucle de inyección, arrastrando así el bolo de muestra desde el bucle de inyección hasta el *RAM*, como se recoge en la Figura 3.8.b. La bomba A funciona con un flujo de  $0.25 \text{ mL min}^{-1}$  durante 4 minutos. Mientras tanto los compuestos de la matriz son lavados y eliminados a desecho y los compuestos de interés son retenidos por el *RAM*. Transcurridos los 4 minutos de la etapa (b) el equipo cambia de forma automática a modo (c) “Elución del *RAM* y recogida de la muestra” y, mediante la bomba B, el disolvente óptimo para eluir los analitos, *ACN:agua UHQ* 70:30 (v/v), es impulsado hacia el *RAM* con un flujo de  $0.50 \text{ mL min}^{-1}$ . Los analitos retenidos en el *RAM* son eluidos y en vez de ser arrastrados hasta la columna cromatográfica son recogidos de forma manual en un vial, Figura 3.8.c. Controlando el tiempo de elución se recogen  $250 \mu\text{L}$  de la muestra (30 segundos). Después de la recogida de la muestra, el equipo se mantuvo en funcionamiento durante 3 minutos y medio, etapa (c), para lavar completamente el *RAM* y arrastrar así cualquier resto de analito retenido en él. A continuación, el sistema de manera automática vuelve a su posición inicial.

La fracción eluida fue evaporada mediante una corriente de  $\text{N}_2$  hasta sequedad a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Una vez que se evaporó todo el disolvente el residuo seco fue reconstituido con el medio de inyección apropiado,  $250 \mu\text{L}$  de *BGE* 30 mM (pH 11.0), para su posterior análisis mediante *CE-ESI(-)MS*.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

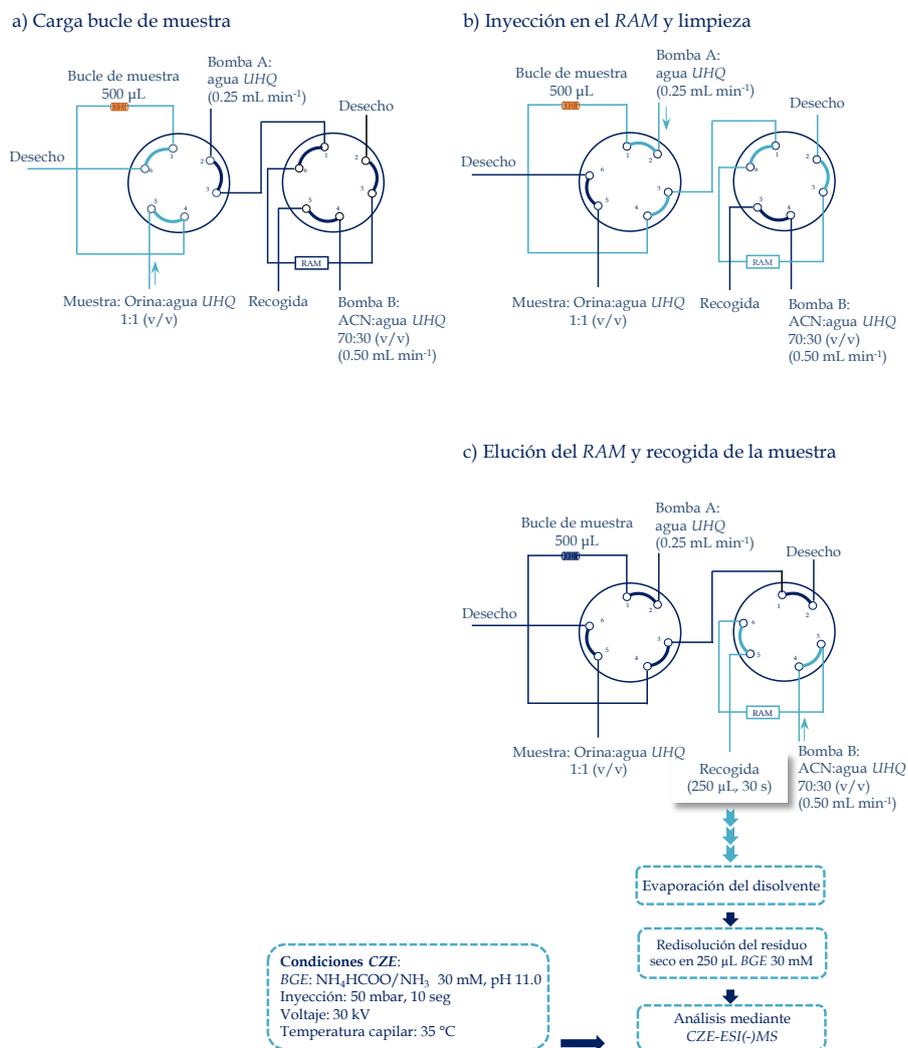


Figura 3.8. Diagrama de las dos válvulas de seis vías empleadas en la configuración instrumental *off-line* RAM/CE-MS.

IV

DETERMINACIÓN DE  
NUCLEÓSIDOS MEDIANTE  
CE-ESI-MS EN MODO POSITIVO



#### 4.1. COMPORTAMIENTO ELECTROFORÉTICO DE NUCLEÓSIDOS Y NUCLEOBASES MODIFICADOS.

Debido a la escasa bibliografía que hace referencia a la separación electroforética de estos analitos en la modalidad de electroforesis capilar zonal, *CZE*, el primer estudio a realizar en el desarrollo de este trabajo fue comprobar el comportamiento de los nucleósidos y nucleobases en diferentes medios de separación, medio ácido y medio básico, con objeto de plantear las posibilidades que ofrece esta modalidad electroforética en la separación de los electrolitos implicados. Para este estudio se utilizó un detector UV-VIS de barrera de diodos (*diode array detector, DAD*).

Como medio electroforético de separación (*background electrolyte, BGE*) se estudiaron los siguientes:

- ⇒ Medio ácido: Disolución acuosa formada por tampón ácido fórmico-formiato amónico, pH 2.5.
- ⇒ Medio básico: Disolución acuosa de amoniaco al 5% (v/v), pH 11.75.

Se utilizaron capilares de sílice de 75  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y 58.2 cm de longitud. El pretratamiento aplicado al capilar consiste en un lavado a presión con hidróxido sódico (0.1 M), agua *UHQ* y tampón ácido fórmico-formiato amónico (500 mM, pH 2.5) durante 10 minutos. Diariamente, antes de comenzar la sesión de trabajo, el capilar se refresca con agua *UHQ* y con el tampón de separación.

A la hora de hacer análisis consecutivos es conveniente realizar un lavado del capilar entre muestras, así se evitarán posibles efectos de memoria. Este proceso consiste en un lavado a presión, 4 bares, con el medio electroforético de separación durante 3 minutos y con agua *UHQ* durante 1 minuto.

La temperatura del capilar a la que se llevó a cabo la separación electroforética fue de 20 °C y se aplicó una diferencia de potencial de 20 kV. La inyección de la muestra fue de tipo hidrodinámica, aplicando una presión de 50 mbar durante 10 segundos.

Los nucleósidos y nucleobases estudiados se encuentran en una concentración de 10.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y son: Guanina (Gua), 7-metilguanina (7mGua), 1-metilguanina (1mGua), 9-metilguanina (9mGua), citidina (Cyt), adenosina (A),

1-metiladenosina, (1mA), guanosina (G), 7-metilguanosina (7mG), 2'-deoxiguanosina (2dG), 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OH2dG), inosina (INN) y 5-metiluridina (5mU).

Se inyecta cada analito por separado para conocer su tiempo de migración ( $t_m$ ) y poder tener una referencia de su comportamiento cuando se analicen mezclas de todos los nucleósidos y nucleobases.

### Medio ácido.

De todos los compuestos estudiados se comprueba que en medio ácido (pH 2.5) es posible llevar a cabo la separación de diez de ellos. A continuación se muestra el electroferograma de cada nucleósido y nucleobase estudiado, Figura 4.1.

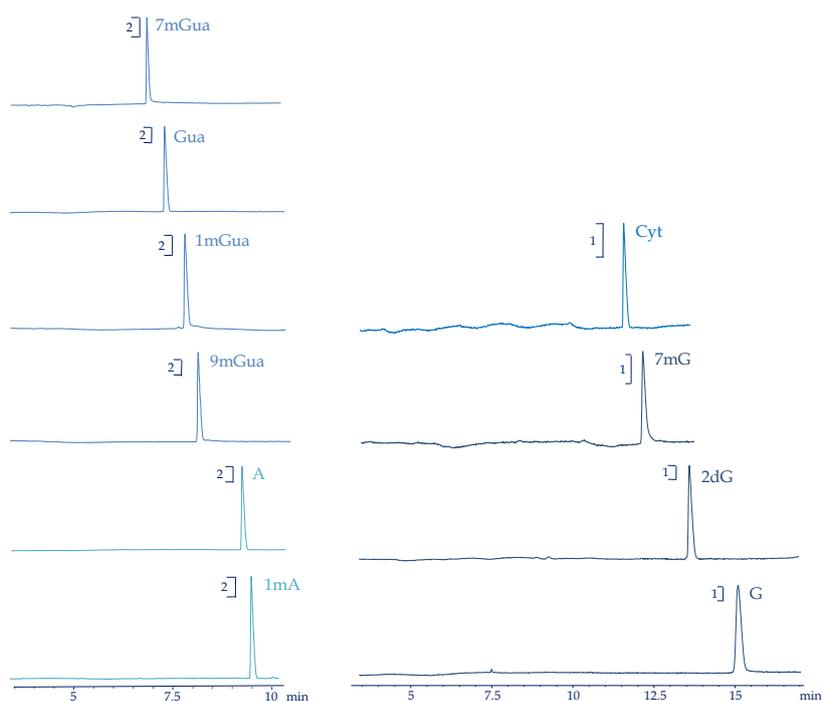


Figura 4.1. Electroferogramas de cada nucleósido y nucleobase estudiado mediante detección con barrera de diodos (*DAD*) ( $\lambda$ , 260 nm). Medio de separación: ácido fórmico-formiato amónico 500 mM, pH 2.5. Medio de inyección: agua *UHQ*, concentración 10.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de cada analito. Condiciones instrumentales: inyección hidrodinámica (50 mbar, 10 s), 20 kV.

**Medio básico.**

En la Figura 4.2 se muestra el electroferograma de cada nucleósido y nucleobase estudiado cuando el medio empleado en la separación electroforética es un medio básico, disolución acuosa de  $\text{NH}_3$  al 5% (v/v), pH 11.75.

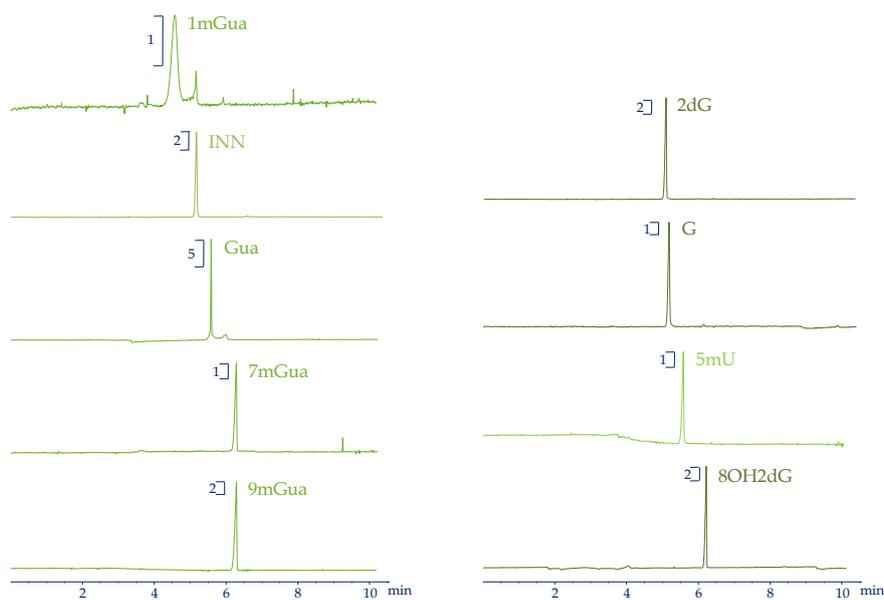


Figura 4.2. Electroferogramas de cada nucleósido y nucleobase mediante detección con barrera de diodos (DAD) ( $\lambda$ , 260 nm). Medio de separación:  $\text{NH}_3$  al 5% (v/v), pH 11.75. Medio de inyección: agua *UHQ*, concentración  $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada analito. Condiciones instrumentales: inyección hidrodinámica (50 mbar, 10 s), 20 kV.

A continuación, a modo resumen, se indican en la Tabla 4.1 los analitos que son detectados en cada medio de separación.

Tabla 4.1. Separación electroforética de nucleósidos y nucleobases en medio ácido y medio básico.

Analito	Medio Ácido	Medio Básico
7-metilguanina (7mGua)	✓	✓
Guanina (Gua)	✓	✓
1-metilguanina (1mGua)	✓	✓
9-metilguanina (9mGua)	✓	✓
Adenosina (A)	✓	✗
1-metiladenosina (1mA)	✓	✗
Citidina (Cyt)	✓	✗
7-metilguanosina (7mG)	✓	✗
2'-deoxiguanosina (2dG)	✓	✓
Guanosina (G)	✓	✓
Inosina (INN)	✗	✓
5-metiluridina (5mU)	✗	✓
8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OH2dG)	✗	✓

✓. Señal electroforética.

✗. No señal electroforética.

Los resultados obtenidos son concordantes con las propiedades ácido-base de los analitos estudiados. La única excepción la presenta el analito INN, ya que éste tiene un valor de pKa de 1.2 (ver Tabla 1.2) y por tanto se encuentra protonado en el medio ácido. El hecho de que la INN no se detecte en este estudio se debe a su baja sensibilidad en *DAD*. Sin embargo, estudios posteriores con *CE-MS* demostraron que sí puede detectarse en este medio debido a la mayor sensibilidad que presenta la espectrometría de masas frente a la detección espectrofotométrica con *DAD*.

A la vista de los resultados obtenidos se decidió realizar un estudio electroforético mediante electroforesis capilar zonal (CZE) en medio ácido, con los diez analitos susceptibles de migrar en estas condiciones.

## 4.2. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA.

Para encontrar las condiciones adecuadas en las que llevar a cabo la separación de estos analitos en medio ácido, se realizó un estudio detallado de todas aquellas variables que afectan al método: tanto las que afectan a la separación (composición del medio de separación, presencia de disolventes orgánicos, concentración del electrolito de separación y voltaje aplicado); como aquellas que afectan a la introducción de la muestra (modalidad de inyección, medio y tiempo de inyección).

### 4.2.1. INFLUENCIA DEL VOLTAJE APLICADO EN LA SEPARACIÓN.

Una etapa clave a la hora de conseguir una separación eficaz de los nucleósidos y nucleobases estudiados es la determinación de la composición del medio o tampón de separación.

Inicialmente el medio de separación ensayado fue un tampón de ácido fórmico–formiato amónico, pH 2.5.

En todo este apartado de optimización de la separación electroforética se va a emplear como muestra una mezcla acuosa de nucleósidos y nucleobases en una concentración de 10.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Los analitos presentes en la muestra son: Gua, 7mGua, 1mGua, 9mGua, A, 1mA, Cyt, G, y 2dG.

Se estudió cómo influye la presencia de un disolvente orgánico en el medio de separación. Se utilizó metanol (MeOH) como disolvente orgánico y se estudiaron medios de separación con distintas proporciones entre 2–10% (v/v).

Al realizar los primeros análisis en este medio ácido se producía una caída en la intensidad de la corriente. La única forma de solucionar este problema consistió en disminuir el tiempo de inyección de 10 a 5 segundos.

En los primeros registros obtenidos se pudo observar que no se detectaba el mismo número de señales electroforéticas como analitos había en las muestras. Para solucionar esta situación se puede optar por aumentar el tiempo de análisis o bien, por hacer un gradiente de potencial, ya que se podría pensar que se pierde algún analito al terminar el análisis en 25 minutos. Se eligió llevar a cabo escalones de potencial para adelantar la migración de los analitos más retrasados.

Para optimizar la separación electroforética inicialmente se aplica un único escalón de potencial. Este escalón se lleva a cabo transcurridos 15 minutos de análisis, aumentando el potencial de 20 a 30 kV, Figura 4.3.

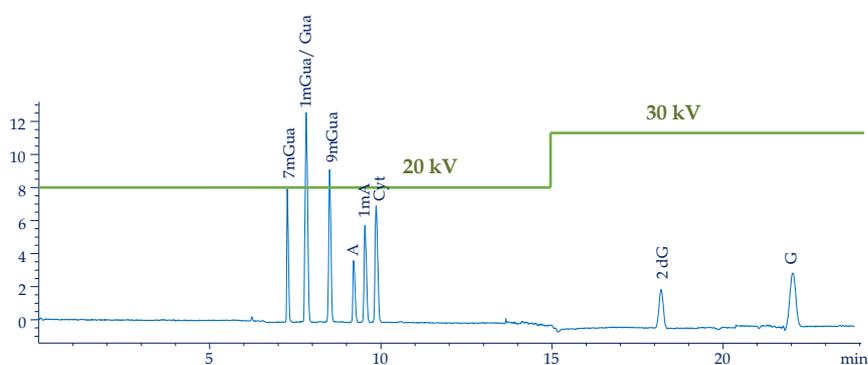


Figura 4.3. Electroferograma de una mezcla de 9 nucleósidos y nucleobases en el cuál se ha llevado a cabo un escalón de potencial. Transcurridos 15 minutos de análisis el potencial pasa de 20 a 30 kV.

En el electroferograma mostrado en la Figura 4.3 se puede observar que hay un tramo de 10 a 18 minutos en el cual no se detecta ningún analito. Por ello, se aplica otro escalón de potencial para adelantar aún más la migración de los analitos, con el propósito de poder reducir el tiempo de análisis. En este caso, transcurridos 12 minutos de análisis, se aumenta la diferencia de potencial de 20 a 25 kV y a los 15 minutos del inicio del análisis se incrementa hasta 30 kV, Figura 4.4.

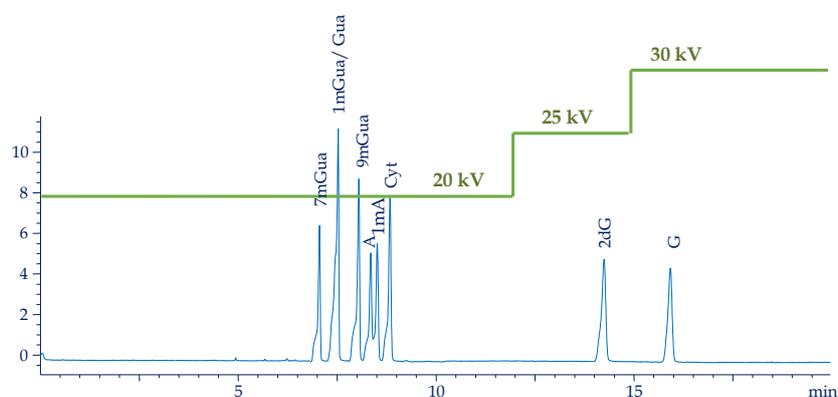


Figura 4.4. Electroferograma de una mezcla de 9 nucleósidos y nucleobases en el cuál se han llevado a cabo dos escalones de potencial: transcurridos 12 minutos de análisis el potencial pasa de 20 a 25 kV y a los 15 minutos aumenta el potencial a 30 kV.

Como se puede observar se logra un acortamiento en el tiempo de análisis: de 22 minutos, que es el tiempo al que aparece el último analito cuando se lleva a cabo un escalón en el potencial, a 16 minutos cuando se realizan dos escalones de potencial. Por lo que, en posteriores estudios se va a trabajar con dos escalones de potencial.

#### 4.2.2. OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO ELECTROFORÉTICO DE SEPARACIÓN.

##### Concentración del electrolito de separación.

En los estudios iniciales la intensidad de la corriente resultó ser bastante alta, del orden de los 100–150  $\mu\text{A}$ . Un aspecto a tener en cuenta en el acoplamiento del sistema electroforético a un detector por espectrometría de masas es que la intensidad de la corriente no debe superar los 50  $\mu\text{A}$ . Con vistas al acoplamiento de la electroforesis capilar al espectrómetro de masas se debe optimizar la

#### IV. DETERMINACIÓN DE NUCLEOSIDOS MEDIANTE CE-ESI(+)-MS

---

concentración del tampón de separación para que la intensidad de corriente sea inferior a ese valor.

Las concentraciones del medio electroforético de separación estudiadas fueron 50, 100, 150, 250 y 500 mM.

En la Tabla 4.2 se representan los valores del voltaje (kilovoltios) y de la intensidad (microamperios) al variar la concentración del medio de separación.

Tabla 4.2. Influencia de la concentración del medio electroforético de separación en la intensidad de corriente.

Ácido Fórmico- Formiato Amónico (mM)	Voltaje aplicado (kV)	Intensidad ( $\mu$ A)
50	20-30	17-27
100	20-30	25-41
150	20-30	32-52
250	20-30	45-76
500	20-30	85-165

A la vista de los resultados obtenidos, en posteriores estudios, se trabajó utilizando una concentración del tampón de separación entre 50 y 100 mM. Como el perfil de los picos empeora para la concentración de 50 mM se eligió una concentración de *BGE* de 100 mM.

**Presencia de disolvente orgánico en el medio de separación.**

La presencia de disolvente orgánico en el medio de separación puede tener un efecto importante en la resolución de los picos electroforéticos además de modificar la velocidad del flujo electroosmótico, debido a su influencia en la viscosidad del medio electroforético de separación, lo que producirá variaciones en los tiempos de migración de los compuestos.

Con el fin de determinar la influencia que el porcentaje de disolvente orgánico ejerce sobre la separación electroforética se realizó un estudio adicionando MeOH al medio de separación. Se trabajó con porcentajes de MeOH comprendidos entre el 2 y el 10% (v/v). Para este estudio se empleó una muestra con 6 analitos: 7mGua, 1mGua, 9mGua, A, 1mA y G.

Se observó un aumento en los tiempos de migración de los nucleósidos y nucleobases modificados al modificar el porcentaje de MeOH, debido al aumento de la viscosidad del medio y a la consiguiente disminución de la velocidad del flujo electroosmótico. Los electroferogramas se muestran en la Figura 4.5.

En estudios posteriores se decidió trabajar en ausencia de medio orgánico, es decir, utilizando como medio de separación una disolución acuosa tamponada de ácido fórmico-formiato amónico 100 mM, pH 2.5, ya que no se observan mejoras apreciables con la presencia del disolvente orgánico.

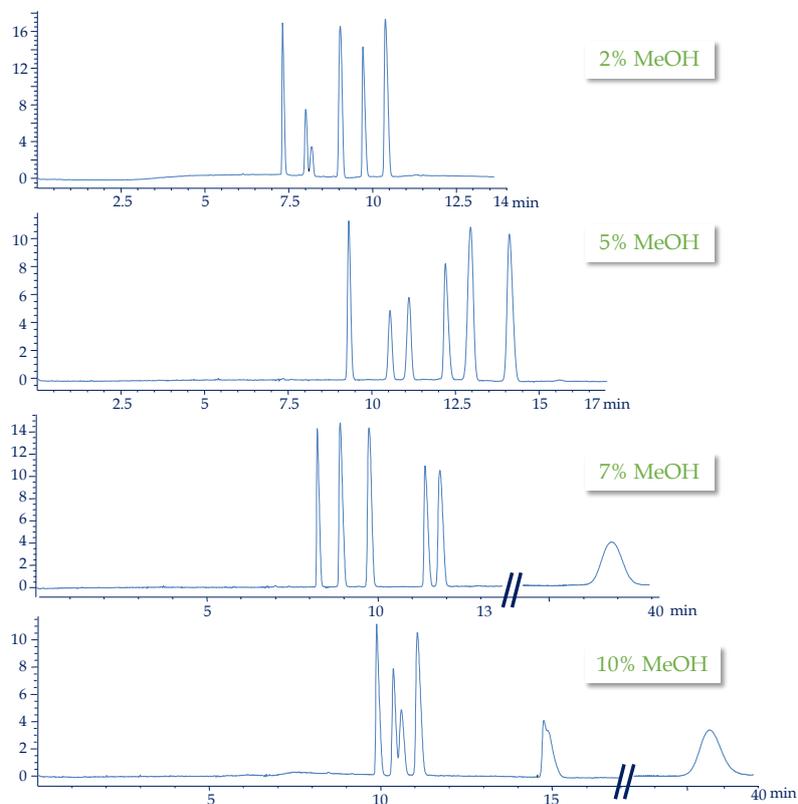


Figura 4.5. Influencia de la adición de metanol (MeOH) al medio de separación.

#### 4.2.3. ESTUDIO DE LA MODALIDAD DE INYECCIÓN.

La inyección de muestra en un sistema de electroforesis capilar se puede realizar siguiendo dos modalidades diferentes:

- ⇒ Inyección hidrodinámica: Implica la aplicación de un gradiente de presión entre los extremos del capilar.
- ⇒ Inyección electrocinética: Se aplica un gradiente de potencial eléctrico.

En ambos casos el volumen de muestra que se introduce en el capilar se controla mediante el tiempo de inyección. A mayor tiempo de inyección mayor cantidad de muestra introducida y por lo tanto, mayor sensibilidad. Sin embargo, al aumentar el tiempo de inyección se produce un ensanchamiento de la zona inyectada que puede influir negativamente en la eficacia y en la resolución. Por ello hay que llegar a una situación de compromiso que implica encontrar un tiempo de inyección para obtener una buena sensibilidad sin perjudicar la resolución entre los picos electroforéticos.

En este trabajo se investigaron ambas modalidades de inyección con objeto de encontrar cuál de ellas es la más adecuada para la separación de los analitos de interés.

#### Inyección hidrodinámica.

La inyección hidrodinámica se realizó por aplicación de una presión positiva de 50 mbar con aire durante tiempos de inyección comprendidos entre 4 y 12 segundos.

La muestra utilizada fue una mezcla patrón de los nucleósidos y nucleobases en agua *UHQ*, a una concentración de 10.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . El tampón de separación utilizado fue ácido fórmico-formiato amónico 250 mM, pH 2.5. La separación se llevó a cabo aplicando los escalones de potencial optimizados previamente.

Los resultados indican que tiempos de inyección entre 5 y 8 segundos permiten obtener una sensibilidad y selectividad adecuadas.

Con esta modalidad de inyección hidrodinámica se realizó una experiencia posterior dirigida a estudiar la posibilidad de desarrollar fenómenos de focalización durante el proceso de inyección. Por ello, se inyectó un pequeño bolo de disolución ácida inmediatamente después de la inyección de la muestra acuosa. Los protones del medio ácido son iones de gran movilidad por lo que, al aplicar el voltaje de separación, se moverán hacia el bolo de muestra. Ello deberá provocar un cambio de acidez en la zona del bolo de muestra y, por tanto, que los analitos (inicialmente neutros por estar en medio acuoso) adquieran una fracción de carga positiva que aumente su movilidad electroforética. La focalización debería producirse en la interfase de separación entre la zona de muestras y el tampón electroforético, de mayor fuerza iónica.

#### IV. DETERMINACIÓN DE NUCLEOSIDOS MEDIANTE CE-ESI(+)-MS

Este estudio se realizó inyectando la muestra en un medio acuoso durante 4 segundos y posteriormente inyectando una disolución ácida durante 1, 2 o 3 segundos. Además se modificó la concentración del medio ácido variando las concentraciones de ácido fórmico entre 0.1, 1, 2 y 5% (v/v). En los electroferogramas de la Figura 4.6 se puede observar un ejemplo de la inyección hidrodinámica convencional comparada con una inyección en la que se ha introducido un bolo de una disolución ácida, es decir, en la que se pretende llevar a cabo la focalización de los analitos.

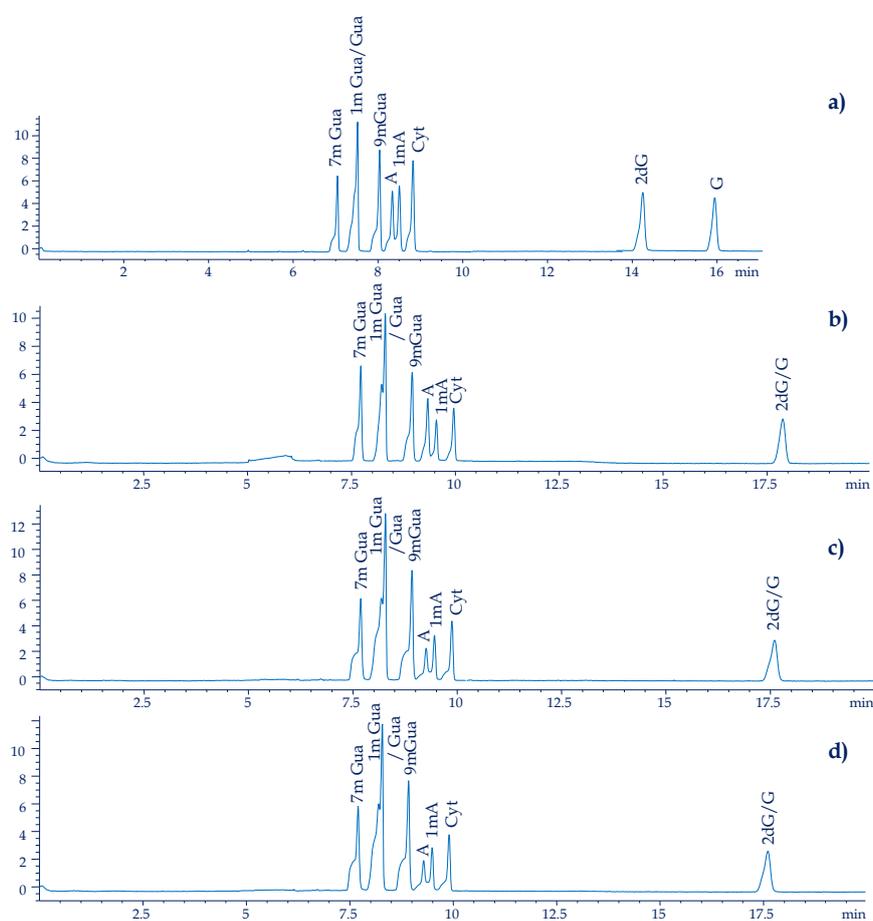


Figura 4.6. Electroferogramas para (a) una inyección hidrodinámica de muestra durante 4 segundos, (b) igual que (a) pero con inyección posterior de un bolo de medio ácido, ácido fórmico al 1% (v/v) durante 1 segundo, (c) 2 segundos y (d) 3 segundos.

No se observa ninguna mejoría en la resolución de la señal cuando se incrementa el porcentaje de medio ácido hasta el 5% (v/v) con respecto a la que se obtiene con inyección hidrodinámica simple.

Cuando se comparan los electroferogramas obtenidos al inyectar una misma concentración de ácido, 1% de ácido fórmico, variando solo los distintos tiempos de inyección del bolo de disolución ácida (Figura 4.6.b, c y d) se puede observar que tampoco hay mejoría en la sensibilidad ni en la resolución.

Todo ello indica que no se consigue efecto de focalización con la inyección de un bolo de disolución ácida.

#### Inyección electrocinética.

En la inyección electrocinética la introducción de los analitos en el capilar depende tanto del flujo electroosmótico como de la carga y movilidad de los analitos, ya que ésta se lleva a cabo mediante la aplicación de un voltaje entre los extremos del capilar.

Esta modalidad de inyección es más selectiva que la inyección hidrodinámica, ya que se basa en el mismo principio que la separación electroforética, es decir, en la migración diferencial de los iones bajo el campo eléctrico aplicado. Así, una muestra inyectada electrocinéticamente estará enriquecida en especies catiónicas, cuya movilidad electroforética se suma a la del flujo electroforético; mientras que estará empobrecida en compuestos aniónicos, cuya movilidad electroforética tiene sentido opuesto al flujo electroosmótico. Las especies neutras entrarán en el capilar únicamente dirigidas por el flujo electroosmótico.

Por ello, en este modo de inyección debemos introducir los analitos ya cargados con objeto de favorecer su entrada en el capilar, por tanto, la muestra además de estar en un medio acuoso tiene que contener un porcentaje de medio ácido, en nuestro caso un 5% (v/v) de ácido fórmico.

Se estudiaron distintos voltajes de inyección: 5, 8, 10 y 15 kV y a su vez, para cada voltaje de inyección se ensayaron distintos tiempos de inyección: 5, 15 y 25 segundos. En todas las experiencias realizadas se obtuvieron registros con picos mucho menos sensibles que los obtenidos con inyección hidrodinámica para muestras de la misma concentración. Además, se comprobó que la utilización de tiempos de inyección mayores de 5 segundos provocaba una notable deformación

#### IV. DETERMINACIÓN DE NUCLEOSIDOS MEDIANTE CE-ESI(+)-MS

de los picos electroforéticos, que presentaban una apariencia casi rectangular. Por otra parte, el aumento del tiempo de inyección origina una clara disminución de la resolución.

Un ejemplo de los resultados obtenidos al llevar a cabo una inyección electrocinética a 10 kV se muestra en la Figura 4.7.

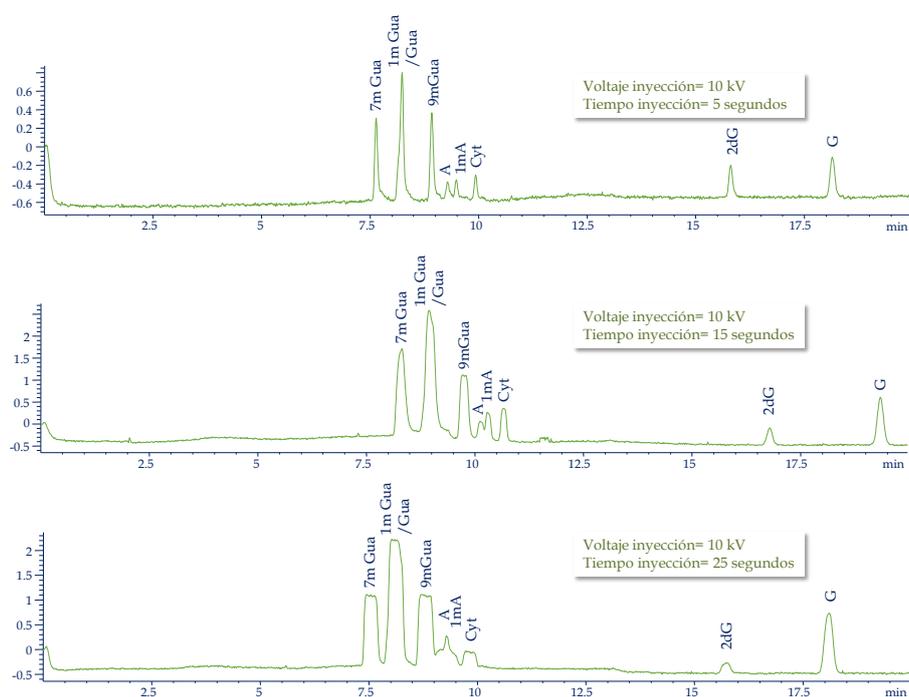


Figura 4.7. Electroferogramas de una inyección electrocinética con un voltaje de inyección de 10 kV para tiempos de inyección de 5, 15 y 25 segundos.

A la vista de los resultados obtenidos se decidió trabajar posteriormente con inyección hidrodinámica, por aplicación de una presión de 50 mbar durante 8 segundos, ya que la inyección electrocinética no supuso ninguna mejora ni en sensibilidad ni en resolución.

### 4.3. ACOPLAMIENTO ELECTROFORESIS CAPILAR – ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

El acoplamiento de un sistema de electroforesis capilar a un detector de espectrometría de masas (CE-MS) mejora notablemente la capacidad de detección de la técnica, al disponer para ello de un sistema de gran selectividad y poder de identificación.

El equipo de MS utilizado en este trabajo tiene un analizador de cuadrupolo sencillo, conectado a una fuente de ionización de electrospray (*electrospray ionization, ESI*). La interfaz con el equipo de electroforesis capilar es de tipo “líquido adicional o envolvente”, es decir, consta de un dispositivo coaxial por donde circula un líquido adicional responsable de cerrar el circuito eléctrico y a su vez, de favorecer el proceso de electronebulización.

En todo el estudio se trabajó con la interfaz ESI en modo positivo, ya que la identificación de todos los analitos se realizó registrando el ion correspondiente a la molécula protonada  $[M+H]^+$ . En la Tabla 4.3 se muestran los iones  $[M+H]^+$  empleados en la identificación y cuantificación de cada analito y los correspondientes a los patrones internos.

#### IV. DETERMINACIÓN DE NUCLEOSIDOS MEDIANTE CE-ESI(+)-MS

Tabla 4.3. Iones  $[M+H]^+$  empleados en la identificación y cuantificación, así como el peso molecular de los analitos en estudio.

Analito	M	$[M+H]^+$ (m/z)
Guanina (Gua)	151	152
7-metilguanina (7mGua)		
1-metilguanina (1mGua)	165	166
9-metilguanina (9mGua)		
Citidina (Cyt)	243	244
Adenosina (A)	267	268
1-metiladenosina (1mA)	281	282
Guanosina (G)	283	284
7-metilguanosina (7mG)	298	299
8- $^{13}\text{C}$ -guanina ( $^{13}\text{C}$ -Gua)	152	153
Ribosa-2- $^{13}\text{C}$ -adenosina( $^{13}\text{C}$ -A)	268	269

##### 4.3.1. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS QUE AFECTAN AL ELECTROSPRAY.

En este estudio se han utilizado algunos parámetros optimizados previamente en el grupo de investigación y se comprobó su eficacia a la vista de los registros obtenidos de los analitos de interés mediante inyecciones directas de patrones individuales. Los parámetros que se tomaron como óptimos fueron los siguientes:

- ⇒ Composición del líquido adicional: agua *UHQ*:isopropanol 1:1 (v/v) con ácido acético 7.5 mM.
- ⇒ Caudal del líquido adicional: 0.78  $\mu\text{L min}^{-1}$ .
- ⇒ Voltaje del capilar: +3500 V.
- ⇒ Presión del gas de nebulización: 10 psi.
- ⇒ Caudal del gas de nebulización: 6  $\text{L min}^{-1}$ .
- ⇒ Temperatura del gas de nebulización: 150 °C.

En la Figura 4.8 podemos observar el electroferograma de ion total (*TIE*) obtenido en estas condiciones.

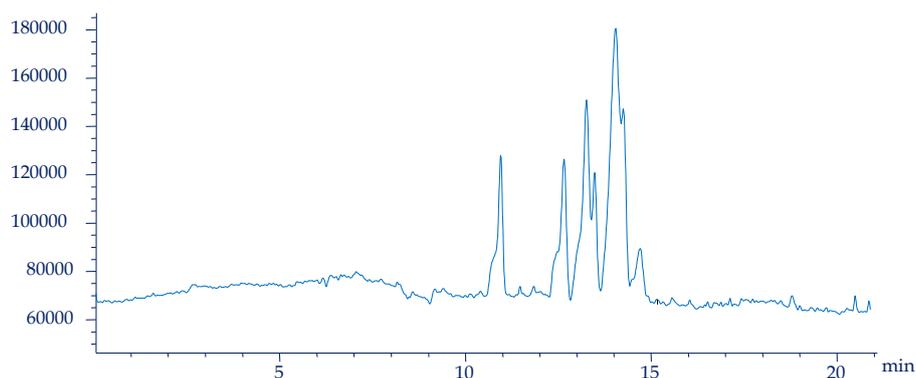


Figura 4.8. Electroferograma de ion total (*TIE*) de una mezcla de nucleósidos y nucleobases modificados utilizando como líquido adicional una mezcla de agua *UHQ*:isopropanol 1:1 (v/v) con ácido acético 7.5 mM.

También se realizaron otros estudios encaminados a la optimización de la composición del líquido adicional variando el tipo de ácido con el que se acidifica el líquido. Se realizaron estudios con ácido fórmico en la misma concentración de 7.5 mM. Los resultados obtenidos mostraron unos tiempos de migración y unas alturas muy parecidas a las obtenidas para el ácido acético, por lo que se decidió seguir trabajando con una mezcla agua *UHQ*:isopropanol 1:1 (v/v) con ácido acético 7.5 mM.

#### Optimización del potencial de cono.

Se decidió estudiar la influencia del potencial de cono sobre la sensibilidad de las señales obtenidas (y sobre la posible fragmentación de los compuestos analizados).

#### IV. DETERMINACIÓN DE NUCLEOSIDOS MEDIANTE CE-ESI(+)-MS

El potencial de cono fue variando para una mezcla de ocho nucleósidos, Gua, 7mGua, 1mGua, 9mGua, A, 1mA, Cyt y 7mG, en el margen de 40–150 V (no observándose fragmentación en el margen de potenciales aplicados). La representación de la señal obtenida para cada compuesto, en función del potencial de cono aplicado, se muestra en la Figura 4.9. En esta figura se aprecia una mayor sensibilidad en la respuesta en *ESI*(+) cuando el potencial de cono aplicado es de 100 V, por ello, en estudios posteriores se aplicó este potencial de cono.

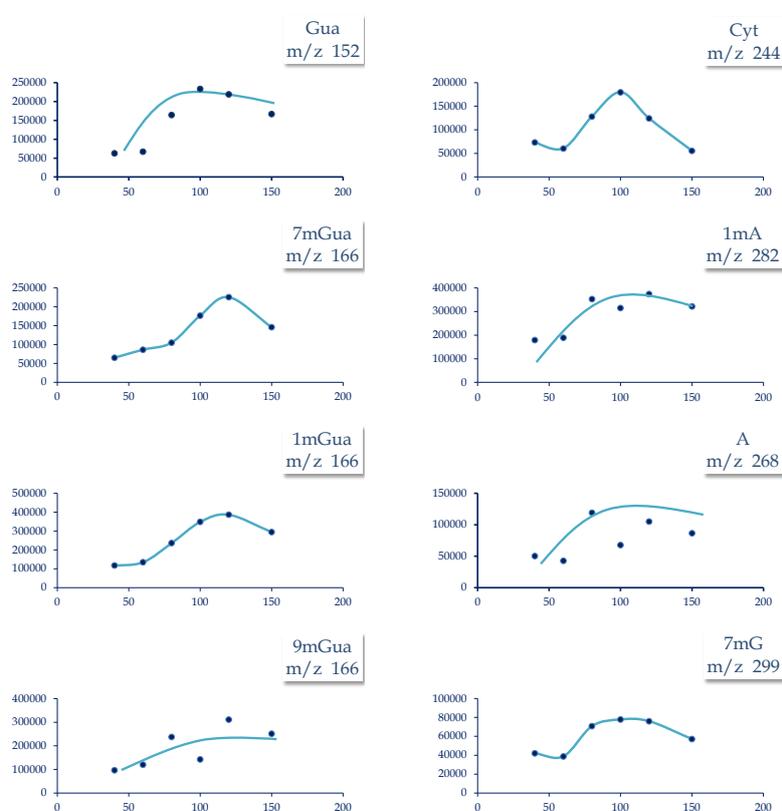


Figura 4.9. Representación gráfica de las áreas obtenidas frente a los valores diferentes de potencial de cono para cada analito.

#### IV. DETERMINACIÓN DE NUCLEOSIDOS MEDIANTE CE-ESI(+)/MS

En la Figura 4.10 se muestra el electroferograma de ion total (*TIE*) y el ion extraído de los nucleósidos y nucleobases modificados estudiados cuando se trabaja en las condiciones óptimas encontradas.

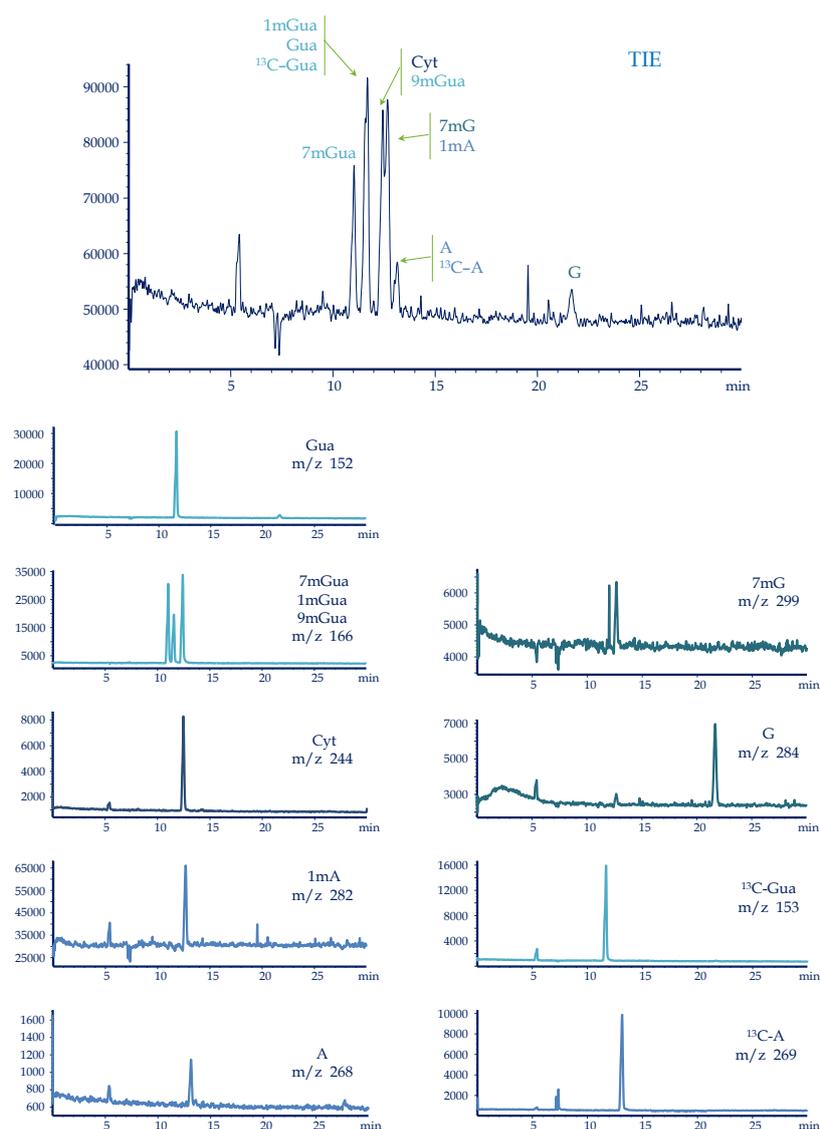


Figura 4.10. Electroferograma de ion total (*TIE*) y de ion extraído para una mezcla patrón de 9 nucleósidos y nucleobases en las condiciones óptimas. Se incluyen los compuestos utilizados como patrones internos, <sup>13</sup>C-Gua y <sup>13</sup>C-A.

#### 4.4. APLICACIÓN DEL MÉTODO DESARROLLADO: MUESTRAS DE ORINA.

En los apartados anteriores se han puesto a punto las condiciones adecuadas para la separación electroforética en medio ácido mediante electroforesis capilar zonal (*CZE*) y la posterior detección, mediante espectrometría de masas, de un conjunto de nueve nucleósidos y nucleobases modificados de interés clínico por su utilidad como marcadores biológicos de una gran variedad de patologías.

En este apartado se aborda la problemática del análisis de estos analitos en muestras reales. La dificultad que conlleva el análisis de estos metabolitos endógenos está relacionada, por una parte, con los distintos niveles de concentración en que está presente cada analito de forma natural en la orina y además, hay que contar con la gran variabilidad que presentan dichos compuestos de un individuo a otro. Por ello, en el estudio que se describe a continuación, se va a trabajar con seis muestras de orina de voluntarios sanos.

La recogida de las muestras se lleva a cabo siguiendo el procedimiento descrito en la parte experimental. Todas las muestras se almacenan a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  en frascos topacio hasta su utilización para evitar cualquier tipo de alteración en las muestras de orina. En primer lugar, antes del análisis, hay que llevar a cabo la descongelación de las muestras. Para ello se mantienen a temperatura ambiente. En las muestras de orina descongeladas se observa un residuo sólido, por lo que la muestra se toma del sobrenadante y se procede a su filtrado para eliminar el precipitado generado en el proceso de congelación, fundamentalmente proteínas. Una vez que se han filtrado las seis muestras de orina se adiciona 8- $^{13}\text{C}$ -guanina ( $^{13}\text{C}$ -Gua) y ribosa-2- $^{13}\text{C}$ -adenosina ( $^{13}\text{C}$ -A) utilizados como patrones internos en una concentración final de  $5.0\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ . Para ello se toman  $1500\text{ }\mu\text{L}$  de orina y se adicionan  $25\text{ }\mu\text{L}$  de una disolución patrón de  $^{13}\text{C}$ -Gua y  $^{13}\text{C}$ -A de concentración  $300.0\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ . A continuación se procede a su inyección en el equipo de electroforesis capilar con detector de espectrometría de masas, *CE-MS*.

En este estudio se van a detectar 9 analitos y los 2 nucleósidos que han sido añadidos a las muestras de orina para su uso como patrones internos,  $^{13}\text{C}$ -Gua y  $^{13}\text{C}$ -A.

En las figuras siguientes, Figura 4.11 y 4.12, se pueden observar los electroferogramas de ion total (*TIE*), para dos de las muestras de orina, junto con el

#### IV. DETERMINACIÓN DE NUCLEOSIDOS MEDIANTE CE-ESI(+MS)

ion extraído de los nucleósidos analizados. Las flechas indican el tiempo en el que aparecen identificados los picos de los analitos de interés.

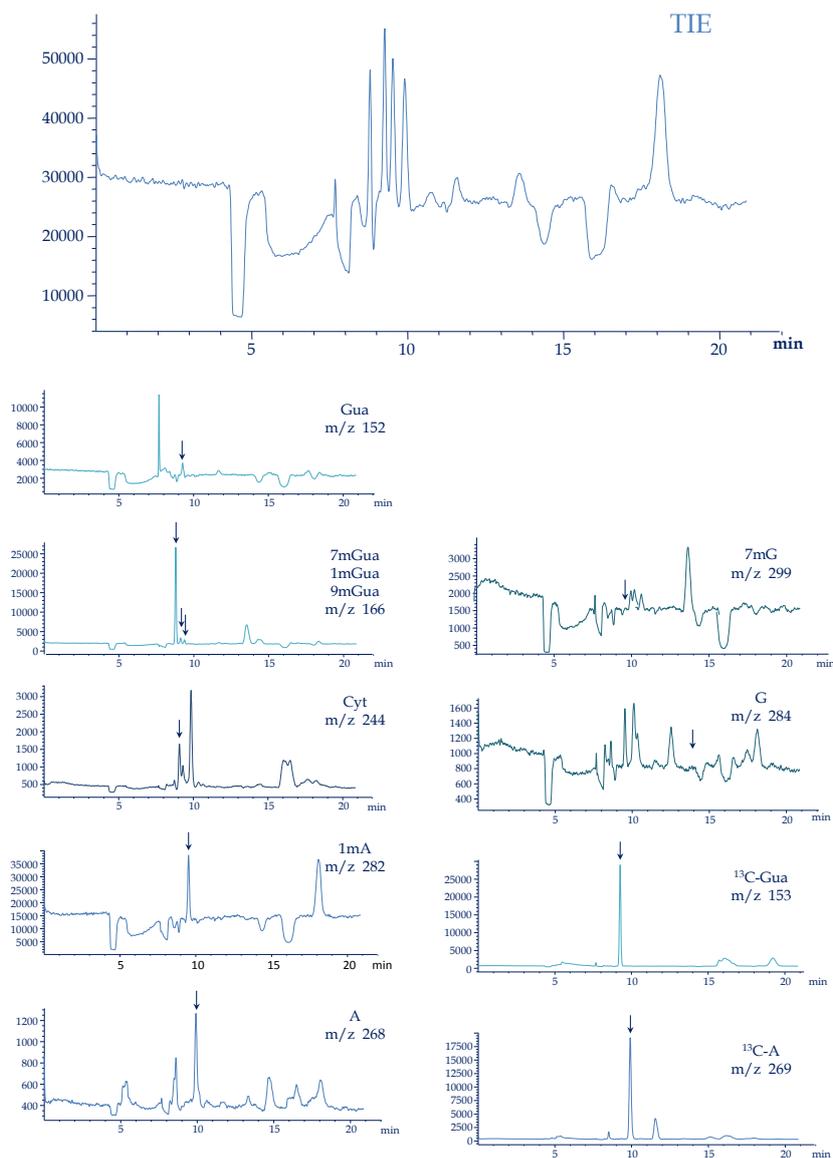


Figura 4.11. Electroferograma de ion total (*TIE*) para una orina (H2) inyectada directamente y los electroferogramas de ion extraído para los analitos estudiados. Las flechas indican el tiempo en el que aparecen identificados los picos de los analitos de interés.

IV. DETERMINACIÓN DE NUCLEOSIDOS MEDIANTE CE-ESI(+)-MS

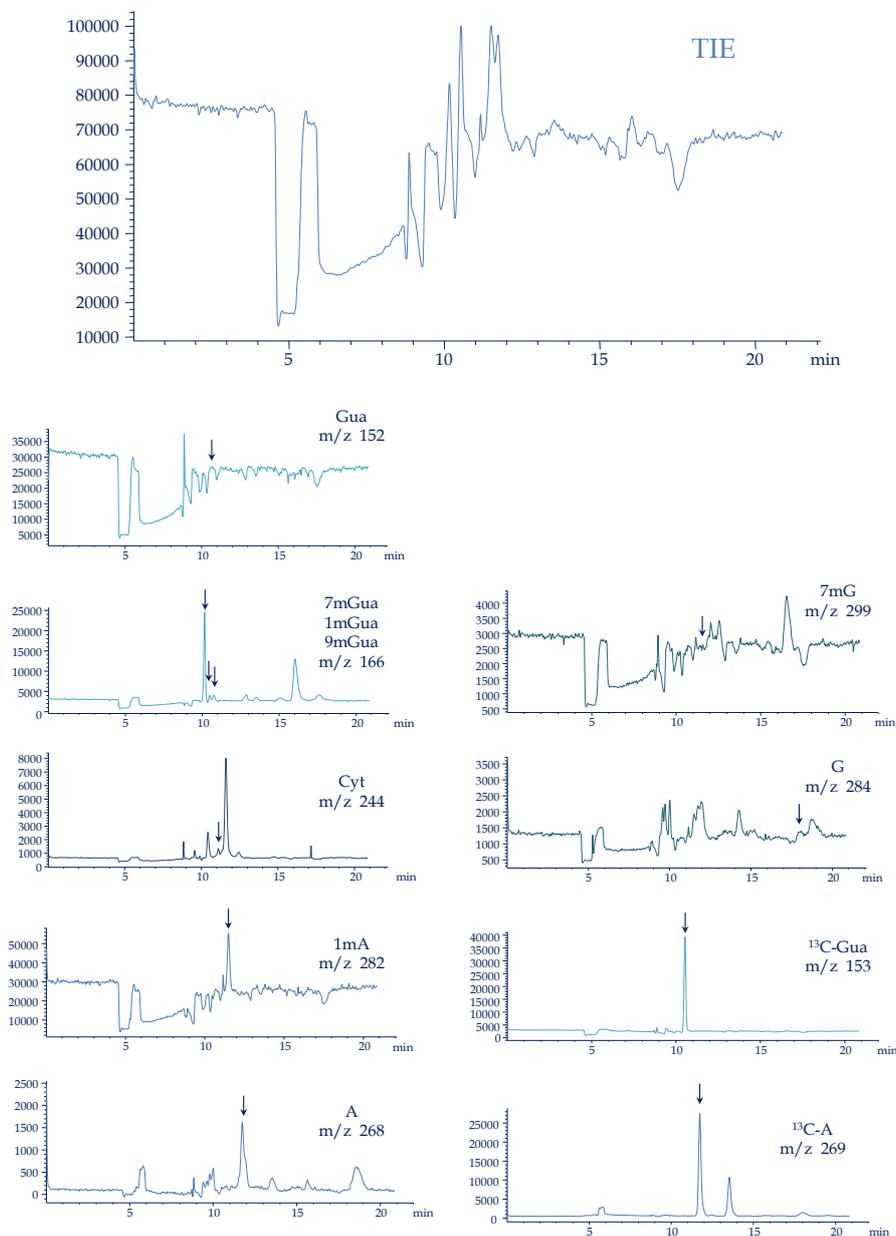


Figura 4.12. Electroferograma de ion total (*TIE*) para una orina (H3) inyectada directamente y los electroferogramas de ion extraído para los analitos estudiados. Las flechas indican el tiempo en el que aparecen identificados los picos de los analitos de interés.

En los electroferogramas obtenidos se puede observar que los nucleósidos modificados, metabolitos endógenos en individuos sanos, están a niveles de concentración muy diferentes en las muestras analizadas. Así, compuestos como 7mGua, 1mA y A se encuentran en concentraciones elevadas, mientras que Gua, 1mGua, 9mGua, Cyt, G y 7mG están en niveles más bajos. Además, en las Figuras 4.11 y 4.12, se puede comprobar la variabilidad en la señal de cada analito de interés para cada individuo.

#### 4.4.1. CUANTIFICACIÓN MEDIANTE ADICIÓN ESTÁNDAR.

Para efectuar la cuantificación se debe tener en cuenta que los nucleósidos y nucleobases son compuestos endógenos, presentes de forma natural en la orina, por lo que no es posible encontrar una matriz natural que se pueda utilizar como blanco. Por todo esto, la forma óptima para llevar a cabo la calibración es el método de adición estándar.

El método de adición estándar se emplea cuando existe la posibilidad de que se produzca efecto de matriz, es decir, cuando se produce un aumento o una disminución de la señal debido a la presencia de otros componentes. Este efecto es especialmente importante en el caso de la detección por espectrometría de masas con electrospray (ESI), dado que se ha demostrado que esta fuente de ionización sufre severas pérdidas de sensibilidad por la presencia de otros compuestos que coeluyan con los analitos de interés.

El método de la adición estándar se llevó a cabo dopando las muestras de orina, previamente descongeladas y filtradas, a tres niveles de concentración. El primer nivel fue de  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , el segundo nivel de  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  y el tercer nivel de  $2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Por su parte los patrones internos se adicionaron siempre en la misma concentración de  $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Al tratar los datos para cada muestra de orina se obtuvieron unas rectas de adición estándar cuyas pendientes, calculadas mediante regresión lineal, están recogidas en la Tabla 4.4 y representadas en la Figura 4.13.

IV. DETERMINACIÓN DE NUCLEOSIDOS MEDIANTE CE-ESI(+)-MS

Tabla 4.4. Pendientes del calibrado por el método de adición estándar para seis muestras de orina.

<b>Analito</b>	<b>H1</b> <b>Pendiente (mL·µg<sup>-1</sup>)</b>	<b>H2</b> <b>Pendiente (mL·µg<sup>-1</sup>)</b>	<b>H3</b> <b>Pendiente (mL·µg<sup>-1</sup>)</b>
Gua	0.35 ± 0.03	0.41 ± 0.04	0.34 ± 0.01
7mGua	0.41 ± 0.02	0.32 ± 0.01	0.38 ± 0.01
1mGua	0.33 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.29 ± 0.01
9mGua	0.83 ± 0.03	0.77 ± 0.01	0.73 ± 0.01
Cyt	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01
1mA	0.74 ± 0.16	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.05
A	0.06 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01
7mG	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01
G	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.11 ± 0.01
<b>Analito</b>	<b>H4</b> <b>Pendiente (mL·µg<sup>-1</sup>)</b>	<b>H5</b> <b>Pendiente (mL·µg<sup>-1</sup>)</b>	<b>H6</b> <b>Pendiente (mL·µg<sup>-1</sup>)</b>
Gua	0.39 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.39 ± 0.01
7mGua	0.34 ± 0.02	0.30 ± 0.07	0.26 ± 0.02
1mGua	0.32 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.37 ± 0.02
9mGua	0.78 ± 0.02	0.71 ± 0.02	0.76 ± 0.03
Cyt	0.15 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.10 ± 0.01
1mA	0.98 ± 0.04	0.59 ± 0.09	0.78 ± 0.08
A	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01
7mG	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.03 ± 0.01
G	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.02

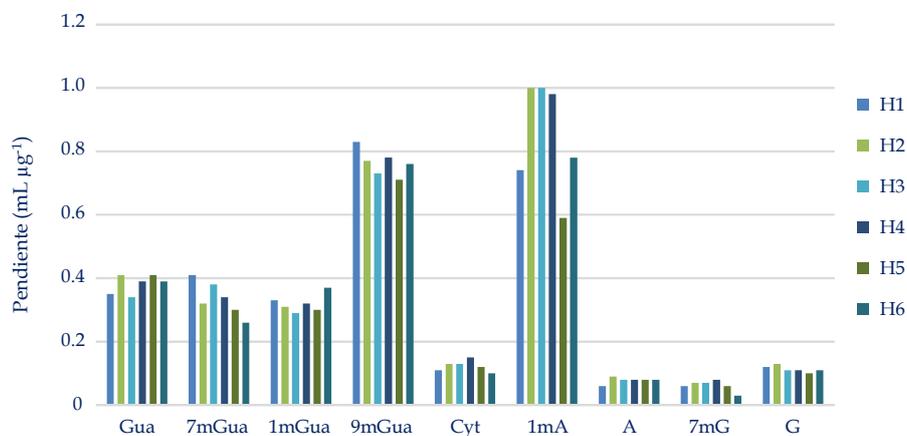


Figura 4.13. Representación de los datos de las pendientes obtenidas por el método de adición estándar para las seis muestras de orina estudiadas.

En la Figura 4.14 pueden observarse los valores obtenidos para los nucleósidos y nucleobases en unidades de concentración,  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , en las orinas de seis donantes sanos (H1–H6). Se observa la gran variabilidad en la concentración para cada muestra de orina.

En el primer grupo, Figura 4.14.a, se encuentran 7mGua, 1mA y A. Estos tres analitos aparecen en una elevada concentración en las orinas de los donantes sanos. En el segundo grupo, Figura 4.14.b, se representan aquellos analitos que se encuentran en una concentración media y baja. En este grupo se encuentran Gua, 1mGua, 9mGua, Cyt, G y 7mG. Para estos analitos sería conveniente desarrollar un método de preconcentración, dada su baja presencia en la orina de forma natural.

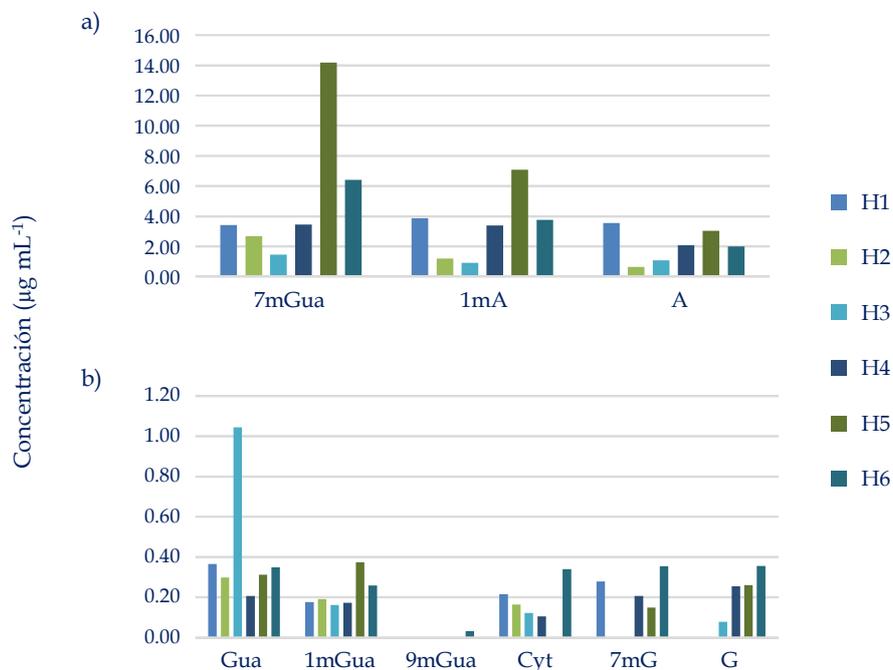


Figura 4.14. Valores encontrados en la orina de donantes sanos en unidades de µg mL<sup>-1</sup> para cada nucleósido y nucleobase.

En la Tabla 4.5 se recogen los valores obtenidos para cada analito de interés en las orinas analizadas. La concentración se expresa en unidades de µg mL<sup>-1</sup> y nmol/µmol de creatinina.

Se debe detallar cómo obtener la normalización con la creatinina a partir del valor en µg mL<sup>-1</sup> obtenido mediante el método de adición estándar. Para ello se emplea la fórmula indicada a continuación. La concentración normalizada ( $C_{\text{Norm.}}$ ) en unidades de nmol/µmol de creatinina es igual al producto de la concentración sin normalizar ( $C_{\text{sin Norm.}}$ , µg mL<sup>-1</sup>) y el peso molecular de la creatinina ( $M_{\text{Creat.}}$ , se toma el valor de 113.12 g mol<sup>-1</sup>), dividido por la concentración de la creatinina,

#### IV. DETERMINACIÓN DE NUCLEOSIDOS MEDIANTE CE-ESI(+MS)

---

característica de cada individuo ( $C_{Creat.}$ , mg dL<sup>-1</sup>) y por el peso molecular del nucleósido o nucleobase.

$$C_{Norm.} \left( \frac{nmol}{\mu mol \text{ creat.}} \right) = \frac{C_{sin Norm.} (\mu g \text{ mL}^{-1})}{C_{Creat.} (mg \text{ dL}^{-1}) \times M_{analito}} \times M_{Creat.} \times 100$$

En la Tabla 4.6 se indican las concentraciones de creatinina (en unidades de mg dL<sup>-1</sup>) de las muestras de orina de los donantes sanos.

IV. DETERMINACIÓN DE NUCLEOSIDOS MEDIANTE *CE-ESI(+)-MS*

Tabla 4.5. Concentración de los analitos de interés, presentes en seis muestras de orina, en unidades de  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y  $\text{nmol}/\mu\text{mol}$  de creatinina.

Analito	H1		H2		H3	
	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\text{nmol}/\mu\text{mol creat.}$	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\text{nmol}/\mu\text{mol creat.}$	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\text{nmol}/\mu\text{mol creat.}$
Gua	0.36	$0.28 \pm 0.09$	0.30	$0.44 \pm 0.18$	1.04	$1.54 \pm 0.14$
7mGua	3.40	$2.36 \pm 0.23$	2.68	$3.61 \pm 0.16$	1.45	$1.96 \pm 0.05$
1mGua	0.18	$0.12 \pm 0.02$	0.19	$0.26 \pm 0.05$	0.16	$0.22 \pm 0.04$
9mGua		nd		nd		nd
Cyt	0.21	$0.10 \pm 0.04$	0.16	$0.15 \pm 0.01$	0.12	$0.11 \pm 0.03$
1mA	3.85	$1.57 \pm 0.33$	1.19	$0.94 \pm 0.05$	0.91	$0.72 \pm 0.06$
A	3.53	$1.51 \pm 0.27$	0.63	$0.52 \pm 0.01$	1.07	$0.89 \pm 0.06$
7mG	0.28	$0.11 \pm 0.02$		nd		nd
G		nd		nd	0.08	$0.06 \pm 0.02$
Analito	H4		H5		H6	
	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\text{nmol}/\mu\text{mol creat.}$	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\text{nmol}/\mu\text{mol creat.}$	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$\text{nmol}/\mu\text{mol creat.}$
Gua	0.21	$0.14 \pm 0.03$	0.31	$0.13 \pm 0.02$	0.35	$0.35 \pm 0.04$
7mGua	3.43	$2.16 \pm 0.14$	14.19	$5.42 \pm 0.28$	6.39	$5.95 \pm 0.63$
1mGua	0.17	$0.11 \pm 0.01$	0.37	$0.14 \pm 0.03$	0.26	$0.24 \pm 0.06$
9mGua		nd		nd	0.03	$0.03 \pm 0.04$
Cyt	0.10	$0.04 \pm 0.01$		nd	0.34	$0.21 \pm 0.08$
1mA	3.37	$1.25 \pm 0.11$	7.07	$1.59 \pm 0.14$	3.75	$2.05 \pm 0.25$
A	2.05	$0.80 \pm 0.04$	3.03	$0.72 \pm 0.04$	1.98	$1.14 \pm 0.15$
7mG	0.21	$0.07 \pm 0.01$	0.15	$0.03 \pm 0.01$	0.35	$0.18 \pm 0.05$
G	0.25	$0.09 \pm 0.01$	0.26	$0.06 \pm 0.01$	0.35	$0.19 \pm 0.17$

IV. DETERMINACIÓN DE NUCLEOSIDOS MEDIANTE CE-ESI(+MS)

Tabla 4.6. Concentración (mg dL<sup>-1</sup>) de creatinina en las seis orinas de donantes sanos utilizados en este trabajo.

Orina	Concentración (mg dL <sup>-1</sup> )
H1	99
H2	51
H3	51
H4	109
H5	179
H6	74

En la Tabla 4.5 se muestran los niveles encontrados para los nucleósidos y nucleobases estudiados en las muestras de orina. En la Tabla 4.7 se recogen los márgenes de concentraciones experimentales encontrados en bibliografía<sup>114</sup> y los valores encontrados con nuestro método para individuos sanos.

Tabla 4.7. Concentración de los nucleósidos y nucleobases en sujetos sanos descritos en bibliografía<sup>114</sup> y en el presente trabajo. Concentraciones expresadas en nmol/μmol de creatinina.

Analito	Niveles de nucleósidos descritos en bibliografía <sup>114</sup> para sujetos sanos	Niveles de nucleósidos obtenidos en este trabajo en sujetos sanos
Cyt	0.01–0.78	0.04–0.21
1mA	2.02–2.90	0.72–2.05
A	0.18–4.70	0.52–1.51
G	0.01–10.70	0.06–0.19

Con todo esto, se pudo comprobar que los datos obtenidos para nuestras muestras de orina de individuos sanos están dentro de los valores normales indicados en bibliografía.

#### 4.4.2. VALIDACIÓN MEDIANTE LC-MS/MS.

Una vez obtenidas las concentraciones de los nucleósidos y nucleobases modificados en las muestras de orina, se validó el método propuesto comparando las concentraciones encontradas con el método electroforético y las encontradas por otra técnica. La técnica utilizada fue la cromatografía líquida con detector de espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

De forma concreta, la metodología utilizada se basa en una fase estacionaria de interacciones hidrofílicas de tipo “*zwitteriónico*” (ZIC-HILIC) acoplada a un detector de espectrometría de masas en tándem de triple cuadrupolo (QQQ) con una fuente de ionización por electrospray (ESI). El sistema cromatográfico lleva incorporado una etapa de tratamiento de muestra mediante la utilización de un material de acceso restringido (*restricted access material*, RAM) acoplado “*on-line*” a la columna cromatográfica. El método RAM-ZIC-HILIC-MS/MS ha sido previamente validado para la cuantificación de diversos nucleósidos y nucleobases en orina<sup>34</sup> según la Guía Europea de Validación para Métodos Bioanalíticos<sup>166</sup>.

La validación se llevó a cabo para las mismas muestras de orina (H2, H4 y H6) y para cuatro de los nucleósidos y nucleobases modificados estudiados en el presente trabajo: 7mGua, 1mA, A y 7mG. Todas las experiencias se llevaron a cabo simultáneamente en los equipos de CE-MS y LC-MS/MS.

En la Tabla 4.8 se pueden observar las concentraciones en unidades de nmol/ $\mu$ mol de creatinina obtenidas mediante las dos técnicas de separación, CE-MS y LC-MS/MS. La cuantificación se llevó a cabo por el método de adición estándar. Se realiza la comparación de los resultados obtenidos aplicando un test-t de dos colas.

Se puede concluir que los resultados obtenidos mediante ambas técnicas no son significativamente diferentes.

---

<sup>166</sup> European Medicines Agency (EMA), *Guideline on validation of bioanalytical methods*, CHMP/EWP/192217/2009.

IV. DETERMINACIÓN DE NUCLEOSIDOS MEDIANTE *CE-ESI(+)*MS

Tabla 4.8. Comparación de las concentraciones (nmol/ $\mu$ mol creatinina), obtenidas mediante *CE-MS* y *LC-MS/MS*, a través de un test-t de dos colas para los analitos 7mGua, 1mA, A y 7mG.

<b>7mGua (nmol/<math>\mu</math>mol creatinina)</b>			
<b>Muestra</b>	<b><i>CE-MS</i></b>	<b><i>LC-MS/MS</i></b>	<b>p<sup>a</sup></b>
H2	$3.72 \pm 0.22$	$3.82 \pm 0.19$	0.61
H4	$2.16 \pm 0.14$	$2.67 \pm 0.14$	0.02
H6	$5.94 \pm 0.59$	$6.82 \pm 0.59$	0.11

<b>1mA (nmol/<math>\mu</math>mol creatinina)</b>			
<b>Muestra</b>	<b><i>CE-MS</i></b>	<b><i>LC-MS/MS</i></b>	<b>p<sup>a</sup></b>
H2	$0.89 \pm 0.04$	$1.33 \pm 0.17$	0.02
H4	$1.25 \pm 0.11$	$1.34 \pm 0.17$	0.50
H6	$2.14 \pm 0.24$	$1.70 \pm 0.22$	0.10

<b>A (nmol/<math>\mu</math>mol creatinina)</b>			
<b>Muestra</b>	<b><i>CE-MS</i></b>	<b><i>LC-MS/MS</i></b>	<b>p<sup>a</sup></b>
H2	$0.52 \pm 0.02$	$0.51 \pm 0.04$	0.66
H4	$0.80 \pm 0.04$	$0.98 \pm 0.08$	0.04
H6	$1.20 \pm 0.17$	$1.10 \pm 0.09$	0.44

<b>7mG (nmol/<math>\mu</math>mol creatinina)</b>			
<b>Muestra</b>	<b><i>CE-MS</i></b>	<b><i>LC-MS/MS</i></b>	<b>p<sup>a</sup></b>
H2	nd	$0.10 \pm 0.01$	–
H4	$0.07 \pm 0.02$	$0.09 \pm 0.01$	0.42
H6	$0.18 \pm 0.05$	$0.10 \pm 0.01$	0.06

<sup>a</sup>. p: Probabilidad en tanto por uno, según un test-t de dos colas, de que no existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las concentraciones.

En la Figura 4.15 se muestran los resultados obtenidos.

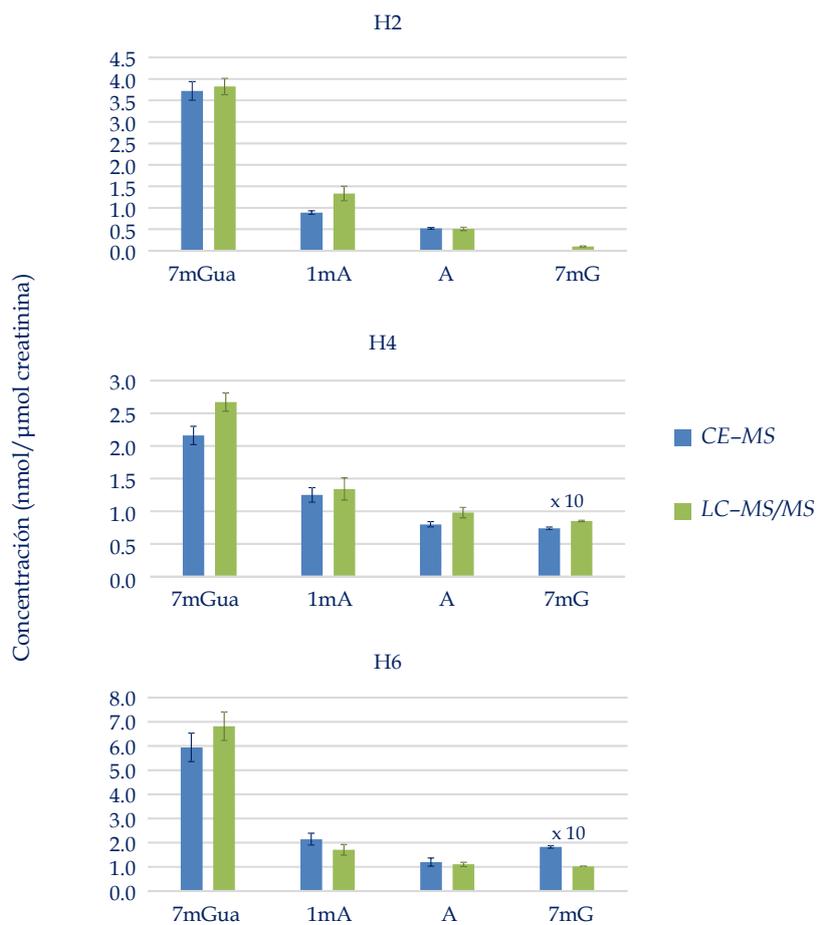


Figura 4.15. Concentraciones, en unidades de nmol/μmol de creatinina, obtenidas mediante las dos técnicas de separación, *CE-MS* y *LC-MS/MS*, para orinas de donantes sanos.

#### 4.4.3. CALIBRACIÓN EXTERNA: PATRONES ACUOSOS Y MATRIZ SINTÉTICA.

El método de adición estándar permite obtener buenos resultados, sin embargo, aunque es una aproximación eficaz al problema común de los “efectos de matriz” tiene varias desventajas. La principal es que cada muestra analizada requiere su propia gráfica de calibrado, en contraste con los experimentos de calibración en matriz externa donde una misma recta de calibrado puede proporcionar valores de concentración para varias muestras. En términos estadísticos, el método de adición estándar es un método de extrapolación y en principio menos preciso que las técnicas de interpolación.

Debido a estos inconvenientes se decidió evaluar la posibilidad de realizar una calibración externa en matriz acuosa. Para este estudio se prepararon muestras de distintas concentraciones en un intervalo de 0.5 a 2.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Las curvas de calibrado, obtenidas al representar el área normalizada con el patrón interno frente a la concentración de cada analito, muestran un comportamiento lineal en el margen estudiado.

A partir de los análisis de regresión de dichas curvas se hace un estudio sobre la posible elección de la matriz acuosa como matriz óptima para la calibración. Para ello se compararon los valores medios de las pendientes, obtenidas en matriz real mediante adición estándar, frente a las respectivas pendientes obtenidas en las mismas condiciones experimentales pero analizando estándares en agua *UHQ*. Para la comparación se aplicó un test-t de dos colas cuyos resultados se muestran en la Tabla 4.9.

En dicha tabla se puede observar que los valores de probabilidad (p) son menores de 0.05 para dos de los analitos (7mGua y 9mGua), por lo tanto existe efecto de matriz.

Tabla 4.9. Comparación de las pendientes obtenidas en orina mediante el método de adición estándar con las obtenidas en medio acuoso a través de un test-t de dos colas.

Analito	Pendiente (mL·µg <sup>-1</sup> )		p <sup>b</sup>
	Método de adición estándar <sup>a</sup>	Calibrado acuoso	
Gua	0.38 ± 0.02	0.34 ± 0.01	0.05
7mGua	0.34 ± 0.02	0.40 ± 0.01	0.02
1mGua	0.32 ± 0.03	0.33 ± 0.01	0.62
9mGua	0.76 ± 0.04	0.50 ± 0.01	<0.01
Cyt	0.12 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.10
1mA	0.89 ± 0.09	0.99 ± 0.03	0.17
A	0.08 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.22
7mG	nd	nd	–
G	0.11 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.22

<sup>a</sup>. Valor medio de las pendientes obtenidas por el método de adición estándar en las seis orinas analizadas.

<sup>b</sup>. p: Probabilidad en tanto por uno, según un test-t de dos colas, de que las pendientes no sean significativamente diferentes y, por tanto, no exista un efecto de matriz significativo.

Estos resultados sugieren la existencia de efectos de matriz en las muestras de orina, lo que afecta a la señal analítica. Por ello, para poder cuantificar los analitos en muestras de orina de forma adecuada debe utilizarse un método que corrija este efecto de matriz como la calibración en matriz real (“*matrix-matched calibration*”). Debido a que los analitos están presentes de forma endógena en la orina no es posible obtener una matriz libre de analitos, necesaria para realizar un calibrado en la matriz real. Se optó, por tanto, por realizar la calibración en matriz sintética.

La composición de la orina sintética se obtuvo a partir de datos bibliográficos y aparece en la parte experimental del presente trabajo, Tabla 3.1.

El siguiente paso a seguir fue llevar a cabo la calibración con matriz sintética. Las concentraciones variaban en un intervalo de 0.5 a 2.0 µg mL<sup>-1</sup>. Las curvas de calibrado, obtenidas al representar el área normalizada con el patrón interno frente

a la concentración de cada analito, vuelven a mostrar un comportamiento lineal en el margen estudiado.

Para comprobar la validez de la matriz sintética como matriz óptima para la calibración se compararon, mediante un test-t de dos colas, las pendientes obtenidas en matriz real frente a las obtenidas en las mismas condiciones experimentales, pero analizando estándares en orina sintética. En la Tabla 4.10 se muestran los valores de probabilidad, p. Analizando los valores obtenidos se observa que para la mayoría de los analitos “p” presenta un valor mayor de 0.05. Sólo el analito 9mGua presenta una probabilidad menor de 0.05. Por lo tanto, se propone realizar una calibración en matriz ajustada (“*matrix-matched calibration*”) en orina sintética como alternativa al método de adición estándar.

Tabla 4.10. Comparación de las pendientes ( $\text{mL} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ ) obtenidas en orina, método de adición estándar, con las obtenidas en orina sintética a través de un test-t de dos colas.

Analito	Pendiente ( $\text{mL} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ )		p <sup>b</sup>
	Método de adición estándar <sup>a</sup>	Calibrado orina sintética	
Gua	$0.38 \pm 0.02$	$0.32 \pm 0.03$	0.06
7mGua	$0.34 \pm 0.02$	$0.34 \pm 0.02$	1.00
1mGua	$0.32 \pm 0.03$	$0.26 \pm 0.03$	0.09
9mGua	$0.76 \pm 0.04$	$0.37 \pm 0.03$	<0.01
Cyt	$0.12 \pm 0.02$	$0.13 \pm 0.02$	0.58
1mA	$0.89 \pm 0.09$	$0.65 \pm 0.09$	0.05
A	$0.08 \pm 0.02$	$0.07 \pm 0.01$	0.47
7mG	nd	nd	–
G	$0.11 \pm 0.02$	$0.08 \pm 0.02$	0.16

<sup>a</sup>. Valor medio de las pendientes obtenidas por el método de adición estándar en las seis orinas analizadas.

<sup>b</sup>. p: Probabilidad en tanto por uno, según un test-t de dos colas, de que las pendientes no sean significativamente diferentes y, por tanto, no exista un efecto de matriz significativo.

## 4.4.4. CALIBRADO EN MATRIZ SINTÉTICA: PREDICCIÓN.

Finalmente, y con objeto de comprobar la validez de utilizar la calibración en orina sintética como forma de cuantificación alternativa al método de adición estándar, se compararon los resultados obtenidos por ambos métodos para aquellos analitos que son cuantificados con mayor fiabilidad. Como se ha indicado anteriormente, la presencia de estos metabolitos endógenos en orina de individuos sanos tiene niveles de concentración muy diferentes: compuestos como 7mGua, 1mA y A están en concentraciones elevadas mientras que 9mGua, 7mG y G son difíciles de detectar debido a que están presentes en niveles de concentración muy bajos.

En la Tabla 4.11 se muestran los resultados obtenidos para una de las muestras de orina analizada mediante el método de adición estándar y los obtenidos mediante predicción a través de un calibrado en orina sintética.

Tabla 4.11. Comparación de los resultados obtenidos para una de las muestras de orina analizada mediante el método de adición estándar con los obtenidos mediante predicción a través de un calibrado en orina sintética.

Analito	Método de adición estándar ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Predicción mediante calibrado de orina sintética ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	p <sup>a</sup>
Gua	0.14 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.08	0.46
7mGua	1.83 $\pm$ 0.10	1.34 $\pm$ 0.27	0.06
1mGua	0.15 $\pm$ 0.05	0.11 $\pm$ 0.09	0.55
Cyt	0.10 $\pm$ 0.05	0.12 $\pm$ 0.09	0.44
1mA	1.68 $\pm$ 0.18	1.57 $\pm$ 0.12	0.76
A	0.88 $\pm$ 0.06	0.69 $\pm$ 0.10	0.07

<sup>a</sup>. p: Probabilidad en tanto por uno, según un test-t de dos colas, de que no existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las concentraciones obtenidas mediante el método de adición estándar y las obtenidas mediante predicción a través de un calibrado en orina sintética.

Se puede comprobar que para los analitos que se encuentran en concentraciones altas y son cuantificados con mayor fiabilidad, como son 7mGua, 1mA y A, los resultados obtenidos por ambos métodos no difieren significativamente. Por tanto, la calibración en orina sintética puede considerarse una forma adecuada de calibración, lo cual simplifica considerablemente la laboriosidad del procedimiento mediante adición estándar. En cambio, para los analitos que se encuentran a niveles de concentración muy bajos, como 9mGua, 7mG y G, esta comparación es difícil de realizar ya que los resultados obtenidos por adición estándar presentan un intervalo de confianza que engloba el cero, es decir, que la concentración es tan pequeña que no es posible distinguirla de forma significativa del valor cero de concentración.

A la vista de los resultados obtenidos se confirma de nuevo la necesidad de utilizar una etapa de preconcentración que permita determinar aquellos analitos que se encuentran presentes en la orina en niveles de concentración muy bajos, los analitos 9mGua, 7mG y G.

#### **4.5. DESARROLLO DE UNA ETAPA DE PRECONCENTRACIÓN MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.**

Como ya se ha señalado en el Capítulo I, Apartado 1.4.1, el análisis mediante *CE-MS* de compuestos a nivel de trazas presenta ciertas limitaciones en la detección debido a la falta de sensibilidad provocada por el pequeño paso óptico, limitado al diámetro interno del capilar, y sobre todo por el pequeño volumen de muestra inyectada. Por todo ello se deben desarrollar técnicas de preconcentración previas al análisis *CE-MS*.

La técnica de extracción en fase sólida (*SPE*) permite la retención de los analitos de interés, su enriquecimiento y la limpieza de los interferentes presentes en la orina, por todo ello, se consideró la mejor técnica para la detección y cuantificación de nucleósidos mediante *CE-ESI(+)*MS.

#### 4.5.1. ELECCIÓN DEL SORBENTE Y DEL MEDIO DE ELUCIÓN.

Con el fin de disponer de un método más sensible para la cuantificación de nucleósidos y nucleobases modificados se realizó un estudio utilizando extracción en fase sólida (SPE) con distintos sorbentes, como etapa de preconcentración previa a la determinación electroforética.

El procedimiento global que se lleva a cabo en la etapa de preconcentración mediante extracción en fase sólida (SPE) se muestra en la Figura 4.16.

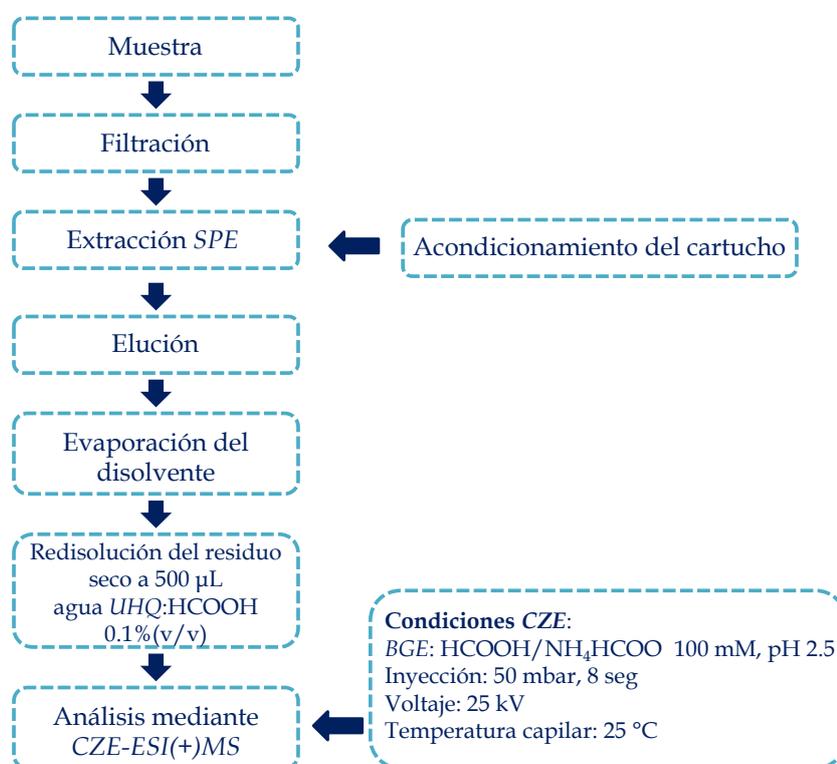


Figura 4.16. Esquema del procedimiento global de análisis para la determinación de nucleósidos y nucleobases modificados.

Inicialmente se procedió a evaluar la capacidad de distintos sorbentes para retener los compuestos de interés. Los sorbentes estudiados se enumeran a continuación:

- *Isolute® ENV+*, copolímero de estireno hidroxilado y divinilbenceno.
- *Oasis® MCX*, copolímero de divinilbenceno sulfonado y N-vinilpirrolidona.
- *Oasis® HLB*, copolímero de divinilbenceno y N-vinilpirrolidona.
- *LiChrolutEN®*, copolímero de estireno divinilbenceno.

Se utilizó una muestra de agua *UHQ* (1.0 mL) con 8 analitos a un nivel de concentración de 10.0 µg mL<sup>-1</sup>. Para efectuar la elución de los analitos retenidos en los cartuchos se empleó 1.0 mL de una mezcla ACN:NH<sub>3</sub> 90:10 (v/v). El residuo seco obtenido se redisolvió en 500 µL de agua *UHQ* acidificada con ácido fórmico 0.1% (v/v).

Las recuperaciones obtenidas están representadas en la Figura 4.17 y se muestran en la Tabla 4.12.

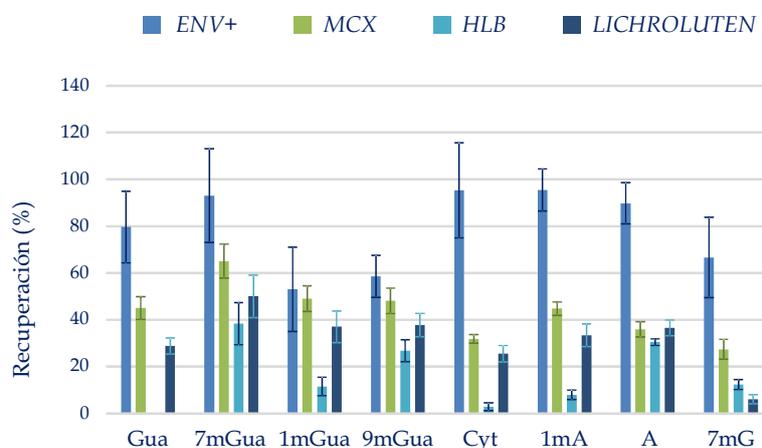


Figura 4.17. Recuperaciones (%) obtenidas en muestras de agua *UHQ* tras un paso previo de *SPE* en función del sorbente empleado.

IV. DETERMINACIÓN DE NUCLEOSIDOS MEDIANTE CE-ESI(+)-MS

Tabla 4.12. Recuperaciones (%) obtenidas al analizar muestras de agua UHQ después de una etapa de preconcentración mediante SPE en función del sorbente empleado.

Analito	Recuperación (%)			
	<i>Isolute ENV+</i>	<i>Oasis MCX</i>	<i>Oasis HLB</i>	<i>LiChrolutEN</i>
Gua	80 ± 15	45 ± 5	–	29 ± 4
7mGua	93 ± 20	65 ± 7	38 ± 9	50 ± 9
1mGua	53 ± 18	49 ± 5	12 ± 4	37 ± 7
9mGua	59 ± 9	48 ± 5	27 ± 5	38 ± 5
Cyt	95 ± 20	32 ± 2	3 ± 2	25 ± 3
1mA	95 ± 9	45 ± 3	8 ± 2	33 ± 5
A	90 ± 9	36 ± 3	30 ± 1	37 ± 3
7mG	67 ± 17	27 ± 4	12 ± 2	6 ± 2

A la vista de los resultados se puede hacer una elección del sorbente óptimo para la preconcentración de los analitos de interés. En este caso se decidió continuar los estudios posteriores con los cartuchos *Isolute ENV+* y *Oasis MCX*.

Para el sorbente *Oasis MCX*, estudios previos realizados en el grupo de investigación habían puesto de manifiesto que, el eluyente óptimo era la mezcla MeOH:NH<sub>3</sub> con una relación 95:5 (v/v). Para el sorbente *Isolute ENV+* se estudiaron dos eluyentes: una mezcla MeOH:HCOOH 0.1% (v/v) y una mezcla ACN:NH<sub>3</sub> 90:10 (v/v). Los resultados obtenidos nos muestran que el eluyente más adecuado es una mezcla de ACN:NH<sub>3</sub> 90:10 (v/v). Con el *Oasis HLB* se evaluaron otros dos eluyentes: MeOH y ACN. Para el *LiChrolutEN* se investigaron: una mezcla de ACN:HCOOH y ACN:NH<sub>3</sub> obteniéndose en todos los casos valores de recuperación más bajos.

Un esquema de los eluyentes estudiados se muestra en la Figura 4.18.

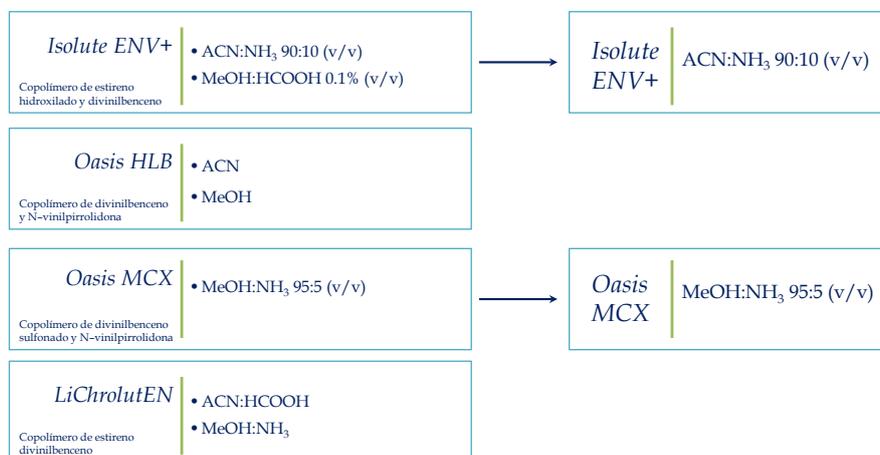


Figura 4.18. Esquema resumen de la optimización del eluyente y del sorbente.

#### 4.5.2. INFLUENCIA DEL VOLUMEN DE MUESTRA PRECONCENTRADO.

Otra variable a optimizar en un procedimiento de preconcentración en fase sólida es el volumen de muestra que puede ser preconcentrado. La mejora del factor de preconcentración basada en aumentar el volumen de muestra presenta algunas limitaciones. Por un lado, existe la posibilidad de la elución de los analitos en la propia matriz al pasar por el cartucho, fenómeno que se denomina “*breakthrough*” y que afecta fundamentalmente a los analitos de mayor polaridad, aunque dicho fenómeno es poco probable dado los bajos volúmenes que se van a optimizar. Existe también un límite práctico que es el tiempo de demora que supone el paso de volúmenes altos de muestra a flujos relativamente bajos para conseguir que se produzca la retención de los analitos.

Con el fin de establecer el volumen máximo de muestra que puede pasar por el sorbente se prepararon cuatro muestras, de volúmenes comprendidos entre 1.0 y 10.0 mL de orina filtrada, que contenía aproximadamente la misma cantidad de analito, 5.0 µg.

IV. DETERMINACIÓN DE NUCLEOSIDOS MEDIANTE CE-ESI(+)-MS

Esta etapa de optimización del volumen de muestra se llevó a cabo con los cartuchos con los que se obtuvieron mejores recuperaciones, *Isolute ENV+* y *Oasis MCX*.

Con los sorbentes indicados se realizó un estudio detallado del volumen de muestra a preconcentrar. Al ser los analitos compuestos endógenos se ha realizado el estudio con muestras de orina sin dopar y dopadas. En la Tabla 4.13 se encuentran recogidos los valores de las señales analíticas (%) para cada volumen dependiendo del tipo de sorbente empleado. La señal analítica en % se obtiene relacionando dicha señal con la de un patrón acuoso de 10.0 µg mL<sup>-1</sup>.

Tabla 4.13. Señales analíticas (%) obtenidas para una orina sin dopar en función del volumen de muestra preconcentrado utilizando como sorbente los cartuchos *Isolute ENV+* y *Oasis MCX*.

Señal analítica <sup>a</sup> (%) de orina sin dopar								
Analito	<i>Isolute ENV+</i> Volumen (mL)				<i>Oasis MCX</i> Volumen (mL)			
	10.0	5.0	2.0	1.0	10.0	5.0	2.0	1.0
Gua	23	18	8	3	9	11	6	2
7mGua	158	153	136	37	157	153	70	47
1mGua	4	4	7	4	3	5	5	3
9mGua	2	1	2	1	2	2	2	1
Cyt	75	40	21	26	136	101	60	25
1mA	177	153	113	64	356	200	87	68
A	163	135	112	50	184	152	69	45
7mG	13	14	10	13	26	24	20	2
G	3	2	1	2	4	2	1	1

<sup>a</sup>. Señal en tanto por ciento (%) con respecto a la de un patrón acuoso de 10.0 µg mL<sup>-1</sup>.

IV. DETERMINACIÓN DE NUCLEOSIDOS MEDIANTE CE-ESI(+)/MS

También se muestra la representación en diagrama de barras en la Figura 4.19, donde se pueden observar las señales analíticas, áreas de pico, obtenidas al pasar una orina sin dopar a través de los cartuchos empleados, *Isolute ENV+* y *Oasis MCX*. En la representación se observa claramente la diferente presencia de los nucleósidos en muestras de orina, siendo elevada para los analitos 7mGua, 1mA y A.

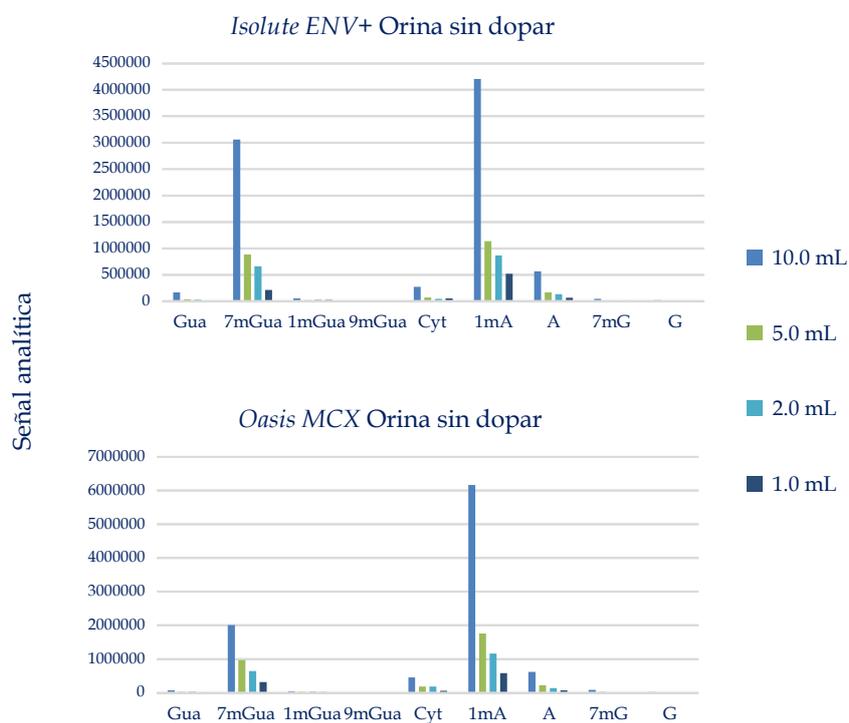


Figura 4.19. Señal analítica, área de pico, de cada analito estudiado presente en una orina sin dopar obtenida mediante una etapa de preconcentración con *Isolute ENV+* y *Oasis MCX*.

En la Tabla 4.14 se muestran las señales (%), pero en este caso, de una orina dopada con 5.0 µg de cada analito, para cada volumen, dependiendo del tipo de sorbente empleado, *Isolute ENV+* u *Oasis MCX*.

IV. DETERMINACIÓN DE NUCLEOSIDOS MEDIANTE CE-ESI(+)-MS

Tabla 4.14. Señal (%) obtenida, en función del volumen de muestra preconcentrada, utilizando como sorbentes *Isolute ENV+* y *Oasis MCX* para una orina dopada con 5.0 µg de cada analito de interés.

Analito	Señal <sup>a</sup> (%) de orina dopada							
	<i>Isolute ENV+</i>				<i>Oasis MCX</i>			
	Volumen (mL)				Volumen (mL)			
	10.0	5.0	2.0	1.0	10.0	5.0	2.0	1.0
Gua	67	63	71	47	26	29	39	29
7mGua	170	169	206	76	198	129	79	60
1mGua	18	23	81	86	12	19	32	39
9mGua	27	28	48	31	37	34	28	22
Cyt	125	60	123	99	137	90	71	66
1mA	170	183	183	147	398	249	90	93
A	221	210	238	159	237	194	120	98
7mG	24	41	17	17	51	46	31	12
G	54	53	53	13	31	27	69	44

<sup>a</sup>. Señal (%) con respecto a la de un patrón acuoso de 10.0 µg mL<sup>-1</sup>.

Como se puede comprobar en la Figura 4.19, hay analitos de los que se obtienen grandes señales analíticas, como son 7mGua, 1mA y A. Esto se debe a la cuantificación de lo presente en la orina más lo que se adiciona de forma externa en una cantidad aproximada de 5.0 µg. Por lo que, aquellos analitos que se encuentran en más baja concentración de forma endógena, se visualizan peor en el diagrama de barras. Por ello, en la Figura 4.20 sólo se han representado aquellos analitos que tienen una concentración relativamente baja. En la figura se muestran las señales relativas obtenidas al pasar una orina, dopada con analitos a un nivel de concentración en torno a 5.0 µg, a través de los cartuchos *Isolute ENV+* y *Oasis MCX*.

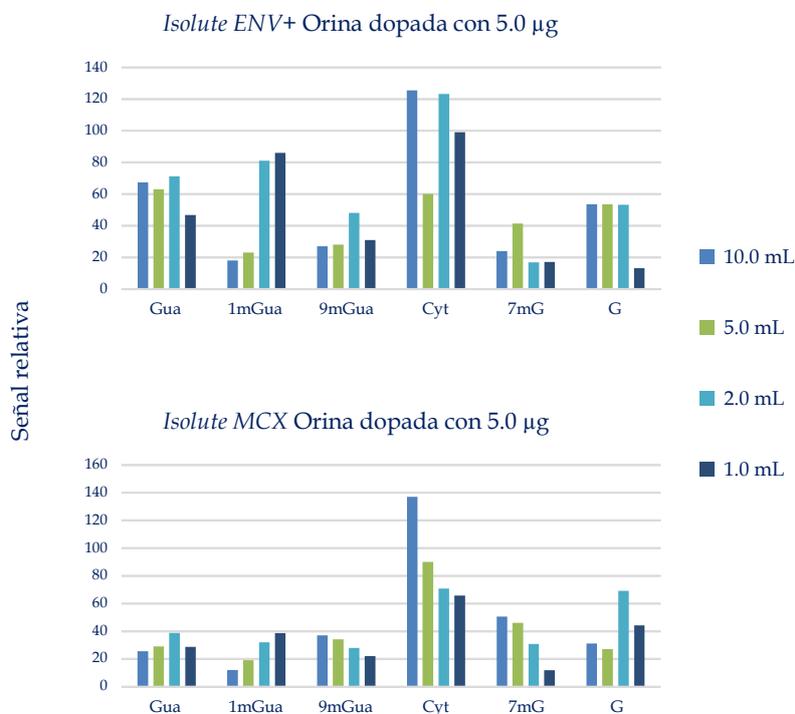


Figura 4.20. Señal relativa de los nucleósidos y nucleobases modificados presentes en una orina dopada con 5.0 µg obtenidos mediante una etapa de preconcentración.

A la vista de los resultados se eligió un volumen de 2.0 mL como compromiso entre los valores de recuperación más satisfactorios y los límites de detección más bajos que se pueden conseguir. Además, se eligió éste, ya que el volumen del reservorio del cartucho es de 3.0 mL, por lo que el paso de 2.0 mL es relativamente fácil de realizar.

Como conclusión al estudio de la influencia del volumen de muestra preconcentrada se puede indicar que el cartucho óptimo elegido para estudios posteriores será el *Isolute ENV+* y que es necesaria la utilización del patrón interno para corregir las fluctuaciones en las señales.

4.5.3. ADICIÓN DEL PATRÓN INTERNO DURANTE LA ETAPA DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.

Uno de los problemas que surge al trabajar con la técnica de electroforesis capilar acoplada a un espectrómetro de masas es la fluctuación en las señales, por lo que se plantea la necesidad de emplear uno o varios patrones internos.

En este trabajo se ha optado por trabajar con dos patrones internos: 8-<sup>13</sup>C-guanina (<sup>13</sup>C-Gua) y ribosa-2-<sup>13</sup>C-adenosina (<sup>13</sup>C-A). Esta decisión se debe a que los compuestos analizados, nucleósidos y nucleobases, poseen estructuras diferentes. Las nucleobases son compuestos que presentan una base nitrogenada mientras que los nucleósidos además de la base nitrogenada tienen acoplado a ella un azúcar. Por todo ello se decidió escoger un patrón interno cuya estructura se asemejase a los nucleósidos y otro que se asemejase a la estructura de las nucleobases. A continuación, en la Tabla 4.15 se indica qué patrón interno, de los dos empleados, se utiliza para corregir la señal de los compuestos en estudio.

Tabla 4.15. Patrones internos empleados en el presente trabajo y los analitos relacionados a los que corrigen su señal.

Patrón interno	Analito relacionado
8- <sup>13</sup> C-guanina ( <sup>13</sup> C-Gua)	Guanina (Gua)
	7-metilguanina (7mGua)
	1-metilguanina (1mGua)
	9-metilguanina (9mGua)
Ribosa-2- <sup>13</sup> C-adenosina ( <sup>13</sup> C-A)	Citidina (Cyt)
	1-metiladenosina (1mA)
	Adenosina (A)
	7-metilguanosina (7mG)
	Guanosina (G)

Debido a la necesidad de emplear patrón interno se debe estudiar cómo compatibilizarlo con la etapa de preconcentración y la influencia de adicionarlo antes o después del proceso de *SPE*.

Cuando se emplea una etapa de preconcentración en fase sólida siempre existen dos posibilidades, añadir el patrón interno antes de la etapa de preconcentración, por lo que, en este caso, los patrones internos sufren retenciones similares al resto de los analitos estudiados, o también se pueden añadir los patrones internos en el último paso, después de haber reconstituido el residuo sólido que se obtiene tras el proceso de evaporación. En este caso se tiene la seguridad de que los patrones internos no sufren ninguna retención en el sorbente. En la mayoría de las metodologías se añade el patrón interno al final del proceso de *SPE*, cuando lo que se quiere es corregir la variabilidad de la señal obtenida en el detector de espectrometría de masas.

En este trabajo se ha estudiado el posible efecto de adicionar el patrón interno antes o después de la etapa de preconcentración propiamente dicha. Para estudiar la influencia de la adición de los patrones internos durante la etapa de *SPE* se procedió a dopar orina sintética, previamente filtrada, con los nucleósidos y nucleobases modificados siguientes: Gua, 7mGua, 1mGua, 9mGua, Cyt, 1mA, A y 7mG. El estudio se realizó en cinco niveles de concentración: 0.3, 0.5, 0.8, 1.0 y 1.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , haciéndose pasar un volumen de 2.0 mL de orina sintética por un cartucho *Isolute ENV+*. Como la muestra de orina sintética preconcentrada es de 2.0 mL y se redissuelve en un volumen final de 500  $\mu\text{L}$ , procedimiento especificado en la Figura 4.21, se trabaja con un factor de preconcentración de 4.

Por otra parte, los patrones internos  $^{13}\text{C}$ -Gua y  $^{13}\text{C}$ -A fueron adicionados en dos concentraciones distintas, 1.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , si son adicionados antes de la etapa de preconcentración y 4.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  si se adicionan después de la etapa de preconcentración en fase sólida.

En la Figura 4.21 se muestra un esquema del estudio de la recuperación en matriz sintética. En la parte izquierda se muestra el proceso cuando la adición de los patrones internos se lleva a cabo al final de la etapa de preconcentración. En este caso se adicionan a la vez que se redissuelve el sólido obtenido tras la etapa de evaporación, antes del análisis mediante electroforesis capilar zonal acoplado a un espectrómetro de masas. Mientras que en el esquema de la derecha, los patrones internos se adicionan antes del proceso de extracción en fase sólida, es decir, la adición de los patrones internos se lleva a cabo a la vez que se hace la adición externa de los nucleósidos y nucleobases modificados estudiados.

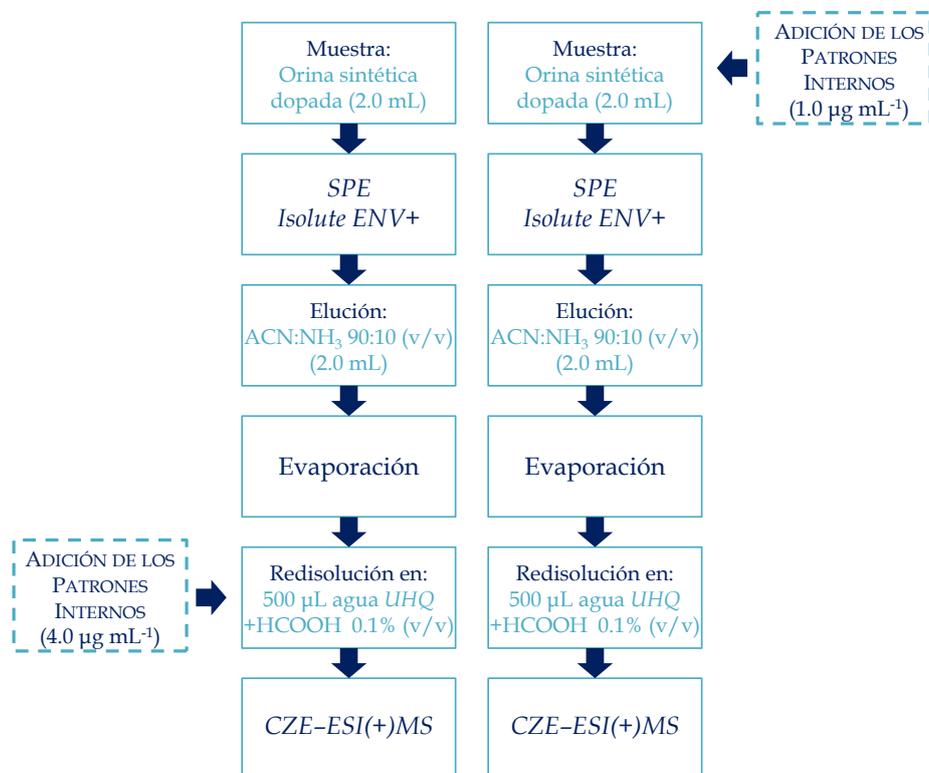


Figura 4.21. Esquema del estudio de recuperaciones en matriz sintética.

Las recuperaciones se calculan relacionando la señal obtenida con la que origina una inyección directa de muestras de orina sintética dopadas con los mismos analitos con los que se doparon las muestras anteriores, en este caso, en cinco niveles de concentración: 1.2, 2.0, 3.2, 4.0 y 6.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Para cada nivel de concentración se utilizan dos cartuchos *Isolute ENV+* y el extracto final se inyecta por triplicado. Los resultados se muestran en las Figuras 4.22.a y 4.22.b.

IV. DETERMINACIÓN DE NUCLEOSIDOS MEDIANTE CE-ESI(+MS)

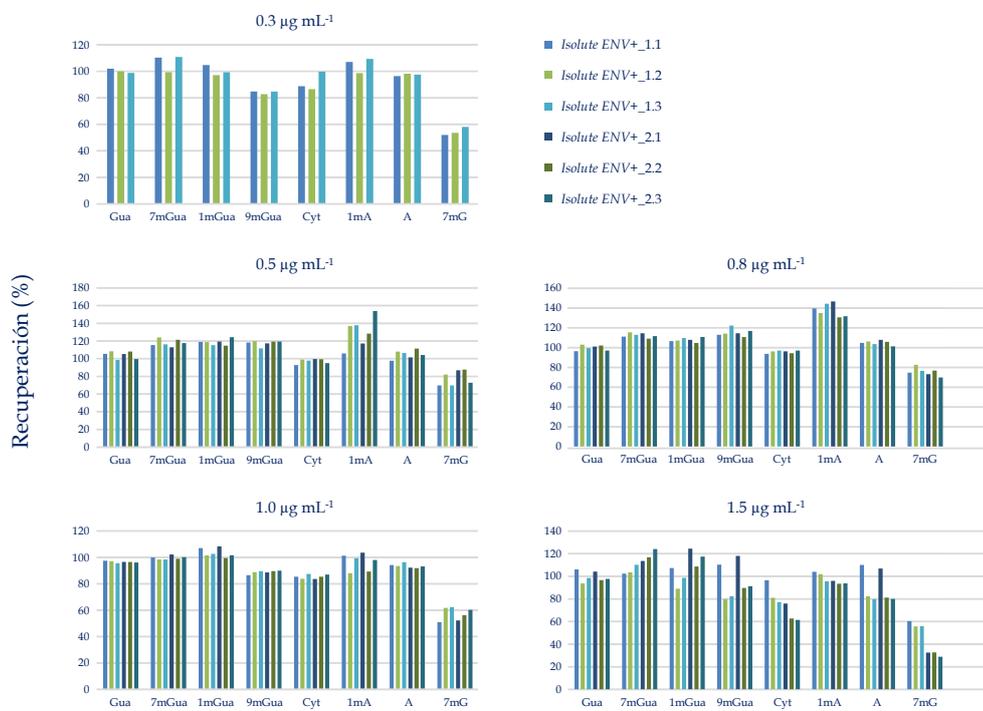


Figura 4.22.a. Recuperaciones (%) en muestras de orina sintética dopadas en cinco niveles de concentración, con un paso previo de *SPE* y con la adición de los patrones internos antes del proceso de preconcentración.

#### IV. DETERMINACIÓN DE NUCLEOSIDOS MEDIANTE *CE-ESI(+)-MS*

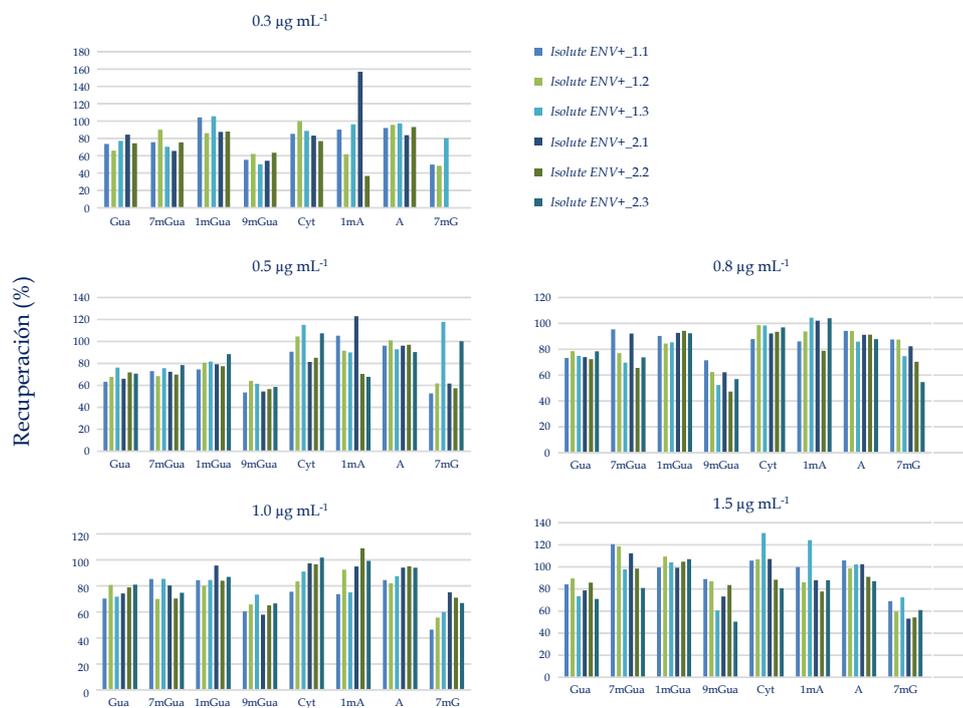


Figura 4.22.b. Recuperaciones (%) en muestras de orina sintética dopadas en cinco niveles de concentración, con un paso previo de *SPE* y con la adición de los patrones internos después del proceso de preconcentración.

Como se puede observar en las Figuras 4.22.a y 4.22.b, para las tres réplicas de los dos cartuchos se obtienen resultados reproducibles, por lo que el uso de los patrones internos puede considerarse adecuado como forma de compensar las fluctuaciones de señal que se obtienen en el detector de espectrometría de masas.

Los valores medios de recuperación se calcularon a partir de la regresión entre la señal obtenida después de la etapa de preconcentración con el sorbente *Isolute ENV+* y la concentración inicial en orina sintética. La pendiente de esta recta de regresión,  $m_{ENV+}$ , se comparó con las obtenidas en un calibrado de orina sintética obtenido por inyección directa,  $m_{ID}$ . La relación de las pendientes en ambas

IV. DETERMINACIÓN DE NUCLEOSIDOS MEDIANTE CE-ESI(+)/MS

experiencias, es decir,  $m_{ENV+}/m_{ID}$ , proporciona el valor de la recuperación media en todo el intervalo de concentraciones estudiado.

La Tabla 4.16 recoge los valores obtenidos para las experiencias realizadas adicionando el patrón interno antes y después de la etapa de preconcentración. Los resultados obtenidos en la comparación de las pendientes con y sin preconcentración,  $m_{ENV+}/m_{ID}$ , están comprendidos entre el 65–113%.

Tabla 4.16. Recuperaciones (%) obtenidas en orina sintética. Relación entre las pendientes obtenidas con y sin etapa de preconcentración. Adición de los patrones internos antes y después de la etapa de preconcentración.

Analito	Pendiente (mL $\mu\text{g}^{-1}$ )			Recuperación (%)	
	$m_{ID}^a$	$m_{ENV+\_Pre}^b$	$m_{ENV+\_Pos}^c$	$m_{ENV+\_Pre}/m_{ID}$	$m_{ENV+\_Pos}/m_{ID}$
Gua	1.75	1.61	1.42	92	81
7mGua	1.17	1.32	1.12	113	96
1mGua	0.59	0.65	0.53	110	90
9mGua	1.36	1.28	0.81	94	70
Cyt	0.66	0.55	0.60	83	91
1mA	2.48	2.65	2.00	107	81
A	0.31	0.28	0.31	90	100
7mG	0.22	0.12	0.13	65	68

a. Calibrado en orina sintética, sin preconcentrar, obtenido por inyección directa (ID).

b. Calibrado en orina sintética con preconcentración en cartucho *Isolute ENV+* (dos cartuchos diferentes, *Isolute ENV+1* e *Isolute ENV+2*, analizados por triplicado) adicionando el patrón interno antes de la etapa de *SPE*.

c. Calibrado en orina sintética con preconcentración en cartucho *Isolute ENV+* (dos cartuchos diferentes, *Isolute ENV+1* e *Isolute ENV+2*, analizados por triplicado) adicionando el patrón interno después de la etapa de *SPE*.

En la Figura 4.23 se muestran las rectas de regresión para algunos de los analitos en estudio.

#### IV. DETERMINACIÓN DE NUCLEOSIDOS MEDIANTE CE-ESI(+)-MS

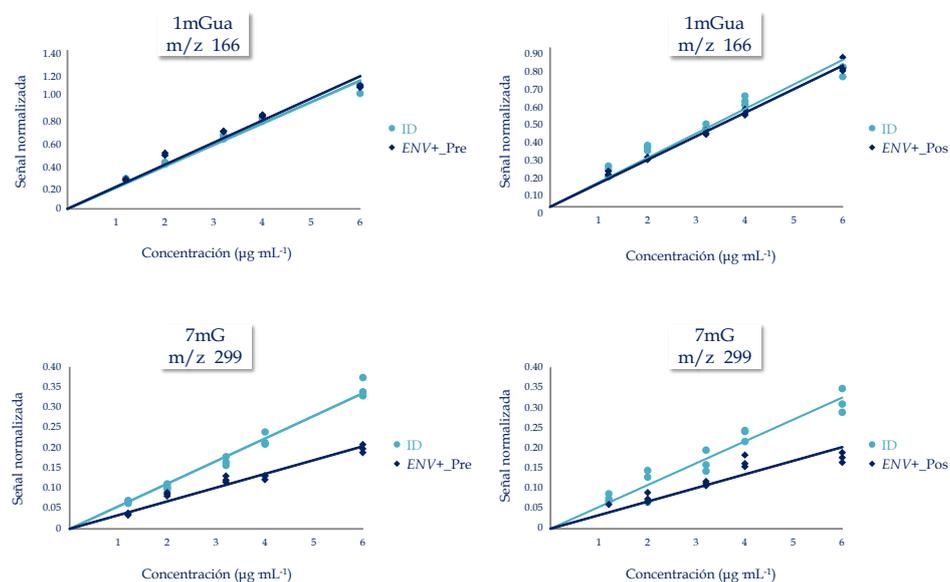


Figura 4.23. Rectas de regresión para los analitos 1mGua y 7mG.

A la vista de las recuperaciones obtenidas se deduce que la adición del patrón interno, antes o después de la etapa de preconcentración, no produce resultados significativamente diferentes.

Trabajando en las condiciones óptimas encontradas (preconcentración de 2.0 mL de orina sintética y adición del patrón interno después de la etapa de preconcentración) se determinaron las características analíticas del método. En la Tabla 4.17 se muestran los parámetros del análisis de regresión, señal analítica normalizada con el patrón interno frente a la concentración en  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . La precisión del método se determinó a partir de los valores de desviación estándar relativa en porcentaje (%), calculada para dos niveles de concentración, 0.3 y 1.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Se observa que para ambas concentraciones los valores para el coeficiente de variación están comprendidos entre 22 y 4%. Estos valores pueden considerarse aceptables teniendo en cuenta que el procedimiento engloba una etapa de preconcentración que precisa de un cambio de disolvente por evaporación del extracto eluido del cartucho y posterior redisolución del residuo seco en el medio adecuado para la separación electroforética.

IV. DETERMINACIÓN DE NUCLEOSIDOS MEDIANTE CE-ESI(+MS)

El límite analítico  $CC\alpha$  se determinó a partir de las curvas de calibración según el criterio de Verdon y col<sup>167</sup>. Dicho criterio, conforme a la Decisión 657/2002/CE, propone calcular dicho límite utilizando la siguiente expresión:

$$CC\alpha = \frac{2.33 \times S_a}{b}$$

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

Los valores encontrados están comprendidos entre 0.04 y 0.17  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para Cyt y 7mG.

Tabla 4.17. Características analíticas del método CE-MS con preconcentración.

Analito	Pendiente ( $\text{mL } \mu\text{g}^{-1}$ )	Ordenada en el origen	$R^2$	$CC\alpha^a$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$RSD^b(\%)$	
					0.30 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1.50 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Gua	$1.44 \pm 0.04$	$-0.03 \pm 0.06$	0.992	0.06	11	9
7mGua	$1.19 \pm 0.04$	$-0.03 \pm 0.04$	0.988	0.07	14	14
1mGua	$0.53 \pm 0.02$	$-0.01 \pm 0.02$	0.988	0.07	12	4
9mGua	$0.90 \pm 0.02$	$-0.03 \pm 0.02$	0.994	0.05	18	12
Cyt	$0.71 \pm 0.02$	$-0.05 \pm 0.01$	0.997	0.04	12	17
1mA	$2.00 \pm 0.09$	$-0.03 \pm 0.08$	0.989	0.09	5	9
A	$0.30 \pm 0.01$	$0.00 \pm 0.01$	0.987	0.08	7	7
7mG	$0.13 \pm 0.01$	$0.01 \pm 0.01$	0.931	0.17	22	17

a.  $CC\alpha$ : Límite de decisión.

b.  $RSD$ : Desviación estándar relativa.

<sup>167</sup> 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".

#### 4.5.4. APLICACIÓN DEL MÉTODO A UNA MUESTRA DE ORINA.

El procedimiento de preconcentración propuesto ha sido aplicado a la determinación de estos metabolitos en una muestra de orina seleccionada.

Debido a la naturaleza endógena de estos compuestos se analizó una muestra de orina sin dopar junto con una muestra de orina dopada a dos niveles de concentración, 0.5 y 1.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A todas las muestras se adicionó la misma concentración de los patrones internos,  $^{13}\text{C}$ -Gua y  $^{13}\text{C}$ -A, 1.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Se aplicó el procedimiento de preconcentración con sorbente *Isolute ENV+* tal como se optimizó anteriormente, es decir, una muestra de 2.0 mL se pasa por el cartucho y después del lavado los analitos se eluyen en una mezcla ACN:NH<sub>3</sub> 90:10 (v/v). Se evapora y se redissuelve en 500  $\mu\text{L}$  de agua *UHQ* acidificada con ácido fórmico 0.1% (v/v). Los extractos obtenidos se inyectan en el equipo *CE-MS* y las señales obtenidas, una vez normalizadas respecto al patrón interno, se introducen en un calibrado en orina sintética.

Finalmente, para completar el estudio, se compararon las concentraciones obtenidas para muestras sin dopar con la concentración endógena de los nucleósidos estudiados, utilizando el método de adición estándar. Puede observarse como los resultados obtenidos están en buena consonancia, Tabla 4.18.

Para los analitos 9mGua y 7mG no fue posible efectuar su cuantificación en las muestras sin dopar. Para el analito G, debido a su bajo nivel en la muestra de orina analizada, el procedimiento de preconcentración debería modificarse utilizando un mayor volumen de muestra.

IV. DETERMINACIÓN DE NUCLEOSIDOS MEDIANTE CE-ESI(+MS)

Tabla 4.18. Determinación de nucleósidos y nucleobases modificados en orina mediante un calibrado en matriz sintética a partir de las señales obtenidas tras la etapa de preconcentración.

Analito	Concentración puesta ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Concentración encontrada ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	
		Calibrado en orina sintética	Adición Estándar
Gua	0.00	0.08	0.09
	0.50	0.61	
	1.00	1.08	
7mGua	0.00	2.30	2.33
	0.50	2.83	
	1.00	3.47	
1mGua	0.00	0.11	0.12
	0.50	0.63	
	1.00	1.15	
9mGua	0.00	–	–
	0.50	0.41	
	1.00	0.82	
Cyt	0.00	0.06	0.06
	0.50	0.55	
	1.00	1.11	
1mA	0.00	1.09	1.15
	0.50	1.58	
	1.00	1.91	
A	0.00	4.46	4.50
	0.50	5.14	
	1.00	5.50	
7mG	0.00	–	–
	0.50	0.39	
	1.00	0.80	

## 4.6. CONCLUSIONES.

El trabajo descrito en este capítulo consiste en el desarrollo de un método basado en electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas para la separación, identificación y cuantificación de un conjunto de nucleósidos, nucleobases y derivados metilados en muestras de orina.

En este capítulo se pueden distinguir tres partes:

- Estudio de la separación electroforética.
- Determinación en muestras de orina.
- Desarrollo de un procedimiento de preconcentración.

De los resultados obtenidos en cada una de ellas se pueden extraer las siguientes conclusiones:

### ESTUDIO DE LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA.

Mediante la modalidad de electroforesis capilar zonal (*CZE*) se estudió el comportamiento electroforético de nucleósidos libres y modificados con diferentes medios de separación: ácido y básico.

Para este estudio se utilizó un conjunto inicial de 13 analitos entre los que se incluyen nucleósido como, adenosina, guanosina, inosina e uridina; nucleobases como guanina; derivados metilados como 7-metilguanina, 1-metilguanina, 9-metilguanina, 1-metiladenosina, 7-metilguanosina y 5-metiluridina; y derivados hidroxilados como 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina.

En medio ácido los analitos susceptibles de migrar electroforéticamente son:

Guanina (Gua)	1-metiladenosina (1mA)
7-metilguanina (7mGua)	Citidina (Cyt)
1-metilguanina (1mGua)	7-metilguanosina (7mG)
9-metilguanina (9mGua)	Guanosina (G)
Adenosina (A)	

Mientras que en medio alcalino es posible separar:

Guanina (Gua)	7-metilguanosina (7mG)
7-metilguanina (7mGua)	2'-deoxiguanosina (2dG)
1-metilguanina (1mGua)	Guanosina (G)
9-metilguanina (9mGua)	Inosina (INN)
Adenosina (A)	5-metiluridina (5mU)
1-metiladenosina (1mA)	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OH2dG)
Citidina (Cyt)	

Los estudios posteriores se centraron en desarrollar un método mediante electroforesis capilar zonal en medio ácido con los analitos susceptibles de migrar en estas condiciones.

La optimización de la separación electroforética en este medio ácido implica las siguientes conclusiones:

- ⇒ Medio electroforético de separación: ácido fórmico–formiato amónico 100 mM, pH 2.5.
- ⇒ Voltaje aplicado: 20 kV hasta 12 minutos, 25 kV de 12 a 15 minutos y 30 kV a partir de 15 minutos.
- ⇒ Inyección hidrodinámica: 8 segundos a 50 mbar.
- ⇒ Detección MS:
  - Analizador de cuadrupolo sencillo.
  - Interfaz de electrospray (ESI), modo positivo; voltaje del capilar: +3500 V; caudal líquido adicional: 0.78  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; presión del gas de nebulización: 10 psi, caudal del gas de nebulización: 6  $\text{L min}^{-1}$  y temperatura del gas de nebulización: 150 °C.
  - Líquido adicional: agua UHQ:isopropanol 1:1 (v/v) con ácido acético 7.5 mM.

#### DETERMINACIÓN EN MUESTRAS DE ORINA.

La aplicación a muestras de orina pone de manifiesto los distintos niveles de concentración en que se encuentran estos analitos de forma natural.

Para los analitos que se encuentran a niveles de concentración altos, 7mGua, 1mA y A, se propone un método de cuantificación mediante calibrado en orina sintética, como alternativa al método de adición estándar, ya que proporciona resultados comparables. Estos resultados se confirmaron mediante LC-MS/MS.

Para los analitos que se encuentran a niveles de concentración medios y bajos, Gua, 1mGua, 9mGua, Cyt, 7mG y G, se desarrolla un procedimiento de preconcentración basado en extracción en fase sólida (SPE) que se describe a continuación.

#### DESARROLLO DE UN PROCEDIMIENTO DE PRECONCENTRACIÓN.

Se describe un procedimiento para la extracción–preconcentración de estos analitos, en muestras de orina, basado en la utilización de un sorbente polimérico, *ENV+*, un copolímero hidroxilado de poliestireno–divinilbenceno.

El procedimiento propuesto implica un volumen de orina de 2.0 mL. La elución de los analitos se realizó con 2.0 mL de ACN:NH<sub>3</sub> 90:10 (v/v) que se evapora y se redisuelve en 500 µL de agua *UHQ* acidificada con ácido fórmico 0.1% (v/v) antes de su inyección en el sistema electroforético.

Debido a la necesidad de emplear patrón interno para cuantificar, se comprueba que su adición antes o después de la etapa de preconcentración no produzca resultados significativamente diferentes.

La recuperación obtenida para los analitos en estudio osciló entre 68% y 100% en muestras de orina.

De forma general, se puede concluir, que la metodología desarrollada en este trabajo, basada en el acoplamiento de electroforesis capilar zonal con espectrometría de masas, *CZE-ESI-MS*, es rápida y robusta, resultando apropiada para la determinación de nucleósidos y nucleobases modificados en orina.



V

DETERMINACIÓN DE  
NUCLEÓSIDOS MEDIANTE  
CE-ESI-MS EN MODO NEGATIVO



Hasta el momento se ha logrado obtener una metodología rápida y eficaz, por la cual, podrían ser detectados y cuantificados un amplio conjunto de nucleósidos, nucleobases y nucleósidos modificados, utilizando como técnica de separación la electroforesis capilar acoplada a un detector de espectrometría de masas con ionización por electrospray en modo positivo *ESI(+)*MS. Para aquellos nucleósidos que no pudieron ser detectados con esta metodología en modo positivo, el siguiente objetivo a conseguir en el presente trabajo es desarrollar un nuevo método basado en ionización por electrospray en modo negativo *ESI(-)*MS que facilite su detección.

## 5.1. ELECCIÓN DE LOS ANALITOS Y LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN Y DETECCIÓN MEDIANTE *CE-ESI(-)MS*.

En primer lugar se llevó a cabo la elección de los analitos que iban a ser estudiados. Para ello se parte de los resultados obtenidos en la Tabla 4.1 del Capítulo IV de este trabajo, donde se comprobó que mediante *ESI(+)*MS en modo positivo no era posible la identificación de los siguientes analitos: 5-metiluridina (5mU), inosina (INN) y 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OH2dG). Este es, por tanto, el grupo de analitos de interés a estudiar mediante *ESI(-)*MS. También se incluyeron aquí otros compuestos importantes relacionados con indicadores de estrés oxidativo, como son 8-hidroxiguanosina (8OHG) y 8-hidroxiguanina (8OHGua) y el nucleósido 2'-deoxiguanosina (2dG).

En este caso, la separación electroforética se llevó a cabo utilizando un medio de separación (*BGE*) con pH básico, para que estos analitos puedan migrar en forma aniónica. Teniendo en cuenta los valores de pKa que presentan los compuestos estudiados (Capítulo I) se eligió un pH de 11.0 en el que todos ellos se encontraban con carga negativa.

Para seleccionar el modo de detección óptimo, compatible con esta separación electroforética en medio básico, se realizó un estudio de la respuesta analítica obtenida para ambas modalidades de detección, *ESI(+)*MS y *ESI(-)*MS. Para ello se empleó una muestra patrón de los analitos de interés, en concentración de 10.0 µg mL<sup>-1</sup>, en un medio de separación *BGE* formiato amónico-amoniaco de concentración 30 mM, pH 11.0, inyectada a una presión de 50 mbar durante

8 segundos mediante una inyección hidrodinámica. El estudio se llevó a cabo en un capilar de 75  $\mu\text{m}$  de diámetro interno aplicando un voltaje de separación de 25 kV.

Los resultados obtenidos muestran, en el caso de la separación en medio básico y detección en *ESI(+)*, que era posible detectar todos los analitos menos 8OHG y 8OHGua. En cambio, para la separación en medio básico y detección en *ESI(-)* se detectaron todos los nucleósidos menos 8OHGua.

La elección de un modo de detección positivo o negativo se llevó a cabo también atendiendo a la relación señal/ruido. A la vista de los resultados recogidos en la Tabla 5.1, se comprueba que los mejores valores para la relación señal/ruido se obtienen con la detección *ESI(+)*, mientras que con la detección *ESI(-)* se detectaba un mayor número de analitos. Se decidió sacrificar un poco la sensibilidad para los analito INN y 5mU, para los cuales se obtuvieron mejores resultados con la detección *ESI(+)*, a favor de poder identificar y cuantificar 8OHG, analito importante, ya que está relacionado con los procesos de estrés oxidativo.

Tabla 5.1. Relación señal analítica/ruido obtenida mediante separación electroforética en medio alcalino (pH 11.0) y detección en modo *ESI(+)* y *ESI(-)* para una muestra patrón de nucleósidos (10.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) disueltos en el medio *BGE* de separación.

Analito	Señal analítica /Ruido	
	CE medio alcalino, <i>ESI(+)</i>	CE medio alcalino, <i>ESI(-)</i>
5mU	33	13
2dG	42	65
INN	73	33
8OHG	–	73
8OH2dG	24	31

Se seleccionó, para estudios posteriores, separación electroforética en medio básico, pH 11.0, y detección por espectrometría de masas mediante ionización por electrospray en modo negativo, *ESI(-)MS*, para los siguientes analitos: 5mU, 2dG, INN, 8OHG y 8OH2dG.

### 5.1.1. SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA.

En este nuevo estudio, se utilizaron algunos de los parámetros optimizados en el capítulo anterior. A continuación se van a describir las variables que afectan tanto a la separación, como a aquellas que afectan a la introducción de la muestra.

#### Variables que afectan a la separación electroforética.

Entre las variables que afectan a la separación electroforética se encuentran la composición del medio de separación (naturaleza y concentración del electrolito soporte, pH, presencia de disolventes orgánicos) y el voltaje aplicado.

Con respecto a la composición del medio de separación, en este caso, se llevó a cabo en medio básico, tampón formiato amónico–amoniaco a pH 11.0. La elección de esta composición se debe a la volatilidad del formiato amónico y del amoniaco, siempre con vistas al acoplamiento entre el equipo de electroforesis capilar y el detector de espectrometría de masas.

La siguiente variable que afecta a la separación electroforética es la concentración del electrolito de separación. En este caso se llevó a cabo la optimización de la concentración de la disolución tampón formiato amónico–amoniaco, siempre teniendo en cuenta que en el acoplamiento del sistema electroforético a un detector de espectrometría de masas, la intensidad de la corriente no debe superar los 50  $\mu\text{A}$  por lo que esto delimita mucho el rango de concentraciones estudiadas. En los apartados siguientes se va a estudiar la concentración del *BGE* de separación, durante la optimización de los parámetros dependiendo del diámetro interno del capilar utilizado.

La adición de disolventes orgánicos no se volvió a considerar, debido en parte a los resultados obtenidos en los estudios realizados en medio ácido, Capítulo IV,

donde no se observaron mejoras apreciables con la presencia del disolvente orgánico.

Por último, el voltaje aplicado para la separación electroforética fue de 25 kV, pero este valor puede variar a lo largo del estudio, y en especial cuando se analicen muestras de orina, debido a las interferencias que presenta una matriz compleja como es la orina. Aquí no se planteó la aplicación de escalones de potencial ya que la separación electroforética transcurre en un tiempo aceptable.

#### Variables que afectan a la introducción de la muestra.

Entre las variables que afectan a la introducción de la muestra se encuentran, la modalidad de inyección (electrocinética e hidrodinámica) y el tiempo y medio de inyección.

En la inyección electrocinética la introducción de la muestra se lleva a cabo mediante la aplicación de un voltaje entre los extremos del capilar que provoca la migración de los iones bajo el campo eléctrico aplicado. Esta modalidad de inyección no ofreció ninguna mejora significativa, todo lo contrario, producía una disminución de la sensibilidad, en comparación con lo obtenido mediante la inyección hidrodinámica, y además se apreciaba una notable modificación en la morfología de los picos electroforéticos, por lo que se desestimó el estudio del modo de inyección electrocinético.

El modo de inyección seleccionado para introducir la muestra en el capilar fue la inyección hidrodinámica, en la cual se aplica un gradiente de presión entre los extremos del capilar que permite la introducción de la muestra. La inyección hidrodinámica se llevó a cabo aplicando una presión positiva de 50 mbar con aire durante tiempos de inyección que variaron dependiendo de la naturaleza de la muestra analizada. Cabe destacar que no es lo mismo inyectar patrones acuosos que muestras de orina, por lo que a medida que progrese el estudio puede ser necesario modificar el volumen de inyección en cada caso.

### 5.1.2. ACOPLAMIENTO ELECTROFORESIS CAPILAR–ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Como se ha señalado previamente, el acoplamiento de un sistema de electroforesis capilar a un detector de espectrometría de masas mejora notablemente la capacidad de detección al disponer de un sistema que aporta una elevada selectividad. El equipo de espectrometría de masas utilizado en este trabajo consta de un analizador de cuadrupolo sencillo, conectado a una fuente de ionización de electrospray (*ESI*). La interfaz con el equipo de electroforesis capilar es de tipo coaxial por donde circula un líquido adicional responsable de cerrar el circuito eléctrico y a su vez de favorecer el proceso de nebulización.

Señalar que la diferencia entre esta parte del trabajo y el capítulo anterior se encuentra en el modo de la interfaz *ESI* en el que se llevó a cabo la determinación de los analitos de interés. En este caso se trabajó con la interfaz en modo *ESI* negativo, registrando el ion correspondiente a la molécula desprotonada  $[M-H]^-$ . En la Tabla 5.2 se muestran los iones  $[M-H]^-$  empleados en la identificación y cuantificación de cada analito y el patrón interno empleado (Adenosina– $^{13}C_{10}^{15}N_5$  5′–monofosfato ( $^{13}C_{10}^{15}N_5$ –AMP)).

Tabla 5.2. Iones  $[M-H]^-$  empleados en la identificación y cuantificación, así como las masas moleculares de los analitos en estudio.

Analito	M	$[M-H]^-$ (m/z)
5–metiluridina (5mU)	258	257
2′–deoxiguanosina (2dG)	267	266
Inosina (INN)	268	267
8–hidroxiguanosina (8OHG)	299	298
8–hidroxi–2′–deoxiguanosina (8OH2dG)	283	282
Adenosina– $^{13}C_{10}^{15}N_5$ 5′–monofosfato ( $^{13}C_{10}^{15}N_5$ –AMP)	362	361

**Parámetros que afectan al electrospray.**

Los parámetros que afectan al electrospray son los descritos anteriormente para la determinación y cuantificación de nucleósidos y nucleósidos modificados en modo *ESI(+)**MS* y se describen a continuación.

- ⇒ Composición del líquido adicional: posee la misma proporción y composición que el descrito anteriormente, agua *UHQ*:isopropanol 1:1 (v/v), pero en este caso no se adicionó ácido acético.
- ⇒ Caudal del líquido adicional: 0.78  $\mu\text{L min}^{-1}$ .
- ⇒ Voltaje del capilar: -3500 V.
- ⇒ Caudal del gas de nebulización: 7  $\text{L min}^{-1}$ .
- ⇒ Temperatura del gas de nebulización: 350°C.

Hay que indicar que la presión del gas de nebulización es un parámetro que se estudiará posteriormente, en función del capilar utilizado, puesto que se ha comprobado que es un parámetro cuya magnitud puede afectar a la separación y detección en sistemas *CE-MS* que implica la separación de especies aniónicas. En el siguiente apartado se describen los estudios desarrollados con capilares de sílice fundida con distintos diámetros internos.

## 5.2. ELECCIÓN DEL CAPILAR EMPLEADO EN LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA EN FUNCIÓN DE SU DIÁMETRO INTERNO.

Los capilares estudiados fueron de sílice fundida con diámetros internos de 50, 75 y 100  $\mu\text{m}$ , todos ellos con la misma longitud, 87.5 cm, hasta el detector *MS*.

### 5.2.1. CAPILAR CON DIÁMETRO INTERNO DE 75 $\mu\text{m}$ .

El primer capilar estudiado fue el de diámetro interno de 75  $\mu\text{m}$  por ser el utilizado en la determinación de nucleósidos mediante *CE-ESI(+)**MS*.

Para llevar a cabo la separación electroforética, el voltaje aplicado fue de 25 kV y el *BGE* empleado fue un tampón formiato amónico-amoniaco, concentración 30 mM, ajustado a pH 11.0. La inyección de la muestra se realizó con la modalidad de inyección hidrodinámica aplicando una presión de 50 mbar durante 8 segundos y la muestra inyectada fue una mezcla de los nucleósidos estudiados en una concentración de 10.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  disueltos en un medio de inyección de la misma composición que el medio *BGE* de separación.

En estas condiciones se llevó a cabo un estudio de la presión del gas de nebulización para evaluar su posible influencia en la detección de especies aniónicas.

#### Estudio de la presión del gas de nebulización.

En un acoplamiento *CE-ESI-MS* la presión del gas de nebulización es un parámetro importante por su efecto en la formación y estabilidad del spray que entra en el espectrómetro de masas, como por su efecto en la separación y resolución que tiene lugar en el capilar electroforético.

Inicialmente se estudiaron distintos valores de presión del gas de nebulización, 4, 6, 8 y 10 psi. La decisión acerca de cuál de estos valores era el más adecuado se tomó teniendo en cuenta su efecto tanto en el tiempo de migración como en el área de pico de cada analito. Se consideró como óptima aquella presión del gas de nebulización que permitía obtener tiempos de análisis más cortos y una mejor respuesta para la mayoría de los analitos de interés.

Los tiempos de migración obtenidos con una presión de nebulización de 4 psi se encuentran comprendidos en un intervalo de 14 a 16 minutos, mientras que para presiones de 8 y 10 psi los tiempos de migración disminuyen ligeramente, estando comprendidos entre 12 y 14 minutos, Tabla 5.3. Por tanto, en función del tiempo de migración, los mejores resultados se obtenían con estos valores de presión de nebulización, 8 o 10 psi. Con respecto a las señales obtenidas en cada caso, se observó que las áreas de pico obtenidas para una presión de 4 psi resultaron inferiores en comparación con los otros valores de presión. Los mejores resultados se obtenían con la presión de 8 psi, a excepción del analito 2dG, para el cual se obtenía un valor de área más alto cuando se trabajaba a 10 psi. Finalmente, se eligió una presión de nebulización de 8 psi como la presión óptima a utilizar para capilares de 75  $\mu\text{m}$  de diámetro interno.

Tabla 5.3. Influencia de la presión del gas de nebulización en el tiempo de análisis y en la señal analítica.

	Presión del gas de nebulización (psi)			
	4	6	8	10
Tiempo análisis (min)	14–16	13–15	13–14	12–13
Señal analítica ( $\times 10^3$ ua)	10–16	12–21	14–23	13–25

#### Estudio de la aplicación de una presión programada del gas de nebulización.

Una vez optimizada la presión del gas de nebulización se estudió también la posibilidad de aplicar la presión de nebulización de una forma programada (*programed nebulizing-gas pressure, PNP*) durante el análisis, en lugar de mantener constante una presión de 8 psi. Esta modalidad ha sido desarrollada recientemente en el grupo de

investigación y consiste en aplicar diferentes presiones de nebulización durante la separación electroforética y durante la entrada de los analitos en la fuente de electrospray para su detección en el espectrómetro de masas. El programa empieza con valores de presión del gas de nebulización bajos (próximos a cero), durante el tiempo en que se produce la separación electroforética de los analitos en el capilar de separación, evitando así que se produzca la succión de la muestra por la fuente de *ESI*. Al pasar un tiempo determinado, antes de la entrada de los analitos en la fuente de *ESI*, la presión del gas de nebulización se eleva a un valor adecuado que favorezca la nebulización de la muestra y la ionización de los analitos.

En este caso se trabajó con escalones de presión de nebulización que fueron 1–4, 1–8 y 1–10 psi. El análisis se inicia con una presión de nebulización de 1 psi y después de 7 minutos, antes de la llegada de los analitos a la interfaz *ESI*, se eleva la presión a un valor de 4, 8 y 10 psi respectivamente. En la Figura 5.1 se muestra el esquema básico de la modalidad *PNP* ensayada.

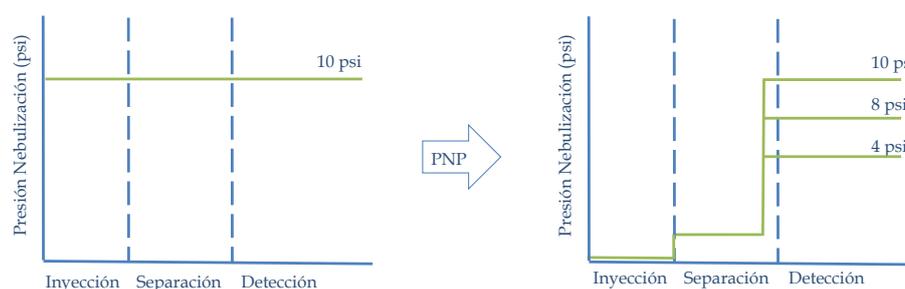


Figura 5.1. Representación de la aplicación de una presión de nebulización constante (izquierda) y de los programas de presión de nebulización programada ensayados: 1–4, 1–8 y 1–10 psi (derecha).

En todos los casos, los resultados obtenidos, mostraron un ligero incremento de los tiempos de migración cuando se aplica la presión de nebulización programada (*PNP*). También se observa, como ocurre en el estudio anterior, que a valores de presión de nebulización bajos, 1–4 psi, los tiempos de migración son mayores que los obtenidos para valores más elevados de presión de nebulización. Sin embargo,

en este caso, con el escalón de 1–4 psi se obtuvieron mejores valores de área de pico electroforético que para el resto de escalones de presión de nebulización estudiados.

La comparación entre ambas formas de aplicar la presión del gas de nebulización de forma constante, 8 psi, o mediante el programa de presión programada, 1–4 psi, permite decidir entre ambas modalidades a la hora de escoger las mejores condiciones de detección. Los resultados más favorables se obtuvieron en el primer caso, esto es, cuando la presión del gas de nebulización se aplica de forma constante durante todo el análisis. Por tanto, en este caso y con capilares de 75 micras de diámetro interno, la aplicación de la presión del gas de nebulización de una forma programada no suponía ninguna mejora en la detección de los nucleósidos estudiados.

#### Estudio del tiempo y medio de inyección de la muestra.

Inicialmente se estudió el tiempo de inyección para una muestra patrón disuelta en medio *BGE* y posteriormente se realizó un estudio de la influencia del medio de inyección en que se introduce la muestra en el capilar electroforético.

Se estudió el tiempo de inyección para una muestra patrón de los cinco analitos de interés, en concentración  $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , disueltos en un medio de igual composición que el utilizado en el medio de separación (*BGE*), es decir, en tampón formiato amónico–amoniaco, 30 mM, pH 11.0. Los tiempos de inyección estudiados fueron de 8, 10 y 15 segundos mediante inyección hidrodinámica a 50 mbar.

Los resultados obtenidos mostraron un incremento de las áreas al aumentar el tiempo de inyección, algo por otro lado esperado, ya que a mayor tiempo de inyección mayor cantidad de muestra inyectada y mayor señal analítica. Debido a estos buenos resultados con tiempos de inyección elevados se decidió seguir con este estudio aumentando los tiempos de inyección.

Para el tiempo de 15 segundos se comparó la señal obtenida para tres medios de inyección distintos: (a) medio 100% acuoso (agua *UHQ*), (b) medio 30 mM formiato amónico–amoniaco, pH 11.0 (*BGE*) y (c) una dilución 1:10 (v/v) *BGE*:agua *UHQ*, es decir, un medio de la misma composición y pH que el *BGE* inicial, formiato amónico–amoniaco de pH 11.0, pero en concentración 3 mM.

Los resultados expresados como relación señal/ruido se muestran en la Tabla 5.4. En este caso se puede observar que los valores de relación señal/ruido obtenidos en medio 1:10 (v/v) *BGE*:agua *UHQ* están próximos a los que se obtienen en medio 100% acuoso, agua *UHQ*, y son superiores a los que se obtienen cuando el medio de inyección de la muestra es igual al medio de separación, *BGE*. Se elige este medio 1:10 (v/v) *BGE*:agua *UHQ* para estudios posteriores.

Tabla 5.4. Influencia del medio de inyección en la relación señal analítica/ruido para los tres casos estudiados: (a) 100% agua *UHQ*, (b) medio *BGE* (30 mM formiato amónico–amoniaco), y (c) medio 1:10 (v/v) *BGE*: agua *UHQ*.

Analito	Señal analítica/Ruido		
	Agua <i>UHQ</i>	<i>BGE</i>	1:10 (v/v) <i>BGE</i> :agua <i>UHQ</i>
5mU	41	21	45
2dG	191	93	189
INN	130	76	120
8OHG	161	86	112
8OH2dG	110	69	88

Se estudió la posibilidad de aumentar los tiempos de inyección por encima de 15 segundos puesto que con los valores estudiados no se observaba una clara tendencia a la saturación.

En este caso se ensayaron tiempos de inyección de 8, 15, 20, 30, 50 y 70 segundos. Al evaluar los resultados obtenidos se observó que todos los analitos estudiados presentaban una respuesta lineal y en ningún momento se observó una saturación en la señal obtenida en el detector de espectrometría de masas. Estos resultados se muestran en la Figura 5.2 donde queda patente la respuesta lineal.

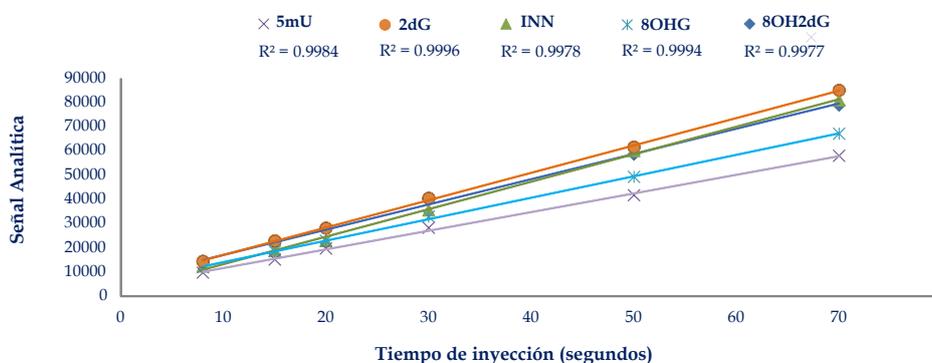


Figura 5.2. Influencia del tiempo de inyección en la respuesta analítica (área de pico). Se incluyen también los valores de R<sup>2</sup> de las rectas obtenidas.

El aumento del tiempo de inyección a valores superiores, 100 y 150 segundos, no resultaron satisfactorios. Para algunos de los analitos en estudio, como 5mU y 8OHG, los valores de la señal analítica obtenidos para estos tiempos de inyección de 100 y 150 segundos son inferiores a lo esperado, lo que se puede interpretar como una tendencia a la saturación. Por ello, el tiempo de inyección óptimo se consideró 70 segundos.

#### Calibrado con el capilar de diámetro interno de 75 $\mu\text{m}$ .

Para completar este estudio se llevó a cabo un calibrado en las condiciones experimentales optimizadas para este diámetro interno en particular. El medio de separación BGE empleado fue formiato amónico–amoniaco 30 mM a pH 11.0, la detección se realizó en modo ESI(-)MS con una presión del gas de nebulización de 8 psi. Se utilizaron muestras patrón de los cinco analitos en concentraciones de 0.05 a 5.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en medio acuoso UHQ. La introducción de la muestra se llevó a cabo mediante inyección hidrodinámica aplicando una presión de 50 mbar durante 70 segundos. La detección se llevó a cabo en modo SIM, siguiendo el ion [M-H]<sup>-</sup> de

cada uno de los analitos de interés. En la Tabla 5.5 se muestran los parámetros del análisis de regresión, señal analítica frente a la concentración en  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Para el estudio de la reproducibilidad del método se prepararon ocho muestras patrón en medio acuoso *UHQ* de los nucleósidos a un nivel de concentración de  $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ , inyectados por triplicado. Los valores de desviación estándar relativa (*RSD%*) obtenidos para este nivel de concentración están comprendidos entre 9.6 y 11.3%.

En la Tabla 5.5 también se muestran los valores de límite de detección, *LOD*, determinados a partir de las curvas de calibración según el criterio propuesto por la Conferencia Internacional de Coordinación o Armonización (*International Conference on Harmonisation, ICH*)<sup>168</sup>, el cual propone tres métodos para la determinación de los límites de detección (*LOD*):

- Basado en una evaluación visual.
- Basado en la relación señal/ruido.
- Basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente.

Esta conferencia internacional determina que los límites de detección pueden ser calculados mediante la fórmula:

$$LOD = \frac{3.3 \times \sigma}{S}$$

siendo  $\sigma$  la desviación estándar de la respuesta y **S** la pendiente de la recta de calibrado. En nuestro caso  $\sigma$  se ha evaluado mediante la desviación estándar residual de la línea de regresión obtenida a niveles próximos al límite de cuantificación.

Los límites de detección obtenidos están comprendidos entre  $0.02 \mu\text{g mL}^{-1}$  para el compuesto 2dG y  $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$  para el analito 5mU.

---

<sup>168</sup> *International Conference on Harmonisation, "Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2 (R1)"*, Nov. 2005.

Tabla 5.5. Características del calibrado realizado en un capilar de 75  $\mu\text{m}$  para patrones acuosos. Intervalo de concentraciones de 0.05 a 5.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Analito	Pendiente ( $\times 10^4 \text{ mL } \mu\text{g}^{-1}$ )	Ordenada en el origen ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	LOD <sup>a</sup> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	RSD <sup>b</sup> (%)
5mU	0.81 $\pm$ 0.02	0.31 $\pm$ 5.29	0.997	0.05	–
2dG	1.17 $\pm$ 0.04	-2.46 $\pm$ 7.81	0.996	0.02	10
INN	1.07 $\pm$ 0.04	-2.77 $\pm$ 7.90	0.995	0.03	11
8OHG	0.89 $\pm$ 0.02	-0.51 $\pm$ 5.11	0.997	0.04	11
8OH2dG	1.07 $\pm$ 0.03	-1.64 $\pm$ 5.64	0.997	0.03	10

a. LOD: Límite de detección según la ICH.

b. RSD: Desviación estándar relativa (n=8) para un nivel de concentración de 0.05  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 5.2.2. CAPILAR CON DIÁMETRO INTERNO DE 100 $\mu\text{m}$ .

Se realizó un estudio similar para capilares con diámetro interno de 100  $\mu\text{m}$ . Para las pruebas iniciales se utilizaron los parámetros de inyección optimizados para el capilar de 75  $\mu\text{m}$  (inyección hidrodinámica a 50 mbar, 70 segundos; presión del gas de nebulización de 8 psi). Sin embargo, hay que señalar que debido al aumento del diámetro interno del capilar de separación, fue necesario disminuir la concentración del medio de separación de 30 mM a 3 mM, manteniendo el valor de pH 11.0. La utilización de este BGE diluido en proporción 1:10 (v/v) está condicionado por el límite en la intensidad de corriente a un valor máximo de 50  $\mu\text{A}$ , impuesto por el acoplamiento con el detector de espectrometría de masas.

Los resultados obtenidos para este medio de separación mostraron una nula separación entre los analitos cuando se aplicaba un potencial de 25 kV, ya que migraban todos al mismo tiempo. Por ello se decidió optimizar algunos de los parámetros que afectan tanto a la separación como a la detección, como son el potencial aplicado, el tiempo de inyección y la concentración del BGE de separación. Por último se estudió la posibilidad de aplicar un programa de presión de

nebulización con el propósito de conseguir una mejor separación entre los analitos estudiados.

**Estudio del potencial de separación aplicado.**

La influencia del potencial de separación aplicado se estudió para valores de potencial de 10, 15 y 20 kV. En la Figura 5.3 se muestran los valores de señal analítica y área de pico electroforético obtenidos en cada uno de los casos. Los valores de la señal analítica no difieren significativamente, para los tres valores ensayados, pero para un potencial de 15 kV se obtiene una buena separación de los analitos sin alargar demasiado el tiempo de análisis. Por lo que será este valor de 15 kV el potencial aplicado en estudios posteriores.

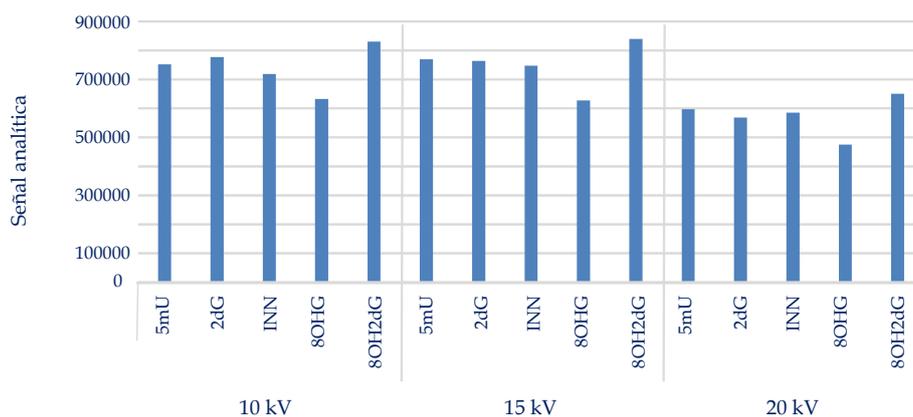


Figura 5.3. Señal analítica, área de pico, frente al voltaje de separación aplicado, 10, 15 y 20 kV, en un capilar de 100 µm de diámetro interno.

**Estudio del tiempo de inyección de la muestra.**

Los tiempos de inyección estudiados fueron 10, 20, 30, 50 y 70 segundos con una muestra patrón en medio acuoso. En la Figura 5.4 se representan los valores de la respuesta analítica, área de pico, frente a los tiempos de inyección estudiados. Se puede observar un comportamiento lineal para todos los analitos. Por ello, desde el punto de vista de la sensibilidad, se podría trabajar con tiempos de inyección largos que proporcionan una mayor señal analítica. Sin embargo, centrándose en la separación electroforética, los tiempos de inyección largos proporcionan una separación deficiente. Así, para un tiempo de inyección de 70 segundos, los analitos presentan tiempos de migración comprendidos entre 7.53 y 7.57 minutos, mientras que para tiempos de inyección de 10 segundos, los tiempos de migración estaban comprendidos entre 9.65 y 10.32 minutos.

Se puede observar como al aumentar el tiempo de inyección disminuye la separación electroforética, por lo que, se decidió trabajar con tiempos de inyección cortos, de 10 segundos, que proporcionan una mejor separación electroforética a costa de sacrificar un poco la señal analítica obtenida.

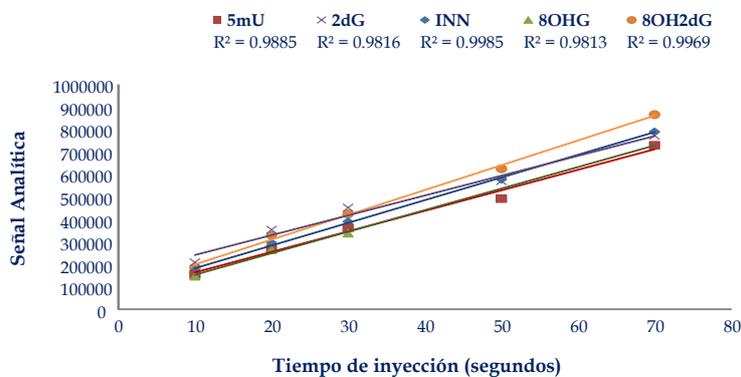


Figura 5.4. Influencia del tiempo de inyección en la señal analítica, área de pico. Se incluyen también los valores de R<sup>2</sup> de las rectas obtenidas.

**Optimización de la concentración de electrolito en el medio de separación (BGE).**

Se llevó a cabo el estudio de la influencia de la concentración de electrolito presente en el medio de separación, *BGE*, para tres niveles, 3, 6 y 15 mM, de una disolución formiato amónico ajustada con amoníaco a pH 11.0.

En la Figura 5.5 se representa la respuesta analítica, área de pico y tiempo de migración, frente a las distintas concentraciones estudiadas. Como se puede observar, con el medio más diluido, *BGE* 3 mM, se obtuvieron los valores de área más elevados y los tiempos de migración más bajos, sin embargo, cuando se emplea un *BGE* de concentración 6 mM se obtienen mayores tiempos de migración pero con una mejor resolución entre los analitos. Se seleccionó 6 mM como concentración de compromiso del medio de separación (*BGE*), debido a que es la que ofrece una mejor separación electroforética.

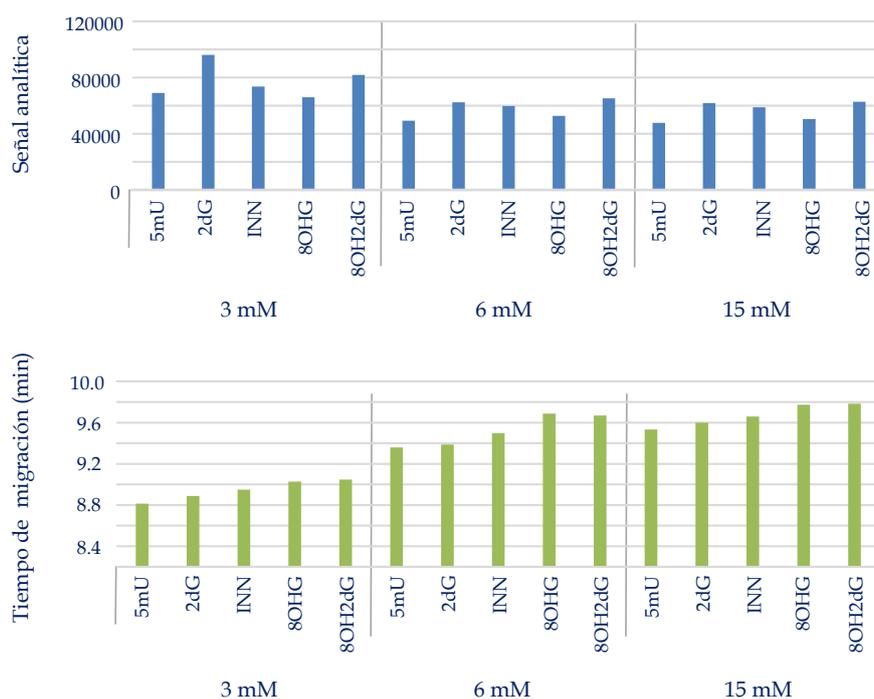


Figura 5.5. Influencia de la concentración del medio de separación, *BGE*, en la señal analítica (parte superior) y en los tiempos de migración (parte inferior) para los nucleósidos de interés.

**Aplicación de una presión programada del gas de nebulización (PNP).**

En este estudio con capilares de diámetro interno de 100  $\mu\text{m}$  surge continuamente el problema de la separación de los picos electroforéticos, que es, mucho más crítica que con capilares más estrechos (75  $\mu\text{m}$ ), como los utilizados anteriormente. Con objeto de mejorar la separación y resolución electroforética se ensayó la aplicación de una presión de nebulización programada (PNP) puesto que se ha comprobado que afecta positivamente a la separación de picos de especies que migran con posterioridad al flujo electroosmótico, como es el caso de las especies aniónicas.

Los programas de presión de nebulización estudiados fueron 1-4, 1-6 y 1-8 psi. En la Figura 5.6 se muestran los resultados obtenidos, los valores de señal analítica y tiempo de migración. En ella se puede observar que, para un programa de 1-4 psi, se obtienen señales analíticas un poco más altas, que para el resto de los programas estudiados aunque no es un aumento muy significativo.

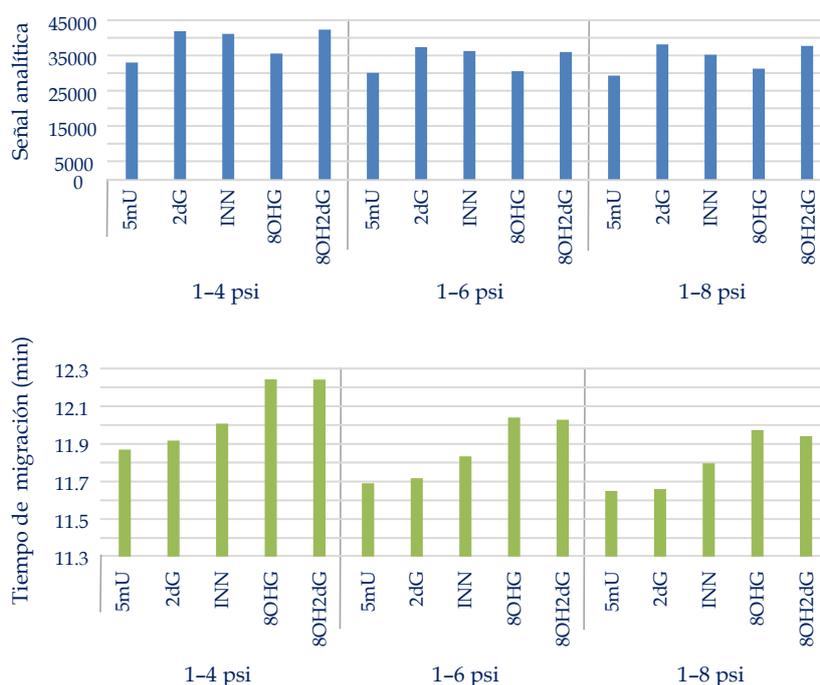


Figura 5.6. Influencia de la aplicación de una presión de nebulización programada (PNP) en la señal analítica (parte superior) y en los tiempos de migración (parte inferior) para los nucleósidos de interés.

En cuanto al efecto sobre los tiempos de migración se considera que los resultados más favorables corresponden al *PNP* de 1–4 psi. Se obtenían tiempos de migración más altos, asociando esta respuesta a una migración de los analitos en un intervalo de tiempo más amplio, y por tanto, a una mejor separación electroforética, Figura 5.7.

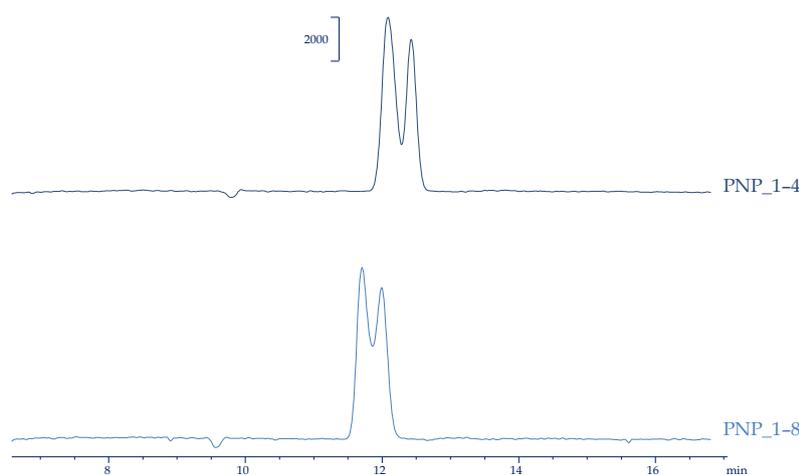


Figura 5.7. Electroferogramas de ion total para una muestra acuosa de concentración  $5.00 \mu\text{g mL}^{-1}$  de los analitos de interés aplicando diferentes programas de presión del gas de nebulización (*PNP*).

Por tanto, el programa de presión de nebulización 1–4 psi se presenta como el más adecuado en un capilar de  $100 \mu\text{m}$  de diámetro interno.

Para este capilar de  $100 \mu\text{m}$  también se realizó un estudio comparativo del efecto de la presión del gas de nebulización aplicado de forma constante o mediante este programa de presiones (*PNP*). En este caso se compararon los resultados obtenidos para una presión de 8 psi y los que se obtuvieron con el programa *PNP* de 1–4 psi. Si se tenía en cuenta la respuesta analítica, área de pico, los mejores resultados se obtuvieron cuando se aplicaba una presión del gas de nebulización constante de 8 psi. Pero teniendo en cuenta la resolución electroforética se podía observar una gran diferencia entre ambas modalidades, siendo en este caso, el

programa de presiones de nebulización de 1–4 psi el que proporcionaba resultados más favorables, con una mejora en la separación de los analitos de interés, que sin embargo no llegaba a ser totalmente satisfactoria, como se observa en la Figura 5.7.

#### Calibrado con el capilar de diámetro interno de 100 $\mu\text{m}$ .

Una vez que se ha llevado a cabo la optimización de los parámetros que afectan a la separación y a la detección, el último paso fue realizar un calibrado para obtener las características del método, utilizando los parámetros optimizados a lo largo de este apartado.

Como se ha indicado el voltaje óptimo aplicado es de 15 kV, con inyección hidrodinámica a 50 mbar durante 10 segundos. Como medio electroforético de separación, *BGE*, se utilizó formiato amónico–amoníaco en concentración de 6 mM con un pH de 11.0. Con respecto a los parámetros que afectan a la detección, se empleó un programa de presiones de nebulización, *PNP*, con un escalón de 1–4 psi en modo *SIM* y se siguió el ion  $[\text{M-H}]^-$  de los analitos de interés. Se inyectaron muestras patrón de los cinco nucleósidos de interés en medio acuoso *UHQ* con concentraciones comprendidas entre 0.05–5.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

En la Tabla 5.6 se encuentran recogidos los parámetros del análisis de regresión, señal analítica (área de pico) frente a concentración ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

La precisión se determinó a partir de los valores de desviación estándar relativa (*RSD*) obtenidos para seis muestras, a un nivel de concentración de 0.05  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , inyectadas por triplicado. Se observa que los valores para el coeficiente de variación están comprendidos entre 2.1 y 5.0%. Los valores de los límites de detección, *LOD*, según la *ICH*, están comprendidos entre 0.01 y 0.03  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para los compuestos 8OH2dG y 5mU, respectivamente.

Tabla 5.6. Características del calibrado realizado en un capilar de 100  $\mu\text{m}$  para mezclas patrón en medio acuoso, *UHQ*. Intervalo de concentración 0.05–5.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Analito	Pendiente ( $\times 10^4 \text{ mL } \mu\text{g}^{-1}$ )	Ordenada en el origen ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	LOD <sup>a</sup> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	RSD <sup>b</sup> (%)
5mU	0.88 $\pm$ 0.09	-1.67 $\pm$ 5.66	0.980	0.03	5.0
2dG	1.20 $\pm$ 0.09	-3.65 $\pm$ 4.74	0.986	0.02	2.5
INN	0.96 $\pm$ 0.04	-0.20 $\pm$ 2.03	0.996	0.02	3.7
8OHG	0.89 $\pm$ 0.03	-1.02 $\pm$ 1.41	0.998	0.02	2.1
8OH2dG	1.06 $\pm$ 0.03	-0.20 $\pm$ 1.44	0.998	0.01	2.2

a. LOD: Límite de detección según la ICH.

b. RSD: Desviación estándar relativa (n=6) para un nivel de concentración de 0.05  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 5.2.3. CAPILAR CON DIÁMETRO INTERNO DE 50 $\mu\text{m}$ .

Una vez estudiado el comportamiento electroforético en capilares de 75 y de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, se decidió hacer un estudio similar con capilares de menor diámetro, 50  $\mu\text{m}$ .

Como se realizó en ocasiones anteriores, el estudio comenzó a partir de las condiciones optimizadas previamente, en este caso para el capilar de 100  $\mu\text{m}$ , haciendo alguna leve variación debido a la diferencia en el tamaño del diámetro interno. Por tanto, se parte de un voltaje aplicado de 15 kV, tiempo de inyección de 30 segundos y una mezcla formiato amónico–amoníaco 30 mM, pH 11.0, como medio de separación, *BGE*. Para la detección se aplicó un programa de presiones de nebulización, *PNP*, 1–4 psi. Estos estudios se llevaron a cabo con una muestra patrón de los analitos de interés, 5mU, 2dG, INN, 8OHG y 8OH2dG, en medio 100% acuoso *UHQ*, en una concentración de 5.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Los primeros registros obtenidos mostraron una mejora muy significativa en la resolución y la morfología de los picos, obteniéndose picos mucho más estrechos y mejor separados que los obtenidos anteriormente con capilares de 75 y de 100  $\mu\text{m}$ .

**Optimización de la concentración de electrolito en el medio de separación (BGE).**

Se ensayaron distintas concentraciones de formiato amónico–amoniaco con pH 11.0, 30 mM y 50 mM. En la Figura 5.8 se muestra la representación mediante diagrama de barras de los resultados obtenidos en el estudio de la concentración del BGE de separación para los nucleósidos estudiados. Se representa el efecto sobre (a) la señal analítica, área de pico electroforético, (b) anchura de pico y (c) tiempo de migración para las dos concentraciones estudiadas, 30 y 50 mM.

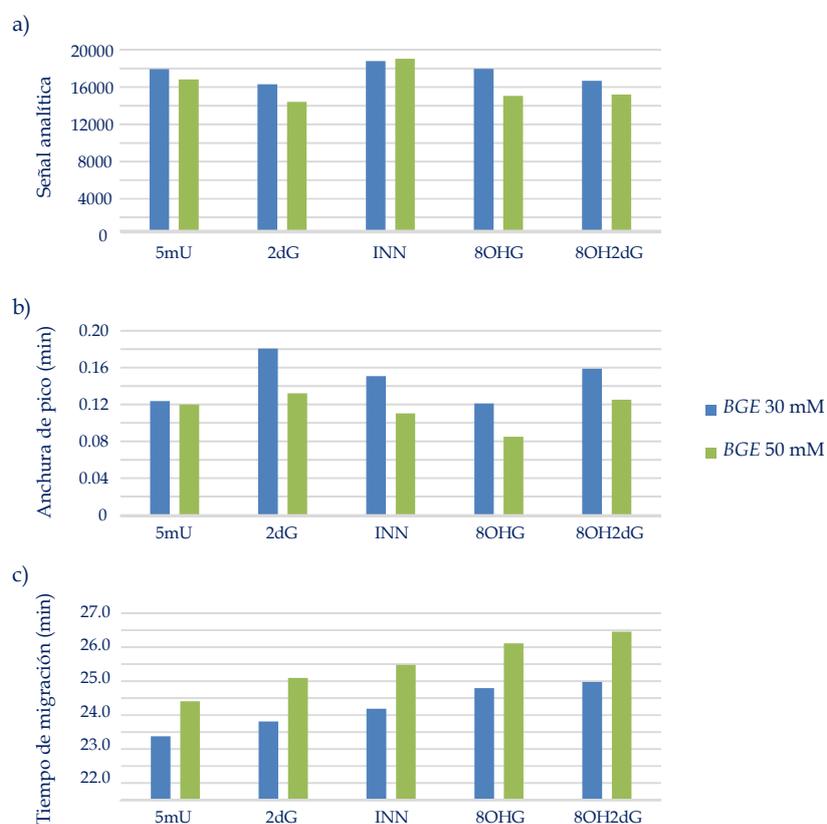


Figura 5.8. Influencia de la concentración del medio de separación (BGE) en (a) la señal analítica, área de pico electroforético, (b) anchura de pico y (c) tiempo de migración para las dos concentraciones estudiadas, 30 y 50 mM.

Los resultados muestran que las señales analíticas, área de pico electroforético, presentan valores más elevados para una concentración de *BGE* de 30 mM (Figura 5.8.a) mientras que, los valores de anchura de pico electroforético no presentan variaciones significativas (Figura 5.8.b). Con respecto a los tiempos de migración (Figura 5.8.c) sí se observan diferencias importantes con las concentraciones estudiadas. Se obtienen valores de tiempo de migración mucho más bajos cuando se emplea, como *BGE* de separación, el medio de concentración de 30 mM que cuando se emplea el de 50 mM. Por ello, se decidió trabajar con una concentración de 30 mM como concentración óptima del *BGE* de separación.

#### Optimización del tiempo y medio de inyección de la muestra.

El tiempo y el medio de inyección se estudiaron de forma conjunta. Se estudió el efecto de inyectar la muestra disuelta en medio 100% acuoso, agua *UHQ*, o bien cuando se disuelve en el mismo medio de separación, pero diluido en proporción 1:10 (v/v) con agua *UHQ*, medio 1:10 (v/v) *BGE*:agua *UHQ*.

En la Figura 5.9 se muestra la representación mediante diagrama de barras de los resultados obtenidos para los cinco nucleósidos de interés. Se representa la señal analítica y la anchura de pico para los tiempos de inyección estudiados, 10, 30 y 50 segundos en cada uno de los medios de inyección ensayados, agua *UHQ* o medio 1:10 (v/v) *BGE*:agua *UHQ*. Como cabría esperar, a mayor tiempo de inyección mayor señal analítica, área de pico, Figura 5.9.a, y un aumento, aunque ligero, en los valores de anchura de pico medidos a mitad de altura, Figura 5.9.b. Por ello, una solución de compromiso es la que supone utilizar un tiempo de inyección de 30 segundos. Con respecto al medio de inyección, se escogió como medio óptimo de inyección la dilución 1:10 (v/v) *BGE*:agua *UHQ*, es decir formiato amónico–amoniaco 3 mM.

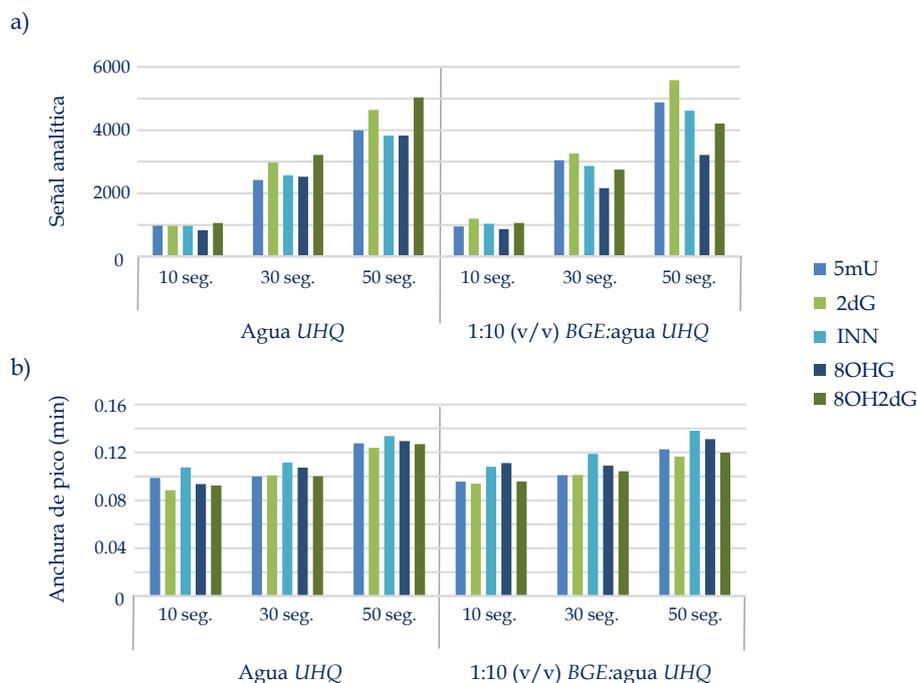


Figura 5.9. Estudio del tiempo y del medio de inyección para los nucleósidos de interés. Se representan (a) la señal analítica y (b) la anchura de pico en función del tiempo de inyección para cada uno de los medios en que va disuelta la muestra, agua UHQ o 1:10 (v/v) BGE:agua UHQ.

### Optimización de la presión del gas de nebulización.

Los valores de la presión de nebulización estudiados fueron 4, 6, 8 y 10 psi, manteniendo todas las condiciones optimizadas previamente.

La representación de los resultados obtenidos se muestra en la Figura 5.10 para la señal analítica, área de pico, y la anchura de pico para cada uno de los analitos de interés, 5mU, 2dG, INN, 8OHG y 8OH2dG.

Para todas las presiones se obtuvieron resultados similares de respuesta analítica y solo en el caso de una presión de nebulización de 10 psi los valores

obtenidos disminuían significativamente con respecto a los obtenidos para las otras presiones de nebulización, Figura 5.10.a. Teniendo en cuenta los valores de anchura de pico electroforético, los picos más estrechos se obtuvieron para los valores más altos de presión de nebulización, siendo muy similares los picos obtenidos a presiones del gas de nebulización de 6 y 8 psi. Por ello, al no observarse diferencias muy significativas entre los resultados obtenidos para ambas presiones, se tomó el valor de 6 psi como valor adecuado de presión del gas de nebulización para estudios posteriores.

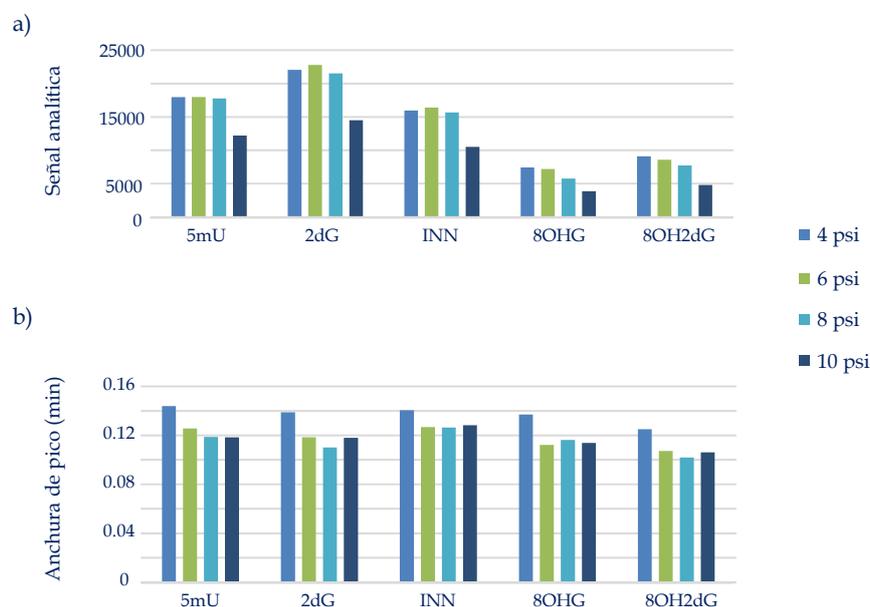


Figura 5.10. Influencia de la presión del gas de nebulización en (a) la señal analítica, área de pico y (b) la anchura de pico para cada uno de los analitos de interés.

A diferencia de los estudios anteriores, en los cuales se barajó la posibilidad de, además de optimizar la presión del gas de nebulización, comparar esos resultados con los obtenidos al aplicar un programa de presiones de nebulización, esto no se

llevó a cabo con capilares de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro interno. Ello se basa en los resultados obtenidos con capilares de 75  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, para los que se comprobó que la aplicación de la presión de nebulización de forma programada (modalidad *PNP*) no presentaba ninguna ventaja significativa en capilares suficientemente estrechos.

### Optimización del voltaje aplicado durante la separación electroforética.

Por último, en la optimización de los parámetros que afectan a la separación electroforética en un capilar de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, se llevó a cabo el estudio del voltaje aplicado entre los extremos del capilar.

Los voltajes estudiados fueron 15, 20, 25 y 30 kV. El estudio se realizó con un patrón de los nucleósidos de interés, 5mU, 2dG, INN, 8OHG y 8OH2dG, en una concentración de 5.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  disueltos en medio 1:10 (v/v) *BGE:agua UHQ*.

Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 5.11 donde se representa, para cada uno de los analitos en estudio, la influencia del voltaje aplicado en la señal analítica (área de pico) y en la anchura de los picos electroforéticos.

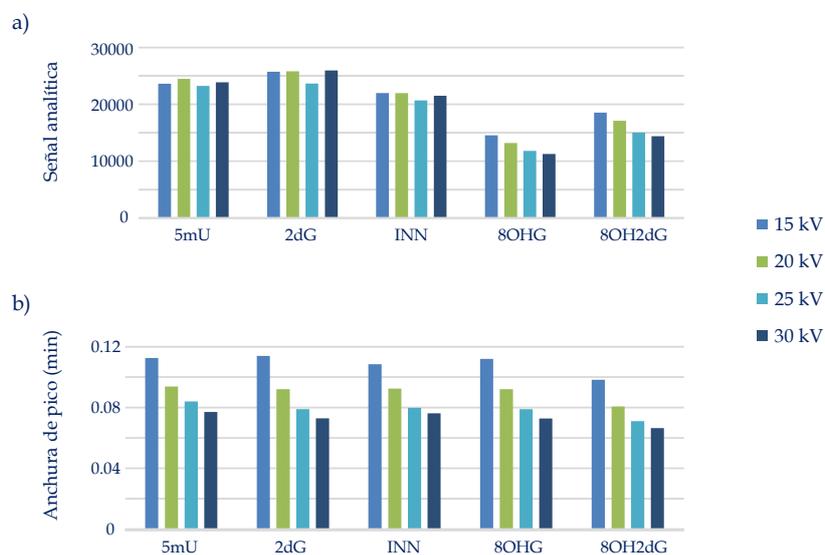


Figura 5.11. Influencia del voltaje aplicado durante la separación electroforética. Se representa (a) señal analítica y (b) anchura de pico, para cada uno de los analitos de interés, para los distintos valores de voltaje de separación estudiados.

Se puede observar cómo, para cada uno de los analitos en estudio, las señales analíticas son similares para los cuatro voltajes estudiados (Figura 5.11.a). En cambio, si se tiene en cuenta la anchura del pico electroforético (Figura 5.11.b) sí se observan diferencias significativas dependiendo del voltaje aplicado, en este caso los picos más estrechos se obtienen cuando el voltaje de separación aplicado tiene un valor de 30 kV, por lo que se toma este valor como valor óptimo en la separación electroforética de los analitos en estudio.

Para este voltaje de separación, 30 kV, los tiempos de migración se adelantan notablemente, por lo que el tiempo total de análisis se acorta, pasando de 16 minutos con 15 kV a un tiempo de 9 minutos con el voltaje de 30 kV.

#### Calibrado con el capilar de diámetro interno de 50 $\mu\text{m}$ .

Una vez que se ha llevado a cabo la optimización de los parámetros que afectan a la separación y a la detección, el último paso es llevar a cabo un calibrado para obtener las características del método, utilizando los parámetros optimizados a lo largo de este apartado.

Como se ha indicado el voltaje óptimo fue de 30 kV, la inyección fue de tipo hidrodinámica mediante una presión de 50 mbar durante 30 segundos, el tampón de separación (*BGE*) optimizado consistió en formiato amónico–amoniaco en una concentración de 30 mM y pH 11.0. Con respecto a los parámetros que afectan a la detección, se aplicó una presión constante del gas de nebulización de 6 psi. La toma de datos se realizó en modo *SIM* y se siguió el ion  $[\text{M}-\text{H}]^-$  de cada uno de los analitos de interés. Las muestras analizadas eran patrones de los cinco nucleósidos. El medio de inyección fue en todos los casos 1:10 (v/v) *BGE*:agua *UHQ* con concentraciones comprendidas entre 0.1–5.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

También se realizó un estudio de la reproducibilidad del método optimizado de separación y detección de los analitos de interés en un capilar de 50  $\mu\text{m}$ ; en este estudio se prepararon seis muestras patrón en concentración 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en el medio de inyección indicado anteriormente. El tiempo de inyección, la presión del gas de nebulización, el *BGE* y los demás parámetros son los mismos con los que se realizó el calibrado.

En la Tabla 5.7, se encuentran recogidos los parámetros del análisis de regresión, señal analítica frente a concentración expresada en  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Los valores

## V. DETERMINACIÓN DE NUCLEÓSIDOS MEDIANTE CE-ESI(-)MS

obtenidos de límite de detección, *LOD*, están comprendidos entre 0.01 y 0.04  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para los compuestos INN y 8OH2dG, respectivamente.

Los valores de precisión obtenidos, expresados como desviación estándar relativa (*RSD*%) están comprendidos entre 6 y 14%. Estos valores pueden considerarse aceptables teniendo en cuenta que se obtienen para el nivel de concentración inferior del calibrado, 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Tabla 5.7. Características del calibrado realizado en un capilar de 50  $\mu\text{m}$  para patrones de los analitos disueltos en 1:10 (v/v) BGE:agua UHQ. Intervalo de concentraciones de 0.1 a 5.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Analito	Pendiente ( $\times 10^3 \text{ mL } \mu\text{g}^{-1}$ )	Ordenada en el origen ( $\times 10^2$ )	$R^2$	<i>LOD</i> <sup>a</sup> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	<i>RSD</i> <sup>b</sup> (%)
5mU	$4.57 \pm 0.26$	$0.52 \pm 5.95$	0.990	0.03	10
2dG	$5.21 \pm 0.16$	$-0.03 \pm 3.79$	0.997	0.02	11
INN	$4.05 \pm 0.10$	$-1.47 \pm 2.39$	0.998	0.01	12
8OHG	$3.11 \pm 0.08$	$1.42 \pm 1.97$	0.998	0.03	6
8OH2dG	$3.91 \pm 0.12$	$1.61 \pm 2.79$	0.997	0.04	14

<sup>a</sup>. *LOD*: Límite de detección según la ICH.

<sup>b</sup>. *RSD*: Desviación estándar relativa (n=6) para un nivel de concentración de 0.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

5.2.4. RESUMEN DE LOS ESTUDIOS REALIZADOS EN CAPILARES DE DISTINTO DIÁMETRO INTERNO.

Para finalizar este apartado del estudio de capilares de tres diámetros internos diferentes, 50, 75 y 100  $\mu\text{m}$ , se muestra en la Figura 5.12 un resumen de las condiciones optimizadas para cada uno de ellos.

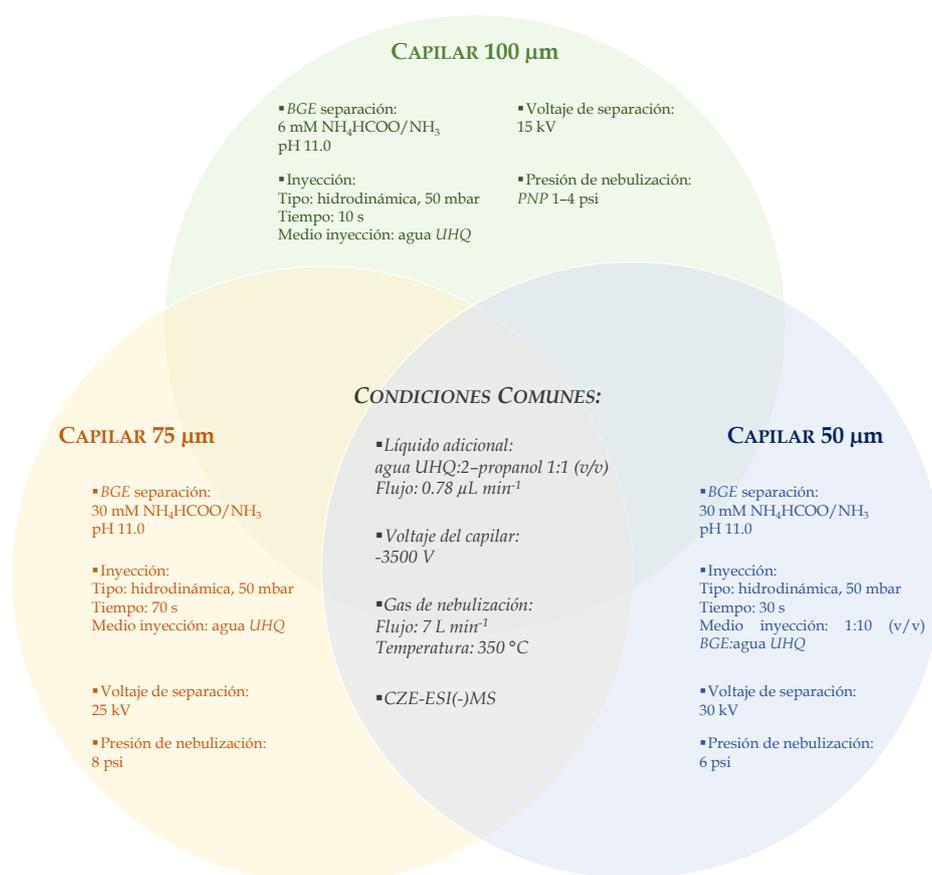


Figura 5.12. Resumen de las condiciones optimizadas para los tres diámetros internos de capilar, 50, 75 y 100  $\mu\text{m}$ , para la determinación de nucleósidos en medio alcalino mediante *CE-ESI(-)MS*.

A la vista de los resultados obtenidos para estos tres diámetros internos se decidió escoger como óptimo el capilar de 50  $\mu\text{m}$ , puesto que con él se obtiene una mejor resolución electroforética, algo que también conlleva mejoras en la detección posterior.

En la Figura 5.13 se muestra la diferente resolución que se obtiene para cada uno de los capilares si se trabaja en las mismas condiciones (izquierda), así como el electroferograma de ion total (TIE) e ion extraído obtenidos con el capilar de 50  $\mu\text{m}$  (derecha).

Los estudios posteriores se realizarán por tanto, con el capilar de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, en las condiciones optimizadas en el apartado anterior para este tamaño de diámetro interno.

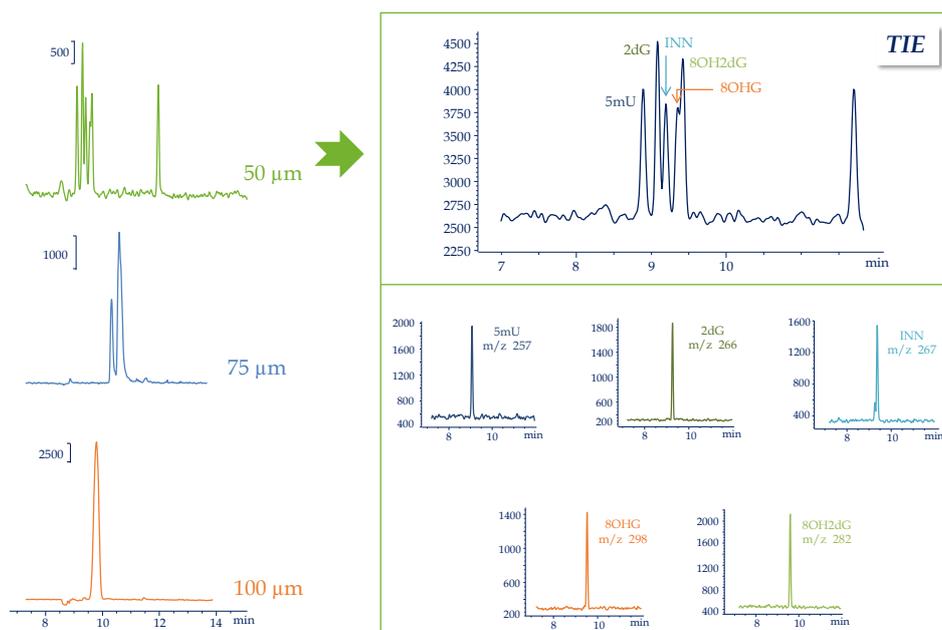


Figura 5.13. Electroferogramas de ion total obtenidos con los capilares ensayados (izquierda). En la parte derecha se detallan los resultados obtenidos con el capilar de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, en las condiciones optimizadas.

### 5.3. APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE ORINA.

Las condiciones optimizadas para el sistema *CE-ESI(-)MS* corresponden al análisis de patrones acuosos de los nucleósidos de interés. El siguiente objetivo fue su aplicación al análisis de muestras de orina procedentes de donantes sanos.

El primer tratamiento al que se vieron sometidas las muestras de orina, después de su recogida, fue un proceso de congelación a  $-32^{\circ}\text{C}$  en ausencia de luz favoreciendo la precipitación de las proteínas. Antes de llevar a cabo el análisis mediante *CE-ESI(-)MS* se deben descongelar las muestras de orina a temperatura ambiente. Una vez que las muestras han sido descongeladas se separa una alícuota y se lleva a cabo una etapa de filtrado, con filtros de *PVDF* de tamaño de poro de  $0.22\ \mu\text{m}$ , para eliminar posible materia en suspensión. La muestra así ya puede ser inyectada en el equipo *CE-ESI(-)MS*.

En estos estudios iniciales se empleó la orina de un mismo donante sano. Una alícuota de esta orina fue filtrada e inyectada directamente en el equipo *CE-ESI(-)MS* con las condiciones experimentales ya optimizadas para un capilar de  $50\ \mu\text{m}$ . En la Figura 5.14 se recoge el electroferograma obtenido al inyectar, de forma directa, la muestra de orina sometida únicamente a una etapa previa de filtración.

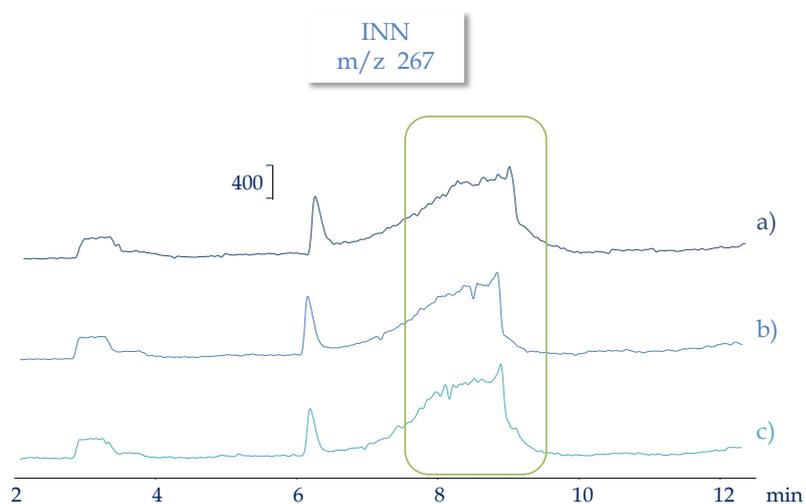


Figura 5.14. Electroferogramas de ion extraído, para el analito INN, obtenidos al inyectar de forma directa la muestra de orina de donante sano sometida (a) a una etapa previa de filtración y posteriormente dopada a dos niveles de concentración, (b)  $1.0$  y (c)  $5.0\ \mu\text{g mL}^{-1}$ .

En la Figura 5.14 se puede observar la ausencia de picos electroforéticos individuales, en su lugar, aparecen señales anchas en las que quedarían enmascaradas las señales electroforéticas de los analitos en estudio, por lo que se estudió la posibilidad de realizar diluciones de la muestra de orina por si esto producía una mejora en los perfiles de la respuesta analítica, lo que permitiría el análisis directo de muestras de orina.

Para ello, se tomaron diferentes alícuotas de orina filtrada que fueron dopadas a dos niveles de concentración, 1.0 y 5.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Cada una de estas alícuotas dopadas fue dividida, a su vez, en alícuotas que permitieron, por un lado realizar la inyección directa en *CE-ESI(-)MS* y por otro, llevar a cabo diluciones a dos proporciones, 1:1 y 1:5 (v/v), para su posterior inyección en *CE-ESI(-)MS*.

En la Figura 5.15 se muestra el comportamiento observado para dos analitos representativos, INN como ejemplo de analito cuya concentración endógena es más elevada, y 8OHG, uno de los compuestos que de forma endógena se encuentra a bajas concentraciones en la orina de un individuo sano.

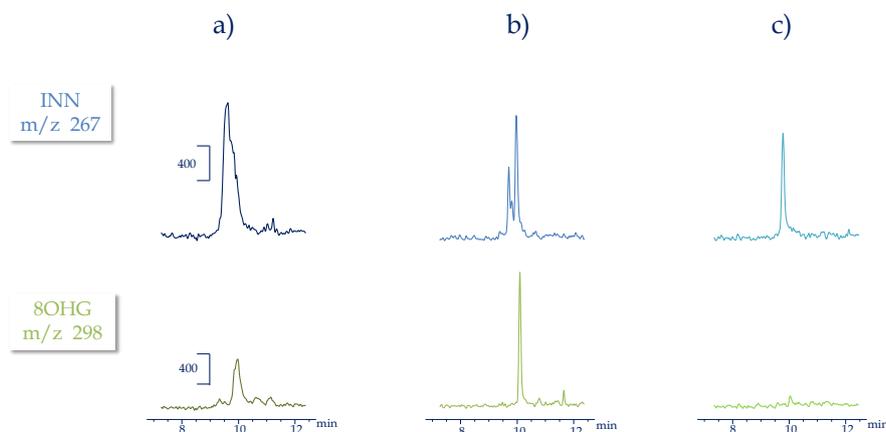


Figura 5.15. Efecto de la dilución de una muestra de orina 1:1 (v/v) sobre el comportamiento de dos de los analitos en estudio, INN y 8OHG. Electroferogramas de ion extraído: (a) inyección de una muestra de orina filtrada y dopada a una concentración de 2.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , (b) muestra filtrada y dopada, diluida con agua *UHQ* en proporción 1:1 (v/v), y (c) muestra de orina sin dopar, diluida con agua *UHQ* en proporción 1:1 (v/v). En este caso (c) solo se observa señal para los compuestos endógenos de concentración más elevada.

Se observó que al llevar a cabo el proceso de dilución se producía una disminución de la señal, comportamiento esperado, pero a su vez se producía una mejora en los perfiles de las señales analíticas obtenidas. Sin embargo, esta mejora era significativa únicamente para aquellos analitos que de forma endógena están presentes en la orina en una concentración más elevada, como es el caso de INN y 5mU. Para los analitos que se encuentran a bajas concentraciones, como 8OHG y 8OH2dG, la dilución afecta negativamente a su detección y continuaba siendo difícil o imposible su identificación y cuantificación.

Por ello, se decidió continuar el estudio de nuevas etapas de tratamiento de muestra (extracción/limpieza/preconcentración) que faciliten la determinación de estos compuestos minoritarios en orina.

## 5.4. ETAPAS DE TRATAMIENTO DE MUESTRA PREVIAS AL ANÁLISIS.

### 5.4.1. DESARROLLO DE UNA ETAPA MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.

Los resultados obtenidos en el apartado anterior, al analizar una muestra de orina únicamente filtrada, confirmaron la necesidad de realizar un tratamiento adicional que implique tanto la extracción de los analitos de la matriz como una eficaz limpieza y preconcentración, de forma que, se obtenga un extracto adecuado para su posterior análisis mediante *CE-ESI(-)MS*.

Para esta etapa se recurrió a la extracción en fase sólida (*SPE*) con sorbentes de tipo polimérico. Concretamente, en este apartado se ensayaron dos sorbentes poliméricos, *Isolute ENV+* (copolímero de estireno hidroxilado y divinilbenceno), ya utilizado previamente en la extracción y preconcentración descrita en el Capítulo IV, y se añadió el sorbente *Isolute ABN*, copolímero de estireno y divinilbenceno con diversos grupos funcionales, de reciente incorporación al mercado.

El procedimiento global que se llevaba a cabo mediante *SPE* se muestra en la Figura 5.16.

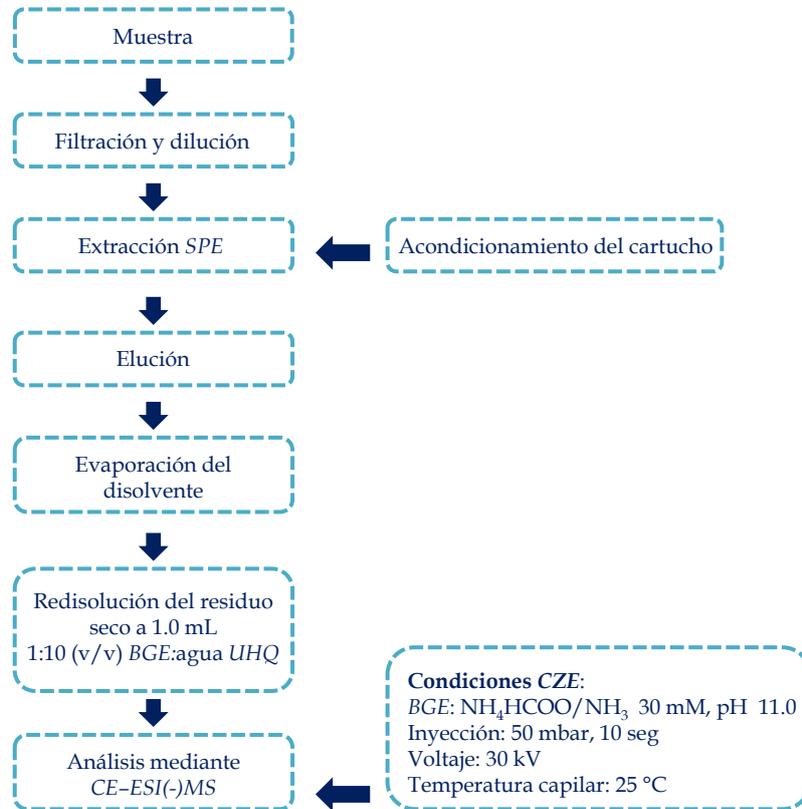


Figura 5.16. Esquema del procedimiento global de análisis para la determinación de nucleósidos mediante *CE-ESI(-)MS*.

### Elección del sorbente y medio de elución.

Gracias al estudio desarrollado con anterioridad ya era conocido que un sorbente adecuado, que permitía la retención de los nucleósidos, era el sorbente denominado *Isolute ENV+*, de tipo polimérico. En este estudio se incorpora también otro sorbente polimérico, *Isolute ABN*, que como se ha indicado anteriormente también está basado en un copolímero de estireno y divinilbenceno, pero con diversos grupos funcionales, de forma que está recomendado por el fabricante para la retención de compuestos ácidos, básicos y neutros.

El estudio se realizó de forma paralela con ambos tipos de sorbentes utilizando como muestra un patrón acuoso de los analitos de interés, a un nivel de concentración de  $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , para un volumen de muestra de 2.0 mL. El acondicionamiento del cartucho se llevó a cabo de forma secuencial con volúmenes de 2.0 mL de disolvente orgánico (acetonitrilo o metanol) y 2.0 mL de agua *UHQ*. El paso de la muestra a través del cartucho se llevó a cabo por gravedad y la etapa de lavado posterior con 2.0 mL de agua *UHQ*. Una vez finalizada la etapa de retención los cartuchos se secan durante 30 minutos con una bomba de vacío a  $-15 \text{ mmHg}$  ( $1 \text{ mmHg} = 133.322 \text{ Pa}$ ).

Los medios de elución estudiados para ambos cartuchos fueron: 100% metanol, 100% acetonitrilo y mezclas de cada uno de ellos con amoníaco concentrado ( $\text{NH}_3$ ) en una relación 90:10 (v/v). En todos los casos, la elución de los componentes retenidos se llevó a cabo con un volumen de 2.0 mL. La fase orgánica, obtenida tras la elución, se evapora hasta sequedad en el dispositivo de concentración de muestras que emplea una corriente de Nitrógeno ( $\text{N}_2$ ). El residuo seco se reconstituye en 1.0 mL de un medio 1:10 (v/v) *BGE*:agua *UHQ*. Con este procedimiento se pretende obtener una eficaz etapa de limpieza y a la vez efectuar una preconcentración de la muestra dirigida a obtener mejores señales al analizar por *CE-ESI(-)MS*.

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 5.8 y se representan en la Figura 5.17 para todas las combinaciones sorbente-eluyente ensayadas. En todos los casos las experiencias se realizaron por duplicado y se trabajó de forma simultánea con los dos tipos de sorbente, es decir, con 4 cartuchos. El extracto de cada uno de los cartuchos fue inyectado por triplicado en el equipo electroforético. Los valores de recuperación se calculan por comparación de las señales obtenidas con respecto a un patrón acuoso, de la concentración final esperada, inyectado directamente en el equipo *CE-ESI(-)MS*.

Tabla 5.8. Recuperaciones (%), de los cinco nucleósidos estudiados, obtenidas al analizar patrones acuosos tras una etapa SPE en función del sorbente empleado, *Isolute ENV+* o *Isolute ABN* y del medio de elución empleado.

Sorbente	Medio de elución	Recuperación (%)				
		5mU	2dG	INN	8OHG	8OH2dG
<i>ABN</i>	ACN (100%)	96 ± 2	86 ± 4	51 ± 3	69 ± 2	71 ± 3
	MeOH (100%)	88 ± 5	85 ± 3	48 ± 6	63 ± 5	67 ± 3
	ACN:NH <sub>3</sub> 90:10 (v/v)	89 ± 4	95 ± 5	56 ± 2	91 ± 3	102 ± 7
	MeOH:NH <sub>3</sub> 90:10 (v/v)	91 ± 2	94 ± 4	54 ± 3	94 ± 2	104 ± 5
<i>ENV+</i>	MeOH (100%)	96 ± 3	64 ± 2	83 ± 3	74 ± 2	74 ± 2
	ACN:NH <sub>3</sub> 90:10 (v/v)	93 ± 2	74 ± 3	86 ± 3	89 ± 1	94 ± 2
	MeOH:NH <sub>3</sub> 90:10 (v/v)	91 ± 2	92 ± 3	89 ± 2	109 ± 2	115 ± 3

A la vista de los resultados obtenidos se puede comprobar que cuando se utiliza el sorbente *Isolute ABN* la INN es el analito que presenta recuperaciones más deficientes, mientras que con sorbentes de tipo *ENV+* es 2dG el que presenta peores recuperaciones. También se comprueba que las mezclas con amoníaco, MeOH:NH<sub>3</sub> 90:10 (v/v) y ACN:NH<sub>3</sub> 90:10 (v/v), proporcionan resultados más favorables que cuando se utilizan los disolventes puros.

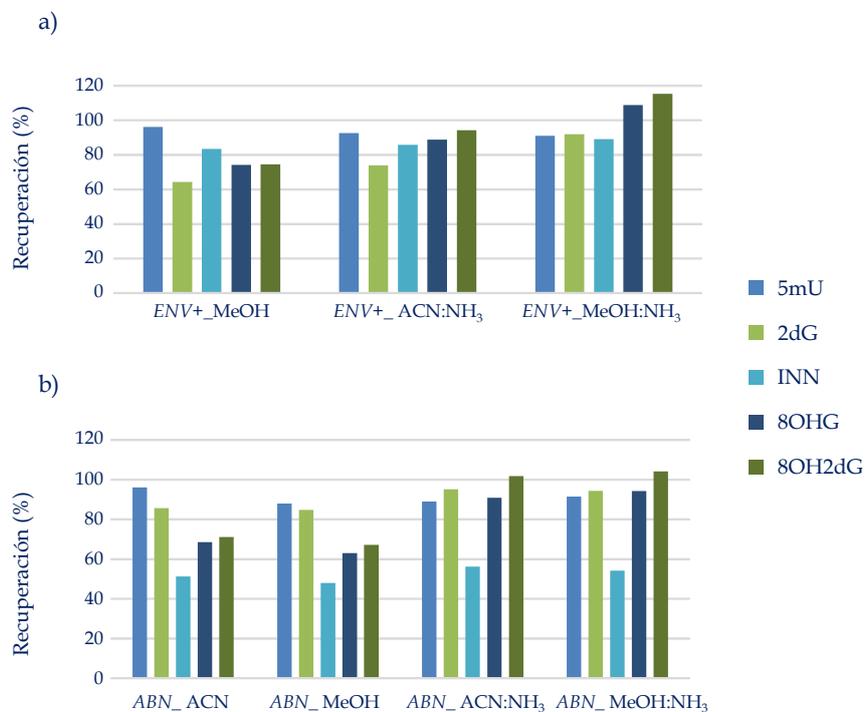


Figura 5.17. Valores de recuperación (%), de los cinco nucleósidos estudiados, obtenidos al analizar patrones acuosos tras una etapa *SPE* para los sorbentes, (a) *Isolute ENV+* y (b) *Isolute ABN*, para los diferentes medios de elución estudiados: 100% ACN, 100% MeOH y mezclas de ACN:NH<sub>3</sub> y MeOH:NH<sub>3</sub> en ambos casos en proporción 90:10 (v/v).

### Aplicación a muestras de orina.

Para el estudio de las recuperaciones de estos analitos en muestras de orina se optó por continuar con ambos sorbentes, utilizando la mezcla MeOH:NH<sub>3</sub> 90:10 (v/v) como medio de elución en ambos casos, ya que es el eluyente con el que se obtienen valores más constantes para todos los analitos.

Además, se decidió hacer un estudio comparativo entre las condiciones optimizadas en este trabajo y las facilitadas por el fabricante para su aplicación general en muestras de orina.

Las condiciones indicadas por el fabricante para el sorbente *Isolute ENV+* implican emplear una mezcla 80:20 (v/v)<sup>169</sup> MeOH:ACN como medio de elución. Para el sorbente *Isolute ABN* las condiciones facilitadas por el fabricante emplean como eluyente 100% ACN. Las condiciones optimizadas en este trabajo para ambos sorbentes implican utilizar como medio de elución una mezcla de MeOH:NH<sub>3</sub> en una proporción 90:10 (v/v).

La muestra empleada en este estudio fue una muestra de orina de un donante sano, filtrada, dopada a un nivel de concentración de 1.0 µg mL<sup>-1</sup> y diluida con agua *UHQ* en una proporción 1:1 (v/v).

La dificultad que conlleva el análisis de estos metabolitos endógenos en muestras de orina está relacionada no solo con el desconocimiento de la concentración existente, sino con los distintos niveles de concentración en que están presentes cada analito de forma natural en la orina. Además hay que contar con la gran variabilidad que presentan dichos compuestos entre individuos distintos.

La Figura 5.18 muestra los resultados obtenidos en una muestra de orina, para los cinco analitos en estudio, al comparar las distintas condiciones de elución, para los dos tipos de sorbentes ensayados. En esta figura se representan valores de señal normalizada con respecto al valor máximo de área de pico obtenido para cada compuesto, al que se le asigna el valor de 100%.

---

<sup>169</sup> "Extraction of 8-oxo-dG from biological fluids using ISOLUTE ENV+". *Literature. Application notes. Part N°: AN759. Published: 2012. Biotage.*

P. M. W. Lam, V. Mistry, T. H. Marczyklo, J. C. Konje, M. D. Evans, M. S. Cooke, *Free Radical Bio. Med.* 52 (2012) 2057. "Rapid measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in human biological matrices using ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry"

Como puede observarse en la Figura 5.18, para los analitos en estudio, los mejores resultados se obtuvieron con las condiciones de elución optimizadas en este trabajo y con el sorbente de tipo polimérico *Isolute ENV+*.

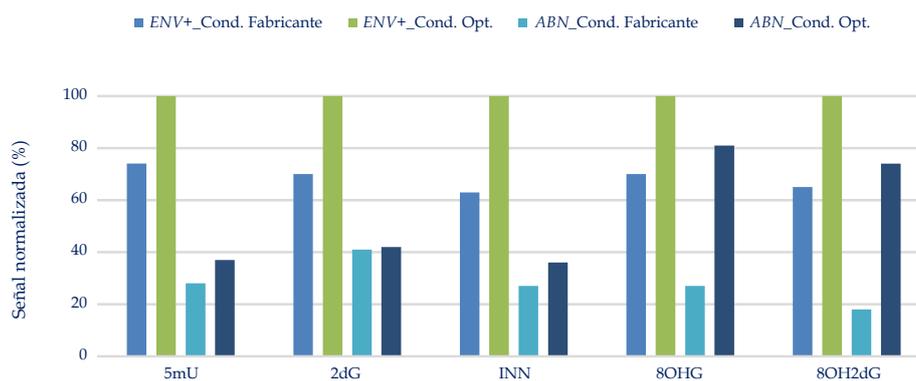


Figura 5.18. Influencia del sorbente y de las condiciones de elución en la eficacia de la etapa *SPE* aplicada a una muestra de orina. Se representa la señal analítica normalizada frente a la señal máxima obtenida para cada compuesto. Sorbentes, *Isolute ENV+* e *Isolute ABN*, utilizando las condiciones indicadas por el fabricante o las optimizadas en este trabajo.

#### Estudio del volumen de elución.

Una vez estudiadas las condiciones de elución, empleadas en la etapa de extracción en fase sólida, se comprobó la correcta elución de los analitos de interés. Esto permitió verificar que no se producía su retención de forma permanente en el sorbente polimérico. Lo que se hizo fue recoger dos fracciones durante la etapa de elución, una primera fracción de 2.0 mL en la que se esperaba la presencia de los analitos en estudio y una segunda fracción de 1.0 mL en el que debía ser mínima o inexistente la presencia de los analitos. Los resultados se muestran en la Figura 5.19.

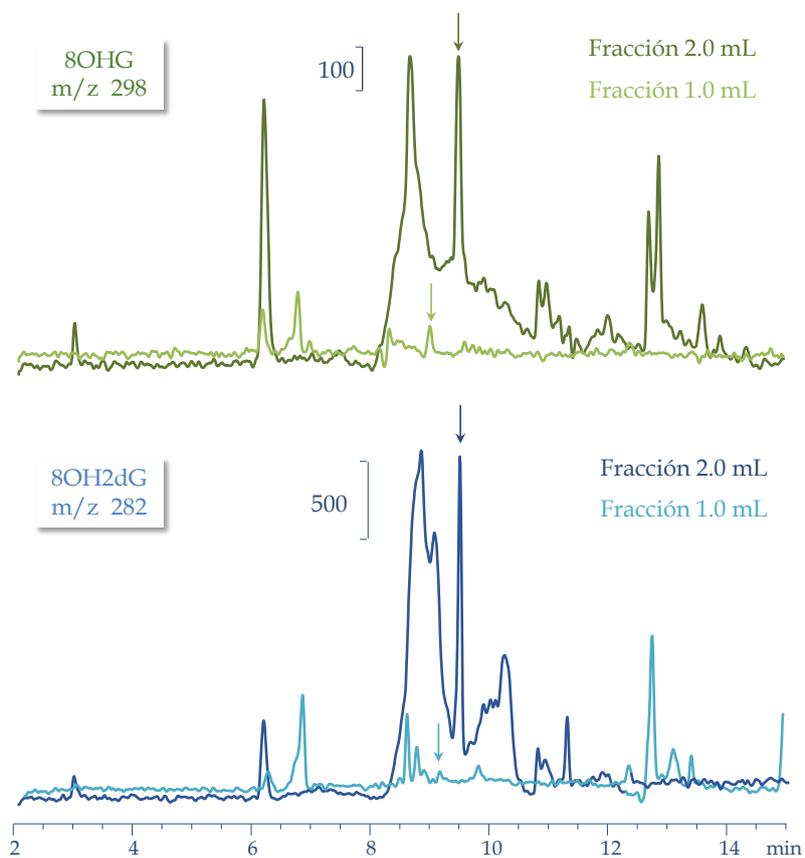


Figura 5.19. Electroferogramas de ion extraído de los nucleósidos hidroxilados, 8OHG y 8OH2dG, para una muestra de orina dopada a una concentración de  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Se representa la señal obtenida para la fracción de elución de 2.0 mL (en azul y verde oscuro) y la señal obtenida de la fracción consecutiva de 1.0 mL (en azul y verde claro).

A la vista de los electroferogramas mostrados en la Figura 5.19 se comprobó que la elución de los analitos se producía mayoritariamente en la primera fracción de 2.0 mL ya que en la fracción de 1.0 mL la señal obtenida era muy pequeña, por lo que se consideró que se producía una efectiva elución de los analitos al utilizar un volumen de 2.0 mL.

Estudio del contenido de metanol del medio de elución.

El siguiente estudio con muestras de orina fue la optimización del contenido de metanol, MeOH, en la mezcla utilizada en la etapa de elución. Para este estudio se utilizó el sorbente *Isolute ENV+* que con muestras de orina proporcionaba mejores resultados.

Los medios de elución ensayados fueron mezclas MeOH:NH<sub>3</sub> con proporciones 80:20 y 95:5 (v/v). El estudio se realizó con la misma muestra de orina descrita anteriormente, es decir, orina diluida en agua UHQ en proporción 1:1(v/v) y dopada a un nivel de concentración de 5.0 µg mL<sup>-1</sup>.

En la Figura 5.20 se comparan los resultados con los obtenidos anteriormente para una mezcla MeOH:NH<sub>3</sub> 90:10 (v/v). Como se aprecia en la figura no se observaron modificaciones significativas, en las señales obtenidas, al variar el contenido de metanol. Por tanto, en estudios posteriores se continuó utilizando la proporción 90:10 (v/v) en el medio de elución.

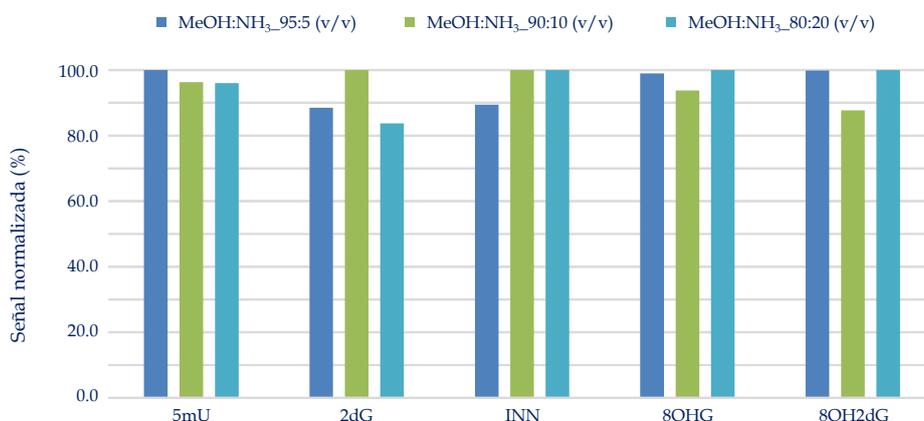


Figura 5.20. Representación mediante diagrama de barras de los resultados obtenidos, señales normalizadas (%) frente a la señal más alta, para cada uno de los analitos de interés al emplear tres proporciones distintas de metanol en el medio de elución. Sorbente, *Isolute ENV+*.

#### Optimización del tiempo de inyección.

A la vista de los registros obtenidos hasta el momento se comprobó la necesidad de mejorar el perfil de los picos electroforéticos obtenidos. Para ello se llevó a cabo un estudio del tiempo de inyección con el fin de mejorar los perfiles de las señales electroforéticas. Hasta este momento se emplearon tiempos de inyección de 30 segundos, ya que, con este tiempo se obtuvieron los mejores resultados para capilares con diámetro interno de 50  $\mu\text{m}$ . Pero cómo ya se señaló anteriormente, alguno de los parámetros optimizados en el apartado de “Optimización del tamaño del diámetro interno del capilar” iban a tener que ser estudiados de nuevo, debido a los problemas asociados al análisis de muestras de orina, dada la complejidad de esta matriz.

Este estudio se llevó a cabo con una muestra de orina de un donante sano. Las muestras que se prepararon para estudiar diversos tiempos de inyección fueron varias alícuotas de esta muestra de orina, orina filtrada y orina filtrada y diluida en dos relaciones 1:5 y 1:10 (v/v). Estas muestras se sometieron a un proceso de extracción en fase sólida empleando sorbente *Isolute ENV+*. El volumen de muestra empleado fue de 2.0 mL y la elución se llevó a cabo con 2.0 mL de una mezcla de MeOH:NH<sub>3</sub> en una proporción 90:10 (v/v). El residuo seco fue reconstituido en 1.0 mL de BGE 30 mM diluido en una proporción 1:10 (v/v) dopado, con los analitos de interés, en una concentración de 2.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Una vez que se obtuvo la muestra ya reconstituida se analizó mediante CE-MS, con las condiciones optimizadas para el capilar de 50  $\mu\text{m}$ , variando solo el tiempo de inyección.

Los tiempos de inyección estudiados fueron 5, 10, 20, 30 y 50 segundos de inyección de tipo hidrodinámica aplicando una presión de 50 mbar.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.21. En ella se recogen los electroferogramas de una orina diluida en una proporción 1:5 (v/v), dopada después de la etapa de SPE, para los tiempos de inyección estudiados. Solo se recogen los electroferogramas de uno de los analitos de interés, 8OH2dG. Indicar que el resto de nucleósidos estudiados se comportaban de forma similar.

De los resultados mostrados en la Figura 5.21 se puede concluir que a medida que aumenta el tiempo de inyección se produce un empeoramiento de los perfiles de los picos electroforéticos. Más concretamente, para tiempos de inyección superiores a 10 segundos, se observaba un empeoramiento de la morfología de las señales, se empezaba a producir un ensanchamiento de las señales y la consiguiente

indefinición de los picos electroforéticos de los analitos de interés. Por lo que, en estudios posteriores, se decidió trabajar con tiempos de 10 segundos de inyección.

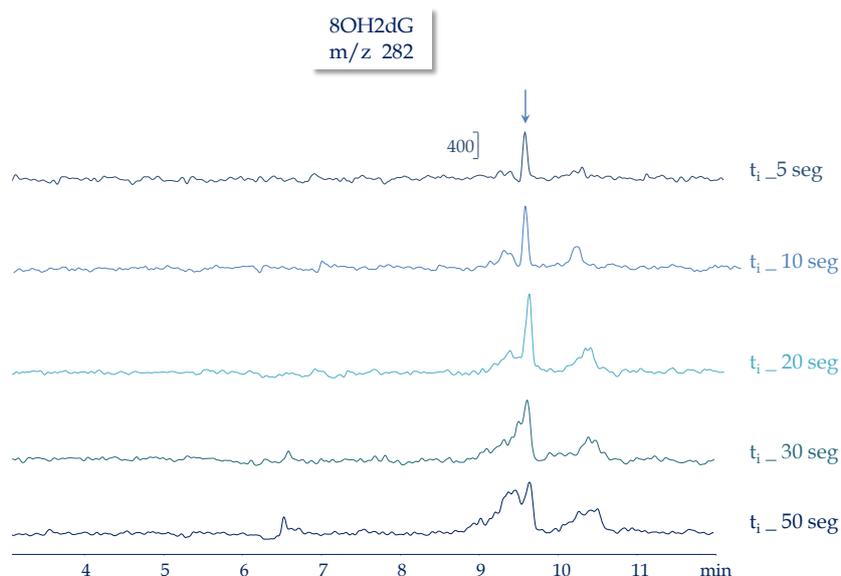


Figura 5.21. Electroferogramas de ion extraído, del nucleósido 8OH2dG, para una muestra de orina diluida con agua *UHQ* en proporción 1:5 (v/v), sometida a una etapa de extracción en fase sólida con *Isolute ENV+*, reconstituida en 1.0 mL de dilución 1:10 (v/v) *BGE:agua UHQ*, dopada con los analitos en estudio a un nivel de concentración de 2.5 µg mL<sup>-1</sup> y analizada mediante *CE-ESI(-)MS* con tiempos de inyección de 5, 10, 20, 30 y 50 segundos.

#### Influencia del volumen de muestra.

Una de las variables a optimizar en el proceso de extracción en fase sólida es el volumen de muestra que puede ser utilizado. Ello es debido a que el aumento del volumen de muestra puede conllevar algunas limitaciones ya que existe la posibilidad de la elución de los analitos en la propia matriz al pasar por el cartucho. Este

fenómeno afecta a los analitos con mayor polaridad puesto que la orina es una matriz hidrofílica.

El estudio de la influencia del volumen de muestra se llevó a cabo utilizando una muestra de orina diluida en proporción 1:5 (v/v) con agua *UHQ*. Se estudiaron cuatro volúmenes de muestra, 5.0, 10.0, 20.0 y 25.0 mL, aplicando el procedimiento de *SPE* descrito en la Figura 5.16 con el sorbente *Isolute ENV+*. Se emplean 5.0 mL de MeOH y de agua *UHQ* para el acondicionamiento del cartucho. Para la etapa de lavado se emplearon volúmenes de agua *UHQ* cinco veces inferiores al volumen de muestra pasado por el cartucho. La elución se llevó a cabo con 2.0 mL de una mezcla de MeOH:NH<sub>3</sub> en una proporción 90:10 (v/v). La fase orgánica obtenida fue sometida a un proceso de evaporación y el residuo seco resultante se reconstituyó en 1.0 mL de disolución 1:10 (v/v) *BGE*:agua *UHQ*. Ese volumen se dividió en dos alícuotas, una se reservó para ser inyectada directamente en el equipo *CE-ESI(-)MS* y la otra se dopó con los analitos de interés a un nivel de concentración de 2.5 µg mL<sup>-1</sup> antes de su inyección.

En la Figura 5.22 se muestran los electroferogramas de ion extraído para el nucleósido 8OH2dG obtenidos para los dos volúmenes de muestra estudiados, 5.0 y 25.0 mL. Se representan los registros obtenidos para la muestra de orina inyectada directamente y la muestra dopada. De esta forma se confirmó la identificación del pico electroforético.

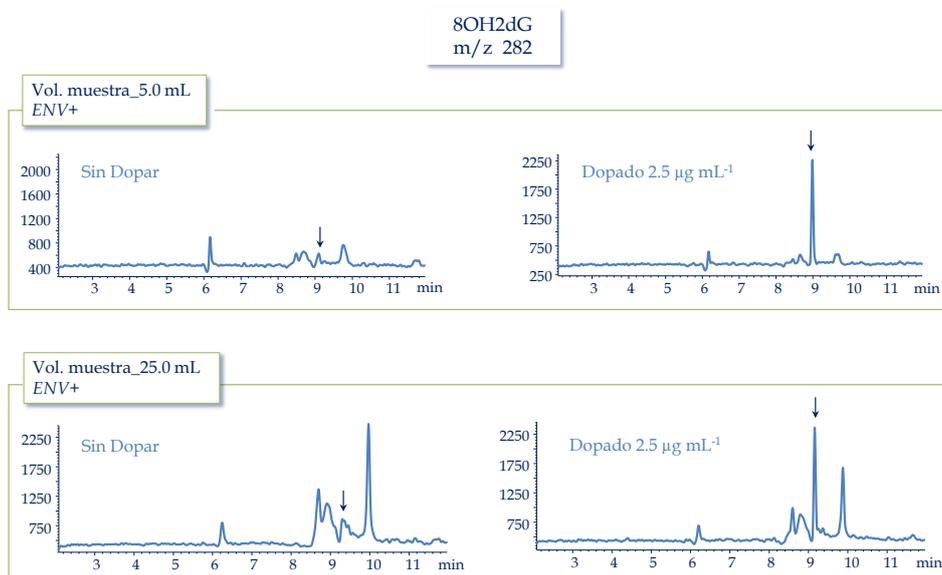


Figura 5.22. Electroferogramas de ion extraído, para el nucleósido 8OH2dG, obtenidos para los volúmenes de muestra estudiados de 5.0 y 25.0 mL. Se representan los registros obtenidos para la muestra de orina sin dopar y dopada, después de la etapa de *SPE*, a un nivel de concentración de 2.5 µg mL<sup>-1</sup>.

Lo primero que se aprecia en los electroferogramas registrados en la Figura 5.22 es que el aumento del volumen de muestra no proporciona un aumento de la señal analítica en la misma proporción. Ello puede estar relacionado con una saturación del sorbente, por parte de la propia matriz de la orina, que dificulte la retención de los analitos de interés. También puede existir un efecto de elución de estos compuestos, debido a su carácter altamente hidrofílico, al pasar por el sorbente un volumen elevado de orina.

La Tabla 5.9 recoge los valores obtenidos al normalizar la señal analítica frente al valor más elevado obtenido para cada analito en cada volumen de muestra estudiado.

Tabla 5.9. Señal normalizada (%) obtenida en el proceso *SPE*, para una muestra de orina filtrada y diluida 1:5 (v/v), en el cual se estudiaron distintos volúmenes de muestra, 5.0, 10.0, 20.0 y 25.0 mL.

Analito	Señal normalizada (%)			
	5.0 mL	10.0 mL	20.0 mL	25.0 mL
5mU	100	50	52	57
2dG	62	100	85	83
INN	97	100	100	63
8OHG	100	25	11	62
8OH2dG	100	39	31	27

Estos datos se representan en la Figura 5.23. Se observa que para todos los analitos, menos para el nucleósido 2dG, los mejores resultados se obtenían con el volumen de 5.0 mL. De todas formas, para 2dG, se obtenía un porcentaje de 62% siendo un buen resultado en comparación con los obtenidos para los analitos que peor se retienen en el resto de volúmenes estudiados. Para el volumen de 10.0 mL el peor resultado se obtenía para el analito 8OHG con un porcentaje de 25% y ese mismo nucleósido hidroxilado presentaba un porcentaje de 11% para el volumen de 20.0 mL. Cuando se estudió el volumen de 25.0 mL el peor valor de señal normalizada obtenido fue para 8OH2dG, 25%.

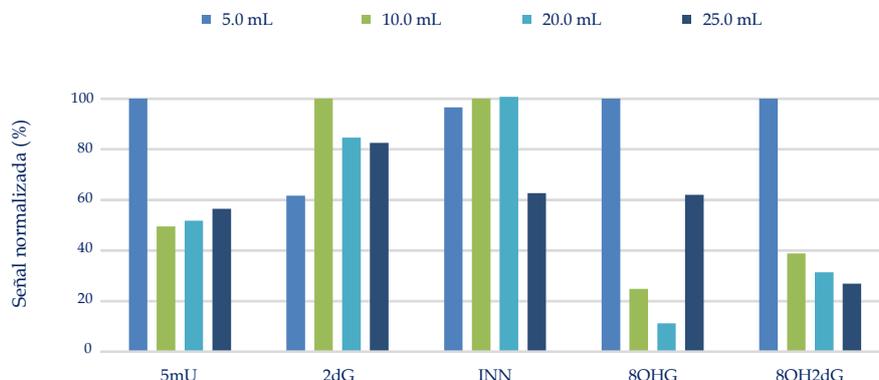


Figura 5.23. Señal normalizada (%), para los nucleósidos de interés, en función de los volúmenes de muestra estudiados, 5.0, 10.0, 20.0 y 25.0 mL.

Por tanto se consideró que un volumen de muestra de 5.0 mL era el adecuado para estudiar muestras de orina, ya que, volúmenes superiores no generaban señales analíticas mucho mayores y además, los picos electroforéticos presentaban un perfil mal definido que dificultaba notablemente su medida. Por otra parte, el paso de volúmenes de orina elevados implicaba un paso de muestra más costoso debido a la compactación de los sorbentes.

Se calcularon los valores de recuperación obtenidos al utilizar como volumen de muestra 5.0 mL. Estos valores de recuperación se obtienen normalizando con un patrón acuoso de  $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $A_{\text{patrón}}$ ) la resta de los valores de área de pico obtenidos de la muestra dopada ( $A_{\text{dopada}}$ ) y sin dopar ( $A_{\text{sin dopar}}$ ), todos ellos inyectados consecutivamente. Es decir:

$$R(\%) = \frac{[A_{\text{dopada}} - A_{\text{sin dopar}}]}{A_{\text{patrón}}} \times 100$$

Los valores de recuperación (%) obtenidos para los analitos en estudio fueron  $69 \pm 3$  para 5mU;  $89 \pm 2$  para 2dG;  $72 \pm 2$  para INN;  $84 \pm 1$  para 8OHG y  $93 \pm 3$  para 8OH2dG.

Estudio de la dilución de la muestra empleada en la etapa de extracción en fase sólida.

Como se ha ido indicando, el uso de una matriz como la orina lleva asociados una serie de problemas que derivan de la complejidad de su composición. Para minimizar estos efectos se estudió la posibilidad de llevar a cabo diluciones de la muestra de orina utilizada en el proceso de extracción en fase sólida.

Este estudio se llevó a cabo con una muestra de orina dopada a un nivel de concentración de  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . La muestra se sometió al proceso de SPE sin diluir y diluida con agua UHQ en proporciones 1:1, 1:2 y 1:5 (v/v).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.24. En ella se representa, mediante un diagrama de barras, la señal analítica (área de pico) obtenida para los analitos de interés en los casos en los que la etapa de SPE se llevó a cabo para la muestra sin diluir y la muestra diluida en las proporciones 1:1, 1:2 y 1:5 (v/v). Como se puede observar el comportamiento de todos los analitos en estudio fue muy similar. Según lo esperado, a medida que aumenta la dilución de la muestra utilizada en la etapa de SPE, la señal obtenida disminuye. Sin embargo, se comprobó que la disminución de la señal no era proporcional a la dilución efectuada en la muestra. Esto puede observarse al comparar las diferencias entre las señales analíticas obtenidas para una muestra de orina sin diluir y una muestra diluida 1:1 (v/v).

Por ello, se consideró una buena alternativa utilizar una muestra diluida 1:1 (v/v). Permitiría la obtención de señales sin una disminución significativa a la vez que favorecería a una mejor detección en el espectrómetro de masas, ya que, se reducirá la introducción de interferencias presentes en la orina que dificultan la detección de los picos electroforéticos de interés.

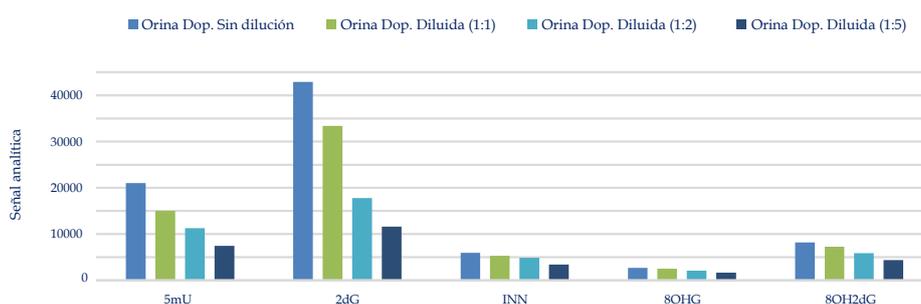


Figura 5.24. Señal analítica, área de pico electroforético, obtenida para los analitos estudiados en función de la dilución o no de la muestra de orina dopada ( $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) antes del proceso SPE. Las diluciones estudiadas fueron diluciones con agua UHQ en proporciones 1:1, 1:2 y 1:5 (v/v).

Optimización de la etapa de lavado del sorbente polimérico.

Una etapa importante en el proceso de extracción en fase sólida es la etapa de lavado que se lleva a cabo después del paso de muestra y antes de la elución de los analitos. Ésta debe llevarse a cabo con un medio y un volumen adecuado, que permita eliminar de forma efectiva las especies interferentes y que a la vez no provoque el arrastre de los analitos de interés por afinidad de estos con la naturaleza del disolvente de lavado.

Para la etapa de lavado se utilizó agua *UHQ* como disolvente de lavado y los volúmenes estudiados fueron 0.5, 1.0 y 2.0 mL. En este estudio se empleó una muestra de orina filtrada sin diluir y diluida con agua *UHQ* en proporción 1:1 (v/v). El volumen de muestra en el proceso de extracción en fase sólida fue de 5.0 mL. La elución se llevó a cabo con 2.0 mL de la mezcla MeOH:NH<sub>3</sub> en proporción 90:10 (v/v). Después de la etapa de evaporación el residuo seco se reconstituyó en 1.0 mL de 1:10 (v/v) BGE:agua *UHQ*, pH 11.0.

En la Figura 5.25 se representan los datos de señal analítica (área de pico) obtenidos, para los analitos de interés, al estudiar el volumen de agua *UHQ* empleado en la etapa de lavado previa a la elución del sorbente.

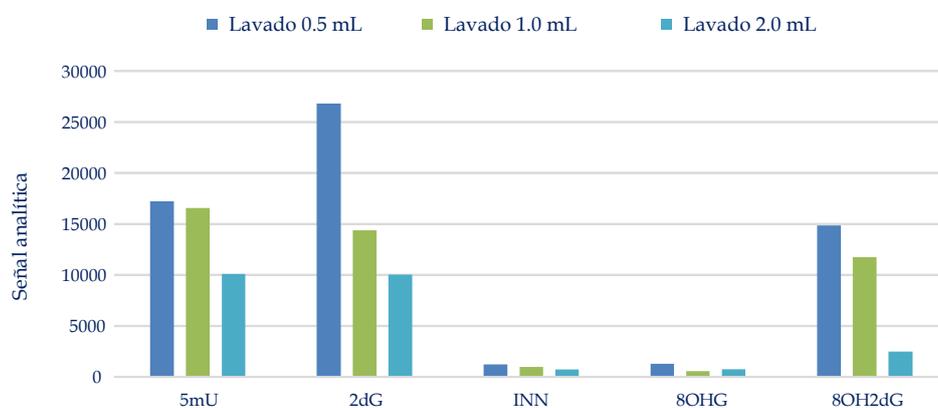


Figura 5.25. Influencia del volumen de agua *UHQ* empleado en la etapa de lavado previa a la elución del sorbente. Los volúmenes de agua *UHQ* estudiados fueron 0.5, 1.0 y 2.0 mL.

A la vista de los resultados mostrados en la Figura 5.25 se comprueba que, a medida que aumentaba el volumen utilizado en la etapa de lavado del sorbente polimérico, disminuía la señal electroforética obtenida para los analitos en estudio. Por tanto, sí se producía una pérdida de analito durante la etapa de lavado, por lo que, se lavará el cartucho con el menor volumen de agua *UHQ* posible.

En estudios posteriores se emplearán volúmenes de lavado comprendidos entre 0.5 y 1.0 mL, pero nunca volúmenes superiores debido a que la disminución de la señal obtenida para estos analitos fue significativa. Se trabajará con este intervalo de volúmenes de lavado debido al efecto positivo que ejerce en la eliminación de otros compuestos retenidos en el sorbente polimérico, lo que se traduce en una disminución de las interferencias en la muestra final analizada mediante *CE-MS*. Por ello, con un volumen de 1.0 mL se observa una mejora en la detección de los analitos mediante espectrometría de masas aunque se produce una cierta pérdida de señal de los analitos estudiados.

#### Estudio del porcentaje de metanol presente en el medio de lavado.

El último estudio relacionado con la etapa de lavado fue la posibilidad de adicionar un porcentaje de metanol (MeOH) en el agua *UHQ* empleada en la etapa de lavado.

Este estudio de optimización se realizó con una muestra de orina filtrada, de donante sano, dopada a un nivel de  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . La orina dopada se diluyó en una proporción 1:1 (v/v) y fue sometida a una etapa de extracción en fase sólida siguiendo el esquema recogido en la Figura 5.16. El volumen de muestra en la etapa de *SPE* fue de 5.0 mL. Para la etapa de lavado del sorbente se empleó un volumen de 1.0 mL de agua *UHQ* con distintos porcentajes de metanol, objetivo de este apartado.

La elución se llevó a cabo con 2.0 mL de una mezcla MeOH:NH<sub>3</sub> 90:10 (v/v) y la reconstitución del residuo seco, obtenido de la evaporación, se realizó en 1.0 mL de *BGE* formiato amónico-amoniaco 30 mM diluido con agua *UHQ* en una proporción 1:10 (v/v).

Los porcentajes de metanol presentes en el agua *UHQ* de la etapa de lavado estaban comprendidos entre el 0% y el 100% de metanol.

Los resultados obtenidos en este estudio fueron expresados (Figura 5.26) en forma de señal normalizada con respecto al valor máximo de área de pico obtenido para cada compuesto, al que se le asigna el valor de 100%.

Las áreas de pico obtenidas, para los nucleósidos estudiados, cuando la muestra de orina, dopada y diluida, sufre un proceso *SPE* con una etapa de lavado del sorbente polimérico en la cual se empleaba agua *UHQ* con distintos porcentajes de MeOH, son comparadas con las de un patrón inyectado al inicio de la secuencia. De esta comparación se obtuvieron los datos que se recogen en la Figura 5.26. Se puede observar como la señal de los analitos disminuye apreciablemente a partir de valores de 30% de metanol en el agua de lavado, hasta llegar a alcanzar valores muy bajos.

A la vista de los resultados obtenidos se podría concluir que la presencia de metanol, en la etapa de lavado del sorbente polimérico, no afecta de forma significativa a las señales obtenidas cuando se mantiene en valores entre 5–10%. Trabajar con estos porcentajes de metanol sería considerado aceptable, debido a que, no alteran la magnitud de la señal y se obtienen electroferogramas un poco más limpios.

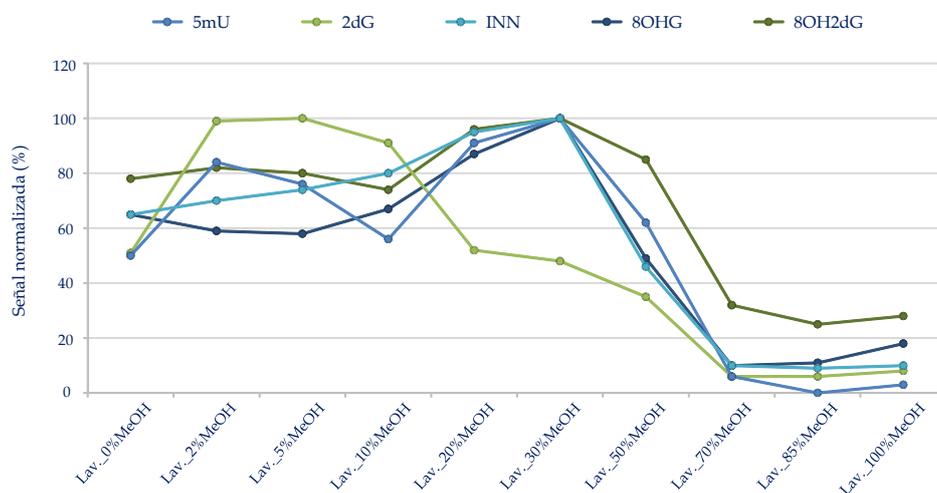


Figura 5.26. Efecto de la presencia de metanol en la etapa de lavado del sorbente. Los porcentajes MeOH:agua *UHQ* (v/v) estudiados fueron 0, 2, 5, 10, 20, 30, 50, 70, 85 y 100%.

Centrándose en los nucleósidos hidroxilados, 8OHG y 8OH2dG, a continuación se muestran los resultados de señal normalizada (%) obtenidos para estos dos analitos. En este caso los datos se representan mediante un diagrama de barras, Figura 5.27.

Se observa que tanto con ausencia como en presencia de metanol (hasta un 30% en el agua *UHQ* de lavado) los valores de señal normalizada obtenidos son aceptables para ambos analitos: en el caso del nucleósido 8OHG las señales están comprendidas entre un 60 y un 100% de su señal máxima y para el compuesto 8OH2dG entre un 80 y un 100% de su señal máxima.

También se observa cómo a partir de un porcentaje de 30% de MeOH se produce una disminución muy acusada de los valores de señal obtenidos y, para porcentajes del 70% y superiores, los analitos son mayoritariamente eluidos en la etapa de lavado puesto que la respuesta analítica que se obtiene en la posterior etapa de elución es muy pequeña.

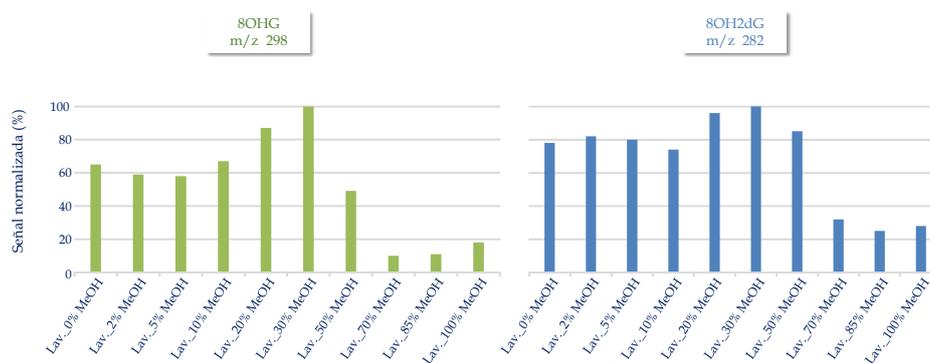


Figura 5.27. Señal normalizada (%) obtenida para los nucleósidos hidroxilados, 8OHG y 8OH2dG, en función de los porcentajes de metanol presentes en el agua *UHQ* de la etapa de lavado del sorbente. Los porcentajes estudiados fueron 0, 2, 5, 10, 20, 30, 50, 70, 85 y 100% de MeOH:agua *UHQ*.

Dada la mala identificación y cuantificación de los analitos de interés obtenida con la metodología optimizada hasta el momento, que involucraba una etapa de limpieza con *SPE*, se decidió realizar un último intento para obtener unos registros libres de interferencias. Para ello se realizaron modificaciones del potencial aplicado durante la separación electroforética con el fin de mejorar la separación y a su vez, mejorar la identificación y detección en el espectrómetro de masas. En este estudio se aplicaron escalones de potencial a una muestra patrón y a una muestra de orina sometida a una etapa de limpieza mediante *SPE* en las condiciones optimizadas en este trabajo. En la Figura 5.28 se muestran los electroferogramas de ion total para un patrón acuoso de los analitos de interés y para la muestra de orina sometida a una etapa de *SPE*. En ambos casos se hizo una inyección con un potencial constante de 30 kV y luego se llevó a cabo la aplicación de escalones de potencial. Se estudiaron dos escalones de 30 a 22 kV y de 30 a 25 kV.

A la vista de los resultados obtenidos se comprueba que la aplicación de los escalones de potencial provocaba un retraso en los tiempos de migración y no mejoraban la separación electroforética de los analitos de interés. Por lo que se decidió descartar la aplicación de escalones de potencial para mejorar la separación electroforética.

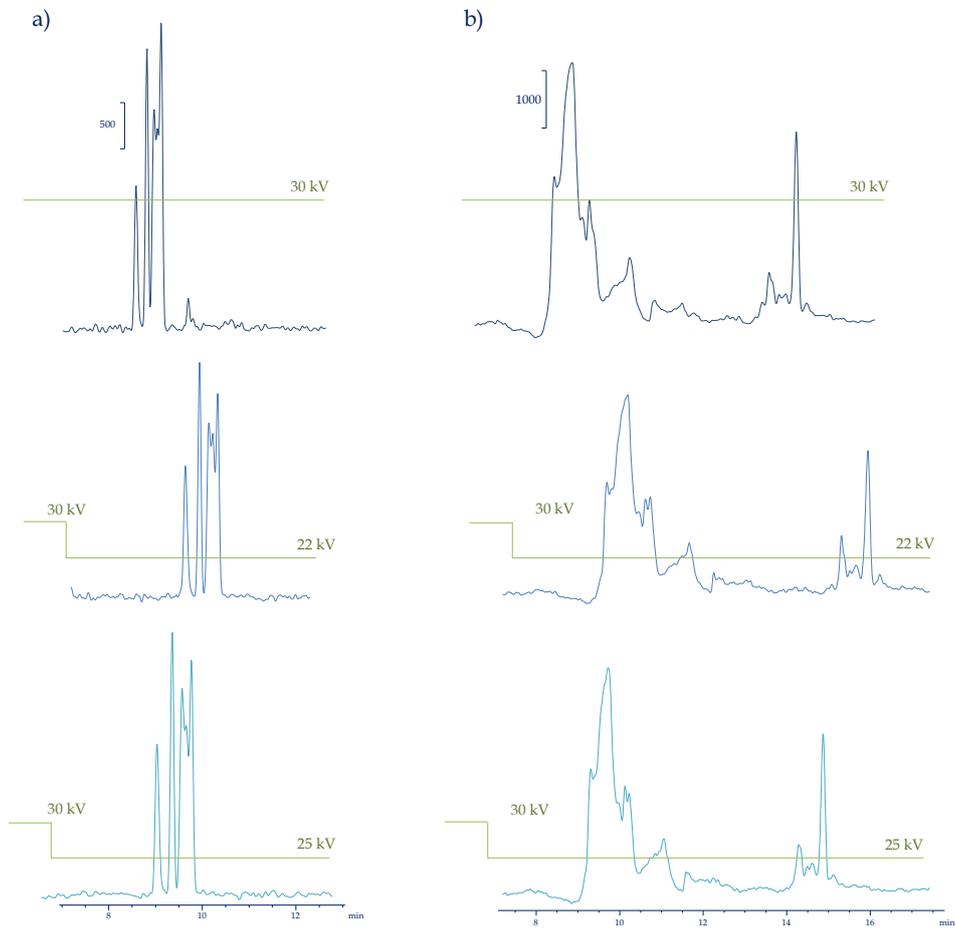


Figura 5.28. Electroferogramas de ion total (a) para un patrón acuoso de los analitos de interés y (b) para la muestra de orina sometida a una etapa de *SPE*. En ambos casos, el potencial para la separación se aplicó de diferentes formas, constante o en escalón.

**Características analíticas del método SPE/CE-MS.**

Una vez que se ha llevado a cabo el estudio de las etapas que engloban el proceso de extracción en fase sólida, el último paso fue realizar un calibrado para obtener las características del método, utilizando los parámetros optimizados a lo largo de este apartado. El sorbente polimérico utilizado fue *Isolute ENV+*. Las muestras analizadas eran muestras de orina filtradas, diluidas en una proporción 1:5 (v/v), dopadas con los cinco nucleósidos de interés en niveles de concentración comprendidos entre 0.1–5.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Las concentraciones finales, después del proceso de preconcentración, serían de 0.5–25.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (debido a la dilución aplicada, estas concentraciones coinciden con las concentraciones en la muestra de orina original).

La Tabla 5.10 muestra los parámetros del análisis de regresión, señal analítica frente a la concentración en  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , para todos los analitos. La precisión se determinó a partir de los valores de desviación estándar relativa en porcentaje (*RSD%*) calculada para un nivel de concentración, 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Se observa que los valores para el coeficiente de variación están comprendidos entre 8 y 23%. Estos valores pueden considerarse aceptables considerando que el procedimiento involucra una etapa de extracción en fase sólida que precisa de un cambio de disolvente, por evaporación del extracto eluido del cartucho, y posterior redisolución del residuo seco en el medio adecuado para la separación electroforética.

Tabla 5.10. Características del calibrado empleando una etapa de extracción en fase sólida para una muestra de orina filtrada, dopada en un intervalo de concentraciones desde 0.5 a 25.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y diluida 1:5 (v/v).

Analito	Pendiente ( $\times 10^3 \text{ mL } \mu\text{g}^{-1}$ )	Ordenada en el origen ( $\times 10^3$ )	$R^2$	$LOD^a$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$RSD^b$ (%)
5mU	$1.99 \pm 0.06$	$1.79 \pm 0.58$	0.994	0.27	8
2dG	$2.03 \pm 0.08$	$0.48 \pm 0.77$	0.989	0.17	10
INN	$1.31 \pm 0.07$	$0.38 \pm 0.76$	0.980	0.25	17
8OHG	$0.99 \pm 0.05$	$0.14 \pm 0.56$	0.981	0.46	23
8OH2dG	$1.39 \pm 0.07$	$0.82 \pm 0.82$	0.979	0.44	23

<sup>a</sup>. *LOD*: Límite de detección según la *ICH*.

<sup>b</sup>. *RSD*: Desviación estándar relativa ( $n=6$ ) para un nivel de concentración de 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

**Estudio de una mezcla de sorbentes poliméricos en la etapa de extracción en fase sólida (SPE).**

Para completar el estudio de desarrollo de una etapa de limpieza mediante extracción en fase sólida (SPE) se estudió la posibilidad de fabricar un cartucho de forma manual, con una mezcla de los sorbentes poliméricos comerciales, sorbente ENV+ y sorbente ABN.

Este estudio surgió en base a dos premisas. La primera se basa en las buenas recuperaciones obtenidas para el nucleósido 2dG con el sorbente polimérico ABN. La segunda, en que el grupo de investigación ya ha estudiado la aplicación de una etapa de SPE en un cartucho fabricado manualmente, cuyo sorbente era mezcla de tres sorbentes comerciales. Debido a que en este estudio mencionado se obtuvieron buenos resultados y se logró desarrollar una nueva metodología para la determinación de nucleósidos mediante cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de triple cuadrupolo, se consideró conveniente utilizar aquí esta posibilidad.

Se intentó, por tanto, aunar las buenas recuperaciones obtenidas con el sorbente ENV+ para los nucleósidos 5mU, INN, 8OH2dG y 8OHG con las buenas recuperaciones obtenidas para el nucleósido 2dG con el sorbente ABN.

Se hizo un primer estudio con cantidades similares de cada uno de los sorbentes comerciales, 50% de sorbente ENV+ y 50% de sorbente ABN. Los cartuchos se prepararon con 200 mg de la mezcla de sorbentes, 100 mg del sorbente ENV+ y 100 mg del sorbente ABN, así se preparó un cartucho con la misma cantidad de sorbente que la que contienen los cartuchos comerciales.

El estudio con este nuevo cartucho se llevó a cabo con una muestra de orina diluida en una proporción 1:1 (v/v) y una orina dopada a  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  y diluida en una proporción 1:1 (v/v). El acondicionamiento del cartucho se lleva a cabo con MeOH. El medio de elución fue una mezcla 90:10 (v/v) de MeOH:NH<sub>3</sub>.

Los resultados obtenidos no fueron los esperados. No se observa ninguna mejora en los perfiles de los picos electroforéticos para los analitos de interés, y más en particular para el analito 2dG, debido a la incorporación del sorbente ABN.

Debido a esto se planteó el cambio de los porcentajes de sorbentes poliméricos, aumentando el porcentaje de sorbente comercial *ABN*, para intentar mejorar el perfil de la señal obtenida para el nucleósido 2dG. La composición del nuevo cartucho quedaría constituida por un 30% de sorbente *ENV+* y un 60% de sorbente *ABN*. Este estudio se llevó a cabo de forma similar al realizado para el anterior cartucho preparado de forma manual.

Los resultados obtenidos con este nuevo cartucho tampoco fueron los esperados. No mejoraban en ningún momento los perfiles de los picos electroforéticos ni tampoco el perfil del nucleósido 2dG. Por tanto, se tomó la decisión de abandonar esta metodología debido en parte a que no suponía ninguna mejora frente a los resultados obtenidos con los cartuchos comerciales de sorbente *ENV+*, además suponía un aumento en el tiempo de preparación de los cartuchos, ya que la etapa de preparación de la mezcla y la consiguiente preparación del cartucho para su posterior empleo en la etapa de extracción en fase sólida suponía un consumo importante de tiempo.

#### Resumen de los estudios realizados en el desarrollo de una etapa mediante extracción en fase sólida.

Una vez finalizado el estudio de la etapa previa mediante extracción en fase sólida se considera adecuado realizar un resumen en el que se sintetizen las condiciones óptimas con las que se obtuvieron los mejores resultados para esta etapa. Fueron las siguientes:

- ⇒ Sorbente: *Isolute ENV+*.
- ⇒ Volumen de muestra: 5.0 mL orina diluida en una proporción 1:1 (v/v).
- ⇒ Etapa de lavado: 1.0 mL de una mezcla 20% MeOH:agua *UHQ*.
- ⇒ Elución: 2.0 mL de una mezcla MeOH:NH<sub>3</sub> 90:10 (v/v).
- ⇒ Evaporación de la muestra hasta sequedad.
- ⇒ Reconstitución del residuo seco: 1.0 mL de una mezcla 1:10 (v/v) *BGE*:agua *UHQ*.

En la Figura 5.29 se muestra el electroferograma de ion extraído, para los analitos de interés, al someter a la muestra de orina al proceso de limpieza mediante extracción en fase sólida con las condiciones optimizadas en este estudio. Se puede observar que estas condiciones solo son buenas para la identificación y cuantificación de los analitos hidroxilados estudiados, 8OHG y 8OH2dG. Para el resto de los analitos se debería emplear otra etapa de limpieza de muestra.

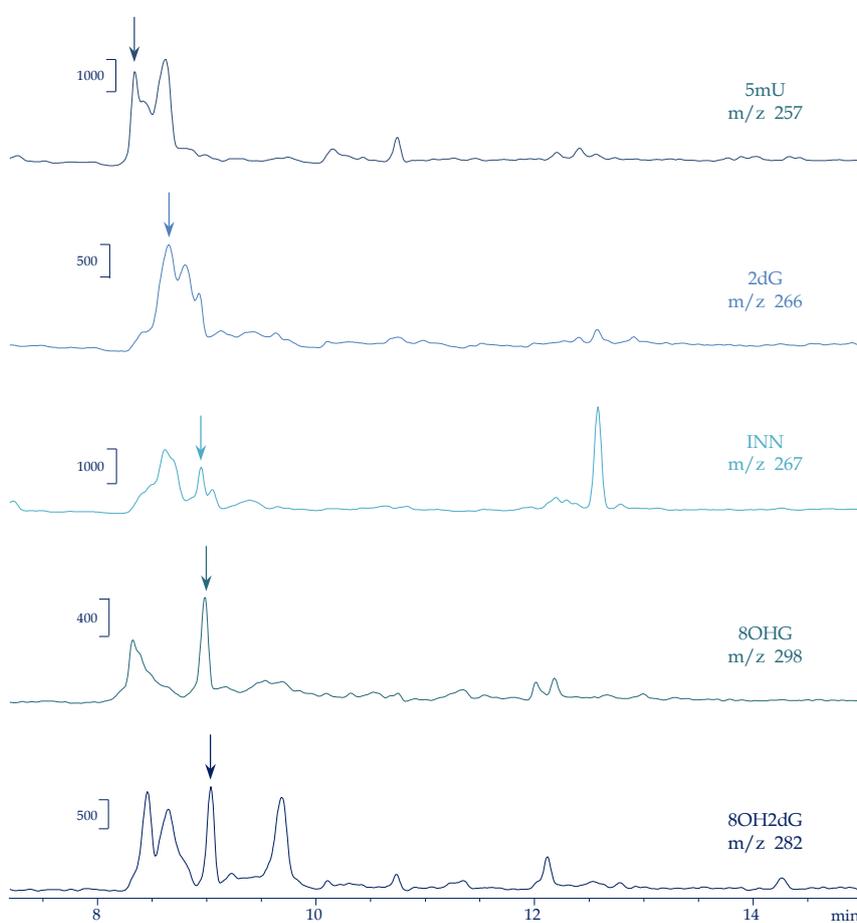


Figura 5.29. Electroferograma de ion extraído para una muestra de orina, sometida a una etapa de extracción en fase sólida (*SPE*), aplicando las condiciones optimizadas en este estudio.

#### 5.4.2. DESARROLLO DE UNA ETAPA MEDIANTE MATERIAL DE ACCESO RESTRINGIDO (RAM).

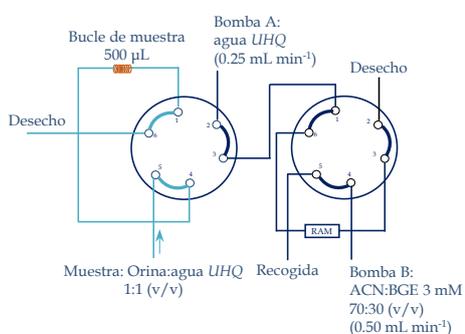
En este apartado se va a estudiar la utilidad de un material de acceso restringido (*RAM*) como etapa de tratamiento de muestra previa a la inyección en el equipo *CE-MS*. Esta decisión se tomó debido a los resultados obtenidos cuando la etapa de limpieza se realizaba con sorbentes poliméricos ya que, no permitían una limpieza adecuada para lograr una buena identificación de los analitos en estudio.

Como alternativa se propone la posibilidad de llevar a cabo la etapa de limpieza con un *RAM*, basándose en los resultados obtenidos previamente con este dispositivo en el grupo de investigación. Los resultados obtenidos utilizando distintos materiales de acceso restringido (*RAM*) han puesto de manifiesto que los de tipo polimérico, MSpak PK, formados por un copolímero hidrofílico que contiene N-vinilacetamida retienen adecuadamente a diversos nucleósidos modificados<sup>34</sup>. Por ello, en este trabajo se ha utilizado este material, MSpak PK, en el tratamiento de las muestras de orina.

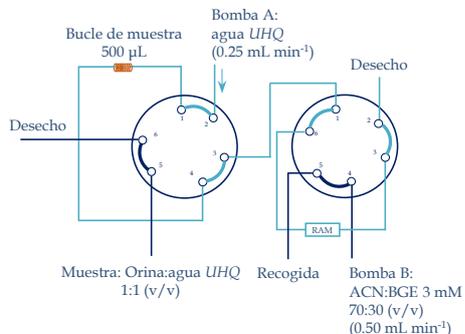
La Figura 5.30 muestra el diagrama de la configuración instrumental utilizada, basada en el acoplamiento en serie de dos válvulas de seis vías, la primera válvula sirve para cargar la muestra en un bucle de volumen fijo y la segunda válvula incorpora el dispositivo *RAM* en el bucle de inyección.

El funcionamiento de este dispositivo implica tres etapas: (a) la muestra se carga en el bucle de la primera válvula, (b) inyección de la muestra en el dispositivo *RAM*, impulsada por la bomba A, a la vez que se produce la limpieza del mismo y (c) elución del *RAM* (bomba B) y recogida de muestra, que finalmente es llevada al equipo de *CE-MS* para su inyección y análisis. En el Capítulo III, Apartados 3.3.5 y 3.5.4, se recoge una descripción detallada de la metodología empleada así como de las distintas etapas involucradas en este paso previo a *CE-ESI(-)MS*.

a) Carga bucle de muestra



b) Inyección en el RAM y limpieza



c) Elución del RAM y recogida de la muestra

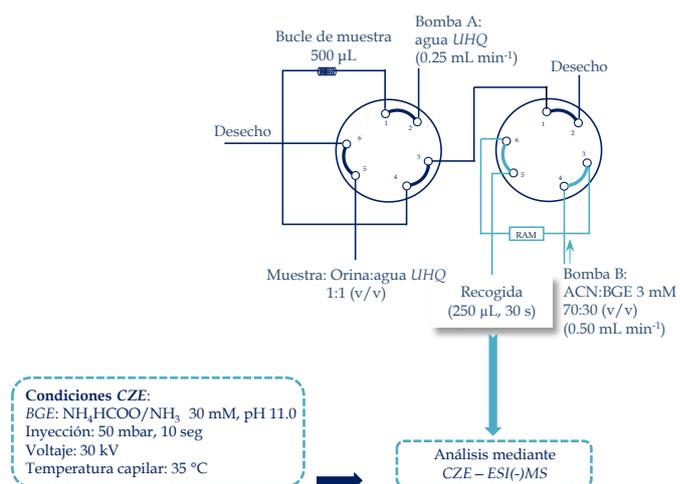


Figura 5.30. Diagrama de la configuración instrumental utilizada en la metodología *off-line* RAM/CE-MS.

**Estudio del posible medio utilizado en la elución de los analitos del RAM.**

Teniendo en cuenta que los analitos se inyectarán en el equipo CE-MS en el medio que son eluidos del dispositivo RAM, la situación ideal sería que este medio fuese el adecuado para una correcta separación electroforética. De esta manera se evitaría la incorporación de etapas de cambio de medio, lo que reduce la manipulación de la muestra, simplificando el análisis. Por ello, antes de iniciar la optimización de algunas de las variables que afectan al proceso de limpieza con un material de acceso restringido, se llevó a cabo el estudio de distintos medios en los que los analitos podrían ser eluidos del RAM, comprobando la respuesta obtenida en el equipo CE-MS.

Se ensayaron distintos posibles medios de elución basados en mezclas ACN:agua UHQ y en mezclas con el tampón de separación (BGE) en distintas proporciones. La presencia de BGE en este estudio se justifica por los beneficios que supone la inyección de la muestra en un medio básico para favorecer la ionización de los nucleósidos, lo que deriva en una mejor detección en ESI(-)MS.

A continuación se enumeran los distintos medios ensayados:

- ACN:agua UHQ 70:30 (v/v).
- ACN:agua UHQ 50:50 (v/v).
- ACN:agua UHQ 30:70 (v/v).
- Agua 100%.
- BGE:agua UHQ 1:10 (v/v).
- ACN:BGE 3 mM 70:30 (v/v).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.31, en la cual se representa la señal analítica (área de pico electroforético) obtenida, para los cinco nucleósidos, con algunos de los medios ensayados. En ella se puede observar como las mejores señales se obtienen para la mezcla ACN:BGE 3mM 70:30 (v/v) por lo que, en estudios posteriores, se empleará esta mezcla acuoorgánica como medio de elución de la muestra del RAM y como medio de inyección en el equipo CE-MS.

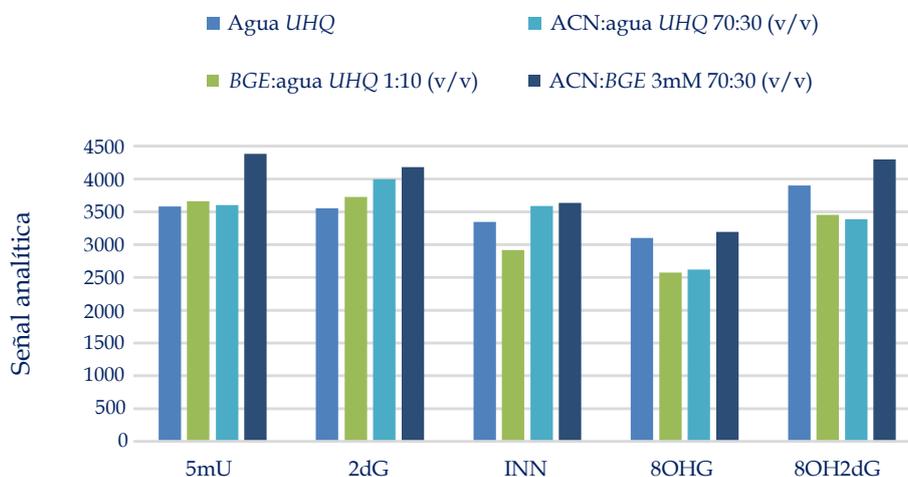


Figura 5.31. Influencia del posible medio de elución en la respuesta analítica, área de pico, de los cinco nucleósidos en estudio.

### Procedimiento en el dispositivo RAM.

La etapa de tratamiento de muestra con este dispositivo *RAM* implica tres pasos:

⇒ **Etapa (a). Carga bucle de muestra.**

Esta etapa implica el llenado del bucle de muestra con la disolución a analizar. Para los estudios de optimización se utilizó un patrón acuoso de  $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de los analitos y un bucle de muestra de volumen fijo de  $500 \mu\text{L}$ .

⇒ **Etapa (b). Inyección en el RAM y limpieza (controlada por la bomba A).**

La inyección de la muestra en el dispositivo RAM está controlada por la bomba A, que impulsa una disolución de agua UHQ encargada de desplazar el contenido del bucle de muestra hacia el RAM. A la vez, la fase móvil impulsada por la bomba A actúa como disolución de lavado, eliminando los componentes de la matriz no retenidos en el RAM. Ello implica que el tiempo de duración de esta etapa debe ser suficiente para cargar toda la muestra en el RAM y que el efecto de lavado sea eficaz.

Por tanto, los parámetros a controlar en esta etapa (b) son el caudal de la bomba A y el tiempo de duración de la etapa.

En primer lugar se estudió el caudal de la bomba A. Se ensayaron caudales de 0.25 y 0.50 mL min<sup>-1</sup> manteniendo constantes todos los demás parámetros. Para el caudal de 0.25 mL min<sup>-1</sup> se utilizaron dos tiempos de lavado, 1 y 2 minutos. Para el caudal de 0.50 mL min<sup>-1</sup> se utilizó un tiempo de 1 minuto. Durante este tiempo se recogió la disolución percolada para comprobar si se producían pérdidas de muestra durante la etapa (b). Se recogió en cada caso fracciones de 1 minuto.

Una vez que se produce la inyección de la muestra en el RAM la siguiente etapa es la elución de los analitos del RAM y la recogida de la muestra. Esta etapa está controlada por la bomba B que impulsa una disolución ACN:BGE 3mM 70:30 (v/v) a 0.50 mL min<sup>-1</sup>. Esta etapa se optimizará posteriormente.

En la Figura 5.32 se recogen los electroferogramas de ion total para estos estudios realizados. Para el caudal de 0.50 mL min<sup>-1</sup>, Figura 5.32.c, se muestran los electroferogramas obtenidos en la disolución percolada en la etapa (b) y en las cuatro fracciones recogidas en la elución del RAM. Para los otros dos se obtenían resultados similares, incluido el electroferograma del patrón acuoso inyectado de forma directa en el equipo de CE-MS con la misma concentración que la muestra, sometida a la etapa de limpieza en el RAM.

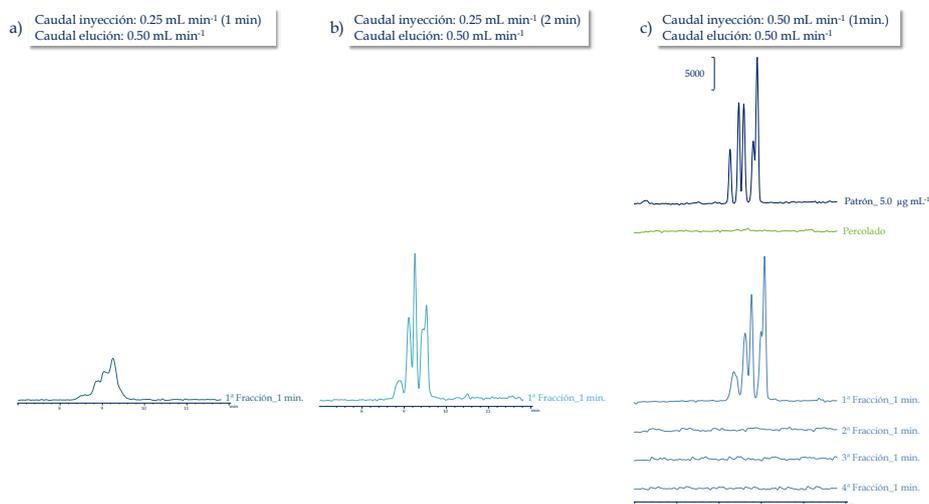


Figura 5.32. Electroferogramas de ion total obtenidos en el estudio del caudal de inyección de la bomba A involucrada en la etapa (b) denominada “Inyección en el RAM y limpieza”.

De este estudio de la etapa (b) de “Inyección en el RAM y limpieza” se obtuvieron los siguientes resultados:

- En primer lugar se comprueba la ausencia de analitos en la muestra percolada, recogida en esta etapa (b), para los caudales de inyección estudiados, Figura 5.32, por lo que se verifica que los analitos se quedaban retenidos en el RAM.
- En segundo lugar se comprueba que la elución de los analitos se producía, en su mayoría, en el primer minuto de recogida durante la etapa (c) de “Elución del RAM y recogida de la muestra” debido a que, en las posteriores fracciones, no se observaban señales de los analitos de interés. Este comportamiento se repitió en los estudios de los dos caudales ensayados.

- Por último se observó cómo existe una diferencia significativa en cuanto a la eficacia del lavado en función del tiempo de duración de la etapa. Al comparar los electroferogramas de ion total obtenidos para el caudal de  $0.25 \text{ mL min}^{-1}$ , Figura 5.32.a y b, con tiempos de duración de 1 y 2 minutos, se observa un gran deterioro en el perfil de la señal electroforética obtenida cuando el tiempo de la etapa es de 1 minuto. Esto indica la necesidad de aplicar un tiempo de inyección superior a 1 minuto que permitiese la limpieza de la muestra ya que repercute en una mejor detección de los analitos de interés.

Se calcularon las recuperaciones por comparación de las señales obtenidas para la muestra, sometida a una etapa de limpieza con *RAM*, con las señales de un patrón acuoso inyectado de forma directa en *CE-MS*. Para todos los analitos en estudio las recuperaciones fueron próximas al 100% lo que indica una correcta retención y elución de los analitos del *RAM*. Hay que indicar que solo se calcularon las recuperaciones para los estudios “b” y “c” de la Figura 5.32, ya que, en el estudio “a” se obtuvieron malos perfiles de los picos electroforéticos, siendo imposible su integración.

A la vista de los resultados obtenidos el caudal de carga utilizado en estudios posteriores fue de  $0.25 \text{ mL min}^{-1}$  con un tiempo de duración del proceso de 2 minutos.

Si bien los resultados obtenidos en este estudio son muy satisfactorios, no hay que olvidar que el estudio se realizó con patrones acuosos, por lo que es de esperar que las recuperaciones no sean tan favorables en el momento en el que se analicen muestras de orina.

⇒ **Etapa (c). Elución del RAM y recogida de la muestra (controlada por la bomba B).**

Una vez comprobada la adecuada retención de los nucleósidos en el dispositivo RAM, se estudió la posibilidad de optimizar el proceso de elución modificando el caudal de la bomba B, implicada en esta etapa (c) “Elución del RAM y recogida de la muestra”. La fase móvil impulsada por esta bomba B es una disolución ACN:BGE 3 mM 70:30 (v/v) empleada para la elución de estos compuestos.

Se estudiará el caudal de la etapa de elución para valores de 0.25 y 0.50 mL min<sup>-1</sup>, manteniendo el caudal de carga en el valor optimizado previamente, 0.25 mL min<sup>-1</sup> (bomba A).

La recogida de la muestra eluida se lleva a cabo en fracciones de 1 minuto, por lo que, hay que tener en cuenta que al disminuir el caudal se deberá aumentar el tiempo de duración de la etapa, puesto que disminuye también el volumen de cada fracción recogida. Para un caudal de 0.25 mL min<sup>-1</sup> en total se recogen 6 minutos, 250 µL por cada minuto de elución.

En la Figura 5.33 se muestran los resultados obtenidos para el estudio del caudal de elución de 0.25 mL min<sup>-1</sup>. En estos electroferogramas se confirman los resultados obtenidos anteriormente ya que el registro de la muestra percolada, recogida durante la etapa (b) de “Inyección en el RAM y limpieza”, no presenta señales de los analitos de interés, por lo que se verifica la retención de los analitos en el material de acceso restringido. Con respecto a la elución, únicamente se representan los TIE correspondientes a las tres primeras fracciones recogidas porque las fracciones recogidas durante los restantes 3 minutos ya no presentan ninguna señal apreciable.

Como se muestra en la Figura 5.33 los analitos de interés se eluyen principalmente en las dos primeras fracciones, es decir, teniendo en cuenta el flujo de la bomba B, los analitos eluyen en un volumen de 500 µL. Con respecto a la morfología de los picos electroforéticos, los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas para los caudales de la etapa de elución estudiados, 0.25 o 0.50 mL min<sup>-1</sup>, siendo la morfología de los picos semejante.

Calculando el porcentaje de señal obtenida en los dos primeros minutos de elución, todos los analitos muestran el mismo comportamiento: en el primer minuto de elución se obtiene aproximadamente entre un 75 y un 80% de la señal total,

mientras que, en el segundo minuto de recogida se obtiene entre un 20 y un 25% de la señal.

Estos resultados ponen de manifiesto que el caudal de la bomba B no es un aspecto crítico del análisis, ya que, dependiendo del valor empleado se ajustará el tiempo de recogida para obtener una óptima recuperación de los analitos.

En estudios posteriores se adoptará, como caudal óptimo de la bomba B encargada de la etapa de elución, un valor de  $0.50 \text{ mL min}^{-1}$  para así acortar el tiempo de recogida de la muestra a 1 minuto.

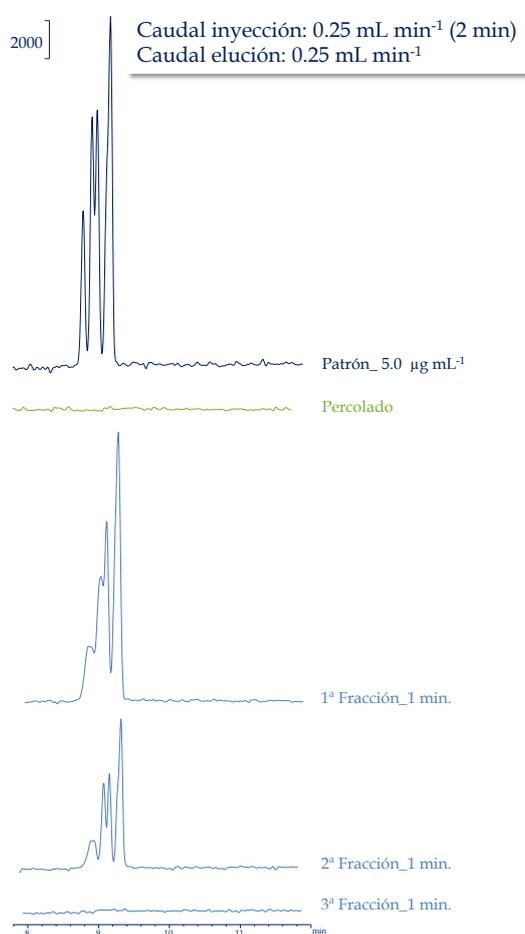


Figura 5.33. Electroferogramas de ion total obtenidos en el estudio del caudal de la bomba B encargada de la elución de los analitos del RAM, etapa (c).

### Aplicación al análisis de muestras de orina.

Una vez estudiadas las condiciones adecuadas para la inyección y elución de la muestra en el dispositivo *RAM*, el siguiente paso fue su aplicación al análisis de muestras de orina. Esto tenía como objetivo verificar si los resultados obtenidos con patrones acuosos presentaban diferencias significativas con los obtenidos con una matriz compleja como es la orina.

Por ello, a partir de este momento, todos los estudios de optimización se realizan con una misma muestra de orina de un donante sano, diluida en una proporción 1:1 (v/v) con agua *UHQ*.

### Inyección de muestras de orina. Estudio del volumen y del tiempo de lavado.

Para poder estudiar la influencia del volumen de orina inyectado en el dispositivo *RAM* se acopló, a la configuración instrumental descrita, un bucle de muestra de una capacidad máxima de 1500  $\mu\text{L}$ , controlado por el inyector automático de un equipo de *HPLC*. De esta manera se pueden cargar distintos volúmenes de muestra en la etapa (a) sin necesidad de reemplazar el bucle de inyección utilizado. Los volúmenes de orina ensayados fueron 500, 1000 y 1500  $\mu\text{L}$ .

El primero de los estudios realizados corresponde a un volumen de orina de 500  $\mu\text{L}$ . Debido a que el bucle tiene una capacidad total de 1500  $\mu\text{L}$  se tuvieron que ajustar los tiempos de duración de la etapa (b), “Inyección en el *RAM* y limpieza”. Los tiempos de la etapa (b) ensayados fueron 12, 18 y 24 minutos, con un caudal de la bomba A de 0.25  $\text{mL min}^{-1}$ . La fase móvil impulsada por la bomba A (agua *UHQ*) además de impulsar la muestra inyectada, actúa como disolvente de lavado durante el tiempo prefijado, eliminando los componentes de la matriz no retenidos en el *RAM*, para lo cual, se calcula un volumen de dos, tres y cuatro veces el volumen del bucle de muestra.

La etapa (c) “Elución del *RAM* y recogida de muestra” se lleva a cabo mediante la bomba B, ACN:*BGE* 3mM 70:30 (v/v), con un caudal de 0.50  $\text{mL min}^{-1}$ . Se recoge el primer minuto de elución que corresponde a un volumen de muestra de 500  $\mu\text{L}$ . Las muestras recogidas se separaron en dos alícuotas: una alícuota se dopó con el patrón interno,  $^{13}\text{C}_{10}$   $^{15}\text{N}_5$ -AMP, a un nivel de concentración de 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y se inyectó de forma directa en el equipo *CE-MS* por triplicado. La otra alícuota se dopó con los analitos de interés, incluido el patrón interno, a una concentración de 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Esto se lleva a cabo con objeto de verificar la señal

analítica del compuesto de interés, debido a la baja concentración de estos analitos en orina de donantes sanos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.34.

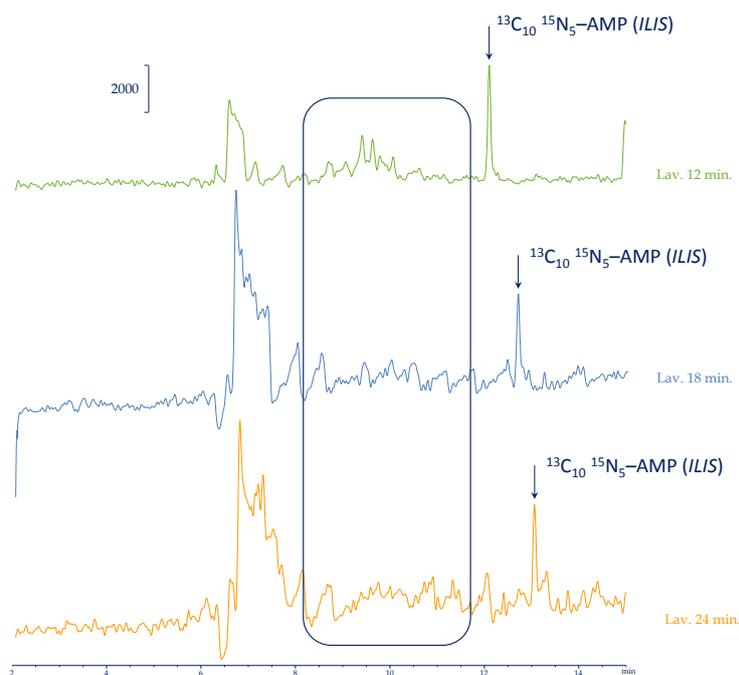


Figura 5.34. Electroferogramas de ion total obtenidos para un volumen de orina diluida 1:1 (v/v) de 500  $\mu$ L con distintos tiempos de duración en la etapa (b) de “Inyección en el RAM y limpieza”.

En los electroferogramas que se muestran en la figura se observa que a medida que aumenta el tiempo de lavado de la etapa (b), “Inyección en el RAM y limpieza”, se produce una pérdida de las señales de los analitos de interés. Por tanto, podría decirse que a volúmenes de lavado grandes los analitos acaban por ser arrastrados del RAM por el medio acuoso empleado en la etapa de lavado. Seguramente el tiempo de 12 minutos de la etapa de lavado parece ser el valor máximo para un volumen de 500  $\mu$ L de orina.

El siguiente volumen de muestra estudiado fue 1000  $\mu\text{L}$ . La metodología empleada fue la misma que la descrita para un volumen de 500  $\mu\text{L}$  por lo que se estudiaron los mismos tiempos de la etapa de lavado.

Los resultados obtenidos, Figura 5.35, mostraron que aunque se aumentase el volumen de orina inyectada al doble, las señales analíticas obtenidas no sufrían ese mismo aumento. Al contrario, en la mayoría de los casos se obtuvo una respuesta analítica muy similar para los dos volúmenes de muestra estudiados.

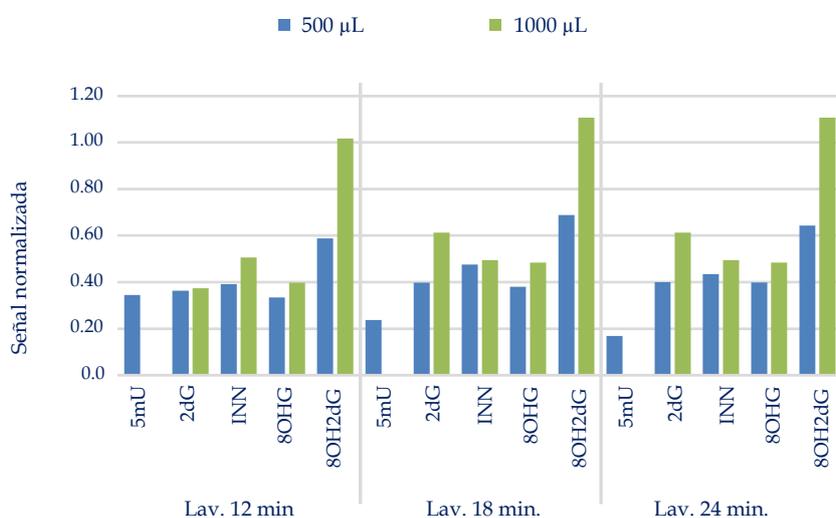


Figura 5.35. Influencia del tiempo de lavado del RAM, etapa (b), en las señales obtenidas para distintos volúmenes de orina inyectados.

Por último, se estudió el volumen de muestra de 1500  $\mu\text{L}$ . La metodología fue la misma que la empleada para los dos volúmenes de muestra anteriores y se estudiaron los mismos tiempos de lavado, 12, 18 y 24 minutos.

Tampoco en este caso se obtuvieron los resultados esperados. Como se ha señalado anteriormente, al aumentar el volumen de orina inyectada en el *RAM* no solo no se observa el esperado aumento en las señales electroforéticas sino que aumentan notablemente las interferencias en la muestra eluida. En la Figura 5.36 se representan los electroferogramas de ion total obtenidos para los volúmenes de muestra inyectados en el *RAM*, de 500 y 1500  $\mu\text{L}$ , con el mismo tiempo de lavado, 12 minutos. En estos registros se pone de manifiesto que la detección llega a ser imposible en las muestras sin dopar, dado que los picos electroforéticos quedaban ocultos en el ruido de fondo de la propia matriz.

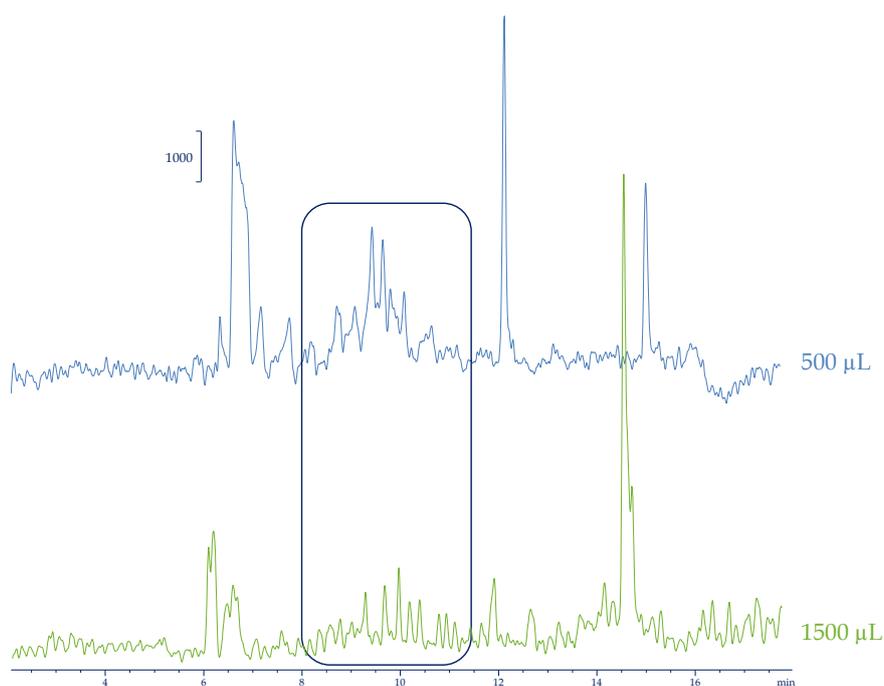


Figura 5.36. Electroferogramas de ion total obtenidos para volúmenes de 500 y 1500  $\mu\text{L}$  de orina diluida 1:1 (v/v) con el mismo tiempo de duración de la etapa (b), “Inyección en el *RAM* y limpieza”, 12 minutos.

A la vista de los resultados obtenidos se decidió utilizar, como volumen de orina, un volumen de 500  $\mu\text{L}$ , ya que se comprueba que un aumento del volumen inyectado no mejora la sensibilidad obtenida. Se consideró conveniente cambiar el bucle de 1500  $\mu\text{L}$  por uno que se ajustase al volumen exacto de muestra inyectada, por lo que se sustituyó nuevamente el bucle de muestra de 1500  $\mu\text{L}$  por un bucle fijo de 500  $\mu\text{L}$ .

Con respecto al tiempo de duración de la etapa (b) “Inyección en el *RAM* y limpieza” se trabajará con un tiempo de 12 minutos.

#### Estudio de la etapa de “Elución del *RAM* y recogida de la muestra”, etapa (c).

Debido a los problemas surgidos por la introducción de una matriz compleja como es la orina, donde los registros obtenidos mostraban un elevado número de interferentes que dificultan notablemente la detección de los analitos de interés, se planteó la necesidad de optimizar nuevamente el proceso de elución, etapa (c).

El intento de aumentar la duración de la etapa (b) para mejorar así el lavado del dispositivo *RAM* no resultó satisfactorio, ya que se producía una pérdida de analitos a tiempos elevados.

En este caso se planteó llegar a una solución de compromiso entre la posible pérdida de los analitos en la etapa (b) o la obtención de una muestra eluida en la etapa (c), con un gran número de sustancias interferentes, que dificulten la ionización de los analitos de interés en la fuente de electrospray, provocando una disminución de la señal analítica.

La metodología empleada implica:

- ⇒ Etapa (a): 500  $\mu\text{L}$  de orina diluida 1:1 (v/v) dopada a un nivel de concentración de 1.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .
- ⇒ Etapa (b): agua *UHQ*, 12 minutos de duración (bomba A, caudal de 0.25  $\text{mL min}^{-1}$ ).
- ⇒ Etapa (c): ACN:*BGE* 3 mM 70:30 (v/v), con un tiempo de elución de 4 minutos (bomba B, caudal de 0.50  $\text{mL min}^{-1}$ ).

La recogida de muestra se llevó a cabo cada 30 segundos, por lo que teniendo en cuenta el caudal de la bomba B, responsable de la elución de los analitos del *RAM*, se obtuvieron fracciones eluidas de 250  $\mu$ L.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.37. En la parte izquierda de la figura se recogen los registros obtenidos en el detector de diodos *DAD* ( $\lambda = 254$  nm) y en la parte derecha las señales obtenidas del ion extraído de uno de los analitos en estudio, 8OHG, de las distintas fracciones de 30 segundos recogidas en la etapa (c). Se recogieron 4 fracciones, aunque la última no se muestra en la figura debido a que es similar a las fracciones segunda y tercera y no aporta ninguna información. En ambos registros se observa que los analitos son eluidos en la primera fracción de 30 segundos de la etapa (c) y que en las posteriores fracciones recogidas de 30 segundos no aparece ninguna señal de los analitos de interés.

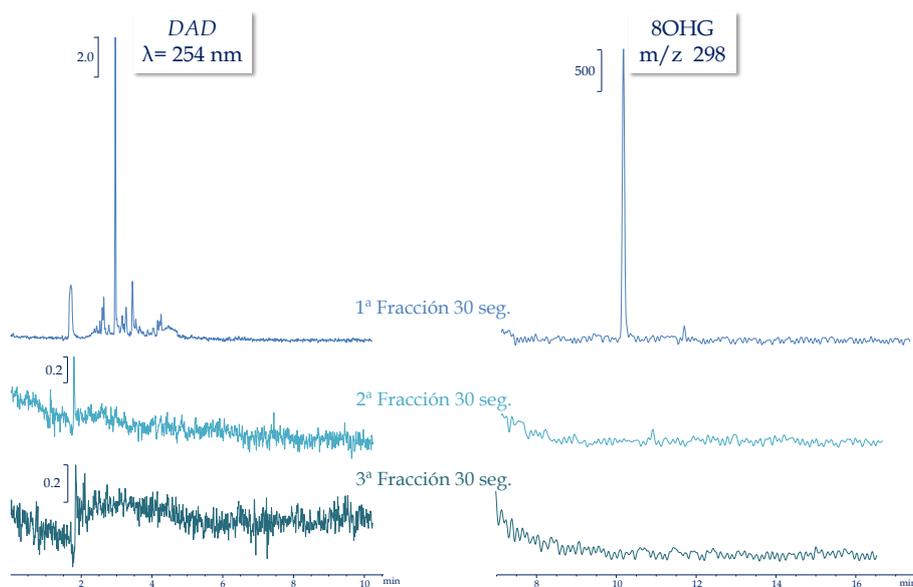


Figura 5.37. Señales del detector de diodo array (izquierda) y del ion extraído del analito 8OHG (derecha), para una muestra de orina diluida 1:1 (v/v) dopada y sometida a una etapa de limpieza con *RAM* e inyectada en *CE-MS*. Las fracciones eluidas se recogieron en intervalos de 30 segundos.

A la vista de los resultados obtenidos se elige como tiempo óptimo de recogida de muestra un tiempo de 30 segundos, manteniendo la bomba B, que controla la etapa de elución, a un caudal de 0.50 mL min<sup>-1</sup>.

Estudio de la precisión del método optimizado.

Para evaluar la precisión del método se prepararon 8 muestras de una orina de un donante sano diluida en una proporción 1:1 (v/v) y dopada a un nivel de concentración de 1.0 µg mL<sup>-1</sup>. Estas 8 muestras fueron sometidas a una etapa de limpieza con el RAM, siguiendo la metodología que se muestra en la Figura 5.30. Se inyecta un volumen de muestra de 500 µL, la duración de la etapa de “Inyección en el RAM y limpieza” fue de 12 minutos y la última etapa “Elución del RAM y recogida de la muestra” se llevó a cabo durante 4 minutos pero se recogió la fracción correspondiente a los primeros 30 segundos de la etapa (250 µL). Una vez que se han recogido las 8 muestras, antes de inyectarlas en el equipo CE-MS por duplicado, se doparon con patrón interno (ILIS), <sup>13</sup>C<sub>10</sub> <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-AMP, concentración 0.5 µg mL<sup>-1</sup>.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.11.

Tabla 5.11. Parámetros estadísticos del procedimiento RAM optimizado para un volumen de muestra inyectado de 500 µL, una duración de la etapa de “Inyección y limpieza” de 12 minutos y una etapa de “Elución y recogida de muestra” de 4 minutos. La muestra eluida se recogió en los primeros 30 segundos de la etapa (250 µL).

Analito	Varianza	Desv. Est.	Media*	RSD <sup>a</sup> (%)
5mU	0.0026	0.051	0.372	14
2dG	0.0050	0.071	0.558	13
INN	0.0018	0.042	0.191	22
8OHG	0.0035	0.059	0.323	18
8OH2dG	0.0162	0.127	0.814	16

\*. Referida al valor medio de las áreas de pico normalizadas con respecto al patrón interno (A/A<sub>ILIS</sub>).

a. RSD: Desviación estándar relativa (n=8) para un nivel de concentración de 1.0 µg mL<sup>-1</sup>.

Un aspecto adicional a considerar en sistemas acoplados *CE-MS* es la estabilidad de la intensidad de corriente necesaria para el correcto funcionamiento del sistema. Este problema se presentó en este momento, cuando se inyectaron de forma consecutiva un elevado número de muestras de orina procedentes del dispositivo *RAM*, es decir, eluidas en un medio *ACN:BGE* 3 mM 70:30 (v/v). Se observó que, en estos casos, se producía un rápido deterioro del capilar con una pérdida notoria de eficiencia y con frecuentes caídas de corriente que impedían el análisis.

Debido a que el medio de elución del *RAM* contiene un elevado porcentaje de acetonitrilo esta podría ser la causa de las constantes caídas de corriente. Para comprobarlo se registró la corriente generada al inyectar una disolución patrón en ese mismo medio, observándose que la presencia de acetonitrilo en la muestra inyectada producía una caída muy pronunciada de la corriente en el momento en que el bolo de muestra alcanzaba el detector *MS*. Este efecto puede comprobarse en la Figura 5.38. Cuando estas caídas de corriente se hacen irrecuperables el circuito electroforético se interrumpe y el análisis se cancela.

Por ello se planteó la necesidad de inyectar las muestras en el equipo de *CE-MS* en un medio que no contenga *ACN*. La solución adoptada fue la evaporación de la muestra eluida del *RAM* y su posterior redisolución en un medio más adecuado para la inyección en *CE-MS*.

En la Figura 5.38 se puede observar el registro de las fluctuaciones en la corriente sufridas durante el análisis por *CE-MS* de una muestra patrón de los analitos ( $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) disuelta en distintos medios, medio *BGE* de separación 30 mM (pH 11.0), medio *ACN:BGE* 30 mM 70:30 (v/v) y medio *ACN:BGE* 3 mM 70:30 (v/v). Se observa como en ausencia de *ACN* la corriente se mantiene estable.

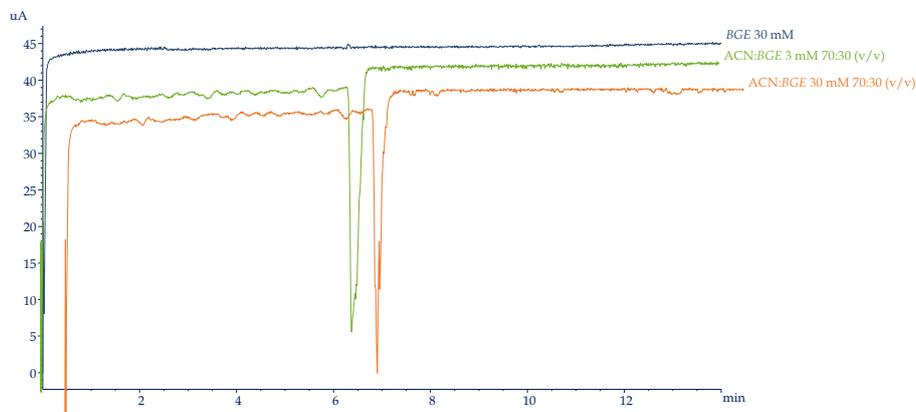


Figura 5.38. Variación de la intensidad de corriente para diferentes medios de inyección.

#### Estudio del medio de reconstitución.

Debido a la necesidad de incluir el paso de evaporación de la muestra procedente del *RAM*, se llevó a cabo un pequeño estudio del medio más adecuado para reconstituir la muestra antes de su inyección en *CE-MS*.

El estudio se llevó a cabo con una muestra de orina, sometida al procedimiento *RAM* ya indicado, con una elución con ACN:*BGE* 3mM 70:30 (v/v) durante 4 minutos. La fracción recogida se evapora a sequedad a 30°C y se reconstituyó en dos medios, *BGE* de separación 30 mM y *BGE* 3 mM. Los mejores resultados se obtuvieron en medio *BGE* 30 mM de pH 11.0. En este medio no se producían caídas de corriente, por lo que en estudios posteriores se utilizó este medio para reconstituir las muestras evaporadas antes de su inyección en *CE-MS*.

Además, debido a que el medio de reconstitución utilizado contiene ya las mismas sales que el medio electroforético, se decidió eliminar este compuesto del medio de elución del *RAM*. Por ello, las muestras al no ser inyectadas directamente, pueden ser eluidas del *RAM* en un medio libre de sales, que a partir de ahora será una mezcla ACN:agua *UHQ* 70:30 (v/v).

Los electroferogramas obtenidos para dos de los analitos de interés, 8OHG y 8OH2dG, se muestran en la Figura 5.39 donde se compara la elución en presencia y en ausencia de *BGE*.

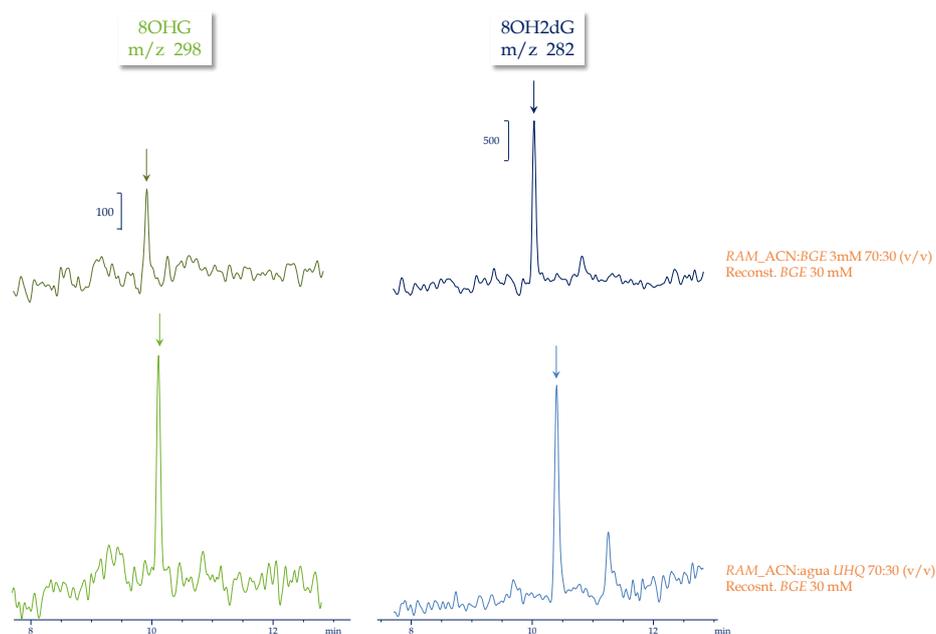


Figura 5.39. Electroferogramas de ion extraído para los analitos, 8OHG y 8OH2dG, tras la etapa (c) de “Elución del *RAM* y recogida de la muestra” con distintos medios.

Como se observa en la Figura 5.39 las mejores condiciones se obtienen en ausencia de *BGE* en el medio de elución de la muestra, por lo que será el medio elegido para la etapa (c) en estudios posteriores.

Reproducibilidad obtenida con la metodología RAM desarrollada con una etapa posterior de evaporación.

El estudio de la reproducibilidad se llevó a cabo analizando 6 alícuotas de una muestra de orina de un donante sano, diluida en proporción 1:1 (v/v) y dopada con los analitos de interés en una concentración de  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , analizadas según el procedimiento optimizado. Las fracciones eluidas, una vez evaporadas y reconstituidas, son inyectadas por triplicado en el equipo CE-MS. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.12.

Los valores de *RSD* (%) están comprendidos entre 6 y 28%, datos considerados aceptables si se tiene en cuenta toda la metodología empleada que incluye una etapa de limpieza *off-line* y una etapa de evaporación y reconstitución antes de la inyección en el equipo de electroforesis capilar.

Tabla 5.12. Parámetros estadísticos del procedimiento RAM con una etapa posterior de evaporación. Volumen de muestra inyectada de 500  $\mu\text{L}$ , una duración de la etapa de “Inyección y limpieza” de 12 minutos y una etapa de “Elución y recogida de muestra” de 4 minutos. La muestra analizada fue la fracción recogida en los primeros 30 segundos de la etapa de elución (250  $\mu\text{L}$ ) y fue sometida a un proceso de evaporación y redisolución del residuo seco en 250  $\mu\text{L}$  de BGE 30 mM.

Analito	Varianza	Desv. Est.	Media*	RSD <sup>a</sup> (%)
5mU	0.00184	0.043	0.268	16
2dG	0.00084	0.029	0.528	6
INN	0.00008	0.009	0.032	28
8OHG	0.00005	0.007	0.057	12
8OH2dG	0.0045	0.067	0.559	12

\*. Referida al valor medio de las áreas de pico normalizadas con respecto al patrón interno ( $A/A_{\text{ILIS}}$ ).

<sup>a</sup>. *RSD*: Desviación estándar relativa (n=6) para un nivel de concentración de  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Nueva optimización de la etapa (b). Estudio del tiempo de “Inyección en el RAM y limpieza”.

Debido a la incorporación de la etapa de evaporación tras la elución de los analitos del RAM, se consideró oportuno volver a estudiar el tiempo de duración de la etapa (b) de “Inyección en el RAM y limpieza”. Se considera ahora la posibilidad de reducir el tiempo de duración de esta etapa, 12 minutos. Los tiempos estudiados fueron 4, 6, 8 y 10 segundos.

El estudio se llevó a cabo con una muestra de orina diluida 1:1 (v/v), dopada con los analitos de interés en una concentración de  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  y el volumen de muestra inyectada fue  $500 \mu\text{L}$ . La muestra eluida (30 segundos,  $250 \mu\text{L}$ ) sufre un proceso de evaporación y de reconstitución en el mismo volumen de BGE de separación, 30 mM (pH 11.0) dopado con el patrón interno,  $^{13}\text{C}_{10} \text{ }^{15}\text{N}_5\text{-AMP}$ , a un nivel de concentración de  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

En las Tablas 5.13 y 5.14 se muestran los valores de señal normalizada y los valores de RSD (%), respectivamente, obtenidos para los distintos tiempos empleados en la etapa (b). Como se puede observar los mejores resultados se obtienen para el tiempo de 4 minutos, lo que nos confirma que el tiempo empleado de 12 minutos era un tiempo excesivamente elevado para la etapa (b) y que llegaba a producirse el arrastre de los analitos de interés durante esta etapa.

Tabla 5.13. Señal normalizada (%) obtenida para los distintos tiempos de la etapa “Inyección en el RAM y limpieza” estudiados.

Analito	Señal normalizada (%)				
	4 min.	6 min.	8 min.	10 min.	12 min.
5mU	70	40	30	25	22
2dG	77	36	54	49	39
INN	51	41	30	26	9
8OHG	60	45	30	27	10
8OH2dG	69	40	33	29	20

Tabla 5.14. Valores de *RSD* (%) obtenidos para los tiempos de 4, 8 y 12 minutos.

Analito	<i>RSD</i> <sup>a</sup> (%)		
	4 min.	8 min.	12 min.
5mU	11	15	16
2dG	6	9	10
INN	23	20	60
8OHG	5	11	23
8OH2dG	5	7	10

<sup>a</sup>. *RSD*: Desviación estándar relativa (n=6) para un nivel de concentración de 0.5 µg mL<sup>-1</sup>.

A la vista de los resultados recogidos en las tablas anteriores se considera como tiempo óptimo de la etapa (b), “Inyección en el *RAM* y limpieza”, 4 minutos, por lo que será el tiempo empleado en estudios sucesivos.

#### Características analíticas del método *RAM/CE-MS*.

Una vez que se ha llevado a cabo la optimización de la metodología empleada, basada en un material de acceso restringido, *RAM*, se realizó un calibrado para obtener las características analíticas del método utilizando los parámetros optimizados a lo largo de este apartado y que se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 5.15. Condiciones optimizadas para el procedimiento RAM en muestras de orina.

Etapa (a): “Carga bucle de muestra”	Volumen de muestra 1:1 (v/v): 500 $\mu$ L
Etapa (b): “Inyección en el RAM y limpieza”	Bomba A: agua UHQ caudal: 0.25 mL min <sup>-1</sup> tiempo: 4 minutos
Etapa (c): “Elución del RAM y recogida de la muestra”	Bomba B: ACN:agua UHQ 70:30 (v/v) caudal: 0.50 mL min <sup>-1</sup> tiempo: 4 minutos tiempo y volumen de recogida: 30 segundos, 250 $\mu$ L

Una vez que se obtienen las fracciones eluidas, estas son evaporadas en un dispositivo de evaporación/concentración de muestras a una temperatura de 30 °C con una corriente de N<sub>2</sub>. El residuo seco obtenido se redisuelve en 250  $\mu$ L de BGE 30 mM dopado con el *ILIS*, <sup>13</sup>C<sub>10</sub> <sup>15</sup>N<sub>5</sub>-AMP (0.5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>).

La inyección de las muestras en el equipo CE-MS fue de tipo hidrodinámica mediante una presión de 50 mbar durante 10 segundos. El tampón de separación (BGE) optimizado fue un tampón formiato amónico-amoniaco en una concentración de 30 mM (pH 11.0) y el voltaje aplicado fue de 30 kV. Con respecto a los parámetros que afectan a la detección ESI-MS, se trabajó en modo negativo, con un voltaje de -3500 V y una presión constante del gas de nebulización de 6 psi. La toma de datos se realizó en modo SIM, registrando el ion [M-H]<sup>-</sup> de cada uno de los analitos de interés.

Las muestras analizadas fueron muestras de orina, diluidas en una proporción 1:1 (v/v) y dopadas con los cinco nucleósidos en un margen de concentración entre 0.05–0.75  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>.

En la Tabla 5.16 se encuentran recogidos los parámetros del análisis de regresión, señal analítica frente a concentración expresada en  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Los valores encontrados para los límites de detección están comprendidos entre 0.06 y  $0.18 \mu\text{g mL}^{-1}$  para los compuestos 8OHG y 2dG, respectivamente.

Para el estudio de la reproducibilidad se prepararon seis muestras de la misma orina diluida 1:1 (v/v) y dopada a una concentración de  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Se analizaron por triplicado utilizando las mismas condiciones en las que se realizó el calibrado.

Tabla 5.16. Características del calibrado realizado para una muestra de orina diluida 1:1 (v/v) dopada con los analitos de interés. Intervalo de concentraciones de  $0.05$  a  $0.75 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Analito	Pendiente ( $\times 10^4 \text{ mL } \mu\text{g}^{-1}$ )	Ordenada en el origen ( $\times 10^3$ )	R <sup>2</sup>	LOD <sup>a</sup> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	RSD <sup>b</sup> (%)
5mU	$0.98 \pm 0.09$	$1.07 \pm 0.29$	0.991	0.12	11
2dG	$1.36 \pm 0.18$	$3.74 \pm 0.60$	0.981	0.18	6
INN	$1.04 \pm 0.11$	$1.78 \pm 0.41$	0.986	0.17	17
8OHG	$0.92 \pm 0.04$	$0.28 \pm 0.13$	0.998	0.06	5
8OH2dG	$1.52 \pm 0.10$	$-0.08 \pm 0.35$	0.996	0.08	8

<sup>a</sup>. LOD: Límite de detección según la ICH.

<sup>b</sup>. RSD: Desviación estándar relativa (n=6) para un nivel de concentración de  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

## 5.5. APLICACIÓN DEL MÉTODO *RAM/CE-MS* AL ESTUDIO DE METABOLITOS ASOCIADOS AL CONSUMO DE TABACO EN MUESTRAS DE ORINA.

Una vez que se ha llevado a cabo la optimización del método de limpieza con el material de acceso restringido, se propone su aplicación al análisis de muestras de orina con el fin de cuantificar los analitos en estudio y así poder llegar a determinar sus niveles naturales en orinas de individuos sanos.

El objetivo es comprobar la aplicabilidad de la metodología desarrollada para la evaluación de estos compuestos endógenos de interés clínico. Es bien conocido que los niveles de estos compuestos en orina aumentan de forma anómala bajo ciertas patologías graves como el cáncer o procesos neurodegenerativos, de forma que estos compuestos presentan un gran interés clínico como potenciales biomarcadores de estas enfermedades y especialmente para la detección precoz de ciertos tipos de cáncer.

El estudio se centra en establecer la posible relación entre los niveles en orina de estos nucleósidos modificados y el consumo de tabaco en individuos sanos. Se seleccionan individuos sanos para evitar la influencia de posibles enfermedades en los niveles de estos metabolitos y poder así establecer el efecto concreto de este hábito. Así se podría determinar si el consumo de tabaco influye en el contenido de estos nucleósidos en orina.

En este apartado se analizarán 42 muestras de orina procedentes de individuos sanos, 21 de fumadores y 21 de no fumadores. Los voluntarios se seleccionaron teniendo en cuenta que tanto la edad como la relación entre hombres y mujeres fuera similar en ambos grupos. Una descripción pormenorizada de las muestras analizadas se recoge en el Capítulo III.

Se sometió a las 42 muestras de orina de donantes sanos a la etapa de limpieza con el *RAM*. Posteriormente fueron evaporadas, reconstituidas en 250  $\mu\text{L}$  de *BGE* 30 mM y se les adicionó el *ILIS* a un nivel de concentración de 1.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Una vez reconstituidas las 42 muestras se analizaron mediante *CE-MS*.

En la Figura 5.40 se muestran los electroferogramas de ion extraído para dos muestras de orina, una de fumador y otra de no fumador.

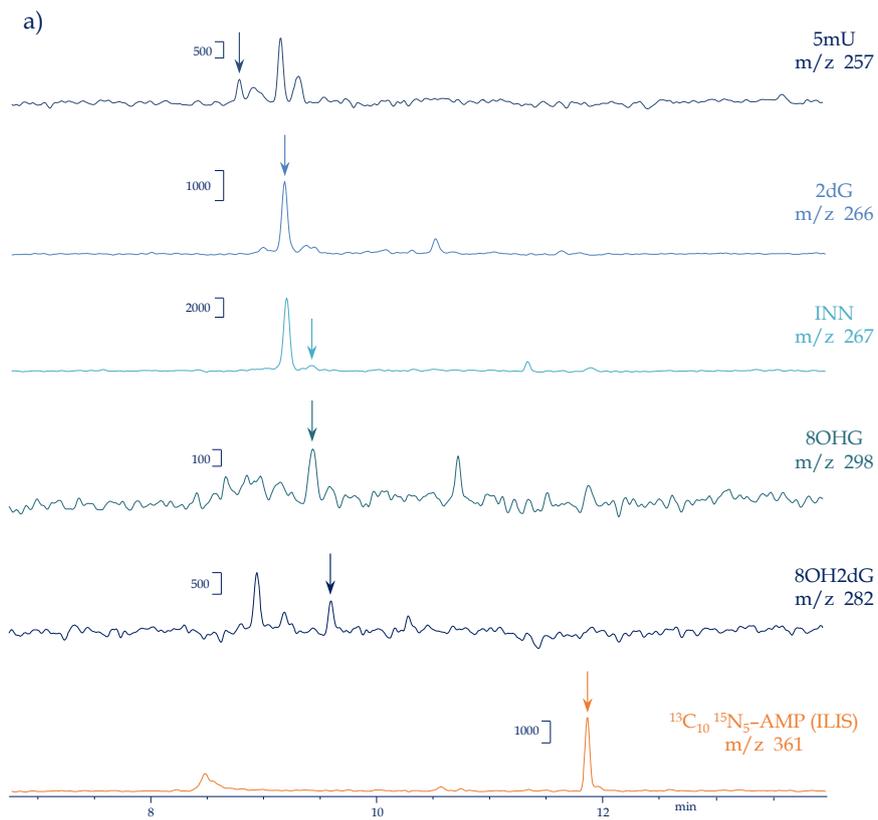


Figura 5.40. Electroferogramas de ion extraído para muestras de orina de donantes sanos (a) fumador y (b) no fumador, sometidas a una etapa de limpieza mediante RAM y analizadas por CE-MS.

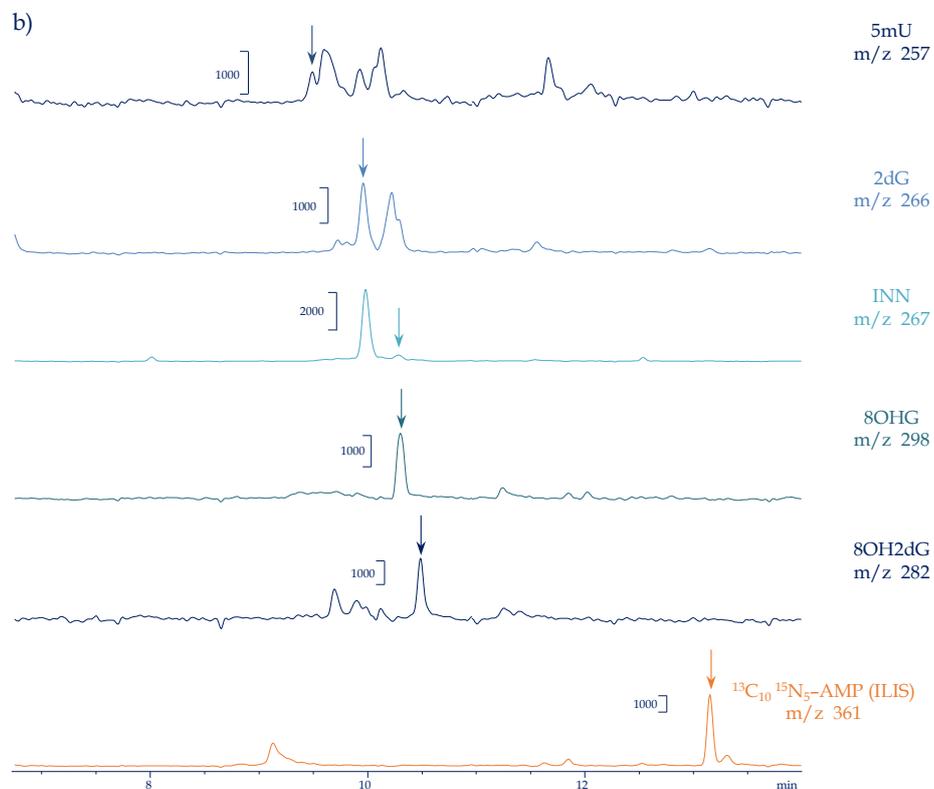


Figura 5.40 (Continuación). Electroferogramas de ion extraído para muestras de orina de donantes sanos (a) fumador y (b) no fumador, sometidas a una etapa de limpieza mediante *RAM* y analizadas por *CE-MS*.

Las señales obtenidas, una vez normalizadas respecto al patrón interno, son comparadas con un patrón inyectado al inicio de cada secuencia, mezcla de los nucleósidos en estudio disueltos en *BGE* de separación 30 mM (pH 11.0) a un nivel de concentración de 5.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Una vez obtenidas las concentraciones de los nucleósidos en la orina, en unidades de  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , se llevó a cabo la normalización con respecto al contenido en creatinina. Los resultados obtenidos, expresados en unidades de nmol/ $\mu\text{mol}$  de creatinina, se muestran en las Tablas 5.17 y 5.18.

Tabla 5.17. Concentración, nmol/ $\mu$ mol de creatinina, de las 21 muestras de orina de no fumadores sometidas a la metodología optimizada R-AM/CE-MS.

Muestra	5mU	2dG	INN	8OHG	8OH2dG
NF_01	0.20 $\pm$ 0.07	0.17 $\pm$ 0.02	0.033 $\pm$ 0.003	0.06 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.01
NF_02	0.08 $\pm$ 0.03	0.11 $\pm$ 0.01	0.058 $\pm$ 0.003	0.06 $\pm$ 0.01	0.025 $\pm$ 0.004
NF_03	0.10 $\pm$ 0.03	0.20 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.01	<LD	<LD
NF_04	0.18 $\pm$ 0.04	0.30 $\pm$ 0.01	0.038 $\pm$ 0.002	0.011 $\pm$ 0.005	0.07 $\pm$ 0.02
NF_05	<LD	0.18 $\pm$ 0.03	<LD	0.03 $\pm$ 0.01	<LD
NF_06	<LD	0.09 $\pm$ 0.02	0.07 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01	<LD
NF_07	0.18 $\pm$ 0.03	0.10 $\pm$ 0.01	<LD	<LD	0.21 $\pm$ 0.04
NF_08	0.21 $\pm$ 0.04	0.06 $\pm$ 0.02	0.043 $\pm$ 0.003	0.16 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.01
NF_09	0.34 $\pm$ 0.08	0.03 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.03	<LD
NF_10	<LD	0.010 $\pm$ 0.006	0.25 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01	<LD
NF_11	<LD	0.16 $\pm$ 0.04	0.07 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.05	<LD
NF_12	0.06 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.03	0.066 $\pm$ 0.003	<LD	0.15 $\pm$ 0.04
NF_13	0.03 $\pm$ 0.01	0.010 $\pm$ 0.005	0.051 $\pm$ 0.003	0.28 $\pm$ 0.07	<LD
NF_14	0.011 $\pm$ 0.005	0.030 $\pm$ 0.006	0.023 $\pm$ 0.001	<LD	0.06 $\pm$ 0.01
NF_15	0.013 $\pm$ 0.005	0.09 $\pm$ 0.03	<LD	0.02 $\pm$ 0.01	<LD
NF_16	0.03 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.01	0.013 $\pm$ 0.001	0.06 $\pm$ 0.02	0.020 $\pm$ 0.003
NF_17	0.014 $\pm$ 0.005	0.053 $\pm$ 0.005	<LD	0.012 $\pm$ 0.004	0.10 $\pm$ 0.01
NF_18	<LD	0.06 $\pm$ 0.01	<LD	0.010 $\pm$ 0.004	<LD
NF_19	0.02 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.02	0.032 $\pm$ 0.001	0.012 $\pm$ 0.009	<LD
NF_20	<LD	<LD	<LD	0.07 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.01
NF_21	<LD	0.10 $\pm$ 0.01	0.010 $\pm$ 0.002	0.020 $\pm$ 0.006	0.090 $\pm$ 0.005

Tabla 5.18. Concentración, nmol/ $\mu$ mol de creatinina, de las 21 muestras de orina de fumadores sometidas a la metodología optimizada R-AM/CE-MS.

Muestra	5mU	2dG	INN	8OHG	8OH2dG
F_01	0.13 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01
F_02	0.21 $\pm$ 0.08	0.18 $\pm$ 0.02	<LD	0.08 $\pm$ 0.02	<LD
F_03	0.21 $\pm$ 0.09	0.33 $\pm$ 0.03	0.13 $\pm$ 0.03	0.15 $\pm$ 0.03	<LD
F_04	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
F_05	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
F_06	0.018 $\pm$ 0.003	0.08 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01	<LD
F_07	0.10 $\pm$ 0.01	0.19 $\pm$ 0.03	0.059 $\pm$ 0.002	0.23 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0.01
F_08	0.13 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.01	<LD	0.19 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.06
F_09	0.091 $\pm$ 0.003	0.21 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.03	0.071 $\pm$ 0.0005
F_10	0.83 $\pm$ 0.22	0.37 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.01	<LD
F_11	0.053 $\pm$ 0.005	0.21 $\pm$ 0.08	0.04 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.03	0.13 $\pm$ 0.05
F_12	0.04 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.02	0.02 $\pm$ 0.01	0.096 $\pm$ 0.002	0.10 $\pm$ 0.02
F_13	0.06 $\pm$ 0.05	0.08 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.01	0.59 $\pm$ 0.09	0.36 $\pm$ 0.05
F_14	0.02 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.02	0.02 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01	<LD
F_15	<LD	0.08 $\pm$ 0.02	<LD	<LD	<LD
F_16	0.027 $\pm$ 0.002	0.08 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.03	<LD
F_17	0.03 $\pm$ 0.01	0.084 $\pm$ 0.003	0.06 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.04
F_18	0.08 $\pm$ 0.04	0.08 $\pm$ 0.04	<LD	<LD	<LD
F_19	<LD	0.04 $\pm$ 0.01	<LD	0.15 $\pm$ 0.04	0.09 $\pm$ 0.01
F_20	<LD	0.02 $\pm$ 0.01	0.006 $\pm$ 0.002	0.11 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.02
F_21	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

En la Figura 5.41 se representan los datos obtenidos, en concentración (nmol/ $\mu$ mol de creatinina), mediante un diagrama de cajas (*box-plot*) para cada analito estudiado en las 21 muestras de orina de donantes sanos fumadores y en las 21 muestras de orina de no fumadores.

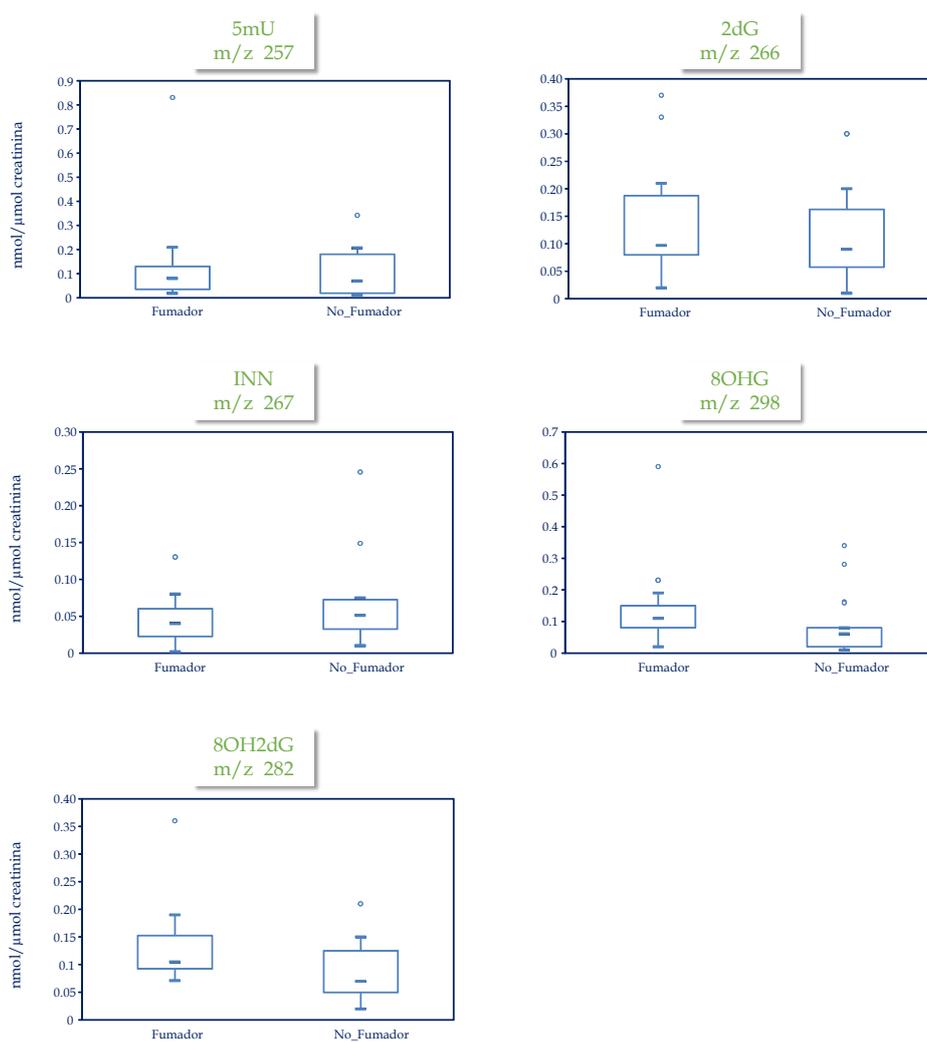


Figura 5.41. Representación de la concentración de cada analito (nmol/ $\mu$ mol de creatinina) para las 42 muestras de orina, fumadores y no fumadores, mediante diagrama de cajas (*box-plot*).

Ya visualmente se puede apreciar que se obtienen concentraciones similares de los nucleósidos estudiados tanto en las muestras de fumadores como en las de no fumadores.

#### Validación mediante LC-MS/MS.

Una vez obtenidas las concentraciones de los nucleósidos en las muestras de orina de los donantes sanos, fumadores y no fumadores, se procedió a validar el método propuesto comparando los resultados obtenidos con una técnica de análisis diferente. La técnica utilizada fue la cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas en tándem, LC-MS/MS.

De forma concreta se utiliza una sola técnica, la cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas en tándem, pero se usan dos metodologías diferentes con distintos mecanismos cromatográficos de separación. Una de las metodologías utilizada se basa en una fase estacionaria de interacciones hidrofílicas de tipo “*zwitterionico*” (ZIC-HILIC) acoplada a un detector de espectrometría de masas en tándem de triple cuadrupolo (QQQ) con una fuente de ionización por electrospray (ESI) trabajando en modo positivo. El sistema cromatográfico lleva incorporado una etapa de tratamiento de muestra mediante la utilización de un material de acceso restringido acoplado *on-line* a la columna cromatográfica. El RAM empleado en esta metodología es de la misma naturaleza que el empleado en la metodología CE-MS propuesta en este trabajo. El método RAM-ZIC-HILIC-MS/MS ha sido previamente validado para la cuantificación de diversos nucleósidos y nucleobases en orina<sup>34</sup> según la Guía Europea de Validación para Métodos Bioanalíticos<sup>166</sup>.

La otra metodología utilizada se basa en un mecanismo de fase inversa C<sub>18</sub>. Se trabaja con una columna cromatográfica empaquetada con partículas superficialmente porosas (de tipo *core-shell*) acoplada a un detector de espectrometría de masas en tándem de triple cuadrupolo (QQQ) con una fuente de ionización por electrospray (ESI) trabajando en modo positivo. En este caso la limpieza de la muestra se lleva a cabo mediante una etapa de extracción en fase sólida (SPE) con un sorbente mixto<sup>170</sup>, preparado por mezcla de sorbentes comerciales con base polimérica *Isolute ENV+*, *Isolute ABN* y *Oasis HLB*.

---

<sup>170</sup> E. Rodríguez-Gonzalo, L. Herrero-Herrero, D. García-Gómez, J. *Chromatogr. B* (2015), “Development, validation and application of a fast analytical methodology for the simultaneous determination of DNA- and RNA-derived urinary nucleosides by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry”. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.10.044>.

La comparación de los resultados se llevó a cabo para las mismas muestras de orina de donantes sanos fumadores. Para los nucleósidos hidroxilados, 8OHG y 8OH2dG, se llevó a cabo la comparación con la metodología *RAM-ZIC-HILIC-MS/MS*<sup>34</sup> y para los otros dos nucleósidos estudiados, 5mU e INN, se utilizó la metodología *SPE/LC-MS/MS*<sup>170</sup>. Solo se compararon estos dos nucleósidos debido a que por la técnica *LC-MS/MS* el nucleósido 2dG no pudo ser detectado.

En la Tabla 5.19 y en la Figura 5.42 (diagrama de cajas, *box-plot*) se recogen las concentraciones de los analitos estudiados por ambas metodologías, *CE-MS* y *LC-MS/MS*, en unidades de nmol/ $\mu$ mol de creatinina.

Tabla 5.19. Concentraciones, en nmol/ $\mu$ mol de creatinina, obtenidas mediante las dos técnicas de análisis, (a) *RAM/CE-MS* y *RAM-ZIC-HILIC-MS/MS* y (b) *RAM/CE-MS* y *SPE/LC-MS/MS*, para orinas de donantes sanos fumadores.

(a)

8OHG (nmol/ $\mu$ mol creatinina)		8OH2dG (nmol/ $\mu$ mol creatinina)	
<i>RAM/CE-MS</i>	<i>RAM-ZIC-HILIC-MS/MS</i>	<i>RAM/CE-MS</i>	<i>RAM-ZIC-HILIC-MS/MS</i>
0.08 $\pm$ 0.01	0.089 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.06	0.154 $\pm$ 0.03
0.08 $\pm$ 0.02	0.07 $\pm$ 0.02	0.071 $\pm$ 0.005	0.062 $\pm$ 0.01
0.15 $\pm$ 0.03	0.147 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.05	0.03 $\pm$ 0.01
0.23 $\pm$ 0.02	0.257 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.01
0.11 $\pm$ 0.03	0.106 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01
0.05 $\pm$ 0.01	0.041 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.02

V. DETERMINACIÓN DE NUCLEÓSIDOS MEDIANTE CE-ESI(-)MS

Tabla 5.19 (Continuación). Concentraciones, en nmol/ $\mu$ mol de creatinina, obtenidas mediante las dos técnicas de análisis, (a) RAM/CE-MS y RAM-ZIC-HILIC-MS/MS y (b) RAM/CE-MS y SPE/LC-MS/MS, para orinas de donantes sanos fumadores.

(b)

5mU (nmol/ $\mu$ mol creatinina)		INN (nmol/ $\mu$ mol creatinina)	
RAM/CE-MS	SPE/LC-MS/MS	RAM/CE-MS	SPE/LC-MS/MS
0.13 $\pm$ 0.02	0.008 $\pm$ 0.002	0.06 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01
0.21 $\pm$ 0.08	0.009 $\pm$ 0.002	0.13 $\pm$ 0.03	0.08 $\pm$ 0.01
0.018 $\pm$ 0.003	0.003 $\pm$ 0.001	0.04 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01
0.10 $\pm$ 0.01	0.003 $\pm$ 0.001	0.059 $\pm$ 0.002	0.04 $\pm$ 0.01
0.13 $\pm$ 0.02	0.008 $\pm$ 0.003	0.08 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01
0.091 $\pm$ 0.003	0.005 $\pm$ 0.001	0.13 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.01
0.04 $\pm$ 0.01	0.014 $\pm$ 0.001	0.04 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01
0.06 $\pm$ 0.05	0.17 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01
0.02 $\pm$ 0.01	0.015 $\pm$ 0.002	0.03 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01
0.027 $\pm$ 0.002	0.016 $\pm$ 0.003	0.02 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01
0.03 $\pm$ 0.01	0.035 $\pm$ 0.002	0.002 $\pm$ 0.001	0.016 $\pm$ 0.004
0.08 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.02	0.04 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.01
		0.006 $\pm$ 0.002	0.07 $\pm$ 0.01

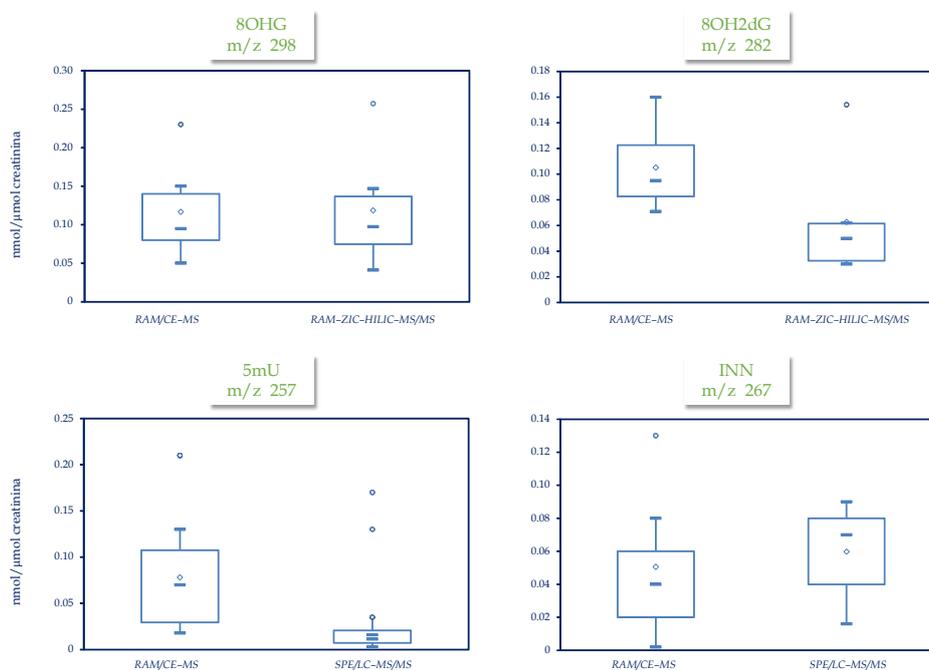


Figura 5.42. Representación de las concentraciones, en nmol/μmol creatinina, obtenidas mediante las dos técnicas de separación, *CE-MS* y *LC-MS/MS*, para orinas de donantes sanos fumadores mediante diagrama de cajas (*box-plot*).

Para comparar los resultados obtenidos mediante las dos técnicas de separación, *CE-MS* y *LC-MS/MS*, se llevaron a cabo dos test de significación diferentes, un test-F con objeto de comparar la igualdad de las varianzas entre ambas poblaciones y un test-t de dos colas. La hipótesis nula para el test-F permite conocer si existen diferencias significativas entre los valores de varianza de los resultados obtenidos, mientras que el test-t permite determinar si existen diferencias significativas entre los valores obtenidos. Cualquiera de las hipótesis se rechaza para significaciones menores de 0.05 (95% de probabilidad).

Los valores de significación, correspondientes al test-F y al test-t se muestran en las tablas 5.20 y 5.21.

Tabla 5.20. Valores de significación obtenidos al comparar los resultados obtenidos por las metodologías *RAM/CE-MS* y *RAM-ZIC-HILIC-MS/MS* a través de un test-F y un test-t de dos colas.

		Valores de significación
<b>8OHG</b>	test-F	0.73
	test-t	0.97
<b>8OH2dG</b>	test-F	0.49
	test-t	0.10

Tabla 5.21. Valores de significación obtenidos al comparar los resultados obtenidos por las metodologías *RAM/CE-MS* y *SPE/LC-MS/MS* a través de un test-F y un test-t de dos colas.

		Valores de significación
<b>5mU</b>	test-F	0.87
	test-t	0.08
<b>INN</b>	test-F	0.06
	test-t	0.50

A partir de los valores de significación obtenidos se puede concluir que no hay diferencias significativas entre los valores de desviación estándar (test-F) y los valores de concentración obtenidos por ambos métodos (test-t). Por lo que quedaría validado el método *RAM/CE-MS* propuesto en este trabajo.

Análisis estadístico de los resultados obtenidos en muestras de orina.

Una vez que se ha validado el método *RAM/CE-MS* aquí desarrollado se procedió a realizar un análisis estadístico de los resultados obtenidos para las muestras de orina, para establecer si las poblaciones de fumadores y no fumadores son estadísticamente iguales o no en lo que respecta a la concentración de estos nucleósidos.

Las concentraciones de nucleósidos obtenidas para las 42 muestras de orina, normalizadas frente a la concentración de creatinina en cada caso, fueron sometidas a análisis estadístico con el fin de comprobar la posible existencia de diferencias significativas entre los valores encontrados en ambos grupos, fumadores y no fumadores.

- En primer lugar se aplicó un test-U de Mann-Whitney al conjunto de todas las muestras, únicamente agrupadas en fumadores y no fumadores.

El test-U de Mann-Whitney es un test no paramétrico y que por lo tanto no presupone ningún tipo de distribución de los resultados. La hipótesis nula es que las dos poblaciones no son significativamente diferentes siendo la hipótesis alternativa que una de las poblaciones presenta valores mayores que la otra. El test-U de Mann-Whitney es más robusto que el test-t, en el sentido de que es menos probable que indique diferencias significativas debido a la presencia de *outliers*. En cuanto a la eficiencia, es mayor para el test de Mann-Whitney que para el test-t en distribuciones que se alejan de la normal, sin embargo para distribuciones normales el test-t es solo ligeramente superior por lo que suele recomendarse el test de Mann-Whitney como opción por defecto. Al igual que para el test-t, los resultados para el test de Mann-Whitney suelen expresarse como valores de “p”, con el mismo significado que en dicho test.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.22. En ella se recogen los valores estadísticos obtenidos para los dos conjuntos de muestras, fumadores y no fumadores y los valores de significación para los 5 analitos estudiados al comparar la concentración obtenida de cada analito para las 21 muestras de orina de fumadores frente a la concentración obtenida para las 21 muestras de orina de no fumadores.

V. DETERMINACIÓN DE NUCLEÓSIDOS MEDIANTE CE-ESI(-)MS

Tabla 5.22. Valores estadísticos y de significación (test-U de Mann-Whitney) obtenidos al comparar las concentraciones de los analitos estudiados en las muestras de orina de fumadores y no fumadores.

	Valores estadísticos					
	No Fumadores			Fumadores		
	Mediana	Media	SD <sup>a</sup>	Mediana	Media	SD <sup>a</sup>
5mU	0.09	0.11	0.10	0.08	0.14	0.20
2dG	0.09	0.10	0.08	0.10	0.14	0.10
INN	0.06	0.07	0.06	0.04	0.05	0.04
8OHG	0.06	0.09	0.10	0.11	0.14	0.13
8OH2dG	0.08	0.10	0.06	0.11	0.14	0.09

<sup>a</sup>. SD: Desviación estándar (n=21).

	Valores de significación (test-U de Mann-Whitney)
5mU	0.57
2dG	0.41
INN	0.56
8OHG	0.04
8OH2dG	0.08

Puede observarse que para casi todos los nucleósidos estudiados se obtuvieron valores de  $p > 0.05$ , lo que conduce a la conclusión de que no hay diferencias significativas entre los datos experimentales obtenidos para ambos grupos, fumadores y no fumadores. Solo para uno de los nucleósidos estudiados, 8OHG, se obtiene un valor de “p” inferior a 0.05 pero superior a 0.01 lo que requeriría un estudio más detallado.

• El estudio se amplió haciendo agrupaciones por edad y por sexo para las muestras de fumadores.

Las muestras se agruparon por edad, fumadores mayores de 30 años y fumadores menores de 30 años (F>30 vs F<30) y en función del sexo, fumadores hombres y fumadores mujeres (F\_Hombres vs F\_Mujeres).

En la Tabla 5.23 se muestran los valores de significación al comparar las muestras de orina de fumadores (agrupadas por edad y por sexo) mediante un test-F y un test-t de dos colas.

Tabla 5.23. Valores de significación obtenidos para los test-F y test-t aplicados a las muestras de orina de fumadores agrupados en función de la edad y del sexo.

		Valor de significación				
		5mU	2dG	INN	8OHG	8OH2dG
<b>F&gt;30 vs F&lt;30</b>	test-F	0.05	0.96	0.27	0.15	0.50
	test-t	0.49	0.82	0.40	1.00	0.90
<b>F_Hombre vs F_Mujer</b>	test-F	0.0006	0.43	0.87	0.02	0.19
	test-t	0.36	0.58	0.97	0.17	0.75

Las conclusiones obtenidas son las mismas. No existen diferencias significativas en la concentración de los nucleósidos estudiados cuando se analizan muestras de orina de donantes sanos fumadores, teniendo en cuenta la edad y el sexo del fumador.

Por tanto, los resultados obtenidos en este estudio preliminar indican que no hay evidencias de que, en individuos sanos, el consumo de tabaco sea un factor adicional en el incremento de los niveles de estos nucleósidos en orina.

Se puede interpretar que, en individuos sanos, el hábito del consumo de tabaco no parece modificar la posibilidad de la utilización de estos analitos como marcadores de ciertas enfermedades graves.

## 5.6. CONCLUSIONES.

Se ha desarrollado un método basado en *CE-MS* para la separación de aquellos compuestos susceptibles de migrar electroforéticamente en medio básico, en forma aniónica. En este caso, la detección posterior por espectrometría de masas se realiza por ionización por electrospray en modo negativo *ESI(-)*.

En este estudio se ha utilizado un conjunto de 5 analitos entre los que se incluyen los derivados hidroxilados 8-hidroxiguanosina (8OHG) y 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OH2dG), metabolitos asociados a procesos de estrés oxidativo, junto con nucleósidos como inosina (INN), y otros derivados como 5-metiluridina (5mU) y 2'-deoxiguanosina (2dG).

De los resultados obtenidos del segundo método desarrollado se pueden extraer las siguientes conclusiones.

### ESTUDIO DE LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA.

Los resultados del estudio de la separación electroforética en capilares de diferente diámetro interno, 50, 75 y 100  $\mu\text{m}$ , determinaron que 50  $\mu\text{m}$  era el diámetro más adecuado para la separación de los analitos en estudio, ya que proporcionaba la mejor resolución en un corto tiempo de análisis.

La optimización de la separación electroforética, en medio básico y con este capilar de diámetro interno de 50  $\mu\text{m}$ , implica las siguientes condiciones:

- ⇒ Medio electroforético de separación (*BGE*): formiato amónico-amoniaco 30 mM, pH 11.0.
- ⇒ Voltaje aplicado: 30 kV.
- ⇒ Inyección hidrodinámica: 30 segundos a 50 mbar en un medio de inyección 1:10 (v/v) *BGE*:agua *UHQ*.
- ⇒ Detección *MS*:
  - Analizador de cuadrupolo sencillo.
  - Interfaz de electrospray (*ESI*), modo negativo; voltaje del capilar: -3500 V; caudal del líquido adicional: 0.78  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; presión del gas de nebulización: 6 psi, caudal del gas de nebulización: 7  $\text{L min}^{-1}$  y temperatura del gas de nebulización: 350 °C.
  - Líquido adicional: agua *UHQ*:isopropanol 1:1 (v/v).

### DETERMINACIÓN EN MUESTRAS DE ORINA.

La aplicación a muestras de orina de donantes sanos pone de manifiesto los bajos niveles de concentración de los analitos en estudio. El desarrollo de una etapa previa de tratamiento de muestra se basa en la extracción en fase sólida (SPE) con sorbentes poliméricos y en la utilización de materiales de acceso restringido (RAM).

### EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE) COMO ETAPA PREVIA.

Se describe un procedimiento para la extracción de estos analitos, en muestras de orina, basado en la utilización de un sorbente polimérico, ENV+, un copolímero hidroxilado de poliestireno-divinilbenceno.

El procedimiento propuesto implica un volumen de 5.0 mL de orina diluida 1:1 (v/v) con agua UHQ. La elución de los analitos se realizó con 2.0 mL de una mezcla MeOH: NH<sub>3</sub> 90:10 (v/v) que se evapora y se redissuelve en 1.0 mL de 1:10 (v/v) BGE:agua UHQ antes de su inyección en el sistema electroforético. En este caso se redujo el tiempo de inyección de 30 a 10 segundos.

Las condiciones optimizadas en este estudio fueron satisfactorias para la separación y cuantificación de algunos de los analitos en estudio, 8OHG y 8OH2dG, aunque no proporciona resultados aceptables para todos los analitos en estudio. Las recuperaciones obtenidas oscilan entre un 69 y un 93%.

### UTILIZACIÓN DE UN MATERIAL DE ACCESO RESTRINGIDO (RAM) COMO ETAPA PREVIA.

Se describe un procedimiento para la extracción de estos analitos, en muestras de orina, basado en la utilización de un material de acceso restringido (RAM), empaquetado con un copolímero hidrofílico conteniendo N-vinilacetamida y con un tamaño de 10 mm x 4.0 mm.

El procedimiento propuesto implica la utilización de un volumen de 500 µL de orina diluida con agua UHQ en proporción 1:1 (v/v). La elución de los analitos

retenidos en el *RAM* se realiza con una mezcla *ACN:agua UHQ* en proporción 70:30 (v/v), con un caudal de 0.50 mL min<sup>-1</sup> durante 4 minutos. La fracción eluida se evapora y se redissuelve en 250 µL de *BGE 30 mM*, dopado con el patrón interno antes de su inyección en *CE-ESI(-)MS*. La precisión obtenida, expresada como desviación estándar relativa, oscila entre 5 y 23%.

#### ANÁLISIS DE NUCLEÓSIDOS EN ORINA DE FUMADORES Y NO FUMADORES.

La metodología desarrollada, *RAM/CE-ESI(-)MS*, se aplicó al estudio de los analitos de interés en muestras de orina de donantes sanos con hábitos de consumo de tabaco. El objetivo fue comprobar si existe una diferencia significativa en la concentración de estos analitos en muestras de orina de fumadores, frente a la obtenida para muestras de orina de no fumadores.

Con ello se pretende establecer la posible relación entre los niveles en orina de estos nucleósidos modificados y el consumo de tabaco en individuos sanos. Se seleccionan individuos sanos para evitar la influencia de posibles enfermedades en los niveles de estos metabolitos y poder así establecer el efecto concreto de este hábito.

Para un muestreo de 42 muestras de orina de individuos sanos (21 fumadores, y 21 no fumadores, equilibrados en cuanto a edad y sexo) se comprueba los bajos niveles de concentración a los que se encuentran estos compuestos en todas ellas. Los resultados obtenidos con el método desarrollado, *RAM/CE-ESI(-)MS*, fueron validados mediante *LC-MS/MS*.

Los resultados obtenidos indicaron que no había diferencias significativas en la concentración de estos analitos entre muestras de fumadores y no fumadores. Tampoco se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de los analitos, entre fumadores, dependiendo de la edad y del sexo.

Como conclusión de estos estudios se podría decir que no existen pruebas experimentales para considerar que la concentración de estos nucleósidos en orina (entre ellos los derivados 8OH2dG y 8OHG) sea superior en fumadores que en no fumadores. Por tanto, en individuos sanos, los nucleósidos estudiados podrían ser utilizados como marcadores de enfermedades graves independientemente del consumo de tabaco.

No hay que olvidar, sin embargo, que el muestreo aquí realizado afecta a individuos sanos, de edad media–baja, lo que sugiere la realización de estudios más profundos, ampliando el muestreo a individuos de edad más avanzada, y a individuos con una enfermedad diagnosticada, todos ellos en categoría de fumadores y no fumadores.

Finalmente, es importante resaltar que el objeto de este estudio es mostrar una posible aplicación de la metodología propuesta, como herramienta analítica, sin ninguna pretensión dentro del campo del diagnóstico clínico, que obviamente queda fuera de nuestros conocimientos.



VI

ANÁLISIS METABOLÓMICO



## 6.1. OBJETO DEL ESTUDIO.

En el capítulo anterior se ha desarrollado una metodología basada en *CE-ESI(-)MS* para la separación, detección y cuantificación de algunos nucleósidos modificados de interés, entre ellos, los derivados hidroxilados 8OHG y 8OH2dG.

Su aplicación al análisis de muestras de orina de fumadores y no fumadores, todos ellos individuos sanos, no presenta diferencias significativas en los niveles de este grupo de compuestos.

Por ello, se decidió ampliar el estudio a la búsqueda de otros posibles metabolitos relacionados con el consumo de tabaco que pudieran mostrar diferencias significativas entre ambos grupos de muestras.

Se plantea realizar un estudio no dirigido para obtener los perfiles metabólicos de las muestras de orina. En este capítulo se describen los resultados obtenidos en el análisis de las mismas muestras de orina pero aplicando una metodología diferente, basada en la utilización de un analizador de masas de alta resolución, el analizador de tiempo de vuelo (*TOF*) acoplado a un cromatógrafo de líquidos (*LC-TOF*).

El planteamiento de este estudio se basa en la experiencia adquirida por la doctoranda durante una estancia de investigación, desarrollada como parte de su formación pre-doctoral, en el Departamento de Química Farmacéutica del *King's College London*, bajo la supervisión de la Dra. Cristina Legido Quigley.

Durante el periodo de esta estancia se adquirió experiencia práctica en la aplicación del análisis metabolómico en el ámbito de la toxicología clínica, en colaboración con la Dra. Lea Ann Dailey, también perteneciente al Departamento de Química Farmacéutica del *King's College London*. En esos momentos la línea de investigación que seguía la Dra. Dailey y su equipo estaba centrada en el estudio de la toxicidad provocada por la inhalación de nanopartículas de hidrofobicidad elevada<sup>171</sup>.

Los objetivos de este estudio se podrían resumir en dos grandes bloques. En primer lugar medir el impacto de las diferentes nanopartículas estudiadas (baja y alta hidrofobicidad superficial) sobre la toxicidad pulmonar. En segundo lugar la

---

<sup>171</sup> L. A. Dailey, R. Hernández-Prieto, A. M. Casas-Ferreira, M. C. Jones, Y. Riffo-Vasquez, E. Rodríguez-Gonzalo, D. Spina, S. A. Jones, N. W. Smith, B. Forbes, C. Page, C. Legido-Quigley, *Nanotoxicology* 9 (2015) 106. "Adenosine monophosphate is elevated in the bronchoalveolar lavage fluid of mice with acute respiratory toxicity induced by nanoparticles with high surface hydrophobicity".

aplicación de un análisis no dirigido para investigar si la exposición a nanopartículas daba lugar a perfiles metabólicos significativamente diferentes, y mediante el estudio de los mismos, identificar posibles marcadores relacionados con la exposición a las nanopartículas estudiadas. En este último objetivo se centró nuestra colaboración con el equipo de la Dra. Dailey.

Se aplicaron técnicas de análisis multivariante, tanto de reconocimiento de pautas no supervisadas (Análisis de Componentes Principales, *PCA*), como de reconocimiento de pautas supervisadas (Análisis Discriminante mediante Regresión Parcial por Mínimos Cuadrados, *PLS-DA* y *OPLS-DA*).

El estudio se realizó con ratones machos albinos a los cuales se les suministró, vía intratraqueal, soluciones en suspensión que contenían las nanopartículas estudiadas. Las muestras consistían en 400  $\mu\text{L}$  del líquido procedente del lavado broncoalveolar (*Broncho-alveolar lavage, BAL*) que fueron analizadas mediante un sistema de cromatografía de líquidos en la modalidad de ultra alta resolución acoplado a un analizador de tiempo de vuelo (*UPLC-QTOF-MS*).

En el estudio realizado se encontraron seis metabolitos responsables de la separación entre los grupos de nanopartículas de alta y baja hidrofobicidad. De estos seis metabolitos no fue posible la identificación de cinco de ellos. El último, adenosina monofosfato (*adenosine monophosphate, AMP*) se confirmó su identidad mediante inyección del compuesto de referencia. Se concluye que, como respuesta a la administración pulmonar de nanopartículas se observa una elevada concentración de *AMP* extracelular.

Los resultados de este trabajo se muestran al final de esta memoria.

## 6.2. ESTUDIOS PREVIOS. OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA LC-TOF.

El análisis metabolómico de las muestras de orina se realizó con un analizador de tiempo de vuelo, *TOF*, acoplado a un cromatógrafo de líquidos, *LC-TOF*. Se describe, en primer lugar, el estudio de la separación cromatográfica utilizando la modalidad de fase inversa, con detección por espectrometría de masas en tándem en un analizador de triple cuadrupolo. Los analitos utilizados en este estudio son los nucleósidos modificados utilizados en el capítulo anterior, 5mU, 2dG, INN, 8OHG y 8OH2dG, junto con el patrón interno marcado isotópicamente  $^{13}\text{C}_{10}$   $^{15}\text{N}_5$ -AMP.

### 6.2.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.

La optimización de la separación cromatográfica de los nucleósidos de interés se llevó a cabo en un sistema *HPLC*, con una columna de fase inversa  $\text{C}_{18}$  rellena con partículas superficialmente porosas (Kinetex  $\text{C}_{18}$  Core-Shell<sup>TM</sup>), acoplado a un detector de espectrometría de masas en tándem de triple cuadrupolo (*QqQ*) con una fuente de ionización por electrospray, *ESI*, trabajando en modo negativo.

La fase móvil ensayada fue una mezcla acetonitrilo (ACN) y agua ultrapura (*UHQ*). Se probaron proporciones de ACN:agua *UHQ* entre 10:90 y 0:100 (v/v). En todos los casos, la separación cromatográfica se realizó en modo isocrático. Una vez finalizado el análisis se aplicó una etapa de lavado a la columna de 2 minutos de duración, con una fase móvil formada por 50:50 (v/v) ACN:agua *UHQ*, que permitía la eliminación de los interferentes de menos polaridad y evitaba una posible contaminación entre análisis consecutivos.

Los resultados obtenidos mostraron que la proporción 2:98 (v/v) ACN:agua *UHQ* permitía obtener una separación satisfactoria, en menos de 5 minutos. Se estudió también el efecto de la modificación del pH de la fase móvil, ácido o básico, para favorecer la ionización de los analitos en la fuente de electrospray (*ESI*) y conseguir un aumento de la respuesta analítica en el detector de triple cuadrupolo (*QqQ*).

Se ensayaron dos nuevas fases móviles, basadas en la proporción indicada anteriormente 2:98 (v/v) ACN:agua *UHQ*, una de ellas a pH 3.3, en presencia de ácido fórmico 2.5 mM y otra a pH 8.9 por adición de amoníaco.

En la Figura 6.1 se comparan los resultados obtenidos en el estudio de estas tres fases móviles. Como se puede observar, para los derivados hidroxilados 8OHG y 8OH2dG, y el nucleósido INN la señal analítica, área de pico, es superior o igual, cuando la fase móvil utilizada poseía una concentración de 2.5 mM de medio ácido. En el caso del nucleósido 2dG y el patrón interno ( $^{13}\text{C}_{10}$   $^{15}\text{N}_5$ -AMP) las mejores respuestas analíticas se obtuvieron cuando se usaba la fase móvil de pH básico. A la vista de los resultados obtenidos, se eligió como fase móvil adecuada para estudios posteriores una mezcla 2:98 (v/v) ACN:agua *UHQ*, 2.5 mM HCOOH para la cual se obtiene una separación satisfactoria, con tiempos de retención:  $^{13}\text{C}_{10}$   $^{15}\text{N}_5$ -AMP (1.0 min), INN (1.8 min), 5mU (2.0 min), 8OHG (2.2 min), 2dG (2.3 min), 8OH2dG (3.5 min).

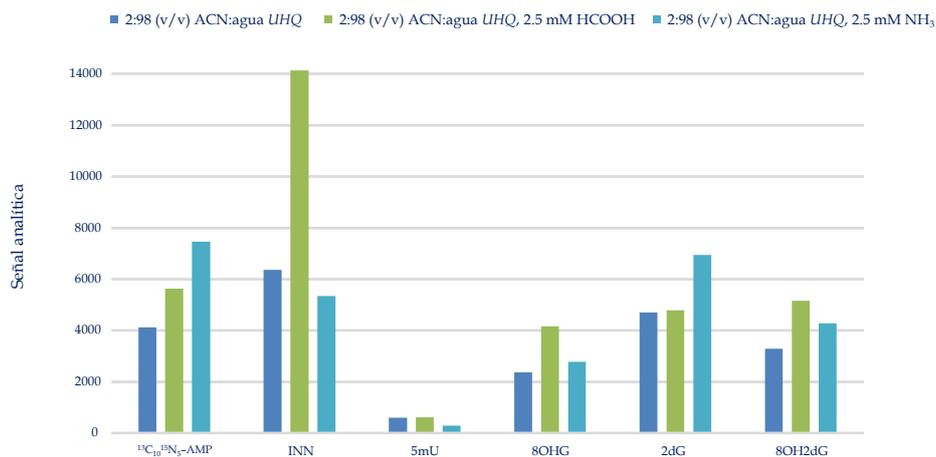


Figura 6.1. Señal analítica, área de pico, obtenida al inyectar un patrón acuoso de los nucleósidos estudiados, concentración de  $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , empleando distintas fases móviles.

Con esta fase móvil se procedió a optimizar la composición del medio de la muestra inyectada. La necesidad de este estudio se debe a la etapa previa de limpieza de la muestra de orina, basada en la utilización de un material de acceso restringido

(RAM). La elución de los analitos retenidos en el RAM fue previamente optimizada, consistía en utilizar una mezcla 70:30 (v/v) ACN:agua UHQ. Por lo tanto, se plantea la posibilidad de inyectar las muestras en este medio directamente para su análisis en LC-MS o bien llevar a cabo una etapa de evaporación de las muestras para redisolverlas en un medio compatible con la separación cromatográfica. La Figura 6.2 muestra los resultados obtenidos para la inyección de muestras patrón, en concentración de  $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , preparadas en medio acuoso (UHQ) y en medio acuorgánico 70:30 (v/v) ACN:agua UHQ. El volumen de inyección utilizado fue de  $20 \mu\text{L}$ . No se aprecian diferencias significativas respecto a las áreas de los analitos (normalizadas con el patrón interno, ILIS) ni tampoco respecto a la separación cromatográfica.

Por tanto, se decidió utilizar directamente el medio 70:30 (v/v) ACN:agua UHQ, ya que con este medio se evitan las etapas de evaporación y de redisolución después del proceso con el material de acceso restringido (RAM).

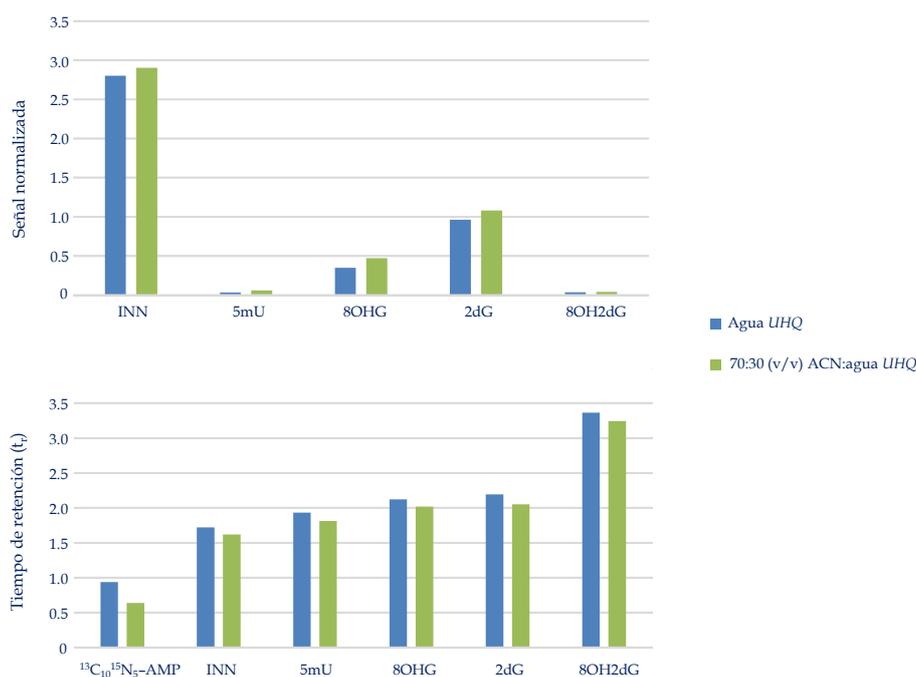


Figura 6.2. Señal normalizada (arriba) y tiempos de retención (abajo) obtenidos al inyectar un patrón de los nucleósidos estudiados, concentración de  $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , en distintos medios, en medio acuoso UHQ y en medio acuorgánico 70:30 (v/v) ACN:agua UHQ.

### Analizador de masas de triple cuadrupolo (QqQ).

En este estudio se ha utilizado un analizador de triple cuadrupolo (QqQ) con una fuente de ionización por electrospray (ESI). Se ensayaron los dos modos de operación ESI(+) y ESI(-) con cada una de las fases móviles estudiadas y finalmente, la detección se realizó en modo negativo, ESI(-), por ser la que proporcionó los mejores resultados, al generar un ruido de fondo mucho menor.

Los parámetros 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 establecidos por el fabricante para un flujo de fase móvil de 0.5 mL min<sup>-1</sup>. Los parámetros fijados fueron los siguientes: voltaje del capilar de -4000 V; el flujo y la temperatura del gas de secado (N<sub>2</sub>) fueron de 12 L min<sup>-1</sup> y 350 °C, respectivamente; y por último, la presión de nebulización tenía un valor de 35 psi.

El modo de adquisición de datos fue “seguimiento de reacciones múltiples”, (*multiple reaction monitoring, MRM*). Además de los parámetros generales fue necesaria la optimización de una serie de factores que dependen de la naturaleza propia de cada analito. Para la fragmentación en el triple cuadrupolo se seleccionó, para cada analito, la molécula desprotonada [M-H]<sup>-</sup> como ion precursor. El equipo optimiza la energía a transmitir al ion precursor para su fragmentación, eligiendo la energía de colisión (expresada en voltios) adecuada para que la sensibilidad de los distintos fragmentos sea la 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. La optimización fue realizada mediante inyección directa de patrones individuales de cada analito en medio acuoso (UHQ) en una concentración de 5.0 µg mL<sup>-1</sup>. En el Apéndice I se recogen los espectros de MS/MS, así como todos los parámetros optimizados, característicos de cada analito (Tabla I, Apéndice I).

### 6.2.2. DETECCIÓN MEDIANTE UN ANALIZADOR DE TIEMPO DE VUELO (TOF).

En el apartado anterior se describe la optimización de la separación cromatográfica, en cuanto a la composición de la fase móvil y el medio de inyección de la muestra. Las condiciones optimizadas serán utilizadas para el análisis metabolómico de las muestras de orina, una vez que sea optimizada también la detección en el analizador de tiempo de vuelo.

Debido a la menor sensibilidad que presenta el analizador de tiempo de vuelo (TOF) en comparación con un analizador de triple cuadrupolo (QQQ), se estudió la posibilidad de mejorar la respuesta en este detector TOF mediante la adición post-columna de una disolución alcalina. El objeto de utilizar este medio básico se debe al modo de detección en el que se trabaja, ESI(-). Con la adición post-columna de este medio básico se espera facilitar la formación de especies aniónicas por parte de los analitos, y por tanto, favorecer su ionización en la fuente de electrospray y así generar una mayor respuesta en el analizador de tiempo de vuelo (TOF).

La adición post-columna del medio básico fue realizada mediante una conexión en forma de T a la salida de la columna cromatográfica y antes de la entrada en la fuente de electrospray.

Se evaluaron dos bases de volatilidad elevada: amoníaco (NH<sub>3</sub>), pKa 9.3 y dietilamina (DEA), pKa 10.9. Las dos bases fueron utilizadas en forma diluida 1:1 (v/v) en metanol con respecto al producto comercial (amoníaco, 25% (v/v) y dietilamina, solución al 40% en agua). Ambas se inyectaron de forma directa, a través de la conexión en T, empleando una jeringa de inyección impulsada por una bomba de pistón, a distintas velocidades de flujo, 1 μL min<sup>-1</sup> y 10 μL min<sup>-1</sup>.

Los resultados se muestran en la Figura 6.3. Puede observarse que todos los compuestos estudiados presentaban un comportamiento parecido, aun variando la sustancia básica adicionada. La respuesta fue siempre inferior a la respuesta obtenida cuando se llevaba a cabo la inyección de la muestra sin la adición post-columna de una base.

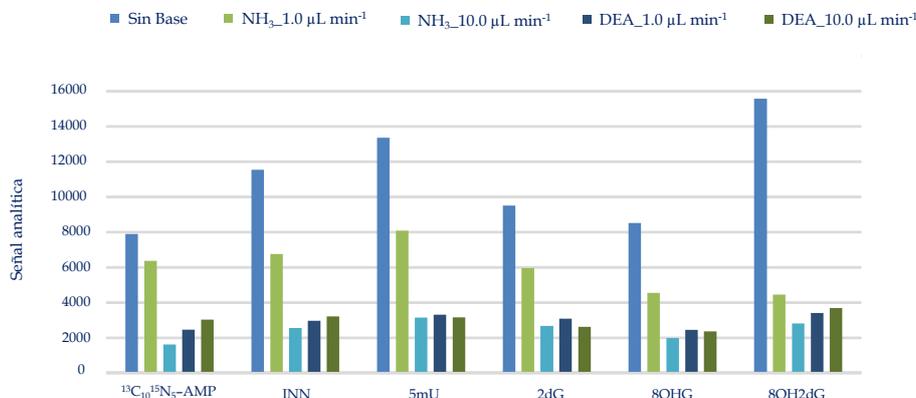


Figura 6.3. Influencia de la adición post–columna de diferentes bases, amoníaco (NH<sub>3</sub>) y dietilamina (DEA), con caudales de 1.0 a 10.0 µL min<sup>-1</sup>, sobre la respuesta analítica de los compuestos en estudio expresada como área de pico cromatográfico.

En la Figura 6.3 se puede observar cómo la señal analítica disminuye cuando se lleva a cabo la adición post–columna de NH<sub>3</sub>, y esta disminución es aún más drástica cuando el caudal de la base pasa de 1.0 a 10.0 µL min<sup>-1</sup>. Este comportamiento puede explicarse como efecto de una dilución. Cabría esperar el mismo resultado cuando la base adicionada es DEA, pero en este caso la señal analítica no seguía el mismo comportamiento que presentaba con el NH<sub>3</sub>. En el caso de utilizar DEA la disminución de la señal respecto al patrón sin base post–columna fue aún más acusada que cuando se empleaba NH<sub>3</sub> y el efecto de la dilución no fue observado de una forma acusada.

Una posible explicación a este comportamiento puede ser el hecho de que una alta concentración de base pueda producir un aumento de la supresión iónica. La base, como componente mayoritario, será ionizada preferentemente en la interfaz lo que ocasionará una menor ionización de los analitos de interés.

A la vista de los resultados obtenidos, se concluye que la adición post–columna de un medio básico, para favorecer la formación de iones (desprotonación) antes de su llegada a la fuente de ionización, no produce una mejora de la respuesta en el analizador de tiempo de vuelo. En estudios posteriores

se decidió descartar la adición post-columna de un medio básico ya que no producía ninguna mejora de la respuesta analítica en el *TOF*.

### **6.3. APLICACIÓN AL ESTUDIO DE METABOLITOS ASOCIADOS AL CONSUMO DE TABACO.**

Para la realización del estudio metabolómico se utilizó el equipo *LC-TOF* con los parámetros optimizados descritos en los apartados anteriores. En este estudio se mantiene el tratamiento previo de la muestra de orina con el material de acceso restringido (*RAM*).

Las muestras empleadas en el estudio metabolómico fueron las mismas 42 muestras de orina obtenidas de voluntarios sanos, fumadores y no fumadores, descritas en el capítulo anterior. Sin embargo, debido a que la técnica de análisis empleada en los estudios anteriores, *RAM/CE-ESI(-)MS*, requería condiciones de inyección diferentes a las empleadas mediante *LC-TOF*, los extractos obtenidos de la etapa con el *RAM* no pudieron ser utilizados en ambos sistemas, debido a la incompatibilidad de los medios de elución y de separación.

Por ello, las 42 muestras de orina fueron nuevamente sometidas a una etapa de limpieza con el *RAM*, pero en este caso suprimiendo la etapa de evaporación y reconstitución final del extracto; es decir, el volumen obtenido de la elución del dispositivo *RAM* se analizó directamente en el equipo *LC-TOF*.

Finalizado el análisis de las 42 muestras y obtenidos todos los cromatogramas, es necesario realizar la calibración de estos para obtener la masa exacta de todos los analitos. El compuesto seleccionado para la calibración fue el ácido úrico ( $C_5H_4N_4O_3$ ) puesto que su masa exacta es conocida ( $m/z$  168.021) y es un analito que se encuentra presente en todas las muestras.

Con los cromatogramas obtenidos, se realizaron los estudios en las dos modalidades que se describen a continuación: (a) análisis de metabolitos específicos y (b) estudio de la huella metabólica y su relación con el consumo de tabaco.

**(a) Análisis de metabolitos específicos.**

En primer lugar se utilizaron las señales obtenidas para la identificación inequívoca de los nucleósidos estudiados anteriormente. En la Tabla 6.1 se presentan los resultados de la identificación de los metabolitos en estudio. Las especificaciones del equipo determinan una precisión en la medida de la masa de 5 ppm de error o 2 mDa.

Tabla 6.1. Identificación y confirmación de los nucleósidos estudiados.

<b>Analito</b>	<b>Masa Exacta</b>	<b>Masa Detectada</b>	<b>Error (mDa)</b>	<b>Error (ppm)</b>
INN	267.0734	267.0754	1.9	7.1
5mU	257.0779	257.0768	-1.1	-4.3
2dG	266.0894	266.0904	0.9	3.5
8OHG	298.0793	298.0814	2.1	7.0
8OH2dG	282.0843	282.0840	-0.4	-1.4
$^{13}\text{C}_{10} \text{ } ^{15}\text{N}_5\text{-AMP}$	361.0745	361.0751	0.6	1.6

Señalar que se identifican los analitos estudiados en casi todas las muestras de orina analizadas (42 en total, fumadores y no fumadores). Sin embargo debido a la baja concentración de estos analitos en la mayoría de ellas, y a la baja sensibilidad del analizador de tiempo de vuelo (*TOF*), fue posible su detección pero no su cuantificación.

Aunque no fue posible obtener resultados cuantitativos en este estudio, los resultados aquí obtenidos, mediante la configuración *RAM/LC-TOF*, del análisis de metabolitos prefijados, vuelve a incidir en los resultados que ya se obtuvieron previamente mediante *RAM/CE-ESI(-)MS*: en lo que se refiere a los compuestos en estudio, no se aprecian diferencias entre los dos grupos de voluntarios sanos.

**(b) Aplicación al estudio de la huella metabólica relacionado con el consumo de tabaco.**

Después de llevar a cabo la calibración de las masas exactas, se realizó el tratamiento de datos con el programa *MZmine*.

Para cada muestra se obtuvieron aproximadamente 295 compuestos identificados con su relación  $m/z$  y su tiempo de retención ( $t_r$ ). El tratamiento de datos se realizó siguiendo los pasos descritos a continuación:

- ⇒ “*Deconvolution*”: ayuda a reducir los picos falsos en el caso de que los cromatogramas no estén delineados.
- ⇒ “*Deisotoped*”: se emplea con el fin de eliminar picos detectados como diferentes pero que en realidad corresponden a diferentes formas isotópicas del mismo compuesto.
- ⇒ “*Aligned peak*”: corrige cualquier desviación lineal o no lineal en el tiempo de retención mediante la creación de un modelo de esta desviación. En este paso ya se encuentran superpuestos los picos con una misma relación  $m/z$  y un mismo  $t_r$  en un solo cromatograma.
- ⇒ “*Gap filled*”: una vez que se tienen los picos cromatográficos se realiza una búsqueda en todas las muestras para la detección de aquellos que no se detectaron en un primer análisis de los datos.

De esta forma se obtiene un archivo con 3017 candidatos finales que corresponden a una relación  $m/z$  y un  $t_r$  concretos, y para cada uno de ellos se obtuvieron 42 valores de área pertenecientes a cada una de las muestras analizadas (42 voluntarios sanos, de los cuales 21 eran no fumadores y 21 eran fumadores).

Estos datos son exportados al programa SIMCA 13.0.3. (*MKS Umetrics*, Suecia), que permite llevar a cabo un análisis quimiométrico de los resultados. Se genera una matriz de datos definida como  $X$  que contiene  $N$  filas (cada una de ellas pertenece a un individuo concreto) y  $K$  variables (cada una de las propiedades que se miden en todos los individuos). La matriz se muestra en la Tabla 6.2.

Tabla 6.2. Representación esquemática de la matriz de datos de las 42 muestras de orina.

<i>Primary ID</i>	<i>ID</i>	1	2	3	...	3017
<i>Second ID</i>	m/z	178.044	191.004	181.046		238.974
<i>Second ID</i>	t <sub>r</sub>	4.76076	0.53422	0.54693		1.69231
<i>All identity element</i>						
	NF_01 ( <i>peak area</i> )	119468	35908.5	32902.7		1.55618
	NF_21 ( <i>peak area</i> )	61422.3	2919.4	6866.15		36.3108
	....					
	F_01/ ( <i>peak area</i> )	1171910	101853	2696.14		165.992
	F_21/ ( <i>peak area</i> )	2873.48	9733.4	6943.52		124.494

Una vez obtenida la matriz de los datos, generada por el SIMCA, se llevó a cabo, con el fin de encontrar tendencias inherentes en los datos, un análisis de componentes principales (*PCA*) sobre las 42 muestras de orina de fumadores y no fumadores. Con este análisis se descubre información significativa de grandes cantidades de señales multivariantes y permite su representación a partir de un número reducido de componentes. La primera componente sigue la dirección de máxima variabilidad de los datos y el resto de componentes se forman siguiendo las pautas citadas anteriormente (Capítulo I, Apartado 1.7). Con las dos primeras componentes se genera el “*scores plot*” y “*loadings plot*”. Con este análisis no se obtuvo ninguna información que pudiera ser utilizada, puesto que no se obtuvo separación

entre los dos grupos, fumadores y no fumadores, como queda demostrado en el diagrama de “*scores*” de la Figura 6.4.a.

Se prosiguió haciendo distintos subconjuntos de los datos y analizándolos mediante *PCA*. Se hizo un primer grupo con todas las muestras de orina pertenecientes a hombres, en total 22 muestras de hombres fumadores y no fumadores, Figura 6.4.b, esta agrupación de muestras se llevó a cabo con el fin de encontrar separación entre fumadores y no fumadores. Un segundo grupo, formado por todas las muestras de orina pertenecientes a mujeres, 20 muestras en total, con la misma intención, ver separación entre fumadoras y no fumadoras, Figura 6.4.c. Y la última agrupación fue la de fumadores, 21 muestras de orina, en la cual se pretendía ver si había alguna separación por edad (mayores o menores de 30 años) o por sexo (hombre o mujer), Figura 6.4.d.

Los porcentajes de varianza explicada acumulada para los cuatro primeros componentes principales fueron 44% en el caso del análisis del conjunto total de las muestras, (a); 49% en el caso del subconjunto de 22 muestras pertenecientes a hombres fumadores y no fumadores (b); 58% en el caso del subconjunto de muestras de orina pertenecientes a mujeres fumadoras y no fumadoras, 20 muestras (c) y 62% para el subconjunto que agrupa a las 21 muestras de orina de fumadores, tanto hombres como mujeres (d).

Se asignó la nomenclatura NF a los voluntarios sanos no fumadores y F a los voluntarios sanos fumadores.

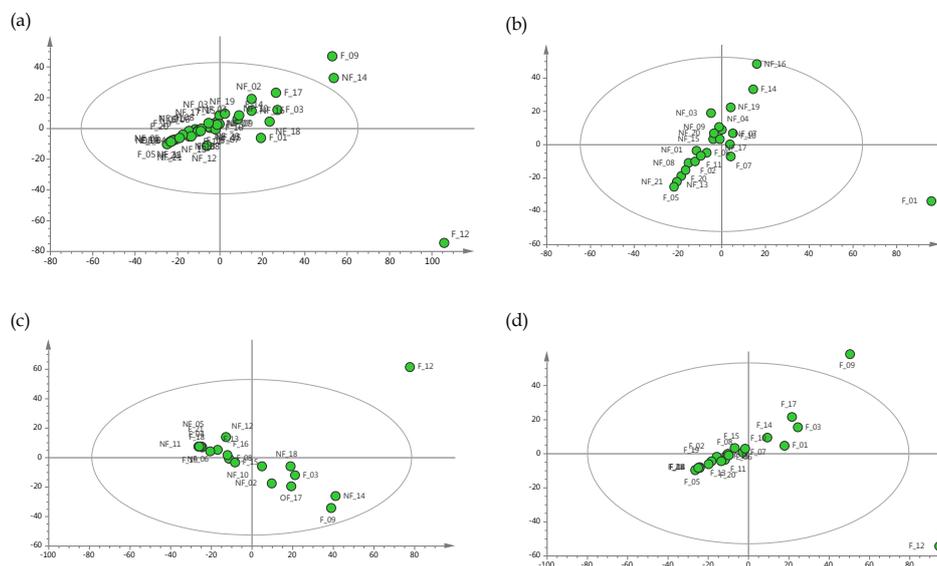


Figura 6.4. Diagramas de “scores” para los análisis por componentes principales, *PCA*, para (a) las 42 muestras de orina de fumadores y no fumadores; (b) agrupación de las 22 muestras de orina que pertenecían a hombres, tanto fumadores como no fumadores; (c) agrupación de las 20 muestras pertenecientes a mujeres, fumadoras y no fumadoras; y (d) las 21 muestras de orina de fumadores, tanto hombres como mujeres.

A la vista de los resultados obtenidos con los análisis por componentes principales y los datos de varianza explicada acumulada se concluyó que no es posible apreciar diferencias significativas entre el perfil metabólico de fumadores y el de no fumadores.

Se prosiguió con el análisis de los datos mediante técnicas de reconocimiento de datos supervisadas. Para ello se generaron modelos mediante *PLS-DA*. Esta técnica permite la obtención de gráficos en los que los individuos aparecen o no agrupados en función de su similitud (*scores plot*) e igualmente con las variables (*loadings plot*).

Se siguieron todas las etapas indicadas a continuación:

- ⇒ Generación del modelo.
- ⇒ Obtención de los parámetros  $Q^2$  y  $R^2$ .

- ⇒ Validación del modelo: “*Scrambling*”.
- ⇒ Análisis de los resultados:
  - Estudio del gráfico de “*loadings*”.
  - Comprobación de picos cromatográficos.
  - Integración y normalización de las áreas con respecto a la creatinina.
  - Análisis estadístico.
  - Búsqueda de los posibles metabolitos en la base de datos *Human Metabolome Database, HMDB*.

En el modelo *PLS-DA* se escogió un escalado univariante (uv). En un principio se utilizaron las 3017 variables obtenidas y las observaciones fueron divididas en dos clases, fumadores y no fumadores. A la vista de los resultados obtenidos se decidió eliminar 4 muestras que, o bien quedaban fuera del modelo, o bien se incluían en el grupo contrario al que pertenecían. Este nuevo modelo *PLS-DA* generado sin las 4 muestras, se denominó modelo M1. Con las dos primeras componentes se generó el “*scores plot*” y el “*loadings plot*” que se muestran en las Figuras 6.5 y 6.6 respectivamente.

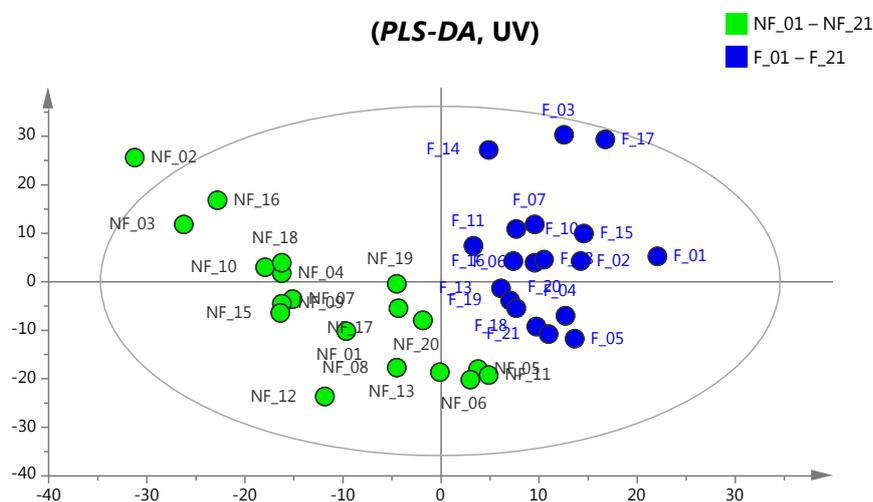


Figura 6.5. Gráfico “*scores plot*” del modelo *PLS-DA* (M1), donde se representan los grupos de fumadores (color azul) y no fumadores (color verde).

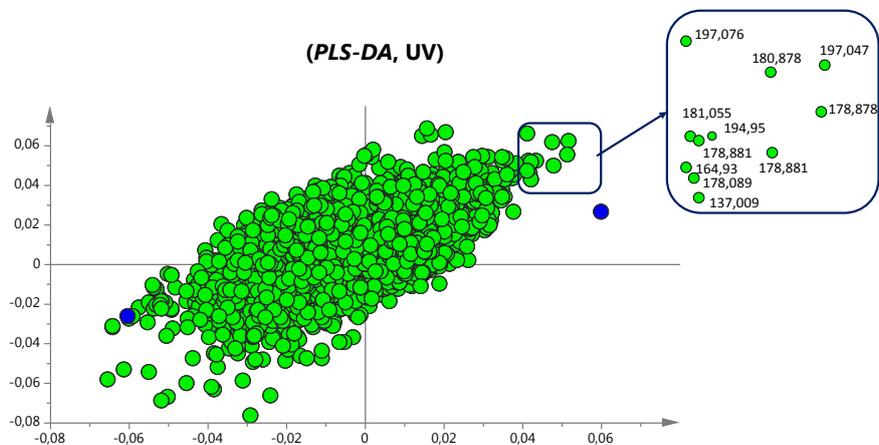


Figura 6.6. Gráfico “loadings plot” del modelo *PLS-DA* (M1), donde se representan los 3017 metabolitos encontrados de las 38 muestras de orinas. En color verde se representa cada una de estas variables y en color azul se representa el centro de masas de cada uno de los grupos: no fumadores (izquierda) y fumadores (derecha).

Se procedió a generar un nuevo modelo, basado en *OPLS-DA*, con escalado univariante (uv). Con este nuevo modelo se pretendía encontrar algún metabolito diferente, a los ya localizados en el modelo *PLS-DA* (M1), que permitiese la diferenciación entre el grupo de los fumadores y de los no fumadores. Con este modelo *OPLS-DA* (M2) se obtuvo una separación más efectiva entre los dos grupos estudiados, que con el modelo *PLS-DA* (M1), debido a que presenta la ventaja de que concentra en la primera componente la separación entre clases, por lo que permite una interpretación más clara. Con las dos primeras componentes se generó el “scores plot” y el “loadings plot” que se muestran en las Figuras 6.7 y 6.8 respectivamente.

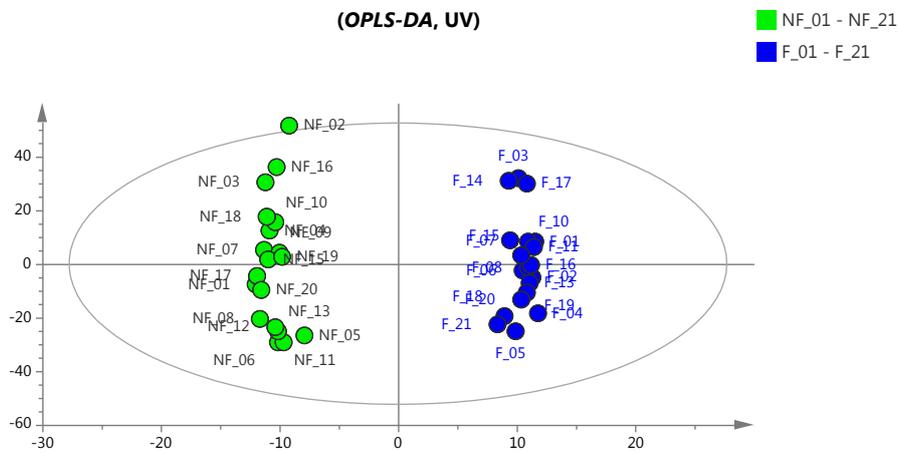


Figura 6.7. Gráfico “scores plot” del modelo *OPLS-DA* (M2), donde se representan los grupos de fumadores (color azul) y no fumadores (color verde).

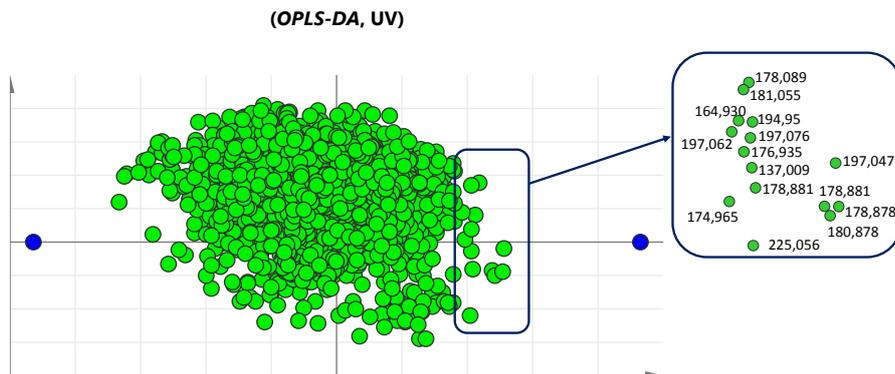


Figura 6.8. Gráfico “loadings plot” del modelo *OPLS-DA* (M2), donde se representan los 3017 metabolitos encontrados de las 38 muestras de orina. En color verde se representa cada una de estas variables y en color azul se representa el centro de masas de cada uno de los grupos: no fumadores (izquierda) y fumadores (derecha).

A la vista de los resultados obtenidos con el modelaje *PLS-DA* y *OPLS-DA* para las 38 muestras de orina, se decidió generar nuevos modelos con todas las

combinaciones posibles, teniendo en cuenta variables como el género, edad y la condición de fumador o no fumador. Los resultados se resumen en la Tabla 6.3 y en su obtención se siguieron todas las etapas indicadas anteriormente.

Tabla 6.3. Modelos generados a partir de la matriz de datos (38 voluntarios). Se evaluaron todas las combinaciones posibles teniendo en cuenta las siguientes variables: hábito de consumo, fumador (F), no fumador (NF) y género, hombre (H), mujer (M).

Modelo	Parámetros		"Loadings"			
			ID	m/z	t <sub>r</sub>	
F vs NF	<i>PLS-DA</i>	Q <sup>2</sup> = 0.699	Valido	171	194.95	0.58
	<b>M1</b>	R <sup>2</sup> = 0.989		1325	197.06	0.54
	<i>OPLS-DA</i>	Q <sup>2</sup> = 0.701	Valido	2110	176.94	0.50
	<b>M2</b>	R <sup>2</sup> = 0.992		2151	225.06	0.57
F_H vs NF_H	<i>PLS-DA</i>	Q <sup>2</sup> = 0.659	Valido	2807	158.08	0.52
	<b>M3</b>	R <sup>2</sup> = 0.995				
F_M vs NF_M	<i>OPLS-DA</i>	Q <sup>2</sup> = 0.342	No valido			
		R <sup>2</sup> = 0.995				
F_H vs NF_M	<i>PLS-DA</i>	Q <sup>2</sup> = 0.178	No valido			
		R <sup>2</sup> = 0.746				
F_H vs F_M	<i>OPLS-DA</i>	Q <sup>2</sup> = 0.541	No valido			
		R <sup>2</sup> = 0.998				
F_H vs F_M	<i>PLS-DA</i>	Q <sup>2</sup> = 0.116	No valido			
		R <sup>2</sup> = 0.635				
F_H vs NF_H vs	<i>OPLS-DA</i>	Q <sup>2</sup> = -0.190	No valido			
		R <sup>2</sup> = 0.707				
F_H vs NF_H vs	<i>PLS-DA</i>	Q <sup>2</sup> = 0.121	No valido			
		R <sup>2</sup> = 0.276				
F_M vs NF_M	<i>OPLS-DA</i>	Q <sup>2</sup> = 0.136	No valido			
		R <sup>2</sup> = 0.314				

De estos modelos generados, solo uno pudo ser validado, hombres fumadores (H\_F) frente a hombres no fumadores (H\_NF), en total 19 muestras de orina (3 muestras de orina tuvieron que ser eliminadas debido a que quedaban fuera del modelo). El modelo validado *PLS-DA* (M3) tenía un escalado univariante (uv), en el cual se observó una separación entre los dos grupos estudiados. Con las dos

primeras componentes se generó el “*scores plot*” y el “*loadings plot*” que se muestran en las Figuras 6.9 y 6.10 respectivamente.

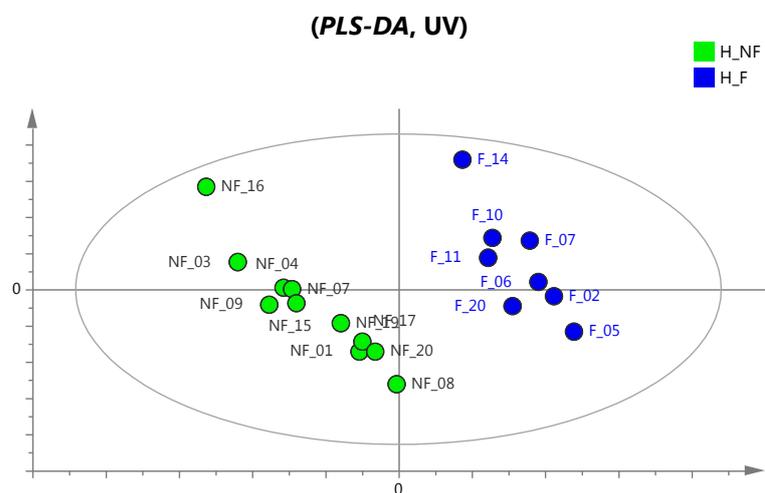


Figura 6.9. Gráfico “*scores plot*” del modelo *PLS-DA* (M3), donde se representan los dos grupos, hombres fumadores (color azul) y hombres no fumadores (color verde).

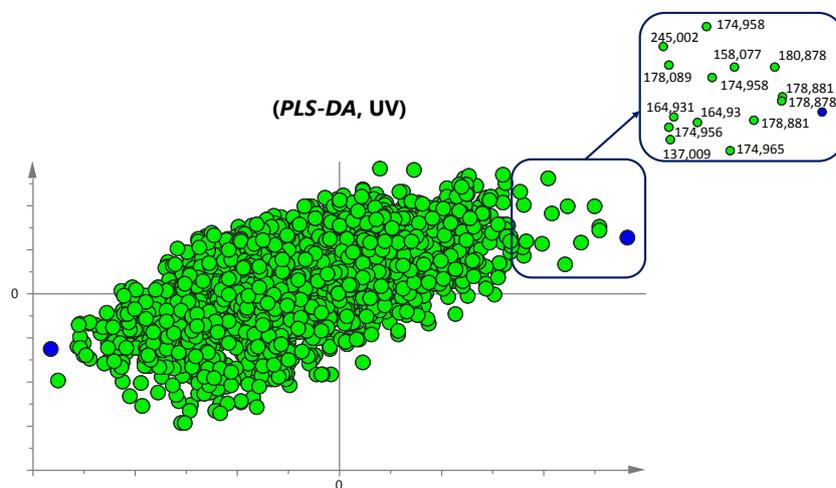


Figura 6.10. Gráfico “*loadings plot*” del modelo *PLS-DA* (M3), donde se representan los 3017 metabolitos encontrados de las 19 muestras de hombres fumadores y no fumadores. En color verde se representa cada una de estas variables y en color azul se representa el centro de masas de cada uno de los grupos: no fumadores (izquierda) y fumadores (derecha).

Una vez obtenidos los gráficos el siguiente paso fue llevar a cabo la valoración de los parámetros de  $R^2$ , varianza total explicada por el modelo, y  $Q^2$ , capacidad predictiva del modelo, ya que estos parámetros informan de la calidad del modelo. Los valores se calculan por validación cruzada y se presentan en la Tabla 6.4.

Como ya se señaló anteriormente, el último paso en la validación de un modelo es el proceso de “*scrambling*”, con el cual se comprueba que el modelo obtenido no se debe al azar. De este proceso se obtienen gráficas como la que se muestra a continuación para el modelo M3, Figura 6.11.

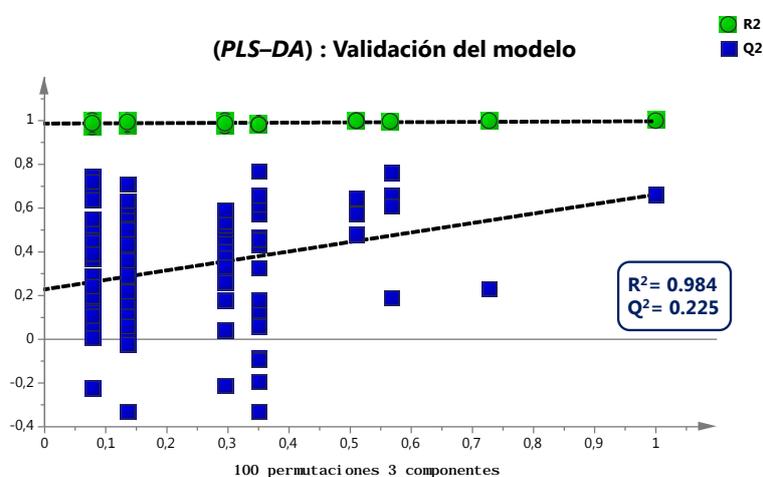


Figura 6.11. Gráfica resultado del proceso de “*scrambling*” para el modelo M3. En la parte superior derecha (el punto verde y el azul), se muestran los valores de  $R^2$  y  $Q^2$  del modelo original (en este caso del modelo M3) y desde ahí hacia la parte izquierda los valores de  $R^2$  y  $Q^2$  de los modelos generados tras las permutaciones. En el recuadro de color azul oscuro se presentan los valores de  $R^2$  y  $Q^2$  una vez realizadas las 100 permutaciones (valores de  $R^2$  y  $Q^2$  en su corte con el eje Y).

Tabla 6.4. Parámetros de los modelos *PLS-DA* (M1 y M3) y *OPLS-DA* (M2).

Modelo			Características	Valores Estándar
<i>PLS-DA</i>	M1 F vs NF	Parámetros	$R^2 = 0.989$	$Q^2 \geq 0.5$ [Bueno]
			$Q^2 = 0.699$	$Q^2 \geq 0.9$ [Excelente]
			$R^2-Q^2 = 0.29$	$R^2-Q^2 \leq 0.2-0.3$
		Parámetros "scrambling"	$R^2 = 0.967$	$R^2 \rightarrow 1$
			$Q^2 = 0.227$	$Q^2 \rightarrow 0$
M3 F_H vs NF_H	Parámetros	$R^2 = 0.995$	$Q^2 \geq 0.5$ [Bueno]	
		$Q^2 = 0.696$	$Q^2 \geq 0.9$ [Excelente]	
		$R^2-Q^2 = 0.299$	$R^2-Q^2 \leq 0.2-0.3$	
	Parámetros "scrambling"	$R^2 = 0.984$	$R^2 \rightarrow 1$	
$Q^2 = 0.225$		$Q^2 \rightarrow 0$		
<i>OPLS-DA</i>	M2 F vs NF	Parámetros	$R^2 = 0.992$	$Q^2 \geq 0.5$ [Bueno]
			$Q^2 = 0.701$	$Q^2 \geq 0.9$ [Excelente]
			$R^2-Q^2 = 0.291$	$R^2-Q^2 \leq 0.2-0.3$

A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que los tres modelos son válidos. Los valores de  $R^2$  y  $Q^2$  obtenidos en los modelos cumplen los requisitos establecidos, están dentro de los márgenes del estándar y al realizar las 100 permutaciones los valores son menores a los iniciales y cumplen con las condiciones establecidas.

Una vez realizada la validación del modelo se procedió al análisis de los resultados.

Para ambos modelos *PLS-DA*, M1 y M3, y para el modelo *OPLS-DA*, M2, los gráficos de “scores” muestran la diferenciación entre grupos; los modelos M1 y M2 entre no fumadores y fumadores, y el modelo M3 entre hombres no fumadores y hombres fumadores.

En los gráficos de “loadings” para los modelos M1 y M3 (Figuras 6.6 y 6.10) los puntos azules que aparecen en los extremos del gráfico representan el centro de masas de cada uno de los grupos, y en color verde aparecen los datos de la matriz X. Cada uno de estos puntos representa una relación  $m/z$  y un tiempo de retención ( $t_r$ ). Se puede observar como en los gráficos se concentra una masa de puntos verdes en el centro y al dirigirnos a los extremos, van apareciendo puntos aislados alejados del resto. Estos puntos son los que permiten diferenciar ambos grupos. Esto es, en el caso del modelo *PLS-DA* (M1) los puntos que se encuentran a la derecha del gráfico corresponden a los valores  $m/z$  que presentan un mayor peso en las muestras de fumadores. En el caso del modelo *PLS-DA* (M3), los puntos de la derecha del gráfico corresponden a los de mayor peso en las muestras de hombres fumadores. Estos puntos son los que se resaltan en la ampliación enmarcada con recuadro azul, Figuras 6.6 y 6.10. Se va a llevar a cabo la identificación de estos puntos ( $m/z$  y  $t_r$ ) ya que son posibles metabolitos urinarios relacionados con el consumo de tabaco.

Una vez que se han seleccionado los posibles candidatos a metabolitos asociados al consumo de tabaco, recogidos en la Tabla 6.5, se procede a comprobar que son picos cromatográficos reales, puesto que puede ocurrir que las variables representen zonas de ruido muy alto que no forman un pico como tal.

En este caso, para el modelo M1, sólo dos de las variables indicadas en la Tabla 6.5 eran picos cromatográficos, los de ID 171 e ID 1325. Esto mismo ocurría con el modelo M2, solo siendo válidas las variables con ID 2110 e ID 2151. Mientras que para el modelo M3 solamente se encontró una variable nueva (algunas variables estaban ya incluidas en el modelo M1), con ID 2807.

Tabla 6.5. Identificación de las variables de los posibles candidatos a metabolitos urinarios relacionados con el consumo de tabaco que se obtienen de los gráficos de “loadings” de los modelos *PLS-DA*, M1 y M3 y el modelo *OPLS-DA*, M2.

Modelo	ID	m/z	t <sub>r</sub> (min)
<b>M1</b> ( <i>PLS-DA</i> , F vs NF)	1007	137.009	0.5723
	2136	164.930	2.6564
	399	178.089	4.4449
	2575	178.878	0.6604
	1025	178.881	0.6692
	2112	178.881	0.6608
	2122	180.878	0.6532
	568	181.055	1.7947
	<b>171</b>	<b>194.950</b>	<b>0.5803</b>
	<b>1325</b>	<b>197.061</b>	<b>0.5382</b>
	2968	197.076	0.5398
<b>M2</b> ( <i>OPLS-DA</i> , F vs NF)	1325	197.047	0.5382
	2575	178.878	0.6604
	2122	180.878	0.6533
	1025	178.881	0.6692
	399	178.089	4.4449
	568	181.055	1.7947
	171	194.950	0.5803
	2968	197.076	0.5398
	<b>2110</b>	<b>176.935</b>	<b>0.5060</b>
	1007	137.009	0.5723
	2112	178.881	0.6608
	<b>2151</b>	<b>225.056</b>	<b>0.5723</b>
	2136	164.930	2.6564
	758	197.062	0.5426
2282	174.965	2.0483	

Tabla 6.5 (Continuación). Identificación de las variables de los posibles candidatos a metabolitos urinarios relacionados con el consumo de tabaco que se obtienen de los gráficos de “loadings” de los modelos *PLS-DA*, M1 y M3 y el modelo *OPLS-DA*, M2.

Modelo	ID	m/z	t <sub>r</sub> (min)
	1007	137.009	0.5723
	<b>2807</b>	<b>158.077</b>	<b>0.5164</b>
	2136	164.930	2.6564
	2296	164.931	3.1688
	1012	174.956	1.2534
	904	174.958	2.9930
<b>M3</b> ( <i>PLS-DA</i> , H_F vs H_NF)	2282	174.965	2.0483
	399	178.089	4.4449
	2575	178.878	0.6604
	1025	178.881	0.6692
	2112	178.881	0.6608
	2122	180.878	0.6533
	171	194.950	0.5803
	2887	245.002	2.2913

Se procedió a la identificación de estas variables para posteriormente poder llevar a cabo un análisis estadístico.

Para la identificación de los candidatos, se recurrió a la base de datos *Human Metabolome Database*, *HMDB*, la cual contiene 41.993 metabolitos.

Se introdujeron las relaciones m/z teniendo en cuenta que estos analitos se han ionizado mediante *ESI(-)*. En un principio los analitos se buscaron con un error de 0.01 Da con respecto a la masa del compuesto identificado como posible marcador de diferencias entre ambos grupos, fumadores y no fumadores. La búsqueda se hacía sin especificar aducto, como aducto desconocido, pero para acotarla y hacerla un poco más fácil también se buscó el aducto [M-H].

En caso de que con el error de 0.01 Da no se encontrasen resultados, posibles aductos [M-H], lo que se hizo fue ampliar el error hasta 0.02 y 0.03 Da, deteniéndose en el momento en el que se encontrase algún aducto desprotonado que pudiera ajustarse a nuestra búsqueda. Los resultados obtenidos para la identificación más probable de dichos metabolitos se muestran en la Tabla 6.6.

Tabla 6.6. Datos obtenidos de la identificación de las variables ID 171, con m/z 194.950; ID 1325, con m/z 197.061; ID 2110, con m/z 176.935; ID 2151, con m/z 225.056 e ID 2807, con m/z 158.077.

ID	m/z	t <sub>r</sub>	Busqueda en <i>HMDB</i>		
			Error (Da)	Nº Aductos desconocidos	Nº Aductos [M-H]
171	194.950	0.5803	0.01	12	Sin resultados
			0.02	22	Sin resultados
			0.03	33	Sin resultados
1325	197.061	0.5382	0.01	77	5
			0.02	194	14
2110	176.935	0.5060	0.01	8	Sin resultados
			0.02	12	Sin resultados
			0.03	24	Sin resultados
2151	225.056	0.5723	0.01	134	4
			0.02	222	9
			0.03	304	15
2807	158.077	0.5164	0.01	33	14

Como se observa en la Tabla 6.6 para el ID 171 y el ID 2110 no fue posible encontrar ningún aducto [M-H], aún con un error de 0.03 Da, por lo que para estos dos compuestos, hasta el momento, no hay aductos conocidos con la misma m/z de estos posibles metabolitos diferenciadores entre fumadores y no fumadores. En cambio, para el resto de compuesto sí.

Para el ID 1325, con un error de 0.01 Da, se encontraron 5 posibles aductos [M-H]; de esos 5 aductos, ningún compuesto era susceptible de ionizarse en modo *ESI(-)* por lo que se volvió a realizar la búsqueda ampliando el error a 0.02 Da. Al aumentar el error también aumentaron los posibles aductos [M-H] hasta un número de 14. De los resultados obtenidos, el único aducto que podría estar relacionado con el consumo de tabaco era 3-hidroxi-4-metoximandelato (HMDB 29170). Este compuesto tiene una masa molecular monoisotópica de 198.053, por lo que una ionización en modo negativo para generar el ion [M-H]<sup>-</sup> se correspondería con el valor de m/z detectado. La base de datos *HMDB* lo describía de la siguiente manera, “ácido orgánico urinario utilizado para la detección de enfermedades metabólicas hereditarias”. Sin embargo, si bien es un metabolito asociado a la excreción urinaria, no presenta relación directa con el estudio que se lleva a cabo en este trabajo.

Para el ID 2151 se llevó a cabo la búsqueda con un error inicial de 0.01 Da. De esta búsqueda se encontraron 4 aductos [M-H], pero ninguno de esos 4 compuestos estaba relacionado con el consumo de tabaco, ni tampoco con fluidos biológicos, por lo que se amplió la búsqueda aumentando el error a 0.02 Da. En esta nueva búsqueda se obtuvieron 9 posibles candidatos, pero ocurría lo mismo, por lo que se amplió el error a 0.03 Da. En este caso se encontraron 15 aductos posibles con m/z 225.056, de los cuales, solo uno de ellos, el ácido 4-hidroxi-(3,4-dihidroxiifenil) valerico, según la base de datos, *HMDB* estaba asociado a fluidos biológicos, “el ácido 4-hidroxi-(3,4-dihidroxiifenil) valerico es un metabolito polifenol detectado en fluidos biológicos”. Este compuesto podría ser un posible diferenciador entre ambos grupos, fumadores y no fumadores, pero para ello se requerirían estudios más específicos, los cuales se escapan a nuestra área de conocimiento.

Por último, para el compuesto identificado como ID 2807, la búsqueda en la base de datos *HMDB* con un error de 0.01 Da, daba como resultado 14 posibles compuestos para esa relación m/z 158.077. De todos ellos, el segundo compuesto que aparecía en la búsqueda, 2-metilbutirilglicina, era el único asociado a la excreción urinaria, pero tampoco estaba asociado al consumo de tabaco, aunque según la descripción que aparecía en la *HMDB* se encontraba asociado a procesos de oxidación de los ácidos grasos, que pueden estar asociados a procesos de estrés

oxidativo provocado por la composición del humo de tabaco. Según la HMDB “2-metilbutirilglicina es una acil glicina. Las acil glicinas son normalmente metabolitos menores de los ácidos grasos. Sin embargo, su excreción se incrementa en varios errores congénitos del metabolismo. En ciertos casos, la medición de estos metabolitos en los fluidos corporales se puede utilizar para diagnosticar trastornos asociados con la beta-oxidación de ácidos grasos mitocondriales. También se ha encontrado en la orina de pacientes con deficiencia de propionil-CoA carboxilasa después de consumir isoleucina. Su concentración es elevada en la orina de pacientes con aciduria glutárica II y en encefalopatía etilmalónica”. Por lo que sería muy interesante ampliar el estudio sobre este compuesto, haciendo análisis dirigidos y más específicos.

Por tanto, en ninguno de los casos, los candidatos encontrados pueden ser relacionados con una estructura química de un nucleósido modificado, del tipo de los analitos estudiados en este trabajo. Tampoco pudieron ser relacionados de forma directa con el consumo de tabaco.

Se procedió a su integración manual en los cromatogramas de las muestras de orina analizadas. Los valores obtenidos fueron normalizados con respecto a la concentración de creatinina, determinada para cada muestra de orina, como se indica (Capítulo III, Apartado 3.4.1). En este caso, como no se realizó un calibrado, no pueden darse valores de concentración, únicamente se determinaron las áreas de pico para establecer la existencia de diferencias significativas.

Las áreas normalizadas frente a la concentración de creatinina, valor característico de cada muestra (Figura 6.12), fueron sometidas a un análisis estadístico con el fin de comprobar la posible existencia de diferencias significativas entre ambos grupos. Para ello se realizó un test-t para muestras independientes obteniéndose, para los candidatos correspondientes a las variables ID 171 e ID 2807, un valor de  $p=0.04$ . Para los metabolitos correspondientes a las variables ID 2110 e ID 2151 se obtuvo un valor de  $p=0.02$  en ambos casos. Por último, para el metabolito con variable ID 1325 se obtuvo un valor de  $p=0.03$ .

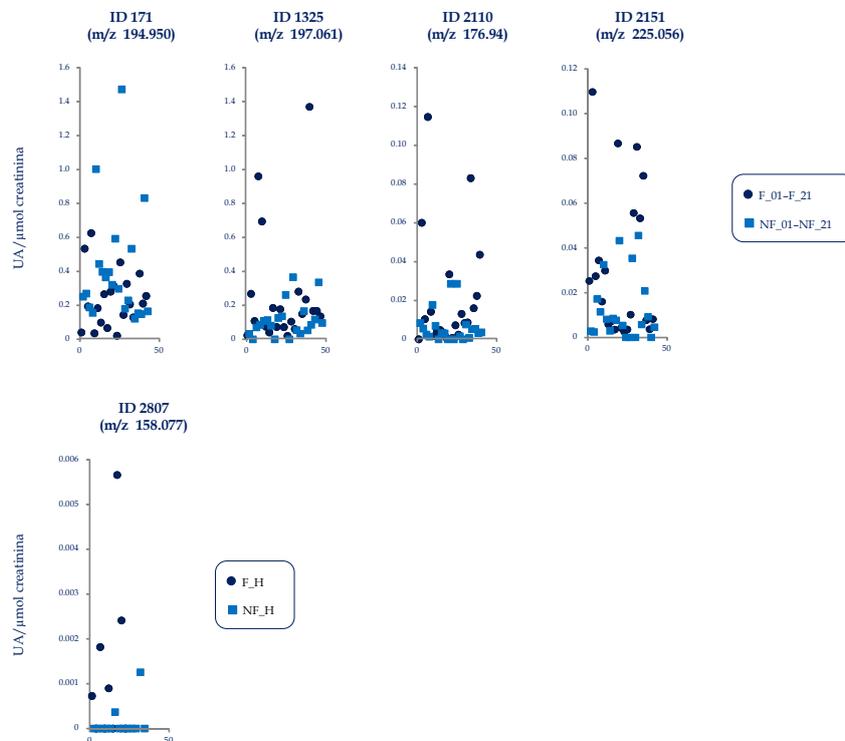


Figura 6.12. Representación de los valores obtenidos de la integración de los picos en unidades arbitrarias (UA) divididos por los  $\mu\text{mol}$  de creatinina obtenidos para cada muestra. En color azul oscuro se representan los valores obtenidos para los voluntarios fumadores y los hombres sanos fumadores y en color azul claro están representados los valores obtenidos para los voluntarios no fumadores y para los hombres sanos no fumadores.

Cabe resaltar que el metabolito identificado como ID 171 no sigue el comportamiento del resto de los compuestos. En vez de aumentar su concentración en las muestras de fumadores disminuye, por lo que se podría decir que es un compuesto que es inhibido por el consumo de tabaco.

Resaltar que para los cinco metabolitos considerados se obtuvieron valores de  $p$  inferiores a 0.05, lo que conduce a la conclusión de que es posible rechazar la hipótesis nula con los datos experimentales obtenidos, o lo que es lo mismo, consideran que las poblaciones de las que se han obtenido los resultados (no fumadores y fumadores) no son estadísticamente iguales para estos posibles metabolitos urinarios.

Sin embargo, se obtiene un valor de  $p$  superior a 0.01, por lo que, dependiendo del criterio empleado para el nivel de significación también se podría llegar a la conclusión de que no existen diferencias significativas siendo necesarios análisis dirigidos que permitiesen obtener resultados más concluyentes.

A la vista de los resultados obtenidos del análisis no dirigido de muestras de orina de fumadores habituales y no fumadores, por el cual se realizaba una comparación de los perfiles metabólicos de ambos grupos se concluye que existen cinco posibles compuestos, ID 171, ID 1325, ID 2110, ID 2151 e ID 2807, que podrían diferenciar a los individuos según su condición de fumador o no.

Ninguno de ellos pudo ser identificado de forma concluyente en la base de datos consultada y tampoco pudieron ser relacionados de forma directa con el hábito de consumo de tabaco.

Por tanto, el estudio no dirigido de la huella metabólica de fumadores y no fumadores presenta diferencias con significado estadístico ( $<0.05$ ) pero no en cuanto a los nucleósidos modificados, objeto de estudio en esta Tesis Doctoral.

Queda fuera de esta investigación el estudio de la posible relación entre el consumo de tabaco y la presencia de otro tipo de metabolitos relacionados con enfermedades hereditarias.

## 6.4. CONCLUSIONES.

El análisis de las muestras de orina de fumadores y no fumadores se completó con un estudio mediante la metodología *LC-TOF* que permitió la identificación de los analitos por determinación de su masa exacta. En este estudio se mantiene la etapa de tratamiento de muestra con el material de acceso restringido, *RAM*, descrita anteriormente, pero se optimizaron los parámetros que afectan a la separación cromatográfica en la modalidad de fase inversa.

Se realizó un primer análisis de metabolitos diana que permitió confirmar, por masa exacta, la identidad de los 5 nucleósidos en estudio en las muestras de orina. La menor sensibilidad del *TOF* hizo imposible su cuantificación en la mayoría de las muestras, debido a la baja concentración en que se encuentran en la orina, tanto de fumadores como de no fumadores.

El segundo análisis realizado fue un análisis no dirigido de la huella metabólica (*metabolic fingerprinting*) orientado a la búsqueda de posibles diferencias significativas en los perfiles metabólicos de las muestras de fumadores y no fumadores. A partir del estudio de estos perfiles se podrían identificar otros posibles metabolitos asociados al consumo de tabaco, responsables de las diferencias entre ambos grupos de muestras.

Se generaron modelos con todas las combinaciones posibles teniendo en cuenta variables como sexo, edad y condición de fumador y no fumador. Solo fueron validos aquellos que enfrentaban las muestras de fumadores y las de no fumadores, sin diferenciar en cuanto a sexo o edad.

A partir de estos resultados se llegó a la conclusión de que existían diferencias significativas en el perfil metabólico de fumadores y no fumadores. Sin embargo, ninguno de los metabolitos responsables de estas diferencias pudo ser relacionado con el consumo de tabaco en la búsqueda llevada a cabo en la base de datos de *Human Metabolome Database (HMDB)*.

Se obtienen, nuevamente, unos resultados similares a los obtenidos en el capítulo anterior, que indican que no existe evidencia experimental de que, en individuos sanos, el consumo de tabaco sea un factor adicional en el incremento de los niveles de estos nucleósidos en orina. Conviene resaltar, otra vez, que este muestreo está limitado a una población de edad media-baja y se requeriría la ampliación a fumadores y no fumadores de edad más avanzada, para poder dar una interpretación adecuada.

Finalmente, resaltar que este estudio no tiene ninguna pretensión dentro del campo toxicológico ni del diagnóstico clínico. Sólo se pretende mostrar un campo de aplicación donde los nuevos desarrollos en metodologías analíticas pueden ser de gran interés.



VII

CONCLUSIONES GENERALES



El trabajo descrito en esta memoria consiste en el desarrollo de nuevas metodologías basadas en electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas para la separación, identificación y cuantificación de un conjunto de nucleósidos, nucleobases y algunos de sus derivados metilados e hidroxilados, en muestras de orina. El trabajo se completa con un estudio no dirigido, para la búsqueda e identificación de posibles metabolitos asociados al consumo de tabaco.

En los capítulos correspondientes se han descrito las conclusiones particulares de cada uno de estos estudios. Aquí se resumen las conclusiones generales más relevantes.

#### DETERMINACIÓN MEDIANTE *CE-ESI-MS*.

1. Se han puesto a punto dos nuevos métodos de análisis basados en electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas (*CE-MS*) para la determinación de nucleósidos excretados en orina. En ambos métodos se utiliza la modalidad de electroforesis capilar zonal (*CZE*) bien en medio ácido, para la separación de compuestos susceptibles de generar especies catiónicas, o en medio alcalino, para la separación de especies aniónicas.
2. La detección mediante espectrometría de masas se realiza en un analizador de cuadrupolo sencillo, con una fuente de ionización de electrospray de tipo coaxial, funcionando en modo positivo, *ESI(+)*, o negativo, *ESI(-)*, dependiendo de las posibilidades de ionización de los compuestos en estudio.

#### APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE ORINA.

3. La aplicación a muestras de orina de individuos sanos pone de manifiesto los distintos niveles de concentración en que está presente cada analito, de forma natural, en la orina de un mismo individuo, y además, la gran variabilidad en que se encuentra un mismo compuesto entre individuos.

## VII. CONCLUSIONES GENERALES

---

4. Para los analitos que se encuentran a niveles de concentración altos (7mGua, 1mA y A) se propone un método de cuantificación mediante calibrado en orina sintética, como alternativa al método de adición estándar. Los resultados obtenidos fueron confirmados mediante *LC-MS/MS*.
5. Para los analitos que se encuentran a niveles de concentración medios y bajos (como Gua, 1mGua, 9mGua, Cyt, 7mG y G en medio ácido, y los derivados hidroxilados en medio alcalino) se han desarrollado etapas de tratamiento de muestra basadas en extracción en fase sólida (*SPE*), con sorbentes de tipo polimérico, y en la utilización de materiales de acceso restringido (*RAM*), de forma que se facilita la detección y cuantificación de los analitos a la vez que se preserva el equipo instrumental.

### DETERMINACIÓN DE NUCLEÓSIDOS MODIFICADOS EN MUESTRAS DE ORINA DE FUMADORES Y NO FUMADORES.

6. La metodología *RAM/CE-ESI(-)MS*, desarrollada para la determinación de especies aniónicas, como los derivados hidroxilados 8OHG y 8OH2dG, ha sido aplicada al estudio de estos compuestos en muestras de orina de donantes sanos fumadores y no fumadores, con objeto de comprobar si existe alguna diferencia significativa en la concentración de estos analitos entre ambos grupos.
7. El muestreo se realizó a partir de 42 muestras de orina de voluntarios sanos, 21 fumadores y 21 no fumadores, equilibradas en cuanto a sexo y edad.
8. Los resultados experimentales obtenidos, validados mediante *LC-MS/MS*, indican que, para el grupo de compuestos analizados no existen diferencias significativas entre las muestras de orina de fumadores y no fumadores.

APLICACIÓN AL ESTUDIO DE METABOLITOS ASOCIADOS AL CONSUMO DE TABACO.

9. Las muestras de orina de fumadores y no fumadores fueron analizadas con un analizador de tiempo de vuelo acoplado a un cromatógrafo de líquidos (*LC-TOF*) utilizando el material *RAM* como etapa de limpieza previa.
10. El análisis de metabolitos diana (*metabolite target analysis*) aplicado a los derivados hidroxilados 8OHG y 8OH2dG, junto a 5mU, 2dG e INN permitió confirmar, por masa exacta, la identidad de los 5 compuestos estudiados. Sin embargo, la menor sensibilidad del *TOF* dificulta su cuantificación en la mayoría de las muestras debido a la baja concentración en que se encuentran estos compuestos de forma natural, tanto en orina de fumadores como de no fumadores.
11. El estudio no dirigido de la huella metabólica (*metabolic fingerprinting*) de estas muestras de orina, de fumadores y no fumadores, concluye que ambas poblaciones no muestran diferencias significativas en cuanto a estos compuestos endógenos. Tampoco es posible su discriminación en base a compuestos derivados de la ruta metabólica de la nicotina.

De forma global, se puede concluir que las metodologías desarrolladas en este trabajo, basadas en el acoplamiento de electroforesis capilar con espectrometría de masas, *CE-ESI-MS*, son rápidas y robustas, resultando apropiadas para la determinación de estos nucleósidos y nucleobases modificados en muestras de orina.

En su aplicación al análisis de orina de fumadores y no fumadores, los resultados experimentales aquí descritos no muestran evidencias de que, en individuos sanos, el consumo de tabaco sea un factor adicional en el aumento de los niveles de estos nucleósidos hidroxilados en orina, con respecto a los valores de referencia en individuos sanos no fumadores. Sin embargo, no hay que olvidar que el muestreo es limitado y que, por tanto, puede considerarse como un estudio preliminar.

## VII. CONCLUSIONES GENERALES

---

Finalmente, es importante resaltar que el objeto de estos estudios es mostrar un posible campo de aplicación de las metodologías propuestas, como herramientas de análisis, sin ninguna pretensión dentro del campo del diagnóstico clínico, que obviamente queda fuera de nuestros conocimientos.

VIII

ARTÍCULOS PUBLICADOS



- “*Capillary electrophoresis–mass spectrometry for direct determination of urinary modified nucleosides. Evaluation of synthetic urine as a surrogate matrix for quantitative analysis*”, *J. Chromatogr. B* 942–943 (2013) 21–30.
- “*Development of a procedure for the isolation and enrichment of modified nucleosides and nucleobases from urine prior to their determination by capillary electrophoresis–mass spectrometry*”, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 88 (2014) 489–496.
- “*Adenosine monophosphate is elevated in the bronchoalveolar lavage fluid of mice with acute respiratory toxicity induced by nanoparticles with high surface hydrophobicity*”. *Nanotoxicology* 9(1) (2015) 106–115.





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chromb](http://www.elsevier.com/locate/chromb)

## Capillary electrophoresis–mass spectrometry for direct determination of urinary modified nucleosides. Evaluation of synthetic urine as a surrogate matrix for quantitative analysis



Encarnación Rodríguez-Gonzalo\*, Raquel Hernández-Prieto,  
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 12 July 2013

Accepted 11 October 2013

Available online xxx

#### Keywords:

Nucleosides

Direct analysis

Synthetic urine

Surrogate matrix

Capillary electrophoresis

Mass spectrometry

### ABSTRACT

This work describes the development of a fast and reliable method based on capillary zone electrophoresis coupled with electrospray ionization–mass spectrometry (CZE–ESI–MS) for the determination of modified nucleosides in untreated human urine. The target compounds were guanine, 1-methyl-guanine, 7-methyl-guanine, 9-methyl-guanine, adenosine, 1-methyl-adenosine, cytidine, guanosine, 7-methyl-guanosine. As internal standards, ribose-2-<sup>13</sup>C-adenosine and 8-<sup>13</sup>C-guanine were used. The CZE separation was carried out in acidic medium (pH 2.5). MS detection with a single quadrupole, with ESI operating in positive-ion mode, was optimized. For the analysis of urine samples, owing to the endogenous character of these analytes different quantification strategies were explored. The standard additions method, matrix-matched calibration in synthetic urine and calibration in pure aqueous medium were compared in order to evaluate the endogenous levels of these compounds in human urine. The results obtained showed that calibration in synthetic urine as a surrogate matrix was an appropriate alternative to the method of standard additions for the accurate quantitation of compounds such as guanine, 1-methyl-guanine, 7-methyl-guanine, adenosine, 1-methyl-adenosine and cytidine by CE–ESI–MS directly in the urine matrix; values in the range 0.1 µg/mL for cytidine and 6.4 µg/mL for 7mGua, as the lowest and the highest level, were found in untreated urine from healthy volunteers. These results were confirmed by LC–MS/MS detection. It can be concluded that the electrophoretic CZE–ESI–MS methodology offers a valid and reliable alternative for the determination of urinary nucleosides at naturally occurring levels in healthy individuals.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The detection and quantification of certain endogenous metabolites such as free and modified nucleosides present in biological fluids (urine, blood and saliva) have aroused considerable interest in recent years owing to their usefulness as non-invasive diagnostic and/or follow-up methods for certain pathologies (tumoral processes, degenerative diseases... ) and, in general, as a contribution to knowledge of the metabolic response of living organisms to physiopathological stimuli.

Free and modified nucleosides are degradation products of nucleic acids that are naturally present in human urine. This is due to a fundamental metabolic process called metabolic re-exchange of ribonucleic acid (RNA), during which the action of hydrolytic enzymes such as ribonucleases and phosphatases release normal

and modified nucleosides during RNA regeneration, mainly transfer RNA (tRNA). Unmodified nucleosides undergo re-use and degradation, becoming transformed into uric acid (in the case of the analytes guanosine and adenosine), into β-alanine (in the case of cytidine and uridine) and β-aminoisobutyrate [1,2]. By contrast, modified nucleosides cannot be re-used or undergo later degradation, such that they circulate freely through the blood stream until they are eliminated in the urine. This natural metabolic process is enhanced in the presence of phenomena associated with cell ageing, carcinogenesis and neurodegeneration, and also with other diseases that course with strong metabolic disorders.

Modified nucleosides excreted in urine have been studied to examine their biomedical significance as possible biomarkers for cancer and other diseases (rheumatoid arthritis, encephalomyopathy, Alzheimer's and AIDS). It has also been suggested that the quantification of urinary levels of modified nucleosides might be useful for premature cancer diagnosis. However, these biomarkers lack sufficient specificity for their use as single diagnostic tests since descriptions have been made of alterations of the urinary levels of

\* Corresponding author. Tel.: +34 923 294 483; fax: +34 923 294 483.  
E-mail address: [erg@usal.es](mailto:erg@usal.es) (E. Rodríguez-Gonzalo).

modified nucleosides in cases of benign diseases and indulgence in certain life-style habits such as smoking, excessive sports activities, fatigue, stress, exposure to toxic compounds. . .). Accordingly, a highly active field of current research is devoted to assessing the possibility of using modified nucleosides to distinguish between cancer and other diseases. It is therefore important to stress that the clinical use of modified nucleosides and nucleobases is complementary to already known diagnostic methods. Another possible use of interest for these biomarkers is the follow-up of patients being treated for cancer, for monitoring the response to therapy, and in post-operative recurrences. If a marker or group of markers is available for a given type of cancer, it is much easier to check treatment efficacy by following the evolution of these compounds instead of repeating other much more costly tests.

Different analytical techniques have been reported for the determination of nucleosides, immunoassay [3-5] and, mainly, liquid chromatography with spectrophotometric [6-13] or MS detection [14,15] being the most widely employed. Application of capillary electrophoresis for the separation of modified nucleosides has also been reported [16-21] but in most cases the methods are based on MEKC procedures, which involve the use of surfactants in the separation medium. This hinders the application of MS detection coupled with CE.

Capillary electrophoresis (CE) is highly suitable for application in the analysis of biological samples since it is a technique that is compatible with aqueous media and is appropriate for the separation of highly polar analytes, both ionic and ionizable. These characteristics are seen in most of the metabolites found in biological fluids such as urine.

Capillary Electrophoresis offers a good alternative to chromatographic methods for the analysis of hydrophilic compounds. Capillary zone electrophoresis (CZE) has the advantage of separating charged analytes whereas reversed-phase LC separates analytes according to their interaction with the hydrophobic stationary phase. As a result, polar charged species are often not well separated by reversed-phase LC. Especially in these cases, CE represents a valid alternative to consider.

Other attractive features of CE are its general applicability to a broad range of analytes (from ions and small molecules to macromolecules), excellent separation efficiency, high speed of analysis, high versatility in terms of separation modes and, additionally, reduced sample and solvent consumption. Additionally, CE-MS coupling has the advantages inherent to capillary electrophoresis as a high-efficacy separation technique with the ability to identify compounds by mass spectrometric detection.

The aim of this work is to develop a fast and efficient analytical methodology based on CE-MS that permits quantitative assessment of the urinary levels of these compounds in untreated samples, and thus the method may be easily applied in clinical analysis for preventive uses or for follow-up in therapies.

The interest in urinary modified nucleosides as biomarkers for malignant diseases and, especially, their possible use for premature cancer diagnosis, has created the need for reliable analytical methods to quantify these compounds in human urine accurately.

Quantitative determination of modified nucleosides in urine is complicated by the endogenous presence of these analytes [22]. Another issue associated with quantitative bioanalytical methods based on MS detection is the so-called matrix effect, i.e., an alteration in the response due to the presence of coeluting compounds that may increase or reduce ionization of the analyte (ion enhancement/suppression) in the mass spectrometer source. Matrix-dependent signal suppression or enhancement represents a major drawback in quantitative bioanalysis based on MS detection. This issue has been widely discussed in the literature [23-27] related to LC-MS since this technique is currently one of the main approaches used for the quantitative analysis of small molecules

in biological samples. However, the literature addressing this issue when CE-MS is applied is still scarce.

Several strategies have been suggested to minimize the interferences of matrix components that are not fully resolved such as the use of effective sample pre-treatment steps to reduce the presence of interfering compounds in the final extract or the use of another ionization source. Alternatively, an appropriate calibration technique must be used to compensate for the signal alterations. The standard additions method represents the most-effective way to compensate for the adverse influence of the matrix [28]. Calibration with external matrix-matched standards is often proposed if analyte-free matrices are available. Another approach to compensate for matrix effects is based on the use of an adequate internal standard (structural analogue or isotopically labeled internal standard ILS) [29]. It is generally believed that the use of an ILS corrects for any matrix effects, but data reported in literature indicate that this issue needs proper attention [30,31].

Here we evaluated synthetic urine as a surrogate matrix for the accurate quantitation of these compounds by CE-ESI-MS, since no analyte-free samples of the authentic matrix are available. The standard additions method was used to evaluate the urinary levels of these naturally occurring compounds in healthy volunteers. Moreover, a comparison between the results obtained with CE-ESI-MS and another different method using LC-MS/MS in hydrophilic interaction chromatography mode coupled to a triple quadrupole detector is described. The results demonstrated that the new electrophoretic methodology constitutes a valid and reliable alternative for the accurate quantitative determination of the urinary levels of modified nucleosides in healthy individuals.

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals

The analytical standards corresponding to *guanine* (Gua), CAS RN [73-40-5]; *7-methyl-guanine* (7mGua), CAS RN [578-76-7]; *1-methyl-guanine* (1mGua), CAS RN [938-85-2]; *9-methyl-guanine* (9mGua), CAS RN [5502-78-3]; *1-methyl-adenosine* (1mA), CAS RN [15763-06-1]; *cytidine* (Cyt), CAS RN [65-46-3]; *guanosine* (G), CAS RN [118-00-3]; *adenosine* (A), CAS RN [58-61-7]; *7-methyl-guanosine* (7mG), CAS RN [20244-83-4] were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Isotopically Labeled Internal Standards (ILISs), *8-<sup>13</sup>C-guanine* (<sup>13</sup>C-Gua) 98% and *ribose-2-<sup>13</sup>C-adenosine* (<sup>13</sup>C-A) 99%, were purchased from Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Massachusetts, USA).

Formic acid (>98%) and acetic acid (>98%) were from Fluka (Steinheim, Germany). Acetonitrile (ACN) and Methanol (MeOH) were of HPLC grade (Merck, Darmstadt, Germany). Ammonium formate (>98%) was from Riedel-de Hën (Hannover, Germany). Ammonia (solution at 25%) and 2-propanol were obtained from Scharlau (Barcelona, Spain). Ultra-high quality (UHQ) water was obtained with a Wasserlab water purification system (Noáin, Spain). All other chemicals were of analytical grade.

### 2.2. Instrumentation

All experiments were carried out with a Hewlett-Packard HP<sup>3D</sup> CE instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a UV-visible DAD device working at 260 nm with a bandwidth of 16 nm. MS was performed using an Agilent LC/MSD SL mass spectrometer (Agilent Technologies) 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.

Fused-silica capillaries (75  $\mu\text{m}$  i.d., 375  $\mu\text{m}$  o.d.) from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA), supplied by Composite Metal Services Ltd (West Yorkshire, UK), were used throughout the work. For CE-MS analysis, fused-silica capillaries (75  $\mu\text{m}$  ID) with a total length of 87.5 and 20 cm to the UV detector were used; for CE-DAD analysis, the total capillary length was 58.5 cm and the effective length was 50 cm.

CE separation buffers and injection samples were placed in 1700- $\mu\text{L}$  disposable amber glass vials with pre-perforated polyurethane caps (Agilent, Waldbroon, Germany).

### 2.3. CZE separation conditions

The running buffer (background electrolyte, BGE) was an aqueous solution of 100 mM formic acid-ammonium formate (pH 2.5). Injections were made at the anodic end, using a pressure of 50 mbar for 8 s. Electrophoretic separation was achieved with a voltage of 25 kV (normal polarity mode, detector at the cathodic end), with an initial ramp of 7 s. The temperature of the capillary was kept constant at 25 °C. Before its first use, the capillary was conditioned by flushing with the BGE for 10 min at 4 bar. This was also implemented as a daily start-up procedure. After each run, the capillary was rinsed at 4 bar for 1 min with fresh running buffer.

### 2.4. ESI-MS conditions

MS was performed using an Agilent LC/MSD SL mass spectrometer equipped with a single quadrupole analyzer. An Agilent coaxial sheath-liquid sprayer was used for CZE-ESI-MS coupling (Agilent Technologies). The sheath liquid consisted of 1:1 (v/v) isopropanol:UHQ water (7.5 mM acetic acid) and was delivered at a flow rate of 0.78  $\mu\text{L}/\text{min}$  by an Agilent 1100 series pump, equipped with a 1:100 flow-splitter. The electrospray ESI voltage was set at +3500 V. Other ESI parameters under optimum conditions were: nebulizing gas pressure, 10 psi; drying-gas flow rate, 7 L/min; drying gas temperature, 150 °C. The optimized fragmentor voltage was 100 V for all analytes.

The mass spectrometer was operated in the positive-ion mode (ESI+). Analyte quantification was carried out under the selected ion monitoring (SIM) acquisition mode using protonated molecules  $[\text{M} + \text{H}]^+$ . A narrow isolation width of 1 u and dwell times of 52 ms were selected.

### 2.5. Preparation of standard solutions and quantitation

The initial stock standard solutions for the Gua (250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 7mGua, 1mGua, 9mGua, 1 mA, Cyt, G, A, 7mG (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were prepared in acidified UHQ water (HCl 0.1 M). Two isotopically labeled internal standards (ILISs) were used: ribose-2- $^{13}\text{C}$ -adenosine ( $^{13}\text{C}$ -A) for free and modified nucleosides (A, 1mA, Cyt, G, 7mG), and 8- $^{13}\text{C}$ -guanine ( $^{13}\text{C}$ -Gua) for the nucleobases (Gua, 1mGua, 7mGua, 9mGua); they were prepared in acidified UHQ water at 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . These stock solutions were stored at 4 °C in brown glass bottles.

Analyte quantification was carried out under SIM acquisition mode using protonated molecules,  $[\text{M} + \text{H}]^+$ . The quantitative variable used was the ratio between the peak area generated by the ion of each analyte, expressed in arbitrary units, and the peak area generated by the ILIS.

The values of the limits of quantification (LOQ), calculated from a signal to noise ratio of 10, between 0.10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for Cyt, G and 9mGua and 0.36  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 1mA were obtained.

### 2.6. Urine samples

Human urine samples from healthy volunteers (numbered from H1 to H5) were used to implement the method. 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 filtered through 0.22  $\mu\text{m}$  filters. A 1500- $\mu\text{L}$  aliquot of natural urine was collected, adding 25  $\mu\text{L}$  of a standard solution (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of  $^{13}\text{C}$ -Gua and  $^{13}\text{C}$ -A, and then injected in the CE-MS instrument without any further treatment.

The urinary levels of the nucleosides were related to the urinary creatinine concentration which is a standard way to express the urinary levels of endogenous metabolites. This is justified because the excretion of creatinine is fairly constant over a longer time interval and allows randomly collected urine to be used instead of 24 h urine samples [32].

All urinary analyte concentrations were normalized against creatinine and expressed as nmol analyte/ $\mu\text{mol}$  creatinine. Urinary creatinine levels [33] were determined by a modified Jaffé method, based on the reaction between creatinine and picric acid, using photometric detection. The data on creatinine concentrations in the urine samples from the healthy volunteers were 0.99, 0.51, 0.52, 1.09, 0.74 in mg/mL, respectively for H1 to H5.

Normalization of the concentration values with respect to the creatinine content of the urine samples was accomplished using the following expression:

$$C_{\text{Norm}} \text{ (nmol}/\mu\text{mol}_{\text{creat}}) = \frac{C_{\text{without Norm}} (\mu\text{g}/\text{mL})}{C_{\text{creat}} (\text{mg}/\text{mL}) \times M_{\text{Wanalyte}}} \times M_{\text{Wcreat}}$$

where  $C_{\text{Norm}}$  is the normalized concentration expressed in units of nmol/ $\mu\text{mol}$  of creatinine;  $C_{\text{without Norm}}$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) is the non-normalized concentration obtained with the standard additions method,  $M_{\text{Wcreat}}$  and  $M_{\text{Wanalyte}}$  represent the molecular weight of creatinine and the analyte, respectively, and  $C_{\text{creat}}$  (in mg/mL) is the creatinine concentration, characteristic of each individual ( $M_{\text{Wcreat}}$ , 113.12 g/mol).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Optimization of CZE separation in acid medium

Owing to the scarce bibliography referring to the electrophoretic separation of these analytes in capillary zone electrophoresis (CZE) the electrophoretic behavior of nucleosides and nucleobases in different separation media – acid and basic medium – was first explored with a view to examining the possibilities offered by CZE in the separation of the analytes studied. To accomplish this, we used a UV diode-array detector (DAD) coupled with the CZE system.

The target compounds were guanine, 1-methyl-guanine, 7-methyl-guanine, 9-methyl-guanine; adenosine, 1-methyl-adenosine, cytidine, guanosine, 7-methyl-guanosine. As internal standards two isotopically  $^{13}\text{C}$  labeled compounds, ribose-2- $^{13}\text{C}$ -adenosine and 8- $^{13}\text{C}$ -guanine, were used. Their structures are shown in Fig. 1.

It was observed that by using acidic medium as running buffer (100 mM formic acid, pH 2.5) these analytes were susceptible to becoming protonated and hence to migrating electrophoretically, which allows their separation with CZE.

In order to find the most suitable conditions, we performed a detailed study of the variables affecting the electrophoretic separation – the voltage applied and the composition of the separation medium (the presence of organic solvents, the concentration of the

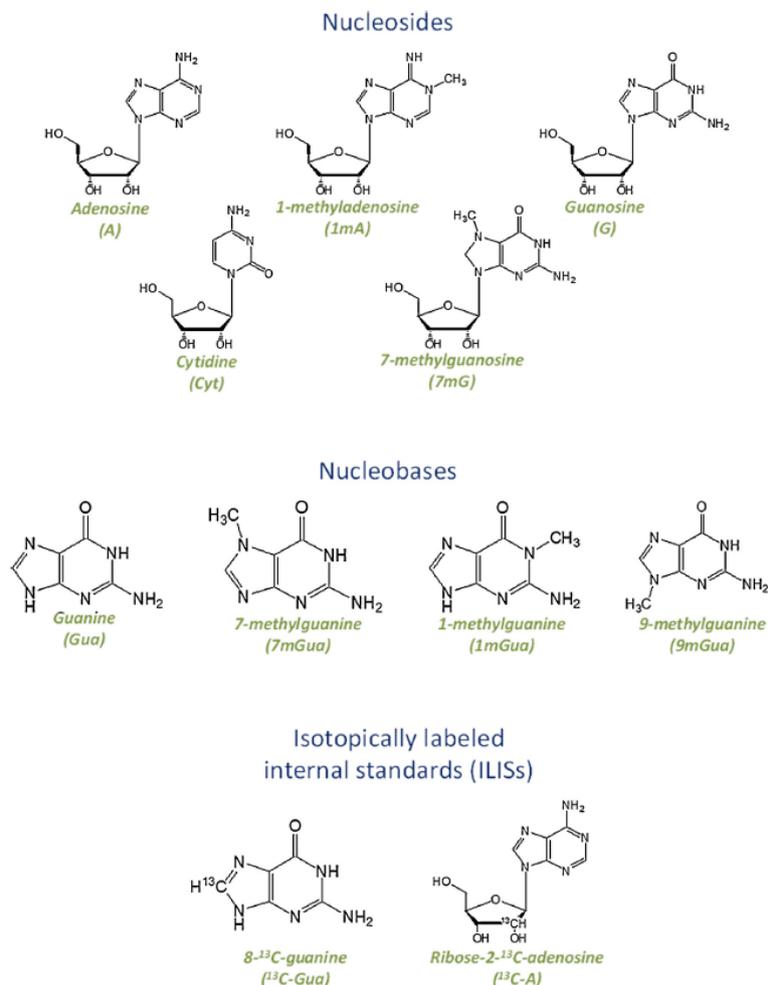


Fig. 1. Chemical structures of the compounds considered in this study.

background electrolyte)—and those affecting sample introduction (injection mode, medium and time of injection). For the optimization studies, we used an aqueous mixture of nucleosides and nucleobases at a concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

First, electrophoretic separation was carried out by applying a constant voltage of 20 kV, which involves an excessively long time of analysis (>30 min). To reduce this we applied one voltage step (from 20 to 30 kV at 15 min), or two steps, from 20 to 25 kV at 12 min, and from 25 to 30 kV at 15 min. This latter action reduced

the time of analysis to 22 min, such that it was selected for later use.

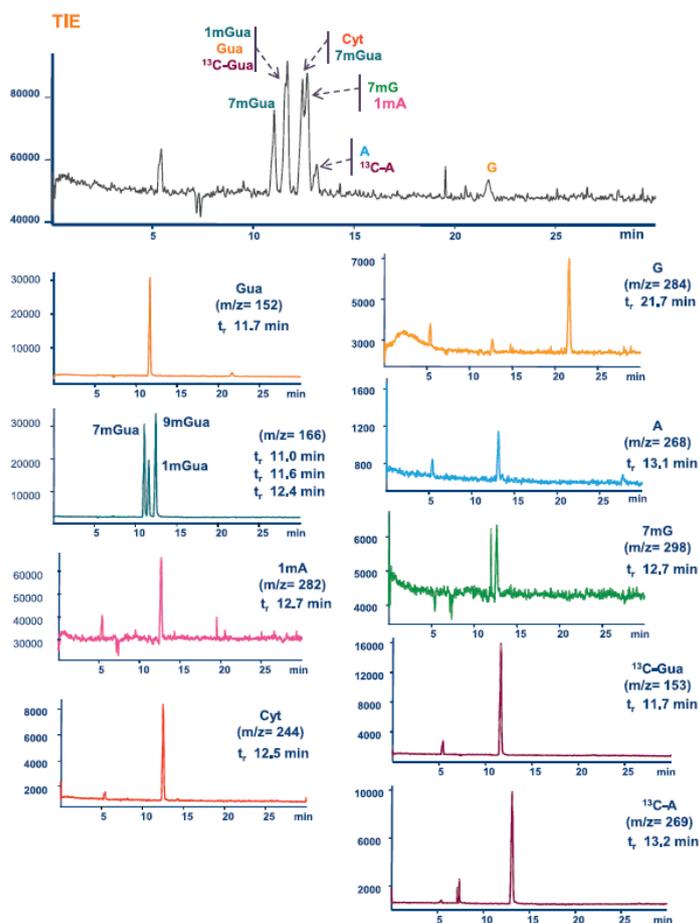
In order to transfer the CZE-UV DAD method to a CZE-MS application, special attention must be given to compatibility with MS requirements. For example, the concentration of the background electrolyte (BGE) used for electrophoretic separation should be optimized to keep the current intensity below 50  $\mu\text{A}$ . The concentrations of the electrophoretic medium assayed were 50, 100, 150, 250 and 500 mM. According to the results on current intensity, it

was concluded that 100 mM was the optimum concentration for the background electrolyte (BGE).

To check the effect of an organic solvent in the separation medium we used methanol as a solvent at proportions between 2% and 30% (v/v). We decided to work in the absence of organic medium because in the presence of methanol no appreciable improvements in sensitivity were observed and, by contrast, an increase in the migration times was noted.

Sample injection into the capillary electrophoresis system can be performed using two injection modes: hydrodynamic and electrokinetic. The hydrodynamic injection mode was implemented by applying a positive pressure of 50 mbar over injection times

ranging from 4 to 12 s. The results indicated that injection times between 5 and 8 s afforded suitable sensitivity and selectivity; these could not be improved with longer injection times. For the electrokinetic injection mode, injection voltages between 1 and 15 kV were studied, with different injection times: 5, 15 and 25 s. In all the experiments performed we obtained electropherograms with much less sensitive peaks than those obtained with hydrodynamic injection from samples of the same concentration. We also observed that the use of injection times longer than 5 s led to a noteworthy deformation of the electrophoretic peaks and a clear loss of resolution. In light of these results, we decided to use the hydrodynamic injection mode, applying a pressure of 50 mbar over 8 s.



**Fig. 2.** Total ion electropherogram (TIE) and extracted ion electropherograms (XIE) for a mixture of nucleosides and nucleobases under optimal conditions. The figure includes the isotopically labeled compounds used as internal standards:  $^{13}\text{C}$ -Gua and  $^{13}\text{C}$ -A. The ions monitored were  $[\text{M} + \text{H}]^+$  for all the analytes.

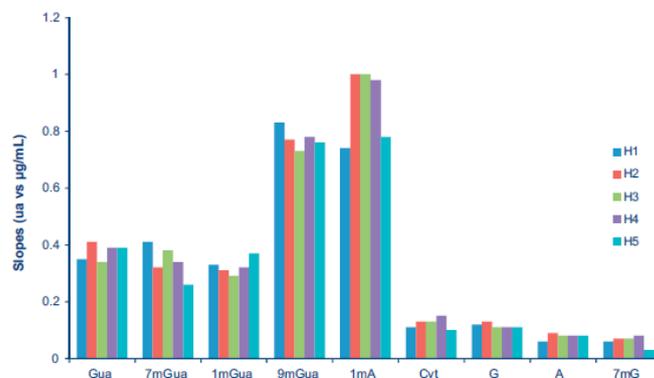


Fig. 3. Values of the slopes obtained by the standard additions method for each analyte in urine samples from healthy volunteers (H1–H5 urine samples).

### 3.2. CE–MS optimization

Here we used CE–MS with a coaxial electrospray interface (ESI) with sheath liquid, which together with the separation buffer closes the electric circuit. The nature and flow rate of the sheath liquid and the nebulizing gas pressure are decisive parameters in a CE–ESI–MS system since they govern the stability of the electric current, affect sensitivity since they determine the dilution of the sample, and favor the ionization process.

We studied the composition of the sheath liquid using water–ethanol and water–isopropanol mixtures at proportions of 1:1 and 1:2 (v/v) in the presence of 7.5 mM acetic acid or formic acid. The best results were obtained using a 1:1 (v/v) water–isopropanol mixture with 7.5 mM acetic acid.

We also optimized the cone voltage to study the possible fragmentation of the compounds analyzed; the cone voltage was varied between 40 and 150 V, and no fragmentation was observed for any of the analytes, but we observed greater sensitivity in the response when the cone potential applied was 100 V.

Fig. 2 shows the total ion electropherograms (TIE) and the extracted ion electropherograms (XIE) obtained by monitoring protonated molecular ions  $[M + H]^+$  when working under the optimum conditions. It should be noted that the electrophoretic method developed here allowed the separation and differentiation between the 1mGua, 7mGua and 9mGua isomers, which possess identical molecular weights.

### 3.3. Application of the method to urine analysis

The difficulty involved in analyzing the endogenous metabolites studied here is related to the following aspects: (i) the different concentration levels at which these analytes are naturally present in the urine of the same individual, (ii) the marked variability shown by each analyte between different individuals and (iii) the lack of analyte-free samples of the authentic matrix.

In order to examine the response of naturally present urinary nucleosides, we analyzed urine samples from healthy volunteers. The collection and storage of the samples were carried out following the procedure reported in the experimental part.

### 3.4. Quantification by the standard additions method

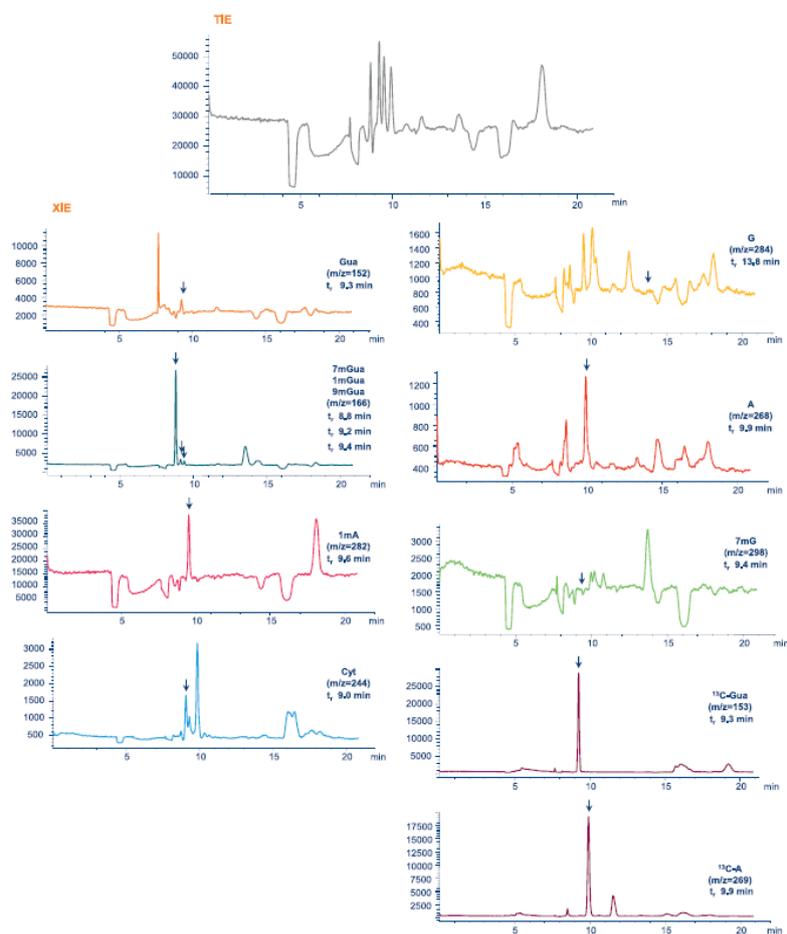
To quantify these analytes it must be borne in mind that they are endogenous compounds and are naturally present in urine. Accordingly, it is not possible to find a natural matrix for use as a blank-matrix to prepare the calibration standards. In light of this, the standard additions method was used to evaluate the natural presence of these analytes.

The standard additions method is used when there is a possibility of a matrix effect occurring: that is, when an increase or decrease occurs in the signal due to the presence of other components. This effect is particularly important in the case of MS detection with electrospray ionization (ESI) since it has been demonstrated that this source of ionization is subject to matrix-dependent signal suppression or enhancement due to the presence of other compounds that coelute with the analytes of interest.

Quantification by standard addition was performed by spiking the urine samples, previously thawed and filtered, at three concentration levels: 0.5, 1.0 and 2.0 µg/mL. Additionally, the isotopically labeled internal standards (ILIs) were added to each aliquot at a concentration of 5 µg/mL. Thus, four aliquots per sample were obtained (the unspiked sample and three spiked aliquots) which were analyzed by CE–MS following the procedure described in Section 2.6.

Fig. 3 shows the slopes obtained with the standard additions method for each analyte in each of the five urine samples from the healthy volunteers; these slopes were obtained by linear regression of the straight line for the three additions made. Fig. 4 shows the electropherograms obtained for an unspiked urine sample directly injected into the CE–MS system. The naturally low level of 9mGua in healthy people can be appreciated (Fig. 4) while the signals for G and 7mG are hardly distinguishable.

The individual concentration values (in µg/mL) obtained with the standard additions method in the urine samples from the five healthy volunteers (H1–H5) are shown in Fig. 5. Note should be taken of the great variability in the urinary level of the analytes of each sample from the same individual together with the variability between individuals. Thus, compounds such as 7mGua, 1mA and A were found at high concentrations (1–6.4 µg/mL), whereas Gua, 1mGua, 9mGua, Cyt, G and 7mG were at low-intermediate levels (<1 µg/mL). For some of these



**Fig. 4.** Total ion electropherogram (TIE) and extracted ion electropherograms (XIE) for a urine sample directly injected in the CE-MS system. The figure includes the isotopically labeled compounds used as internal standards:  $^{13}\text{C}$ -Gua and  $^{13}\text{C}$ -A. The ions monitored were  $[\text{M}+\text{H}]^+$  for all the analytes.

latter analytes, such as 9mGua, G and 7mG, it would be appropriate to develop a preconcentration procedure since their natural levels were not adequate for accurate quantification in the all five samples of untreated urine. This can also be seen in Fig. 4.

In order to compare the levels of these compounds with other values reported for healthy people, normalization was performed with respect to the creatinine content (Table 1) as indicated in the experimental part (Section 2.6). The normalized values, expressed in  $\text{nmol}/\mu\text{mol}$  creatinine (Table 2) are in agreement with the values reported in the literature [18] for some of the compounds analyzed in healthy people.

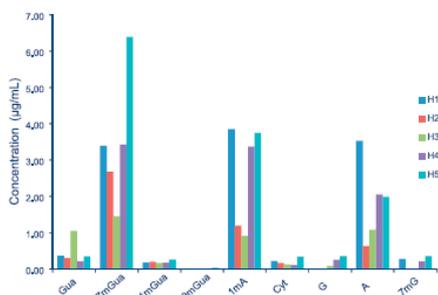
### 3.5. Comparison of the results obtained with CE-MS and LC-QqQ

The electrophoretic CE-MS method was validated by comparing the urinary concentrations found in healthy individual with the results obtained by liquid chromatography with tandem mass spectrometry LC-MS/MS [34]. In this case, chromatographic separation was applied after a pre-treatment with a restricted-access material (RAM) of the urine sample prior to the injection in the LC-MS/MS system. However, for electrophoretic analysis untreated urine samples were used.

The LC-MS/MS [34] system employed was based on a stationary phase of hydrophilic interactions of the "zwitterionic" type

**Table 1**  
Concentration levels of urinary nucleosides for healthy volunteers (H1–H5 urine samples) normalized against creatinine.

Analyte	H1 (0.99) <sup>a</sup> (nmol/ μmol <sub>creatinine</sub> )	H2 (0.51) <sup>a</sup> (nmol/ μmol <sub>creatinine</sub> )	H3 (0.52) <sup>a</sup> (nmol/ μmol <sub>creatinine</sub> )	H4 (1.09) <sup>a</sup> (nmol/ μmol <sub>creatinine</sub> )	H5 (0.74) <sup>a</sup> (nmol/ μmol <sub>creatinine</sub> )
Gua	0.28 ± 0.09	0.44 ± 0.18	1.54 ± 0.14	0.14 ± 0.03	0.35 ± 0.04
7mGua	2.36 ± 0.23	3.61 ± 0.16	1.96 ± 0.05	2.16 ± 0.14	5.95 ± 0.63
1mGua	0.12 ± 0.02	0.26 ± 0.05	0.22 ± 0.04	0.11 ± 0.01	0.24 ± 0.06
9mGua	Nd <sup>b</sup>	Nd	Nd	Nd	0.03 ± 0.04
1mA	1.57 ± 0.33	0.94 ± 0.05	0.72 ± 0.06	1.25 ± 0.11	2.05 ± 0.25
Cyt	0.10 ± 0.04	0.15 ± 0.01	0.11 ± 0.03	0.04 ± 0.01	0.21 ± 0.08
G	Nd	Nd	0.06 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.19 ± 0.17
A	1.51 ± 0.27	0.52 ± 0.01	0.89 ± 0.06	0.80 ± 0.04	1.14 ± 0.15
7mG	0.11 ± 0.02	Nd	Nd	0.07 ± 0.01	0.18 ± 0.05

<sup>a</sup> In brackets, creatinine value for each urine sample (in mg/mL).<sup>b</sup> Not detected.**Fig. 5.** Concentration levels (μg/mL) of urinary nucleosides and nucleobases from five healthy volunteers (H1–H5, unspiked urine samples) determined directly in the urine matrix by the standard additions method.

(ZIC-HILIC) coupled to a mass spectrometer with a triple quadrupole detector (QqQ) and an electrospray ionization source. This method was validated previously for the quantification of several nucleosides and nucleobases in urine according to the Guideline on Validation of Bioanalytical Methods [35].

Validation was performed for three human urine samples (H2, H4 and H5 samples) and for several of the modified nucleosides and nucleobases studied: 7mGua, 1mA, A. All experiments were carried out simultaneously with the CE-ESI-MS and LC-MS/MS setups. Fig. 6 shows the results obtained with both methods. These results were compared, applying a two-tailed t test in which a probability of  $p > 0.05$  was obtained in all cases. Accordingly, it may be concluded that the results obtained with both methods were not significantly different.

**Table 2**

Comparison of levels of nucleosides excreted in urine reported in literature for healthy subjects with those obtained in the present work. Concentrations expressed in nmol/μmol creatinine.

Analyte	Literature data for healthy subjects <sup>a</sup>	Nucleoside levels for healthy subjects (this work)
A	0.18–4.70	0.52–1.51
Cyt	0.01–0.78	0.04–0.21
G	0.01–10.70	0.06–0.19
1mA	2.02–2.90	0.72–2.05

<sup>a</sup> Data from Ref. [18].

### 3.6. Quantitation using aqueous medium and synthetic urine as surrogate matrices

The standard additions method affords good results and, additionally, is an efficient approach to the common problem of matrix effects. However, it has the disadvantage of being laborious since the sample analyzed requires its own calibration plot after measuring the response for a series of standard additions. As an alternative, it was decided to assess the possibilities of quantification via the use of the external standard method.

Owing to the lack of analyte-free urine samples to prepare the calibration standards, for a reliable quantitation of endogenous compounds two approaches were attempted: calibration of an authentic analyte in a surrogate matrix and calibration of a surrogate analyte in the authentic matrix. Here we describe the first approach using pure water and synthetic urine as surrogate matrices for simultaneous quantitation of these endogenous compounds in human urine.

Calibration standards were prepared in pure water (UHQ) and in synthetic urine. The synthetic urine was prepared following the procedure described by van de Merbel [22], adding creatinine at a concentration of 1 g/L. In both cases, the calibration graphs revealed linear behavior within the range studied, 0.5–2 μg/mL.

Table 3 compares the mean value of slopes obtained in the authentic matrix by the standard additions method (H1–H5 urine samples, individual slopes shown in Fig. 3) with the slopes obtained by calibration in aqueous medium and by calibration in synthetic urine. For a good interpretation of the results, we applied a two-tailed t test to compare the mean slope values obtained in the authentic matrix by standard additions and the respective slopes obtained under the same experimental conditions but analyzing the standards in ultrapure water (UHQ) and in synthetic urine. On using UHQ water as the calibration matrix, the probability values ( $p$ ) obtained were lower than 0.05 for some of the analytes studied, whereas in the case of calibration in synthetic urine it was observed that for all of the analytes the  $p$  value was greater than 0.05 indicating that there is no significant difference between the two slopes. Thus, surrogate matrix calibration in synthetic urine is proposed as an appropriate alternative to the method of standard additions.

These results can be explained bearing in mind that synthetic urine is prepared by trying to imitate the natural urine especially in regard to its salts content. Therefore the effect on the analytical signal obtained in the ESI-MS detector (signal suppression or enhancement) is expected to be similar to that undergone by the analytes in real urine.

Finally, in order to check the validity of using calibration in synthetic urine as an alternative to the standard additions method we compared the results obtained on analyzing a urine sample with both methods (Table 4) for the analytes showing intermediate or high concentration levels the results obtained with both

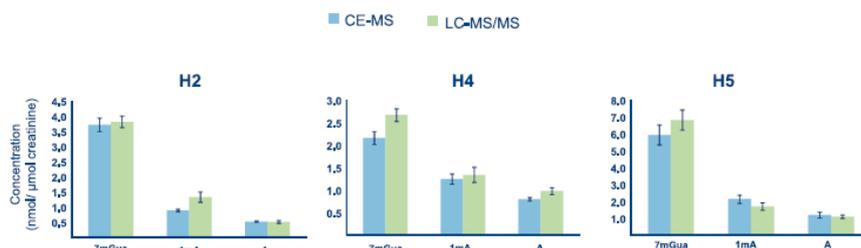


Fig. 6. Comparison of the results obtained by CE-MS and LC-MS/MS (nmol/μmol creatinine) for urine samples from healthy volunteers.

Table 3

Comparison of the slopes (expressed in arb. units vs. concentration in μg/mL) obtained in natural urine (H1–H5 samples) by the standard additions method and the slopes obtained by calibration in aqueous medium and in synthetic urine.

Analyte	Slope			PSA-Synth <sup>b</sup>	PSA-Aq <sup>c</sup>
	Standard addition method <sup>a</sup>	Calibration in synthetic urine	Calibration in aqueous medium		
Gua	0.38 ± 0.02	0.32 ± 0.03	0.34 ± 0.01	0.06	0.05
7mGua	0.34 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.40 ± 0.01	1.00	0.02
1mGua	0.32 ± 0.03	0.26 ± 0.03	0.33 ± 0.01	0.09	0.62
1mA	0.89 ± 0.09	0.65 ± 0.09	0.99 ± 0.03	0.05	0.17
Cyt	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.58	0.10
A	0.08 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.47	0.22

<sup>a</sup> Mean value of the five individual slope values obtained in urine samples H1 to H5 (shown in Fig. 2).

<sup>b</sup> Standard additions vs. Calibration in synthetic urine.

<sup>c</sup> Standard additions vs. Calibration in aqueous medium.

Table 4

Results for individual nucleosides and nucleobases in a sample of natural urine from a healthy volunteer analyzed with the standard additions method and via calibration in synthetic urine.

Analyte	Standard addition method (μg/mL)	Prediction by calibration in synthetic urine (μg/mL)	<i>p</i>
Gua	0.14 ± 0.02	0.10 ± 0.08	0.46
7mGua	1.83 ± 0.10	1.34 ± 0.27	0.06
1mGua	0.15 ± 0.05	0.11 ± 0.09	0.55
1mA	1.68 ± 0.18	1.57 ± 0.12	0.44
Cyt	0.10 ± 0.05	0.12 ± 0.09	0.76
A	0.88 ± 0.06	0.69 ± 0.10	0.07

methods did not differ significantly ( $p > 0.05$ ). For those analytes present at low concentrations – 9mGua, G and 7mG – the need for a preconcentration step was confirmed since direct determination was difficult to perform. This enrichment step is now under development.

#### 4. Concluding remarks

This paper describes the development of a rapid and robust methodology based on CZE-ESI-MS for the separation and determination of the urinary levels of a selected group of modified nucleosides and nucleobases (guanine, 1-methyl-guanine, 7-methyl-guanine, 9-methyl-guanine; adenosine, 1-methyl-adenosine, cytidine, guanosine and 7-methyl-guanosine).

The optimized method was applied to the separation of these endogenous compounds in human urine samples. Quantification of these endogenous compounds directly in the urine matrix was accomplished by applying the method of standard additions in order to evaluate the natural presence of these compounds in healthy volunteers. The results show the different urinary levels of these compounds for the same individual together with the

variability between individuals. A comparison between the urinary levels of the compounds analyzed by CZE-ESI-MS and LC-MS/MS was performed, revealing that the new electrophoretic methodology constitutes a valid and reliable alternative to other existing methods such as liquid chromatography.

Here we evaluated the use of synthetic urine as a surrogate matrix for the accurate quantification of these compounds as compared with the standard additions method. The good agreement in slopes suggests that both methods were comparable. Thus, the use of synthetic urine as a surrogate matrix for calibration is proposed as an appropriate alternative to the standard additions method for accurate quantification of these endogenous compounds by CZE-ESI-MS directly in the untreated urine from healthy people.

#### Acknowledgments

The *Ministerio de Economía y Competitividad*, Spain, (Project CTQ 2011-24075) is gratefully acknowledged for financial support for this work. R.H.P and D.G.G. acknowledge financial assistance from the Spanish government (grants FPI and FPU, respectively).

#### References

- [1] P.A. Limbach, P.F. Crain, J.A. McCloskey, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 2183.
- [2] H.M. Liebich, S. Müller-Hagedorn, M. Bacher, H.G. Scheel-Walter, X. Lu, *J. Chromatogr. B* 814 (2005) 275.
- [3] S. Ishiwata, K. Itoh, K.T. Yamaguchi, N. Ishida, M. Mizugaki, *J. Tohoku, Exp. Med.* 176 (1995) 61.
- [4] A.J. Sacco, F. Rey, C. Reynaud, J.Y. Bobin, M. Clavel, A. Nivelau, *Cancer Lett.* 108 (1996) 157.
- [5] K. Koshida, J. Harmenberg, U. Stendahl, B. Wahren, E. Borgstrom, L. Helstrom, L. Andersson, *Urol. Res.* 13 (1985) 213.
- [6] F. Oerlemans, F. Lange, *Gynecol. Obstet. Invest.* 22 (1986) 212.
- [7] T. Rasmuson, G.R. Bjork, L. Damber, L. Jacobsson, A. Jeppsson, T. Stigbrand, G. Westman, *Acta Oncol.* 26 (1987) 261.
- [8] T. Rasmuson, G.R. Bjork, *Acta Oncol.* 34 (1995) 61.
- [9] 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.

## VIII. ARTÍCULOS PUBLICADOS

---

30

*E. Rodríguez-Gonzalo et al. / J. Chromatogr. B 942–943 (2013) 21–30*

- [110] E. Kvist, K.E. Sjölin, J. Iversen, K. Nyholm, *Urol. Nephrol.* 27 (1993) 45.
- [111] K. Nakano, T. Nakao, K.H. Schram, W.M. Hammargren, T.D. McClure, E. Petersen, *Clin. Chim. Acta* 218 (1993) 169.
- [112] G. Xu, H.R. Schmid, H.M. Liebich, P. Lu, *Biomed. Chromatogr.* 14 (2000) 459.
- [113] J. Yang, G.W. Xu, Y.F. Theng, H. Kong, T. Pang, S. Lv, Q. Yang, *J. Chromatogr. B* 813 (2004) 59.
- [114] E. Dudley, F. Lemiere, W.R. VanDongen, R.S. Tuytten, S. El-Sharkawi, A.G. Brenton, L. Esmans, R.P. Newton, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 2730.
- [115] S.H. Lee, B.H. Jung, S.Y. Kim, B.C. Chung, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 973.
- [116] E. Szymanska, M.J. Markuszewski, X. Capron, A.-M. van Nederkassel, Y. Van der Heyden, M. Markuszewski, K. Krajka, R. Kaliszán, *Electrophoresis* 28 (2007) 2861–2873.
- [117] Y.F. Zheng, H.W. Kong, J.H. Xiong, S. Lv, G.W. Xu, *Clin. Biochem.* 38 (2005) 24.
- [118] Y. Jiang, Y. Ma, *Anal. Chem.* 81 (2009) 6474–6480.
- [119] H.M. Liebich, S. Müller-Hagedorn, F. Klaus, K. Mezziane, K.-R. Kim, A. Fricken-schmidt, B. Kammerer, *J. Chromatogr. A* 1071 (2005) 271–275.
- [120] H.M. Liebich, R. Lehmann, G. Xu, H.G. Wahl, H.-U. Häring, *J. Chromatogr. B* 745 (2000) 189.
- [121] S. La, J.H. Cho, J.-H. Kim, K.-R. Kim, *Anal. Chim. Acta* 486 (2003) 171.
- [122] C. van de Merbel, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 924.
- [123] P.J. Taylor, *Clin. Biochem.* 38 (2005) 328–334.
- [124] H. Trüfelli, O. Palma, G. Famigliini, A. Cappiello, *Mass Spectrom. Rev.* 30 (2011) 491–509.
- [125] F.T. Peters, D. Remane, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 2155–2172.
- [126] R. Dams, M.A. Huestis, W.E. Lambert, C.M. Murphy, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 14 (2003) 1290–1294.
- [127] M. Vogeser, C. Seger, *Clin. Chem.* 56 (2010) 1234–1244.
- [128] M. Stuber, T. Reemtsma, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 910–916.
- [129] E. Eckert, H. Drexler, T. Göen, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 2506–2514.
- [130] M. Jemal, A. Schuster, D.B. Whigan, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 1723–1734.
- [131] S. Wang, M. Cyronak, E. Yang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 701–707.
- [132] H.M. Liebich, *J. Chromatogr. A* 1071 (2005) 271–275.
- [133] (a) H. Bartels, M. Böhmer, C. Heierli, *Clin. Chim. Acta* 37 (1972) 193;  
(b) M. Jaffe, *Z. Physiol. Chem.* 10 (1886) 391.
- [134] E. Rodríguez-Gonzalo, D. García-Gómez, E. Carabias-Martínez, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 9055–9063.
- [135] European Medicines Agency (EMA), *Guideline on validation of bioanalytical methods, CHMP/EWP/192217/2009.*



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jpba](http://www.elsevier.com/locate/jpba)

## Development of a procedure for the isolation and enrichment of modified nucleosides and nucleobases from urine prior to their determination by capillary electrophoresis–mass spectrometry



Encarnación Rodríguez-Gonzalo\*, Raquel Hernández-Prieto,  
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 3 August 2013  
Received in revised form 3 October 2013  
Accepted 6 October 2013  
Available online xxx

#### Keywords:

Nucleosides  
Urine  
Solid-phase extraction  
Polymeric sorbents  
Capillary electrophoresis  
Mass spectrometry

### ABSTRACT

A sample treatment step based on solid-phase extraction (SPE) with polymeric sorbents has been developed for the simultaneous isolation and preconcentration of nucleosides and nucleobases from urine prior to analyses by CE-ESI-MS. In most reported methods nucleosides are isolated from urine by SPE in affinity mode, using an immobilized phenylboronic acid group, which specifically binds *cis*-diols. However, this is not applicable to non-*cis*-diol compounds. Here, different types of polymeric sorbents were evaluated for the simultaneous extraction of nucleosides and nucleobases from urine. The best results were obtained with Isolute ENV+, a hydroxylated styrene-divinylbenzene polymer, whose retention capacity can be attributed mainly to hydrophobic interactions, and thus it can be applied to a broad range of compounds, regardless of whether they present or not to the *cis*-diol group in their structure. Other parameters such as the elution solvent and sample volume were optimized. We also studied the influence of the addition of isotopically labeled internal standards (ILISs) before or after the extraction step. The detection limits achieved were in the 0.04–0.17  $\mu\text{g/mL}$  range for a sample size of 2.0 mL and relative standard deviations were 4–22%. The whole method developed, SPE prior to CE-ESI-MS, was applied to human urine samples from healthy volunteers. We conclude that SPE with polymeric sorbents prior to the electrophoretic CE-ESI-MS methodology constitutes a fast, valid and reliable approach for the simultaneous extraction of urinary nucleosides and nucleobases.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Modified nucleosides excreted in human urine are related to RNA turnover, a process that is increased in the presence of a tumor and other metabolic disorders. These nucleosides have been studied to examine their biomedical significance as possible biomarkers for cancer and other diseases.

Although these biomarkers lack sufficient specificity for use as single diagnostic tests, their clinical interest lies in their potential usefulness as previous complementary diagnostic methods and also to check the efficiency of treatment in patients undergoing treatment for cancer and in the follow-up of post-operative relapses. If a marker or group of markers is available for a given type of cancer, it is much easier to check the efficacy of the treatment by following the evolution of these compounds instead of repeating far more costly tests such as computerized tomography, and gammagraphy. Hence the importance of having available rapid

and reliable analytical methods that can be used as routine tools for the determination of urinary levels of nucleosides in clinical laboratories.

During the last decade, many analytical methods for measuring and monitoring nucleosides in biological fluids have been reported, liquid chromatography with spectrophotometric [1–9] or MS detection [10–14] being the analytical technique most widely employed. Application of capillary electrophoresis for the determination of urinary nucleosides has also been reported; micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC), which involves the use of surfactants, is the mode usually applied [15–21]. However, this hinders MS detection. The application of other CE modes is still scarce.

Capillary zone electrophoresis coupled with electrospray ionization–mass spectrometry (CE-ESI-MS) has been previously assayed [22] for the determination of modified nucleosides in untreated human urine from healthy people. It has proved to be an appropriate approach for these compounds due to their hydrophilic character and also to the attractive features of CE-MS, since it combines the high separation capacity of CE with the good selectivity and high-power identification of mass spectrometry. Nevertheless,

\* Corresponding author. Tel.: +34 923294483; fax: +34 923 294 483.  
E-mail address: [erg@usal.es](mailto:erg@usal.es) (E. Rodríguez-Gonzalo).

CE-MS currently presents a limited concentration sensitivity that may prevent its use in the analysis of compounds at trace levels. This is why the development and application of preconcentration techniques prior to CE-MS may be of special importance in fields where the quantification of compounds in a broad range of concentration levels is required. The need for efficient sample preparation is often a critical point in the total analysis. It may involve analyte isolation, trace enrichment and further cleanup to remove matrix interferences. These 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.

In literature, the techniques most frequently employed for the extraction of modified nucleosides from urine have been based on the use of an affinity interaction sorbent Affi-gel 601 [23–27]; this is a polymeric sorbent composed of polyacrylamide with immobilized groups of phenylboronic acid, which binds selectively to the *cis*-diol groups of the glucoside group. These bonds are only formed in nucleosides that have *cis*-diol groups at positions C-2 and C-3 of the ribose. This material does not retain nucleosides that do not have this *cis*-diol group and nucleobases such that they cannot be extracted from urine and it is necessary to search for an alternative for their extraction. It should be noted that in our revision of the literature we found abundant references to procedures using Affi-gel 601 in the extraction process of urinary nucleosides. However, few alternatives to the use of Affi-gel 601 in the extraction step have been reported [28,29].

The main aim of the present work was to develop an extraction and preconcentration procedure based on solid-phase extraction using polymeric sorbents which facilitates the simultaneous retention of nucleosides and nucleobases naturally present in urine, regardless of whether they have *cis*-diol groups or not. The target compounds were, guanine, 1-methylguanine, 7-methylguanine, 9-methylguanine; 7-methylguanosine, cytidine, adenosine and 1-methyladenosine. After the sample treatment procedure, the target analytes were separated and analyzed by capillary zone electrophoresis coupled to mass spectrometry (CZE-ESI-MS). The application to human urine from healthy volunteers is also reported.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

The analytical standard of guanine (Gua), CAS RN [73-40-5]; 7-methylguanine (7mGua), CAS RN [578-76-7]; 1-methylguanine (1mGua), CAS RN [938-85-2]; 9-methylguanine (9mGua), CAS RN [5502-78-3]; 1-methyladenosine (1mA), CAS RN [15763-06-1]; cytidine (Cyt), CAS RN [65-46-3]; adenosine (A), CAS RN [58-61-7]; 7-methylguanosine (7mG), CAS RN [20244-83-4] were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Isotopically Labeled Internal Standards (ILISs), 8-<sup>13</sup>C-guanine (<sup>13</sup>C-Gua), 98% and ribose-2-<sup>13</sup>C-adenosine (<sup>13</sup>C-A) 99% were purchased from Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Tewksbury, MA, USA).

Formic acid (>98%), acetic acid (>98%) were from Fluka (Steinheim, Germany). Acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH) were of HPLC grade (Merck, Darmstadt, Germany). Ammonium formate (>98%) was from Riedel de Hën (Hannover, Germany). Ammonia (solution at 25%) and 2-Propanol were obtained from Scharlau (Barcelona, Spain). Ultra-high quality (UHQ) water was obtained with a Wasserlab (Noáin, Spain) Ultramatic water purification system. All other chemicals were of analytical grade.

### 2.2. Instrumentation

All experiments were carried out with a Hewlett-Packard HP<sup>3D</sup> CE instrument (Agilent Technologies, Waldbron, Germany) equipped with a UV-visible DAD device. MS was performed using an Agilent LC/MSD SL mass spectrometer (Agilent Technologies) 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.04.01 SR1.

Fused-silica capillaries (75  $\mu$ m ID, with a total length of 87.5 cm) were from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA), supplied by Composite Metal Scientific (Shipley, West Yorkshire, UK) and were used throughout the work.

CE separation buffers and injection samples were placed in 1700- $\mu$ L disposable amber glass vials with pre-perforated polyurethane caps (Agilent, Waldbron, Germany).

For SPE analysis, different types of sorbent (Oasis<sup>®</sup> HLB, Oasis<sup>®</sup> MCX, LiChrolut<sup>®</sup> EN, Isolute<sup>®</sup> ENV+) were assayed. Drying and conditioning of the cartridges were accomplished with a vacuum pump (Afa, Barcelona, Spain) coupled to a 20-port manifold for sample preparation (Varian, Harbor City, CA, USA).

### 2.3. Conditions for CE separation and ESI-MS detection

The running buffer (background electrolyte, BGE) was an aqueous solution of 100 mM formic acid–ammonium formate (pH 2.5). Injections were made at the anodic end, using a pressure of 50 mbar for 8 s. Electrophoretic separation was achieved with a voltage of 25 kV (normal mode), with an initial ramp of 7 s. 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 start-up procedure. After each run, the capillary was washed at 4 bar for 1 min with fresh running buffer.

MS was performed using an Agilent LC/MSD SL mass spectrometer equipped with a single quadrupole analyzer. An Agilent coaxial sheath-liquid sprayer was used for CE-MS coupling (Agilent Technologies). The sheath liquid consisted of 1:1 (v/v) isopropanol:UHQ water (7.5 mM acetic acid) and was delivered at a flow rate of 0.78  $\mu$ L/min by an Agilent 1100 series pump, equipped with a 1:100 flow-splitter. The mass spectrometer was operated in the positive-ion mode (ESI+), with the ESI voltage set at +3500 V. Other electrospray parameters under optimum conditions were: nebulizer pressure, 10 psi; drying-gas flow rate, 6 L/min; drying gas temperature, 150 °C. The optimized fragmentor voltage was 100 V for all analytes.

### 2.4. Preparation of standard solutions and quantitation

The initial stock standard solutions for the Gua (250  $\mu$ g/mL), 7mGua, 1mGua, 9mGua, 1mA, Cyt, A, 7mG (500  $\mu$ g/mL) were prepared in acidified UHQ water (HCl 0.1 M). These stock solutions were stored at 4 °C in amber glass bottles. Two isotopically labeled internal standards (ILISs) were used: 8-<sup>13</sup>C-guanine (<sup>13</sup>C-Gua) for the nucleobases, and ribose-2-<sup>13</sup>C-adenosine (<sup>13</sup>C-A) for the nucleosides. They were prepared at 300  $\mu$ g/mL and stored under the same conditions.

Analyte quantification was carried out under SIM acquisition mode using protonated molecules [M+H]<sup>+</sup>. The quantitative variable used was the ratio between the peak area generated by the ion of each analyte, expressed in arbitrary units, and the peak area generated by the isotopically labeled internal standard (ILIS). Quantification was carried out by calibration in synthetic urine prepared according to Ref [30].

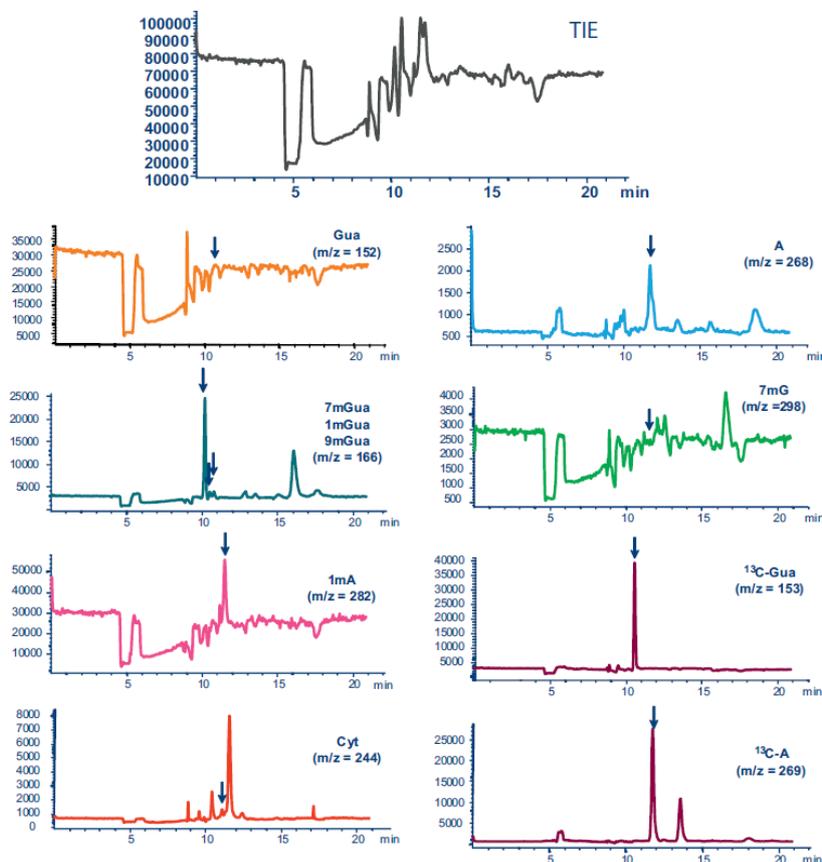


Fig. 1. Total ion electropherogram (TIE) and extracted ion electropherograms (XIE) of a urine sample from a healthy volunteer directly injected into the CE-MS. The figure includes the isotopically labeled compounds used as internal standards (ILIS):  $^{13}\text{C}$ -Gua and  $^{13}\text{C}$ -A. The ions monitored were  $[\text{M}+\text{H}]^+$  for all the analytes.

### 2.5. Human urine samples

Samples of human urine from healthy volunteers were collected in 250 mL amber glass bottles and frozen immediately until analysis. Before use, the samples were thawed at room temperature. All samples were filtered through 0.22  $\mu\text{m}$  filters prior to analysis.

Extraction–preconcentration was accomplished by passing 2.0 mL of urine through the extraction cartridge (Isolute ENV+); this cartridge was previously conditioned with 2 mL of acetonitrile and 2 mL of water (UHQ). Following this, the cartridges were dried for 15 min under a vacuum of  $-15$  mm Hg. The analytes retained were then eluted with 2 mL of acetonitrile/ammonia (90:10, v/v). The eluted fraction was evaporated to dryness and the dry residues were reconstructed in 500  $\mu\text{L}$  of water with formic acid 0.1% (v/v).

### 3. Results and discussion

Capillary electrophoresis coupled with mass spectrometry (CE-MS) has been previously described [23] for the determination of modified nucleosides in untreated human urine. Application of the method to urine samples revealed the broad concentration range at which these analytes are present in urine for the same individual, also observing broad variability for the same analyte between different individuals. Direct determination via CE-ESI-MS was possible for some of these compounds at medium or high concentration levels (for example 7mGua, 1mA, and A). For analytes present at intermediate and low concentrations, an enrichment step is required (Fig. 1).

Here we report the development of a procedure for the extraction and preconcentration of analytes whose levels in urine are

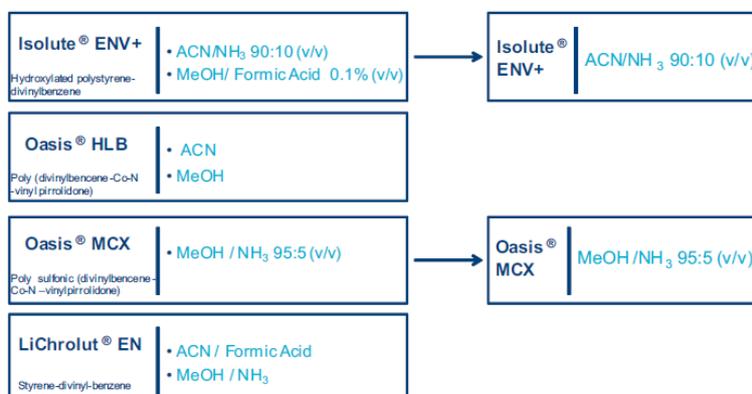


Fig. 2. Scheme of the optimization of the eluent/sorbent used for simultaneous extraction of nucleosides and nucleobases. Right side of the figure indicates the sorbent/eluent combination that afforded the best results for all compounds.

low and do not allow their direct determination via CE-ESI-MS. The target compounds were guanine, 1-methylguanine, 7-methylguanine, 9-methylguanine, adenosine, 1-methyladenosine, cytidine, 7-methylguanosine. Two isotopically labeled compounds, ribose-2-<sup>13</sup>C-adenosine and 8-<sup>13</sup>C-guanine, were used as internal standards. Electrophoretic separation was accomplished in CZE mode, using 100 mM formic acid at pH 2.5 as separation buffer. MS detection was accomplished in a single quadrupole, with the electrospray interface (ESI) operating in positive-ion mode.

### 3.1. Solid-phase extraction with polymeric sorbents prior to CE-ESI-MS

In order to facilitate the quantification of the modified nucleosides present in urine at low concentrations, we studied solid-phase extraction (SPE) with polymeric sorbents as an isolation and pre-concentration method prior to separation by CE-ESI-MS.

We first assessed the ability of different sorbents to retain simultaneously the compounds of interest, nucleosides and nucleobases. The sorbents studied were: Isolute ENV+ (hydroxylated polystyrene-divinylbenzene), Oasis HLB (a copolymer of divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone), Oasis MCX (a copolymer of sulfonic-divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone), and LiChrolut EN (a copolymer of styrene divinylbenzene).

Different elution conditions were assayed depending on the nature of the sorbent. Fig. 2 shows the different sorbent/elution medium combinations tested. Volumes in the range 1–10 mL were assayed to elute the analytes from the cartridges. In all cases, an aqueous sample (1 mL) spiked with the analytes at a concentration of 1 µg/mL was used. Adjustment of the sample pH may be necessary to improve the retention of certain polar ionizable analytes that at the normal values found in urine are ionized and hence may be weakly retained by the sorbent.

In the case of the Oasis HLB, LiChrolut EN and ENV+ sorbents, due to their hydrophobic nature, pH control of the sample is not necessary because in the usual pH range of the urine from a healthy individual (between 4.6 and 8) the nucleosides and nucleotides are not ionized, which favors their retention. For Oasis MCX cartridges, a cation-exchange sorbent, retention studies were carried out in acidic media [29].

The best results were found for the ENV+ and Oasis MCX sorbents; the optimum eluent proved to be a mixture of acetonitrile/ammonia (90:10, v/v) for ENV+, and a mixture of methanol/ammonia (95:5, v/v) for the Oasis MCX. For the other two sorbents assayed, Oasis HLB and LiChrolut EN, low recoveries were obtained, such that no further studies were carried out with these sorbents.

The recovery values for the four sorbents studied, the mean of four replicas, are shown in Fig. 3. In this figure is also possible to note that the values of the standard deviations obtained for some analytes are relatively high. Accordingly, and to gain greater precision, in later studies we decided to work using the two ILISs described.

#### 3.1.1. Influence of the sample volume

In light of the above results, ENV+ and MCX were chosen as suitable sorbents. In order to achieve higher enrichment factor, and thereby improve the sensitivity of the method, a study was made of the effect of the volume of sample to be preconcentrated. The improvement in detection limits based on an increase in the volume of sample has some limitations, such as the fact that retention capacity of the sorbent might be surpassed or that, for highly polar analytes, the breakthrough phenomenon may occur. There is also a practical limitation, i.e. the time involved in the passage of large sample volumes.

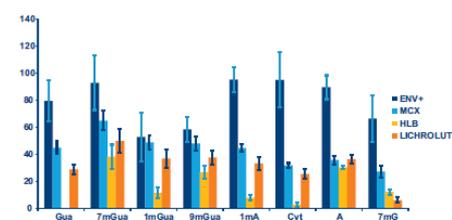


Fig. 3. Recoveries ( $n=4$ ) obtained after solid-phase extraction with different polymeric sorbents, ENV+, Oasis MCX, Oasis HLB and LiChrolut EN.

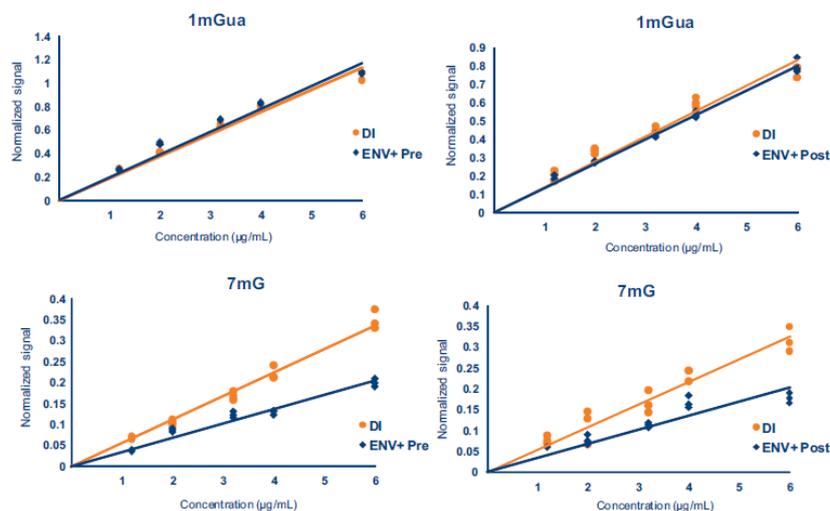


Fig. 4. Calibration lines obtained by addition of ILISs before or after the SPE step. Comparison with the calibration lines obtained by direct injection (DI) of synthetic urine standards.

Table 1

Calibration lines obtained by addition of internal standards (ILISs) before or after the SPE step. Comparison with the calibration line in synthetic urine obtained by direct injection (DI) without preconcentration. Recovery (%) =  $(m_{ENV}/m_{DI}) \times 100$  calculated as the ratio between the slope of the regression line obtained with preconcentration ( $m_{ENV}$ ) and the one generated by direct injection ( $m_{DI}$ ).

Analytes	Slope			Recovery %	
	$m_{DI}^a$	$m_{ENV+Pre}^b$	$m_{ENV+Post}^c$	ILIS before SPE ( $m_{ENV+Pre}/m_{DI}$ )	ILIS after SPE ( $m_{ENV+Post}/m_{DI}$ )
Gua	1.75	1.61	1.42	92	81
7mGua	1.17	1.32	1.12	113	96
1mGua	0.59	0.65	0.53	110	90
9mGua	1.36	1.28	0.81	94	70
1mA	2.48	2.65	2.00	107	81
Cyt	0.66	0.55	0.60	83	91
A	0.31	0.28	0.31	90	100
7mG	0.22	0.12	0.13	65	68

<sup>a</sup> Calibration line in synthetic urine obtained by direct injection, without preconcentration.

<sup>b</sup> Calibration line in synthetic urine with preconcentration with ENV+ cartridges by adding the ILISs before the SPE step.

<sup>c</sup> Calibration line in synthetic urine with preconcentration with ENV+ cartridges by adding the ILISs after the SPE step.

The experiments were carried out with sample volumes ranging between 1 and 10 mL of natural urine. Because the compounds were endogenous, the study was performed with unspiked urine samples. Satisfactory results were obtained with both cartridges, showing that the analytical signal increased with increase in the

sample volume loaded into the cartridge. Thus no breakthrough effects were observed. In later studies, it was decided to use the ENV+ sorbent and a volume of urine of 2 mL as a compromise between the increase in sensitivity and the time taken in the SPE step.

Table 2

Analytical characteristic of the method developed based on SPE with ENV+ prior to CE-ESI-MS.

		Gua	7mGua	1mGua	9mGua	1mA	Cyt	A	7mG
Calibration parameters	Intercept ( $10^{-2}$ )	$-3 \pm 6$	$-3 \pm 4$	$-1 \pm 2$	$-3 \pm 2$	$-3 \pm 8$	$-5 \pm 1$	$0 \pm 1$	$1 \pm 1$
	Slope (AU-mL/ $\mu$ g)	$1.44 \pm 0.04$	$1.19 \pm 0.04$	$0.53 \pm 0.02$	$0.90 \pm 0.02$	$2.00 \pm 0.09$	$0.71 \pm 0.02$	$0.30 \pm 0.01$	$0.13 \pm 0.01$
	CC $\alpha$ <sup>a</sup> ( $\mu$ g/mL)	0.06	0.07	0.07	0.05	0.09	0.04	0.08	0.17
Repeatability as RSD (%) <sup>b</sup>	0.3 $\mu$ g/mL	11	14	12	18	5	12	7	22
	1.5 $\mu$ g/mL	9	14	4	12	9	17	7	17

<sup>a</sup> CC $\alpha$ : decision Limits, calculated according to the 2002/657/EC decision.

<sup>b</sup> RSD: relative standard deviation (n=6).

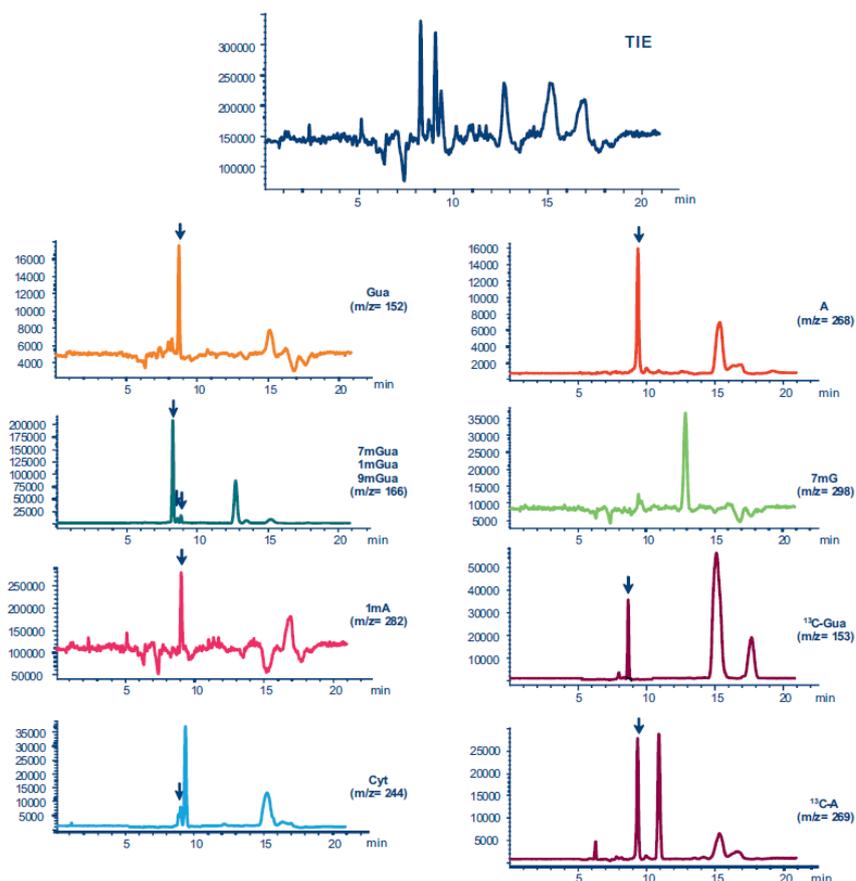


Fig. 5. Total ion electropherogram (TIE) and extracted ion electropherograms (XIE) of a urine sample from a healthy volunteer after SPE step with ENV+ prior to CE-ESI-MS.

### 3.1.2. Influence of the addition of isotopically labeled internal standards (ILISs) during the SPE step

One of the problems that arise when working with ESI-MS detection is the fluctuation in the signals due to ion suppression effects that occurs in the electrospray device. These effects are mainly due to the co-elution of matrix interferents with the analytes, such that it is necessary to use one or several internal standards for suitable quantification to be achieved. Here we worked with two isotopically labeled internal standards (ILISs): 8-<sup>13</sup>C-guanine (<sup>13</sup>C-Gua) and ribose-2-<sup>13</sup>C-adenosine (<sup>13</sup>C-A). The former was used as the internal standard of Gua, 7mGua, 9mGua and 1mGua; whereas <sup>13</sup>C-A was used as the internal standard of 1mA, Cyt, A and 7mG.

We then studied the influence of adding the ILISs before or after the solid-phase extraction step (SPE). In the first case (pre-SPE) the quantitative recovery of the overall process was assessed, while in

the second one (post-SPE) the aim was to correct the variability in the signal obtained at the MS detector.

For this study, synthetic urine [31] was employed as a surrogate matrix because these compounds are naturally present in human urine. Aliquots of 2 mL of synthetic urine were spiked at five concentration levels, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0 and 1.5 μg/mL, and passed through the ENV+ cartridge. After elution of the SPE sorbent, the solvent was evaporated off and the dry residue was redissolved in 500 μL of an aqueous solution of 0.1% (v/v) formic acid for further analysis by CE-ESI-MS. Thus, the preconcentration factor was 4. The internal standards, <sup>13</sup>C-Gua and <sup>13</sup>C-A, were added at two different concentrations: 1 μg/mL, when they were added before the preconcentration step (pre-SPE), and 4 μg/mL when they were added after that step (post-SPE). For each concentration level, two ENV+ cartridges were used and the final extract was injected in triplicate.

**Table 3**  
Comparison of the limits of detection (LODs) for several methods reported in the literature (2007–2013) for the determination of modified nucleosides and nucleobases in urine.

Analytes	Sample treatment	Analytical technique	LOD (ng/mL)	Reference
5 Nucleosides	On-line solid-phase microextraction (SPME)	Capillary LC-UV (home-made HILIC column)	40–52	[9]
6 Nucleosides 2 Nucleobases	On-line solid-phase extraction (SPE) with RAM	LC-MS/MS (ZIC-HILIC)	0.1–1.3	[12]
8 Nucleosides	–	UHPLC-UV (Kinetex C18)	23–36	[13]
12 Nucleosides	Phenylboronic acid (PBA) column	LC-MS/MS (C18)	40–180	[14]
7 Nucleosides	Solid-phase extraction (SPE) with Oasis MCX	LC-MS/MS (C18)	7.5–75	[29]
11 Nucleosides	Aff-Gel 601	MEKC-UV	150–406	[21]
14 Nucleosides	Aff-Gel 601	MEKC-UV	40–580	[24]
11 Nucleosides	Aff-Gel 601	CE-MS	2.4–1024	[27]
5 Nucleosides 3 Nucleobases	Solid-phase extraction (SPE) with Isolute ENV+	CE-MS	40–170	This work

As a reference, a calibration line was obtained by direct injection of synthetic urine standards spiked at the level expected if recoveries were 100%; that is, 1.2, 2.0, 3.2, 4.0, and 6.0 µg/mL. It should be borne in mind that the preconcentration factor is 4 for the procedure described (the sample volume to be preconcentrated is 2.0 mL and the final volume is 0.5 mL. Fig. 4 shows the results for 1mGua and 7mG as examples of the more and less favorable behavior, respectively.

The slope of the regression line obtained with the SPE step ( $m_{ENV+}$ ) and the one generated by direct injection ( $m_{DI}$ ) of standards in synthetic urine were calculated. The ratio between the slopes of both lines, that is,  $m_{ENV+}/m_{DI}$ , represents the mean recovery along the whole concentration range studied. Table 1 shows the recoveries  $R$  (%), expressed as  $(m_{ENV+pre}/m_{DI})$  and  $(m_{ENV+post}/m_{DI})$  for the addition of ILISs before and after the SPE step, respectively.

In the case of experiments involving the addition of the ILISs before the preconcentration step (pre-SPE) the values of  $m_{ENV+pre}/m_{DI}$ , expressed in %, were in the 65–113% range (Table 1). Upon adding the ILISs after the preconcentration step (post-SPE) the  $m_{ENV+post}/m_{DI}$  values ranged between 68% and 100%. Accordingly, it may be seen that the addition of the ILISs before or after the preconcentration step does not afford significantly different results. This may be due to the use of isotopically labeled compounds as internal standards, which showed a similar behaviour on the SPE step as the analytes of interest.

### 3.1.3. Analytical characteristics of the method based on SPE prior to the CE-ESI-MS

The analytical characteristics of the CE-ESI-MS method after SPE with ENV+ sorbents were determined (Table 2) taking into account all the above-described conditions. Calibration graphs were obtained by using a sample volume of 2 mL and the ILISs were added after the SPE step. The results reveal a good linear relationship between the analytical signals normalized with the internal standard against the analyte concentration in the 0.2–5 µg/mL range.

The precision of the method was determined from the values of the relative standard deviation in percentage form (%), calculated for two concentration levels of 0.3 and 1.5 µg/mL. It is seen that for both levels the values of the coefficient of variation range between 4 and 22%. These values can be considered acceptable, bearing in mind that the procedure involves a preconcentration step that requires a change of the solvent due to evaporation of the extract eluted from the cartridge and later redissolution of the dry extract in a medium suitable for electrophoretic separation.

The decision limits,  $CC\alpha$ , were calculated from the calibration curves following the criterion proposed in the 657/2002/CE Decision. The values found ranged between 0.04 and 0.17 µg/mL for Cyt and 7mG respectively. Table 3 shows a comparison of the limits of detection (LODs) obtained with the different methods reported in the literature in recent years. It can be seen that the method proposed here affords better LODs than others methods based

on CE-UV; in comparison with LC-MS/MS using a SPE step with phenylboronic acid, similar results were obtained, but in our case the use of a polymeric sorbent allowed us to perform the simultaneous extraction of nucleosides and nucleobases.

### 3.1.4. Application to human urine samples

The proposed extraction–preconcentration procedure was applied to the simultaneous determination of modified nucleosides and nucleobases in urine from a healthy volunteer.

In view of the lack of certified samples of modified nucleosides in urine, the method was validated by determining the recovery at two concentration levels in urine from a healthy volunteer. To accomplish this, we analyzed an unspiked urine sample according to the SPE procedure prior to CE-ESI-MS. Fig. 5 shows the electropherograms obtained; when compared to Fig. 1 they show that the SPE step provides cleaner electropherograms. Moreover, in the non-preconcentrated sample it is not possible to quantify the analytes Gua, Cyt and 7mG, whereas in the sample obtained after the SPE step (Fig. 5) the first two can be quantified.

The sample was then spiked at two levels, 0.5 and 1 µg/mL. The signal obtained for each analyte was introduced into the corresponding calibration line; the quantitative variable used was the

**Table 4**  
Results obtained for a sample of human urine analyzed by the proposed SPE step with ENV+ prior to CE-ESI-MS.

Analytes	Added (µg/mL)	Found (µg/mL)	Found by SA <sup>a</sup> (µg/mL)
Gua	0.0	0.08	0.09
	0.5	0.61	
	1.0	1.08	
7mGua	0.0	2.30	2.33
	0.5	2.83	
	1.0	3.47	
1mGua	0.0	0.11	0.12
	0.5	0.63	
	1.0	1.15	
9mGua	0.0	<LOD	–
	0.5	0.41	
	1.0	0.82	
1mA	0.0	1.09	1.15
	0.5	1.58	
	1.0	1.91	
Cyt	0.0	0.06	0.06
	0.5	0.55	
	1.0	1.11	
A	0.0	4.46	4.50
	0.5	5.14	
	1.0	5.50	
7mG	0.0	<LOD	–
	0.5	0.39	
	1.0	0.80	

<sup>a</sup> Found with the standard addition (SA) method directly in the unspiked urine sample.

ratio between the peak area generated by the ion of each analyte and the peak area generated by the ILIS. The ratio thus obtained was quantified according to the calibration line obtained by the direct injection of external standards. The amounts found (Table 4) for all the analytes studied matched the expected values satisfactorily, taking into account the additions made.

Accuracy was checked by analyzing unspiked urine sample by the standard additions method and comparing the results with those obtained with SPE prior to CE-ESI-MS. The results of the unspiked urine sample with the standard additions method are also shown in Table 4. It should be noted that in the case of the 9mGua and 7mG it was not possible to perform their quantitation in the unspiked sample, using the standard additions method owing to the low levels at which they were present.

#### 4. Conclusions

In the present work we report the development of a procedure based on solid-phase extraction (SPE) for the isolation and preconcentration of urinary nucleosides and nucleobases naturally present in urine at low concentration levels, which do not allow their direct determination via CE-ESI-MS.

The results indicate that the polymeric sorbent (ENV+), a hydroxylated copolymer of polystyrene divinylbenzene, can be satisfactorily applied for the simultaneous retention of nucleosides and nucleobases regardless of the presence or absence of the *cis*-diol group in their structure. The proposed procedure used only 2 mL of urine but sample volume can be easily increased in order to maximize the sensibility. Recoveries in the range 65–113% were found for all the target compounds with detection limits in the 40–170 ng/L range.

The applicability of the proposed procedure in human urine from healthy people was tested. The endogenous levels of these urinary compounds were confirmed using the method of standard additions for quantification directly in the untreated urine matrix. This confirms that the methodology developed, SPE with a polymeric sorbent prior to CE-ESI-MS, is a suitable approach when wishing to perform the simultaneous determination of modified nucleosides and nucleobases in urine at low concentration levels.

#### Acknowledgements

The Ministerio de Economía y Competitividad, Spain, (Project CTQ 2011–24075) is gratefully acknowledged for financial support for this work. R.H.P. and D.G.G. acknowledge financial assistance from the Spanish Government (FPI and FPU grants respectively).

#### References

- [1] F. Oerlemans, F. Lange, Major and modified nucleosides as markers in ovarian cancer: a pilot study, *Gynecol. Obstet. Invest.* 22 (1986) 212–217.
- [2] T. Rasmussen, G.R. Björk, L. Damber, L. Jacobsson, A. Jeppsson, T. Stigbrand, G. Westman, Tumor markers in mammary carcinoma, *Acta Oncol.* 26 (1987) 261–267.
- [3] T. Rasmussen, G.R. Björk, Urinary excretion of pseudouridine and prognosis of patients with malignant lymphoma, *Acta Oncol.* 34 (1995) 61–67.
- [4] J.E. McEntire, K.C. Kuo, M.E. Smith, D.L. Stalling, J.W. Richens, R.W. Zumwalt, C.W. Gehrke, B.W. Papermaster, Classification of lung cancer patients and controls by chromatography of modified nucleosides in serum, *Cancer Res.* 49 (1989) 1057–1062.
- [5] E. Kvist, K.E. Sjölin, J. Iversen, K. Nyholm, Urinary excretion patterns of pseudouridine and beta-aminoisobutyric acid in patients with tumours of the urinary bladder, *Urol. Nephrol.* 27 (1993) 45–53.
- [6] K. Nakano, T. Nakao, K.H. Schram, W.M. Hammargren, T.D. McClure, E. Petersen, Urinary excretion of modified nucleosides as biological marker of RNA turnover in patients with cancer and AIDS, *Clin. Chim. Acta* 218 (1993) 169–183.
- [7] G. Xu, H.R. Schmid, H.M. Liebich, P. Lu, Excretion pattern investigation of urinary normal and modified nucleosides of breast cancer patients by RP-HPLC and factor analysis method, *Biomed. Chromatogr.* 14 (2000) 459–463.
- [8] J. Yang, G.W. Xu, Y.F. Zheng, H. Kong, T. Pang, S. Lv, Q. Yang, Diagnosis of liver cancer using HPLC-based metabolomics avoiding false-positive result from hepatitis and hepatocirrhosis diseases, *J. Chromatogr. B* 813 (2004) 59–65.
- [9] M.L. Chen, S.-S. Wei, B.-F. Yuan, Y.-Q. Feng, Preparation of methacrylate-based monolith for capillary hydrophilic interaction chromatography and its application in determination of nucleosides in urine, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 183–192.
- [10] E. Dudley, F. Lemiere, W.R. VanDongen, R.S. Tuytten, S. El-Sharkawi, A.G. Brenton, L. Esmans, R.P. Newton, Analysis of urinary nucleosides. IV. Identification of urinary purine nucleosides by liquid chromatography/electrospray mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 2730–2738.
- [11] S.H. Lee, B.H. Jung, S.Y. Kim, B.C. Chung, A rapid and sensitive method for quantitation of nucleosides in human urine using liquid chromatography/mass spectrometry with direct urine injection, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 973–977.
- [12] E. Rodríguez-Gonzalo, D. García-Gómez, R. Carabias-Martínez, 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, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 9055–9063.
- [13] S. Studzinska, B. Buszewski, A new way to fast and high resolution determination of modified nucleosides, *J. Chromatogr. B* 887–888 (2012) 93–101.
- [14] W. Struck, D. Siluk, A. Yumba-Mpanga, M. Markuszewski, R. Kaliszán, M. Jan Markuszewski, Liquid chromatography tandem mass spectrometry study of urinary nucleosides as potential cancer markers, *J. Chromatogr. A* 1283 (2013) 122–131.
- [15] R.G. Zhao, G.B. Xu, B. Yue, H.M. Liebich, Y. Zhang, Artificial neural network classification based on capillary electrophoresis of urinary nucleosides for the clinical diagnosis of tumours, *J. Chromatogr. A* 828 (1998) 489–496.
- [16] Y.F. Zheng, H.W. Kong, J.H. Xiong, S. Lv, G.W. Xu, Clinical significance and prognostic value of urinary nucleosides in breast cancer patients, *Clin. Biochem.* 38 (2005) 24–30.
- [17] Y.F. Zheng, G.W. Xu, D.Y. Liu, J.H. Xiong, P.D. Zhang, C. Zhang, Q. Yang, S. Lv, Study of urinary nucleosides as biological marker in cancer patients analyzed by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Electrophoresis* 23 (2002) 4104–4109.
- [18] H.M. Liebich, G. Xu, C.D. Stefano, R. Lehmann, Capillary electrophoresis of urinary normal and modified nucleosides of cancer patients, *J. Chromatogr. A* 793 (1998) 341–347.
- [19] H.M. Liebich, R. Lehmann, G. Xu, H.G. Wahl, H.-U. Häring, Application of capillary electrophoresis in clinical chemistry: the clinical value of urinary modified nucleosides, *J. Chromatogr. B* 745 (2000) 189–196.
- [20] S. La, J.H. Cho, J.-H. Kim, K.-R. Kim, Capillary electrophoretic profiling and pattern recognition analysis of urinary nucleosides from thyroid cancer patients, *Anal. Chim. Acta* 486 (2003) 171–182.
- [21] Y. Jiang, Y. Ma, A fast capillary electrophoresis method for separation and quantification of modified nucleosides in urinary samples, *Anal. Chem.* 81 (2009) 6474–6480.
- [22] R. Hernández-Prieto, D. García-Gómez, E. Rodríguez-Gonzalo, R. Carabias-Martínez, Capillary electrophoresis with mass spectrometric detection for the determination of urinary levels of modified nucleoside, in: *Communication Presented at Euroanalysis XVI, Belgrade, 2012*.
- [23] H.M. Liebich, S. Müller-Hagedorn, F. Klaus, K. Meziane, K.-R. Kimb, A. Frickenschmidt, B. Kammerer, Chromatographic, capillary electrophoretic and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of urinary modified nucleosides as tumor markers, *J. Chromatogr. A* 1071 (2005) 271–275.
- [24] E. Szymanska, M.J. Markuszewski, K. Bodzioch, R. Kaliszán, Development and validation of urinary nucleosides and creatinine assay by capillary electrophoresis with solid phase extraction, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 1118–1126.
- [25] Y. Mao, X. Zhao, S. Wang, Y. Cheng, Urinary nucleosides based potential biomarker selection by support vector machine for bladder cancer recognition, *Anal. Chim. Acta* 598 (2007) 34–40.
- [26] 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, Role of nitrogen Lewis basicity in boronate affinity chromatography of nucleosides, *Anal. Chem.* 79 (2007) 6662–6669.
- [27] S. Wang, X. Zhao, Y. Mao, Y. Cheng, Novel approach for developing urinary nucleosides profile by capillary electrophoresis-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1147 (2007) 254–260.
- [28] D.J. Weiss, C.E. Lunte, Detection of a urinary biomarker for oxidative DNA damage 8-hydroxydeoxyguanosine by capillary electrophoresis with electrochemical detection, *Electrophoresis* 21 (2000) 2080–2085.
- [29] L.-B. Jeng, W.-Y. Lo, W.-Y. Hsu, W.-D. Lin, C.-T. Lin, C.-C. Lai, F.-J. Tsai, Analysis of urinary nucleosides as helper tumor markers in hepatocellular carcinoma diagnosis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 1543–1549.
- [30] N.C. van de Merbel, Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 924–933.

## ORIGINAL ARTICLE

## Adenosine monophosphate is elevated in the bronchoalveolar lavage fluid of mice with acute respiratory toxicity induced by nanoparticles with high surface hydrophobicity

Lea Ann Dailey<sup>1,2</sup>, Raquel Hernández-Prieto<sup>1,3</sup>, Ana Maria Casas-Ferreira<sup>3</sup>, Marie-Christine Jones<sup>4</sup>, Yanira Riffo-Vasquez<sup>1,5</sup>, Encarnación Rodríguez-Gonzalo<sup>3</sup>, Domenico Spina<sup>1,5</sup>, Stuart A. Jones<sup>1</sup>, Norman W. Smith<sup>6</sup>, Ben Forbes<sup>1</sup>, Clive Page<sup>1,5</sup>, and Cristina Legido-Quigley<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Pharmaceutical Science, King's College London, London, UK, <sup>2</sup>MRC-PHE Centre for Environment and Health, London, UK, <sup>3</sup>Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, University of Salamanca, Salamanca, Spain, <sup>4</sup>Pharmacy, Pharmacology, Therapeutics section, School of Clinical and Experimental Medicine, University of Birmingham, Birmingham, UK, <sup>5</sup>Sackler Institute of Pulmonary Pharmacology, King's College London, London, UK, and <sup>6</sup>Division of Environmental and Analytical Science, King's College London, London, UK

**Abstract**

Inhaled nanomaterials present a challenge to traditional methods and understanding of respiratory toxicology. In this study, a non-targeted metabolomics approach was used to investigate relationships between nanoparticle hydrophobicity, inflammatory outcomes and the metabolic fingerprint in bronchoalveolar fluid. Measures of acute lung toxicity were assessed following single-dose intratracheal administration of nanoparticles with varying surface hydrophobicity (i.e. pegylated lipid nanocapsules, polyvinyl acetate nanoparticles and polystyrene beads; listed in order of increasing hydrophobicity). Broncho-alveolar lavage (BAL) fluid was collected from mice exposed to nanoparticles at a surface area dose of 220 cm<sup>2</sup> and metabolite fingerprints were acquired via ultra pressure liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomics. Particles with high surface hydrophobicity were pro-inflammatory. Multivariate analysis of the resultant small molecule fingerprints revealed clear discrimination between the vehicle control and polystyrene beads ( $p < 0.05$ ), as well as between nanoparticles of different surface hydrophobicity ( $p < 0.0001$ ). Further investigation of the metabolic fingerprints revealed that adenosine monophosphate (AMP) concentration in BAL correlated with neutrophilia ( $p < 0.01$ ), CXCL1 levels ( $p < 0.05$ ) and nanoparticle surface hydrophobicity ( $p < 0.001$ ). Our results suggest that extracellular AMP is an intermediary metabolite involved in adenosine nucleotide-regulated neutrophilic inflammation as well as tissue damage, and could potentially be used to monitor nanoparticle-induced responses in the lung following pulmonary administration.

**Keywords**

AMP, broncho-alveolar lavage, hydrophobicity, inflammation, lung, metabolomics, nanoparticles

**History**

Received 23 August 2013  
Revised 24 January 2014  
Accepted 6 February 2014  
Published online 12 March 2014

**Introduction**

Safety assessment for inhaled nanomaterials is complex and advances in respiratory nanotoxicology depend upon developing a mechanistic understanding to link physical and chemical properties to measurable toxicological outcomes. According to some classifications, nanomaterials may be divided into high- and low-toxicity materials based on their dose-response in the lungs (Aitken et al., 2009; Fadeel et al., 2012). High-toxicity nanoparticles which induce inflammation at low doses are generally composed of highly reactive materials, e.g. materials with significant positive or negative surface charge or materials that become toxic upon intracellular processing (Cho et al., 2012). In contrast, low-toxicity nanomaterials (e.g. titanium dioxide,

gold, silver and polystyrene) tend to present a much more inert surface, hence they require much higher exposure doses to induce pulmonary inflammation (Donaldson et al., 2008; Duffin et al., 2007). This response to low-toxicity nanoparticles is attributed primarily to the high material burden rather than nanomaterial reactivity (Maynard et al., 2011).

Most of the studies of low-toxicity nanomaterials have been conducted using rigid, crystalline, insoluble materials, whereas there has been less research on the response of the respiratory system to the administration of organic nanomaterials (Beyerle et al., 2011; Dailey et al., 2006; Harush-Frenkel et al., 2010; Liu et al., 2009; Nassimi et al., 2009), sometimes referred to as soft nanomaterials (Nalwa, 2009). Organic nanomaterials are increasingly being developed as inhaled nanomedicines or components of aerosol-based consumer products, e.g. hairsprays, cleaning products, and include nanoconstructs such as liquid crystals, proteins, nucleic acids, polymers, surfactants, micelles or emulsions (Nalwa, 2009). These have very different physico-chemical properties compared to rigid crystalline nanoparticles and typically present an amorphous, more flexible surface that may be highly hydrated (Dailey, 2009; Maynard et al., 2011;

Correspondence: Lea Ann Dailey, Institute of Pharmaceutical Science, King's College London, 150 Stamford Street, SE1 9NH London, UK. Tel: +44 207 848 4780. E-mail: lea\_ann.dailey@kcl.ac.uk Cristina Legido-Quigley, Institute of Pharmaceutical Science, King's College London, 150 Stamford Street, SE1 9NH London, UK. Tel: +44 207 848 4722. E-mail: cristina.legido\_quigley@kcl.ac.uk

Moghimi & Szebeni, 2003; Lorusso et al., 2007). Hence, it is important to evaluate how the respiratory system responds to the physicochemistry presented by organic nanomaterials, especially when these are biopersistent.

Surface hydrophobicity is one feature of many organic nanoparticles and has been identified as a defining factor in how the lungs respond to their administration (Beyerle et al., 2011; Maynard et al., 2011). In this study, hydrophobic interaction chromatography (HIC) (Carstensen et al., 1991) was used to characterise five different nanoconstructs, designed to possess increasing surface hydrophobicity. The nanoconstructs included two different lipid nanocapsule (LNC) formulations, two types of polyvinyl acetate (PVAc) nanoparticles, and commercially available polystyrene beads as a control material to benchmark to the literature. Nanoparticles were administered intratracheally (i.t.) to mice. Bronchoalveolar lavage (BAL) fluid was collected at 24 h and evaluated for markers of inflammation and tissue damage. Neutrophil counts and cytokine levels in BAL confirmed that the nanoparticles induced an inflammatory response linked to increasing surface hydrophobicity, with responses similar to those reported for known low-toxicity nanomaterials (Brown et al., 2001; Dailey et al., 2006; Duffin et al., 2007).

In metabolomics research, it is conventional to develop investigations through a two phase approach. In the first phase, non-targeted metabolomics is used to screen for differences in metabolite levels that indicate perturbations in normal metabolic pathways. The strength of this approach is that it is non-biased towards any particular outcome (i.e. non-hypothesis driven) and may therefore identify putative markers of both known and previously undiscovered metabolic pathways. Once metabolites of interest have been identified, targeted phase two studies are designed to investigate specific pathways of interest, evaluate multiple compartments or perform longitudinal studies. The primary aim of this study was to apply non-targeted metabolomics to assess whether nanoparticle-induced acute respiratory toxicity yields informative metabolite profiles in BAL fluid and identify putative markers of nanoparticle-induced toxicity. It was anticipated that BAL fluid from vehicle control animals would differ significantly in metabolite profile compared to that of animals exposed to nanoparticles. Further, it was postulated that specific metabolites may be identified which correlate with the acute respiratory toxicity induced by nanoparticles of increasing surface hydrophobicity.

## Methods

### Polymer synthesis

Two grades of PVAc, high-molecular weight (148 kDa) and low-molecular weight (12.8 kDa), were purchased from Sigma Aldrich, Dorset, UK. The 148 kDa PVAc was subjected to direct saponification according to the method described by Chana et al. (2008) producing a modified PVAc polymer with 17 mol% hydroxyl groups and 83 mol% residual acetate groups (PVAc80). The 12.8 kDa PVAc polymer was subjected to direct saponification under different reaction conditions to produce a PVAc polymer with 34 mol% hydroxyl groups and 66% residual acetate groups (PVAc60) (Chana et al., 2008). Polymer purity and degree of hydrolysis were verified by NMR analysis prior to use. Poly vinyl alcohol (PVA; 8–12 kDa; 80 mol% hydroxyl; 20 mol% acetate groups) was used as a stabiliser in the manufacturing of nanoparticle and was purchased from Sigma Aldrich, Dorset, UK.

### Manufacture of PVAc nanoparticles

PVAc60 nanoparticles were prepared according to a method by Chana et al. (2008) by injecting a solution of 5% w/v PVAc60

dissolved in 2:1 methanol:water into a 0.33% w/v aqueous solution of the stabiliser, PVA, whilst stirring at 3500 rpm. PVAc80 nanoparticles were prepared by injecting a solution of 1% w/v PVAc80 dissolved in 2:1 methanol:water into a 0.33% w/v aqueous solution of the stabiliser, PVA, whilst stirring at 3500 rpm. Following 30 min constant stirring at 4000 rpm and solvent evaporation overnight (~100 rpm), the nanosuspensions were dialysed against water (72 h) to remove excess PVA and subsequently concentrated to the desired final concentration using ultrafiltration centrifuge tubes (Millipore Corporation, Billerica, MA; 100 kDa MWCO). Residual PVA was <0.4–0.5 mg/mL. Particles were stored at 4 °C and were used within one week of preparation.

### Manufacture of LNCs

LNCs were manufactured using a phase-inversion temperature method (Heurtault et al., 2003). LNCs with a diameter of ~50 nm (LNC50) were prepared by generating a coarse emulsion of 17% w/v Labrafac® WL1349 (Gattefosse, Saint-Priest, France), 17.5% w/v Solutol® HS15 (BASF, Ludwigshafen, Germany), 1.75% w/v Lipoid® S75-3 (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany) and 3% w/v NaCl in purified water. This emulsion was then submitted to repeated heating cooling cycles (85°–60°–85°–60°–85° °C) before cooling to 72 °C at which point ice-cold water was added. Excess stabiliser (Solutol® HS15) was removed from the suspension by dialysis (72 h) against water containing BioBeads® (BioRad, Hertfordshire, UK) and subsequent concentration using ultrafiltration centrifuge tubes (Millipore Corporation, Billerica, MA; 100 kDa MWCO). Residual Solutol HS 15 content was determined to be <0.5 mg/mL. LNC with a diameter of ~150 nm (LNC150) were prepared and purified using the same method, except that the relative concentrations of the three main coarse emulsion components were: 25% w/v Labrafac WL1349, 8.5% w/v Solutol® HS15, 1.75% w/v Lipoid S75-3 (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany) and 3% w/v NaCl in purified water. Particles were stored at 4 °C and were used within one week of preparation.

### Polystyrene nanoparticles

Unmodified polystyrene nanoparticles with a diameter of 50 nm (PSS0; 2.62% m/v) were used as a control and were purchased from Polysciences (Eppelheim, Baden-Württemberg, Germany).

### Nanoparticle size and surface charge

Particle size and zeta potential were determined using a Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcesterchire, UK). Particle suspensions were diluted in the test medium (purified water, 6.3 mM sodium chloride or Hank's buffered saline solution containing 10% fetal bovine serum) prior to measurement and the analysis parameters (viscosity, temperature, refractive index) were adjusted to match the medium and sample type used for analysis.

### Nanoparticle hydrophobicity

Surface hydrophobicity of nanoparticle suspensions ( $n=3$  three individual batches) was assessed using HIC (Carstensen et al., 1991). Briefly, 250 µL nanoparticle suspension was prepared in phosphate-buffered saline (PBS) and eluted through three different HiTrap™ substituted sepharose hydrophobic interaction columns: Butyl FF, Phenyl FF (high substitution) and Octyl FF (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK). Fractions of 1 mL elutant were collected and analysed for particle content via turbidity measurement (Lambda 35; Perkin-Elmer, Cambridge, UK;  $\lambda=450$  nm). The column-bound particle fraction was subsequently eluted from the column using 0.1% Triton X-100 and turbidity measured. Absorbance values were plotted against

DOI: 10.3109/1743590.2014.894150

Elevated AMP in BAL correlates with nanoparticle exposure 3

elution volumes and two area under the curve (AUC) values were calculated using Origin™ software. The percentage particle retention in each of the three columns was defined as:

$$\% \text{ Column retention (\%R)} = \left( \frac{\text{AUC TritonX}}{\text{AUC PBS} + \text{AUC TritonX}} \right) \times 100 \quad (1)$$

The HIC index value was calculated according to Equation (2):

$$\text{HIC index} = \frac{(\%R_{\text{butyl}}) + (\%R_{\text{phenyl}}) + (\%R_{\text{octyl}})}{300\%} \quad (2)$$

In the denominator, the 300% value represents the theoretical case of 100% retention on each column ideally achieved by a particle with maximum hydrophobicity. HIC index analysis was performed using a one way ANOVA comparison with a post-hoc Tukey test. *p* Value < 0.05 was considered to be statistically significant.

#### *In vivo* studies

Male BALBc mice (6–8 weeks old, ~22 g; Charles River, UK) were used for *in vivo* pulmonary administration. All experiments were in accordance with the UK Home Office regulations and approved by the local ethics committee. Animals were divided into to six groups (*n* = 5–7) for treatment with either the vehicle control (5% dextrose; DEX) or nanoparticle suspensions. Dosing was spread across four different dates, with vehicle controls (1–2 animals) dosed at every session and 2–4 animals from different nanoparticle groups treated on a rotational basis. A theoretical nanoparticle surface area dose of 220 cm<sup>2</sup> per instillation was chosen for study as this has been shown to induce a moderate inflammation in selected literature reports (Donaldson et al., 2000; Duffin et al., 2007). Particle surface area doses were calculated from the hydrodynamic diameter of the particles, assuming a density of ca. 1 g/cm<sup>3</sup> for PVAc nanoparticles and 0.96 g/cm<sup>3</sup> for LNC (estimated from the density of the oil which is the main constituent), and equated to ~200 μg nanoparticles per lung for the smaller LNC50 and PS systems and ~500 μg nanoparticles per lung for the larger LNC150, PVAc60 and PVAc80 systems. All suspensions were prepared in dextrose 5% w/v to ensure isotonicity and colloidal stability and a 5% w/v dextrose solution was used as the vehicle control for all experiments.

Prior to i.t. dosing, animals were anaesthetised by inhaled isoflurane (1–3%) and maintained with an intraperitoneal injection of 100 mg/kg ketamine mixed with 20 mg/kg xylazine in 0.1 mL saline. This combination of tranquiliser/dissociative yielded a moderate level of anaesthesia for 15–20 min, as assessed by paw pinch withdrawal reflex. Mice were suspended at a 45° angle by their upper incisors and nanosuspensions (50 μL) were administered as a coarse aerosol into the lungs using a Penn Century Microsprayer® aerosoliser (Penn-Century Inc., Wyndmoor, PA). Animals were kept warm post-treatment with a heat lamp, then returned to their cages when ambulatory (<15 min). This administration method was chosen as it has been shown to achieve a more homogenous distribution of liquids into the lungs compared with conventional bolus i.t. instillation techniques (Bivas-Benita et al., 2005).

#### Bronchoalveolar lavage fluid analysis

Mice were euthanised via terminal anaesthesia with urethane (2 mg/g i.p., Sigma Chemical Co.) 24 h after nanoparticle administration and a cannula was inserted into the exposed trachea. The lungs were lavaged with three aliquots (0.5 mL) of sterile saline that was recovered through the cannula. The total number of cells in the cellular fraction of the lavage was

counted with a Neubauer haemocytometer (Fisher Scientific, Loughborough, UK). Differential cell counts were performed using cytopsin preparations (i.e. 100 μL BAL cellular fraction centrifuged at 300 g for 1 min using a Shandon Cytospin 2 (Shandon Southern Instruments, Sewickley, PA) at room temperature). Cells were stained with Diffquick® (DADE Behring, Marburg, Germany) and a total of 200 cells were counted to determine the proportion of neutrophils, eosinophils and mononuclear cells using standard morphological criteria. Eosinophils were not observed in any of the samples and are not reported. It was assumed that at the time point studied, the mononuclear cell population consisted primarily of resident alveolar macrophages and therefore lymphocyte numbers were not investigated. The presence of erythrocytes in BAL was used as an indication of tissue damage. To evaluate this, the number of erythrocytes present within a single representative field of view (40× magnification) of a cytopsin preparation were counted.

Cytokines present in the BAL supernatant were quantified using a murine 7-plex pro-inflammatory cytokine assay (MSD®96-Well Multi-Spot Cytokine Assay; Meso-Scale Discovery, Gainsborough, MD) coupled with an MSD reader, which measures cytokine content via electrochemiluminescence. Of the seven cytokines analysed (IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12p70, CXCL1 (KC/GRO/CINC), and TNF-α), IL-10 and IL-12p70 were below detectable limits and were therefore not reported. As a further measure of tissue integrity, total protein levels in BAL were quantified using a Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK) according to manufacturer's instructions. A two-sided Mann-Whitney test was used for the comparison of BAL neutrophil counts, cytokine and protein levels in all the samples exposed to nanoparticles compared to the vehicle control (5% dextrose). *p* Value < 0.05 was considered to be statistically significant.

#### Sample preparation and UPLC-Q-ToF analysis

Extra pure formic acid and LC-MS grade acetonitrile (ACN) and water were purchased from Fluka (Sigma-Adrich). Aliquots (400 μL) of BAL fluid samples (DEX, *n* = 6; LNC50, *n* = 7; LNC150, *n* = 6; PVAc60, *n* = 5; PVAc80, *n* = 7; and PS, *n* = 7) were transferred to clean tubes and evaporated to dryness at 100 °C. Samples were reconstituted in 100 μL of 50:50 (v:v) purified water containing 0.1% formic acid and ACN containing 0.1% formic acid. Samples were vortexed for 1 min at room temperature. Quality control samples (*n* = 5) consisted of samples without a pre-concentration step. These were used to verify retention time and mass during the duration of the analytical run (Whiley et al., 2012). Samples were run on a Waters Acquity coupled to a Waters Xevo QTOF-MS. The UPLC was performed on a Waters ACQUITY UPLC™ system, equipped with binary solvent delivery manager, sample manager and quadrupole time of flight mass spectrometer. Parameters were as listed: chromatographic column (Garcia-Perez et al., 2010) UPLC-BEH C18, 2.1 × 100 mm (Waters Corporation, Milford, MA); mobile phase A: H<sub>2</sub>O (0.1% formic acid) and B: ACN (0.1% formic acid); gradient analysis: 90% A and 10% B isocratic for 0–5, 5–20 min gradient to 100% B, 20–25 min isocratic 100% B; flow rate: 0.5 mL/min; pressure circa 9000 psi. The MS was operated in the positive ion mode with a capillary voltage of 2.7 kV and a cone voltage of 50 V. The desolvation gas flow was 490 L/h at a temperature of 300 °C and the cone gas flow was 10 L/h. A source temperature of 100 °C was used. All analyses were acquired using the lock spray to ensure accuracy and reproducibility; leucine enkephalin was used as lock mass (*m/z* 556.2771 Da) at a concentration of 200 ng/mL and a flow rate of 10 μL/min. Data were collected in the centroid mode with a lock spray frequency of 11 s over the mass range *m/z* 50–850 with an acquisition time of

Table 1. Composition and physicochemical properties of the five organic nanoparticles studied.

Abbreviation	Lipid nanocapsules		Polymeric nanoparticles		
	LNC50	LNC150	PVAc60	PVAc80	PS
Nanoparticle core	90% TG	93% TG	99% PVAc60	96% PVAc80	Polystyrene
Nanoparticle stabiliser	0.3% PEG-HS 9.3% PC	0.2% PEG-HS 6.5% PC	0.8% PVA	3.8% PVA	Undisclosed
Diameter (nm)	40 ± 3	143 ± 2	160 ± 7	165 ± 7	54 ± 4
PDI	0.14 ± 0.02	0.32 ± 0.42	0.13 ± 0.03	0.08 ± 0.03	0.04 ± 0.02
ζ (mV)	-7 ± 4	-4 ± 1	-3 ± 1	-4 ± 1	-25 ± 5
Stability in H <sub>2</sub> O (4 °C)	>4 weeks	>4 weeks	>4 weeks	>4 weeks	>4 weeks
Stability in HBSS (37 °C)	>24h	>24h	>24h	Immediate aggregation	Immediate aggregation

PEG-HS = polyethylene glycol<sub>660</sub>-(15)-hydroxystearate; PC = soy lecithin; TG = medium chain triglycerides; PVA = polyvinyl alcohol; PVAc = polyvinyl acetate; PDI = polydispersity index; ζ = zeta potential.

250 ms, inter-scan delay of 50 ms. The chromatograms were obtained by injecting 4 μL. Sample sequences were assembled in blocks with blanks every seven injections to monitor for hydrophobic compound carry-over and QC samples were run to ensure analytical reproducibility. Identification of adenosine monophosphate (AMP) was made by first searching databases and then confirmation with MS-MS analyses of two AMP standard compounds (AMP 5' and 3' standards; Sigma-Aldrich, Dorset, UK).

#### UPLC-Q-ToF data analysis

UPLC-Q-ToF data were analysed using Mass Lynx version 4.1, published by Waters Corporation, Milford, MA, and exported to SIMCA-PTM software version 11.5, published by Umetrics AB, Umeå, Sweden. Data comprised 38 BAL samples, seven blanks and 4753 variables per chromatogram (each variable was a retention time and m/z). Models were created by normalising to total chromatogram area and scaling variables to *pareto* in all principal component analyses (PCA), orthogonal partial least squares discriminant analyses (OPLS-DA) and partial least squares (PLS) analyses. PCA was used to assess quality controls and identify outliers in the groups. PLS detects the variation in the fingerprint data as a whole (x-block) and compares it with variation patterns in the metadata (e.g. discrimination, hydrophobicity, neutrophilia or cytokine levels; y-block). PLS divides the analysis into two parts: one part models the covariation between the fingerprint patterns ( $R^2X\%$  is the percentage correlation of the metabolite fingerprints or goodness-of-fit) and the second part models correlation to metadata ( $R^2Y\%$ ). The  $Q^2$  (%) or goodness-of-prediction value expressed the prediction power of the model and is the output of a seven-fold cross-validation. Two to three components were calculated for each model. Models were cross-validated independently by 100-fold scrambling and a CV-ANOVA test. Only features that showed high correlation to either treatment group were considered for identification and semi-quantification.

Metabolite identification was achieved by database searching of in-house libraries and the Human Metabolome Database (HMDB; now containing 40 000 metabolite entries) for standard compounds and their molecular fragmentation pattern (Whiley et al., 2012; Xiayan & Legido-Quigley, 2008). A two-sided Mann-Whitney test was used to assess significance of AMP measurements for all samples exposed to nanoparticles compared to the vehicle control.

#### Results

##### Manufacture of organic nanoparticles with varying surface hydrophobicity

Two discrete size classes of nanoparticles (~50 and 150 nm) were included in the study (Table 1). The sizes were dictated by the

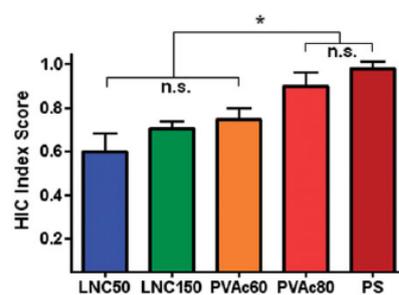


Figure 1. Quantitative evaluation of nanoparticle surface hydrophobicity expressed as the HIC index score of five nanoconstructs. Values represent the mean ± standard deviation of  $n = 3$  individual nanoparticle batches. \* $p < 0.05$ .

chemical composition and the manufacturing techniques used to produce the nanoparticles. The nanoparticles studied did not exhibit a pronounced surface charge and all nanoparticles were physically stable in purified water for up to four weeks. LNC50, LNC150 and PVAc60 retained their original size in Hank's buffered saline (HBSS) at 37 °C for over 24h, but PVA80 and PS50 aggregated immediately upon addition to HBSS (Table 1).

The surface hydrophobicity of the nanoparticles was quantified using a HIC index scale (zero = hydrophilic, 1.00 = hydrophobic). The nanoparticles studied spanned the upper 50% of the HIC index scale, ~0.60–0.96 (Figure 1). PS beads exhibited a nearly maximal hydrophobicity (0.96 ± 0.03) and therefore served as an excellent reference material. The other nanoparticles used in the study exhibited a surface hydrophobicity rank order of LNC50 < LNC150 < PVAc60 < PVAc80. Statistical analysis of the HIC index values revealed two major groupings, lower surface hydrophobicity particles (LNC50, LNC150 and PVAc60; HIC index 0.60–0.80) and high surface hydrophobicity particles (PVAc80 and PS; HIC index > 0.85).

##### Respiratory toxicity of high surface hydrophobicity nanoparticles

Neutrophilia and elevated pro-inflammatory cytokine levels were observed at significant levels in BAL for the two high hydrophobicity nanoparticle treatments, PVAc80 and PS (Figure 2a, b, and d). The moderate inflammation induced in response to PS nanoparticles was consistent with benchmark studies (Dailey et al., 2006; Donaldson et al., 2000; Duffin et al., 2007). Total protein levels in BAL from nanoparticle treatment groups were not significantly different from the dextrose vehicle control or

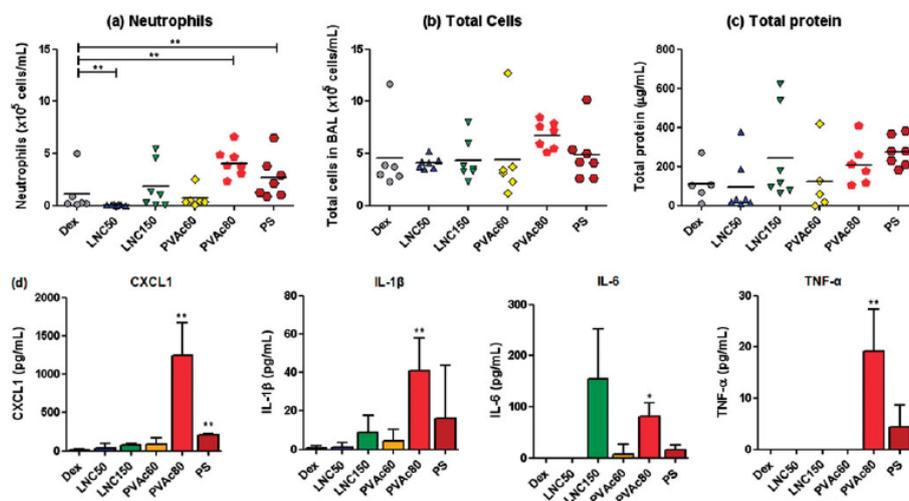


Figure 2. Assessment of respiratory toxicity 24 h post intratracheal administration of five nanoparticles based on (a) neutrophil counts, (b) total cells, (c) total protein levels and (d) pro-inflammatory cytokine content in BAL fluid ( $n=5-7$  individual animals per group). \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

each other (Figure 2c). Trends in the protein data, which also correlate with increase in BAL erythrocyte numbers (Supplementary Figure S1a) suggest that high hydrophobicity nanoparticle treatment, especially PS exposure, generally resulted in higher BAL protein levels indicative of possible tissue damage, and the lack of statistical significance may result from the variability in the vehicle control group.

The high variability in both the inflammatory profile and BAL total protein content of the vehicle control (5% dextrose) compared with untreated controls and animals administered 0.9% saline vehicle via an oral aspiration technique (Supplementary Figure S1b) suggests that Microsprayer<sup>®</sup> administration may be responsible. Careful analysis showed that variability occurred randomly and potential outliers could not be correlated with factors such as animal batch, date of experiment or experience of the operator with the Microsprayer<sup>®</sup> administration technique. Furthermore, including putative outliers in the study allowed us to examine whether their fingerprints showed metabolite patterns indicative of toxicity (i.e. similar to positive control profiles).

#### Nanoparticle treatment results in significant differences in BAL metabolite fingerprints

In this study, a total of 38 BAL fluid samples from the six treatment groups (vehicle control, nanoparticles, and quality control samples) were investigated. The fingerprints acquired consisted of chromatograms from which 4753 molecular features were extracted. In a preliminary analysis using PCA, quality controls were superimposable verifying analytical reproducibility. OPLS-DA was used to compare the fingerprint profiles of vehicle and PS-treated groups (Figure 3), which acted as negative and positive controls, respectively (Brown et al., 2001; Dailey et al., 2006; Duffin et al., 2007). The analysis discriminated between PS nanoparticle treatment and the vehicle control ( $p=0.041$ ), indicating that different metabolites dominated the fingerprints of lungs exposed to nanoparticles compared to those that were not. Five molecule masses ( $m/z$  331.20, 284.95, 188.12, 182.18

and 174.10 Da) were identified from the model as unknown metabolites having the highest correlation (0.98 to 0.78) with PS exposure (elevated concentrations found in PS-treated group compared to vehicle control). These five molecules did not correspond to any of the known accurate masses in metabolite databases. In the case where molecular masses identified in a metabolomics study do not match reported masses and fragmentation patterns in databases, the process of identification requires isolation of the metabolite from the biological sample, utilisation of a variety of analytical approaches to solve the identity of the molecule, and finally MS-based verification using a pure reference compound. In many current studies, researchers will use the mass of unidentified metabolites as a biomarker until the tedious process of metabolite identification is completed.

OPLS-DA was also used to compare the BAL fingerprint profiles of animals exposed to lower hydrophobicity (LNC50, LNC150 and PVAc60) versus high hydrophobicity (PVAc80 and PS) nanoparticles (Figure 4). The analysis discriminated between the two HIC-index groupings ( $p<0.0001$ ). Interestingly, all five unknown metabolites associated with PS nanoparticle exposure ( $m/z$  331.20, 284.95, 188.12, 182.18 and 174.10 Da) were positively correlated in this analysis (correlation = 0.83 to 0.50; Figure 4) suggesting that these molecules are interesting candidates for targeted studies to investigate their potential as biomarkers of respiratory toxicity resulting from high hydrophobicity nanoparticle exposure.

Partial least squares (PLS) analysis was performed to analyse the incremental relationship between nanoparticle hydrophobicity, inflammatory outcomes and the BAL fingerprints. Total protein levels in BAL were excluded from PLS analysis due to the lack of statistically significant differences between groups. PLS analysis metrics for covariance of fingerprint data and nanoparticle HIC index score, neutrophil counts or BAL CXCL1 concentration are listed in Table 2, while the PLS score plot correlating covariance of fingerprint data with HIC index score is presented in Figure 5. A substantial correlation between metabolite fingerprints and measures of lung inflammation (neutrophils and CXCL1) was

Figure 3. OPLS-DA scores plot of the vehicle control (5% dextrose solution) and positive control (PS nanoparticle exposure) showing group separation ( $p = 0.041$ ).

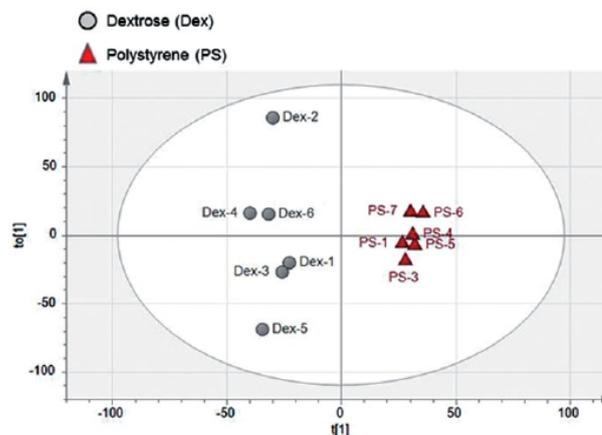


Figure 4. OPLS-DA scores plot of the lower surface hydrophobicity nanoparticle treatments (LNC50, LNC150 and PVAc60; HIC index: 0.6–0.80) and high surface hydrophobicity nanoparticle treatments (PVAc80 and PS; HIC index: >0.85) showing group separation ( $p$  value < 0.0001).

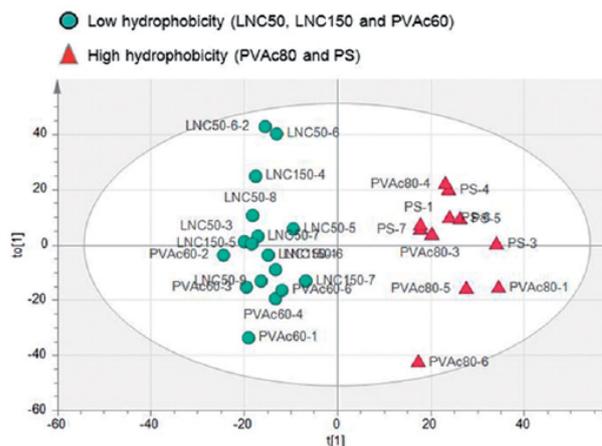


Table 2. PLS analyses to assess correlations between BAL small molecule fingerprints and nanoparticle hydrophobicity (HIC index), neutrophil count or BAL CXCL1 concentration.

	HIC index	Neutrophils	CXCL1
$R^2X$ (%)	28	28	29
$R^2Y$ (%)	98	97	98
$Q^2$ (%)	66	65	68
$p$ Value	0.001	0.01	0.04

The  $R^2X$ ,  $R^2Y$  and  $Q^2$  values are provided for each model in percentage.

indicated by the  $Q^2$  values of 65 and 68%, respectively. The model for covariance between metabolite fingerprints and nanoparticle hydrophobicity showed a similar predictive  $Q^2$  value of 66%, indicating a relationship between increasing nanoparticle hydrophobicity, lung inflammation and metabolite fingerprint models.

#### Elevated AMP levels induced by nanoparticles possessing high surface hydrophobicity

Analysis of the features that governed the correlation between metabolite fingerprint and HIC index identified a retention time and mass of interest. Using standard compounds and fragmentation patterns (Esther et al., 2008b), AMP ( $m/z$  348.06 Da with a main fragment observed at 136.06 Da) was identified as a signature molecule associated with the effects generated in the lungs by nanoparticle of increasing hydrophobicity. The loading plot of the PLS model is provided in the Supplementary Figure S2, showing all metabolite data featured in the model. AMP is one of the major metabolites identified in the loading plot as the driving the separation of groups according to HIC index value. The black arrow in the PLS score plot (Figure 5) indicates that samples located along the direction of the arrow contained higher levels of AMP.

DOI: 10.3109/17435390.2014.894150

Figure 5. PLS scores plot showing the relationship between individual nanoparticle fingerprints and HIC index values. The figure also shows the direction of an identified metabolite, AMP, which follows the trend of increased nanoparticle-induced toxicity.

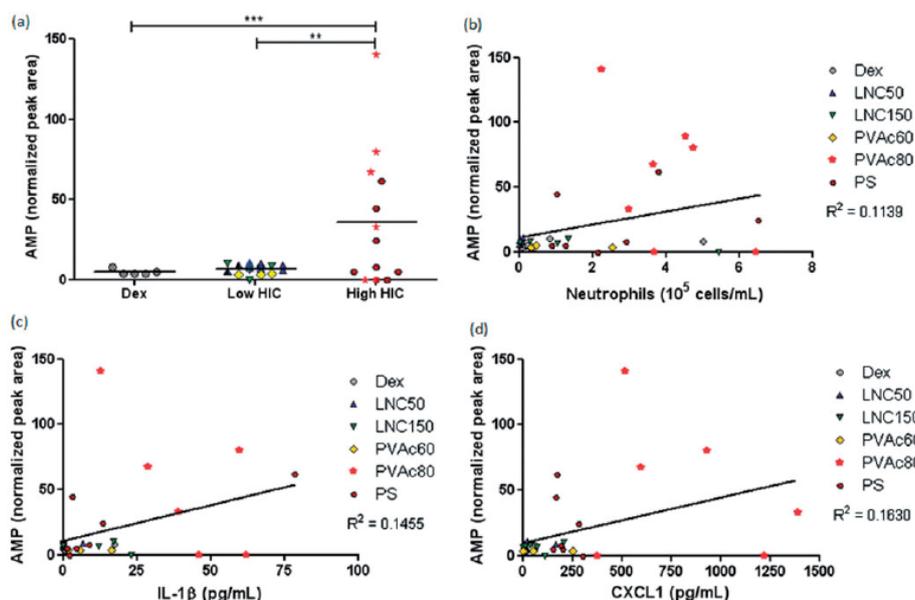
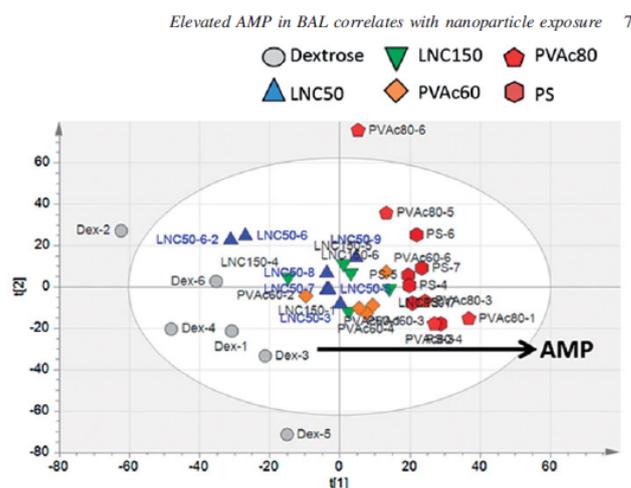


Figure 6. (a) AMP levels from vehicle controls, low hydrophobicity nanoparticle treatments (HIC index: 0.60–0.80) and high hydrophobicity nanoparticle treatments (HIC index: >0.85). \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . AMP levels in each BAL sample (peak area normalised to total fingerprint area) are also plotted against paired values for (b) the number of neutrophils, (c) CXCL1 levels in BAL and (d) IL-1 $\beta$  levels in BAL.

AMP was measured in all the chromatograms and validation of the molecule identity was performed with the pure compound (Supplementary Figure S3 showing MS-MS AMP identification). AMP levels were only significantly elevated in high HIC nanoparticle treatment groups compared to both low HIC ( $p < 0.01$ ) and vehicle ( $p < 0.001$ ) treatment groups

(Figure 6a). Scatter plots depicting paired values of AMP peak areas against neutrophil numbers, total protein levels and individual pro-inflammatory cytokine levels revealed significant correlations of elevated AMP with neutrophil counts (Figure 6b), CXCL1 levels (Figure 6c) and IL-1 $\beta$  levels (Figure 6d). Interestingly, the outlier in the dextrose vehicle

control group did not show highly elevated AMP levels in this analysis.

### Discussion

The aims of this study were twofold: (1) to assess the impact of high versus low nanoparticle surface hydrophobicity on lung toxicity and (2) to apply a non-targeted metabolomics strategy to investigate whether organic nanoparticle exposure would result in significantly differentiated BAL metabolite profiles and to identify putative markers of nanoparticle exposure. Using conventional measures of pulmonary inflammation and tissue damage, it was demonstrated that nanoparticles of different composition exhibiting a high surface hydrophobicity (PVAc80 and PS) were pro-inflammatory with indications of tissue damage, while low hydrophobicity nanomaterials (LNC50, LNC150 and PVAc60) induced little to no toxicity according to these parameters. Hydrophobic nanoparticle surface chemistries may induce respiratory toxicity through more than one mechanism. For example, it has been shown that proteins and opsonins may adsorb more favourably onto a hydrophobic surface, promoting recognition, uptake and inflammatory signaling by phagocytic cells (Ruge et al., 2012; Singh & Lillard, 2009). A pertinent mechanism in this study may be particle aggregation in physiological fluids resulting in irregular surfaces, which have been associated with higher inflammatory potential than comparable smooth-surface particles (Vaïne et al., 2013). Only the nanoparticles in the high surface hydrophobicity group (PS50 and PVAc80) aggregated in isotonic buffer at 37°C (Table 1), suggesting that this may occur to some extent *in vivo* and contribute to their enhanced toxicity profile.

In this study the effect of nanoparticle surface hydrophobicity on acute respiratory toxicity was established convincingly using conventional assays. Thus it was possible to undertake a non-targeted, phase one metabolomics study utilising the same BAL fluid samples. Non-targeted, NMR-based metabolomics screening has been used in a handful of studies to date to analyse intact tissues (lung, liver), as well as biofluids such as urine, serum and BAL from test animals after pulmonary, oral or intravenous

exposure to different nanomaterials, including copper oxide, silica and titanium dioxide (Bu et al., 2010; Hu et al., 2008; Lei et al., 2008; Lu et al., 2011). Notably, Hu et al. (2008) examined the respiratory effects of i.t. administration of high dose silica nanoparticles one week and four months post-exposure. Metabolites identified by NMR as highly correlated with silica exposure (both in BAL and lung tissue) were primarily associated with cell membrane damage (elevated cholines and phosphocholine species), as well as elevated levels of hydroxyproline, indicative of the typical fibrosis development associated with silicosis (Hu et al., 2008).

In this study, five unidentified metabolites and AMP were identified as candidate biomarkers of high hydrophobicity nanoparticle exposure. While metabolite identification is of major importance for the design of hypothesis-driven mechanistic studies of toxicity, it must be emphasised that the identification process of unknown molecules from UPLC-MS chromatograms is not trivial, as current databases only hold metabolite mass and fragmentation pattern information on a small fraction of the estimated total number of possible metabolites (Whiley et al., 2012). AMP, in contrast, was identifiable from databases through its mass, fragmentation pattern and subsequent validation using a pure standard substance (Figures S3). It was observed that AMP levels in BAL fluid correlated with high nanoparticle surface hydrophobicity and acute lung inflammation. This observation was interesting as, in contrast to many putative biomarkers identified in non-targeted metabolomic screens, there is literature evidence to link AMP with known mechanisms of respiratory toxicity (Esther et al., 2008a, 2009; Patel et al., 2013; Schmidt & Tuder, 2010; Wolak, 2009).

A hypothetical basis for the source of elevated extracellular AMP in nanoparticle-induced respiratory toxicity is depicted in Figure 7. The schematic presentation illustrates the interplay between passive (e.g. via necrosis) and active (e.g. via neutrophil secretion) mechanisms of ATP/adenyl purine release into the extracellular fluid (Schmidt & Tuder, 2010). Cellular damage and release of intracellular contents into the extracellular environment is reported to be a putative source of elevated extracellular adeny purines in conditions like acute lung injury

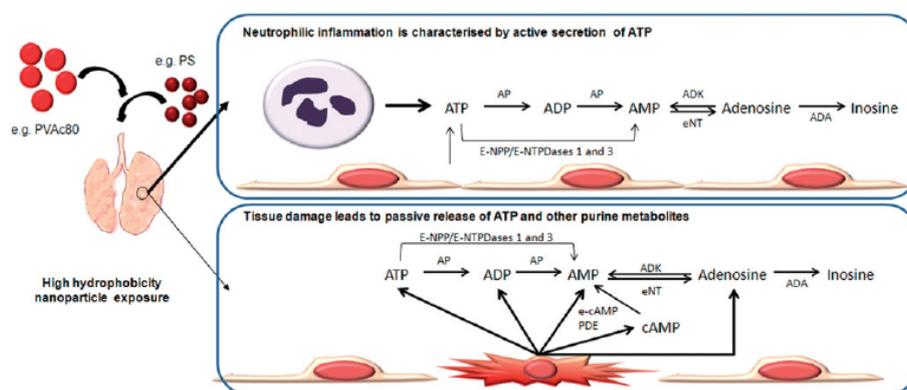


Figure 7. An illustration of the interplay between passive (e.g. via necrosis) and active (e.g. via neutrophil secretion) mechanisms of ATP/adenyl purine release into the extracellular fluid. The contribution of neutrophils and/or tissues to elevated purine levels in response to the administration of high hydrophobic surface nanoparticles is currently speculative. The simplified diagrams of extracellular ATP metabolism are based on information contained in (Barletta et al., 2012; Blackburn et al., 2009; Burch & Picher, 2006; Jackson et al., 2009; Robson et al., 2006; Schmidt & Tuder, 2010). E-NPP = Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases; AP = alkaline phosphatases; E-NTPDase = ecto-nucleoside triphosphate diphosphodolases; eNT = ecto-5'-nucleotidase; ADA = adenosine deaminase; ADK = adenosine kinase; e-cAMP-PDE = ecto-cAMP-phosphodiesterase.

(Schmidt & Tuder, 2010). Elevated extracellular levels of ATP activate the purine receptors, P<sub>2</sub>X and P<sub>2</sub>Y subtypes, which are expressed across a wide range of cell types in the lung and specifically promote chemotaxis, release of pro-inflammatory cytokines, actin mobilisation and enhanced phagocytosis, as well as respiratory burst events in neutrophils (Barletta et al., 2012; Jacob et al., 2013). Notably, P<sub>2</sub>X stimulation is associated with activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells and subsequent secretion of IL-1 $\beta$  (Schmidt & Tuder, 2010).

Activated neutrophils also secrete high quantities of ATP into the extracellular environment, thus propagating inflammation (Figure 7; Barletta et al., 2012; Jacob et al., 2013). The potent pro-inflammatory effects of extracellular ATP are therefore regulated by its rapid metabolism in the lung lining fluid to ADP, AMP and adenosine. The lung mucosal surface possesses four major classes of enzymes to metabolise ATP to adenosine: ectonucleotidase:ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases (E-NPP: ATP  $\rightarrow$  AMP), alkaline phosphatases (AP: ATP  $\rightarrow$  ADP  $\rightarrow$  AMP  $\rightarrow$  adenosine) and ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases: ATP  $\rightarrow$  AMP) and ecto-5'-nucleotidase (eNT: AMP  $\rightarrow$  adenosine) (Burch & Picher, 2006; Button & Button, 2013; Picher et al., 2003, 2004; Robson et al., 2006). Currently, relatively little is known about the direct role of extracellular AMP in inflammation, except as an intermediate metabolite. Adenosine, in contrast, is known to be both a pro- and anti-inflammatory signaling molecule. For example, in neutrophils, adenosine binding to adenosine receptor subtypes A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> generally promotes pro-inflammatory responses, while A<sub>2A</sub> and A<sub>2B</sub> activation results in anti-inflammatory effects, such as reduction in pro-inflammatory cytokine release, phagocytosis and degranulation (Barletta et al., 2012; Blackburn et al., 2009; Reutershan, 2009). Thus, the regulation of neutrophil response in lung inflammation is controlled both by levels of extracellular signaling molecule levels, as well as differential purine and adenosine receptor expression patterns.

The use of elevated extracellular purine levels as a putative biomarker for disease-induced neutrophilic inflammation has been reported previously. ATP and AMP have been observed to be elevated in BAL fluid samples from cystic fibrosis (CF) patients compared to disease controls (patients with unrelated respiratory disease) as well as in exhaled breath condensate from CF patients versus healthy controls (Esther et al., 2008a, 2009; Patel et al., 2013; Wolak, 2009). Further, a highly significant correlation ( $p < 0.0001$ ) between neutrophil counts and increases ATP and AMP was found for all samples irrespective of disease state, supporting the authors' hypothesis that elevated ATP and AMP were a product of the secondary neutrophilic inflammation rather than the primary pathology (Esther et al., 2008a). Interestingly, it was also observed that AMP levels were consistently higher than those of ATP (Esther et al., 2008a), which was speculated by the authors to arise from increased metabolism of ATP to AMP by E-NTPDases (present on both neutrophils and epithelial cell surfaces) combined with a lower capacity to convert extracellular AMP to adenosine during inflammation due to a relative lack of 5'-nucleotidase (eNT: AMP  $\rightarrow$  adenosine) on the surface of infiltrating neutrophils.

It should be noted that while the studies described above were able to show a strong direct correlation between neutrophil numbers and AMP levels, as well as ATP levels (Esther et al., 2008a, 2009; Esther et al., 2008a; Patel et al., 2013; Wolak, 2009), our preliminary results did not reveal as high a correlation between neutrophil numbers and normalised AMP peak areas, even within the high hydrophobicity nanoparticle treatment group (Figure 6b). This discrepancy might be explained by the fact that the studies cited above all used optimised protocols to specifically measure ATP and AMP levels in their samples. This was

representative of a targeted, phase two approach in the biomarker development pathway. In contrast, the analytical protocol used in the current study was designed to maximise the detection of the largest number of unknown metabolites, and may not have favoured purine detection. In fact, Esther et al. (2008b) reported that higher polarity nucleotide species, such as ATP, can be sensitive to low pH mobile phases such as those used in this study (e.g. 0.1% formic acid pH 3–5) and this can have an effect on the limits of detection of the metabolite (Esther et al., 2008b). AMP, a less polar metabolite, is more easily detected in a low pH mobile phase, but may still require further optimisation. Thus, it should be emphasised that targeted, phase two studies using optimised analytical conditions to assess concurrent levels of ATP, ADP, AMP, cAMP and adenosine with a longitudinal experimental design are required to shed further light on both origin and contribution of extracellular purines in nanoparticle-induced acute respiratory toxicity.

### Conclusions

This study has demonstrated that nanoparticles with a high surface hydrophobicity induce acute respiratory inflammation when administered into the lungs of mice. The inflammation was characterised by significant neutrophilia, elevated levels of pro-inflammatory cytokines, evidence of increased tissue damage and significantly altered metabolite fingerprints in BAL fluid. AMP concentration in BAL was found to correlate with the degree of inflammation 24 h after the administration of the nanoparticles, the time point of peak neutrophilic response. This provides an interesting addendum to the hypothesis that elevated extracellular purines in the lungs are candidate biomarkers for neutrophilic lung inflammation. This is the first study to our knowledge to demonstrate elevated AMP in an acute response to the pulmonary administration of nanoparticles.

The non-targeted metabolomics screen also yielded five unidentified metabolites that were highly correlated with exposure to toxicity-inducing nanoparticles. The identities of these metabolites may be elucidated in future studies by isolation of molecules and LC-MS techniques combined with NMR analysis. Similar to AMP, the identities of these molecules may shed further light on individual mechanisms of respiratory nanotoxicity and they have the potential to expand meaningfully the range of nanotoxicity biomarkers available to researchers today.

### Declaration of interest

The authors would like to acknowledge the UK Medical Research Council for funding of the *in vivo* elements of the study and Waters Corporation for support of the Waters Innovation Center at King's College London. R. Hernández-Prieto gratefully acknowledges financial assistance from Ministry of Science and Innovation, Spain (FPI grant and Project CTQ 2011-24075).

### References

- Aitken R, Borm P, Donaldson K, Ichihara G, Loft S, Marano F, et al. 2009. Nanoparticles – one word: a multiplicity of different hazards. *Nanotoxicol* 3:263–4.
- Barletta KE, Ley K, Mehrad B. 2012. Regulation of neutrophil function by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:856–64.
- Beyerle A, Braun A, Banjeree A, Ercal N, Eickelberg O, Kissel T, Stoeger T. 2011. Inflammatory responses to pulmonary application of PEI-based siRNA nanocarriers in mice. *Biomaterials* 32:8694–701.
- Bivas-Benita M, Zwier R, Junginger HE, Borchard G. 2005. Non-invasive pulmonary aerosol delivery in mice by the endotracheal route. *Eur J Pharm Biopharm* 61:214–18.
- Blackburn MR, Vance CO, Morschl E, Wilson CN. 2009. Adenosine receptors and inflammation. In Wilson CN & Mustafa SJ, eds. *Adenosine Receptors in Health and Disease*. Heidelberg: Springer-Verlag, 215–69.

- Brown DM, Wilson MR, MacNee W, Stone V, Donaldson K. 2001. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol* 175:191–9.
- Bu Q, Yan G, Deng P, Peng F, Lin H, Xu Y, et al. 2010. NMR-based metabolomic study of the sub-acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles in rats after oral administration. *Nanotechnology* 21: 125105.
- Burch LH, Picher M. 2006. E-NTPDases in human airways: regulation and relevance for chronic lung diseases. *Purinergic Signal* 2:399–408.
- Button BM, Button B. 2013. Structure and function of the mucus clearance system of the lung. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3:a009720.
- Carstensen H, Müller BW, Müller RH. 1991. Adsorption of ethoxylated surfactants on nanoparticles: 1. Characterization by hydrophobic interaction chromatography. *Int J Pharm* 67:29–37.
- Chana J, Forbes B, Jones SA. 2008. The synthesis of high molecular weight partially hydrolysed poly(vinyl alcohol) grades suitable for nanoparticle fabrication. *J Nanosci Nanotech* 8:5739–47.
- Cho WS, Duffin R, Thielbeer F, Bradley M, Megson IL, MacNee W, et al. 2012. Zeta potential and solubility to toxic ions as mechanisms of lung inflammation caused by metal/metal oxide nanoparticles. *Toxicol Sci* 126:469–77.
- Dailey LA. 2009. Considerations for the design of toxicity studies of inhaled nanomedicines. In: Sahu SC & Casciano DA, eds. *Nanotoxicity. From In Vivo and In Vitro Models to Health Risks*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 41–60.
- Dailey LA, Jekel N, Fink L, Gessler T, Schmehl T, Wittmar M, et al. 2006. Investigation of the proinflammatory potential of biodegradable nanoparticle drug delivery systems in the lung. *Toxicol Appl Pharmacol* 215:100–8.
- Donaldson K, Borm PJA, Oberdörster G, Pinkerton KE, Stone V, Tran CL. 2008. Concordance between in vitro and in vivo dosimetry in the proinflammatory effects of low-toxicity, low-solubility particles: the key role of the proximal alveolar region. *Inhal Toxicol* 20:53–62.
- Donaldson K, Stone V, Gilmour PS, Brown DM, MacNee W. 2000. Ultrafine particles: mechanisms of lung injury. *Philosoph Trans Royal Soc London Ser a-Math Phys Eng Sci* 358:2741–8.
- Duffin R, Tran L, Brown D, Stone V, Donaldson K. 2007. Proinflammatory effects of low-toxicity and metal nanoparticles in vivo and in vitro: highlighting the role of particle surface area and surface reactivity. *Inhal Toxicol* 19:849–56.
- Esther CR, Alexis NE, Clas ML, Lazarowski ER, Donaldson SH, Ribeiro CMP, et al. 2008a. Extracellular purines are biomarkers of neutrophilic airway inflammation. *Eur Resp J* 31:949–56.
- Esther CR, Boysen G, Olsen BM, Collins LB, Ghio AJ, Swenberg JW, Boucher RC. 2009. Mass spectrometric analysis of biomarkers and dilution markers in exhaled breath condensate reveals elevated purines in asthma and cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296: L987–93.
- Esther CR, Jasin HM, Collins LB, Swenberg JA, Boysen G. 2008b. A mass spectrometric method to simultaneously measure a biomarker and dilution marker in exhaled breath condensate. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22:701–5.
- Fadell B, Pietrouitisi A, Shvendova AA. 2012. Adverse effects of engineered nanomaterials: exposure, toxicology, and impact on human health. London. Waltham, MA: Elsevier/Academic Press.
- García-Perez I, Earll ME, Angulo S, Barbas C, Legido-Quigley C. 2010. Chemometric analysis of urine fingerprints acquired by liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis: Application to the schistosomiasis mouse model. *Electrophoresis* 31:2349–55.
- Harush-Frenkel O, Bivas-Benita M, Nassar T, Springer C, Sherman Y, Avital A, et al. 2010. A safety and tolerability study of differently-charged nanoparticles for local pulmonary drug delivery. *Toxicol Appl Pharmacol* 246:83–90.
- Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Benoit JP, Proust JE. 2003. Interfacial stability of lipid nanocapsules. *Coll Surf B-Biointerfaces* 30:225–35.
- Hu JZ, Rommereim DNR, Minard KR, Woodstock A, Harrer BJ, Wind RA, et al. 2008. Metabolomics in lung inflammation: a high-resolution 1H NMR study of mice exposed to silica dust. *Toxicol Mech Methods* 18:385–98.
- Jackson EK, Ren J, Mi Z. 2009. Extracellular 2',3'-cAMP is a source of adenosine. *J Biol Chem* 284:33097–106.
- Jacob F, Novo CP, Bachert C, Van Crombruggen K. 2013. Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. *Purinergic Signal* 9:285–306.
- Lei RH, Wu CQ, Yang BH, Ma HZ, Shi C, Wang QJ, et al. 2008. Integrated metabolomic analysis of the nano-sized copper particle-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats: a rapid in vivo screening method for nanotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 232: 292–301.
- Liu YJ, Ibricevic A, Cohen JA, Cohen JL, Gunsten SP, Frechet JMJ, et al. 2009. Impact of hydrogel nanoparticle size and functionalization on in vivo behavior for lung imaging and therapeutics. *Mol Pharm* 6: 1891–902.
- Lorusso D, Di Stefano A, Carone V, Fagotti A, Pisconti S, Scambia G. 2007. Pegylated liposomal doxorubicin-related palmar-plantar erythrodysesthesia ('hand-foot' syndrome). *Ann Oncol* 18:1159–64.
- Lu XY, Tian Y, Zhao QQ, Jin TT, Xiao S, Fan XH. 2011. Integrated metabolomics analysis of the size-response relationship of silica nanoparticles-induced toxicity in mice. *Nanotechnology* 22: 055101 (1–16).
- Maynard AD, Warheit DB, Philbert MA. 2011. The new toxicology of sophisticated materials: nanotoxicology and beyond. *Toxicol Sci* 120: S109–29.
- Moghimi SM, Szebeni J. 2003. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog Lipid Res* 42:463–78.
- Nalwa HS. 2009. *Soft Nanomaterials*. Stevenson Ranch, CA: American Scientific Publishers.
- Nassimi M, Schleh C, Lauenstein HD, Hussein R, Lübbers K, Pohlmann G, et al. 2009. Low cytotoxicity of solid lipid nanoparticles in vitro and ex vivo lung models. *Inhal Toxicol* 21:104–9.
- Patel K, Davis SD, Johnson R, Esther CR. 2013. Exhaled breath condensate purines correlate with lung function in infants and preschoolers. *Ped Pulmonol* 48:182–7.
- Picher M, Burch LH, Boucher RC. 2004. Metabolism of P2 receptor agonists in human airways – implications for mucociliary clearance and cystic fibrosis. *J Biol Chem* 279:20234–41.
- Picher M, Burch LH, Hirsh AJ, Spychala J, Boucher RC. 2003. Ecto 5'-nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase – two amphihydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways. *J Biol Chem* 278:13468–79.
- Reutershan J, Vollmer I, Stark S, Wagner R, Ngamsri KC, Eltzschig HK. 2009. Adenosine and inflammation: CD39 and CD73 are critical mediators of LPS-induced PMN trafficking into the lungs. *FASEB J* 23:473–82.
- Robson SC, Sevigny J, Zimmermann H. 2006. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2:409–30.
- Ruge CA, Schaefer UF, Herrmann J, Kirch J, Canadas O, Echaide M, et al. 2012. The interplay of lung surfactant proteins and lipids assimilates the macrophage clearance of nanoparticles. *PLoS One* 7:e40775.
- Schmidt EP, Tudor RM. 2010. Role of apoptosis in amplifying inflammatory responses in lung disease. *J Cell Death* 3:41–53.
- Singh R, Lillard JW. 2009. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol* 86:215–23.
- Vaine CA, Patel MK, Zhu JT, Lee E, Finberg RW, Hayward RC, Kurt-Jones EA. 2013. Tuning innate immune activation by surface texturing of polymer microparticles: the role of shape in inflammatory activation. *J Immunol* 190:3525–32.
- Whiley L, Godzien J, Ruperez FJ, Legido-Quigley C, Barbas C. 2012. In-vial dual extraction for direct LC-MS analysis of plasma for comprehensive and highly reproducible metabolic fingerprinting. *Anal Chem* 84:5992–9.
- Wolak JE, Esther CR, O'Connell TM. 2009. Metabolomic analysis of bronchoalveolar lavage fluid from cystic fibrosis patients. *Biomarkers* 14:55–60.
- Xiayan L, Legido-Quigley C. 2008. Advances in separation science applied to metabolomics. *Electrophoresis* 29:3724–36.

Supplementary material available online

Supplementary Figures S1–S3

IX

SUMMARY IN ENGLISH



**TABLE OF CONTENTS:**

1. General aim.
2. Results and discussion.
  - 2.1. Determination of nucleosides by CE-ESI-MS in positive mode.
  - 2.2. Determination of nucleosides by CE-ESI-MS in negative mode.
  - 2.3. Application to the study of metabolites associated with tobacco consumption.
3. General conclusions.



## 1. GENERAL AIM



One of current fields in Analytical Chemistry for application in biomedical areas is the establishment of rapid and efficient methods of analysis for the determination of endogenous metabolites of clinical interest in biological fluids.

Free and modified nucleosides and nucleobases lie within this field; they are compounds that are excreted naturally in urine as products of transfer RNA (tRNA) regeneration and of DNA repair as the result of damage due to oxidative stress. Their levels in urine increase anomalously in certain pathologies, such as tumour processes and neurodegenerative diseases, such that these substances are of great interest as biomarkers in clinical chemistry. Reports have been made of the potential usefulness of free and modified nucleosides as biological markers in diseases as diverse as rheumatoid arthritis, Alzheimer's disease and AIDS, but mainly as early markers of many different types of cancer.

Some authors have also reported studies relating the urinary levels of modified nucleosides to other benign diseases and different lifestyles, such as smoking, fatigue, stress, poor nutrition, exposure to toxic compounds, etc.

Accordingly, most of these compounds lack specificity, such that they cannot be used as sole diagnostic tests. By contrast, they are useful for the early diagnosis of certain diseases, in the control of the efficacy of a given treatment or specific therapy and in the monitoring of post-operative recurrences.

The aim of this work was to develop rapid and efficient methodologies that could be used for the separation, identification and quantification of a broad set of free and modified nucleosides in biological fluids. Urine was chosen as the matrix because it is readily available and its collection is non-invasive.

As analytical technique we used capillary electrophoresis coupled with mass spectrometry (CE-MS), which combines the advantages inherent to capillary electrophoresis as a high performance separation technique and the ability of mass spectrometry to identify analytes faithfully. Moreover, capillary electrophoresis is highly appropriate for application in the analysis of biological samples because it is compatible with aqueous media and is suitable for the separation of highly polar compounds, both ionic and ionizable. These requirements match most of the metabolites found in biological fluids such as urine.

For its application to a complex matrix such as urine it was necessary to develop extraction/cleaning/preconcentration procedures in order to favour analyte detection and preserve the instrumental set-up. Here we studied the application of

a widely used technique (solid phase extraction, SPE) and also a more recently developed one, based on the use of a restricted access material (RAM) owing to the capacity of this type of material to exclude macromolecules thanks to a molecular exclusion mechanism.

A final aim was to check the applicability of the methodologies developed in the analysis of urine samples from healthy donors, smokers and non-smokers. This part of the study aimed at confirming whether tobacco consumption affects the levels of these nucleosides in urine, with respect to the reference levels of healthy non-smokers. This could help to determine whether this habit might exert possible interference in the use of the compounds studied as markers of severe diseases.

To conclude, a search for other metabolites possibly associated with tobacco consumption is described. To accomplish this, a mass spectrometry detector with high accuracy and resolution, such as a Time-of-Flight (TOF) detector, was used for the analysis of urine samples from smokers and non-smokers.

## 2. RESULTS AND DISCUSSION



### 2.1. DETERMINATION OF NUCLEOSIDES BY CE–ESI–MS IN POSITIVE MODE.

The work reported here consisted of developing a method based on capillary electrophoresis coupled with mass spectrometry for the separation, identification and quantification of a set of nucleosides, nucleobases and methylated derivatives in urine samples.

This chapter can be divided into three parts:

- Study of electrophoretic separation.
- Determination in urine samples.
- Development of a procedure for extraction–preconcentration.

From the results obtained in each of the above the following conclusions can be drawn:

#### Study of electrophoretic separation

Using capillary zone electrophoresis (CZE) we studied the electrophoretic behaviour of free and modified nucleosides with different separation media: acid and base.

For this part of the study we used an initial set of 13 analytes, among which there were nucleosides such as adenosine, guanosine, inosine and uridine; nucleobases such as guanine; methylated derivatives such as 7–methylguanine, 1–methylguanine, 9–methylguanine, 1–methyladenosine, 7–methylguanosine and 5–methyluridine, and hydroxylated derivatives such as 8–hydroxy–2′–deoxyguanosine.

In acid medium, the analytes susceptible to migrate electrophoretically are:

Guanine (Gua)	1–methyladenosine (1mA)
7–methylguanine (7mGua)	Cytidine (Cyt)
1–methylguanine (1mGua)	7–methylguanosine (7mG)
9–methylguanine (9mGua)	Guanosine (G)
Adenosine (A)	

Whereas in alkaline medium it is possible to separate the following:

Guanine (Gua)	7-methylguanosine (7mG)
7-methylguanine (7mGua)	2'-deoxyguanosine (2dG)
1-methylguanine (1mGua)	Guanosine (G)
9-methylguanine (9mGua)	Inosine (INN)
Adenosine (A)	5-methyluridine (5mU)
1-methyladenosine (1mA)	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OH2dG)
Cytidine (Cyt)	

Later studies focused on developing a method using capillary zone electrophoresis in acid medium with the analytes susceptible to migrating under these conditions.

Optimization of electrophoretic separation in this acid medium involves the following conditions:

- ⇒ Electrophoretic separation medium (background electrolyte, BGE): 100 mM formic acid–ammonium formate, pH 2.5.
- ⇒ Voltage applied: 20 kV up to 12 min; 25 kV from 12 to 15 min, and 30 kV for 15 min and longer.
- ⇒ Hydrodynamic injection: 8 sec at 50 mbar.
- ⇒ MS detection:
  - Quadrupole analyzer.
  - Electrospray interface (ESI), positive mode; capillary voltage, +3500 V; additional liquid flow rate, 0.78  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; nebulizer gas pressure, 10 psi; nebulizer gas flow rate, 6  $\text{L min}^{-1}$  and nebulizer gas temperature, 150 °C.
  - Additional liquid: 1:1 (v/v) UHQ water:isopropanol with 7.5 mM acetic acid.

### **Determination in urine samples**

Application to urine samples revealed the different concentration levels at which the analytes are found naturally.

In the case of the analytes present at high concentrations, 7mGua, 1mA and A, a quantification method based on calibration in synthetic urine was proposed as an alternative to the standard additions method since it provided similar results. These results were confirmed with LC–MS/MS.

For the analytes present at medium and low concentrations, Gua, 1mGua, 9mGua, Cyt, 7mG and G, a preconcentration procedure based on SPE was developed. This is described below.

### **Development of a preconcentration procedure**

We describe a procedure for the extraction–preconcentration of the analytes studied in urine samples based on the use of SPE with a polymeric sorbent, ENV+, which is a hydroxylated copolymer of polystyrene–divinylbenzene.

A volume of urine of 2.0 mL was used in the proposed procedure. Analyte elution was performed with 2.0 mL of 90:10 (v/v) ACN:NH<sub>3</sub>, which was evaporated off and the residue was redissolved in 500 µL of UHQ water with 0.1% (v/v) formic acid prior to injection into the CE system. The recoveries obtained for the analytes studied ranged between 68% and 100% in urine samples.

In general, it may be concluded that the methodology developed in this work, based on the coupling of capillary zone electrophoresis to mass spectrometry (CE–ESI–MS) is rapid and robust, and that it is appropriate for the determination of modified nucleosides and nucleobases.

**Published results:**

- “Capillary electrophoresis–mass spectrometry for direct determination of urinary modified nucleosides. Evaluation of synthetic urine as a surrogate matrix for quantitative analysis”, *J. Chromatogr. B* 942–943 (2013) 21–30.
- “Development of a procedure for the isolation and enrichment of modified nucleosides and nucleobases from urine prior to their determination by capillary electrophoresis–mass spectrometry”, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 88 (2014) 489– 496.

## 2.2. DETERMINATION OF NUCLEOSIDES BY CE–ESI–MS IN NEGATIVE MODE.

We next developed a methodology based on CE–MS for the separation of modified nucleosides susceptible to migrating electrophoretically as anions in basic medium. In this case, later detection by MS was performed by electrospray ionization in negative mode, ESI(-).

In this part of the study we used a set of 5 analytes, among which the following were included: the hydroxylated derivatives 8–hydroxyguanosine (8OHG) and 8–hydroxy–2′–deoxyguanosine (8OH2dG), which are metabolites associated with processes of oxidative stress, together with nucleosides such as inosine (INN) and other derivatives such as 5–methyluridine (5mU) and 2′–deoxyguanosine (2dG).

From the results obtained from this second method, the following conclusions can be drawn:

### Study of electrophoretic separation.

Electrophoretic separation using capillaries with different internal diameters –50, 75 and 100  $\mu\text{m}$ – revealed that 50  $\mu\text{m}$  was the most suitable diameter for the separation of the analytes studied since it provided the best resolution within a given time of analysis.

Optimization of electrophoretic separation in basic medium and with this capillary diameter (50  $\mu\text{m}$ ) involved the following conditions:

- ⇒ Electrophoretic separation medium (background electrolyte, BGE): 30 mM ammonium formate–ammonia, pH 11.0.
- ⇒ Voltage applied: 30 kV.
- ⇒ Hydrodynamic injection: 30 sec at 50 mbar in a 1:10 (v/v) BGE:UHQ water injection medium.
- ⇒ MS detection:
  - Quadrupole analyzer.
  - Electrospray interface (ESI), negative mode; capillary voltage, -3500 V; additional liquid flow rate, 0.78  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; nebulizer gas pressure, 6 psi; nebulizer gas flow, 7  $\text{L min}^{-1}$  and nebulizer gas temperature, 350  $^{\circ}\text{C}$ .
  - Additional liquid: 1:1 (v /v) UHQ water:isopropanol.

### Determination in urine samples

Application to urine samples revealed the low concentration levels of the analytes studied. The development of a previous sample treatment step was based on SPE with polymeric sorbents and on the use of a restricted access material (RAM).

### Solid phase extraction (SPE) as a previous step.

We report a procedure for the extraction of the analytes studied in urine samples that is based on the use of a polymeric sorbent, ENV+, a hydroxylated copolymer of polystyrene–divinylbenzene.

The proposed procedure employed a 5.0 mL volume of urine diluted 1:1 (v/v) with UHQ water. Analyte elution was accomplished with 2.0 mL of a 90:10 (v/v) MeOH:NH<sub>3</sub>, which was evaporated off and the residue was redissolved in 1.0 mL of 1:10 (v/v) BGE:UHQ water before injection into the CE–ESI–MS system. In this case, the injection time was reduced from 30 to 10 sec.

The optimized conditions in this part of the study were satisfactory for the separation and quantification of some of the analytes studied, 8OHG and 8OH2dG, although they did not provide acceptable results for all of them. Recoveries ranged between 69 and 93%.

### Use of a restricted access material (RAM) as a previous step

We describe a procedure for the extraction of the analytes studied in urine samples based on the use of a restricted access material (RAM) packed with a hydrophilic copolymer containing N–vinylacetamide, with a size of 10mm x 4.0mm.

In the proposed procedure we used a volume of 500 µL of urine diluted 1:1 (v/v) in UHQ water. Elution of the analytes retained in the RAM was conducted with ACN:UHQ water at a proportion of 70:30 (v/v), with a flow rate of 0.5 mL min<sup>-1</sup> over 4 min. The eluted fraction was evaporated off and the residue was

redissolved in 250  $\mu$ L of 30 mM BGE spiked with the internal standard prior to injection into the CE–ESI–MS system.

**Analysis of nucleosides in urine samples as a function of smoking or non-smoking.**

The methodology developed –RAM/CE–ESI(–)MS– was applied to the study of the analytes of interest in urine samples from healthy donors who smoked. We were interested in determining whether there were any significant differences in the concentrations of these analytes in urine samples from smokers as compared with samples taken from non-smokers.

The aim underlying this was to establish a possible relationship between the levels of these modified nucleosides and tobacco consumption in healthy individuals. Healthy individuals were selected in order to avoid the influence of possible diseases on the levels of these metabolites and hence establish the specific effect of the smoking habit.

In 42 urine samples from healthy individuals (21 smokers and 21 non-smokers, balanced according to age and gender), low concentration levels of these compounds were observed in all of them. The results obtained with the use of the method developed (RAM/CE–ESI(–)MS) were validated by LC–MS/MS).

These results showed that there were no significant differences in the concentrations of these analytes between samples from smokers and from non-smokers. We also failed to detect significant differences in the concentrations of the analytes among the smokers as a function of their age and gender.

At least in light the above studies, there is no experimental evidence to be able to conclude that the concentration of the nucleosides studied here in urine (among them the 8OH2dG and 8OHG derivatives) is higher in smokers than in non-smokers. Accordingly, in healthy individuals tobacco consumption does not seem to alter the urinary levels of these compounds.

Nevertheless, it should not be forgotten that the sampling carried out here was only done in healthy individuals (middle-aged and young people), suggesting that it would be necessary to conduct further studies, broadening the sample

population to older individuals and to individuals already affected by a disease, all of them included in the category of smokers and non-smokers.

Finally, it should be stressed that the aim of this study was to demonstrate a possible application of the methodology proposed as an analytical tool for use in clinical practice, with no intention of further entering this field itself since it is evidently beyond our reach as chemists.

**Published results:**

- “Determination of hydroxylated nucleosides in human urine by capillary electrophoresis with mass spectrometric detection.” Communication presented at 20th International Symposium on Electro- and Liquid Phase Separation Techniques, ITP 2013. Pending publication.

### 2.3. APPLICATION TO THE STUDY OF METABOLITES ASSOCIATED WITH TOBACCO CONSUMPTION.

In the previous section, we reported the development of a method based on CE–ESI(–)MS for the detection and quantification of some modified nucleosides of interest, among them the hydroxylated derivatives 8OHG and 8OH2dG. Application of the proposed method for the analysis of urine samples from smokers and non–smokers, all of them healthy, did not reveal significant differences as regards the levels of this group of compounds.

Accordingly, it was decided to broaden the study to other possible modified nucleosides that had not been included previously and in general to search for metabolites related to tobacco consumption that might show significant differences between the two groups of samples.

A study was conducted to obtain the metabolic fingerprint of the urine samples through the use of a Time–of–Flight (TOF) mass analyzer coupled with a liquid chromatograph (LC–TOF). In this study, the sample treatment step with the RAM described above was maintained, but the parameters affecting chromatographic separation in reverse phase mode were optimized.

The approach of this study is based on the experience acquired by the PhD student during her research stay, developed as part of their pre–doctoral training, at King's College London (Department of Pharmaceutical Chemistry). [Nanotoxicology. 2015 Feb; 9 (1): 106–115].

From the results, the following conclusions can be drawn:

- From accurate mass analysis the identity of the 5 nucleosides under study in the urine samples was confirmed (metabolite target analysis). The lower sensitivity of TOF made their quantification almost impossible in most of the samples owing to the low concentration at which they are present in urine, both in smokers and in non–smokers.
- The second analysis was an analysis of the metabolic fingerprint whose aim was to search for possible significant differences in the metabolic profiles of the samples from smokers and non–smokers. From the study of these profiles, it would be feasible to identify other possible metabolites associated with tobacco consumption responsible for the differences between both sample sets. Models were generated with all possible combinations, bearing in mind variables such as

gender, age and the condition of being a smoker or not. Only those that compared the smokers with the non-smokers were valid, with no differences as regards gender or age.

From the results of this study it may be concluded that there were significant differences in the metabolic profiles of smokers and non-smokers. However, none of the metabolites responsible for such differences could be attributed a chemical structure related to the modified nucleosides according to the search carried out in the Human Metabolome Database (HMDB). Neither was it possible to identify them on the basis of compounds related to tobacco consumption such as derivatives of the nicotine metabolic pathway.

The results obtained in this section of the work indicated that in healthy individuals there is no experimental evidence that tobacco consumption is an additional factor in the increase in the levels of modified nucleosides in urine.

Again, it should be stressed that the sampling was limited, further and more specific studies being required to confirm the results.

**Published results:**

- “A metabolomic approach to the study of modified nucleosides in urine from healthy smoker and non-smoker.” (in preparation).

### 3. GENERAL CONCLUSIONS



The work described here consisted of the development of new methodologies based on capillary electrophoresis coupled with mass spectrometry (CE–MS) for the separation, identification and quantification of a set of nucleosides, nucleobases and some of their methylated and hydroxylated derivatives in urine samples. The work was completed with a study to search for and identify possible metabolites associated with tobacco consumption.

In the corresponding sections we have described the particular conclusions drawn for each step of these studies. Below we note the most relevant general conclusions.

#### DETERMINATION BY CE–ESI–MS.

1. We have established two new analytical methods based on CE coupled with MS (CE–MS) for the determination of nucleosides excreted in urine. In both methods, capillary zone electrophoresis (CZE) was used, either in acid medium, for the separation of compounds susceptible to generating cationic species, or in alkaline medium, for the separation of anionic species.
2. Detection via mass spectrometry was carried out with a simple quadrupole analyzer with a coaxial electrospray ionization source functioning in positive, ESI(+), or negative ESI(-) mode, depending on the possibility of ionization of the compounds studied.

#### APPLICATION TO URINE ANALYSIS.

3. Application to urine samples from healthy individuals revealed the different concentration levels at which each analyte was naturally present in the urine from the same individual and, furthermore, the great variability with which the same compound appeared among individuals.

4. For the analytes present at high concentrations a quantification method employing calibration in synthetic urine can be proposed as an alternative to the standard additions method. The results were confirmed with LC–MS/MS.
5. In the case of analytes present at intermediate or low levels (Gua, 1mGua, 9mGua, 7mG and G, in acid medium, and the hydroxylated derivatives in alkaline medium) we developed sample treatment steps based on SPE with polymeric sorbents and on the use of a restricted access material (RAM), facilitating the detection of the analytes, and at the same time preserving the instrumental set-up.

**DETERMINATION OF MODIFIED NUCLEOSIDES IN URINE FROM SMOKERS AND NON-SMOKERS.**

6. The RAM/CE–ESI(–)MS method developed for the determination of anionic species, such as the hydroxylated derivatives 8OHG and 8OH2dG, was applied to the study of these compounds in urine samples from healthy smoker and non-smoker donors in order to determine whether there were any significant differences in the concentrations of these analytes between the two groups.
7. The sampling was carried out on 42 urine samples from healthy volunteers, 21 of them smokers and the rest non-smokers. The groups were balanced as regards gender and age.
8. The experimental results, validated by means of LC–MS/MS, indicate that for the group of analytes studied there are no significant differences between the urine samples from smokers and non-smokers.

APPLICATION TO THE STUDY OF METABOLITES ASSOCIATED WITH TOBACCO CONSUMPTION.

9. The samples of urine from smokers and non-smokers were analyzed with a Time-of-Flight analyzer coupled with a liquid chromatograph (LC-TOF), using a RAM material as the previous clean-up step.
  
10. The analysis of target metabolites applied to the hydroxylated derivatives 8OHG and 8OH2dG, together with 5mU, 2dG and INN, allowed the identity of the 5 compounds studied to be determined via accurate mass analysis. However, the lower sensitivity of TOF hindered their quantification in most of the samples owing to the low concentration at which they are naturally present in urine, both that of smokers and that of non-smokers.
  
11. Study of the metabolic fingerprint of these urines samples from smokers and non-smokers allow the conclusion that both populations are significantly different but not as regards these endogenous compounds. Neither can they be discriminated on the basis of compounds derived from the nicotine metabolic pathway.

Overall, it may be concluded that the methodologies developed here, based on CE-ESI-MS, are rapid and robust. They are suitable for the determination of the modified nucleosides and nucleobases studied in urine samples.

The experimental results described here for the application of the methods to the analysis of urine from smokers and non-smokers do not point to any evidence that in healthy individuals tobacco consumption is an additional factor in the increase in the levels of these modified nucleosides in urine with respect to the reference values in healthy non-smoker individuals. However, it should not be overlooked that the sample size was small and the results should therefore be considered preliminary.

## IX. SUMMARY IN ENGLISH: GENERAL CONCLUSIONS

Finally, it is important to note, once again, that the aim of these studies was to demonstrate a possible field of application for the proposed methodologies as analytical tools, without any intention of becoming involved in clinical diagnosis, which is evidently not part of our knowledge and expertise as chemists.

APÉNDICE I:  
ESPECTROS DE MS/MS

---



En este apéndice I se muestran los espectros de masas (*MS*) y de fragmentación (*MS/MS*) de los diferentes compuestos estudiados en la última parte de esta tesis.

Para cada uno de ellos se encuentran, 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:

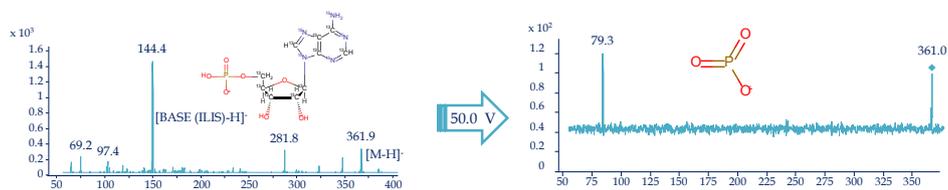
- ⇒ Analizador de triple cuadrupolo.
- ⇒ Fuente de ionización de electrospray *ESI* modo (-).
- ⇒ Voltaje capilar: - 4000 V.
- ⇒ Presión de nebulización: 35 psi.
- ⇒ Gas de secado: N<sub>2</sub>, a 350°C y 12 L min<sup>-1</sup>.
- ⇒ Gas de colisión: N<sub>2</sub>.

La energía de colisión se optimiza para cada analito de forma que la sensibilidad de los distintos fragmentos sea la mayor posible. En la Tabla I se muestran todas las transiciones optimizadas. En negrita se indica la transición de cuantificación.

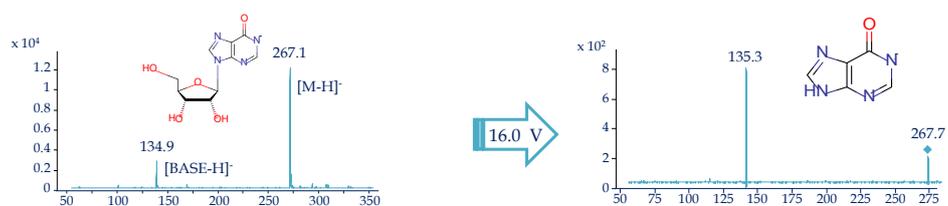
Tabla I. Apéndice I. Parámetros del análisis mediante *LC-QqQ* optimizados para los compuestos estudiados.

Analito	$t_r$ (min)	Transiciones (m/z)	Energía de colisión (eV)	Abundancia
$^{13}\text{C}_{10} \text{ } ^{15}\text{N}_5\text{-AMP}$	1.0	<b>361.17</b> → <b>79.3</b>	50	515
		361.17 → 97.5	16	28
INN	1.8	<b>267.07</b> → <b>135.4</b>	16	955
		267.07 → 108.5	16	20
5mU	2.0	<b>257.08</b> → <b>167.5</b>	5	154
		257.08 → 124.5	5	153
		257.08 → 89.4	16	120
8OHG	2.2	<b>298.08</b> → <b>208.5</b>	5	364
		298.08 → 123.3	27	110
2dG	2.3	<b>266.09</b> → <b>150.4</b>	5	798
		266.09 → 133.1	25	400
		266.09 → 108.3	29	271
8OH2dG	3.5	<b>282.08</b> → <b>192.7</b>	5	300
		282.08 → 122.5	27	150

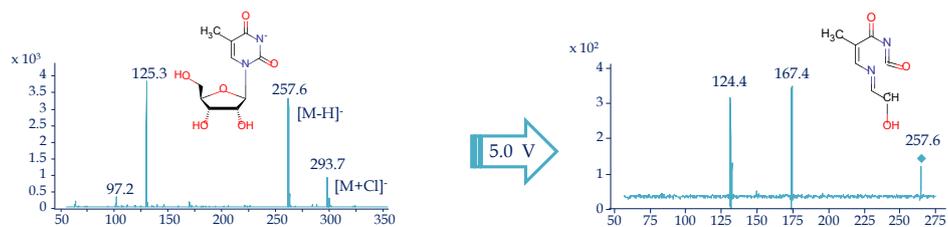
ADENOSINAMONOFOSFATO (ILIS) (361.9 → 79.3)



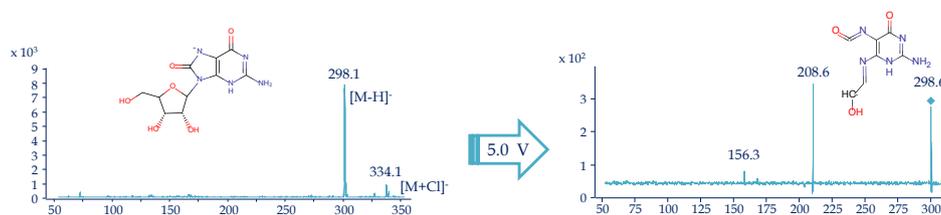
INOSINA (267.1 → 135.3)



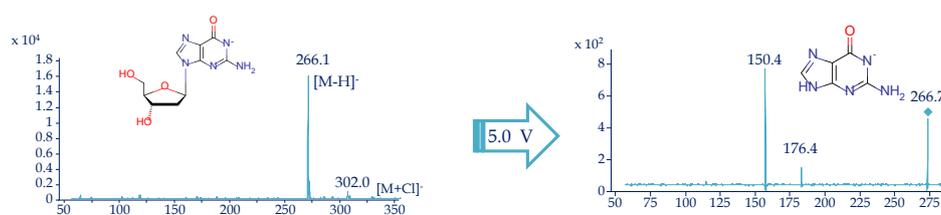
5-METILURIDINA (257.6 → 167.4)



8-HIDROXIGUANOSINA (298.1 → 208.6)



2'-DEOXIGUANOSINA (266.1 → 150.4)



8-HIDROXI-2'-DEOXIGUANOSINA (282.1 → 192.7)



APÉNDICE II: MENCIÓN  
“DOCTORADO INTERNACIONAL”

---



Con la elaboración y defensa de esta memoria de tesis se pretende optar a la obtención de la mención “Doctorado Internacional”, al considerar que la doctoranda reúne los requisitos para optar a tal mención:

- La doctoranda 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 no españolas.
- 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 no española.

Se incluyen, en este apéndice, los pertinentes informes favorables así como la certificación de la estancia breve.



ADMISION EN EL CENTRO RECEPTOR DE LA ESTACIA

<b>1. Becario/ applicant:</b>
Nombre y apellidos/ Name: Raquel Hernández Prieto
D.N.I./ National Identity Card: 71555678X
Centro de aplicación de la beca/ Home Institution: Universidad de Salamanca
<b>2. Centro en el que se realiza la estancia/ Host institution:</b>
Nombre/ Name: King's College London
Dirección/ Address: Franklin-Wilkins Building 150 Stamford Street
Localidad/ Country: Londres (Reino Unido) / London (UK)
<b>3. Investigador responsable en el centro / Person in charge of the Host Institution:</b>
Institución / Institution: King's College London
Nombre / Name: Lea Ann Dailey
Cargo / Post: Senior Lecturer
<b>CERTIFICO:</b>
que acepta al becario arriba mencionado durante la estancia en este centro durante las siguientes fechas:
desde: 01/septiembre/2012 hasta 16/diciembre/2012
<b>THIS IS TO CERTIFY:</b>
That this Institution accepts the above mentioned applicant during his/her temporary stay in the following dates:
From: 01/ September/2012 To 16/ December/2012
<b>Lugar y fecha/ City and date: London</b>
 University of London




DEPARTMENT OF CHEMISTRY

Chemistry Research Laboratory, University of Oxford  
Mansfield Road, Oxford OX1 3TA  
United Kingdom



Oxford, 7 November 2015

**RAQUEL HERNÁNDEZ PRIETO THESIS REPORT**

Title: "New applications of capillary electrophoresis coupled with mass spectrometry for the evaluation of endogenous metabolites of clinical interest in urine".

(University of Salamanca, Spain)

The Doctoral Thesis presented by Ms. Raquel Hernández Prieto is a research of great importance, both practical and applied, with could have very interesting applications as analytical tool for use in clinical practise.

The PhD has used capillary electrophoresis coupled with mass spectrometry to carry out the separation, identification and quantification of a broad set of nucleosides in urine. The methodology developed is rapid and robust. In addition, a new procedure for the extraction, cleaning and preconcentration of the biological samples has been described. Not only but also, she has applied the methodology as analytical tool to study whether tobacco consumption affects the levels of nucleosides in urine.

The large amount of work presented in this thesis has followed serious and rigorous experimental procedures which have been carried out in an ordered and methodological way. The objectives are well presented and all the experimental work has been thoroughly explained. All the objectives have been achieved with success and the results have been analyzed in a critical and clear way.

The volume of the work that has been done is remarkable, and has already been published in two international journals with high impact factor.

Moreover, the PhD has completed with success a predoctoral stay of three months in the prestigious Institute of Pharmaceutical Science King's College London, research that has already been published in a high impact factor international journal. The experience gained by the candidate during this predoctoral stay has been applied in a practical way to her thesis topic, indicating the high degree of utilization of this stage.

In conclusion, I would like to congratulate the Ph.D. Student, Raquel Hernández Prieto, for her work and the quality and relevance of the results obtained. Therefore, I believe that the work meets the scientific quality requirements for presentation and oral dissertation at the Universidad de Salamanca.

Yours sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Ángel L. Fuentes de Arriba".

Dr. Ángel L. Fuentes de Arriba





University of London

ANALYTICAL & ENVIRONMENTAL SCIENCES DIVISION  
KING'S COLLEGE LONDON  
4TH FLOOR, FRANKLIN-WILKINS BUILDING  
150 STAMFORD STREET  
LONDON SE1 9NH

Report for the PhD thesis entitled:

**“New applications of capillary electrophoresis coupled with mass spectrometry for the evaluation of endogenous metabolites of clinical interest in urine”** presented by Raquel Hernández Prieto, University of Salamanca (Spain).

The PhD thesis reviewed here encompasses new and original scientific work and deals with the development of rapid and efficient methodologies for the separation, identification and quantification of a broad set of free and modified nucleosides in biological fluids. The analytical technique employed is capillary electrophoresis coupled with mass spectrometry (CE-MS), this combination exploits the advantages inherent to capillary electrophoresis as a high performance separation technique and the ability of mass spectrometry to identify analytes. Moreover, capillary electrophoresis is highly appropriate for applications in the analysis of biological samples because it is compatible with aqueous media and is suitable for the separation of highly polar compounds, both ionic and ionizable. These requirements match most of the metabolites found in biological fluids. For its application to urine, several extraction/cleaning/preconcentration procedures have been developed in order to favour analyte detection and take care of any contamination damage to the instrumental set-up.

The work described is a research of great theoretical and practical interest, together with a highly topical approach, presenting serious and rigorous experimental development. The experimental was made in a very methodical way, allowing the evaluation of targets and achievements. The results are analyzed critically allowing conclusions about the possible use of these compounds as markers of disease. Overall an excellent piece of analytical and biomarker work. Hence, I believe that the work done widely qualify scientific quality to reach the Degree of Doctor.

Additionally, I believe that the work meets the requirements of scientific quality to obtain the PhD Degree with international Mention for the University of Salamanca.

Yours Sincerely,

*N. W. Smith*  
Dr. Norman W. Smith

