

ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE DILUCIÓN ISOTÓPICA Y DECONVOLUCIÓN DE PERFILES ISOTÓPICOS APLICADA A PROBLEMAS COMPLEJOS

**DETERMINACIÓN DE ESTEROIDES EN MUESTRAS
CLÍNICAS Y DROGAS EN AGUAS RESIDUALES**

**Jorge Pitarch Motellón
Octubre 2020**

Tesis Doctoral dirigida por

**Antoni F. Roig Navarro
Juan V. Sancho Llopis**



**UNIVERSITAT
JAUME·I**



Programa de Doctorado en Ciencias

Escuela de Doctorado de la Universitat Jaume I

**ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE DILUCIÓN ISOTÓPICA Y
DECONVOLUCIÓN DE PERFILES ISOTÓPICOS APLICADA A
PROBLEMAS COMPLEJOS:
DETERMINACIÓN DE ESTEROIDES EN MUESTRAS CLÍNICAS Y
DROGAS EN AGUAS RESIDUALES**

**Memoria presentada por Jorge Pitarch Motellón para optar al
grado de doctor por la Universitat Jaume I**

Jorge Pitarch Motellón

Dr. Antoni F. Roig Navarro

Dr. Juan V. Sancho Llopis

Castelló de la Plana, octubre de 2020

Jorge Pitarch Motellón ha sido beneficiario de una beca COST Action ES1307 para la realización de estancias de corta duración (*STSM grant*) emitida por el grupo *SCORE (Sewage Analysis CORE group Europe)* y enmarcado en la organización de Cooperación Europea en Ciencia y Tecnología (COST, *European Cooperation in Science and Technology*).

Los trabajos realizados en la presente tesis han sido en parte financiados por los proyectos de la Generalitat Valenciana (Prometeo II 2014/023, ISIC/2012/016) y la Universitat Jaume I (PB1-1B2013-55).

Tesis por compendio de las siguientes publicaciones:

J. Pitarch-Motellón, A.F. Roig-Navarro, J.V. Sancho, M. Ibáñez, N. Fabregat-Cabello, O.J. Pozo, R. Ventura, J.I. García Alonso, P. Rodríguez González, A. González Gago, A. Ereño Artabe, P. Van Eenoo, K. Deventer, Y. Dehnes, S. Rzeppa. Evaluation of uncertainty sources in the determination of testosterone in urine by calibration-based and isotope dilution quantification using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1508 (2017) 73-80. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.05.072. IF:4.169

J. Pitarch-Motellón, J.V. Sancho, M. Ibáñez, O. Pozo, A.F. Roig-Navarro. Determination of selected endogenous anabolic androgenic steroids and ratios in urine by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and isotope pattern deconvolution. *Journal of Chromatography A*, 1515 (2017) 172-178. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.08.006. IF:4.169

J. Pitarch-Motellón, A.F. Roig-Navarro, C. Le Goff, E. Cavalier, N. Fabregat-Cabello. Re-certification of hydroxyvitamin D standards by isotope pattern deconvolution. *Journal of Chromatography B*, 1120 (2019) 89-94. DOI: 10.1016/j.jchromb.2019.04.043. IF:2.729

J. Pitarch-Motellón, N. Fabregat-Cabello, C. Le Goff, A.F. Roig-Navarro, J.V. Sancho-Llopis, E. Cavalier. Comparison of isotope pattern deconvolution and calibration curve quantification methods for the determination of estrone and 17 β -estradiol in human serum. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 171 (2019) 164-170. DOI: 10.1016/j.jpba.2019.04.013. IF:2.983

J. Pitarch-Motellón, L. Biljsma, J.V. Sancho, A.F. Roig-Navarro. Isotope Pattern Deconvolution as an alternative to calibration curve for application in wastewater-based epidemiology (*En revisión*).

“Esta tesis dispone de la aceptación de los coautores de las publicaciones que el doctorando/a presenta como tesis y su renuncia expresa a presentarlas como parte de otra tesis doctoral”

A mis familias

Resumen

La espectrometría de masas de dilución isotópica (IDMS) es una de las herramientas más potentes de la química analítica. Es reconocida por su capacidad de producir datos de alta fiabilidad y calidad metrológica. Mediante el uso de IDMS, y especialmente en el acoplamiento con técnicas cromatográficas, se hace posible la cuantificación de analitos a nivel de trazas en muestras de alta complejidad. Esta técnica se basa en el uso de compuestos análogos a los analitos de interés y, por tanto, de idéntico comportamiento físico-químico. Por esta razón, IDMS permite corregir tanto desviaciones por deriva instrumental como complicaciones derivadas del proceso analítico. Así, por ejemplo, resuelve problemas de extracciones no cuantitativas, pérdidas o interconversiones.

Habitualmente, la cuantificación por IDMS se lleva a cabo mediante curvas de calibrado en las que se representa la relación entre la señal del analito y la señal del análogo marcado isotópicamente (en concentración constante en calibrado y muestra) frente a la concentración de estándar. No obstante, en la presente tesis se presenta otra posibilidad: la deconvolución de perfiles isotópicos (IPD). Si bien es una técnica ampliamente estudiada en el campo de la especiación y el análisis elemental, su uso para análisis molecular es todavía novedoso y poco conocido.

La principal ventaja de IPD frente a IDMS convencional es que no necesita de curvas de calibrado para la cuantificación. Se trata de una herramienta matemática, basada en regresión lineal múltiple, capaz de hallar la contribución –como fracción molar– de cada compuesto al perfil isotópico de una mezcla de un compuesto natural y su homólogo marcado con isótopo estable. De esta manera, la adición de una cantidad conocida de compuesto marcado y la consiguiente medida del perfil isotópico resultante permite obtener la cantidad de analito en la muestra. Así, cada inyección proporciona un valor de concentración, hecho que puede conllevar un considerable ahorro de tiempo y costes económicos.

Todos los estudios presentados en la presente tesis hacen uso de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) y cuantificación por IPD e IDMS convencional. Con el objetivo de enfatizar la potencia de IPD en la resolución de problemas analíticos complejos, se han seleccionado diversos tipos de compuestos, así como distintas matrices que, por su naturaleza, son consideradas de gran dificultad.

Los estudios realizados se han agrupado en tres bloques. En el primero de ellos se incluye el desarrollo de la metodología de IPD aplicada a la determinación de esteroides androgénicos endógenos en orina, evaluada frente a cuantificación por calibrado en términos de incertidumbre y de cuantificación simultánea de hasta 4 metabolitos. El segundo bloque consta de otros dos estudios enfocados a análisis clínicos, tanto para la certificación de estándares de vitamina D como para la cuantificación de estrógenos en suero. Finalmente, en el tercer bloque se aplica IPD a otra matriz de gran dificultad analítica como lo son las aguas residuales, para la realización de estudios de epidemiología basada en aguas residuales (WBE) de drogas de abuso.

Entrando más en detalle, el primer bloque consta de dos partes. En un primer estudio se escogió la testosterona (T) como compuesto modelo en el análisis de esteroides androgénicos endógenos. Se desarrolló un procedimiento de extracción de la orina siguiendo las pautas establecidas por la Agencia Mundial Anti-Dopaje (WADA), basado en extracción líquido-líquido tras un paso de hidrólisis enzimática con glucuronidasa obtenida de *Escherichia coli*. No obstante, en lugar de utilizar la cromatografía de gases se optó por la de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem. La cuantificación de T se llevó a cabo mediante distintas metodologías IDMS –IPD y calibrado con patrón interno, en modo ponderado y no ponderado– y clásicas –adiciones estándar–, con el objetivo de evaluar las fuentes de incertidumbre de cada una de ellas. En general, tanto IPD como calibrado ponderado resultaron en incertidumbres similares, aunque las de IPD siempre resultaron inferiores.

Para estas dos metodologías de cálculo fueron de menor magnitud que las del calibrado no ponderado, especialmente a bajas concentraciones. Ambos comportamientos fueron corroborados mediante un ejercicio inter-laboratorio. En el caso de IPD, el parámetro crucial en la incertidumbre analítica es el volumen de disolución de patrón interno y que puede reducirse considerablemente realizando la adición por pesada en lugar de volumen. En cambio, el calibrado presenta dos principales fuentes de incertidumbre, la pendiente y la ordenada en el origen, parámetros intrínsecos del procedimiento y difícilmente optimizables.

Esta metodología de IPD desarrollada para T se extendió a la determinación de cuatro de los principales esteroides endógenos requeridos por la WADA para la monitorización anti-dopaje: androsterona (A), eticolanolona (Etio), testosterona (T) y epitestosterona (E). Se obtuvo una buena separación cromatográfica de los pares de isómeros T/E y A/Etio, además de límites de cuantificación por debajo de los niveles habituales en adultos e incertidumbres combinadas por debajo de los límites establecidos por la WADA, a excepción de la A. De esta manera, IPD se muestra como una alternativa viable para aplicaciones anti-dopaje, si bien la técnica LC-MS con interfase electrospray imposibilita incluir los otros dos esteroides incluidos en la guía 5α Adiol y 5β Adiol– debido a su pobre ionizabilidad.

En el segundo bloque, correspondiente a los análisis clínicos, se expone en primer lugar una aplicación de IPD para la re-certificación de estándares analíticos. Durante el desarrollo de un método de análisis de vitamina D se encontró una gran dificultad a la hora de cumplir con los estrictos requerimientos de exactitud y precisión establecidos por el Programa de Estandarización de Vitamina D (VDST). Esta dificultad radicaba en la escasa, y en ocasiones incorrecta, información acerca de los estándares adquiridos para el estudio. Para corregir esta problemática se recurrió a IPD para establecer los valores correctos de pureza de estándares y análogos marcados. A partir de materiales de referencia certificados, se cuantificó mediante dilución isotópica inversa (RID) la concentración de

las disoluciones de estándar marcado utilizadas en dicho estudio. A su vez, estas disoluciones re-certificadas fueron empleadas para re-certificar las disoluciones del estándar natural por IPD directo. Esto permitió ulteriormente la correcta validación del método en cuestión (no incluido en la presente tesis).

Por otra parte, tras haber comprobado su utilidad en una matriz biológica en el primer bloque (orina), el potencial de aplicación de IPD en el ámbito clínico se puso a prueba en la determinación de estrógenos en suero humano, la cual es también considerada una matriz analítica compleja. Además, este estudio supone una dificultad añadida debido a la menor concentración de estos compuestos en las muestras, ya que tanto la estrona (E1) como el estradiol (E2) pueden encontrarse a niveles tan bajos como 1 ppt. Para ello se desarrolló un método de extracción líquido-líquido seguido de una reacción de derivatización, que incorpora un grupo funcional altamente ionizable en los analitos, el Dansilo. Siguiendo la guía de validación de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), se desarrolló un método basado en calibrado con patrón interno paralelamente al método IPD, con resultados de validación favorables en ambos casos. Finalmente, ambos métodos se compararon con técnicas de inmunoensayo ya establecidas en análisis de rutina, observándose sesgos proporcionales de hasta 2.55 en el caso de la estrona. De esta manera se pone de manifiesto no solamente la necesidad de emplear técnicas de cromatografía en ese tipo de análisis, sino la posibilidad de emplear IPD en su cuantificación, con el correspondiente ahorro de tiempos de análisis y de costes debido a la falta de necesidad de preparar, procesar cuando proceda y medir curvas de calibrado en las secuencias de análisis.

Por último, el tercer bloque se centra en la determinación de drogas de abuso en aguas residuales mediante IPD. Una vez más, tras comprobar la potencia de este método de cuantificación en dos tipos de matrices de gran complejidad y concentraciones bajas, se propone una nueva matriz y un nuevo campo de estudio. Enmarcado en el concepto de epidemiología basada en aguas residuales, se desarrolló el método de IPD basándose en

un procedimiento de extracción ya validado en el laboratorio y utilizado de manera regular. Se analizaron las muestras de control de calidad (QC) de los análisis rutinarios mediante el método establecido, calibrado con patrón interno marcado, e IPD. Dichos QCs se prepararon por fortificación de muestras a dos niveles de concentración. Ambos métodos fueron comparados en términos de valores adversos en los QCs e incertidumbre de los resultados. El método de IPD propuesto mostró consistentemente una mejoría en los porcentajes de recuperación de los QCs. Estableciendo unos límites aceptables de 70-120% de recuperación, IPD redujo el número de 31 a 11 resultados adversos de un total cercano a los 60 valores individuales, en comparación con calibrado. En cuanto a incertidumbre analítica, el parámetro RMS (*Root Mean Square*), asociado a la reproducibilidad del sesgo, en IPD resultó aproximadamente la mitad que en calibrado y, dado que es el mayor contribuyente a la incertidumbre combinada, también ésta resultó considerablemente menor. Por tanto, el método de cálculo de IPD, en igualdad de procedimiento experimental, proporciona una mejoría notable en la incertidumbre asociada tanto al resultado puramente analítico (concentración en muestra), como en las estimaciones de consumo diario de drogas en una ciudad derivadas de éste.

Índice general

Objetivos	1
Plan de Trabajo	5

Capítulo 1: Introducción general

1.1 Introducción	9
1.2 Tratamiento de muestra	15
1.3 Técnicas Instrumentales	17
1.3.1 Cromatografía líquida	17
1.3.2 Espectrometría de masas	21
1.3.3 Espectrometría de masas en tándem	24
1.3.4 Acoplamiento LC-MS	25
1.3.5 Eliminación de especies neutras	27
1.4 Espectrometría de masas de dilución isotópica	30
1.4.1 Isótopos y compuestos marcados isotópicamente	32
1.4.2 Modos de trabajo en IDMS	35
1.4.3 Selección del patrón interno	38
1.4.4 Ecuaciones básicas de IDMS	39
1.4.5 Deconvolución de perfiles isotópicos	41
1.4.6 Matriz de referencia	44
1.4.7 Dilución isotópica inversa	47
1.5 Validación de métodos analíticos	48
1.5.1 Incertidumbre analítica	50
1.6 Bibliografía	53

Capítulo 2: Determinación de esteroides en orina mediante IPD.

2.1 Introducción	61
2.1.1 Metodologías de análisis	66

2.2 Evaluación de la incertidumbre en la determinación de testosterona en orina mediante cuantificación por calibrado y dilución isotópica utilizando cromatografía líquida de ultra alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem	71
2.2.1 Desarrollo del método IPD	73
2.2.2 Evaluación de las fuentes de incertidumbre. Método Kragten	74
2.2.3 Artículo científico 1 Evaluation of uncertainty sources in the determination of testosterone in urine by calibration-based and isotope dilution quantification using ultra high performance liquid-chromatography tandem mass spectrometry	77
2.3 Determinación de esteroides anabólicos androgénicos endógenos seleccionados y relaciones en orina mediante cromatografía líquida de ultra alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem y deconvolución de perfiles isotópicos	111
2.3.1 Selección de compuestos marcados	112
2.3.2 Artículo científico 2 Determination of selected endogenous anabolic androgenic steroids and ratios in urine by UHPLC-MS/MS and isotope pattern deconvolution	115
2.4 Bibliografía	143

Capítulo 3: Aplicación de IPD a análisis clínicos

3.1 Introducción	151
3.1.1 Metodologías de análisis	156
3.2 Re-certificación de estándares de hidroxivitamina D por deconvolución de perfiles isotópicos	161
3.2.1 Secuencia de re-certificación de estándares	165
3.2.2 Artículo científico 3 Re-certification of hydroxyvitamin D standards by isotope pattern deconvolution	167

3.3 Comparación de los métodos de cuantificación de deconvolución de perfiles isotópicos y curva de calibrado para la determinación de estrona y 17β -estradiol en suero humano	191
3.3.1 Desarrollo de metodología LC-MS	196
3.3.2 Validación y comparación de métodos	199
3.3.3 Artículo científico 4	
Comparison of isotope pattern deconvolution and calibration curve quantification methods for the determination of estrone and 17β -estradiol in human serum	201
3.4 Bibliografía	226

Capítulo 4: Determinación de drogas de abuso en aguas residuales

4.1 Introducción	235
4.1.1 Metodologías de análisis	241
4.2 Deconvolución de Perfiles Isotópicos como alternativa a la curva de calibrado para la aplicación en epidemiología basada en aguas residuales	244
4.2.1 WBE e incertidumbre	245
4.2.2 Comparación de métodos	247
4.2.3 Artículo científico 5	
Isotope Pattern Deconvolution as an alternative to calibration curve for application in wastewater-based epidemiology	251
4.3 Bibliografía	294

Capítulo 5: Conclusiones

Conclusiones	303
Trabajos futuros	307
Artículos científicos relacionados	308
Agradecimientos	310

Acrónimos y abreviaturas

AC	Alternate Current
API	Atmospheric Pressure Ionization
CRM	Certified Reference Material
DC	Direct Current
DOA	Drugs of Abuse
EAAS	Endogenous Anabolic Androgenic Steroids
ECLIA	ElectroChemiLuminiscence ImmunoAssay
EMCDDA	European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction
EMA	European Medicines Agency
ESI	ElectroSpray Ionization
FT-ICR	Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Analyzer
HF-LPME	Hollow-Fiber Liquid-Phase Micro-Extraction
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICP	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
IDA	Isotope Dilution Analysis
IDMS	Isotope Dilution Mass Spectrometry
IOC	International Olympic Committee
IPD	Isotope Pattern Deconvolution
IS	Internal Standard
IT	Ion Trap Mass Analyzer
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
GC	Gas Chromatography
LC	Liquid Chromatography
LLE	Liquid-Liquid Extraction
LOD	Limit Of Detection
LOQ	Limit Of Quantification
LPME	Liquid-Phase Micro-Extraction
MS	Mass Spectrometry
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry
m/z	Mass to Charge ratio
NIDA	National Institute for Drug Abuse
Q	Quadrupole Mass Analyzer

QqQ	Triple Quadrupole Mass Analyzer
RIA	RadiImmunoAssay
RID	Reverse Isotope Dilution
RPLC	Reverse-Phase Liquid Chromatography
SCORE	Sewage analysis CORe group Europe
SDME	Single-Drop Micro-Extraction
SPE	Solid-Phase Extraction
SRM	Single Reaction Monitoring
TIMS	Thermal Ionization Mass Spectrometry
TOF	Time Of Flight Mass Analyzer
UHPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography
WADA	World Anti-Doping Agency
WATCH	Wastewater Analysis of Traces of illicit drug-related Chemicals for law enforcement and Health

Objetivos

La presente tesis doctoral tiene como objetivo principal el desarrollo de la metodología de análisis por espectrometría de masas de dilución isotópica (IDMS) en la determinación de compuestos denominada deconvolución de perfiles isotópicos (IPD), ampliando los campos de aplicación y variedad de analitos, mediante la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). En concreto, la metodología de IPD se ha desarrollado y evaluado en las siguientes tres etapas.

Determinación de esteroides en orina mediante IPD

1. Desarrollo de un método de liberación y extracción de esteroides empleando la técnica de hidrólisis enzimática seguida de extracción líquido-líquido.
2. Optimización de un método de separación por cromatografía líquida en fase reversa y detección mediante espectrometría de masas en tándem, primero para un compuesto modelo (testosterona) y posteriormente para los principales esteroides anabólicos androgénicos (testosterona, epitestosterona, androsterona y eticolanolona).
3. Evaluación y comparación de distintas metodologías de cuantificación (adiciones estándar, calibrado con patrón interno e IPD) para testosterona mediante el estudio estadístico de las fuentes de error. Estudios intra- e inter-laboratorio.
4. Validación de las metodologías desarrolladas haciendo uso de materiales de referencia certificados (CRM) y estudios de fortificación.

Aplicación de IPD a análisis clínicos

1. Evaluación y estudio de la pureza y exactitud de patrones comerciales de distintos metabolitos de vitamina D –25-hidroxivitamina D₂ (25(OH)D₂), 25-hidroxivitamina D₃ (25(OH)D₃) y 24,25-dihidroxivitamina D₃ (24,25(OH)₂D₃)– mediante la cuantificación por IPD y dilución isotópica inversa (RID) a partir de materiales de referencia.
2. Desarrollo de un método de extracción cuantitativo y reproducible de estrógenos en cantidades limitadas de muestras de suero humano, mediante extracción líquido-líquido y derivatización para disminuir los límites de detección y cuantificación.
3. Optimización del instrumento de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem para la cuantificación de estrógenos hasta niveles de ng/L mediante calibrado con patrón interno e IPD.
4. Validación exhaustiva de ambos métodos siguiendo guías de validación clínicas (EMA), haciendo uso de estudios de fortificación y CRM.
5. Comparación de resultados de muestras de pacientes reales entre técnicas de rutina basadas en inmunoensayos y los métodos desarrollados para LC-MS.

Determinación de drogas de abuso en aguas residuales urbanas

1. Adaptación a IPD de un método previamente validado en el laboratorio para la determinación de drogas de abuso (DOA) seleccionadas (anfetamina, metanfetamina, cocaína, benzoilecgonina y MDMA) en aguas residuales mediante LC-MS y calibrado con patrón interno.

2. Validación de la metodología de IPD mediante estudios de fortificación y análisis de muestras de inter-laboratorio, comparando los resultados obtenidos con los del método original.
3. Estudio y comparación de la exactitud y precisión de ambos métodos en las muestras de control de calidad (QC), preparadas por fortificación de muestras reales con cantidades conocidas de DOA.

Plan de trabajo

A lo largo de la presente tesis se ha seguido una aproximación muy similar para afrontar el desarrollo de cada uno de los distintos métodos de cuantificación por IPD y cuyos pasos difieren ligeramente de los esquemas de trabajo típicos de desarrollos basados en LC-MS y calibrados metodológicos. De manera general, los pasos para desarrollar un método analítico basado en IPD son los siguientes:

1. Búsqueda bibliográfica de estudios y métodos publicados con anterioridad sobre el tema, ya sea sobre los analitos de interés, del tipo de muestras a analizar o de ambos. Estudio de la posible novedad del método que se quiere desarrollar o de la posible mejora que conllevaría el uso de IPD.
2. Búsqueda y adquisición de patrones comerciales de los compuestos, prestando especial atención a la selección de compuestos marcados isotópicamente, su disponibilidad y opciones de marcaje, priorizando aquellos con carbono 13 sobre los marcados con deuterio.
3. Optimización de los parámetros instrumentales del sistema de espectrometría de masas para obtener la mayor sensibilidad y selectividad posible tanto para los compuestos naturales como para los marcados. Obtención de las transiciones.
4. Optimización de la separación cromatográfica mediante la correcta selección de columna, solventes de la fase móvil y aditivos de la misma. Ajuste del gradiente de elución que asegure la completa separación de los analitos y de sus posibles interferentes en muestra.
5. Cálculo de las distribuciones isotópicas correspondientes a compuestos naturales y marcados según la fragmentación optimizada en el espectrómetro de masas. Medida experimental

de las transiciones correspondientes a los clústers de la fragmentación seleccionada, realizando las correcciones oportunas en función de la presencia de interferencias espectrales y del grado de marcaje de los patrones.

6. Certificación de la concentración de los patrones marcados mediante el cálculo por IPD cuantificando con patrones naturales certificados, proceso conocido como dilución isotópica inversa (RID).
7. Optimización y desarrollo de los parámetros experimentales tales como la extracción de analitos de la matriz, estudio de la eficiencia y selectividad de la extracción, límites de detección y cuantificación y presencia de interferentes inesperados.
8. Validación de la metodología desarrollada de la forma habitual.

CAPÍTULO 1

Introducción general

1.1 Introducción

Desde sus primeros pasos como especie, el ser humano se ha caracterizado siempre por su curiosidad hacia el mundo que lo rodea y hacia sí mismo. Esta capacidad de observación, experimentación y aprovechamiento de los recursos a su alcance es lo que nos ha permitido convertirnos en aquello que somos en la actualidad. La comprensión de los mecanismos y leyes que rigen la Naturaleza nos ha llevado a desarrollar diversas disciplinas de conocimiento a lo largo de los siglos, ya sea para mejorar procesos que ocurren de forma natural, por ejemplo, en el cultivo de alimentos, cría y cruce de especies animales o explotación de recursos minerales; o bien para aprovecharlos de forma más eficiente, en la forma de fuentes de energía o invención de tecnologías. No solo eso, el descubrimiento del propio cuerpo humano, y de los procesos biológicos en general, ha permitido el desarrollo de la medicina y una mejora continua de la esperanza de vida.

En este marco concreto, y a raíz de la inherente competitividad que nos caracteriza, el uso de hierbas para mejorar las capacidades físicas y psicológicas se conoce y practica desde la Antigüedad, tanto para la guerra como para competiciones deportivas. Si bien las antiguas prácticas alquímicas y las primeras técnicas químicas de extracción llevaron a una mejora en la purificación de compuestos activos, han sido el desarrollo de la medicina y la química lo que ha contribuido a potenciar al máximo las capacidades humanas.

Estos avances han dado lugar a la investigación y fabricación de sustancias que mimetizan la actividad de los compuestos producidos por el propio organismo, llamadas sustancias endógenas, por similitud completa o parcial de su estructura química. Esto puede ser utilizado, entre muchos otros usos, para combatir enfermedades o síndromes (medicamentos),

para producir efectos psicoactivos (drogas recreativas) o aumentar el rendimiento en actividades deportivas (dopaje).

En este último ámbito, con la aparición de la administración de sustancias en el deporte de alto nivel, surge la necesidad de regular o prohibir su abuso con el objetivo de mantener la igualdad de oportunidades, la competición justa y la salud de los atletas. Una de las formas más habituales de dopaje, actual e históricamente¹, es la administración de esteroides. Los esteroides son compuestos orgánicos producidos por el propio organismo que regulan multitud de procesos biológicos, entre ellos el desarrollo y producción de masa muscular y ósea². Resulta comprensible, pues, el porqué de su abuso en el deporte. Habitualmente se reconocen dos grandes clasificaciones de los compuestos que presentan esas características: los esteroides anabólicos androgénicos endógenos (EAAS, *Endogenous Anabolic Androgenic Steroids*) y los esteroides exógenos. Los primeros son aquellos que presentan la misma estructura química que los compuestos naturales del cuerpo, mientras que los segundos son aquellos que presentan partes similares y que mimetizan la actividad bioquímica de los compuestos endógenos. Son sintéticos y están diseñados específicamente para esa función, hecho que profundiza la necesidad de desarrollar un sistema de controles antidopaje que proteja tanto la competitividad del deporte como la salud de los participantes³.

No solo eso, además de la mejora de las capacidades físicas y mentales, el placer y los efectos psicotrópicos ha sido otro gran aliciente que ha llevado al ser humano a desarrollar estas actividades de aislamiento de productos naturales y síntesis de nuevos compuestos. Por su alta capacidad para crear adicción y/o tolerancia que conlleva en muchos casos a un riesgo para la salud del usuario por uso excesivo de sustancias psicoactivas⁴, las conocemos como “drogas de abuso” (DOA, *Drugs of Abuse*) o, más vulgarmente, “drogas”. Al igual que en el caso del dopaje en el deporte, el uso de drogas con fines recreativos y de placer también se conoce desde la antigüedad y actualmente supone un serio problema de salud para las

sociedades modernas, que han visto como la prohibición de drogas clásicas (como podrían ser la marihuana, cocaína u otros productos derivados de plantas) ha dado lugar al fenómeno de las sustancias derivadas de los principios activos originales y a las drogas de diseño⁵. Éstas están pensadas para mimetizar el efecto de las originales de una forma u otra, pero en la mayoría de casos se trata de sustancias cuyos efectos a largo plazo son desconocidos y resultan especialmente dañinas para la salud y el correcto funcionamiento del organismo.

En estas dos situaciones se presentan una serie de problemáticas tanto de salud como de legalidad relacionados con esteroides⁶ y drogas de abuso. Por ello, es necesario algún tipo de control y de capacidad de detección, ya sea para prevenir el consumo, monitorizar niveles de sustancias y metabolitos en un organismo o analizar los hábitos de consumo. Es aquí donde entra en juego la química analítica.

Sin profundizar en una definición más exhaustiva, entendemos por “química analítica” aquella rama de la ciencia dedicada a la medición de propiedades y composición de muestras de interés para el resto de ciencias⁷. Así pues, el objeto de investigación en química analítica es el desarrollo de nuevos métodos de análisis que permitan la detección, caracterización y determinación de nuevas sustancias de interés, además de la mejora de los métodos existentes para alcanzar concentraciones cada vez más bajas y mejorar la calidad de sus resultados, es decir, mejorar su fiabilidad, precisión, robustez, etc. Este último caso es de especial interés para la presente tesis, pues se centra en el desarrollo de métodos enfocados a sustancias bien conocidas, como algunos esteroides y drogas de abuso (o sus derivados), y en el estudio y mejora de la precisión y exactitud de dichos métodos.

Una de las estrategias más utilizadas y eficaces en química analítica es la separación de los analitos de interés de una matriz que los acompaña para su posterior caracterización y/o cuantificación. La separación de analitos consiste, a grandes rasgos, en obtener un extracto lo más puro posible del

analito de interés habiendo eliminado el resto de componentes de la muestra. Esta etapa puede llevarse a cabo mediante técnicas de laboratorio clásicas como son las extracciones con distintos disolventes, precipitaciones, absorción y/o adsorción en matrices sólidas, métodos electroquímicos, de inmunoafinidad, etc. Además, el uso continuado de dichas técnicas ha facilitado su automatización y la aparición de nuevos desarrollos que han desembocado en la invención de metodologías instrumentales de separación. Entre estas técnicas instrumentales destacan la cromatografía de gases o líquidos y la electroforesis capilar.

Por otra parte, la detección de los analitos puede llevarse a cabo mediante diferentes técnicas instrumentales que se apoyan en las distintas propiedades de la materia y su interacción con algún tipo de energía. De esta manera, existen detectores que miden variaciones de fenómenos físicos como la radiación electromagnética, corriente eléctrica, conductividad térmica, índice de refracción, etc., debidas a la presencia de compuestos que provocan estas variaciones. Hay otro tipo de detector que ha ido ganando popularidad debido a su versatilidad, sensibilidad y selectividad: la espectrometría de masas. Ésta se basa en el filtrado y detección de la masa de los compuestos que se introducen en el sistema tras ser ionizados, por lo que funciona simultáneamente como método de separación y detección. Se separa cada compuesto de interés por selección de su relación masa/carga y su presencia se pone de manifiesto mediante la respuesta eléctrica generada cuando impactan sobre el sistema de detección, generalmente un multiplicador de electrones secundarios, entre otras posibilidades⁸.

En concreto, la separación cromatográfica acoplada a la espectrometría de masas es actualmente una de las herramientas más potentes y versátiles para la determinación de compuestos orgánicos. Haciendo uso de la espectrometría de masas enfocada a la cuantificación, se presenta una forma alternativa de tratamiento de los datos producidos llamada Deconvolución de Perfiles Isotópicos (IPD, *Isotope Pattern Deconvolution*), enmarcada en la metodología de Espectrometría de Masas de Dilución

Isotópica (IDMS, *Isotope Dilution Mass Spectrometry*) pero que no requiere de la preparación de curvas de calibrado. A lo largo de los siguientes capítulos se expondrán distintas aplicaciones de la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en diversos campos de estudio y tipos de muestras. Se llevarán a cabo comparaciones de la metodología de cuantificación IPD con la más habitual basada en curvas de calibrado y, en algún caso, con métodos alternativos de análisis como los inmunoensayos.

Primeramente, el potencial de mejora de la incertidumbre asociada a los cálculos de cuantificación mediante la aplicación de IPD se puso a prueba en la determinación de esteroides endógenos en muestras de orina. Para ello, se han comparado las fuentes de error asociadas a los elementos necesarios para realizar los cálculos mediante distintos métodos de cuantificación, en la determinación de un compuesto modelo: testosterona. Posteriormente se desarrolló un método de cuantificación simultánea para 4 esteroides en orina basado en IPD, siguiendo directrices oficiales recomendadas por la Agencia Mundial Antidopaje (WADA).

Seguidamente, la gran exactitud y baja variabilidad de resultados obtenidos por IPD se puso de nuevo a prueba en el ámbito clínico. Por una parte, el desempeño de IPD frente a curva de calibrado se comprobó a bajas concentraciones con su aplicación a la determinación de estrógenos en cantidades limitadas de suero humano. Por otra parte, la técnica de IPD se utilizó como método de certificación de disoluciones estándar mediante cuantificaciones consecutivas a partir de materiales de referencia certificados, con el objetivo de detectar y corregir posibles errores de pesada, etiquetado o manipulación experimental que pudieran conllevar errores sistemáticos en los resultados finales.

Finalmente, como último reto de IPD para compensar el efecto matriz derivados de la presencia de una mezcla compleja de interferentes y compuestos de todo tipo, se aplicó IPD a la determinación de drogas de abuso en aguas residuales urbanas. Éste fue desarrollado a partir de otro

método ya validado basado en curva de calibrado y ambos fueron comparados en términos de exactitud y precisión en ejercicios inter-laboratorio y por su respuesta en muestras de control de calidad utilizando muestras de distintos países.

1.2 Tratamiento de muestra

Se entiende por tratamiento o preparación de muestra todos aquellos pasos o manipulaciones que se realizan sobre un espécimen de interés analítico, previo a su determinación mediante cualquier medida o técnica instrumental. El tratamiento de muestra sigue siendo a día de hoy uno de los pasos del proceso analítico que más tiempo consume y, en la mayoría de casos, sigue siendo fundamental para asegurar la calidad de los resultados, a pesar de la potencia y capacidad de resolución de los equipos de cromatografía y de espectrometría de masas. Entre ellos podemos incluir pasos tan sencillos como pesadas o diluciones, o procedimientos más elaborados y que requieren la optimización de numerosos parámetros como son las extracciones o derivatizaciones⁹, por ejemplo.

De todas las opciones posibles de acondicionamiento de la muestra, las extracciones son las técnicas más utilizadas y más estudiadas para la separación de los analitos de la matriz de la muestra, así como para su pre-concentración y mejora de sensibilidad. Actualmente existen numerosos y muy variados modos de trabajo, los cuales pueden ser agrupados a grandes rasgos en métodos para muestras sólidas y para muestras líquidas¹⁰.

Durante décadas, el método de referencia para el tratamiento de muestras líquidas ha sido la extracción líquido-líquido (LLE, *Liquid-Liquid Extraction*). Esta técnica se basa en el uso de un solvente (habitualmente orgánico) inmisible con la fase líquida que contiene la muestra, habitualmente una disolución acuosa. La extracción de la matriz líquida se consigue por partición de los analitos a la fase aceptora, en la que su solubilidad es mucho mayor. Dado que es un proceso de partición, la extracción no es cuantitativa, con lo que en muchas ocasiones se realizan acciones para maximizar la cantidad de analitos extraídos como por ejemplo realizar extracciones consecutivas con nuevos volúmenes de solvente, añadir sales para aumentar la fuerza iónica (*salting out*) o utilizar grandes volúmenes de solvente extractante. A pesar del gran volumen de

disolventes orgánicos que requiere, la extracción líquido-líquido es una de las técnicas más sencillas de aplicar y también de las más efectivas.

En un esfuerzo por adaptar las metodologías para que resulten menos dañinas para el medio ambiente, también conocido como “química verde”, se han desarrollado técnicas de micro-extracción en fase líquida (LPME, *liquid-phase microextraction*) que minimizan el uso de solventes orgánicos. Dentro de esta categoría se encuentran técnicas como la micro-extracción con una sola gota (SDME, *single-drop microextraction*) o la micro-extracción con fibras huecas como soporte del solvente (HF-LPME, *hollow-fiber liquid-phase microextraction*).

Por otra parte, la minimización del uso de solventes puede conseguirse mediante métodos que hacen uso de soportes sólidos en los que retener los analitos de interés, en lugar de utilizar solventes, entre los cuales la extracción en fase sólida (SPE, *solid-phase extraction*) juega un papel principal. Ésta es una técnica basada en la adsorción de los analitos sobre una matriz sólida de polaridad y selectividad química adecuadas, soportada en un cartucho, cuando se hace pasar por ella un volumen de muestra líquida. Esto permite un filtrado, limpieza y concentración de los compuestos de interés por retención en el sólido mientras que el resto de componentes (o la mayor parte de ellos) de la matriz es eliminado. Una vez realizada la extracción, es posible limpiar todavía más el extracto mediante lavados de diferentes condiciones químicas (pH, polaridad, etc.) que eluyen interferentes no deseados pero que deja a los analitos de interés inalterados. Finalmente, los analitos son extraídos del sólido mediante un disolvente adecuado en un volumen relativamente pequeño, de unos pocos mililitros, por lo que se puede considerar como un método respetuoso con el medio ambiente.

1.3 Técnicas instrumentales

En las últimas décadas, la química analítica moderna se ha visto inclinada hacia el uso extensivo de técnicas instrumentales para la resolución de problemas analíticos complejos¹¹. Las técnicas de fabricación y el desarrollo de mejores y más potentes instrumentos de medida han permitido alcanzar niveles de concentración detectables y medibles impensables pocos años atrás, incluso en las matrices más complejas como son las muestras de fluidos biológicos o de aguas residuales.

Es precisamente la matriz de la muestra lo que más problemas acarrea en la determinación de los analitos de interés, es decir, todos aquellos compuestos presentes en una muestra que no interesan. Por esta razón, el desarrollo de técnicas de separación y/o de tratamiento de muestra es uno de los aspectos más importantes que determinan la calidad y fiabilidad de los métodos analíticos.

En este ámbito, la cromatografía tiene un papel esencial, ya que es una de las maneras más eficaces de aislar un analito del resto de la matriz mediante diferencias de propiedades físico-químicas y de condiciones instrumentales. Por otro lado, el desarrollo de la espectrometría de masas como método de detección ha permitido alcanzar una mayor robustez, sensibilidad y precisión en la determinación analítica. La unión de ambas técnicas es, por tanto, obvia para optimizar y acortar los tiempos de análisis y facilitar tanto el manejo de muestras como para evitar la manipulación y transporte de extractos entre instrumentos.

1.3.1 Cromatografía líquida

Las técnicas cromatográficas agrupan un conjunto de metodologías de separación utilizados para el estudio, caracterización y/o purificación de mezclas o muestras complejas.

El mecanismo de toda separación cromatográfica se fundamenta en dos elementos básicos. Por una parte, se tiene una fase móvil en la cual se encuentra disuelta la muestra o mezcla a resolver y que puede estar en fase líquida, gaseosa o como fluido supercrítico (que daría lugar a cromatografía de líquidos, de gases o de fluidos supercríticos, respectivamente). Por otra parte, una fase estacionaria, inmisible con la fase móvil y fijada en algún tipo de soporte como el interior de una columna o una superficie sólida plana. Esta fase estacionaria puede estar compuesta de distintos materiales y estados físicos. Las diferentes características físico-químicas de la fase móvil y la fase estacionaria provocan una distribución de los distintos componentes de la muestra introducida en el sistema, es decir, la propia química de los compuestos conlleva una mayor o menor afinidad por la fase estacionaria que provoca una mayor o menor retención. Así pues, aquellos compuestos que presentan una mayor retención en la fase estacionaria se ven arrastrados en menor medida por la fase móvil que aquellos otros compuestos con interacciones más débiles, que viajan a mayor velocidad. Todo esto produce finalmente una separación de los componentes de la muestra en distintas bandas sobre las que realizar análisis tanto cualitativos como cuantitativos¹².

Concretamente, la cromatografía líquida, especialmente la llamada cromatografía líquida de fase inversa (RPLC, *Reverse Phase Liquid Chromatography*) (*Figura 1.1*), es la modalidad más utilizada actualmente y se basa en el uso de fases móviles líquidas de mayor polaridad que la fase estacionaria, la cual puede estar constituida por partículas sólidas o por geles soportados en polímeros. Esta técnica instrumental se caracteriza por una gran eficacia de separación, tiempos de análisis cortos y amplio rango de analitos separables.

Los disolventes utilizados en RPLC como fase móvil suelen estar formados por una mezcla de agua y un disolvente orgánico polar, siendo los más habituales el metanol o el acetonitrilo. La optimización de la separación comienza con un régimen isocrático, es decir, con una composición

constante de fase móvil que arrastra los compuestos de la muestra a distintas velocidades según su afinidad con dicha mezcla. Estas condiciones pueden mejorarse para lograr mayor resolución o un menor tiempo de análisis si se utilizan gradientes de composición a lo largo del tiempo, empezando con una polaridad más alta (mayor porcentaje de agua) y aumentando la proporción orgánica paulatinamente. Además, la adición de modificadores a la fase móvil (sales de amonio o tampones ácido fórmico/formiato, entre otros) puede proporcionar una mejora tanto de la forma de pico cromatográfico como la anchura y resolución, así como para controlar el pH o para mejorar la sensibilidad en la detección por espectrometría de masas.

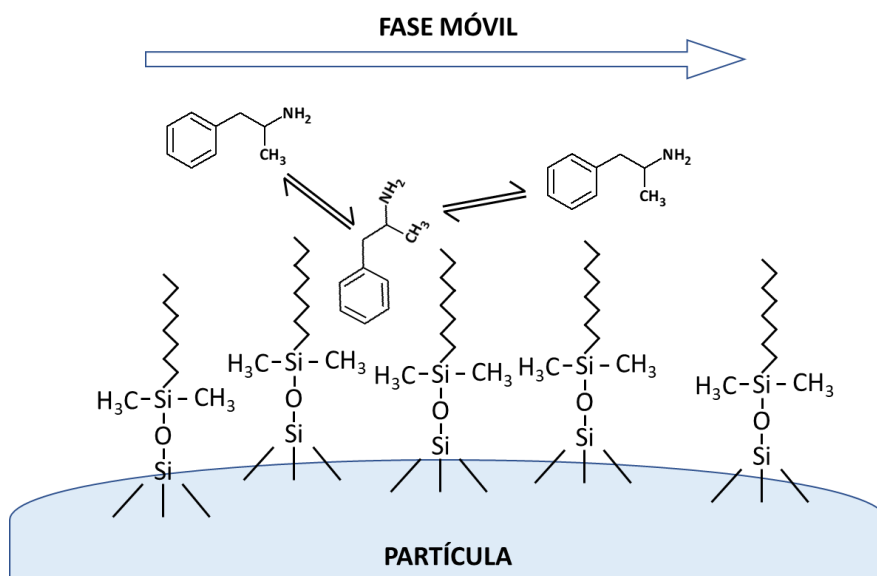


Figura 1.1. Esquema del mecanismo de retención en RPLC con fase estacionaria de C₈.

En cuanto a la fase estacionaria, la mayor parte de columnas cromatográficas de fase reversa comerciales están rellenas de pequeñas partículas de gel de sílice modificada covalentemente, en cuya superficie se enlazan distintos ligandos dependiendo de la polaridad deseada, siendo las más habituales el octadecilsilil (C₁₈), el octilsilil (C₈) o pentafluorofenil¹³. Sin embargo, el proceso de funcionalización de la sílice no es perfecto,

dada la imposibilidad de enlazar ligandos relativamente grandes sobre todos y cada uno de los hidroxilos terminales del material, hecho que podría dar lugar a interacciones no deseadas entre los analitos y los extremos -OH libres. Este problema puede evitarse mediante el proceso de *end-capping*, mediante el cual se enlazan cadenas alquílicas cortas (-CH₃) a los -OH residuales para bloquear estas interacciones secundarias.

En cromatografía líquida, llamada también cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) en las últimas décadas, la eficiencia de la separación cromatográfica está íntimamente ligada al tamaño de las partículas de su interior, ya que las interacciones analito-fase estacionaria ocurre sobre la superficie exterior y entre los poros de ellas. Por tanto, a un menor tamaño de partícula, la superficie disponible para interactuar es mayor y la resolución cromatográfica aumenta, a costa de un aumento de la presión en todo el sistema. Las medidas más comunes para una columna de HPLC están entre los 5 y los 15 centímetros de longitud, con un diámetro interno de hasta 5 milímetros y de un tamaño de partícula de no menos de 2 micrómetros; dimensiones que mantienen la presión de trabajo por debajo de los 400 bares.

Nuevos desarrollos en LC han llevado a la fabricación de columnas y sistemas más eficientes y robustos que han permitido mejorar enormemente la resolución y velocidad de los análisis en lo que se conoce como cromatografía líquida de ultra-alta eficacia (UHPLC, *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*). Esta nueva modalidad hace uso de tamaños de partícula por debajo de las 2 micras que, a pesar de provocar presiones de hasta 1000 bar, disminuyen el tiempo de análisis, estrechan los picos cromatográficos y mejoran la separación. Con esto se consigue no solo aumentar el rendimiento de un laboratorio, sino abaratar costes en términos de consumo de disolventes para fase móvil y optimizar el tiempo de trabajo de los equipos, ya que separaciones que en HPLC pueden conllevar tiempos de decenas de minutos, pueden conseguirse con mejores resultados por debajo de los 5 min en UHPLC¹⁴.

Finalmente, en los últimos años han surgido nuevos diseños de rellenos de columnas HPLC y UHPLC que minimizan sustancialmente la presión generada por las columnas. Las columnas de tipo núcleo sólido (*Solid-Core*) contienen partículas de sílice fundida y sin poros sobre la que se enlazan los compuestos deseados para la fase estacionaria, creando una película semilíquida donde ocurren las interacciones mientras que la parte interior de la partícula permanece inaccesible (al contrario que en las partículas porosas) (*Figura 1.2*). Esto genera unas zonas limitadas de interacción que evitan la presión generada por el paso de la fase móvil por los poros y evitando una mayor difusión de las bandas cromatográficas. Todo esto permite utilizar flujos de fase móvil más altos, pero manteniendo o incluso mejorando la resolución cromatográfica, ya que se obtienen picos más estrechos¹⁵.

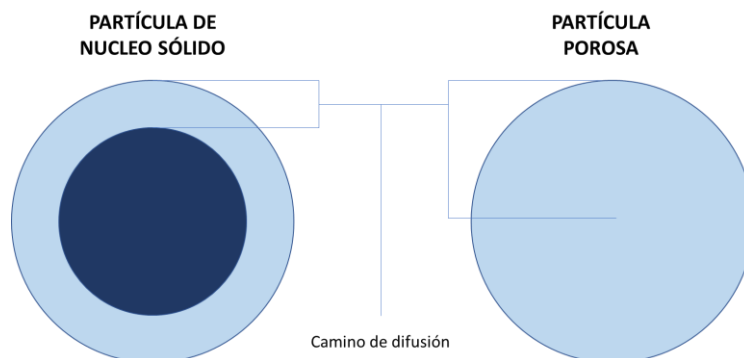


Figura 1.2. Comparación de las estructuras de partícula de núcleo sólido y partícula porosa.

1.3.2 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica instrumental basada en la separación y determinación cuantitativa o cualitativa de especies cargadas, ya sean iones orgánicos o inorgánicos, mediante su relación masa/carga (m/z)¹⁶. Los espectrómetros de masas son herramientas analíticas de gran potencia, ya que permiten no solo la determinación cuantitativa de analitos orgánicos, sino la elucidación estructural de

compuestos desconocidos, dependiendo de los distintos diseños y capacidades instrumentales disponibles.

Los principales componentes que conforman un espectrómetro de masas son: la fuente de iones, el analizador de masas y el detector. La fuente de iones es el lugar donde se introduce la muestra, ya sea de forma directa o proveniente de un sistema cromatográfico, para ser vaporizada (en el caso de muestras líquidas o sólidas) e ionizada. Esta fuente de iones actúa también como interfase entre sistemas cromatográficos y el espectrómetro de masas, como se explica en la siguiente sección. Una vez ionizada la muestra, unas lentes iónicas guían el haz de iones hacia el interior del analizador de masas que se encuentra en condiciones de alto vacío, cuya función es separar y/o filtrar los distintos componentes en función de su relación m/z . Finalmente, los iones seleccionados llegan a un sistema de detección que produce una respuesta eléctrica proporcional al número de impactos recibidos, obteniendo la señal correspondiente a cada relación m/z seleccionada.

Según el diseño, existen distintos analizadores de masas con diferentes características, capacidades de resolución y velocidades de escaneo. Actualmente, los analizadores de masas disponibles comercialmente son los de tipo cuadrupolo (Q, *quadrupole*), el de tiempo de vuelo (TOF, *Time Of Flight*), el sector magnético (*magnetic sector*), la trampa de iones (IT, *Ion Trap*), el *Orbitrap* o el de resonancia ión-ciclotrón con transformada de Fourier (FT-ICR, *Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance*).

De todos estos tipos de espectrómetros de masas, el analizador de tipo cuadrupolo destaca por elevada capacidad de transmisión de iones, peso ligero de los equipos debido a su diseño compacto, ser relativamente económico y permitir una gran velocidad de escaneo de distintos valores de m/z . No obstante, presenta el inconveniente de su baja resolución, limitada a la discriminación entre masas contiguas separadas por aproximadamente una una, característica que dificulta su aplicación para estudios de elucidación estructural. Todo esto convierte al cuadrupolo en

la opción preferente para análisis cuantitativos de alta sensibilidad, precisión y robustez, tanto para tareas de rutina como en investigación.

El cuadrupolo consiste en cuatro barras cilíndricas o hiperbólicas posicionadas en forma de cuadrado, extendiéndose en la dirección z (Figura 1.3). Las barras opuestas están conectadas entre sí y se les aplica un potencial de corriente continua (DC) al que se superpone otro de corriente alterna (AC).

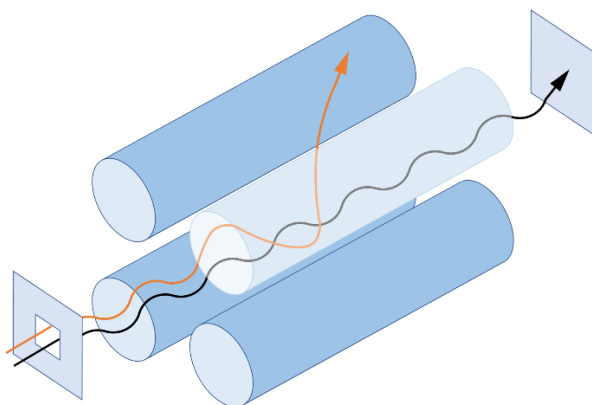


Figura 1.3. Filtrado de masas mediante analizador tipo cuadrupolo. Solamente los iones con la relación m/z seleccionada mantienen una trayectoria estable (negra) mientras que el resto de iones son eliminados (naranja).

Una vez los iones alcanzan la zona interior del cuadrupolo en la dirección z , los voltajes AC aplicados a las barras atraen alternativamente a los iones hacia las direcciones x e y de forma que solamente unos determinados valores de m/z mantienen una trayectoria estable a lo largo de la longitud del cuadrupolo. El barrido de m/z se consigue variando los valores de potencial DC y AC manteniendo la relación entre ellos constante. De esta manera, solo las m/z seleccionadas llegan finalmente al detector, mientras que el resto son o bien expulsados del seno del analizador, o bien chocan contra él perdiendo la carga, para finalmente ser eliminados por el sistema de vacío.

1.3.3 Espectrometría de masas en tándem

La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) permite la fragmentación de los iones generados en la fuente y puede llevarse a cabo mediante la separación en el tiempo de diversos procesos de separación/fragmentación de iones en un mismo analizador de masas (IT) o, más habitualmente, mediante el acoplamiento de dos o más analizadores de masas en serie separados por una celda de colisión. Esto incluye acoplamientos entre analizadores iguales de baja resolución como es el caso de los instrumentos de triple cuadrupolo, o entre distintos analizadores para obtener espectrómetros de masas híbridos, siendo uno de los más habituales el de cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF).

En espectrometría de masas de triple cuadrupolo se tienen dos analizadores de masas de tipo cuadrupolo separados por una celda de colisión que puede estar constituida por un cuadrupolo, hexapolo u octapolo, y suele representarse por las siglas QqQ (donde la q minúscula es la celda de colisión y las Q mayúsculas los analizadores). En la celda de colisión se producen iones fragmentos por la ruptura de las moléculas de m/z seleccionadas en el primer cuadrupolo, por aceleración de éstas mediante un potencial eléctrico y posterior colisión contra un gas inerte presurizado en la celda. De esta manera se consigue más información estructural y, por tanto, cualitativa. De manera simultánea se obtiene una mayor relación señal/ruido por eliminación de interferencias isobáricas, es decir, se consigue la eliminación de gran parte del ruido provocado por especies de la misma m/z que pudieran pasar a través del primer cuadrupolo y alcanzar el detector.

Los equipos de MS/MS de triple cuadrupolo permiten distintos modos de trabajo según si sus 2 analizadores trabajan en modo de barrido de masas o si se monitorizan valores de m/z concretos. De esta forma, puede realizarse un barrido de iones producto (iones fragmento producidos por moléculas con un m/z determinado), barrido de iones precursor (todos aquellos iones que producen un fragmento concreto), búsqueda de

pérdidas neutras (ambos analizadores barren todos los valores de m/z con un intervalo fijo entre ellos) o, como se ha utilizado en esta tesis, la monitorización de transiciones (SRM, *Single Reaction Monitoring*). En este último modo los cuadrupolos monitorizan valores concretos de m/z tanto para precursores como para productos, específicos de los analitos de interés. Es decir, se selecciona la molécula ionizada en el primer cuadrupolo, ésta es fragmentada en la celda de colisión bajo unas condiciones optimizadas y uno o varios de sus fragmentos son seleccionados secuencialmente en el último cuadrupolo.

1.3.4 Acoplamiento LC-MS

Si bien el acoplamiento entre la cromatografía de gases y la espectrometría de masas puede resultar tan sencilla como conectar ambos equipos por un canal caliente, el acoplamiento cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) no es inmediata. Mientras que las condiciones de análisis de un espectrómetro de masas son de alto vacío, el flujo saliente de un equipo de UHPLC es de en torno a los 0.3 mL/min en la mayor parte de aplicaciones (del orden de 1 mL/min en HPLC), teniendo en cuenta que, una vez vaporizado, ese flujo puede multiplicarse por cientos de veces. Esto hace que, si se acoplasen directamente ambos equipos, el vapor proveniente de la fase móvil desbordaría las capacidades de extracción del sistema de vacío y provocaría errores de funcionamiento del instrumento. Por tanto, el acoplamiento LC-MS necesita un elemento de compatibilización que adapte la salida del cromatógrafo a las condiciones del espectrómetro de masas: una interfase.

La posibilidad de una interfase de ionización a presión atmosférica (API, *Atmospheric Pressure Ionization*) para el acoplamiento LC-MS se conoce desde los años 70, pero no es hasta finales de los 80 cuando comienzan a aparecer aplicaciones eficaces. Desde entonces, se han desarrollado diversos dispositivos, quedando los más antiguos obsoletos y apareciendo sistemas más eficientes y robustos.

De todos ellos, la interfase electrospray es una de las más utilizadas, tanto en tareas de rutina como en investigación. La ionización por electrospray (ESI, *ElectroSpray Ionization*) consiste en la aplicación de un alto campo eléctrico a la fase móvil saliente del cromatógrafo líquido, por medio de un capilar metálico, creando un *jet* de microgotas y bajo unas condiciones que provocan que estas gotas producidas sean desintegradas antes de introducirse en el espectrómetro de masas (*Figura 1.4*). Esta desintegración ocurre por dos efectos que se dan simultáneamente. Por una parte, el alto voltaje aplicado al capilar provoca que las microgotas creadas durante la nebulización adquieran un exceso de carga, positiva o negativa según el voltaje aplicado, por la que posteriormente competirán solventes y analitos. Contrario al flujo de fase móvil se posiciona un flujo de gas inerte a alta temperatura (normalmente nitrógeno) que evapora rápidamente los disolventes de la fase móvil. Esto hace que las especies cargadas se acumulen en la superficie de la gota debido a las fuerzas de repulsión electrostática y, o bien terminan en fase gas por expulsión y desolvatación de la gota, o bien la gota termina por colapsar por la repulsión de cargas, una vez ésta supera a las fuerzas cohesivas de tensión superficial. De esta forma, se obtiene una vaporización e ionización de los analitos de interés, ya sea por ionización directa o por transferencia de carga por parte de las moléculas cargadas generadas a partir de la propia fase móvil¹⁷.

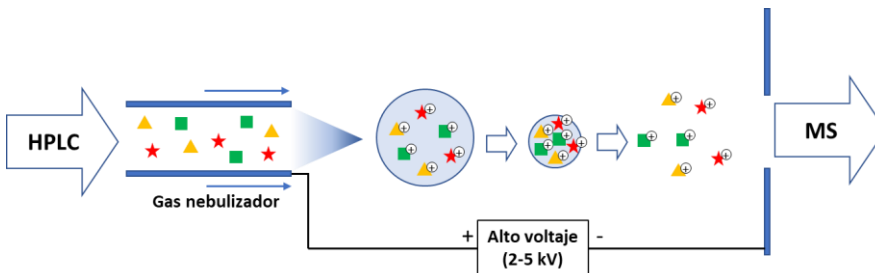


Figura 1.4. Mecanismo de desolvatación e ionización en interfaz electrospray (ESI).

Finalmente, el cono u orificio de entrada al espectrómetro de masas, que además se encarga de atraer y guiar los iones generados hacia el interior del instrumento, puede posicionarse en un ángulo perpendicular respecto al haz de iones generado en el electrospray para evitar la entrada excesiva de gases y especies neutras al interior del analizador. Esto se repite una segunda vez con un segundo cono de menor diámetro de entrada (Figura 1.5). De esta manera se consigue minimizar el ruido instrumental y una mayor robustez de las condiciones de vacío, ya que solamente las especies cargadas serán capaces de seguir la trayectoria en Z hasta el espectrómetro de masas.

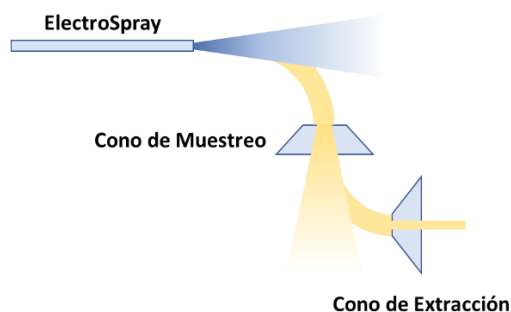


Figura 1.5. Disposición espacial en Z de los conos de muestreo y extracción para la eliminación de especies neutras.

1.3.5 Eliminación de especies neutras

El diseño de la interfase de los equipos de LC-MS están enfocados habitualmente a obtener la máxima transmisión de iones evitando en la medida de lo posible la entrada de sustancias neutras y/o gases provenientes de la fase móvil. No obstante, dado que el interior del analizador de masas se encuentra en condiciones de vacío, resulta inevitable que parte de esos interferentes sean succionados, lo cual causa problemas de interferencia y/o ruido instrumental al llegar al detector. Los fabricantes de equipos de LC-MS(/MS) atacan este problema de distintas formas.

Por una parte, el haz de iones puede desviarse previamente a su separación por relación m/z (y posterior fragmentación y selección de fragmentos en el caso de MS/MS) mediante lentes iónicas (*Figura 1.6*).

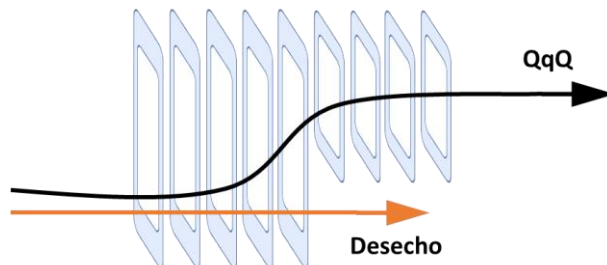


Figura 1.6. Eliminación de especies neutras por desvío del haz de iones.

Por otra parte, el propio diseño de la celda de colisión de un equipo de MS/MS puede hacer las veces de sistema de eliminación de neutros. Este diseño se basa en una celda de colisión en forma de U en la que las especies cargadas seleccionadas en el primer cuadrupolo son desviadas por el potencial eléctrico, a la vez que son aceleradas contra el gas de colisión. De esta manera se consigue tanto la fragmentación de iones precursores como la eliminación de neutros, ya que éstos siguen una trayectoria recta y pueden ser extraídos por el sistema de vacío (*Figura 1.7*).

En ambos casos, el fundamento reside en la modificación de la trayectoria de los iones mediante lentes iónicas y/o campos eléctricos, los cuales no afectan a las especies neutras. Por tanto, el haz de moléculas no cargadas sigue una trayectoria distinta (recta), permitiendo su separación en el espacio y su eliminación.

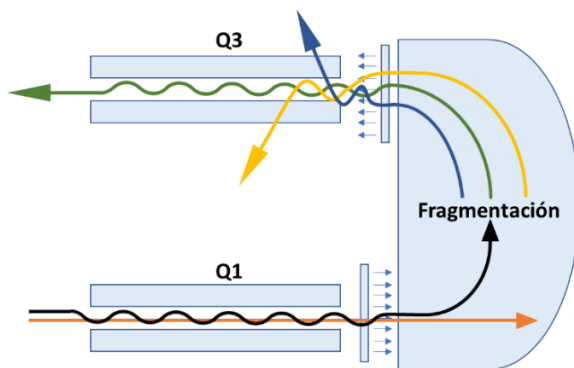


Figura 1.7. Esquema de celda de colisión en U con fragmentación y eliminación de especies neutras.

1.4 Espectrometría de masas de dilución isotópica

La técnica de Análisis por Dilución Isotópica (IDA, *Isotope Dilution Analysis*) es una técnica de análisis cuantitativo de elementos y moléculas. Esta técnica se desarrolla durante la década de 1950 a partir de los estudios de procesos químicos mediante trazadores radiactivos^{18,19}, donde se hace uso de la medida de la radiación emitida por el elemento radiactivo trazador tras su adición a la muestra para la determinación de compuestos tanto biológicos como inorgánicos.

Con el posterior desarrollo de la espectrometría de masas, el IDA se adapta a esta nueva forma de detección y desplaza el uso de la radioactividad como método de medida a un segundo plano, razón por la que el IDA se identifica habitualmente con el término Espectrometría de Masas de Dilución Isotópica (IDMS). Concretamente en IDMS, la dilución isotópica se basa en la alteración intencionada de las abundancias isotópicas naturales por la adición a la muestra de una cantidad conocida de un elemento enriquecido en uno de sus isótopos menos abundantes, llamado trazador o *spike*, tras lo cual se procede a la medida de las abundancias resultantes mediante espectrometría de masas²⁰⁻²².

Podemos visualizar este procedimiento con el siguiente ejemplo. Imaginemos que tenemos una bolsa con un número de canicas blancas que queremos determinar. Para ello añadimos un número conocido de canicas negras, por ejemplo 100, y agitamos la bolsa para que la mezcla sea lo más homogénea posible, con lo que conseguiríamos el *spike* de la muestra. Seguidamente, extraemos al azar diversos grupos pequeños de canicas y se observa (mide) la relación del número de canicas blancas y negras en cada grupo. Dado que se ha alcanzado la homogeneidad (o equilibrio isotópico en el caso de IDMS), la relación entre blancas y negras en los grupos pequeños será idéntico al de la bolsa. Por tanto, si observamos una relación de 1 canica negra por cada 9 blancas, sabiendo que el número total de canicas negras añadidas es de 100,

obtenemos que el número de canicas blancas que había originalmente en la bolsa es de 900.

Trasladando la misma idea al campo de IDMS para análisis elemental de un elemento con 2 isótopos estables, A y B, tenemos una muestra cuya abundancia natural de A es muy alta y que contiene una pequeña abundancia del isótopo B. A ésta se le añade una cantidad conocida de trazador que está enriquecido en el isótopo menos abundante, con lo cual la abundancia de B será mucho mayor que la de A. En la *Figura 1.8* se ilustran estos ejemplos además de la mezcla resultante de elemento natural y de trazador en proporción 1:1. Las abundancias resultantes son una combinación lineal de las abundancias en la muestra y trazador y serían los parámetros a medir en el espectrómetro de masas.

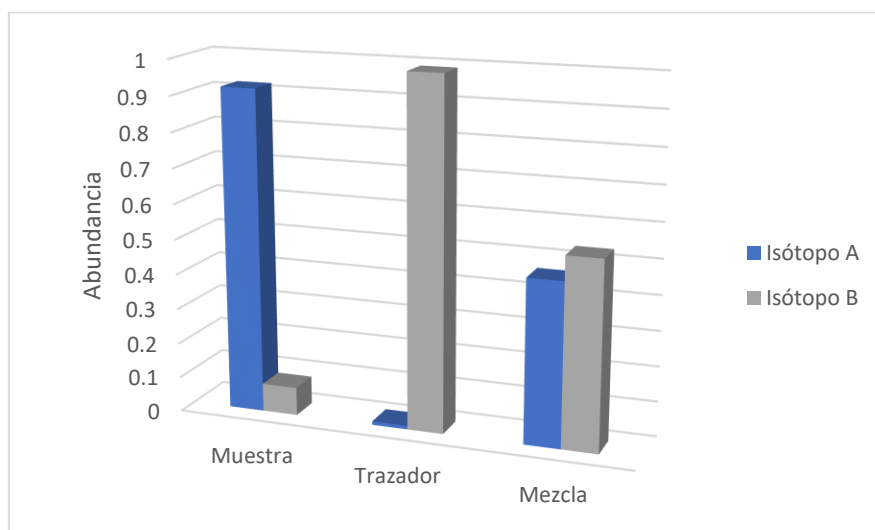


Figura 1.8. Abundancias isotópicas en muestra, trazador y mezcla en dilución isotópica.

Una vez alcanzado el equilibrio isotópico en la mezcla y dado que se miden relaciones de abundancia entre muestra y trazador, las posibles desviaciones debidas a extracciones no cuantitativas, o derivas instrumentales no afectan al resultado final. Por esta razón se considera IDMS como un método de cuantificación de alta calidad metrológica y, bajo determinadas condiciones, puede considerarse como un método

primario de análisis al ser trazable directamente el Sistema Internacional de Unidades²³.

Inicialmente, IDMS aplicada al análisis elemental se llevaba a cabo mediante la técnica de espectrometría de masas con ionización térmica (TIMS, *Thermal Ionization Mass Spectrometry*). En la actualidad ha sido sustituida por la espectrometría de masas con fuente de ionización de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*). Ésta se ha consolidado como la técnica predilecta para el análisis elemental de analitos inorgánicos y orgánicos, debido principalmente a la capacidad de obtener una alta exactitud a la vez que una reducción del tratamiento de muestra necesario previo al análisis²⁴. A partir de la década de 1970, con el desarrollo y la disponibilidad de instrumentos de espectrometría de masas acoplados a cromatografía de gases (GC-MS, *Gas Chromatography Mass Spectrometry*) se abrió la puerta al análisis de compuestos en lugar de elementos. Hoy en día, y tras la incorporación de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS, *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*), el rango de aplicaciones de IDMS se ha extendido enormemente. En esta modalidad se utilizan moléculas marcadas con isótopos pesados para modificar las abundancias naturales de la molécula completa en lugar de las abundancias elementales aisladas. Además, la creciente oferta de estos compuestos marcados permite que la diversidad de campos en los que puede utilizarse el análisis por IDMS no deje de crecer²⁵.

1.4.1 Isótopos y compuestos marcados isotópicamente

Los isótopos son átomos de un mismo elemento que, teniendo el mismo número atómico o número de protones, su número másico o masa atómica es distinta, es decir, contienen un número diferente de neutrones. Desde las primeras sospechas a principios del siglo XX de la existencia de isótopos, actualmente se conocen multitud de isótopos de la mayoría de elementos de la tabla periódica. Existen, sin embargo, unos cuantos casos como, por ejemplo, el flúor o el fósforo, con un único

isótopo estable de masa 19 y 31, respectivamente. De entre todos estos posibles isótopos de cada elemento distinguimos aquellos que son estables y se encuentran en la naturaleza en una proporción relativamente fija, y aquellos que no lo son y que suelen tener propiedades radioactivas. Los isótopos estables serán, por tanto, de gran interés para el análisis por IDMS debido a que no se degradan con el tiempo y no supondrán un riesgo por actividad radioactiva.

Tomando las abundancias isotópicas naturales como constantes fijas en la naturaleza, para una molécula dada con un alto número de átomos, ya sean carbonos, hidrógenos, oxígenos y/o nitrógenos –elementos más habituales en compuestos orgánicos–, existirá una alta probabilidad de encontrar átomos o isótopos pesados de dichos elementos en la molécula. Esto da lugar a una distribución de probabilidades o abundancias para masas superiores –y en ocasiones, inferiores– a la masa molecular correspondiente a la configuración con todos los elementos en su forma más abundante. En la *Figura 1.9* se representa la distribución de abundancias correspondiente a la molécula de testosterona, con fórmula molecular $C_{19}H_{28}O_2$ y masa nominal de 288 uma, en la que pueden observarse abundancias considerables para masas más altas. La primera de ellas, de 289, correspondería a la suma de probabilidades de encontrar en la molécula un isótopo pesado de carbono (^{13}C), de oxígeno (^{17}O) o de hidrógeno (2H), con un valor de 17.04%. Las sucesivas abundancias corresponden, pues, a la probabilidad de encontrar 2 o más isótopos pesados de estos elementos, por lo que su abundancia disminuye rápidamente. Este tipo de representaciones de abundancias puede calcularse a partir de las abundancias isotópicas naturales de los elementos en la naturaleza, tabuladas en manuales de constantes químicas y físicas actualizados anualmente²⁶.

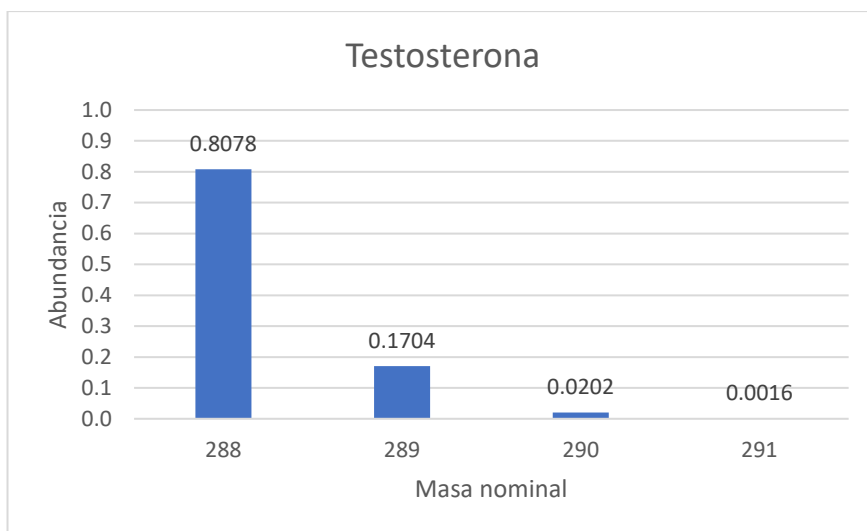


Figura 1.9. Abundancias isotópicas naturales de la molécula de testosterona.

Actualmente es posible obtener y adquirir trazadores enriquecidos en alguno de estos isótopos menos abundantes mediante procesos físicos a través de metodologías basadas directamente en la diferencia de pesos atómicos, en diferentes cinéticas de reacción debido a su diferente peso atómico o en otras propiedades. Uno de los métodos más utilizados es la separación por difusión gaseosa de CO_2 para obtener una fracción isotópicamente enriquecida en ^{13}C , en la que las moléculas más ligeras viajan más rápidamente y tienen más probabilidad de colisionar y difundir a través de una membrana porosa, proceso que se lleva a cabo en cascada para aumentar el rendimiento.

Existen multitud de métodos diseñados para obtener materiales enriquecidos de prácticamente cualquier elemento, a partir de los cuales es posible preparar compuestos específicos tanto inorgánicos como orgánicos. Estos últimos son de especial interés para la IDMS molecular, ya que permiten obtenerse compuestos enriquecidos en isótopos pesados, habitualmente ^{13}C y deuterio (^2H) pero también ^{15}N o ^{18}O , con la misma estructura pero distinto peso molecular y distribución de abundancias isotópicas²⁷. Estos compuestos marcados pueden utilizarse de distintas maneras, como veremos en la siguiente sección,

como patrones internos para corregir desviaciones en IDMS convencional, o como trazadores en IPD.

1.4.2 Modos de trabajo en IDMS

El acoplamiento de técnicas de separación a sistemas de detección basados en espectrometría de masas ha proporcionado vías para aplicar la técnica de dilución isotópica de distintas maneras dependiendo del momento y forma en que sea añadido el compuesto o elemento trazador a la muestra.

En los casos en los que no se conoce exactamente la estructura molecular del compuesto de interés o cuando el análogo marcado isotópicamente es difícil de obtener y/o sintetizar, se puede recurrir al método inespecífico de adición post-columna. Una vez separados los compuestos mediante la técnica cromatográfica adecuada, el flujo saliente se mezcla con un flujo constante de una disolución que contiene un compuesto trazador, previamente a la introducción en el espectrómetro de masas donde se miden las abundancias correspondientes. Este método requiere que no haya pérdidas de analito durante el proceso analítico antes de la mezcla con el trazador y que la mezcla sea completa y homogénea antes de alcanzar el detector. Además, requiere que el comportamiento de trazador y analito sea similar en términos de ionización y fragmentación o, incluso, que éstos sean independientes de la forma química original, como es en el caso de análisis por ICP-MS²⁷.

Contrariamente, cuando los analitos son conocidos y sus análogos marcados se pueden obtener comercialmente o sintetizar en el propio laboratorio, es preferible recurrir a la dilución isotópica específica. En este tipo de aplicación es necesaria la mezcla completa de trazador y analito antes de comenzar el proceso analítico y que durante éste no haya diferencias significativas de comportamiento debido al marcaje isotópico, llamado efecto isotópico. Este puede producir diferentes eficiencias de extracción o diferente separación cromatográfica que puede conllevar

diferente efecto matriz en la fuente de ionización (especialmente relevante en cromatografía acoplada a espectrometría de masas molecular). Si se cumplen estos requisitos²⁸, el método específico es capaz de, una vez alcanzado el equilibrio isotópico, corregir todas las posibles pérdidas de analito por el tratamiento de muestra y la deriva instrumental. En análisis elemental y de especiación, pueden emplearse más de un trazador enriquecido en distintos isótopos poco comunes (trazadores múltiples), que además pueden encontrarse en diferentes estados de oxidación, para la determinación de varios analitos o especies simultáneamente. Otra aproximación al IDMS elemental es el método inespecífico en el cual se determinan varias especies de un mismo elemento con un solo marcador, o bien un elemento distinto.

Si bien estos dos modos son los más habituales en determinaciones elementales y de especiación, también son extrapolables y aplicables a análisis orgánico²⁹. Mientras el modo inespecífico puede ser utilizado para estudios de efecto matriz³⁰, el modo específico se traduce en la dilución isotópica de compuestos orgánicos, que presenta a su vez diversos modos de trabajo posibles.

El uso de compuestos marcados isotópicamente para la cuantificación de analitos orgánicos supone la utilización de compuestos análogos a los compuestos de interés, lo que los convierte en los patrones internos ideales. Si no se presentan efectos isotópicos, los cuales pueden aparecer al utilizar compuestos marcados con un número elevado de deuterios³¹, el comportamiento de analito y patrón interno durante el proceso analítico, separación cromatográfica y detección es idéntico. Por lo tanto, la medida de áreas de pico cromatográfico de los estándares utilizados en la curva de calibrado puede ser estandarizada con respecto al área medida para una cantidad constante de patrón interno y basarse en medidas relativas, dando como resultado una corrección de las posibles desviaciones durante todo el proceso. Se trata, pues, de una metodología basada en IDMS y curva de calibrado con patrón interno específico marcado isotópicamente.

Una posibilidad de minimizar el efecto isotópico es utilizar compuestos marcados con un número mínimo de isótopos pesados (*minimal labelling*). Desafortunadamente, en estos casos de marcaje escaso, el patrón de abundancias de los clústeres de los iones precursores o fragmentos pueden solaparse. Es decir, la probabilidad de encontrar iones del compuesto natural con masas +1, +2, +3, etc. es suficientemente alta como para solaparse con el clúster del compuesto marcado, por ejemplo, si éste está marcado con 2 o con 3 deuterios (masas +2 y +3 con respecto al ion más abundante del compuesto natural). Esto produce una curvatura del calibrado a concentraciones altas de estándar natural con respecto al patrón interno por solapamiento (*Figura 1.10*)³².

Cuando esto ocurre, es posible o bien recurrir a un ajuste del tipo polinómico o a la deconvolución de dicho solapamiento, es decir, averiguar matemáticamente la contribución de cada compuesto (natural y marcado) a la distribución de abundancias de la mezcla. Esta es precisamente la solución que contempla la metodología de cálculo IPD que se detalla más adelante.

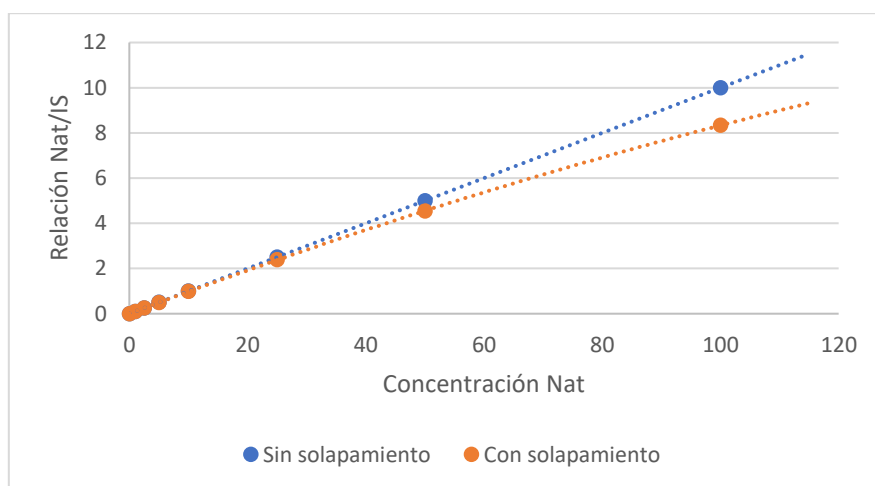


Figura 1.10. Curvatura de la línea de calibrado debida al solapamiento espectral entre los compuestos natural y marcado.

1.4.3 Selección del patrón interno

Como se ha visto, el objetivo principal de la utilización de patrones internos es la de corregir errores derivados de las posibles desviaciones de señal instrumental debida a la deriva o al efecto matriz, y también cualquier pérdida de analito durante el tratamiento de muestra. Por tanto, hay una serie de cuestiones que hay que tener en cuenta a la hora de seleccionar los compuestos marcados para que cumplan la función de patrones internos de forma efectiva.

En términos generales, el comportamiento del compuesto marcado ha de ser idéntico al del compuesto natural. Esto implica que ha de ser extraído en la misma cantidad que el natural en los procesos de tratamiento de muestra, así como no verse afectado de forma distinta frente a las condiciones químicas (pH, solvatación, derivatización, etc.) y co-eluir al mismo tiempo de retención (para evitar distintas condiciones de ionización por efecto matriz al llegar a la interfase del espectrómetro de masas).

En el ámbito de análisis de biomoléculas, y gran parte de los compuestos orgánicos, encontramos átomos de elementos como hidrógeno, carbono y heteroátomos de oxígeno, nitrógeno u otros susceptibles de ser sustituidos por un marcaje isotópico. Mientras que el marcaje con deuterio (^2H) es el más extendido, dado su menor coste y baja dificultad de síntesis a nivel de laboratorio, también es el que puede presentar más problemas, especialmente por diferencias en el tiempo de retención en cromatografía líquida. Una opción sencilla y general para evitar cualquier problema derivado de la presencia de isótopos pesados es el uso de marcajes con un número reducido de ellos. Sin embargo, como ya se ha comentado, este marcaje mínimo (*minimal labelling*) puede resultar contraproducente en las aplicaciones de IDMS que hacen uso de curvas de calibrado debido a solapamientos en el espectro de masa.

Otra cuestión a tener en cuenta al hacer uso de patrones internos con deuterio es la estabilidad del marcaje. Muchos de los materiales

disponibles comercialmente son preparados por sustitución de hidrógenos lábiles de la molécula natural por intercambio con un solvente prótico enriquecido con deuterio. Esta misma reacción, en sentido inverso, puede ocurrir de manera no controlada durante las etapas de tratamiento de muestra y la ionización o fragmentación en el espectrómetro de masas. Si se pierde así el marcaje isotópico, o se modifica, el resultado deja de ser reproducible y, por tanto, fiable. Este efecto también puede ocurrir en marcajes con ^{18}O si éste está situado en un hidroxilo lábil intercambiable con moléculas de agua del medio. Una forma de evitar este problema es el uso de ^{13}C en la estructura molecular como isótopo marcador.

Por último, además de la disponibilidad de ser intercambiado o que sufra reacciones indeseadas durante el proceso de tratamiento de muestra, la posición de marcado también es importante durante la fragmentación de los iones precursores en espectrometría de masas en tándem. Durante la fragmentación, es posible que algunos –o todos– los isótopos marcados se pierdan como parte de los fragmentos neutros, pudiendo dar lugar a solapamientos espectrales de iones producto. Si bien esto no es necesariamente un problema, sí es necesario su estudio y caracterización^{33,34}.

1.4.4 Ecuaciones básicas de IDMS

Partiendo del ejemplo expuesto en la *Figura 1.8*, en el que se tiene un compuesto natural mezclado con una cantidad de compuesto trazador, enriquecido con un isótopo poco abundante en el natural, se puede hacer el siguiente balance del número de moles:

$$N_m = N_s + N_t \text{ (Ec. 1)}$$

donde N_m es el número total de moles en la mezcla, N_s es el número de moles de compuesto natural originalmente en la muestra y N_t el número de moles de trazador añadido.

Si este mismo balance se aplica a los dos isótopos, a y b , se obtiene:

$$N_m^a = N_s^a + N_t^a \text{ (Ec. 2)}$$

$$N_m^b = N_s^b + N_t^b \text{ (Ec. 3)}$$

Seguidamente, dividiendo ambas expresiones se obtiene la relación de moles entre el isótopo a y el b , R_m :

$$R_m = \frac{N_m^a}{N_m^b} = \frac{N_s^a + N_t^a}{N_s^b + N_t^b} \text{ (Ec. 4)}$$

Finalmente, se introducen las abundancias de ambos isótopos sustituyendo los términos N_i^j por $N_i \cdot A_i^j$:

$$R_m = \frac{N_s A_s^a + N_t A_t^a}{N_s A_s^b + N_t A_t^b} \text{ (Ec. 5)}$$

Y, resolviendo para el número de moles en la muestra, N_s :

$$N_s = N_t \frac{R_m A_t^b - A_t^a}{A_s^a - R_m A_s^b} \text{ (Ec. 6)}$$

Esta última ecuación es la forma más sencilla de expresar el análisis por dilución isotópica. Fue desarrollada inicialmente para análisis elemental pero su uso se puede extender a la cuantificación de compuestos moleculares. Para ello se debe calcular o medir experimentalmente la composición isotópica del compuesto molecular (natural y marcado) de manera exacta y se debe comprobar la ausencia de efecto isotópico. Conociendo las abundancias de cada isotópologo^a tanto en la muestra (abundancias naturales) como en el compuesto trazador, y sabiendo con exactitud el número de moles añadidos a la muestra, el cálculo del número de moles originalmente en la muestra solo requiere la medida experimental de la relación isotópica en la mezcla.

^a Entidad molecular que difiere solamente en la composición isotópica (número de sustituciones isotópicas)³⁵.

La Ecuación 6 se puede expresar en términos de concentración y relaciones de abundancias definiendo la relación de abundancias isotópicas en la muestra, $R_s = \frac{A_s^b}{A_s^a}$, y en el trazador, $R_t = \frac{A_t^a}{A_t^b}$; así como transformando el número de moles según $N_i = \frac{C_i \cdot m_i}{M_i}$, donde C_i es la concentración, m_i es la masa y M_i la masa molecular. La ecuación puede expresarse más comúnmente como:

$$C_s = C_t \cdot \frac{m_t}{m_s} \cdot \frac{M_s}{M_t} \cdot \frac{A_t^b}{A_s^a} \cdot \left(\frac{R_m - R_t}{1 - R_m \cdot R_s} \right) \text{ (Ec. 7)}$$

Como puede observarse, todos los parámetros son conocidos de antemano a excepción de la relación de abundancias en la mezcla R_m , que es precisamente la incógnita a determinar mediante espectrometría de masas. De esta manera, IDMS proporciona una manera de obtener un resultado de concentración a partir de una sola medida instrumental de relación de abundancias. Adicionalmente, al no aparecer parámetros relativos a la sensibilidad instrumental como en el caso de calibrado externo o adiciones estándar, se corrigen las posibles inestabilidades de señal instrumental o efectos de deriva de señal que afectarían al resultado final de concentración.

1.4.5 Deconvolución de perfiles isotópicos

Las metodologías de cuantificación que han sido expuestas hasta el momento conllevan el uso de sólo dos isotopólogos de un determinado compuesto. Sin embargo, es posible utilizar un número mayor e incluso hacer uso del perfil isotópico completo mediante la metodología conocida como Deconvolución de Perfiles Isotópicos (IPD). El perfil isotópico de un compuesto es el conjunto de abundancias relativas de todos los isotopólogos de dicho compuesto. La metodología IPD permite solapamientos en el espectro de masas y no depende de la preparación de curvas de calibrado. Es una herramienta quimiométrica basada en regresión lineal multivariante que descompone el perfil isotópico de una

mezcla en las contribuciones individuales del compuesto natural y del marcado. Tras la medida de abundancias en la mezcla, IPD proporciona la fracción molar de cada compuesto y, conociendo la cantidad de trazador añadido, se calcula la concentración de analito de interés en la muestra.

Como se ha comentado anteriormente, en IDMS se produce una alteración de las abundancias isotópicas naturales de un analito en una muestra por adición de un compuesto análogo marcado con uno o varios isótopos pesados. Estas abundancias modificadas son una combinación lineal de las abundancias de ambos compuestos.

Siguiendo el desarrollo matemático de la sección anterior para una muestra fortificada con un trazador, habrá dos perfiles isotópicos de un mismo compuesto. Por tanto, el número de moles en la mezcla (N_m) es la suma de compuesto natural o analito (N_{nat}) y de su análogo marcado (N_{lab}):

$$N_m = N_{nat} + N_{lab} \text{ (Ec. 8)}$$

En el caso de compuestos orgánicos que son ionizados y detectados en un espectrómetro de masas, tenemos la medida de intensidad de la relación masa/carga (m/z) de cada ion del clúster molecular o de los correspondientes a algún clúster de transiciones si se opera en modo de masas en tándem. De esta manera, aplicando un balance similar para todos los valores de relación m/z obtenidos y optimizados en el instrumento, obtenemos la siguiente expresión para cada uno de los iones o transiciones:

$$N_m^i = N_{nat}^i + N_{lab}^i \text{ (Ec. 9)}$$

Sustituyendo de la misma forma que en la ecuación 5 obtenemos:

$$N_m \cdot A_m^i = N_{nat} \cdot A_{nat}^i + N_{lab} \cdot A_{lab}^i \text{ (Ec. 10)}$$

Donde A_m^i , A_{nat}^i y A_{lab}^i son las abundancias relativas de la señal m/z i en la mezcla, compuesto natural y compuesto marcado respectivamente.

Luego, dividiendo las ecuaciones 8 y 9 y haciendo uso de las fracciones molares de cada compuesto:

$$x_{nat} = \frac{N_{nat}}{N_{nat} + N_{lab}}$$

y

$$x_{lab} = \frac{N_{lab}}{N_{nat} + N_{lab}}$$

Se obtiene la siguiente expresión para cada valor de m/z :

$$A_m^i = x_{nat} \cdot A_{nat}^i + x_{lab} \cdot A_{lab}^i \text{ (Ec.11)}$$

Esta última ecuación puede extenderse a todos los valores optimizados de relación m/z y expresarse en notación matricial.

$$\begin{bmatrix} A_m^1 \\ A_m^2 \\ \vdots \\ A_m^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^1 & A_{lab}^1 \\ A_{nat}^2 & A_{lab}^2 \\ \vdots & \vdots \\ A_{nat}^n & A_{lab}^n \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_{nat} \\ x_{lab} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ \vdots \\ e^n \end{bmatrix} \text{ (Ec. 12)}$$

Donde los valores de 1 a n corresponden a los valores de m/z –o transiciones en el caso de MS/MS– seleccionados y medidos. Además, se incluye un vector error, debido a que se tienen más parámetros (abundancias a cada m/z) que incógnitas (fracciones molares, x_i). Los valores de fracciones molares que corresponden a la distribución de abundancias isotópicas medidas en la mezcla se calculan mediante regresión lineal multivariante por minimización del vector error e . Es decir, se calcula la proporción de compuesto natural y marcado que produce el perfil de la mezcla por combinación lineal de los perfiles individuales y conocidos de ambos compuestos. Este cálculo puede realizarse de forma sencilla en cualquier programa de cálculo (por ejemplo, con la fórmula “Regresión lineal” de Excel en forma matricial). Finalmente, una vez obtenidas las fracciones molares y dado que la cantidad de compuesto

marcado o trazador es conocida, basta con aplicar la siguiente fórmula para obtener el número de moles de analito en la muestra.

$$N_{nat} = N_{lab} \cdot \frac{x_{nat}}{x_{lab}} \text{ (Ec. 13)}$$

Todo este proceso puede visualizarse de manera gráfica según la *Figura 1.11* a continuación.

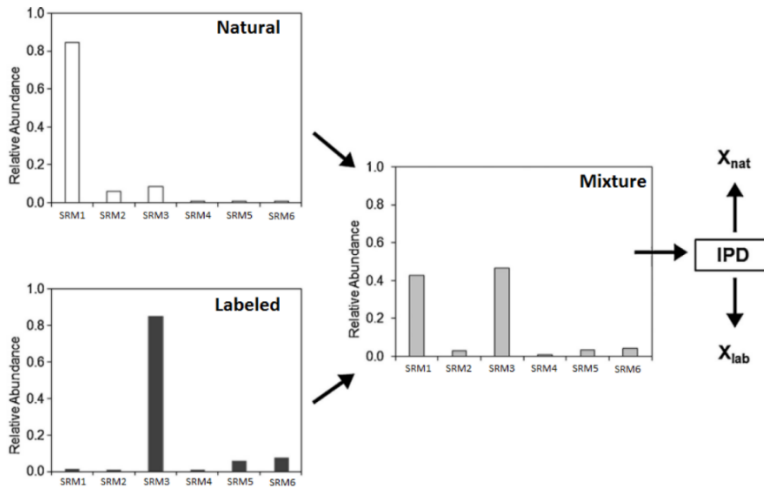


Figura 1.11. Esquema del método IPD. Las fracciones molares se obtienen matemáticamente a partir de las abundancias medidas en la mezcla (derecha), conociendo las abundancias de los compuestos natural y marcado (izquierda).

1.4.6 Matriz de referencia

Como se ha visto en la sección previa, el cálculo por IPD requiere el conocimiento *a priori* de la distribución de abundancias de los compuestos natural y marcado, lo que se conoce como “matriz de referencia” debido a su disposición y uso en forma matricial en la *Ecuación 11*. Existen dos maneras diferentes de obtener esta matriz de referencia, o bien por la vía teórica o bien por la vía experimental.

La matriz de referencia puede obtenerse por cálculos teóricos teniendo en cuenta qué elementos forman una molécula determinada, el número de átomos de cada elemento presente en la misma y haciendo uso de los datos de abundancias isotópicas naturales tabuladas por la IUPAC³⁶. Por otra parte, en el caso de compuestos marcados isotópicamente es necesario conocer el porcentaje de marcado isotópico, que puede venir dado en el certificado comercial o determinarse de manera experimental, como se explica en capítulos posteriores.

Es importante remarcar que los materiales marcados isotópicamente están habitualmente enfocados al uso como patrones internos en calibrados, en cuyo caso no resulta necesario conocer de manera exacta ni su concentración ni el porcentaje de marcado. Ninguno de los dos datos afecta al resultado final ya que solamente es necesario que la cantidad de patrón interno sea constante en cada punto del calibrado. Por eso, en la mayoría de casos no se proporciona una concentración certificada y el valor de marcaje es aproximado. Sin embargo, para el cálculo teórico de las abundancias de la matriz de referencia, necesaria en la metodología IPD, es imprescindible conocer exactamente este valor de porcentaje de marcado.

Cabe tener en cuenta además que la obtención de la distribución de abundancias mediante analizadores de masa tipo cuadrupolo se lleva a cabo con poder de resolución próximo a una uma. Así, las señales obtenidas no corresponden a especies isotópicamente puras, sino a la combinación de isotopólogos de la molécula. Por ejemplo, para una molécula como la anfetamina, de peso molecular nominal 135 uma ($C_9H_{13}N$), se tiene un isotopólogo de mayor abundancia correspondiente a la configuración que contiene los isótopos más ligeros de todos sus elementos, siendo la única posibilidad. Ahora bien, atendiendo al perfil isotópico que se extiende hacia masas más altas, para la siguiente masa correspondiente a 136 (M+1), la abundancia obtenida será la combinación de probabilidad de que en la molécula haya un átomo pesado de ^{13}C , 2H o ^{15}N . Igualmente, para el M+2, su abundancia será combinación de

probabilidades de que en la molécula se encuentren 2 isótopos pesados de cualquiera de sus elementos. Esto hace que el cálculo de abundancias teóricas sea más complicado, ya que tanto los iones precursores como los iones producto presentan esta peculiaridad, frente al análisis por IDMS elemental.

El cálculo de las abundancias de referencia puede llevarse a cabo mediante programas especializados como *IsoPatrn*³⁷, que permite el cálculo de perfiles isotópicos naturales y de compuestos marcados tanto para espectrometría de masas simple como en tándem, indicando las fórmulas moleculares de iones precursor y producto y el porcentaje de marcado.

Por último, la matriz de referencia calculada de esta manera requiere comprobar que durante la medida experimental de las abundancias de la mezcla no se produzcan interferencias espectrales, o si se producen, corregirlas. Se entiende por interferencia espectral el solapamiento de clústeres isotópicos provenientes de las especies $[M\pm xH]^+$ que puedan producir iones de la misma masa que las de interés. Es decir, que iones producto con distinto número de hidrógenos tenga suficiente abundancia como para interferir las transiciones seleccionadas para el análisis de muestras. La existencia de este fenómeno puede comprobarse en las primeras fases del desarrollo del método analítico y tenerlas en cuenta en la construcción de la matriz de referencia por combinación lineal de las especies involucradas.

Alternativamente, la distribución de abundancias de ambos compuestos puede ser determinado experimentalmente mediante espectrometría de masas. De esta manera se evita la necesidad de certificar exhaustivamente el porcentaje de marcaje o la presencia o no de interferencias espectrales ya que, al utilizar datos experimentalmente medidos, todos estos efectos ya están ocurriendo y teniéndose en cuenta. Sin embargo, es necesario seleccionar adecuadamente y medir todas las posibles transiciones producidas por la fragmentación de cada ión del clúster precursor ya que, si la medida fuese incompleta, se produciría una desviación de las

abundancias con respecto a las reales. Esto es debido a que las áreas o intensidades medidas han de normalizarse con respecto a la suma de todas ellas para obtener las respectivas abundancias de cada masa o transición y, dejar alguna sin medir o incluir una que no pertenezca al clúster introduciría un error sistemático en toda la distribución de abundancias.

1.4.7 Dilución isotópica inversa

Por último, pero no menos importante, el análisis por IPD requiere la completa caracterización de las disoluciones o materiales utilizados que contengan el compuesto marcado. Como se acaba de comentar, esta caracterización implica tanto el porcentaje de marcado como la concentración exacta de compuesto. Es imperativo, pues, certificar la concentración de disoluciones estándar de compuesto marcado mediante lo que se conoce como dilución isotópica inversa (RID, *Reverse Isotope Dilution*).

El análisis por RID implica la cuantificación de la cantidad de compuesto marcado en una disolución determinada por IPD utilizando un material de referencia certificado del compuesto natural de interés, de ahí la denominación “inversa”. Como se ha comentado, la exhaustividad de certificación de los compuestos marcados comerciales es habitualmente menos precisa que la de los estándares naturales, por lo que realizar este tipo de certificación en el propio laboratorio proporciona una mejora sustancial de la calidad de los resultados analíticos obtenidos.

Por otra parte, si el compuesto marcado no está disponible comercialmente y ha debido sintetizarse, este paso es imprescindible para conocer con exactitud la pureza y concentración de las disoluciones trazadoras.

1.5 Validación de métodos analíticos

El desarrollo de cualquier metodología analítica debe incluir una etapa de validación o verificación del buen funcionamiento del método para el tipo de muestras y concentración para los que fue concebido. Esta etapa de validación permite comprobar que la información analítica obtenida sea fiable y cumpla con unos requisitos previamente establecidos. Según el tipo de analitos, tipo de muestras o campos de aplicación, existen numerosas guías o normativas de validación que rigen estos requisitos, las cuales se actualizan y amplían periódicamente. De todas ellas, las más relevantes para la presente tesis han sido la regulación emitida por la Comisión Europea que define y establece las metodologías de validación de métodos analíticos en términos generales³⁸, la guía SANTE que regula el análisis de pesticidas en productos alimentarios³⁹ y la guía de validación de métodos bioanalíticos de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, *European Medicines Agency*)⁴⁰.

De forma ideal, la validación de los métodos analíticos debe realizarse mediante su aplicación al análisis de materiales de referencia certificados (CRM, *Certified Reference Materials*). Los CRM son muestras que contienen unas cantidades perfectamente definidas de los analitos de interés, ya sea por adición de los mismos o por presencia natural, pero en todo caso sus concentraciones vienen determinadas y certificadas mediante complejos y extensos análisis inter-laboratorio por instituciones de prestigio. Mediante la aplicación del método a validar sobre los CRM, se comparan los resultados con los valores certificados para determinar la fiabilidad del método.

Dada la amplia variedad de compuestos orgánicos susceptibles de ser de interés analítico, y de la variedad de tipos de muestra en la que pueden encontrarse, la disponibilidad de CRM en análisis orgánico es limitada. Por ello, en los casos en los que no existe un CRM para la combinación muestra-analito del método, se puede recurrir a estudios de fortificación. Esto consiste en la adición de cantidades conocidas de analitos sobre una

muestra idealmente blanca, es decir, que no contenga ya estos analitos, y realizar la validación sobre ellas.

Tanto si se utilizan CRM como si se trata de estudios de fortificación, los parámetros a validar son los mismos. Por una parte, la exactitud y precisión del método es estudiado en experimentos de repetibilidad (réplicas realizadas en el mismo día) y de reproducibilidad (realizados en días distintos), con no menos de 3 replicados y a diferentes niveles de concentración. Además, se debe incluir estudios de linealidad cuando se emplean rectas de calibrado para la cuantificación. Por el contrario, dado que en IPD no se hacen uso de calibrados, este paso no es aplicable, pero sí lo es el establecer y determinar correctamente la cantidad de trazador añadida a las muestras. En estos experimentos también pueden establecerse los límites de detección (LOD, *Limit of Detection*) y de cuantificación (LOQ, *Limit of Quantification*) del método, es decir las cantidades mínimas de analito a partir de las cuales puede afirmarse la presencia o asegurar la determinación del analito, respectivamente.

Adicionalmente, algunas guías incluyen el estudio del efecto matriz, es decir, la supresión o enaltecimiento de la señal analítica debido a la presencia de compuestos provenientes de la muestra. Este paso es obligatorio en métodos que no hacen uso de patrones internos para corregir la señal analítica, pero también puede ser necesario aun cuando sí se utilizan en los métodos para muestras de especial complejidad. En estos casos, es recomendable la comprobación de la eficacia de los patrones internos para corregir esos efectos matriz. Otros parámetros que pueden incluirse en la validación de métodos son la robustez (eficacia del método bajo condiciones experimentales distintas), efectos de dilución de muestra, efecto memoria o estabilidad.

Finalmente, los estudios de validación realizados en el laboratorio pueden extenderse a estudios inter-laboratorio para corroborar los resultados. Esto consiste en el análisis de muestras por diferentes laboratorios y diferente personal con el fin de comparar los resultados obtenidos, bien

por aplicación de los métodos propios establecidos en cada laboratorio, bien por aplicación del nuevo método desarrollado en cada laboratorio participante.

1.5.1 Incertidumbre analítica

Al reportar un resultado analítico, y en general cualquier medida de una magnitud física, es necesario indicar de alguna forma la calidad de dicho valor. Es decir, es necesario indicar el rango de valores en el que existe una alta probabilidad de encontrarse el valor verdadero mediante el estudio de la incertidumbre asociada a la propia medida.

Se entiende por incertidumbre al parámetro de dispersión de un resultado, el cual engloba a su vez los errores asociados a las medidas y etapas que llevan a dicho resultado. Si bien el concepto de error analítico ha estado presente en el desarrollo de la ciencia, la idea de incertidumbre cuantificable es relativamente nueva. Esta evaluación de la incertidumbre de un resultado permite la comparación de la calidad de resultados obtenidos mediante distintas metodologías, comparación entre laboratorios o determinación de las etapas clave de un método analítico.

Por este motivo, numerosas organizaciones oficiales han publicado guías para estandarizar la evaluación de la incertidumbre y la forma de reportar resultados. Por relevancia para la presente tesis, cabe destacar la Guía para la Expresión de Medidas de la JCGM (*Joint Committee for Guides in Metrology*)⁴¹ que reúne los esfuerzos de 8 organizaciones^b, la guía de análisis de sustancias reguladas por la WADA⁴² o la guía de cuantificación de incertidumbre en medidas analíticas emitida por EURACHEM/CITAC⁴³.

^b Bureau International des Poids et Mesures (BIPM), International Electrotechnical Commission (IEC), International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC), International Organization for Standardization (ISO), International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), International Union of Pure and Applied Physics (IUPAP), International Organization of Legal Metrology (OIML).

Las fuentes de incertidumbre en una determinación analítica pueden ser muchas y muy diversas. Algunas desviaciones pueden estar causadas por una incompleta definición del parámetro a medir, de deficiencias en la etapa de muestreo o de condiciones ambientales que afectasen tanto a muestras como a estándares y equipos. Por su parte, la propia medida experimental, incluyendo tratamiento de muestra y determinación instrumental, añade incertidumbre al resultado final. Si bien todos estos aspectos pueden comprenderse y minimizarse durante la etapa de desarrollo de métodos, hay que tener en cuenta que también existe una variabilidad aleatoria imposible de eliminar y que aporta cierta incertidumbre en todas las etapas.

La manera más habitual y extendida de expresar un valor de incertidumbre es mediante la incertidumbre estándar (u_{SD}), expresada como la desviación estándar de cierto número de experimentos o réplicas de muestras. Esta es la manera más sencilla e incompleta de evaluación de incertidumbre, ya que no tiene en cuenta la propagación de errores por cada paso del método.

Para obtener una mejor estimación de la incertidumbre se puede recurrir a la expresión de la incertidumbre estándar combinada (u_c o u_{comb}), calculada como la raíz de la suma cuadrática de todas las componentes de la incertidumbre:

$$u_{comb} = \sqrt{\sum u_i^2} \text{ (Ec. 14)}$$

Sin embargo, a pesar de que estas dos aproximaciones son útiles para la mayoría de aplicaciones analíticas, la mejor y más completa estimación de la incertidumbre de un método es mediante el cálculo de la incertidumbre expandida (U). Ésta se obtiene por multiplicación de la incertidumbre combinada por un factor de cobertura (k), determinado por el nivel de confianza deseado. Por ejemplo, para un nivel de confianza del 95% (probabilidad de que el valor real se encuentre dentro del rango determinado por la incertidumbre expresada), k tiene un valor de 1.96.

Según la importancia que se le dé a la incertidumbre en cada situación particular, el nivel de confianza se establece normalmente en 95% para la mayor parte de aplicaciones, y del 99% ($k = 2.58$) para casos críticos.

$$U = k \cdot u_{comb} \text{ (Ec. 15)}$$

Estas expresiones de incertidumbre son las más extendidas, por simplicidad y cobertura de necesidades en la expresión de resultados analíticos. En el siguiente capítulo se detalla otra metodología más extensa en la evaluación de las fuentes de error y de cálculo de incertidumbres.

1.6 Bibliografía

1. Yesalis CE, Bahrke MS. History of doping in sport. *Int Sport Stud.* 2002;24(1):42-76.
<http://library.la84.org/SportsLibrary/ISS/ISS2401/ISS2401e.pdf>.
2. Wilson JD, Griffin JE. The use and misuse of androgens. *Metabolism.* 1980;29(12):1278-1295. doi:10.1016/0026-0495(80)90159-6
3. Brower KJ. Anabolic steroid abuse and dependence. *Curr Psychiatry Rep.* 2002;4(5):377-387. doi:10.1007/s11920-002-0086-6
4. McCann UD, Lowe KA, Ricaurte GA. Long-lasting Effects of Recreational Drugs of Abuse on the Central Nervous System. *Neurosci.* 1997;3(6):399-411. doi:10.1177/107385849700300613
5. Appendino G, Minassi A, Taglialatela-Scafati O. Recreational drug discovery: natural products as lead structures for the synthesis of smart drugs. *Nat Prod Rep.* 2014;31(7):880. doi:10.1039/c4np00010b
6. Sjöqvist F, Garle M, Rane A. Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society. *Lancet.* 2008;371(9627):1872-1882. doi:10.1016/S0140-6736(08)60801-6
7. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. Naturaleza de la química analítica. In: *Fundamentos de Química Analítica.* 9ª Edición. Cengage Learning; 2015.
8. Gross JH. Principles of Ionization and Ion Dissociation. In: *Mass Spectrometry.* 2nd Editio. Springer Berlin Heidelberg; 2011.
9. Ahuja S, Jespersen N. Sampling and sample preparation. In: *Comprehensive Analytical Chemistry (Book 47).* Elsevier; 2006.
10. Ramos L. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. *J Chromatogr A.* 2012;1221:84-98. doi:10.1016/j.chroma.2011.11.011

11. Baird D. Analytical chemistry and the 'big' scientific instrumentation revolution. *Ann Sci.* 1993;50(3):267-290. doi:10.1080/00033799300200221
12. Skoog DA, Crouch SR, Holler FJ, Anzures MB. Cromatografía de líquidos. In: *Principios de Análisis Instrumental*. 6ª Edición. Cengage Learning; 2007.
13. Lough WJ, Wainer IW. Modes of chromatography. In: *High Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice*. CRC Press; 1995.
14. Guillarme D, Veuthey J-L. General Overview of Fast and High-resolution Approaches in Liquid Chromatography. In: *UHPLC in Life Sciences*. Royal Society of Chemistry; 2015.
15. Hayes R, Ahmed A, Edge T, Zhang H. Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2014;1357:36-52. doi:10.1016/j.chroma.2014.05.010
16. Gross JH. Introduction. In: *Mass Spectrometry*. Springer Berlin Heidelberg; 2011.
17. Niessen WMA. Atmospheric-pressure ionization. In: *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*. 3rd Editio. Taylor & Francis Group; 2006.
18. Garrett AB. Radioactive tracers: George de Hevesy. *J Chem Educ.* 1963;40(1):36. doi:10.1021/ed040p36
19. Rosenblum C. Principles of Isotope Dilution Assays. *Anal Chem.* 1957;29(12):1740-1744. doi:10.1021/ac60132a021
20. Rodríguez-González P, Marchante-Gayón JM, García Alonso JI, Sanz-Medel A. Isotope dilution analysis for elemental speciation: a tutorial review. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc.* 2005;60(2):151-207. doi:10.1016/j.sab.2005.01.005
21. Lehmann WD. A timeline of stable isotopes and mass spectrometry in the life sciences. *Mass Spectrom Rev.* 2017;36(1):58-85. doi:10.1002/mas.21497

22. Mechlińska A, Wolska L, Namieśnik J, Wolska L. Isotope-labeled substances in analysis of persistent organic pollutants in environmental samples. *TrAC Trends Anal Chem.* 2010;29(8):820-831. doi:10.1016/j.trac.2010.04.011
23. García-Alonso JI, Rodríguez-González P. Introduction to isotope dilution mass spectrometry (IDMS). In: *Isotope Dilution Mass Spectrometry*. Royal Society of Chemistry; 2013:1-39.
24. Heumann KG. Isotope-dilution ICP-MS for trace element determination and speciation: from a reference method to a routine method? *Anal Bioanal Chem.* 2004;378(2):318-329. doi:10.1007/s00216-003-2325-z
25. Sargent. Guidelines for Achieving High Accuracy in Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS). In: Sargent M, Harte R, Harrington C, eds. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2007:1-34. doi:10.1039/9781847559302-00001
26. Rumble JR, ed. *Handbook of Chemistry and Physics*. 99th Ed. CRC Press; 2018.
27. Ignacio García Alonso J, Rodríguez P. La dilución isotópica en el análisis de trazas. In: Cámara C, Pérez-Conde C, eds. *Análisis Químico de Trazas*. Editorial Síntesis; 2011:224-277.
28. Meija J, Mester Z. Paradigms in isotope dilution mass spectrometry for elemental speciation analysis. *Anal Chim Acta.* 2008;607(2):115-125. doi:10.1016/j.aca.2007.11.050
29. Díaz SC, Encinar JR, Sanz-Medel A, Alonso JIG. Towards compound-independent calibration for organic compounds using online isotope dilution mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2012;402(1):91-97. doi:10.1007/s00216-011-5464-7
30. Stahnke H, Reemtsma T, Alder L. Compensation of Matrix Effects by Postcolumn Infusion of a Monitor Substance in Multiresidue Analysis with LC-MS/MS. *Anal Chem.* 2009;81(6):2185-2192. doi:10.1021/ac802362s

31. García-Alonso JI, Rodríguez-González P. Selection of isotopically enriched elements and isotopically labelled molecules. In: *Isotope Dilution Mass Spectrometry*. Royal Society of Chemistry; 2013:193-225.
32. García Alonso JI, Rodríguez-González P. IDMS Procedures and Calculation Methods. In: *Isotope Dilution Mass Spectrometry*. Royal Society of Chemistry; 2013.
33. Wang Q, Borotto NB, Håkansson K. Gas-Phase Hydrogen/Deuterium Scrambling in Negative-Ion Mode Tandem Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. February 2019. doi:10.1007/s13361-019-02143-4
34. Jørgensen TJD, Gårdsvoll H, Ploug M, Roepstorff P. Intramolecular Migration of Amide Hydrogens in Protonated Peptides upon Collisional Activation. *J Am Chem Soc*. 2005;127(8):2785-2793. doi:10.1021/ja043789c
35. Nic, M., Hovorka, L., Jirat, J., Kosata, B. and Znamenacek J. isotopologue. In: *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. Research Triangle Park, NC: IUPAC; 2005:1670. doi:10.1351/goldbook.I03351
36. Meija J, Coplen TB, Berglund M, et al. Isotopic compositions of the elements 2013 (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem*. 2016;88(3):293-306. doi:10.1515/pac-2015-0503
37. Ramaley L, Herrera LC. Software for the calculation of isotope patterns in tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2008;22(17):2707-2714. doi:10.1002/rcm.3668
38. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. 2002. <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/eur49615.pdf>.
39. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. SANTE/11813/2017. 2017. doi:10.13140/RG.2.2.33021.77283

40. European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. *EMA, Comm Med Prod Hum Use*. 2012;44(July 2011):1-23. doi:EMA/CHMP/EWP/192217/2009
41. Evaluation of measurement data — Guide to the Expression of Uncertainty of Measurement. *Clin Chem*. 2004;50(5):977-978. doi:10.1373/clinchem.2003.030528
42. World Anti-Doping Agency. WADA Technical Document – TD2018DL Decision Limits for the Confirmatory Quantification of Threshold Substances. 2018:1-18. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2018dl_v1_en.pdf.
43. Edition T. *EURACHEM/CITAC Guide CG 4; Quantifying Uncertainty in Analytical measurement, Third Edition.*; 2012.

CAPÍTULO 2

Determinación de esteroides en orina mediante IPD

2.1 Introducción

El uso de sustancias para la mejora de las capacidades humanas es un hecho que se conoce desde la antigüedad, desde extractos de plantas como elixires hasta el extendido uso de anfetaminas (estimulantes) por los soldados alemanes durante la Segunda Guerra Mundial. También en el deporte, sustancias estimulantes como la efedrina han sido utilizadas amplia y abiertamente durante largo tiempo. Hoy en día el uso de sustancias en el deporte está estrictamente prohibido y se conoce como “dopaje”, término acuñado por primera vez en 1889¹.

El dopaje comienza a regularse tentativamente con la prohibición de drogas estimulantes por parte de la Asociación Internacional de Federaciones de Atletismo (IAAF, *International Association of Athletics Federations*) en 1928, con pobres resultados. Es en 1960 cuando el dopaje adquiere una visibilidad notable con la muerte televisada de un ciclista en plena competición durante los Juegos Olímpicos de Roma², cuya investigación sacó a la luz un amplio y rampante uso de sustancias dopantes en el mundo del deporte. Este hecho sería el motor para la creación de una Comisión Médica (MC, *Medical Commission*) por parte del Comité Olímpico Internacional (IOC, *International Olympic Committee*), con el objetivo de diseñar un plan de ataque efectivo contra el dopaje.

Por otra parte, el abuso de esteroides anabólicos comienza a captar la atención a principios de la década de 1950 a raíz de las acusaciones hacia atletas soviéticos de abuso de testosterona para aumentar su rendimiento en halterofilia³. Además de la injusticia inherente a la manipulación de las capacidades atléticas y del riesgo para la salud que conlleva el abuso de sustancias dopantes, en la década de 1970 pudieron observarse claramente otros efectos secundarios, como es el caso de atletas femeninas altamente masculinizadas (síndrome conocido como

androgenización) por el uso sistemático de testosterona bajo la protección del gobierno de la República Democrática Alemana (Alemania del Este)⁴.

Los primeros controles antidopaje comienzan en 1968, tras la publicación de la primera lista de sustancias prohibidas en el deporte por el IOC en 1967. En ella no se incluían todavía los esteroides anabólicos debido a la falta de ensayos clínicos que pudieran detectarlos. Posteriormente, en 1974, el IOC incluía este tipo de compuestos en el grupo de sustancias prohibidas⁵, pero no fue hasta 1983 cuando se prohíbe la administración de testosterona, sustancia que, junto con una serie de esteroides endógenos, entraría a formar parte de la Lista de Compuestos Prohibidos (*Prohibited List*) de la Agencia Mundial Antidopaje (WADA, *World Anti-Doping Agency*) de 2004. Esta lista permanece vigente a día de hoy y es actualizada y ampliada periódicamente a medida que se descubren y detectan nuevas sustancias dopantes⁶.

La WADA surge en base a la Declaración sobre el Dopaje en el Deporte⁷ promulgada en la Conferencia Mundial de Dopaje de 1999 en Lausanne (Suiza), tras los escándalos de dopaje el año anterior, como lo fueron la intervención de material y drogas dopantes en equipos de ciclismo o el descubrimiento de que determinadas muestras de controles antidopaje se dejaban sin analizar en algunos laboratorios supuestamente acreditados. Siguiendo los términos de la Declaración de Lausanne, se conforma esta agencia independiente (WADA) encargada de la regulación del dopaje a nivel mundial bajo la iniciativa del IOC y con la participación de organizaciones intergubernamentales, gobiernos, autoridades públicas y otros cuerpos públicos y privados involucrados en la lucha contra el dopaje. El objetivo principal de esta organización sería, y es a día de hoy, unificar esfuerzos en la lucha contra el dopaje, tanto con la promulgación de normativas como con el fomento de legislaciones a nivel nacional compatibles internacionalmente, es decir, que conlleven controles y consecuencias de similar gravedad.

Bajo este marco se establecerían una serie de normas y guías para alcanzar un entorno de competición libre de dopaje, recogidas en el Código Mundial Anti-Dopaje⁸.

La lista de sustancias prohibidas incluye compuestos exógenos, que no son sintetizados por el metabolismo, y compuestos endógenos, aquellos que sí lo son. La simple detección de una sustancia exógena en la orina de un atleta es suficiente para demostrar un caso de dopaje. Sin embargo, la determinación y valoración del dopaje en el caso de sustancias endógenas (aquellas que son sintetizadas en el propio organismo), como es la testosterona, presenta la problemática adicional de discernir entre niveles normales del esteroide y un caso de dopaje. Es decir, un nivel alto de este compuesto podría no ser indicativo del abuso, ya que existen distintos factores naturales que pueden afectar a la concentración excretada en orina, tales como el sexo, edad, etnia, polimorfismos o enfermedades⁹. De manera equivalente, un resultado con una concentración aparentemente baja sí podría corresponder a dopaje cuando los niveles habituales del atleta son aún más bajos. No obstante, a partir del estudio de los perfiles esteroidales intraindividuales (concentraciones y relaciones entre ellas de esteroides endógenos seleccionados) realizados durante largos periodos de tiempo, es bien conocido el hecho de que las cantidades excretadas de esteroides endógenos son relativamente estables. Sin embargo, dado que estas cantidades sí varían con el flujo urinario, resulta más lógico recurrir a la medida de relación de concentración entre distintos esteroides para evitar fluctuaciones debidas a una mayor o menor dilución de la orina¹⁰⁻¹². Típicamente, se encuentran variaciones inferiores al 30% para atletas masculinos, o al 60% para femeninos, que no dependen del nivel de entrenamiento o de ritmos circadianos.

Por estas razones, la medida de la relación de testosterona respecto a su isómero inactivo epitestosterona (T/E) ha sido el marcador más utilizado para detectar la administración fraudulenta de testosterona, ya que ésta hace aumentar la cantidad de T excretada sin alterar la de E, por lo que un valor anómalo de la relación T/E podría ser indicativo de un caso de

dopaje^{13,14}. Tomando en cuenta estos avances, el *IOC* establece inicialmente, en 1983, un límite máximo de la relación T/E igual a 6 como criterio para discernir entre niveles naturales y administración exógena de testosterona u otras sustancias anabólicas^{13,15}. Posteriormente, dada la variabilidad de valores de T/E entre diferentes grupos étnicos, en 2004 se propuso una relación igual o superior a 4 para considerar una muestra como sospechosa de dopaje y proponer un análisis de confirmación mediante espectrometría de masas de relaciones isotópicas (*IRMS, Isotope-Ratio Mass Spectrometry*). Además, se incluyen progresivamente otros compuestos pertenecientes al metabolismo de esteroides anabólicos androgénicos y relaciones de concentración entre ellos con el objetivo de discernir más afinadamente los posibles casos de dopaje de niveles anormalmente altos o bajos. Actualmente la *WADA* establece el análisis de concentración urinaria de al menos 6 esteroides endógenos a través de estudios longitudinales de cada atleta y relaciones entre ellas, las cuales no están afectadas por el entrenamiento, ciclos menstruales o ciclos circadianos o anuales. Los parámetros o marcadores establecidos por este organismo, así como procedimientos recomendados, se recogen en documentos técnicos e incluyen la medida de: testosterona (T), epitestosterona (E), androsterona (A), eticolanolona (Etio), 5 α -androstan-3 α ,17 β -diol (Adiol), 5 β -androstan-3 α ,17 β -diol (Bdiol) y las relaciones T/E, A/Etio, A/T y Adiol/Bdiol^{10,16-18}.

Toda la información y conocimiento sobre el metabolismo de esteroides y biomarcadores de dopaje durante la década de los 90^{10-12,19,20} ha dado como resultado la creación y desarrollo de la herramienta del Pasaporte Biológico del Atleta (*ABP, Athlete's Biological Passport*). Este documento digital consta de 3 módulos que incluyen información longitudinal de diversos biomarcadores hematológicos, endocrinos y esteroideos, respectivamente. La potencia de esta herramienta reside en la evaluación de los datos incluidos mediante el análisis de un gran número de individuos y de su interpretación por técnicas de inferencia Bayesiana^{21,22}. Esto implica el análisis conjunto de todos los datos contenidos en el Pasaporte Biológico, tales como el sexo, edad, etnia de origen u otros

factores que pueden afectar tanto a los valores de biomarcadores como a su dispersión. En el módulo esteroidal del Pasaporte Biológico se incluyen actualmente los siguientes biomarcadores, obtenidos como relación de concentraciones urinarias entre los 6 esteroides comentados anteriormente: T/E, T/A, A/Etio, Adiol/Bdiol y Adiol/E.

Partiendo de valores poblacionales al inicio de los registros del Pasaporte Biológico para establecer los límites permitidos, las siguientes medidas se ven paulatinamente restringidos a unos límites más estrechos teniendo en cuenta las medidas previas con mayor peso respecto a los valores poblacionales originales. Esto hace que a medida que se obtienen más medidas longitudinales, los límites son más rigurosos y personalizados para el atleta en cuestión, indicando la probabilidad de dopaje en los puntos que caen fuera de límites.

Los laboratorios antidopaje trabajan sobre la base de una estrategia en dos pasos para cumplir con los requisitos y volúmenes de trabajo impuestos por la WADA. Durante la toma de muestra el atleta proporciona dos muestras, la A para la realización de los análisis y la B para posibles comprobaciones. Por una parte, se llevan a cabo análisis de cribado (*screening*) con la finalidad de detectar posibles casos de dopaje de manera rápida, fiable y selectiva en la que la prioridad es evitar falsos negativos con un margen mínimo de falsos positivos. Es en esta etapa donde entra en juego el Pasaporte Biológico. Como se ha comentado, el ABP muestra los límites de variación de la concentración de EAAS para cada atleta determinado. Estos límites están afectados por la variabilidad del individuo y por la del método analítico. Así, una mejora de la precisión analítica afectaría directamente a los límites permitidos para cada atleta. Este aspecto se retoma en el apartado dedicado al cálculo de la incerteza.

Una vez determinados los casos sospechosos de dopaje, es necesaria una confirmación exhaustiva, dadas las implicaciones profesionales y penales para el atleta como consecuencia de un resultado positivo en dopaje. Para ello, se recurre al análisis de la misma muestra sospechosa mediante otra

metodología especialmente desarrollada para el compuesto detectado en la etapa de cribado. Un resultado fuera de los límites permitidos por la normativa supondría un resultado analítico adverso (AAF, *Adverse Analytical Finding*) y la emisión de un informe. Adicionalmente, se dispone de la muestra B, adquirida a la vez que la muestra principal (A) y bajo las mismas condiciones, almacenada a bajas temperaturas y disponible para un segundo análisis de confirmación en casos positivos de dopaje o de comprobación de errores durante el procedimiento²³. Todos estos pasos se resumen en la *Figura 2.1*.

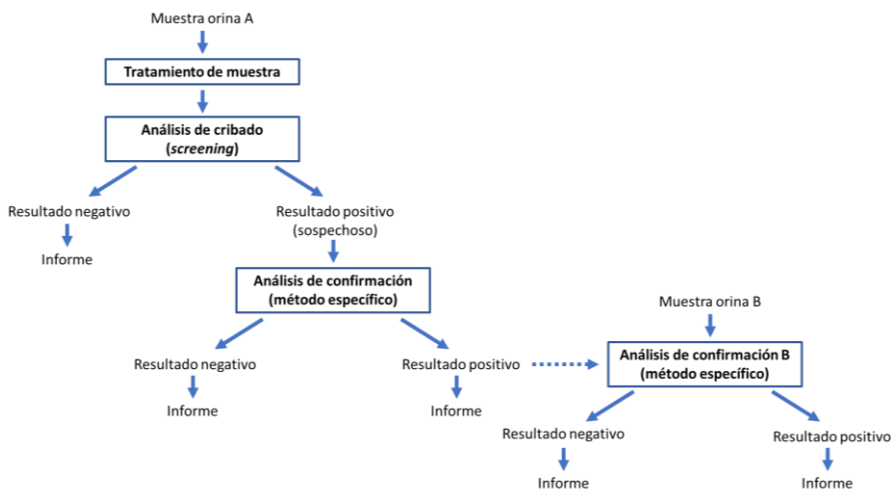


Figura 2.1. Diagrama de flujo del proceso de análisis de una muestra en control antidopaje.

2.1.1 Metodologías de análisis

Históricamente, la detección y determinación de sustancias dopantes clásicas (estimulantes como anfetaminas o efedrina) se realizaba exclusivamente mediante cromatografía de gases utilizando detectores de llama sensibles al nitrógeno (NFID, *Nitrogen-sensitive Flame Ionization Detection*) o espectrometría de masas²⁴. En concreto para sustancias anabolizantes, la técnica de GC-MS sigue siendo la más utilizada²⁵, a pesar de la necesidad de un tratamiento de muestra más extensivo para eliminar

interferentes provenientes de la matriz, además de requerir pasos de derivatización de los analitos para convertirlos en especies volátiles y compatibles con las condiciones instrumentales. Así mismo, se hace necesaria una etapa de hidrólisis previa a la derivatización que libera los esteroides de su forma conjugada. Esta etapa permite, además, la posibilidad de realizar análisis de comparación de las concentraciones de esteroide libre y conjugado. En la determinación de concentración total de esteroides en orina, dado que el metabolito mayoritario es el derivado glucurónico, éste ha de ser liberado, preferiblemente, mediante hidrólisis enzimática con glucuronidasa de *E. coli* (Figura 2.2).

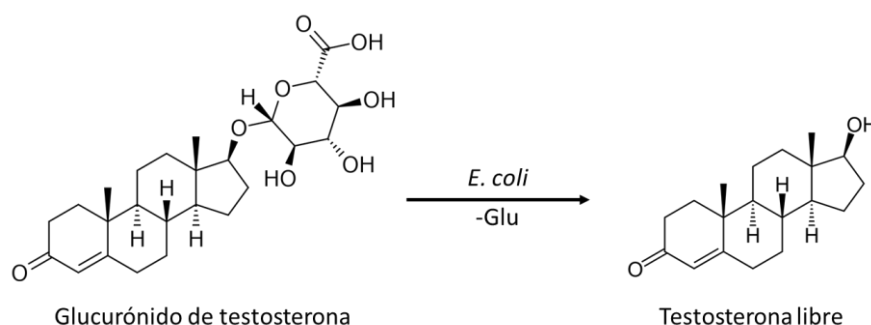


Figura 2.2. Liberación de testosterona mediante hidrólisis enzimática del glucurónido con glucuronidasa (de *Escherichia coli*).

La WADA publica y actualiza regularmente documentos técnicos relativos a las metodologías oficiales y recomendadas para el correcto análisis y armonización de resultados de controles antidopaje. El procedimiento recomendado para el análisis inicial de EAAS en muestras de orina (TD2018EAAS¹⁷) consiste en la cuantificación de androsterona (A), etiocholanolona (Etio), 5 α -androstan-3 α ,17 β -diol (5 α Adiol), 5 β -androstan-3 α ,17 β -diol (5 β Adiol), testosterona (T) y epitestosterona (E), además de las relaciones de concentración T/E, A/T, A/Etio, 5 α Adiol/5 β Adiol y 5 α Adiol/E.

Si bien no se detalla una metodología concreta de análisis, se indican una serie de características que deben cumplir los métodos desarrollados por los laboratorios acreditados:

- Metodología basada en GC-MS o GC-MS/MS previa derivatización de los analitos con grupos trimetilsililo (TMS), la cual debe ser monitorizada mediante la relación de señales entre el derivado mono-O-TMS y di-O-TMS de androsterona.
- Uso de curvas de calibrado en cada secuencia de análisis, incluyendo dos orinas de diferentes niveles de concentración de analitos como muestras de control de calidad.
- Liberación de los esteroides (los cuales se encuentran en forma de glucurónido en la orina) mediante hidrólisis enzimática utilizando β -glucuronidasa purificada de *Escherichia coli*, controlada mediante glucurónido de androsterona marcado isotópicamente.
- El volumen de muestra debe ajustarse en los casos en los que la densidad de la muestra exceda unos límites establecidos.
- La relación T/E debe determinarse a partir de las relaciones de área cromatográfica o de altura de pico cromatográfico.
- La linealidad del método ha de abarcar todo el rango de concentraciones normal en humanos, manteniendo unos límites de cuantificación (LOQ) de T y E por debajo de los 2 ng/mL.
- La incertidumbre combinada ha de mantenerse por debajo del 30% en el LOQ, 20% (A y Etio) o 25% (Adioles) en cinco veces el LOQ y 20% para concentraciones por encima de 5 ng/mL de T y E. Además, la incertidumbre combinada de la relación T/E no debe superar el 15% cuando cada una de las concentraciones es mayor de 5 ng/mL y menor del 30% en el resto de casos.

- Es necesario monitorizar las posibles degradaciones microbianas durante la manipulación y almacenamiento de las muestras.

Por otra parte, el análisis de confirmación en el caso de encontrar resultados analíticos adversos requiere de métodos específicos para los analitos detectados. Para ello, la WADA establece que el análisis debe realizarse con alícuotas nuevas de la misma muestra (muestra A) mediante métodos de cuantificación específicos (*fit-for-purpose*) de GC-MS o GC-MS/MS, donde la técnica de combustión-espectrometría de masas de relación isotópica (GC-C-IRMS) suele ser la más habitual^{17,26}.

Si bien la WADA recomienda el uso de GC-C-IRMS como análisis de confirmación²⁷, de forma general establece los siguientes parámetros para análisis basados en GC-MS o GC-MS/MS¹⁷:

- Debe realizarse una extracción en fase sólida (SPE) de los analitos previamente a su hidrólisis enzimática.
- Al igual que en los análisis iniciales, han de incluirse curvas de calibrado y controles de calidad en cada secuencia de análisis.
- La incertidumbre combinada ha de mantenerse por debajo del 15% en determinaciones de A, Etio y Adioles a cinco veces el LOQ y en determinaciones de T, E y T/E a concentraciones superiores a 5 ng/mL.

En los últimos años, las técnicas basadas en LC (incluyendo HPLC y UHPLC, en modo RPLC) han ido ganando popularidad como alternativa a los análisis por GC, y no como metodologías complementarias entre ellas. Si bien los primeros análisis por LC hacían uso de detectores ultravioleta (UV)²⁸, la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) con ionización a presión atmosférica (ESI, APCI o APPI) ha experimentado una generalización en su uso gracias a la mayor información espectral generada²⁵. Por otra parte, los últimos desarrollos instrumentales han dado lugar a acoplamientos robustos y fiables entre equipos de LC y

diferentes diseños de MS, para proporcionar tanto información estructural, elucidación y monitorización no dirigida mediante equipos de alta resolución (especialmente utilizando equipos de tiempo de vuelo, TOF)^{29,30}, como para la cuantificación exacta y reproducible a bajos niveles de concentración mediante equipos de gran sensibilidad como el triple cuadrupolo (QqQ)³¹. Todo esto, junto con el relativamente sencillo tratamiento de muestra asociado a las metodologías LC-MS y rapidez de análisis, está haciendo que cada vez más laboratorios de rutina e investigación se decanten por esta técnica. En el presente capítulo se recopilan dos estudios englobados en la aplicabilidad de la metodología de cálculo IPD utilizando LC-MS.

En una primera parte, atendiendo al importante papel que recae sobre la incertidumbre analítica en el ámbito del informe de resultados en antidopaje, se presenta un estudio detallado de las fuentes de error analítico y su potencial impacto sobre los resultados finales. Para ello se usan distintas metodologías de cuantificación de un compuesto modelo (T), y se comparan las diferentes contribuciones al error final para cada una de ellas. También se calculan y comparan los errores globales, evaluados tanto en estudios intra-laboratorio, mediante el cálculo de la incertidumbre combinada (u_c), como inter-laboratorio, mediante el coeficiente de variación (CV).

En una segunda parte, se aplica la metodología IPD desarrollada durante la primera parte para extenderla a la determinación de los esteroides requeridos por la WADA (T, E, A y Etio), a excepción de los Adioles, los cuales no pueden determinarse mediante LC-MS con interfase tipo ESI tras la etapa de hidrólisis enzimática. De nuevo, IPD se puso a prueba frente a métodos convencionales de cuantificación con el objetivo de comprobar mejoras en la dispersión e incertidumbre de los resultados obtenidos.

2.2 Evaluación de la incertidumbre en la determinación de testosterona en orina mediante cuantificación por calibrado y dilución isotópica utilizando cromatografía líquida de ultra alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem

La primera parte de la presente tesis consiste en el estudio de la incertidumbre analítica asociada a la metodología propuesta basada en la deconvolución de perfiles isotópicos, IPD.

Para ello se desarrolló un procedimiento analítico para la determinación de esteroides en orinas escogiendo un único compuesto modelo como referencia, la testosterona (T). Se llevó a cabo una optimización del tratamiento de muestra que asegurase la total liberación de la testosterona excretada como complejo glucurónido mediante hidrólisis enzimática y posterior extracción y preconcentración para ser analizada mediante LC-MS/MS.

Una vez establecido el procedimiento óptimo de tratamiento de muestra se desarrollaron distintas metodologías de cuantificación de T. Por una parte, 3 métodos basados en IDMS, incluyendo IPD y calibrado con patrón interno, en modo ponderado y no ponderado, utilizando testosterona marcada con dos átomos de carbono-13 ($^{13}\text{C}_2\text{-T}$). Por otra parte, se aplicó la cuantificación por adiciones estándar, el cual no necesita patrones internos para corregir el efecto matriz, a modo de método de referencia.

Los tres métodos de IDMS fueron evaluados y comparados entre ellos en términos de precisión, exactitud e incertidumbre analítica en base a los distintos procedimientos oficiales comentados en el capítulo anterior. Además, se organizó un estudio inter-laboratorio a nivel europeo con participación de cinco grupos de investigación, como soporte necesario

para evaluar la incertidumbre del método. Además, sirvió de refuerzo de las conclusiones obtenidas en los estudios intra-laboratorio.

Para la evaluación de la incertidumbre global de cada método de cuantificación se ha calculado la incertidumbre combinada, u_c , de acuerdo con la guía NORDTEST³², una de las usadas en el documento técnico de la WADA TD2018DL¹⁸.

La metodología seleccionada de la guía NORDTEST permite, entre otras posibilidades, calcular la incertidumbre asociada a un método y un laboratorio a partir de datos de validación usando materiales de referencia. Como referencia, se han usado muestras sintéticas de orina de concentración conocida (C_{ref}), obtenida del estudio inter-laboratorio usando diferentes métodos de análisis y de cálculo. El procedimiento implica el cálculo de la incerteza asociada a la reproducibilidad del método aplicado en el laboratorio, u_{SD} , y la asociada a cualquier tipo de sesgo, u_{bias} . Esta última se estima a partir de la diferencia entre el valor obtenido en el laboratorio y el considerado correcto (el valor asignado en el ejercicio inter-laboratorio. C_{ref}), y la incertidumbre asociada a este valor de referencia.

La incertidumbre combinada para el método y el laboratorio se calcula de la siguiente manera:

$$u_c = \sqrt{u_{SD}^2 + RMS^2 + u_{ref}^2} \quad (Ec. 2.1)$$

El sesgo puede ser cero, pero siempre conlleva una incertidumbre que debe ser tomada en cuenta. Para cada muestra de referencia (6 en el presente caso) el sesgo es un valor medio de diferentes réplicas. La incertidumbre asociada a este sesgo, RMS, se computa como la raíz del valor cuadrático promedio para cada una de las 6 muestras.

La incertidumbre asociada al valor de referencia se ha obtenido a partir de la desviación estándar del estudio inter-laboratorio para cada muestra. El cálculo detallado se muestra más adelante en el artículo científico.

Finalmente se han calculado y comparado los valores de coeficiente de variación de los resultados del estudio inter-laboratorio, lo que proporciona una mejor evaluación de la incertidumbre de cada método.

Conocer la incertidumbre asociada a un método analítico es especialmente interesante en el campo del dopaje y, en concreto, en la evaluación de los límites del pasaporte biológico de un atleta. Estos incluyen tanto la variabilidad del atleta como la del método. Una reducción de ésta última ayudaría a definir más estrictamente los límites de esteroides de cada ABP. Conocer por tanto las fuentes de la incertidumbre analítica es una posibilidad a estudiar. Más adelante se aborda el tema de la evaluación de estas fuentes.

2.2.1 Desarrollo del método IPD

Tal y como se vio en el capítulo primero, el método de IPD requiere una serie de medidas y preparación antes de su aplicación a muestras.

Primeramente, es necesario caracterizar de manera exhaustiva los compuestos de interés, ya sean los analitos naturales o los análogos marcados que se utilizan para la cuantificación. Todas las disoluciones estándar se prepararon gravimétricamente, mediante diluciones consecutivas en balanza analítica. Este modo de trabajar, aunque es bastante laborioso, suele ser habitual en IPD para minimizar la incertidumbre del resultado.

Seguidamente, dado que IPD emplea las abundancias relativas de los distintos isotopólogos de los compuestos, hay que establecerlas de antemano. Tanto en este estudio como en los siguientes, se optó por la medida experimental en lugar de la estimación teórica. Tras un estudio de la existencia de intercambios, adiciones y/o eliminaciones de átomos de H

durante la fragmentación que pudieran dar lugar a alteraciones del patrón de abundancias esperado, se adquirieron todas aquellas transiciones MS/MS que corresponden al clúster isotópico y que son detectadas en el espectrómetro de masas, inyectando soluciones estándar individuales de cada compuesto (T y $^{13}\text{C}_2\text{-T}$). De esta manera se consigue obtener un perfil completo de los compuestos de interés, minimizando los posibles errores de normalización de abundancias por exclusión de transiciones relevantes si éstas se deciden de antemano. Una vez establecidas estas abundancias de referencia, se escogen las más abundantes (habitualmente de 2 a 6 transiciones por compuesto), las cuales se utilizarán a lo largo del estudio. Así, se seleccionan aquellas transiciones con mayor sensibilidad instrumental para la cuantificación de las muestras, las que conllevan unos menores límites de detección y cuantificación. El uso de un número de transiciones inferior al total no compromete la representatividad del perfil isotópico ya que las relaciones de intensidad entre ellas se mantienen.

2.2.2 Evaluación de las fuentes de incertidumbre. Método Kragten

La estimación de la incertidumbre global, expuesta anteriormente, no permite conocer la contribución de cada una de las etapas de un determinado método analítico. Para este propósito se debe conocer la función completa que relaciona el valor de concentración final con cada paso del método.

A partir de esta función, la estimación de las aportaciones individuales de cada paso de cálculo a la incertidumbre global conlleva unos cálculos más elaborados que pueden ejecutarse mediante el método Kragten³³.

El método Kragten es un método numérico y universal basado en el uso de hojas de cálculo y la fórmula general de propagación de errores (Ec. 2.2) que permite la obtención de desviaciones estándar sin violar la condición de independencia mutua, de forma rápida y minimizando los errores de cálculo.

$$s_R^2 = \left(\frac{\partial R}{\partial x}\right)^2 s_x^2 + \left(\frac{\partial R}{\partial y}\right)^2 s_y^2 + \left(\frac{\partial R}{\partial z}\right)^2 s_z^2 + \dots \quad (\text{Ec. 2.2})$$

En el presente artículo se empleó el método Kragten mediante tablas en hojas de cálculo Excel, de la siguiente manera:

- En la primera columna se sitúan los valores básicos utilizados en los cálculos de la metodología, tales como volúmenes, medidas experimentales de abundancias o concentraciones.
- En la primera fila se sitúan las desviaciones estándar de cada uno de los parámetros anteriores, obtenidos mediante replicados (abundancias, concentraciones, etc.) o la incertidumbre asociada a los aparatos de medida y material común de laboratorio (volúmenes o pesadas).
- La tabla resultante se rellena con los valores básicos de cada parámetro excepto en la diagonal, en cuyas celdas se calcula la suma del valor básico y su desviación estándar. De esta manera se obtienen tantos conjuntos de datos (columnas) como parámetros considerados, en los cuales solo uno de los valores está modificado con su correspondiente desviación estándar, además de un valor básico sin modificaciones (primera columna).
- Con cada conjunto de datos se realizan los cálculos pertinentes a la metodología analítica, obteniendo un valor de interés final para cada uno de ellos, en este caso la concentración de T.
- Se procede al cálculo de la diferencia entre el valor básico (R) y los valores modificados (R_i) mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta_i^2 = (R - R_i)^2 \quad (\text{Ec. 2.2})$$

- A partir de estos valores se obtiene la incertidumbre del cálculo:

$$U = \sqrt{s_R^2} = \sqrt{\sum \Delta^2} \quad (\text{Ec. 2.3})$$

- Finalmente, los porcentajes de contribución de cada parámetro se obtienen como la fracción de cada Δ_i^2 sobre U :

$$\% \text{ contribución} = \frac{\Delta_i^2}{U} \quad (\text{Ec. 2.4})$$

A continuación, en la *Tabla 2.1* se presenta de forma gráfica este procedimiento para un caso modelo en el que, a partir de dos parámetros X e Y de valores x e y con desviaciones estándar s_x y s_y , se obtiene el resultado final R calculado como producto de ambos parámetros, $R = x \cdot y$.

De esta manera se obtiene tanto la contribución individual de cada parámetro a la incertidumbre global como ésta misma, permitiendo por tanto además aportar un resultado final con un valor de incertidumbre asociado en la forma:

$$R = R_0 \pm U \quad (\text{Ec. 2.5})$$

Tabla 2.1. Cálculo general de la incertidumbre individual y global de un resultado R calculado como producto de los parámetros X e Y de desviaciones estándar (SD) s_x y s_y .

		Parám.	X	Y
		SD	s_x	s_y
Parám.	Valor	Columna 0	Columna 1	Columna 2
X	x	x	$x + s_x$	x
Y	y	y	y	$y + s_y$
R		$R_0 = x \cdot y$	$R_1 = (x + s_x) \cdot y$	$R_2 = (x \cdot (y + s_y))$
Δ^2		-	$\Delta_1^2 = (R_0 - R_1)^2$	$\Delta_2^2 = (R_0 - R_2)^2$
% contrib.		-	$\frac{\Delta_1^2}{U}$	$\frac{\Delta_2^2}{U}$
s_r^2		$\Delta_1^2 + \Delta_2^2$		
U		$\sqrt{s_r^2}$		

2.2.3 Artículo científico 1

Evaluation of uncertainty sources in the determination of testosterone in urine by calibration-based and isotope dilution quantification using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

Pitarch-Motellón, J., Roig-Navarro, A. F., Sancho, J. V., Fabregat-Cabello, N., Pozo, O. J., Ventura, R., García Alonso, J. I., Rodríguez-González, P., González Gago, A., Ereño Artabe, A., Van Eenoo, P., Deventer, K., Dehnes, Y., Rzeppa, S. *Journal of Chromatography A* 2017, 1508, 73-80

Journal of Chromatography A, 1508 (2017) 73–80



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

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



Evaluation of uncertainty sources in the determination of testosterone in urine by calibration-based and isotope dilution quantification using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry^{2*}



J. Pitarch-Motellón^a, A.F. Roig-Navarro^{a,b}, J.V. Sancho^a, M. Ibáñez^a, N. Fabregat-Cabello^b, O.J. Pozo^c, Rosa Ventura^d, J.I. García Alonso^e, Pablo Rodríguez-González^e, Adriana González Gago^e, Amaia Ereño Artabe^e, Peter Van Eenoo^f, Koen Deventer^f, Yvette Dehnes^g, Sebastian Rzeppa^g

^a Research Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, E-12071, Castelló, Spain

^b Department of Clinical Chemistry, University of Liège, Liège, Belgium

^c Bioanalysis Research Group, IMIM, Hospital del Mar Medical Research Institute, Barcelona, Spain

^d Barcelona Anti-doping Laboratory, Doping Control Research Group, Fundació IMIM, Barcelona, Spain

^e Department of Physico and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Oviedo, Spain

^f Ghent University, Department of Clinical Chemistry, Microbiology and Immunology, Doping Control Laboratory, Zwijnaarde, Belgium

^g Norwegian Doping Control Laboratory, Oslo University Hospital, Oslo, Norway

ARTICLE INFO

Article history:
Received 8 March 2017
Received in revised form 2 May 2017
Accepted 31 May 2017
Available online 3 June 2017

Keywords:
Testosterone
urine
LC-MS/MS
uncertainty
IDMS
isotope pattern deconvolution

ABSTRACT

Three quantification methodologies, namely calibration with internal standard (Cal-IS, non-weighted), weighted calibration with internal standard (wCal-IS) and isotope pattern deconvolution (IPD) have been used for the determination of testosterone in urine by LC-MS/MS. Uncertainty has been calculated and compared for the three methodologies through intra- and inter-laboratory reproducibility assays. IPD showed the best performance for the intra-laboratory reproducibility, with RSD and combined uncertainty values below 4% and 9% respectively. wCal-IS showed similar performance, while Cal-IS were not constant and clearly worse at the lowest concentration assayed (2 ng/mL) reaching RSD values up to 16%. The inter-laboratory assay indicated similar results although wCal-IS RSD (20%) was higher than IPD (10%) and Cal-IS get worse with RSD higher than 40% for the lowest concentration level. Uncertainty budgets calculated for the three procedures revealed that intercept and slope were the most important factors contributing to uncertainty for Cal-IS. The main factors for wCal-IS and IPD were the volumes of sample and/or standard measured.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The use of drugs to enhance performance in sports is a well-known and documented issue. Despite the continuous introduction of new compounds, endogenous androgenic anabolic steroids (EAAS) are among the most popular doping agents [1–3]. EAAS determination still represents an important challenge due to the complexity to differentiate exogenous administration of endoge-

nous substances. The goal requires collaborative efforts as well as advanced methodologies [1–7]. Longitudinal fluctuations measurement for a given athlete is nowadays regarded as the most effective approach to suspect the EAAS misuse. In this way, the steroid profile of the Athlete Biological Passport (ABP) represents a powerful tool to reveal doping with endogenous compounds [1,3,6].

For most drugs, urine is the matrix generally used since it involves a non-invasive sampling procedure, large volumes are easily obtained, shows wide time windows and concentrations are high enough [1,6,7]. However, sample preparation is mandatory to ensure matrix effect attenuation and good sensitivity and selectivity. Usual treatment techniques such as solid phase extraction (SPE), liquid–liquid extraction (LLE) and simple matrix dilution are normally used. Due to its simplicity, efficiency and low cost, LLE at basic pH is still widely used in EAAS determination in urine samples [5,6].

^{2*} Selected paper from the XVI Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques (SECYA 2016), 2–4 November 2016, Seville, Spain.

* Corresponding author.

E-mail addresses: roig@uji.es (A.F. Roig-Navarro), rventura@imim.es (R. Ventura).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.05.072>
0021-9673/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Evaluation of uncertainty sources in the determination of testosterone in urine by calibration-based and isotope dilution quantification using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*

Journal of Chromatography A, 1508 (2017) 73-80

J. Pitarch-Motellón^a, A.F. Roig-Navarro^{a,*}, J.V. Sancho^a, M. Ibáñez^a, N. Fabregat-Cabello^b, O.J. Pozo^c, Rosa Ventura^d, J.I. García Alonso^e, Pablo Rodríguez-González^e, Adriana González Gago^e, Amaia Ereño Artabe^e, Peter Van Eenoo^f, Koen Deventer^f, Yvette Dehnes^g, Sebastian Rzeppa^g

^a*Research Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, E-12071, Castelló, Spain*

^b*Department of Clinical Chemistry, University of Liège, Liège, Belgium*

^c*Bioanalysis Research Group, IMIM, Hospital del Mar Medical Research Institute, Barcelona, Spain*

^d*Barcelona Antidoping Laboratory, Doping Control Research Group, Fundació IMIM, Barcelona, Spain*

^e*Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Oviedo, Spain*

^f*Ghent University, Department of Clinical Chemistry, Microbiology and Immunology, Doping Control Laboratory, Zwijnaarde, Belgium*

^g*Norwegian Doping Control Laboratory, Oslo University Hospital, Oslo, Norway*

* *Selected paper from the XVI Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques (SECyTA 2016), 2-4 November 2016, Seville, Spain.*

* Corresponding author.

E-mail addresses: roig@uji.es (A.F. Roig-Navarro), rventura@imim.es (R. Ventura)

ABSTRACT

Three quantification methodologies, namely calibration with internal standard (Cal-IS, non-weighted), weighted calibration with internal

standard (wCal-IS) and isotope pattern deconvolution (IPD) have been used for the determination of testosterone in urine by LC–MS/MS. Uncertainty has been calculated and compared for the three methodologies through intra- and inter-laboratory reproducibility assays. IPD showed the best performance for the intra-laboratory reproducibility, with RSD and combined uncertainty values below 4% and 9% respectively. wCal-IS showed similar performance, while Cal-IS where not constant and clearly worse at the lowest concentration assayed (2 ng/mL) reaching RSD values up to 16%. The inter-laboratory assay indicated similar results although wCal-IS RSD (20%) was higher than IPD (10%) and Cal-IS get worse with RSD higher than 40% for the lowest concentration level. Uncertainty budgets calculated for the three procedures revealed that intercept and slope were the most important factors contributing to uncertainty for Cal-IS. The main factors for wCal-IS and IPD were the volumes of sample and/or standard measured.

KEYWORDS: Testosterone, urine, LC-MS/MS, uncertainty, IDMS, Isotope pattern deconvolution

1. INTRODUCTION

The use of drugs to enhance performance in sports is a well-known and documented issue. Despite the continuous introduction of new compounds, endogenous androgenic anabolic steroids (EAAS) are among the most popular doping agents [1–3]. EAAS determination still represents an important challenge due to the complexity to differentiate exogenous administration of endogenous substances. The goal requires collaborative efforts as well as advanced methodologies [1–7]. Longitudinal fluctuations measurement for a given athlete is nowadays regarded as the most effective approach to suspect the EAAS misuse. In this way, the steroidal profile of the Athlete Biological Passport (ABP) represents a powerful tool to reveal doping with endogenous compounds [1,3,6]. For most drugs, urine is the matrix generally used since it involves a non-invasive sampling procedure, large volumes are easily obtained, shows wide time windows

and concentrations are high enough [1,6,7]. However, sample preparation is mandatory to ensure matrix effect attenuation and good sensitivity and selectivity. Usual treatment techniques such as solid phase extraction (SPE), liquid–liquid extraction (LLE) and simple matrix dilution are normally used. Due to its simplicity, efficiency and low cost, LLE at basic pH is still widely used in EAAS determination in urine samples [5,6].

Concerning identification and quantification, LC–MS based techniques – equipped with Electrospray Ionization source (ESI)- tend to replace GC–MS(/MS) – considered as the gold World Anti-doping Agency (WADA) standard for quantifications [8]- since the former shows suitable sensitivity and faster instrumental run time. Specially UHPLC–MS/MS with its demonstrated separation efficiency is considered the method of choice in doping analysis [1,5,6,9]. A relevant problem with the use of ESI source is the signal alteration due to matrix effect [10–12]. Matrix effect can affect drastically to sensitivity, precision and accuracy of the analytical results. The most robust approach to minimize matrix effect rely on the use of Stable Isotope Labeled-Internal Standard (SIL-IS) [11,12]. Thus, matrix-effects associated to complex matrices can be properly overcome using a quantification methodology based on isotope dilution mass spectrometry (IDMS). Classical IDMS is based on the preparation of methodological calibration curves with the associated time consumption. An alternative method of quantification, based on the measurement of isotopic abundances in the spiked sample by multiple linear regression, can also be used. This method, known as isotope pattern deconvolution (IPD), do not requires the construction of any calibration graph and has been tested satisfactorily for rapid quantifications in different complex matrices [13–16]. IDMS together with IPD is a fast and reliable methodology, which provides one result per injection with high accuracy and free of matrix effect. In the field of doping analysis, improvements of reliability and robustness of analytical results is continuously and still required [1,2,5,6]. WADA highlights the need of good inter-laboratory precision, particularly relevant in ABP profiling [5]. Analytical results for ABP are obtained from different laboratories for the same athlete, thus,

improving inter-laboratory precision seems of maximum concern to allow universal application of any developed methodology. In this way, the need of calculating and minimizing measurement uncertainty deserves to be treated thoroughly [2,17,18]. In the present work, a previously developed method has been applied to assess the uncertainty in the testosterone concentration determined in several synthetic urine samples. Testosterone concentration has been calculated using three different methodologies, weighted and non-weighted calibration with IS (wCal-IS and Cal-IS, respectively) and IPD. In order to evaluate more in depth the associated uncertainty, an inter-laboratory comparison among five laboratories has been performed. For all three methodologies, intra- and inter-laboratory measurements have been conducted, combined uncertainties (u_c) and full uncertainty budgets have been obtained and compared.

2. EXPERIMENTAL

2.1 Reagents and materials

Testosterone (T, purity 99%) was provided by Sigma-Aldrich Co. (Madrid, Spain) and $^{13}\text{C}_2$ -testosterone ($^{13}\text{C}_2$ -T, purity 98% and $^{13}\text{C}_2$ - enrichment 98%) by Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA). Methanol (MeOH, HPLC quality) and methyl tert-butyl ether (MTBE, GC quality) were provided by Scharlau (Barcelona, Spain). For the sample hydrolysis, β -glucuronidase from E. coli K12 provided by Roche (Indianapolis, IN, USA) was employed. A 1 M phosphate buffer was prepared by dissolving the proper amount of $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Merck, Darmstadt, Germany) in Milli-Q water and adjusted to pH=7 with HCl 37% from Scharlau (Barcelona, Spain). Also, a $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ (1:2, w/w) (Sigma-Aldrich Co., Madrid, Spain) solid buffer was prepared. Formic acid (LC additive quality) and a 500 mM solution of NH_4HCOO (Scharlau, Barcelona, Spain) in methanol HPLC were used for the mobile phase preparation.

A 250 µg/mL stock solution of T was prepared by dissolving 25 mg of solid standard, accurately weighed, in 100 mL of methanol. The stock solution of ¹³C₂-T was prepared by dissolving 10 mg of the purchased material in 50 mL of methanol. This provided a concentration by reverse isotope dilution against the natural compound of 237 µg/mL. Individual 10 µg/mL and 1 µg/mL working solutions of the natural and labelled compounds were prepared by dilution of the stock solutions with methanol. All of the standard solutions were stored in amber glass bottles in a freezer. The water purification system used was a Milli-Q gradient A10 from Millipore (Bedford, MA, USA).

2.2 Instrumentation

All participants in the inter-laboratory comparison have determined testosterone by LC–MS/MS. Additionally some laboratories have used other methodologies (see inter-laboratory comparison section). This section describes the instrumentation used at Research Institute for Pesticides and Water (IUPA) laboratory, where the intra-laboratory measurements and all calculations have been done. An Acquity UPLC system coupled to a TQD triple quadrupole mass spectrometer from Waters Corp. (Milford, MA, USA) was employed for sample analysis. Chromatographic separation was performed with an Acquity UPLC BEH C18 column (1.7 µm, 2.1 mm × 100 mm), also from Waters Corp., at a 0.3 mL/min flow rate and an injection volume of 10 µL. The column oven was kept at 55 °C and the sample manager at 10 °C. Mobile phase A was purified water and mobile phase B was MeOH HPLC, both containing 0.01% of formic acid and 1 mM of NH₄HCOO as modifiers. The gradient applied was: 45% B (0–1 min), linear increase to 77.5% B in 6.5 min, 95% B (7.51–8 min), 45% B (8.5–11.5 min). Chromatograms of blank and a selected sample can be seen in Figure S.8 in supplementary material.

Electrospray ionization in the mass spectrometer was performed at 120 °C and 350 °C source and desolvation temperatures, 80 and 800 L/h cone gas and desolvation flow, respectively, and 3.5 kV capillary voltage, operating

in positive ion mode. MS/MS experimental conditions for T and $^{13}\text{C}_2\text{-T}$ are listed in Table 1. Nitrogen was employed as both drying and nebulizing gas, obtained from a nitrogen generator N2 LC-MS adapted for LC-MS analyzers (Claind, Teknokroma, Barcelona, Spain). Collision cell was operated under a pressure of approximately 5.6×10^{-3} mbar of argon 99.995% (Praxair, Madrid, Spain). Dwell times of 0.1 s per SRM transition were chosen. MassLynx v4.1 (Waters) and homemade Excel spreadsheets were used to process the data obtained. Relative abundances of individual 100 ng/mL standards were determined (n=5) under these conditions with RSD values under 1.5%.

2.3 Sampling and sample preparation

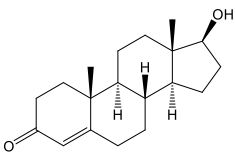
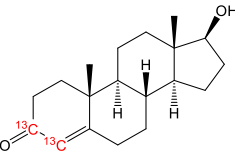
The aim of the study was explained to 15 healthy volunteers (8 men and 7 women with ages comprised between 16 and 59 years) and consent was obtained after confirmation that they fully understood the experiment. Urine samples were collected and stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ until use. Testosterone concentration was approximately determined by IPD for all samples. 12 samples were selected and mixed in pairs in approximate 1:1 (v/v) ratios to obtain 6 synthetic urine samples, A to F, with increasing concentrations along the 2 ng/mL to 75 ng/mL testosterone range. 2.5 mL of the synthetic samples were transferred to individual glass tubes, together with 25 μL of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $^{13}\text{C}_2\text{-T}$, and they were neutralized with 1 mL of 1 M phosphate buffer (pH 7.0). Then, 30 μL of β -glucuronidase solution were added. Samples were incubated at $55 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ in a water bath for 1 h.

After hydrolysis, approximately 200 mg of a $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ (1:2, w/w) solid buffer were added and dissolved by stirring in a vortex. Liquid-liquid extraction was performed with 6 mL of MTBE and stirring in a vortex for 1 min. Separation of phases was achieved by centrifugation at 3500 rpm for 5 min and the upper organic phase was transferred to clean glass tubes with disposable Pasteur pipettes, carefully avoiding to transfer any aqueous phase. MTBE was evaporated in a MiVac

at 40 °C for 20 min. The residue was reconstituted in 300 μ L of MeOH/H₂O 1:1 (v/v) and transferred to LC vials.

Samples and standards were equally treated and analyzed as described above.

Table 1. Chemical structure and experimental conditions of the LC-(ESI)-MS/MS for testosterone and labeled testosterone.

Compound	Structure	Rt (min)	Precursor ion	Cone voltage (V)	SRM transitions (collision voltage, V)
T		5.7	[M+H] ⁺	30	289.2 > 96.9 (25)
					290.2 > 96.9 (25)
¹³ C ₂ -T		5.7	[M+H] ⁺	30	291.2 > 98.9 (25)
					292.2 > 98.9 (25)

2.4 Quantification methods

The 6 synthetic urine samples (A to F) were analyzed by three quantification approaches: Cal-IS, wCal-IS and IPD.

Additionally, at IUPA laboratory, standard addition was also employed for the inter-laboratory experiment. On this purpose, 2.5mL aliquots of each sample were spiked with 0, 0.5, 2 and 3.5 times the original approximate concentration of T and adjusted to a final volume of 2720 μ L with water. The described sample treatment was applied without the addition of internal standard.

For all participant laboratories, calibration curves freshly prepared consisted in 6 points between 0 and 100 ng/mL of T in 2.5mL of water. Using the same data acquired for calibration with IS, weighed calibration

calculations were applied as described in Garcia-Alonso and Rodríguez-González[19].

IPD was applied to the same sample extracts used in Cal-IS.

The isotope dilution quantification methodology employed is based on multiple linear regression and the spiking of samples with an isotopically enriched analog of the analytes of interest. This produces an intentional alteration of the natural isotopic composition of the analyte in the mix. Briefly, the altered isotopic composition measured in the mixture $A_{mix}^{SRM_i}$ is a combination of the contribution of the abundances of the natural, $A_{nat}^{SRM_i}$, and the isotopically enriched spike, $A_{lab}^{SRM_i}$, analyte. For a single isotopically enriched spike and n measured transitions, this can be expressed in matrix notation as:

$$\begin{bmatrix} A_{mix}^{SRM1} \\ A_{mix}^{SRM2} \\ \vdots \\ A_{mix}^{SRMn} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^{SRM1} & A_{lab}^{SRM1} \\ A_{nat}^{SRM2} & A_{lab}^{SRM2} \\ \vdots & \vdots \\ A_{nat}^{SRMn} & A_{lab}^{SRMn} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X_{nat} \\ X_{lab} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{SRM1} \\ e^{SRM2} \\ \vdots \\ e^{SRMn} \end{bmatrix}$$

A vector error e^{SRM1} needs to be included in order to solve the system by multiple linear regression, which gives the molar fractions of natural and labelled compounds (x_{nat} and x_{lab} respectively) as solutions. These can be obtained in any spreadsheet software with a linear regression function (LINEST in Microsoft Excel) inserting the data in matrix form. Then, since the added amount of labelled compound N_{lab} is known, the amount of natural compound in the sample N_{nat} is readily calculated (Table S.1. Supplementary information):

$$N_{nat} = N_{lab} \frac{x_{nat}}{x_{lab}}$$

As it can be seen, no methodological calibration procedures are required and a single injection provides one concentration value of the sample. The mass isotopomer distribution from each precursor ion has to be

determined experimentally in the mix and compared with the individual distributions corresponding to the natural and the labeled analyte, the reference distributions. These individual distributions can be theoretically calculated or experimentally measured. In the present work, they have been experimentally measured. In a first step, theoretical isotopomer distributions have been obtained by IsoPatrn software implemented by L. Ramaley and L. Cubero-Herrera[20]. Afterwards, only those transitions producing instrumental signal significantly different from background have been selected. A thorough description of the general IPD methodology and its application to different analyte types can be found in the literature[21-23].

2.5 Inter-laboratory experiment

For the inter-laboratory variability evaluation of both calibration and IPD methods, four laboratories were contacted and agreed to collaborate: Barcelona Antidoping Laboratory (Fundació IMIM, Barcelona, Spain), Doping Control Laboratory (DoCoLab, Ghent University, Ghent, Belgium), Norwegian Doping Control Laboratory (Oslo University Hospital, Oslo, Norway) and the Department of Physical and Analytical Chemistry at University of Oviedo (Oviedo, Spain).

Three plastic bags containing 12 mL of frozen samples A to F in individual Falcon tubes, a vial with 1 mL of $^{13}\text{C}_2\text{-T}$ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in MeOH and Instructions and Results documents were prepared. The bags were put into sealed packages with the required amount of dry ice to ensure sub-zero temperature conditions until arrival to the selected laboratories. Samples were processed and all the required measurements were performed in order to apply calibration and IPD calculations at our laboratory. In addition, laboratories were also asked to perform any other routine quantification method they had implemented (Table 2). Taking into account those extra quantification methods, we got 19 analytical results for each sample. These results were used to calculate

a consensus value for the concentration of each sample, C_{ref} , and its associated uncertainty, u_{ref} .

Table 2. Additional quantification procedures conducted in inter-comparison participating laboratories.

Laboratory	Additional analytical methods
IUPA	Standard additions (LC-MS/MS)
DoCoLab	GC-MS/MS, LC-HRMS
Norwegian Doping Control Laboratory	GC-MS/MS

2.6 Uncertainty assessment

In the present work, measurement of uncertainty was evaluated according to WADA technical document TD2014DL[24] and references therein. Specifically the procedure based in the Nordtest guide[25]. To this end, an intra-laboratory reproducibility experiment (five replicates of each sample along five weeks) and a short inter-laboratory comparison have been conducted. Combined uncertainty, u_{comb} , for each selected quantification method and sample were calculated and compared. Moreover, the inter-laboratory reproducibility standard deviation was calculated and compared for the three selected methods. Combined uncertainty has been calculated as:

$$u_{comb} = \sqrt{u_{SD}^2 + u_{bias}^2}$$

where u_{SD}^2 is the intra-laboratory reproducibility standard deviation for the five replicates obtained along five consecutive weeks at IUPA laboratory and u_{bias} is the uncertainty associated to any source of bias which accounts for the method and laboratory bias, including the uncertainty associated to the consensus reference value. To that purpose, a short inter-laboratory comparison was conducted and a whole of 19

quantification results have been obtained for each sample A to F (see inter-laboratory experiment section). Thus, u_{bias} was calculated as

$$u_{bias} = \sqrt{RMS^2 + u_{ref}^2}$$

where u_{ref} is the bias uncertainty associated to the consensus concentration value for each sample, C_{ref} , obtained by:

$$u_{ref} = \frac{S_R}{\sqrt{n}}$$

where S_R is the mean standard deviation for the inter-laboratory reproducibility and n is the number of results for each sample. A $n=17$ was employed instead of 19 due to exclusion of outliers determined by Hampel test (see results, Table 3 and Table S.7 from Supplementary Information).

RMS is the root mean square bias for each quantification method used in the intra-laboratory reproducibility assessment conducted at IUPA lab (for examples of calculations see Table S.2 in supplementary material).

For each sample (A to F) a mean bias has been calculated from the intra-lab reproducibility study ($n = 5$). These mean bias have been used to calculate RMS as:

$$RMS = \sqrt{\frac{\sum_i bias_i^2}{6}}$$

On the other hand, contribution of any source of uncertainty to a given measurement, known as full uncertainty budget, can be calculated using the Kragten approach [26]. Briefly, it consists in an approximation of error propagation theory calculations adapted for its implementation in spreadsheet programs (such as Microsoft's Excel). Calculation tables are constructed with all the parameters used to obtain the final analytical result including their uncertainty or standard deviation. Then, parameter values are sequentially altered with their SD to obtain the deviation (Δ^2)

produced to the analytical result in relation to the unchanged value, which constitutes the magnitude of contribution to total uncertainty of the analytical procedure. It is readily calculated for each parameter i as:

$$\Delta_i^2 = (x - x_i)^2$$

Where x is the unchanged value and x_i is the new value with one parameter altered. Then, total uncertainty of the procedure ($U(x)$) can be obtained using:

$$U(x) = \sqrt{\sum_i \Delta_i^2}$$

Examples of complete uncertainty calculations can be consulted in the Supplementary Information (Table S.2).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 IPD measurements

As explained above, IPD calculations rely on the relative abundance distribution of natural and labelled compounds and, therefore, on their accuracy. For this purpose, the most abundant SRM transitions for each compound were selected with IsoPatrn software. Then, relative abundances were experimentally determined by preparing individual 100 µg/L standards in MeOH/H₂O 1:1 (v/v) and injecting them five times each (Tables S.1 and S.2 in supplementary information). Mean values for experimental abundances were used in subsequent quantification procedure and standard deviations were used in the uncertainty budgets building procedure.

IPD calculation also requires to know the exact amount of labelled compound added to samples. Exact concentration of the ¹³C₂-T working standard solution was calculated by reverse isotope dilution (RID)

against the natural T solution, resulting in 12.20 ± 0.10 mg/L. (Table S.3 supplementary information).

3.2 Evaluation of uncertainty

Uncertainty has been assessed as intra-laboratory reproducibility standard deviation and through the reproducibility of an inter-laboratory comparison.

Intra-laboratory has been conducted at IUPA facilities. Five replicates of the synthetic urine samples (A to F) have been analyzed along five consecutive weeks. Concentration mean values, as well as standard deviation and RSD(%) are shown in Table 3.

Regarding intra-lab precision, wCal-IS shows RSD below 5% for any concentration level. IPD quantification performs slightly better while Cal-IS clearly achieves the worst reproducibility at the lower concentrations, reaching a value of 15.8 % at 2 ppb level. Concerning the inter-laboratory comparison, results are qualitatively similar. IPD shows the highest precision, with a mean RSD value around 10%, while wCal-IS doubles that value. On the other hand, Cal-IS shows the worst performance at the lowest levels, where RSD reaches values higher than 40%.

Thus, inter-laboratory reproducibility noticeably shows tendencies with concentration (Figure 1). Cal-IS performs poorly at low concentrations, with $RSD > 40\%$ in sample A, which decreases to values near 12% as concentrations get higher. In comparison, wCal-IS provided constant values of RSD along the concentration range (20%), improving uncertainty at low concentrations but performing slightly worse in the rest of the samples. IPD produced significantly lower dispersion of values resulting in the highest inter-laboratory precision (from 7.8% to 13%) of the three methods even at low concentrations.

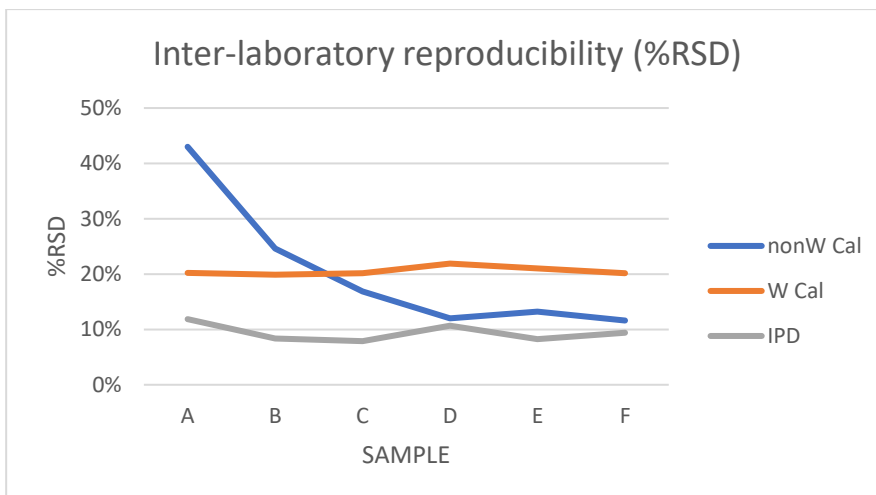


Figure 1. Mean inter-laboratory RSD values for the three quantification methods assayed. Concentration ranges from 2 ng/mL (sample A) to 70 ng/mL (sample F).

In addition to intra-laboratory reproducibility, combined uncertainty, u_c , were calculated in order to estimate the measurement uncertainty for the three quantification methods. To this end, method and laboratory bias were estimated, according to the Nordtest guide[25] (see experimental), as the square root of two components: the percentage of the mean difference (RMS_{bias}) from a reference value (C_{ref}), and uncertainty of this reference value, u_{ref} . The end value for u_c accounts for the method and laboratory bias together with standard deviation of reproducibility at each concentration assayed (A-F samples) (Table 4).

The consensus values obtained from the inter-laboratory comparison were adopted as reference values (Table 3). The consensus values are not intended to be used as certified values, but they were accepted as reference values to calculate bias uncertainty for each quantification methodology and to assess the bias associated to that reference value. A u_{ref} of 3.1% was obtained from the mean RSD value (12.9%) and $n=17$ from the 19 quantification procedures applied minus outlier values (see experimental section and Supplementary Information for details).

Table 3. Intra-laboratory and inter-laboratory precision data for the three quantification methodologies assayed and for the consensus value. Ca_I_IS: non-weighted calibration with internal standard; w-Ca_I_IS: weighted calibration with internal standard; IPD: isotope pattern deconvolution.

Sample	Mean ± SD (RSD%) ng/mL						Consensus C _{ref} (n=17) ^c
	Intra-lab reproducibility (n=5) ^a			Inter-lab reproducibility (n=5) ^b			
	Ca _I _IS	w-Ca _I _IS	IPD	Ca _I _IS	w-Ca _I _IS	IPD	
A	1.9 ± 0.3 (15.8)	2.04 ± 0.06 (2.9)	2.10 ± 0.04 (1.9)	2.1 ± 0.9 (43)	2.2 ± 0.4 (18)	2.3 ± 0.3 (13)	2.0 ± 0.4 (20)
B	3.6 ± 0.3 (8.3)	3.78 ± 0.14 (3.7)	3.87 ± 0.06 (1.6)	4.1 ± 1.0 (24)	4.2 ± 0.8 (19)	4.3 ± 0.4 (9.3)	4.0 ± 0.4 (10)
C	10.1 ± 0.4 (4.0)	10.3 ± 0.5 (4.9)	10.48 ± 0.22 (2.1)	11.2 ± 1.9 (17)	11.6 ± 2.3 (20)	11.6 ± 0.9 (7.8)	11.2 ± 1.2 (11)
D	17.1 ± 0.9 (5.3)	17.4 ± 0.8 (4.6)	17.7 ± 0.6 (3.4)	19.5 ± 2.3 (12)	20 ± 4 (20)	20.3 ± 2.2 (11)	20 ± 3 (15)
E	51.7 ± 1.3 (2.5)	52.0 ± 1.1 (2.1)	52.9 ± 0.9 (1.7)	57 ± 8 (14)	60 ± 13 (22)	60 ± 5 (8.3)	57 ± 6 (11)
F	67.8 ± 1.9 (2.8)	68.0 ± 1.6 (2.4)	69.2 ± 0.9 (1.3)	75 ± 9 (12)	77 ± 16 (21)	78 ± 7 (9.0)	76 ± 10 (13)

^a Results from IUPA laboratory

^b One result from each of the five participant laboratories

^c Consensus value calculated as the mean value for the results obtained from all quantification methodologies used in the interlaboratory comparison. Outlier values were excluded following Hampel test (Table S.7). Associated bias uncertainty of C_{ref} (U_{ref}) calculated from the Mean RSD% is 3.1% (see Table S.5)

Table 4. Combined uncertainty for the three quantification methodologies assayed.

Sample	Combined uncertainty (%)		
	Cal_IS	w-Cal_IS	IPD
U_{ref}		3.1%	
RMS_{bias}	10.4%	8.3%	6.9%
U_{bias}	10.9%	8.8%	7.6%
A	17.9%	9.4%	7.8%
B	13.2%	9.6%	7.8%
C	11.7%	10.0%	7.9%
D	12.0%	10.0%	8.4%
E	11.2%	9.1%	7.8%
F	11.3%	9.1%	7.7%

Since the data required for Cal-IS and wCal-IS is exactly the same, taking into account the difference in combined uncertainty (11.2%-17.9% versus 9.1-10.0%) it is worth noting the improved quality of analytical results due only to the data treatment.

Along with wCal-IS, IPD stands out in comparison with more extensively used methods such as Cal-IS. Furthermore, IPD also provided combined uncertainties below 8.4% in all the concentration range with the advantage of reduced time analysis, since no calibration curve procedure had to be performed.

Again, results showed that Cal-IS performs poorly at low concentrations, being the worse method for the whole concentration range studied. In comparison, wCal-IS provided constant values of combined uncertainty along the concentration range although higher than IPD, which produced the lowest combined uncertainties of the three methods at any concentration assayed. This is in accordance with the high metrological quality of analytical results provided by isotope dilution mass spectrometry determinations[21].

Finally, full uncertainty budgets were obtained for the three selected quantification methods according to the Kragten approach (Table S.6 in supplementary material).

In the case of both wCal-IS and Cal-IS methods, the same 6 parameters were considered, including: intercept and slope of the linear regression, measurement of the area ratio in the sample (between natural and labelled compound chromatographic peak areas, Rm), volume of sample (Vs), volume of internal standard (Vt) and concentration of the natural standard (Cn). Calculations of the contribution of each parameter to total procedure uncertainty were carried out for the five replicates and the average values were obtained.

As it can be seen in Figure 2, in the case of Cal-IS, uncertainty contribution coming from the intercept of the regression is predominant at low concentrations (Sample A) while at high concentrations (Sample F) slope is the highest contributor to final method uncertainty. Thus, uncertainty for a Cal-IS method will hardly improve experimentally. In contrast, when using weighted calibration, the major contributors to uncertainty were the measurement of sample and internal standard volumes. Thus, one way to easily reduce uncertainty could be consider the mass instead of volumes.

On the other hand, the parameters considered for uncertainty calculations in IPD quantification were the following: determination of abundances of the natural testosterone ($natT-1$, $natT-2$) and $^{13}C_2$ -testosterone ($labT-1$, $labT-2$) transitions, measurement of those transitions in the sample blend ($B-1$, $B-2$, $B-3$, $B-4$), volume of sample (Vs) and volume and concentration of $^{13}C_2$ -testosterone standard added (Vt , Ct).

As it might be expected for an isotope-dilution determination[21], one of the most important parameters in IPD was the volume of labelled compound added to perform the quantification. As said above, this contribution to uncertainty could be minimized by weighting the amount of solution added. Moreover, the measurement of relative abundances in

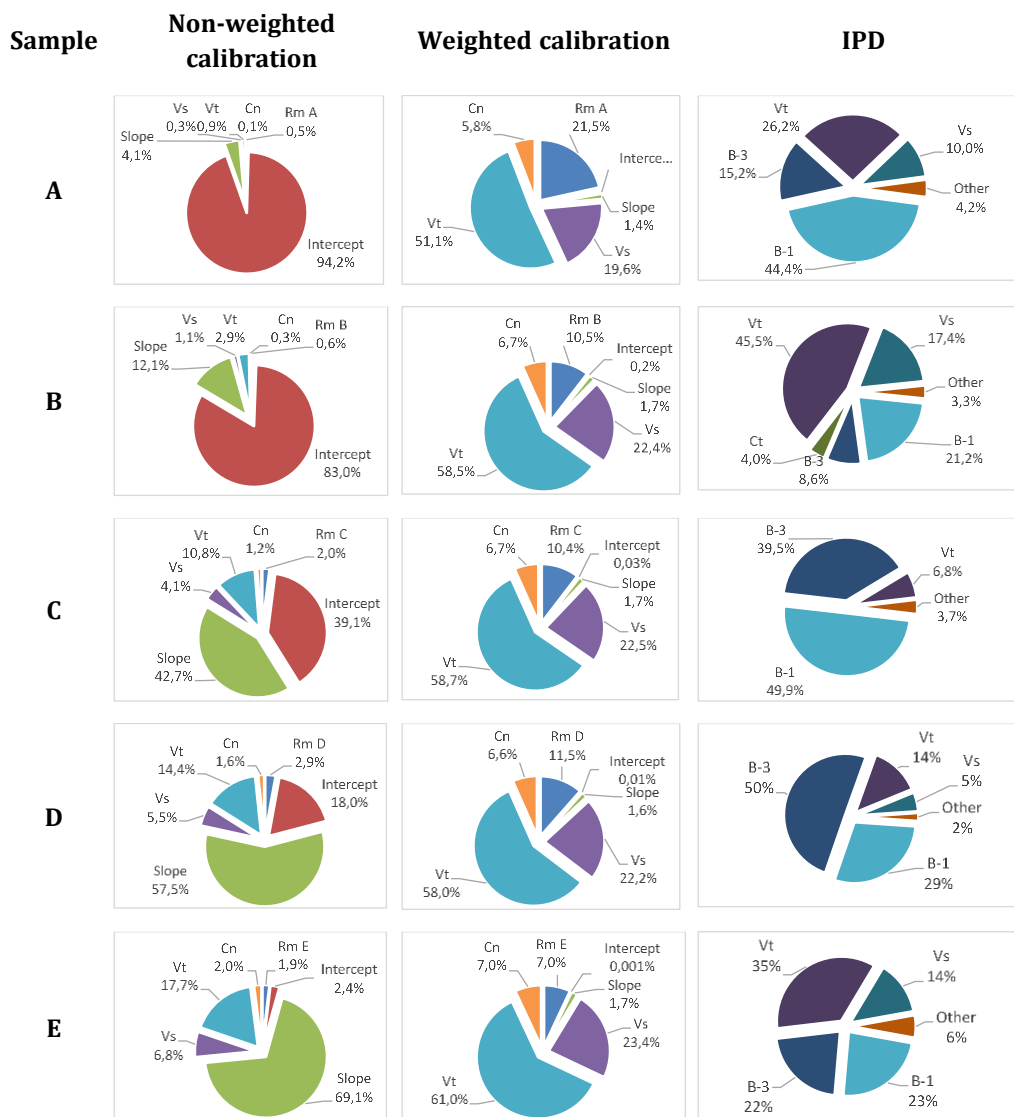


Figure 2. Uncertainty budgets for the quantification methods assayed.

the sample blend, especially the most abundant transitions of natural (B-1: 289 > 97) and labelled compounds (B-3: 291 > 99), contributed significantly to the final uncertainty with relative magnitudes from 8.6% to 50%.

4. CONCLUSIONS

In this work, three analytical approaches for the determination of testosterone in urine have been compared from an uncertainty evaluation point of view.

Firstly, method uncertainty derived from the procedure itself has been evaluated at our laboratory by applying weighted and non-weighted calibration with internal standard and IPD quantifications to 6 synthetic urine samples, composed of mixed human urine samples, in five different weeks. Inter-day combined uncertainties for each sample and method were obtained by Nordtest calculation method and showed similar values for weighted calibration and IPD, below or equal to 10% in all cases, while non-weighted calibration yielded uncertainties ranging from 11.2% to 17.9%.

Secondly, an inter-laboratory experiment was carried out in order to set a reference value for the samples and to further evaluate inter-laboratory RSD of these three methods. Similarly to the intra-laboratory experiment, non-weighted calibration presented much higher uncertainty at low concentrations (43%) than at medium and high concentrations (12%-24%), where it showed a better performance than weighted calibration (18%-21% along all the range). In contrast, the combined uncertainty associated with IPD method was lower than the other two in all 6 samples, ranging from 7.8% to 13%.

In addition, Kragten method was applied to intra-laboratory data to obtain the uncertainty budgets for the considered quantification methods. Thus, linear regression parameters –slope and intercept– were found to be the major contributors to uncertainty in non-weighted calibration, varying along the concentration range. In contrast, weighted calibration and IPD methods were more stable in terms of relative contributions to procedure uncertainty.

Hence, it has been demonstrated that weighted calibration might be more precise than classical calibration with internal standard, providing similar uncertainties and standard deviations than isotope dilution methodologies in intra-laboratory reproducibility studies. Moreover, the present IPD methodology yielded lower inter-laboratory variability and thus, higher metrological quality of the analytical results are expected.

The results presented in this work for testosterone as a model compound, together with the benefits of reduced time analysis and matrix effect corrections provided by IDMS-based methodologies, highlights IPD as a rapid, robust and reliable method. Thus, taking into account the lower uncertainty of the present analytical approach, IPD is shown as a promising alternative to improve longitudinal fluctuations in steroid profiling.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge financial support from the Generalitat Valenciana (Research group of excellence Prometeo II 2014/023 and Collaborative Research on Environment and Food Safety ISIC/2012/016), as well as University Jaume I for project PB1-1B2013-55. Finally, the authors are grateful to the Serveis Centrals d'Instrumentació Científica (SCIC) of University Jaume I for using Acquity and TQD instruments.

REFERENCES

- [1] F. Gosetti, E. Mazzucco, M.C. Gennaro, E. Marengo, Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry determination and profiling of prohibited steroids in human biological matrices. A review, *J. Chromatogr. B.* 927 (2013) 22–36. doi:10.1016/j.jchromb.2012.12.003.
- [2] F. Botrè, New and old challenges of sports drug testing, *J. Mass Spectrom.* 43 (2008) 903–907. doi:10.1002/jms.1455.

- [3] A. Jarek, K. Kowalczyk, P. Chołbiński, K. Chajewska, E. Turek-Lepa, A. Pokrywka, E. Bulska, D. Kwiatkowska, Analytical procedure for steroid profiling valid for Athlete Biological Passport, *Chem. Pap.* 69 (2015) 254–261. doi:10.1515/chempap-2015-0030.
- [4] C. Saudan, Testosterone and doping control, *Br. J. Sports Med.* 40 (2006) i21–i24. doi:10.1136/bjsm.2006.027482.
- [5] F. Badoud, D. Guillarme, J. Boccard, E. Grata, M. Saugy, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, Analytical aspects in doping control: Challenges and perspectives, *Forensic Sci. Int.* 213 (2011) 49–61. doi:10.1016/j.forsciint.2011.07.024.
- [6] R. Nicoli, D. Guillarme, N. Leuenberger, N. Baume, N. Robinson, M. Saugy, J.-L. Veuthey, Analytical Strategies for Doping Control Purposes: Needs, Challenges, and Perspectives, *Anal. Chem.* 88 (2016) 508–523. doi:10.1021/acs.analchem.5b03994.
- [7] G.J. Trout, R. Kazlauskas, Sports drug testing - an analyst's perspective, *Chem. Soc. Rev.* 33 (2004) 1. doi:10.1039/b201476a.
- [8] World Anti-Doping Agency, WADA Technical Document – TD2016EAAS, (2016) 1–16.
- [9] M. Thevis, A. Thomas, V. Pop, W. Schänzer, Ultrahigh pressure liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry in human sports drug testing: Possibilities and limitations, *J. Chromatogr. A.* 1292 (2013) 38–50. doi:10.1016/j.chroma.2012.12.048.
- [10] P.J. Taylor, Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry, *Clin. Biochem.* 38 (2005) 328–334. doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.11.007.

- [11] A. Furey, M. Moriarty, V. Bane, B. Kinsella, M. Lehane, Ion suppression; A critical review on causes, evaluation, prevention and applications, *Talanta*. 115 (2013) 104–122. doi:10.1016/j.talanta.2013.03.048.
- [12] H. Trufelli, P. Palma, G. Famiglini, A. Cappiello, An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 30 (2011) 491–509. doi:10.1002/mas.20298.
- [13] A. González-Antuña, P. Rodríguez-González, G. Centineo, J.I. García Alonso, Evaluation of minimal ¹³C-labelling for stable isotope dilution in organic analysis, *Analyst*. 135 (2010) 953. doi:10.1039/b924432h.
- [14] N. Fabregat-Cabello, J. Pitarch-Motellón, J. V. Sancho, M. Ibáñez, A.F. Roig-Navarro, Method development and validation for the determination of selected endocrine disrupting compounds by liquid chromatography mass spectrometry and isotope pattern deconvolution in water samples. Comparison of two extraction techniques, *Anal. Methods*. 8 (2016) 2895–2903. doi:10.1039/C6AY00221H.
- [15] N. Fabregat-Cabello, P. Zomer, J.V. Sancho, A.F. Roig-Navarro, H.G.J. Mol, Comparison of approaches to deal with matrix effects in LC-MS/MS based determinations of mycotoxins in food and feed, *World Mycotoxin J.* 9 (2016) 149–161. doi:10.3920/WMJ2014.1872.
- [16] N. Fabregat-Cabello, J. V Sancho, A. Vidal, F. V González, A.F. Roig-Navarro, Development and validation of a liquid chromatography isotope dilution mass spectrometry method for the reliable quantification of alkylphenols in environmental water samples by isotope pattern deconvolution., *J. Chromatogr. A*. 1328 (2014) 43–51. doi:10.1016/j.chroma.2013.12.077.

- [17] E. Spirito, F. Botre, The role of measurement uncertainty in doping analysis, *Int. J. Risk Assess. Manag.* 5 (2005) 374. doi:10.1504/IJRAM.2005.007178.
- [18] O. Barroso, J. Miller, A. Squirrell, S. Westwood, Measurement uncertainty in anti-doping quantitative analysis for prohibited threshold substances, *Bioanalysis.* 4 (2012) 1653–1665. doi:10.4155/bio.12.127.
- [19] J.I.G. Alonso, P. Rodríguez-González, *Isotope dilution mass spectrometry*, Royal Society of Chemistry, 2013.
- [20] L. Ramaley, L.C. Herrera, Software for the calculation of isotope patterns in tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 2707–2714. doi:10.1002/rcm.3668.
- [21] J.I.G. Alonso, P. Rodríguez-González, *Isotope dilution mass spectrometry*, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 2739–2740. doi:10.1007/s00216-014-7662-6.
- [22] P. Rodríguez-González, J.I. García Alonso, Recent advances in isotope dilution analysis for elemental speciation, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 239. doi:10.1039/b924261a.
- [23] Á. Castillo, E. Gracia-Lor, A.F. Roig-Navarro, J.V. Sancho, P. Rodríguez-González, J.I.G. Alonso, Isotope pattern deconvolution-tandem mass spectrometry for the determination and confirmation of diclofenac in wastewaters, *Anal. Chim. Acta.* 765 (2013) 77–85. doi:10.1016/j.aca.2012.11.033.
- [24] World Anti-Doping Agency, *Technical Document-TD2014DL Decision Limits for the Quantification of Threshold Substances*, (n.d.).
- [25] Nordtest, *Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories*, (2012).

[26] J. Kragten, Tutorial review. Calculating standard deviations and confidence intervals with a universally applicable spreadsheet technique, *Analyst*. 119 (1994) 2161. doi:10.1039/an9941902161.

SUPPLEMENTARY INFORMATION**Table S1.** Experimental abundances of natural testosterone.

<i>m/z</i>	Avge (n=6)	SD	RSD
289 > 95	0.0362	0.0013	3.5%
289 > 96	0.0046	0.0003	6.1%
289 > 97	0.780	0.003	0.4%
289 > 98	0.00033	0.00005	15.9%
290 > 95	0.0046	0.0004	8.6%
290 > 96	0.00336	0.00021	6.3%
290 > 97	0.1113	0.0014	1.3%
290 > 98	0.0507	0.0012	2.4%
290 > 99	0.00010	0.00006	63.6%
291 > 97	0.0089	0.0005	5.8%

Table S2. Experimental abundances of labelled testosterone.

<i>m/z</i>	Avge (n=6)	SD	RSD
290 > 98	0.0127	0.0003	2.5%
291 > 97	0.0104	0.0003	2.8%
291 > 98	0.0071	0.0003	4.9%
291 > 99	0.8075	0.0018	0.2%
292 > 97	0.00164	0.00009	5.6%
292 > 98	0.00143	0.00011	8.0%
292 > 99	0.1156	0.0016	1.3%
292 > 100	0.0345	0.0008	2.4%
293 > 99	0.0092	0.0003	3.1%

Table S3. Example of Reverse Isotope Dilution calculation.

	Abundances		
	Labeled	Natural	Mix
289 > 95	0	0.036197	0.011
289 > 97	0	0.779939	0.233
290 > 97	0	0.111252	0.034
290 > 98	0.012692	0.050715	0.025
291 > 97	0.010432	0	0.010
291 > 99	0.807504	0	0.579
292 > 99	0.115554	0	0.083
292 > 100	0.034502	0	0.025

Linear regression		Nat	Lab
Nat	Lab		
0.29833175	0.71738866	0.29371444	0.70628556
0.00158345	0.00153239		
0.99997646	0.00125139		
127418.828	6		
0.39906796	9.3958E-06		

m 13C2-T	0.0308 g	Mw 13C2-T	290.389663
m T	0.1992 g	Mw T	288.42442
N natT	6.7982E-10 mol	d MeOH	0.791 g/mL
N labT	1.6347E-09 mol		
[13C2-T]	12.1914444 mg/L		

Table S.4 Example of IPD calculation for sample A.

Injection 1		Abundances		Ab mix		Linear Regression		Molar fractions	
<i>m/z</i>	Area	Labelled	Natural	Ab mix	Linear Regression	Nat	Lab	Nat	Lab
289.2 > 96.9	11651.055	0	0.7799389	0.12764284				0.15029245	0.84970755
290.2 > 96.9	1678.353	0	0.11125233	0.01838715					
291.2 > 98.9	68217.188	0.80750387	0	0.74735168					
292.2 > 98.9	9731.968	0.11555358	0	0.10661833					
Sum	91278.564								
1									
Injection 2		Abundances		Ab mix		Linear Regression		Molar fractions	
<i>m/z</i>	Area	Labelled	Natural	Ab mix	Linear Regression	Nat	Lab	Nat	Lab
289.2 > 96.9	11482.987	0	0.7799389	0.12580157				0.15122272	0.84877728
290.2 > 96.9	1704.46	0	0.11125233	0.01867317					
291.2 > 98.9	66792.43	0.80750387	0	0.73174278					
292.2 > 98.9	9491.98	0.11555358	0	0.10398915					
Sum	89471.857			0.98020667					
								[T] ng/mL (ppb) 2.11 2.13	
Inj 1		N lab		X nat	X lab		N nat		
		1.03E-10		0.15029245	0.84970755		1.83E-11		
Inj 2		1.03E-10		0.15122272	0.84877728		1.84E-11		
A									
Testosterone in sample (ng/mL)									
		Mean		SD	RSD				
		2.119		0.011	0.51%				

Table S.5 Inter-laboratory uncertainty calculations.

Sample	REFERENCE VALUES		
	Mean	SD	RSD
A	2.0	0.4	20%
B	4.0	0.4	10%
C	11.2	1.2	11%
D	20	3	14%
E	57	6	10%
F	76	10	13%

n= 17

Sample	Combined uncertainty (%)		
	Ca_IS	w-Ca_IS	IPD
u_{ref}	3.1%		
RMS_{bias}	10.4%	8.3%	6.9%
u_{bias}	10.9%	8.8%	7.6%
A	17.9%	9.4%	7.8%
B	13.2%	9.6%	7.8%
C	11.7%	10.0%	7.9%
D	12.0%	10.0%	8.4%
E	11.2%	9.1%	7.8%
F	11.3%	9.1%	7.7%

Sample	Mean			SD			RSD			bias		
	Ca_IS	w-Ca_IS	IPD	Ca_IS	w-Ca_IS	IPD	Ca_IS	w-Ca_IS	IPD	Ca_IS	w-Ca_IS	IPD
A	1.847	2.039	2.097	0.263	0.064	0.037	14.2%	3.2%	1.8%	-9.8%	-0.4%	2%
B	3.585	3.781	3.866	0.269	0.141	0.065	7.5%	3.7%	1.7%	-9.4%	-4.4%	-2%
C	10.083	10.297	10.484	0.442	0.471	0.216	4.4%	4.6%	2.1%	-10.2%	-8.3%	-7%
D	17.148	17.370	17.671	0.871	0.831	0.621	5.1%	4.8%	3.5%	-12.6%	-11.5%	-10%
E	51.745	52.034	52.925	1.348	1.095	0.898	2.6%	2.1%	1.7%	-9.6%	-9.1%	-8%
F	67.775	68.094	69.231	1.938	1.575	0.938	2.9%	2.3%	1.4%	-10.7%	-10.3%	-9%

Table S.6 Example of Kragten calculation for an IPD measurement in sample C.

Param.	natT-1	natT-2	labT-1	labT-2	B-1	B-2	B-3	B-4	[13C2-T]	V 13C2-T	V sample
Mean	0.779939	0.111252	0.807504	0.115554	0.404296	0.058734	0.465375	0.066689	1.202	25.00	2.5
SD	0.002937	0.001424	0.001774	0.001558	0.004796	0.002356	0.004769	0.000271	0.006	0.40	0.025
Par / Calc	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
natT-1	0.779939	0.782876	0.779939	0.779939	0.779939	0.779939	0.779939	0.779939	0.779939	0.779939	0.779939
natT-2	0.111252	0.111252	0.112677	0.111252	0.111252	0.111252	0.111252	0.111252	0.111252	0.111252	0.111252
labT-1	0.807504	0.807504	0.807504	0.809278	0.807504	0.807504	0.807504	0.807504	0.807504	0.807504	0.807504
labT-2	0.115554	0.115554	0.115554	0.115554	0.117112	0.115554	0.115554	0.115554	0.115554	0.115554	0.115554
B-1	0.404296	0.404296	0.404296	0.404296	0.409092	0.404296	0.404296	0.404296	0.404296	0.404296	0.404296
B-2	0.058734	0.058734	0.058734	0.058734	0.058734	0.061090	0.058734	0.058734	0.058734	0.058734	0.058734
B-3	0.465375	0.465375	0.465375	0.465375	0.465375	0.465375	0.470144	0.465375	0.465375	0.465375	0.465375
B-4	0.066689	0.066689	0.066689	0.066689	0.066689	0.066689	0.066689	0.066960	0.066689	0.066689	0.066689
[13C2-T]	1.202	1.202	1.202	1.202	1.202	1.202	1.202	1.202	1.208	1.202	1.202
V 13C2-T	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25.40	25
V sample	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.525
N lab	1.0348E-10	1.0348E-10	1.0348E-10	1.0348E-10	1.0348E-10	1.0348E-10	1.0348E-10	1.0348E-10	1.0398E-10	1.0514E-10	1.0348E-10
X nat	0.473618798	0.47270004	0.47355551	0.47415507	0.47368704	0.47650009	0.47382173	0.47112828	0.47359846	0.4736188	0.4736188
X lab	0.526381202	0.52729996	0.52644449	0.52584493	0.52631296	0.523349991	0.52617827	0.52887172	0.52640154	0.5263812	0.5263812
N nat	9.31121E-11	9.277E-11	9.3088E-11	9.3313E-11	9.3138E-11	9.4194E-11	9.3188E-11	9.2186E-11	9.3104E-11	9.356E-11	9.3112E-11
[T]	10.74231572	10.7027961	10.7395892	10.7654469	10.7452565	10.8671517	10.7510634	10.6355065	10.7414393	10.7939453	10.9141928
Δ²	-	0.0015618	7.4339E-06	0.00053505	8.6479E-06	0.01558402	7.6522E-05	0.0114082	7.6805E-07	0.00266562	0.01131236
s_r² = ΣΔ²	0.07270213										
U	0.269633325										

Mw 13C2-T	290.3897
Mw T	288.4244

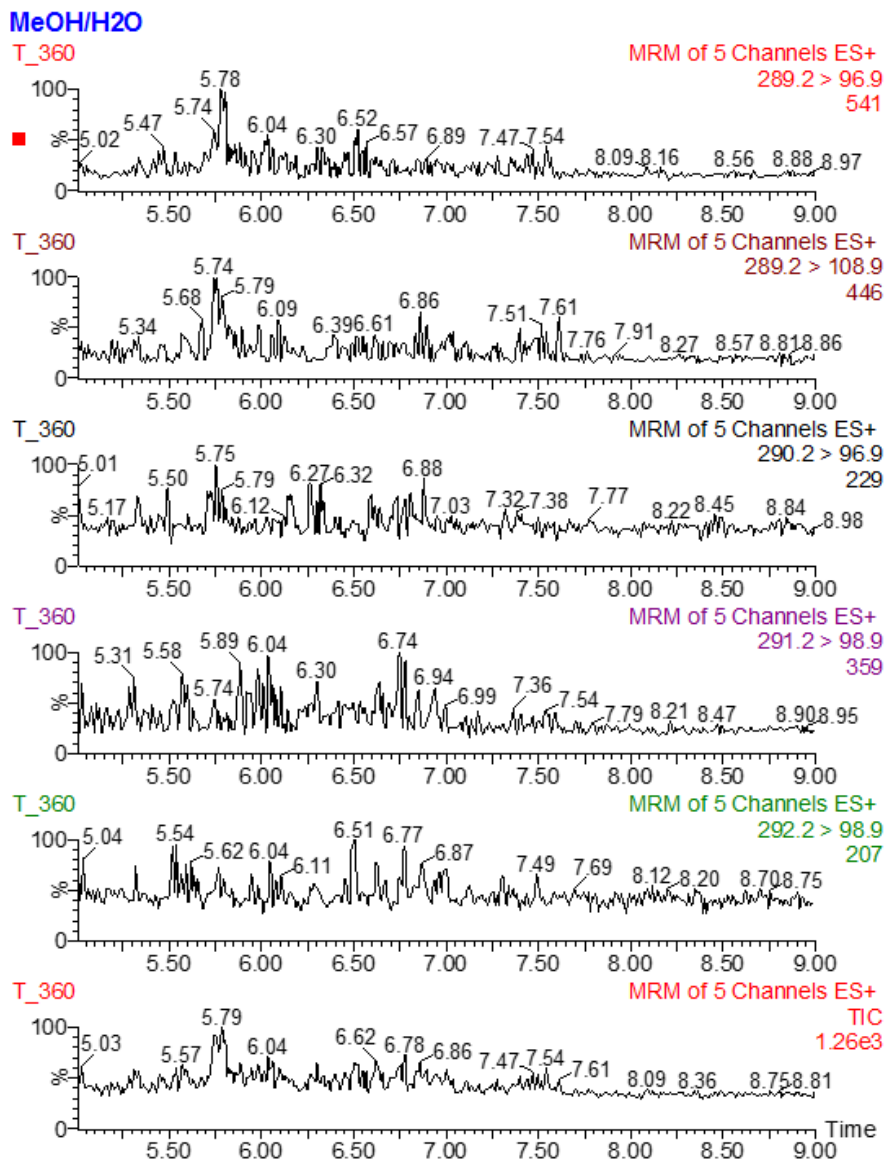
3%

Table S.7 Hampel test calculation example for sample A.

Method	Lab	Mean	SD	Abs Dev	Hampel score	w/o outliers
IPD	IUPA	2.097	0.037	0.058	0.177	2.097
	Oslo	1.943	0.060	0.096	0.293	1.943
	IMIM	2.233	0.071	0.194	0.592	2.233
	Ghent	2.572	0.003	0.533	1.629	2.572
	Oviedo	2.517	0.021	0.478	1.459	2.517
wCal	IUPA	2.039	0.064	0.000	0	2.039
	Oslo	2.020	0.064	0.019	0.057	2.020
	IMIM	2.969	0.099	0.930	2.841	2.969
	Ghent	2.190	0.002	0.152	0.463	2.190
	Oviedo	1.818	0.016	0.221	0.674	1.818
non-wCal	IUPA	1.847	0.263	0.192	0.587	1.847
	Oslo	1.635	0.064	0.404	1.234	1.635
	IMIM	3.653	0.082	1.614	4.931	
	Ghent	1.860	0.002	0.179	0.547	1.860
	Oviedo	1.648	0.017	0.391	1.193	1.648
Std Add	IUPA	2.127	0.086	0.088	0.269	2.127
GC-MS/MS	Oslo	2.47	-	0.431	1.317	2.470
GC-MS/MS	Ghent	1.58	-	0.459	1.402	1.580
LC-HRMS	Ghent	1.28	0.22	0.759	2.318	1.280
Median		2.039	MAD	0.221	Consensus	2.047
					SD	0.410

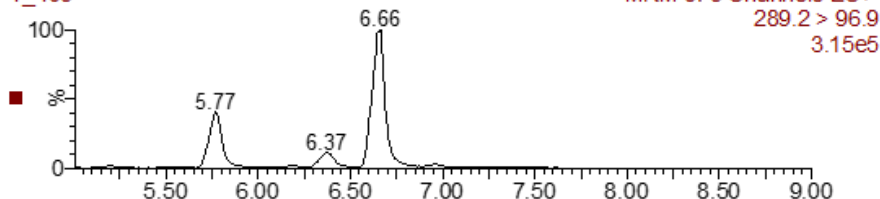
Hampel test was applied to all samples, giving from 0 to 2 outlier results. Thus, a n=17 instead of 19 was used for uncertainty estimation since it was the lowest number of valid results.

Figure S.8 Blank (MeOH/H₂O) and sample chromatograms.

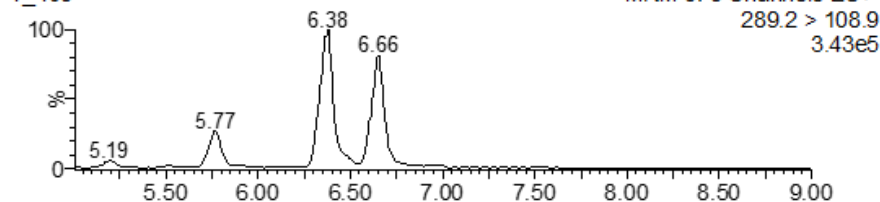


Sample 15

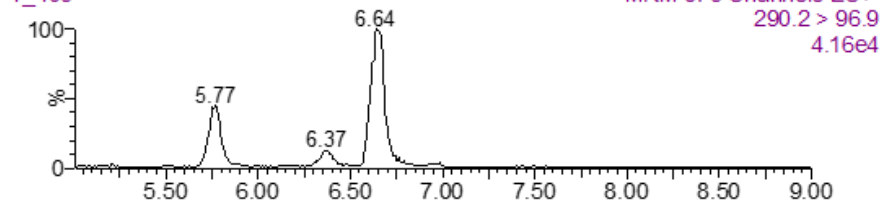
T_405



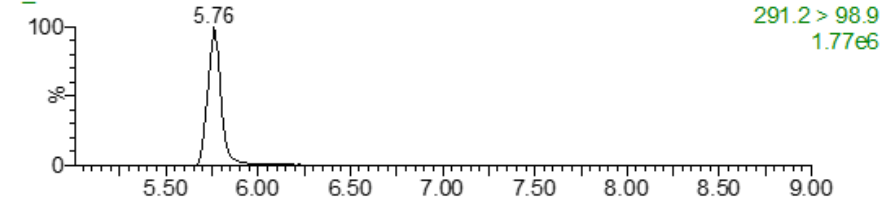
T_405



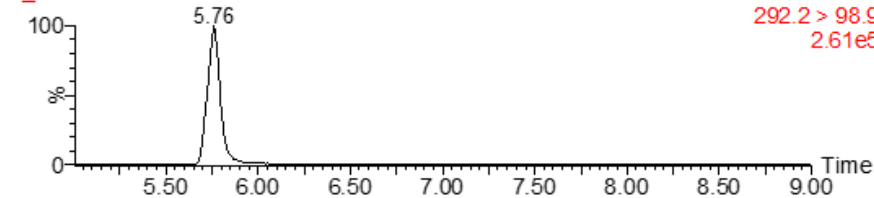
T_405



T_405



T_405



2.3 Determinación de esteroides anabólicos androgénicos endógenos seleccionados y relaciones en orina mediante cromatografía líquida de ultra alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem y deconvolución de perfiles isotópicos

Como se ha visto en el apartado anterior, la aplicación de IPD a la determinación de esteroides es una opción no sólo viable, sino rápida y de una mayor calidad metrológica en relación a otras metodologías de cuantificación basadas en IDMS.

Una vez estudiada esta posibilidad para la testosterona como compuesto modelo, en esta segunda aportación científica se explora más en profundidad esta propuesta con la extensión de la metodología desarrollada en el capítulo anterior a un mayor número de analitos.

Concretamente, los analitos seleccionados fueron testosterona (T), epitestosterona (E), androsterona (A) y etiocolanolona (Etio); todos ellos esteroides anabólicos androgénicos endógenos (EAAS) e incluidos tanto en la Lista de Sustancias Prohibidas de la WADA³⁴ como en el módulo esteroide del Pasaporte Biológico del Atleta^{17,35}. No obstante, en este último también se incluyen otros dos analitos, 5 α -androstan-3 α ,17 β -diol (5 α Adiol) y 5 β -androstan-3 α ,17 β -diol (5 β Adiol), que no fueron incluidos en el presente artículo.

Estos dos compuestos presentan un esqueleto similar al del resto de EAAS (*Figura 2.3*), conteniendo los 4 anillos que lo componen totalmente saturados, al igual que A y Etio. En cambio, a diferencia de éstos y de la pareja T/E, 5 α Adiol y 5 β Adiol presentan dos hidroxilos en las posiciones 3 y 17. Estas dos características provocan que no existan grupos funcionales fácilmente ionizables mediante una ionización “blanda” como es la interfase ESI en LC³⁶. La cuantificación de ambos dioles requiere el

uso de técnicas clásicas basadas en GC. Alternativamente, el análisis directo de esteroides sin hidrólisis del conjugado con glucurónido podría, según experimentos tentativos (datos no mostrados), permitir la cuantificación del conjunto completo de esteroides.

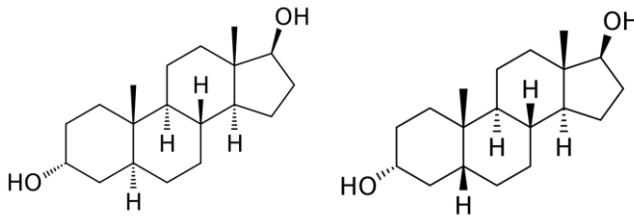


Figura 2.3. Estructuras de los dioles endógenos 5αAdiol y 5βAdiol.

A continuación, se presenta el desarrollo de un método para el análisis de T, E, A y Etio en orina humana mediante LC-MS/MS y cuantificación por IPD, validado mediante el análisis de materiales de referencia certificados (CRM). Este método, al igual que el desarrollado en el apartado anterior, reafirma el potencial de IPD como método rápido, fiable y exacto de esteroides en orina, así como permitir el cálculo de las relaciones de concentración recomendadas por la WADA para EAAS¹⁷.

2.3.1 Selección de compuestos marcados

El desarrollo de la metodología de cuantificación por IPD se completó de manera similar al estudio anterior sobre la testosterona. A diferencia de aquél, en el cual se empleó el compuesto marcado con carbono-13 (¹³C₂-T), en este caso se optó por un marcaje con deuterio (²H o D) para todos los compuestos considerados (d₃-T, d₃-E, d₄-AN y d₅-Etio).

Si bien es sabido que el uso de compuestos marcados con deuterio puede dar lugar a fenómenos de “scrambling” en sistemas de espectrometría de masas en tándem^{37,38}, el proceso de caracterización llevado a cabo durante los primeros pasos del desarrollo de IPD no se ve alterado. Dado que las abundancias relativas de referencia de los compuestos marcados se

adquieren en las mismas condiciones que en la muestra los posibles efectos de “scrambling” ocurren de forma idéntica en estándares (caracterización del perfil de abundancias) y en mezclas (muestra). Por tanto, una correcta caracterización previa evita la aparición de problemas. Este hecho sí sería importante en el caso de utilizar abundancias teóricas en lugar de experimentales, ya que las abundancias teóricas se calculan a partir de datos tabulados de abundancias isotópicas elementales y no tiene en cuenta los efectos instrumentales.

2.3.2 Artículo científico 2

Determination of selected endogenous anabolic androgenic steroids and ratios in urine by UHPLC-MS/MS and isotope pattern deconvolution

Pitarch-Motellón, J., Sancho, J.V., Ibáñez, M., Pozo, O., Roig-Navarro, A.F.
Journal of Chromatography A 2017, 1515, 172-178.

Journal of Chromatography A, 1515 (2017) 172–178



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

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



Determination of selected endogenous anabolic androgenic steroids and ratios in urine by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and isotope pattern deconvolution[☆]



J. Pitarch-Motellón^a, J.V. Sancho^a, M. Ibáñez^a, O. Pozo^b, A.F. Roig-Navarro^{a,*}

^a Research Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, E-12071, Castellón, Spain

^b Bioanalysis Research Group, IMIM, Hospital del Mar, 08003, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 March 2017
Received in revised form 19 July 2017
Accepted 2 August 2017
Available online 3 August 2017

Keywords:

Endogenous steroids
Urine
LC-MS/MS
IDMS
Isotope pattern deconvolution

ABSTRACT

An isotope dilution mass spectrometry (IDMS) method for the determination of selected endogenous anabolic androgenic steroids (EAAS) in urine by UHPLC-MS/MS has been developed using the isotope pattern deconvolution (IPD) mathematical tool. The method has been successfully validated for testosterone, epitestosterone, androstosterone and etiocholanolone, employing their respective deuterated analogs using two certified reference materials (CRM). Accuracy was evaluated as recovery of the certified values and ranged from 75% to 108%. Precision was assessed in intraday (n=5) and interday (n=4) experiments, with RSDs below 5% and 10% respectively. The method was also found suitable for real urine samples, with limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) below the normal urinary levels. The developed method meets the requirements established by the World Anti-Doping Agency for the selected steroids for Athlete Biological Passport (ABP) measurements, except in the case of androstosterone, which is currently under study.

© 2017 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Misuse of steroids is nowadays a significant social issue. Apart from doping in sports, endogenous anabolic androgenic steroids (EAAS) use has become a problem of public health [1]. Regarding substances prohibited in sports, over the years consensus has been achieved about which steroidal markers must be controlled as an additional part of the World Anti-Doping Agency (WADA) Athlete Biological Passport (ABP), the steroidal module [2]. Testosterone (T), epitestosterone (E), androstosterone (A), etiocholanolone (Etio), 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol (5 α Adiol), 5 β -androstane-3 α ,17 β -diol (5 β Adiol) and the ratios T/E, A/T, A/Etio, 5 α Adiol/5 β Adiol, 5 β Adiol/E are the parameters of choice. An abnormal steroidal or longitudinal profiles may constitute a suspicion of doping, thus, reliable analytical methods are needed to assess the concentration of those EAAS. Moreover, clear verification of exogenous administration of EAAS is still a challenge. The

general workflow includes an initial screening method followed by a confirmation if adverse results are found. However, in spite of WADA efforts, a completely standardized methodology has not been established yet, neither by the mass detector (Q or QqQ), nor by the sample treatment method used in that initial screening step [3]. Although the accepted WADA quantification method for EAA determination in urine is GC/MS [2], among current instrumental techniques in drug testing, UHPLC-MS/MS is mainly used due to its high throughput, chromatographic performance and sensitivity [4–6].

On the other hand, ESI, the most employed ionisation source in LC-MS instrumental techniques can suffer severe matrix effect problems, mainly related with ion suppression or enhancement [7–9]. The use of isotope labelled internal standards (IIS) is widely recognized as the best way to overcome matrix effect problems. Thus, quantification through isotope dilution mass spectrometry (IDMS) works out the issues related with signal alteration [10,11]. A recently developed IDMS method of quantification, isotope pattern deconvolution (IPD), does not rely on the construction of any calibration graph. IPD involve the artificial alteration of the natural isotopomer abundances of a compound in a sample by the addition of a known amount of a labelled analogue. The isotopic composition of the blend is a linear combination of two isotope patterns: that of the natural abundance compound and the isotope pattern

[☆] Selected paper from the XVI Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques (SECYTA 2016), 2–4 November 2016, Seville, Spain.

* Corresponding author.
E-mail address: roig@uji.es (A.F. Roig-Navarro).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.08.006>
0021-9673/© 2017 Published by Elsevier B.V.

Determination of selected endogenous anabolic androgenic steroids and ratios in urine by UHPLC-MS/MS and isotope pattern deconvolution*

Journal of Chromatography A, 1515 (2017) 172-178

J. Pitarch-Motellón¹, J. V. Sancho¹, M. Ibáñez¹, O. Pozo², A. F. Roig-Navarro^{*1}

¹ Research Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, E-12071, Castellón, Spain

² Bioanalysis Research Group, IMIM, Hospital del Mar, 08003, Barcelona, Spain

** Selected paper from the XVI Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques (SECyTA 2016), 2-4 November 2016, Seville, Spain.*

* Corresponding author.

E-mail addresses: roig@uji.es (A.F. Roig-Navarro), rventura@imim.es (R. Ventura)

ABSTRACT

An isotope dilution mass spectrometry (IDMS) method for the determination of endogenous anabolic androgenic steroids (EAAS) in urine by UHPLC-MS/MS has been developed using the isotope pattern deconvolution (IPD) mathematical tool. The method has been successfully validated for testosterone, epitestosterone, androsterone and etiocholanolone, employing their respective deuterated analogs using two certified reference materials (CRM). Accuracy was evaluated as recovery of the certified values and ranged from 75% to 108%. Precision was assessed in intraday (n=5) and interday (n=4) experiments, with RSDs below 5% and 10% respectively. The method was also found suitable for real urine samples, with limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) below the normal urinary levels. The developed method meets the requirements established by the World Anti-Doping

Agency for Athlete Biological Passport (ABP) measurements, except in the case of androsterone, which is currently under study.

KEYWORDS: Endogenous steroids, Urine, LC-MS/MS, IDMS, Isotope pattern deconvolution

1. INTRODUCTION

Misuse of steroids is nowadays a significant social issue. Apart from doping in sports, endogenous anabolic androgenic steroids (EAAS) use has become a problem of public health [1]. Regarding substances prohibited in sports, over the years consensus has been achieved about which steroidal markers must be controlled as an additional part of the World Anti-Doping Agency (WADA) Athlete Biological Passport (ABP), the steroidal module[2]. Testosterone (T), epitestosterone (E), androsterone (AN), etiocholanolone (Etio), 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol (5 α Adiol), 5 β -androstane-3 α ,17 β -diol (5 β Adiol) and the ratios T/E, AN/T, AN/Etio, 5 α Adiol/5 β Adiol, 5 β Adiol/E are the parameters of choice. An abnormal steroidal or longitudinal profile may constitute a suspicion of doping, thus, reliable analytical methods are needed to assess the concentration of those EAAS. Moreover, clear verification of exogenous administration of EAAS is still a challenge. The general workflow includes an initial screening method followed by a confirmation if adverse results are found. However, in spite of WADA efforts, a completely standardized methodology has not been established yet, neither by the mass detector (Q or QqQ), nor by the sample treatment method used in that initial screening step[3]. Although the accepted WADA quantification method for EAA determination in urine is GC/MS[2], among current instrumental techniques in drug testing, UHPLC-MS/MS is mainly used due to its high throughput, chromatographic performance and sensitivity[4-6].

On the other hand, ESI, the most employed ionisation source in LC-MS instrumental techniques can suffer severe matrix effect problems, mainly related with ion suppression or enhancement [7-9]. The use of isotope labelled internal standards (ILIS) is widely recognized as the best way to overcome matrix effect problems. Thus, quantification through isotope dilution mass spectrometry (IDMS) works out the issues related with signal alteration [10,11]. A recently developed IDMS method of quantification, isotope pattern deconvolution (IPD), does not rely on the construction of any calibration graph. Instead, IPD is based on the measurement of isotopic abundances in the blend, the spiked sample, and the subsequent calculation of the molar fractions by multiple linear regression[12-14]. This method has been satisfactorily tested for rapid quantifications in different complex matrices, such as food and environmental samples[15-18]. IDMS together with IPD can be considered a reliable (precise and accurate) methodology, free of matrix effect and fast, providing one result per injection. However, except for a recent paper related with testosterone determination in urine[19], IPD has never been applied to steroid determination.

In this work, an UHPLC-MS/MS method, based in IDMS and IPD quantification approach, is developed and validated for the determination of selected EAAS in human urine. Testosterone, epitestosterone, androsterone and etiocholanolone were selected among the EAAS included in the ABP, excluding the diols due to the known ionization difficulties by ESI of hydroxyandrostane compounds[20]. Accuracy and precision have been checked for the selected compounds, as well as ratios, through the analysis of NMIA MX002 and MX005 freeze dried human urine CRMs.

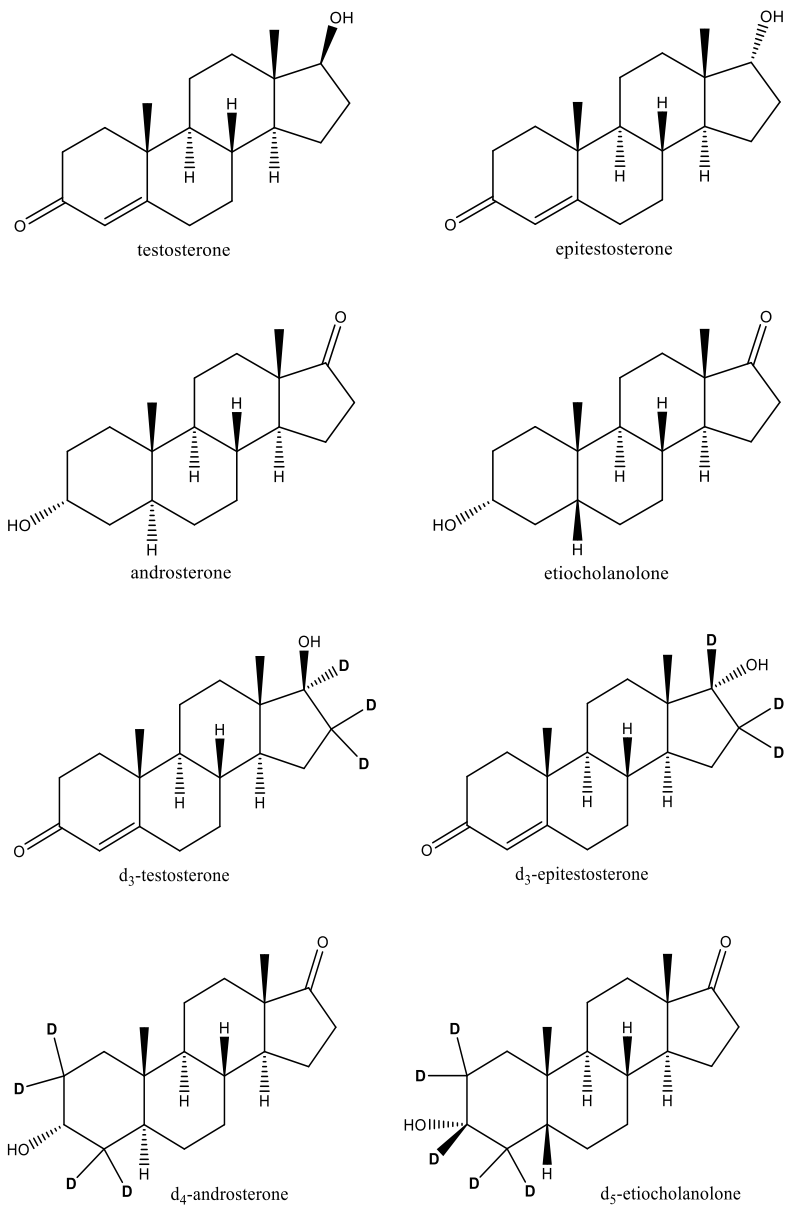


Figure 1. Molecular structure of the selected endogenous steroids. Location of D atoms are displayed for the labeled compounds.

2. EXPERIMENTAL

2.1 Reagents and materials

Testosterone (T, purity 99%) and etiocholanolone (Etio, purity 98%) were provided by Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA), epitestosterone (E, purity 96.1%) was provided by LGC Standards (Luckenwalde, Germany) and androsterone VETRANAL[®] (AN, purity 98.2%) by Sigma-Aldrich (Seelze, Germany). D3-Testosterone (d3-T, d3≈91%), d3-epitestosterone (d3-E, d3≈94%), d4-androsterone (d4-AN, d4≈81%), d5-etiocholanolone (d5-Etio, d5≈92%) and certified reference materials (CRMs) NMIA MX002 and MX005 were all purchased to NMI Australia (North Ryde, NSW, Australia). Molecular structure of the selected EAAS are shown in Figure 1.

Methanol (HPLC quality), acetonitrile (HPLC quality) and methyl tert-butyl ether (MTBE, GC quality) were provided by Scharlau (Barcelona, Spain). For the sample hydrolysis, β -glucuronidase from *E. coli* K12 provided by Roche (Indianapolis, IN) was employed. A 1 M phosphate buffer was prepared by dissolving the proper amount of $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Merck, Darmstadt, Germany) in Milli-Q water and adjusted to pH=7 with HCl 37% from Scharlau (Barcelona, Spain). Also, a $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ (1:2, w/w) (Sigma-Aldrich Co., Madrid, Spain) solid buffer was prepared. Formic acid (LC additive quality) and a 500 mM solution of NH_4COOH (Scharlau, Barcelona, Spain) in methanol HPLC were used as modifiers for mobile phases.

Individual stock solutions were prepared with 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of T, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of E, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of AN, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Etio and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each deuterated analog (d3-T, d3-E, d4-AN and d5-Etio) by dissolving the proper amounts of solid standards in methanol. Then, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ working solutions of each compounds were prepared by dilution of stock solutions with methanol. A mix of labelled compounds was prepared in MeOH containing 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of d3-T and d3-E and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of d4-AN and d5-Etio. All standard solutions were stored in amber glass bottles at -20°C . CRMs were

reconstituted following the procedure indicated by the manufacturer and stored in a refrigerator until use.

Ultrapure water was obtained from a Milli-Q gradient A10 from Millipore (Bedford, MA, USA).

2.2 Instrumentation

Characterization and determination of analytes were performed on an Acquity UPLC system equipped with binary solvent and sample managers from Waters Corp. (Milford, MA, USA), coupled to a TQD quadrupole-hexapole-quadrupole tandem mass spectrometer and a Z-spray-electrospray interface (Waters Corp.). Chromatographic separation was achieved at 55°C on an Acquity UPLC BEH C18 column (1.7 µm, 2.1 mm x 100 mm, Waters Corp.) at 0.3 mL/min flow rate and 10 µL injection volume. Mobile phases consisted in H₂O/ACN (95/5, v/v) as phase A and H₂O/ACN (5/95, v/v) as phase B, both containing 0.01% of formic acid and 0.1 mM of NH₄COOH as modifiers. The gradient applied was: 10% B (0-1 min), linear increase to 50% B in 4.3 min, 50% B (5.3-9 min), 95% B (9.5-10.5 min), 10% B (11-13 min).

Ionization was performed at 120°C desolvation temperature and 350°C source temperature, while cone gas and desolvation flows were set at 80 and 800 L/h respectively. 3.5 kV capillary voltage was applied in positive mode. Multiple reaction monitoring (MRM) conditions and retention times are listed in Table 1.

Drying and nebulizing gas was N₂ from a nitrogen generator N₂ LC-MS adapted for LC-MS analyzers (Claind, Teknokroma, Barcelona, Spain). Collision cell was kept at approximately 5 x 10⁻³ mbar of argon 99.995% provided by Praxair (Madrid, Spain). Dwell time was set to 0.1 s per scan for all quantification measurements. Analytical data was processed using Masslynx v4.1 (Waters) and homemade Excel spreadsheets (Microsoft Office).

Table 1. Experimental conditions of the LC-(ESI)-MS/MS for natural and labeled steroids.

Compound	Ret. Time (min)	Precursor ion	Cone voltage (V)	Collision voltage (V)	MRM transitions*
T	6.43	[M+H] ⁺	35	25	289.2 > 96.9 290.2 > 96.9 289.2 > 109.1
E	7.06	[M+H] ⁺	35	25	289.2 > 96.9 290.2 > 96.9 289.2 > 109.1
AN	8.29	[M+NH ₄] ⁺	35	10	308.3 > 273.1 309.3 > 274.1 308.3 > 291.1
Etio	8.05	[M+NH ₄] ⁺	35	10	308.3 > 291.1 309.3 > 292.1 308.3 > 273.1
d3-T	6.40	[M+H] ⁺	35	25	292.2 > 96.9 293.2 > 96.9 292.2 > 109.1
d3-E	7.03	[M+H] ⁺	35	25	292.2 > 96.9 293.2 > 96.9 292.2 > 109.1
d4-AN	8.24	[M+NH ₄] ⁺	35	10	312.3 > 277.1 313.3 > 278.1 312.3 > 295.1
d5-Etio	8.00	[M+NH ₄] ⁺	35	10	313.3 > 296.1 314.3 > 297.1 313.3 > 278.1

*In bold: MRM transitions employed for IPD quantification.

2.3 Sample treatment

A previously developed and widely used sample treatment method based on WADA guidelines [2] has been directly applied. 25 μL of labelled mix was added into 2.5 mL of sample in clean 15 mL-glass tubes followed by 1 mL of 1 M phosphate buffer (pH=7). Hydrolysis was performed by adding 30 μL of β -glucuronidase solution and incubated in a water bath at 55 ± 2 C for 1 h.

Next, approximately 200 mg of $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ (1:2, w/w) solid buffer were added to the tube and stirred until total dissolution of the solid. Liquid-liquid extraction was carried out by adding 6 mL of MTBE, stirring in a vortex for 1 min and centrifuging at 3500 rpm for 5 min. Then, the upper organic phase was carefully transferred to clean glass tubes using disposable Pasteur pipettes, avoiding transferring any aqueous phase. MTBE was eliminated by evaporation in a MiVac at 40°C for 20 min, the residue was redissolved in 300 μL of MeOH/H₂O (1:1, v/v) and transferred to LC vials.

2.4 Method validation

2.4.1 Accuracy

Accuracy was validated by recovery experiments applying the method to two CRMs with different steroid concentrations and ratios, NMIA MX002 and NMIA MX005 freeze dried human urine. The method was regarded as accurate if the recovery was between 70% and 110%.

2.4.2 Precision

Using the same CRMs, intraday and interday precisions were validated. Intraday repeatability was assessed performing the analysis of five

replicates. Interday reproducibility was obtained by the application of the method to four replicates in four consecutive weeks.

In order to assess precision in terms of WADA guidelines[2], total combined uncertainty, u_c , was also calculated according to WADA technical document TD2014DL[21] and Nordtest Guide[22]. A detailed explanation of the measurement uncertainty determination, using T as model compound in urine, is explained elsewhere[19]. The combined uncertainty for the ratios was assessed taking into account also the general propagation equation[23] to calculate the uncertainty associated to the reference material. A detailed explanation is shown in the supplementary information.

2.4.3 LOD and LOQ

A rough estimation of detection and quantification limits were conducted using the signal to noise ratio obtained in a real-life sample. To this end, 9 urine samples from healthy female volunteers were collected and analyzed in order to get samples with low concentration of EAAS. Limits of quantification (LOQ) and detection (LOD) of the method were estimated as S/N equal to 10 and 3, respectively, in the lowest concentrated sample.

2.5 Quantification by isotope pattern deconvolution (IPD)

Isotope pattern deconvolution is a mathematical tool based on multiple linear regressions that provides the molar fractions of natural and labelled analytes in the spiked sample. The addition of the labelled analog alters the natural isotopic distribution of abundances $A_{nat}^{SRM_i}$ due to the overlap of the labelled isotopic distribution $A_{lab}^{SRM_i}$. Hence, the deconvolution of the measured distribution in the mix $A_{mix}^{SRM_i}$ is performed by solving the multiple linear regression in matrix notation:

$$\begin{bmatrix} A_{mix}^{SRM1} \\ A_{mix}^{SRM2} \\ \vdots \\ A_{mix}^{SRMn} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^{SRM1} & A_{lab}^{SRM1} \\ A_{nat}^{SRM2} & A_{lab}^{SRM2} \\ \vdots & \vdots \\ A_{nat}^{SRMn} & A_{lab}^{SRMn} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X_{nat} \\ X_{lab} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{SRM1} \\ e^{SRM2} \\ \vdots \\ e^{SRMn} \end{bmatrix}$$

Where the error vector e^{SRMi} is the minimized parameter in the regression to solve the system and to obtain the molar fractions of natural and labelled analytes (x_{nat} and x_{lab} respectively). This can be easily achieved with the LINEST function in Microsoft Excel or any spreadsheet software. Then, since the amount of labelled compound N_{lab} is known, the amount of natural compound in the sample N_{nat} is readily calculated as follows:

$$N_{nat} = N_{lab} \frac{x_{nat}}{x_{lab}}$$

In contrast with commonly used analytical methodologies, IPD does not need methodological calibration and a concentration value is obtained from a single injection of the spiked sample. However, an extensive characterization of natural and labelled compounds is required to construct the calculation matrix, including isotopomer abundance distributions and exact concentration of labelled standard solutions (determined by reverse isotope dilution). If the individual isotopomer distribution is theoretically calculated, extent of labeling and spectral purity must be also characterized. Description of the general IPD methodology as well as examples of characterization of standards can be consulted in the literature[12,24]. In the present work, isotopomer abundances corresponding to the selected transitions for natural and labeled compounds have been experimentally obtained according to the method reported in previous works[19].

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Optimization of LC conditions

In a first approach, gradient conditions using methanol and water both containing 0.01% HCOOH/1mM NH₄COOH as mobile phases were tested, as employed for testosterone determination in previous works[19]. However, due to the similarity between AN and Etio (5 α /5 β -position isomers of one H), separation could not be accomplished even with long run times. Therefore, acetonitrile (ACN) was tested as mobile phase on the basis of the chromatographic conditions used by Hauser *et al.*[25], which consisted in water/ACN (95/5, v/v) (Eluent A) and water/ACN (5/95, v/v) (Eluent B), both containing HCOOH and NH₄COOH. Different modifier concentrations were tested and 0.01% HCOOH plus 0.1 mM NH₄COOH provided the optimal sensitivity and peak shape.

Optimization of AN/Etio separation was performed starting from isocratic conditions at different %B (10, 20 and 30%) to ensure that separation was possible with a C₁₈ column. Once separation was observed using 30% Eluent B, peak shape and time analysis were tried to be improved by performing a gradient prior to an isocratic step. Thus, gradients of the same slope were tested starting from 0% or 10% Eluent B and arriving up to 30, 40 and 50% Eluent B, followed by the isocratic step. Separation of the A/Etio pair was achieved in all six experiments, but lower isocratic and initial % of Eluent B produced longer run times and decreased sensitivity due to peak broadening. Thus, starting conditions were set at 10 % eluent B, followed by a gradient up to 50% Eluent B in 4.3min and an isocratic step until 9 min (Figure 2).

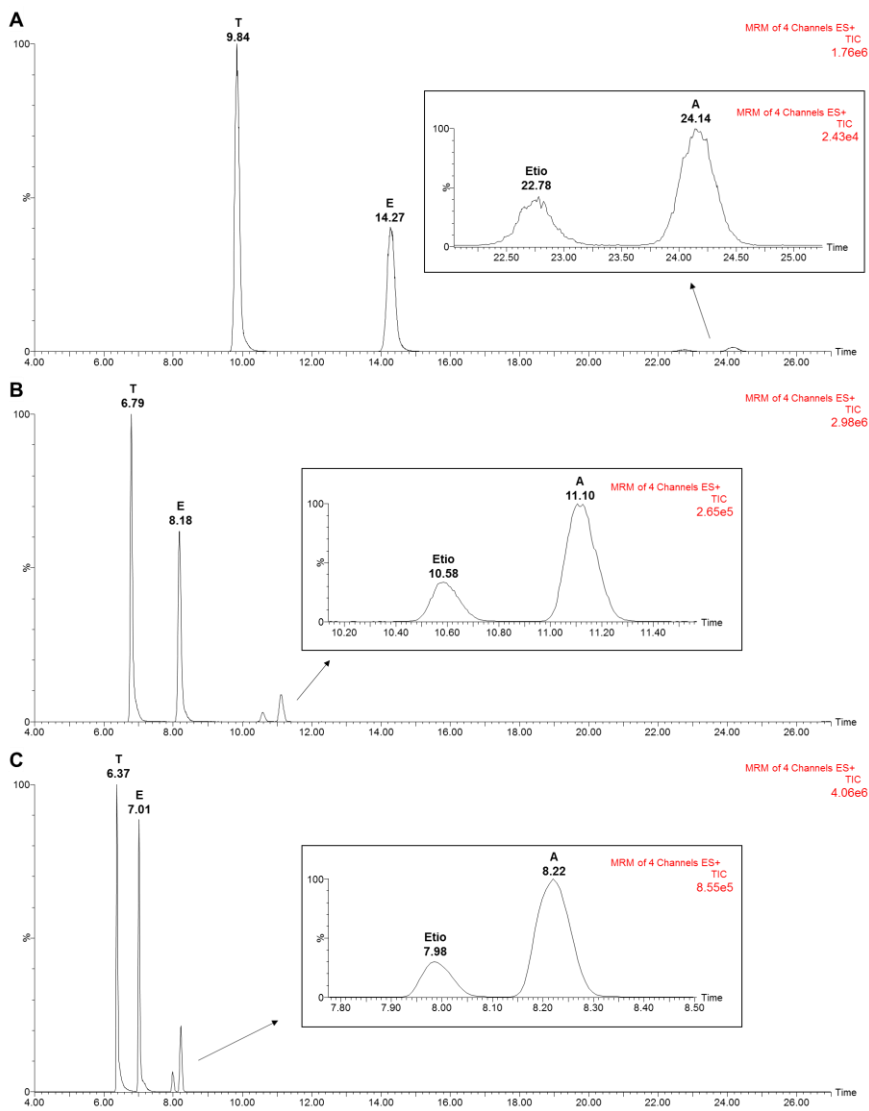


Figure 2. Chromatographic optimization using gradients of the same slope from 10% Eluent B at 1 min to A) 30% at 3.2 min, B) 40% at 4.25 min and C) 50% at 5.3 min, followed by an isocratic step (see text). All three injections correspond to a standard with 500 ng/mL T and E and 1.0 µg/mL AN and Etio in MeOH/H₂O (1:1, v/v).

3.2 Characterization of analytes

Characterization of natural (T, E, AN, Etio) and labelled compounds (d3-T, d3-E, d4-AN, d5-Etio) consisted in the determination of the experimental isotopic distribution of abundances and exact concentration of labelled standard solutions.

Experimental abundances were measured by injecting (n=5) individual 500 ng/mL of T, E, d3-T and d3-E, and 5 µg/mL of AN, Etio, d4-AN and d5-Etio in MeOH/H₂O (1:1, v/v). MRM transitions were selected on the basis of theoretical fragmentation calculations by IsoPatrn software[26], selecting the 10-12 most abundant transitions.

Finally, concentrations of labelled 100 µg/mL standard solutions were checked by reverse isotope dilution (RID). That is, quantification of labelled compound spiking the standard solution with an accurately prepared natural standard solution using IPD[27]. Results obtained by RID were: (100 ± 4) µg/mL for d3-T, (105.8 ± 1.1) µg/mL for d3-E, (98.2 ± 1.1) µg/mL for d4-AN and (112.7 ± 1.9) µg/mL for d5-Etio.

3.3 Method validation

Accuracy assessment was carried out by applying the developed IPD methodology to 2 certified reference materials (CRM) from NMI Australia: NMIA MX002 and NMIA MX005. Recovery, calculated as the percentage ratio between the found and the certified concentration value, is shown in tables 2 and 3. It is worth noting the high accuracy of the method for T, E and Etio, with recovery values between 95% and 108% in all experiments. However, results for AN were lower than expected, between 75% and 79%, which may be caused by insufficient hydrolysis time and/or temperature. Though, interference of matrix components with d4-AN mass spectrum is being also considered since an abnormally high response in labelled transition measurements produces lower quantifications by IPD. All these possibilities are currently under study.

Intra-day repeatability (n=5) and inter-day reproducibility (n=4) were assessed for both CRMs. Results in terms of repeatability and reproducibility showed RSD values below 5% and 10%, respectively, in all cases (Tables 2 and 3). AN shows the highest %RSD that should be related with the poorer recovery. Despite that, the developed method is characterised by a high precision.

Table 2. Validation parameters, accuracy and precision, obtained for NMIA MX002 CRM.

NMIA MX002					
Compound	Certified value ¹	Intra-day repeatability (n=5)		Inter-day reproducibility (n=4)	
		Concentration ¹	Accuracy ²	Concentration ¹	Accuracy
T	16.6 ± 0.65	16.3 ± 0.3 (1.8%)	98%	15.9 ± 0.4 (2.4%)	96%
E	18.3 ± 1.3	19.7 ± 0.3 (1.8%)	108%	19.0 ± 0.5 (3%)	104%
AN	1262 ± 39	963 ± 14 (1.4%)	76%	993 ± 81 (8%)	79%
Etio	814 ± 36	840 ± 15 (1.8%)	103%	804 ± 41 (5%)	99%

¹ Expressed as Mean ± SD (%RSD) ng/mL

² As % recovery respect to the certified value

In order to assess the method combined uncertainty, Nordtest calculations[22] were applied using the available data to obtain combined uncertainty for the determination of the four analytes (Table 4), plus the uncertainty of T/E, AN/T and AN/Etio ratios (Table 5). Total combined uncertainty, u_c , allows the comparison with the WADA requirements for a quantification method[2].

Table 3. Validation parameters, accuracy and precision, obtained for NMIA MX005 CRM.

NMIA MX005					
Compound	Certified value ^{1,3}	Intra-day repeatability (n=5)		Inter-day reproducibility (n=4)	
		Concentration ⁿ¹	Accuracy	Concentration ⁿ¹	Accuracy
T	40.2 ± 1.8	37.3 ± 0.8 (2.0%)	93%	38.0 ± 0.7 (1.8%)	95%
E	10.74 ± 0.59	11.3 ± 0.3 (3%)	105%	11.0 ± 0.3 (3%)	102%
AN	1184 ± 35	886 ± 40 (5%)	75%	890 ± 80 (9%)	75%
Etio	1290 ± 41	1229 ± 30 (2.4%)	95%	1246 ± 55 (4%)	97%

¹ Expressed as Mean ± SD (%RSD) ng/mL

² As % recovery respect to the certified value

³ Corrected as indicated in the manufacturer's instructions (correction factor=0.9977), since the weighted water after reconstitution was 20.0461g

Since the obtained AN concentrations differed from the certified values, its uncertainty derived from the bias ($u(\text{bias})$ around 23%) was found to be higher than the rest ($u(\text{bias})$ between 3.2% and 5.5%). Therefore, combined uncertainties of AN, AN/T and AN/Etio determinations were worse than the rest of analytes and ratios. Lower uncertainty values for AN and AN ratios are expected once the aforementioned recovery problems are solved.

Regarding T, E and Etio, u_c was about 6% or lower in all cases. Taking into account that certified concentrations in the CRMs (Tables 2 and 3) are > 5 ng/mL for T and E, and above five times the method LOQ for AN and Etio (Table 6), the concentration uncertainty of the method was far lower than the limit of 20% set by the WADA for those three analytes[2].

Regarding T/E, the method u_c was 9%, also below the WADA requirements of 15%, and far lower than the observed longitudinal individual variation

in male urine. In a recent paper [28] coefficients of variation of 30% and 46% for longitudinal T/E values were found when one or various laboratories were involved respectively. As might be expected, those values contain not only the individual variation but the method precision itself. Thus, a method with lower measurement uncertainty would help in assessing the actual variability in longitudinal steroidal profile for a given individual.

Finally, limits of quantification (LOQ) and detection (LOD) of the method were roughly estimated as S/N equal to 10 and 3, respectively. To this end, the lowest concentrated sample among 9 healthy female volunteers were selected (see experimental section). Lowest values found within the samples for each analyte are shown in Table 6 along with their corresponding LOQ and LOD.

Table 4. Combined uncertainty, u_c , for the four selected EAAS.

Compound	$u(\text{bias})$	R_w	u_c^1
T	5.5%	1.8%	5.8%
E	4.3%	1.8%	4.7%
AN	23.2%	10.3%	25.4%
Etio	3.2%	5.2%	6.1%

¹ u_c calculated as the square root of the sum of the squares of interday reproducibility (R_w , random uncertainty) and $u(\text{bias})$, the uncertainty associated to any source of bias including that associated to CRMs [19,22]

Table 5. Combined uncertainty, u_c , for the selected ratios.

Ratio	$u(\text{bias})$	R_w	u_c^1
T/E	8.6%	2.7%	9.0%
AN/T	19.2%	8.8%	21.1%
AN/Etio	21.5%	5.6%	22.2%

¹ u_c calculated as the square root of the sum of the squares of interday reproducibility (R_w , random uncertainty) and $u(\text{bias})$, the uncertainty associated to any source of bias including that associated to CRMs [22,23]

Table 6. Concentration of steroids in the selected urine sample and calculated LOD and LOQ.

Compound	Sample ID ¹	Mean \pm SD (%RSD) ng/mL	LOD (ng/mL) ²	LOQ (ng/mL) ³
T	4	0.520 \pm 0.024 (5%)	0.2	0.7
E	8	1.48 \pm 0.09 (6%)	0.5	1.7
AN	8	301 \pm 5 (1.8%)	7.3	24.5
Etio	8	587 \pm 15 (3%)	28.6	95.4

¹ Results for all 9 samples can be consulted in the Supplementary Information (Table S.4)

² S/N = 3

³ S/N = 10

A brief summary of figures of merit of the here developed method reveals that accuracy (75-108% recovery) compares well with already published results, while precision shows equal CV values or better, specifically for T and E and inter-day precision study. On the other hand, as IPD methodology does not require the use of calibration curves and derivatization steps are omitted in LC, the application of IPD quantification makes the method fast and reliable. Table S.5 in supplementary information shows validation results from some selected methods including those of the present work.

4. CONCLUSIONS

In this work, an IDMS method for UHPLC-MS/MS has been proved suitable for EAAS determination in human urine. Isotope pattern deconvolution (IPD) was employed as mathematical tool to perform the quantification of testosterone, epitestosterone, androsterone and etiocholanolone, using deuterium-labelled analogs for that purpose.

The high similarity of molecular structure between AN and Etio required of an extensive optimization of the chromatographic separation using an acetonitrile gradient.

The method was successfully validated with its application to two certified reference materials in terms of intraday repeatability and interday reproducibility with excellent relative standard deviations (%RSD < 10%) in both experiments, as well as in terms of trueness or recovery respect the certified concentration values (between 70% and 110%).

In addition, LODs and LOQs of the method were estimated in real life, low concentrated, female urine samples. All limits were found suitable for the determination of EAAS since they fell below the normal range of concentration in adults.

Combined standard uncertainty for T, E, Etio and T/E were below the WADA required limits for a method to be useful in doping suspicion. Moreover, $u_c(T/E)$ is well below the observed coefficients of variation for individual longitudinal profiles, thus allowing to improve future variability assessment studies.

Therefore, the present IPD method by LC-MS/MS is highlighted as a robust, exact and precise alternative approach for endogenous steroid analysis and a capable alternative to traditional GC- and calibration-based quantifications.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge financial support from the Generalitat Valenciana (Research group of excellence Prometeo II 2014/023 and Collaborative Research on Environment and Food Safety ISIC/2012/016), as well as University Jaume I for project PB1-1B2013-55. Finally, the authors are grateful to the Serveis Centrals d'Instrumentació Científica (SCIC) of University Jaume I for using Acquity and TQD instruments.

REFERENCES

- [1] F. Sjöqvist, M. Garle, A. Rane, Use of doping agents, particularly anabolic steroids, in sports and society, *Lancet*. 371 (2008) 1872–1882. doi:10.1016/S0140-6736(08)60801-6.
- [2] World Anti-Doping Agency, WADA Technical Document – TD2016EAAS, (2016) 1–16.
- [3] R. Nicoli, D. Guillarme, N. Leuenberger, N. Baume, N. Robinson, M. Saugy, J.-L. Veuthey, Analytical Strategies for Doping Control Purposes: Needs, Challenges, and Perspectives, *Anal. Chem.* 88 (2016) 508–523. doi:10.1021/acs.analchem.5b03994.
- [4] M. Thevis, A. Thomas, V. Pop, W. Schänzer, Ultrahigh pressure liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry in human sports drug testing: Possibilities and limitations, *J. Chromatogr. A*. 1292 (2013) 38–50. doi:10.1016/j.chroma.2012.12.048.
- [5] F. Gosetti, E. Mazzucco, M.C. Gennaro, E. Marengo, Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry determination and profiling of prohibited steroids in human biological matrices. A review, *J. Chromatogr. B*. 927 (2013) 22–36. doi:10.1016/j.jchromb.2012.12.003.
- [6] F. Badoud, D. Guillarme, J. Boccard, E. Grata, M. Saugy, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, Analytical aspects in doping control: Challenges and perspectives, *Forensic Sci. Int.* 213 (2011) 49–61. doi:10.1016/j.forsciint.2011.07.024.
- [7] P.J. Taylor, Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry, *Clin. Biochem.* 38 (2005) 328–334. doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.11.007.

- [8] L. Schlittenbauer, B. Seiwert, T. Reemtsma, Matrix effects in human urine analysis using multi-targeted liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1415 (2015) 91–99. doi:10.1016/j.chroma.2015.08.069.
- [9] K. Deventer, O.J. Pozo, A.G. Verstraete, P. Van Eenoo, Dilute-and-shoot-liquid chromatography-mass spectrometry for urine analysis in doping control and analytical toxicology, *TrAC Trends Anal. Chem.* 55 (2014) 1–13. doi:10.1016/j.trac.2013.10.012.
- [10] A. Furey, M. Moriarty, V. Bane, B. Kinsella, M. Lehane, Ion suppression; A critical review on causes, evaluation, prevention and applications, *Talanta.* 115 (2013) 104–122. doi:10.1016/j.talanta.2013.03.048.
- [11] H. Trufelli, P. Palma, G. Famiglini, A. Cappiello, An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 30 (2011) 491–509. doi:10.1002/mas.20298.
- [12] J.I.G. Alonso, P. Rodríguez-González, *Isotope dilution mass spectrometry*, RSC Publishing, 2013.
- [13] P. Rodríguez-González, J.I. García Alonso, Recent advances in isotope dilution analysis for elemental speciation, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 239. doi:10.1039/b924261a.
- [14] Á. Castillo, E. Gracia-Lor, A.F. Roig-Navarro, J.V. Sancho, P. Rodríguez-González, J.I.G. Alonso, Isotope pattern deconvolution-tandem mass spectrometry for the determination and confirmation of diclofenac in wastewaters, *Anal. Chim. Acta.* 765 (2013) 77–85. doi:10.1016/j.aca.2012.11.033.

- [15] A. González-Antuña, P. Rodríguez-González, G. Centineo, J.I. García Alonso, Evaluation of minimal ¹³C-labelling for stable isotope dilution in organic analysis, *Analyst*. 135 (2010) 953. doi:10.1039/b924432h.
- [16] N. Fabregat-Cabello, J. Pitarch-Motellón, J. V. Sancho, M. Ibáñez, A.F. Roig-Navarro, Method development and validation for the determination of selected endocrine disrupting compounds by liquid chromatography mass spectrometry and isotope pattern deconvolution in water samples. Comparison of two extraction techniques, *Anal. Methods*. 8 (2016) 2895–2903. doi:10.1039/C6AY00221H.
- [17] N. Fabregat-Cabello, P. Zomer, J.V. Sancho, A.F. Roig-Navarro, H.G.J. Mol, Comparison of approaches to deal with matrix effects in LC-MS/MS based determinations of mycotoxins in food and feed, *World Mycotoxin J.* 9 (2016) 149–161. doi:10.3920/WMJ2014.1872.
- [18] N. Fabregat-Cabello, J. V Sancho, A. Vidal, F. V González, A.F. Roig-Navarro, Development and validation of a liquid chromatography isotope dilution mass spectrometry method for the reliable quantification of alkylphenols in environmental water samples by isotope pattern deconvolution, *J. Chromatogr. A.* 1328 (2014) 43–51. doi:10.1016/j.chroma.2013.12.077.
- [19] J. Pitarch-Motellón, J.V. Sancho, M. Ibáñez, N. Fabregat-Cabello, A.F. Roig-Navarro, O.J. Pozo, R. Ventura, J.I. García-Alonso, P. Rodríguez-González, A.G. Gago, P. Van Enoo, K. Deventer, Y. Dehnes, S. Rzeppa, Evaluation of uncertainty sources in the determination of testosterone in urine by calibration-based and isotope dilution quantification using UHPLC-MS/MS, *Submitt. to JCA.* (2017).
- [20] O.J. Pozo, P. Van Eeno, K. Deventer, F.T. Delbeke, Ionization of anabolic steroids by adduct formation in liquid chromatography electrospray mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 42 (2007) 497–516. doi:10.1002/jms.1182.

- [21] World Anti-Doping Agency, WADA Technical Document – TD2014DL, (2014) 1–14. <https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA-TD2014DL-v1-Decision-Limits-for-the-Quantification-of-Threshold-Substances-EN.pdf>.
- [22] Nordtest, Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories, (2012).
- [23] J.I. García-Alonso, P. Rodríguez-González, Uncertainty evaluation in IDMS, in: *Isot. Dilution Mass Spectrom.*, RSC Publishing, 2013: pp. 379–433.
- [24] N. Fabregat-Cabello, Á. Castillo, J. V Sancho, F. V González, A.F. Roig-Navarro, Fast methodology for the reliable determination of nonylphenol in water samples by minimal labeling isotope dilution mass spectrometry., *J. Chromatogr. A.* 1301 (2013) 19–26. doi:10.1016/j.chroma.2013.05.033.
- [25] B. Hauser, T. Deschner, C. Boesch, Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of 23 endogenous steroids in small quantities of primate urine, *J. Chromatogr. B.* 862 (2008) 100–112. doi:10.1016/j.jchromb.2007.11.009.
- [26] L. Ramaley, L.C. Herrera, Software for the calculation of isotope patterns in tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 2707–2714. doi:10.1002/rcm.3668.
- [27] N. Fabregat-Cabello, J. V Sancho, A. Vidal, F. V González, A.F. Roig-Navarro, Development and validation of a liquid chromatography isotope dilution mass spectrometry method for the reliable quantification of alkylphenols in environmental water samples by isotope pattern deconvolution., *J. Chromatogr. A.* 1328 (2014) 43–51. doi:10.1016/j.chroma.2013.12.077.

[28] N. Baume, H. Geyer, M. Vouillamoz, R. Grisdale, M. Earl, R. Aguilera, D.A. Cowan, M. Ericsson, G. Gmeiner, D. Kwiatkowska, N. Kioukia-Fougia, A. Molina, J. Ruivo, J. Segura, P. Van Eenoo, N. Jan, N. Robinson, M. Saugy, Evaluation of longitudinal steroid profiles from male football players in UEFA competitions between 2008 and 2013, *Drug Test. Anal.* 8 (2016) 603–612. doi:10.1002/dta.1851.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Uncertainty assessment

In this work, uncertainty assessment was carried out in terms of combined uncertainty (u_{comb}) of the method for each analyte, which can be obtained as:

$$u_{comb} = \sqrt{u_{SD}^2 + u_{bias}^2}$$

where u_{SD} is the mean standard deviation from the reproducibility experiment of both CRMs ($n=3$), and u_{bias} the uncertainty associated to any source of bias contributing to the method bias. This includes the uncertainty associated to certified concentration values of the CRMs (u_{ref}), obtained as the mean u_{comb} of the certified concentration values for each analyte, and the method and laboratory bias assessed through the root mean square (RMS):

$$RMS = \sqrt{\frac{\sum_i bias_i^2}{2}}$$

Then, we have that:

$$u_{bias} = \sqrt{RMS^2 + u_{ref}^2}$$

Analyte	u(ref)	RMS	u_{bias}	u_{SD}	u_{comb}(%)
T	2.1%	5.1%	5.5%	1.8%	5.8%
EpiT	3.0%	3.1%	4.3%	1.8%	4.7%
AN	1.5%	23.1%	23.2%	10.3%	25.4%
Etio	1.9%	2.6%	3.2%	5.2%	6.1%

Similarly, in the case of ratios the same procedure is applied except for the calculation of u_{ref} , which is obtained from the u_{comb} calculated by error propagation theory equations for ratios:

$$u_{comb} \left(\frac{A}{B} \right) = \sqrt{\left(\frac{u_{comb}(A)}{[A]} \right)^2 + \left(\frac{[A]}{[B]^2} \right)^2 \cdot u_{comb}(B)^2}$$

Then, u_{ref} of each ratio is readily obtained as the mean u_{comb} of the two CRMs and the rest of steps are identical as in the case of concentration determination.

Table S.1. Certified concentrations of steroids and their u_{comb} in the two CRMs.

Analyte	NMIA MX002		NMIA MX005	
	C (ng/mL)	u_{comb}	C (ng/mL)	u_{comb}
T	16.6	0.322	40.2	0.878
EpiT	18.3	0.591	10.74	0.291
AN	1262	19.31	1184	17.41
Etio	814	17.22	1290	20.50

Table S.2. Steroid ratios and their u_{comb} in the two CRMs.

Ratio	NMIA MX002			NMIA MX005		
	Value	u_{comb}	u_{comb} (%)	Value	u_{comb}	u_{comb} (%)
T/EpiT	0.907	0.034	3.8%	3.743	0.130	3.5%
AN/T	76.024	1.877	2.5%	29.453	0.776	2.6%
AN/Etio	1.550	0.040	2.6%	0.918	0.020	2.2%

Table S.3. Calculation of total method ucomb of the ratios.

Ratio	U _{ref}	RMS	U _{bias}	U _{SD}	U _{comb} (%)
T/EpiT	3.6%	7.8%	8.6%	2.7%	9.0%
AN/T	2.6%	19.0%	19.2%	8.8%	21.1%
AN/Etio	2.4%	21.3%	21.5%	5.6%	22.2%

Table S.4. Analysis of 9 female urine samples by IPD.

Sample	[T]			[EpiT]			[AN]			[Etio]		
	Mean ¹	SD	RSD	Mean ¹	SD	RSD	Mean ¹	SD	RSD	Mean ¹	SD	RSD
1	3.28	0.11	3%	3.386	0.015	0.4%	2090	41	2.0%	1861	8	0.4%
2	3.55	0.17	5%	3.40	0.08	2.2%	1760	27	1.5%	2067	76	4%
3	4.7	0.3	7%	8.55	0.14	1.6%	2204	72	3%	3193	7	0.2%
4	0.520	0.024	5%	3.21	0.03	0.9%	1736	54	3%	1818	56	3%
5	2.520	0.018	0.7%	9.4	0.8	8%	954	13	1.4%	933	58	6%
6	4.56	0.13	3%	7.9	0.6	8%	1422	48	3%	1604	124	8%
7	5.34	0.19	4%	7.9	0.4	5%	1203	46	4%	2356	169	7%
8	2.49	0.11	5%	1.48	0.09	6%	301	5	1.8%	587	15	3%
9	9.0	0.3	3%	24.0	0.5	2.1%	3363	85	3%	2734	115	4%

¹ ng/mL

2.4 Bibliografía

1. Ljungqvist A. Brief History of Anti-Doping. In: *Medicine and Sport Science*. Vol 62. ; 2017:1-10. doi:10.1159/000460680
2. Bowers LD. Anti-Dope Testing in Sport: The History and the Science. *FASEB J*. 2012;26(10):3933-3936. doi:10.1096/fj.12-1001ufm
3. Todd T. Anabolic steroids: the gremlins of sport. *J Sport Hist*. 1987;14(1):87-107.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11617516>.
4. Franke WW, Berendonk B. Hormonal doping and androgenization of athletes: A secret program of the German Democratic Republic government. *Clin Chem*. 1997;43(7):1262-1279.
5. Cowan DA, Kicman AT. Doping in sport: misuse, analytical tests, and legal aspects. *Clin Chem*. 1997;43(7):1110-1113.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9216446>.
6. World Anti-Doping Agency. Prohibited List. 2018;(January):10.
http://www.abcd.gov.br/arquivos/prohibited_list_2018_en.pdf.
7. World Conference on Doping in Sport. Lausanne Declaration on Doping in Sport. 1999;(February).
http://www.nodoping.olympic.org/Declaration_e.html.
8. World Anti-Doping Agency. World Anti-Doping Code. *World Anti-Doping*. 2015:1-116.
9. Trout GJ, Kazlauskas R. Sports drug testing - an analyst's perspective. *Chem Soc Rev*. 2004;33(1):1. doi:10.1039/b201476a
10. Mareck-Engelke U, Geyer H, Donike M. Stability of Steroid Profiles. In: *10th Cologne Workshop on Dope Analysis*. Köln, Germany; 1992:87-89.
11. Donike M, Rauth S, Mareck-Engelke U, Geyer H, Nitschke R. Evaluation of Longitudinal Studies, the Determination of Subject Based Reference Ranges of the Testosterone / Epitestosterone Ratio. In: *11th Cologne Workshop - Recent Advances in Doping Analysis*. Köln, Germany; 1993:33-39.

12. Ayotte C, Goudreault D, Charlebois A. Testing for natural and synthetic anabolic agents in human urine. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1996;687(1):3-25. doi:10.1016/S0378-4347(96)00032-1
13. Saudan C, Baume N, Robinson N, Avois L, Manguin P, Saugy M. Testosterone and doping control. *Br J Sports Med.* 2006;40(Supplement 1):i21-i24. doi:10.1136/bjism.2006.027482
14. Donike M, Bärwald K-R, Klostermann K, Schänzer W, Zimmermann J. Nachweis von exogem Testosteron [Detection of exogenous testosterone]. In: *Sport: Leistung Und Gesundheit.* Köln, Germany; 1983:293.
15. Ayotte C. Detecting the Administration of Endogenous Anabolic Androgenic Steroids. In: ; 2009:77-98. doi:10.1007/978-3-540-79088-4_4
16. Mareck U, Geyer H, Opfermann G, Thevis M, Schänzer W. Factors influencing the steroid profile in doping control analysis. *J Mass Spectrom.* 2008;43(7):877-891. doi:10.1002/jms.1457
17. World Anti-Doping Agency. WADA Technical Document – TD2018EAAS Endogenous Anabolic Androgenic Steroids Measurement and Reporting WADA Technical Document. 2018:1-8. http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/Technical_Documents/WADA-TD2014-EAAS-Endogenous-Anabolic-Androgenic-Steroids-Measurement-and-Reporting-EN.pdf.
18. World Anti-Doping Agency. WADA Technical Document – TD2018DL Decision Limits for the Confirmatory Quantification of Threshold Substances. 2018:1-18. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2018dl_v1_en.pdf.
19. Mareck-Engelke U, Geyer H, Donike M. Stability of Steroid Profiles (2): Excretion Rates from Morning Urines. 1993:85-89.
20. Mareck-Engelke U, Geyer H, Donike M. Stability of Steroid Profiles (3): The Circadian Rhythm of Urinary Ratios and Excretion Rates of Endogenous Steroids in Male. 1994:121-133.

21. Sottas P-E, Baume N, Saudan C, Schweizer C, Kamber M, Saugy M. Bayesian detection of abnormal values in longitudinal biomarkers with an application to T/E ratio. *Biostatistics*. 2007;8(2):285-296. doi:10.1093/biostatistics/kxl009
22. Sottas P-E, Robinson N, Rabin O, Saugy M. The Athlete Biological Passport. *Clin Chem*. 2011;57(7):969-976. doi:10.1373/clinchem.2011.162271
23. World Anti-Doping Agency. International Standards for Laboratories. 2016.
24. Thevis M, Sigmund G, Geyer H, Schänzer W. Stimulants and Doping in Sport. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010;39(1):89-105. doi:10.1016/j.ecl.2009.10.011
25. Badoud F, Guillarme D, Boccard J, et al. Analytical aspects in doping control: Challenges and perspectives. *Forensic Sci Int*. 2011;213(1-3):49-61. doi:10.1016/j.forsciint.2011.07.024
26. Botrè F. New and old challenges of sports drug testing. *J Mass Spectrom*. 2008;43(7):903-907. doi:10.1002/jms.1455
27. World Anti-Doping Agency. WADA Technical Document - TD2019IRMS Detection of Synthetic Forms of Endogenous Anabolic Androgenic Steroids by GC/C/IRMS. 2019:1-14.
28. Klaus Mueller R, Grosse J, Lang R, Thieme D. Chromatographic techniques—the basis of doping control. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1995;674(1):1-11. doi:10.1016/0378-4347(95)00290-8
29. Peters RJB, Oosterink JE, Stolker AAM, Georgakopoulos C, Nielen MWF. Generic sample preparation combined with high-resolution liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry for unification of urine screening in doping-control laboratories. *Anal Bioanal Chem*. 2010;396(7):2583-2598. doi:10.1007/s00216-010-3484-3
30. Badoud F, Grata E, Perrenoud L, Saugy M, Rudaz S, Veuthey J-L. Fast analysis of doping agents in urine by ultra-high-pressure liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry. II: Confirmatory analysis. *J Chromatogr A*. 2010;1217(25):4109-4119. doi:10.1016/j.chroma.2009.11.001

31. Gosetti F, Mazzucco E, Gennaro MC, Marengo E. Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry determination and profiling of prohibited steroids in human biological matrices. A review. *J Chromatogr B*. 2013;927:22-36. doi:10.1016/j.jchromb.2012.12.003
32. Nordtest. Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories. 2012;(0170).
33. Kragten J. Tutorial review. Calculating standard deviations and confidence intervals with a universally applicable spreadsheet technique. *Analyst*. 1994;119(10):2161. doi:10.1039/an9941902161
34. Agency WA. Prohibited List. *World Anti-Doping Code*. 2019;(JANUARY).
35. Sottas P-E, Saugy M, Saudan C. Endogenous Steroid Profiling in the Athlete Biological Passport. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010;39(1):59-73. doi:10.1016/j.ecl.2009.11.003
36. Pozo OJ, Van Eenoo P, Deventer K, Delbeke FT. Ionization of anabolic steroids by adduct formation in liquid chromatography electrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2007;42(4):497-516. doi:10.1002/jms.1182
37. Hagman C, Håkansson HP, Buijs J, Håkansson HK. Inter-molecular migration during collisional activation monitored by hydrogen/deuterium exchange FT-ICR tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2004;15(5):639-646. doi:10.1016/j.jasms.2004.01.003
38. Ferguson PL, Pan J, Wilson DJ, et al. Hydrogen/Deuterium Scrambling during Quadrupole Time-of-Flight MS/MS Analysis of a Zinc-Binding Protein Domain. *Anal Chem*. 2007;79(1):153-160. doi:10.1021/ac061261f

CAPÍTULO 3

Aplicación de IPD a análisis clínicos

3.1 Introducción

El ámbito de la patología y el funcionamiento del cuerpo es un tema que, durante siglos, ha estado rodeado de misticismo, de ignorancia y poca o nula base científica. La curación de enfermedades se afrontaba mediante el tratamiento de síntomas en lugar de averiguar las causas biológicas que dan lugar a las enfermedades, ya que éstas se veían como un desajuste de los “humores” repartidos por todo el cuerpo.

No es hasta finales del siglo XVII o principios del XVIII cuando aparece el concepto de órgano como lugar anatómico donde se produce la enfermedad. Tras este primer cambio de mentalidad, las prácticas médicas desvían su atención de los fluidos biológicos –de gran importancia en la observación de los humores–, pero con la llegada de la revolución científica de los trabajos de Lavoisier se retoman los experimentos con fluidos y, junto con los nuevos conocimientos en química, la inexorable expansión de lo que a partir de la década de 1840 se conocería como química clínica¹.

Este cambio no llega sin controversia, sino que entre finales del siglo XVIII y la entrada al siglo XX se producen una serie de luchas de poder entre detractores y defensores de las prácticas científicas en medicina, principalmente entre distintas generaciones de fisiólogos y químicos. No obstante, el desarrollo de métodos analíticos simplificados y fácilmente aplicables por parte de Folin y Van Slyke a principios del siglo XX formarían las bases de la química clínica moderna, en gran medida gracias a la creación de laboratorios de investigación situados en los propios hospitales, siendo los Estados Unidos pioneros en esta tendencia². A partir de este nuevo enfoque, centrado en el análisis de pequeños volúmenes de fluidos biológicos, se comienzan a establecer intervalos

de referencia, correlaciones de variación y rutas metabólicas tanto en sujetos sanos como enfermos.

Tras este periodo, al fin de la Segunda Guerra Mundial, el número de personal cualificado para la investigación médica era limitado, ya que la mayoría de profesionales se especializaron en medicina de guerra. Por esta razón, numerosas facultades de bioquímica comienzan programas de formación e investigación que, al no estar directamente relacionados con los hospitales, derivan rápidamente al estudio de mecanismos de reacciones bioquímicas y, a falta de revistas especializadas, saturan las revistas médicas debido al gran volumen de publicaciones. Por esta razón, en 1948 se crea la Asociación Americana de Química Clínica, seguida de la primera revista científica del campo en 1955, *Clinical Chemistry*³.

Finalmente, en 1952 se funda la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC, *International Federation of Clinical Chemistry*) con el objetivo de unificar las distintas sociedades nacionales de química clínica bajo el amparo de la IUPAC⁴. De acuerdo con la IFCC, en 1971 se define a la química clínica como responsable de la descripción cualitativa y cuantitativa del estado patológico y fisiológico mediante el uso de análisis químico-clínicos. Posteriormente, en 1995, se amplía esta definición para incluir la aplicación de estrategias y técnicas químicas, moleculares y celulares como medio para un mejor entendimiento y evaluación de la salud humana^{1,5}.

Actualmente, uno de los campos de actuación de la medicina se centra en la reducción de errores de diagnóstico, para lo cual se distinguen 3 fases en el proceso de análisis^{1,6}:

- Pre-análisis. Una vez identificado el problema en base al historial médico, exámenes y otros datos previos, se solicita el análisis de los biomarcadores o analitos pertinentes, se toman las muestras necesarias y se transportan al laboratorio.

- **Análisis.** Incluye todos los pasos del proceso analítico en el laboratorio hasta obtener un dato numérico o cualitativo sobre las muestras.
- **Post-análisis.** Consiste en la evaluación de los resultados frente a rangos de referencia con el fin de detectar resultados adversos, anómalos o normales.

Dado que en las dos últimas fases del proceso clínico es donde se adquieren y valoran los datos numéricos relativos al estado del paciente, la evaluación de la incertidumbre en la medida es de especial importancia para un correcto diagnóstico. Es necesario pues, minimizar tanto la incertidumbre asociada a la medida individual de biomarcadores del paciente como la incertidumbre asociada al conjunto de datos de referencia contra los que va a ser comparado.

De esta manera, se requieren métodos exactos y precisos para un gran número de analitos de interés clínico, entre los que encontramos compuestos tan diversos como electrolitos (aniones/cationes, CO₂, O₂, etc.), compuestos organo-metálicos, compuestos orgánicos de gran peso molecular (proteínas, ácidos nucleicos o enzimas) y compuestos de bajo peso molecular (metabolitos, esteroides, fármacos, drogas, etc.), además de conteos de células⁷. Por otra parte, debido a la diferente distribución y biodisponibilidad de marcadores, los análisis clínicos pueden realizarse sobre cualquier tipo de matriz biológica, siendo todas ellas de gran dificultad analítica.

En todo momento, el resultado del análisis de las muestras de pacientes ha de ser directamente trazable al Sistema Internacional de Unidades mediante una cadena de comparaciones sucesivas con patrones y métodos de referencia cuya incertidumbre es conocida y disminuye al ascender por la cadena (*Figura 3.1*). Es decir, el resultado del paciente se ha obtenido mediante un método de análisis de rutina. En éste el calibrado se ha llevado a cabo mediante patrones cuya concentración se ha obtenido con un método de referencia de mayor calidad metrológica.

Éste, a su vez, puede ser comparado con otra metodología de referencia o patrón primarios, llegando finalmente al mol, la cantidad de sustancia del SI⁸. Habitualmente, los métodos de mayor calidad metrológica están basados en IDMS⁹.

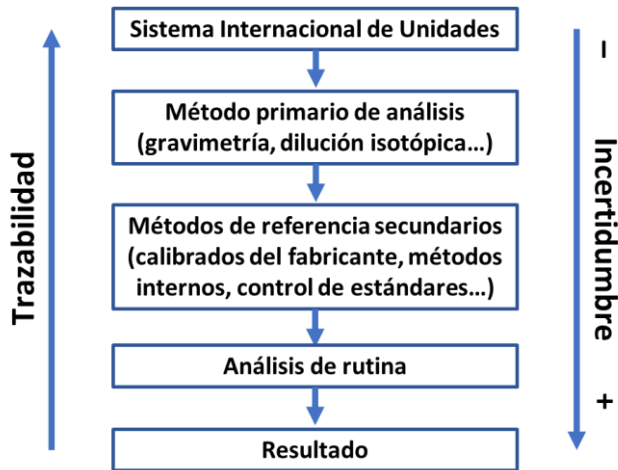


Figura 3.1. Relación de incertidumbre y trazabilidad por etapa analítica.

Por otra parte, es bien conocido el hecho de que la distinción entre salud y enfermedad para ciertos tipos de dolencias es difícil de determinar, puesto que los rangos de concentración de ambos grupos son cercanos o incluso llegan a solaparse, haciendo que los intervalos de decisión sean relativamente estrechos. Si bien para unos casos las distribuciones de concentración son bien distintas entre la población sana y la enferma (*Figura 3.2.A*), en cuyo caso un resultado poco preciso podría no comprometer el diagnóstico; en otros, estas distribuciones están muy próximas entre ellas, haciendo que la incertidumbre del resultado analítico sea crucial (*Figura 3.2.B*).

Por esta razón es necesario disponer de métodos fiables, exactos y precisos, que permitan no solamente disponer de rangos de referencia representativos, sino que los datos obtenidos en un centro de investigación sean comparables a otros. La trazabilidad de la metodología es garantía de esta comparabilidad. Por norma general, los rangos

utilizados en hospitales han de obtenerse para la zona geográfica a la que sirven, pues los niveles poblacionales pueden variar de una región a otra debido a multitud de factores (genéticos, ambientales, dietéticos, etc.).

No obstante, ciertos compuestos de elevada dificultad analítica requieren de esfuerzos conjuntos para producir metodologías adecuadas. Esto requiere de una base común sobre la que fundamentar el trabajo, es decir,

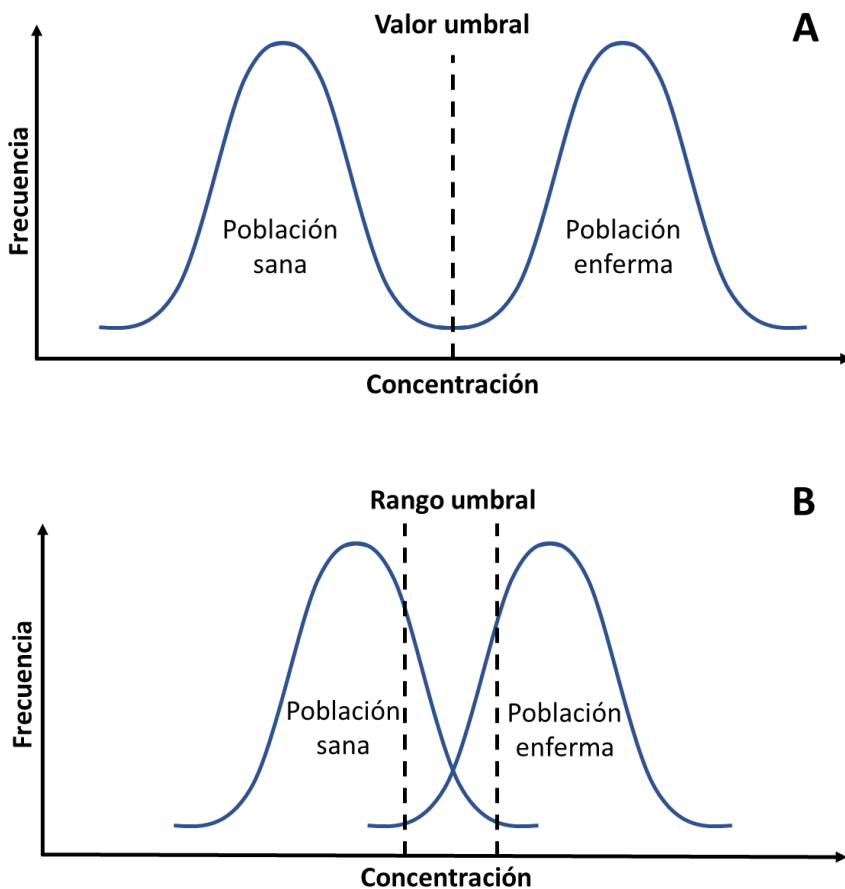


Figura 3.2. Comparación del valor o rango de decisión de diagnóstico en el caso de diferencias considerables de concentración de analito entre población sana y enferma (A) y de distribuciones solapadas (B).

guías de desarrollo y validación de métodos. A pesar de esta normalización, siguen existiendo discrepancias entre distintos métodos de cuantificación causadas por problemas diversos. Entre ellos, podemos encontrar la falta de especificidad del método y problemas de estabilidad o certificaciones incorrectas en los estándares de calibración, como se verá más adelante para el caso del análisis de déficit de Vitamina D¹⁰.

3.1.1 Metodologías de análisis

Dada la gran variedad de analitos de interés para el campo de la medicina y la práctica clínica en general, las metodologías empleadas son también muy variadas y abarcan prácticamente todas las opciones analíticas disponibles a lo largo de su historia.

Clásicamente, los ensayos clínicos implicaban el uso de reactivos comunes sobre diversos fluidos biológicos, tales como amoníaco, potasa o ácidos inorgánicos, con los que se obtenían y determinaban distintos residuos tras la reacción².

Posteriormente y a medida que se desarrollaban nuevas técnicas instrumentales, éstas acabaron por abrirse paso y dominar en los laboratorios de análisis. De entre todas ellas, una de las tendencias más extendidas fueron las técnicas espectroscópicas, tanto moleculares¹¹ como elementales^{12,13} o nucleares¹⁴. No obstante, en la actualidad las técnicas de preferencia son las de inmunoafinidad, debido mayoritariamente a sus, en principio, altas especificidad y sensibilidad, así como a su facilidad de uso.

La forma más sencilla de análisis por inmunoafinidad consiste en la inmovilización de un anticuerpo sobre una superficie sólida, capaz de atrapar de forma selectiva el analito de interés cuando se pone en contacto con la muestra problema. A continuación, se añade otro anticuerpo llamado trazador que es específico a otra parte del analito. Éste estará además marcado de alguna forma (*Figura 3.3*), normalmente con

un isótopo radiactivo para el modo de radio-inmunoensayo (RIA, *Radio-ImmunoAssay*) o con un grupo electroquimioluminiscente (ECLIA, *ElectroChemiLuminiscence InmunoAssay*)¹⁵.

A pesar de su gran popularidad, las técnicas de inmunoensayo no están exentas de problemas. Aunque se basa en la especificidad del anticuerpo por el analito, la realidad es que pueden existir numerosos compuestos compatibles con los sitios de anclaje y que están presentes en muestras biológicas. En consecuencia, los anticuerpos diseñados para moléculas de bajo peso molecular son capaces de reconocer no solamente un analito concreto, sino una familia de compuestos. Esto produce que distintos tratamientos de muestra o distintas plataformas produzcan resultados discrepantes. Además, la presencia de anticuerpos endógenos en las muestras puede llevar a una disrupción del proceso de interacción entre anticuerpo y analito o entre analito y trazador. Finalmente, al utilizar un número finito de puntos de anclaje del analito a los anticuerpos inmovilizados, existe el riesgo de saturar el sorbente y, por tanto, producir resultados erróneos¹⁶.

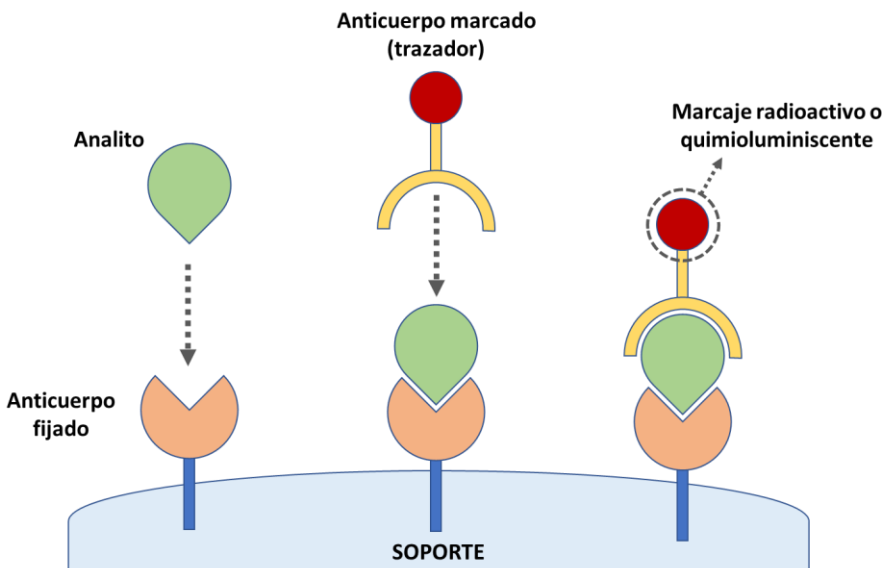


Figura 3.3. Mecanismo simplificado de las técnicas basadas en inmunoensayo.

Si bien es cierto que los métodos de RIA y ECLIA han sido mejorados en términos de automatización y sensibilidad hasta niveles de 10-100 pg/mL, algunos analitos (determinados esteroides androgénicos o estrógenos, por ejemplo) se encuentran en el organismo en concentraciones todavía más bajas. Toda esta problemática lleva a buscar una alternativa que, si bien supone un gasto elevado para los laboratorios clínicos, aporta una versatilidad que las técnicas de inmunoensayo no son capaces de proporcionar. Aquí es donde entra en juego la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS(MS))¹⁷.

La modalidad de LC-MS más extendida consiste en una separación en fase reversa con gradiente de metanol o acetonitrilo y formiato de amonio o tampones de acetato como modificadores de fase móvil. Como analizadores de masas, los más habituales son los de triple cuadrupolo (QqQ) ya que proporcionan una mayor robustez y sensibilidad para analitos conocidos, además de trampas de iones (IT) o cuadrupolos simples (Q). Por otra parte, el uso de analizadores de masas de alta resolución permite además realizar análisis no dirigidos con el objetivo de elucidar compuestos presentes en la muestra o determinar analitos no seleccionados previamente. En esta modalidad de trabajo destaca el analizador de alta resolución tipo tiempo de vuelo (TOF). No obstante, nuevos desarrollos de equipos como los analizadores de tipo QTrap, producto de la combinación de un cuadrupolo simple con una trampa de iones lineal, han abierto la posibilidad de trabajar en modo no dirigido con equipos de baja resolución¹⁸.

A pesar de la gran versatilidad y potencial de LC-MS para el laboratorio clínico, su uso extendido presenta unas limitaciones frente a las técnicas convencionales¹⁹:

- Elevado coste de operación y disponibilidad de equipos.
- Sensibilidad. En algunas ocasiones ECLIA resulta especialmente sensible.

- Tiempo de análisis. Las separaciones cromatográficas pueden necesitar gradientes de más de 15 minutos, lo cual limita el número de muestras analizadas al día.
- Robustez. Es decir, variabilidad de resultados frente a distintas muestras o condiciones ambientales.
- Implantación de métodos. Los procedimientos basados en LC-MS suelen desarrollarse y validarse en el propio laboratorio, frente al fácil acceso de *kits* de análisis por inmunoensayo. Es necesario disponer de personal cualificado.

Muchos de estos puntos ya están en proceso de mejora, como lo son la sensibilidad de los equipos de MS o la robustez de los mismos bajo las extremas condiciones de trabajo continuado de un laboratorio clínico de rutina, mejorando incluso la eficiencia de los métodos clásicos. Asimismo, las tareas de investigación y desarrollo de nuevos métodos por personal cualificado están cada vez más ligadas al trabajo rutinario, lo cual permite sustituir los a veces imprecisos análisis por inmunoensayo por otros de mayor calidad metrológica. A modo de ejemplo, el método aceptado por el *Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine* (JCTLM) para la determinación de vitamina D en suero se basa en LC-MS/MS²⁰.

En el presente capítulo se presentan dos aplicaciones de LC-MS e IDMS haciendo uso de la metodología IPD. Ésta, basada en la medida de abundancias isotópicas y que no hace uso de curva de calibrado, es la propuesta que reiteradamente se pone en práctica en la presente tesis. La finalidad ahora es demostrar el potencial de dicha técnica en dos importantes focos de interés en la problemática de la incertidumbre analítica en ensayos clínicos.

Por una parte, se presenta una metodología de certificación de estándares comerciales mediante materiales de referencia certificados (CRM), haciendo uso de IPD, para la determinación de Vitamina D. Esta corrección de posibles errores de certificación por parte del proveedor permite

cumplir con los estrictos niveles de precisión y exactitud impuestos por las guías de validación oficiales.

Por otra parte, se presenta un método de análisis de compuestos estrógenos en suero humano. Dichos compuestos se encuentran en concentraciones de hasta 1 pg/mL. De esta manera se pone a prueba el potencial de IPD a muy bajas concentraciones, manteniendo los tiempos de análisis por debajo de los 10 minutos y con una precisión y exactitud comparables a las de técnicas consolidadas en el laboratorio, basadas en RIA y ECLIA.

Los estudios presentados en el presente capítulo han sido llevados a cabo en el *Centre Hospitalier Universitaire Sart-Tilman* de Lieja (Bélgica) en colaboración con los doctores Fabregat y Cavalier del Departamento de Química Clínica. El trabajo realizado en dicho centro ha permitido desarrollar las metodologías empleadas bajo la perspectiva del laboratorio clínico, donde la productividad es un factor de alta prioridad, además de permitir la comparación entre las técnicas de rutina (inmunoensayo) frente al enfoque de la investigación (cromatografía y espectrometría de masas).

3.2 Re-certificación de estándares de hidroxivitamina D por deconvolución de perfiles isotópicos

Esta primera parte del capítulo se centra en la mejora de los datos previos al desarrollo de la metodología analítica en sí misma, es decir, la reducción de incertidumbre y errores de certificación en los materiales utilizados para el desarrollo.

En los últimos años, la deficiencia de vitamina D (VTD) se ha convertido en una verdadera epidemia global, incluso en aquellos países que disponen de más horas de luz solar al año, la cual es esencial para iniciar su biosíntesis²¹. La vitamina D puede encontrarse en dos formas, la vitamina D₂ y la D₃, siendo ésta última la más abundante. Si bien la vitamina D₃ puede obtenerse por dieta, la mayor parte se obtiene por acción de los rayos UVB en la epidermis, biosintetizándose a partir de la conversión de 7-dehidrocolesterol en previtamina D₃. Ésta sufre a su vez una isomerización térmica durante 3 días para formar vitamina D₃ o colecalciferol que, mediante proteínas enlazantes de vitamina D (VDBPs, *Vitamin D Binding Proteins*), es transportada por el flujo sanguíneo hasta alcanzar el hígado. Allí, la vitamina D₃ es transformada en 25-hidroxivitamina D₃ (25(OH)D₃), principal metabolito presente en el organismo y de tiempo de vida más largo. Otros compuestos generados en esta ruta metabólica por hidroxilaciones consecutivas en los riñones son 1,25-dihidroxivitamina D₃ y su metabolito inactivo 24,25-dihidroxivitamina D₃^{22,23} (Figura 3.4).

La determinación de VTD representa todavía hoy un desafío, un problema complejo²³. En primer lugar, no todos los metabolitos permiten evaluar el estatus de la VTD en el cuerpo humano. 1,25(OH)₂D es el compuesto biológicamente activo, sin embargo, su concentración en sangre depende de diferentes rutas metabólicas y no informa correctamente sobre el estatus de la VTD de la persona. Actualmente, el consenso general establece la 25(OH)D₃ como biomarcador de los niveles de vitamina D del

organismo, siendo el rango normal de entre 20 y 50 ng/mL en suero²⁴. No obstante, cuantificar de manera precisa este analito puede suponer una tarea difícil. Otros metabolitos de interés son 24,25(OH)₂D₃ y 3-epi-25(OH)D₃ pues pueden interferir en la determinación de 25(OH)D₃⁹. Todos estos compuestos son candidatos a formar parte de un futuro panel para la evaluación del estatus de la VTD y la definición inequívoca de hipovitaminosis D^{24,25}.

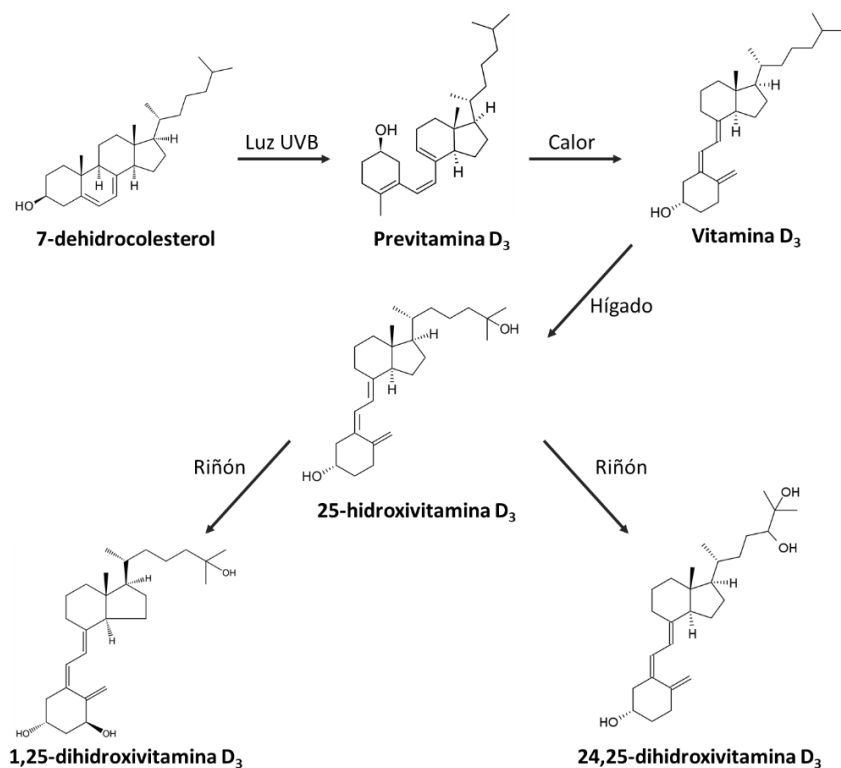


Figura 3.4. Biosíntesis y ruta metabólica de la vitamina D₃.

La determinación de 25(OH)D₃ en suero requiere un primer paso de liberación de la VDBP, proceso que conlleva la coextracción de otros compuestos endógenos que pueden afectar a los métodos típicamente usados²⁶, basados en inmunoensayos y LC-MS/MS. Por otro lado, a pesar de que ambas metodologías han ido mejorando en precisión y exactitud, aún existen discrepancias en los resultados. Especialmente relevante puede resultar el uso de métodos incorrectamente validados y de

patrones de calibrado inadecuados^{10,27-29}. Todos estos problemas suponen una pérdida en exactitud y trazabilidad de los resultados, en definitiva, en su fiabilidad. La estandarización de metodología es un problema no dirimido por completo en la actualidad y su resolución se aborda continuamente^{24,25}.

En 2009, una comparación entre diferentes campañas del *National Health and Nutrition Examination Survey* (NANHES)³⁰ puso de manifiesto la falta de reproducibilidad del inmunoensayo para la determinación de VTD. Entre otras conclusiones se obtuvieron las de introducir la metodología LC-MS/MS con fines comparativos, así como la necesidad de estandarizar la cuantificación en base a materiales de referencia del *National Institute of Standards and Technology* (NIST). Del mismo modo, son numerosos los trabajos publicados que también recomiendan una armonización de metodologías para la correcta determinación de VTD y la evaluación de resultados^{25,31-37}. Aún hoy en día la fiabilidad de los resultados representa un desafío analítico pues éstos no coinciden cuando se usan métodos diferentes e incluso cuando el método es el mismo.

Ya se ha comentado que los principales problemas asociados a inmunoensayo (IE) son la falta de selectividad y de exactitud. La primera etapa de estos métodos, la separación la VTD de las proteínas a las que está asociada, debe llevarse a cabo mediante métodos que sean compatibles con la posterior reacción con el anticuerpo seleccionado. Además, IE no diferencia entre isómeros y puede ocurrir que la reactividad sea diferente para cada uno de ellos.

Una ventaja obvia de LC-MS/MS es la separación de las diferentes especies de VTD previamente a su detección, lo que le confiere mayor versatilidad. Entre las desventajas asociadas a esta técnica encontramos, precisamente, la necesidad de separar todos los compuestos isobáricos endógenos (no siempre conocidos), el efecto matriz que puede afectar severamente a la fuente de ionización y la mayor dificultad de uso. Aun así, la facilidad de resolución de problemas de exactitud y precisión

mediante patrones internos marcados isotópicamente y la mayor versatilidad han convertido la LC-MS/MS en la metodología de referencia (“*Gold Standard*”).

Por otro lado, ambas técnicas comparten un problema importante relacionado con la falta de exactitud y reproducibilidad asociados al hecho comentado más arriba del uso de patrones incorrectamente certificados.

El Programa de Certificación para la Estandarización de Vitamina D (VDSP, *Vitamin D Standardization Certification Program*) surge de la comentada necesidad de aunar los esfuerzos de los laboratorios médicos mundiales por establecer metodologías de análisis del déficit de vitamina D que sean fiables y exactas. En él se establecen unas pautas estrictas de validación de métodos de determinación de distintos metabolitos de vitamina D. Es precisamente durante el desarrollo de una metodología de análisis de 25(OH)D₃ en el laboratorio clínico del CHU de Lieja (Bélgica) en la que se observa una desviación de hasta un 30% respecto a los valores nominales de materiales de referencia certificados. La falta de reproducibilidad intra- e inter-laboratorio debido al uso de patrones comerciales cuya concentración no está correctamente asegurada ha sido puesta de manifiesto en diferentes estudios^{11,25-27,33,34,37}. En alguno de ellos se ha comprobado que el uso de patrones comunes disminuye el CV a prácticamente la mitad²⁶. Resulta necesario, pues, algún tipo de control de calidad que permita cumplir con los estándares de validación establecidos en el VDSP, que establece un error relativo máximo de $\pm 5\%$ ³⁸.

Por esta razón, se presenta el desarrollo de una metodología de re-certificación de estándares comerciales de 25(OH)D₂/D₃ y 24,25(OH)₂D₃ por IPD para comprobar los datos de concentración o pureza indicados por el comerciante. El procedimiento de re-certificación también permite la comprobación periódica de los estándares utilizados en el laboratorio, corrigiendo posibles desviaciones producidas por evaporación de solventes, degradación de los compuestos u otros factores.

3.2.1 Secuencia de re-certificación de estándares

Al igual que en el resto de metodologías de IPD presentadas hasta ahora, el primer paso de desarrollo consiste en la adquisición de las matrices de referencia de cada analito y análogo marcado, obteniendo la información de abundancias isotópicas del clúster completo de transiciones MS/MS.

Seguidamente, se procede a la certificación de las disoluciones individuales de analitos marcados con deuterio ($^2\text{H}_3\text{-25(OH)D}_2$, $^2\text{H}_6\text{-25(OH)D}_3$ y $^2\text{H}_6\text{-24,25(OH)}_2\text{D}_3$) haciendo uso de los siguientes materiales de referencia certificados del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, *National Institute of Standards & Technology*):

- SRM 2972a: conjunto de cuatro soluciones etanólicas individuales que contienen, respectivamente, $25(\text{OH})\text{D}_3$ a dos niveles de concentración, $25(\text{OH})\text{D}_2$ y 3-epi- $25(\text{OH})\text{D}_3$.
- SRM 2971: solución etanólica que contiene $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Haciendo uso de la dilución isotópica inversa (RID), se obtienen las concentraciones de patrones marcados, trazables a los materiales de referencia.

Posteriormente, se cuantifica mediante IPD el contenido de analito natural de los estándares adquiridos (no certificados) utilizando las soluciones re-certificadas de análogos marcados. De esta manera se obtiene la concentración real de las soluciones estándar utilizadas para análisis de rutina basadas en IPD o en calibrados externos establecidos en el laboratorio, concentraciones que pueden o no coincidir con la documentación adjunta a la compra de los materiales, ya que pueden haberse producido pérdidas de analito o disolvente, o haberse producido degradaciones.

Este procedimiento puede repetirse periódicamente para asegurar la estabilidad de los estándares analíticos o, en su defecto, la corrección de los valores de concentración de los mismos (*Figura 3.5*).



Figura 3.5. Trazabilidad de los resultados de análisis de rutina a partir de CRM, mediante IPD.

3.2.2 Artículo científico 3

Re-certification of hydroxyvitamin D standards by isotope pattern deconvolution

J. Pitarch-Motellón, A. F. Roig-Navarro, C. Le Goff, E. Cavalier, N. Fabregat-Cabello. *Journal of Chromatography B* 2019, 1120, 89-94.

Journal of Chromatography B 1120 (2019) 89–94



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

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



Short communication

Re-certification of hydroxyvitamin D standards by isotope pattern deconvolution



J. Pitarch-Motellón^a, A.F. Roig-Navarro^a, C. Le Goff^{ab}, E. Cavalier^b, N. Fabregat-Cabello^{b,*}

^a Research Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, Castelló, Spain

^b Department of Clinical Chemistry, University of Liège, CHU Sart-Tilman, Liège, Belgium

ARTICLE INFO

Keywords:
LC-MS/MS
Isotope dilution mass spectrometry
Vitamin D
Certification
Isotope Pattern Deconvolution
Quality control

ABSTRACT

Background: Vitamin D testing in analytical clinical laboratories has been experiencing a rapid increase of demand over the last years, as it plays a key role in several disorders. Due to the narrow ranges of medical significance regarding its concentration levels in human serum, accurate and precise determinations of vitamin D metabolites are required.

Methods: We present an isotope dilution mass spectrometry quantification method for the re-certification of routine commercial standards used in method validation steps, isotope pattern deconvolution (IPD) based on LC-MS/MS.

Results: IPD allowed to compensate for the observed biases of +4.7% for 25(OH)D₃, –29% for 25(OH)D₂ and –30% for 24,25(OH)₂D₃ standard concentrations, respectively in an easy, cheap and straightforward way.

Conclusions: It has been observed that, in some cases, discrepancies may exist between stated purity or amount of routinely used commercial standards and actual values, which would lead to unwanted bias in the developed methodologies. The present correction has helped meeting the regulations established by international standardization programs, including Vitamin D Standardization Program (VDSP).

1. Introduction

Vitamin D (VTD) is an important prohormone widely known since its deficiency is directly related to development of rickets in children and osteoporosis in adults. Furthermore, recent studies have demonstrated that vitamin D has also an important role in non-skeletal conditions such as autoimmune diseases, cardiovascular diseases and cancer, among others [1]. This vitamin can be found in two main forms: vitamin D₂ and vitamin D₃. The most common form is vitamin D₃ (or cholecalciferol) and can be obtained either from the diet (mostly fatty fish) or endogenous biosynthesis under the effect of UV rays of sunlight. The other form, vitamin D₂ (ergocalciferol or calciferol) is derived from ergosterol, a yeast sterol found in mushrooms. The metabolism of both forms of vitamin D are subjected to a first hydroxylation in the liver to form 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) and then to a second one in the kidney to form 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25(OH)₂D), the active form of vitamin D. Nevertheless, the measurement of 25(OH)D in serum samples is preferred test for the assessment of vitamin D status over the 1,25(OH)₂D. There are two main reasons for this choice: the longer lifetime (3 weeks versus 4 h) and its higher concentration levels (ng/mL versus pg/mL) [2]. Besides, some other VTD metabolites have gained

more attention in the last years. Among them, 24,25(OH)₂D₃ should be mentioned due to its correlation with 25(OH)D₃ which can help to assess VTD status [3].

Over the last years, a dramatic rise in vitamin D testing (as 25(OH)D) has been observed due to different reasons [3–5]. The assays currently available for this determination can be classified into binding (mostly automatic immunoassays) and chemical assays (HPLC and LC-MS/MS) [6,7]. As a consequence, and due to the poor agreement observed among all those different assays an urgent need of standardization across the different methods is needed in order to assure a correct diagnostic and treatment of the patients. Furthermore, the traditional 25(OH)D cut-offs in use for vitamin D deficiency are either 20 or 30 ng/mL, and have been established using Radioimmuno Assays (RIA). In order to deal with the problem of lack of agreement between assays, different entities with international reputation have created programs to establish world-wide standardization, including the VDSP (Vitamin D Standardization Program) from the United States and the DEQAS (Vitamin D External Quality Assessment Scheme) from the United Kingdom. According to the VDSP recommendations, a total CV ≤ 10% and a maximum mean bias against a reference method of ≤ 5% is accepted for the method under standardization [8].

* Corresponding author at: Hematology Research group, Health Research Institute Hospital La Fe (HS La Fe), Valencia, Spain.

E-mail address: N.Fabregat@outlook.es (N. Fabregat-Cabello).

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.04.043>

Received 22 January 2019; Received in revised form 1 April 2019; Accepted 21 April 2019

Available online 22 April 2019

1570-0232/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Re-certification of hydroxyvitamin D standards by isotope pattern deconvolution

Journal of Chromatography B 1120 (2019) 89-94

J. Pitarch-Motellón^a, A. F. Roig-Navarro^a, C. Le Goff^b, E. Cavalier^b, N. Fabregat-Cabello^{b,*}

^aResearch Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, Castelló, Spain

^bDepartment of Clinical Chemistry, University of Liège, CHU Sart-Tilman, Liège, Belgium

*Corresponding autor at: Hematology Research group, Health Research Institute Hospital La Fe (IIS La Fe), Valencia, Spain.

E-mail adress: n.fabregat@outlook.es (N. Fabregat-Cabello)

ABSTRACT

Background: Vitamin D testing in analytical clinical laboratories has been experiencing a rapid increase of demand over the last years, as it plays a key role in several disorders. Due to the narrow ranges of medical significance regarding its concentration levels in human serum, accurate and precise determinations of vitamin D metabolites are required

Methods: We present an isotope dilution mass spectrometry quantification method for the re-certification of routine commercial standards used in method validation steps, isotope pattern deconvolution (IPD) based on LC-MS/MS.

Results: IPD allowed to compensate for the observed biases of +4.7% for 25(OH)D₃, -29% for 25(OH)D₂ and -30% for 24,25(OH)₂D₃ standard concentrations, respectively in an easy, cheap and straightforward way.

Conclusions: It has been observed that, in some cases, discrepancies may exist between stated purity or amount of routinely used commercial

standards and actual values, which would lead to unwanted bias in the developed methodologies. The present correction has helped meeting the regulations established by international standardization programs, including Vitamin D Standardization Program (VDSP).

KEYWORDS: LC-MS/MS, isotope dilution mass spectrometry, vitamin D, certification, isotope pattern deconvolution, quality control

1. INTRODUCTION

Vitamin D (VTD) is an important prohormone widely known since its deficiency is directly related to development of rickets in children and osteoporosis in adults. Furthermore, recent studies have demonstrated that vitamin D has also an important role in non-skeletal conditions such as autoimmune diseases, cardiovascular diseases and cancer, among others [1]. This vitamin can be found in two main forms: vitamin D₂ and vitamin D₃. The most common form is vitamin D₃ (or cholecalciferol) and can be obtained either from the diet (mostly fatty fish) or endogenous biosynthesis under the effect of UV rays of sunlight. The other form, vitamin D₂ (ergocalciferol or calciferol) is derived from ergosterol, a yeast sterol found in mushrooms. The metabolism of both forms of vitamin D are subjected to a first hydroxylation in the liver to form 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) and then to a second one in the kidney to form 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25(OH)₂D), the active form of vitamin D. Nevertheless, the measurement of 25(OH)D in serum samples is preferred test for the assessment of vitamin D status over the 1,25(OH)₂D. There are two main reasons for this choice: the longer lifetime (3 weeks versus 4 h) and its higher concentration levels (ng/mL versus pg/mL) [2]. Besides, some other VTD metabolites have gained more attention in the last years. Among them, 24,25(OH)₂D₃, should be mentioned due to its correlation with 25(OH)D₃ which can help to assess VTD status [3].

Over the last years, a dramatic rise in vitamin D testing (as 25(OH)D) has been observed due to different reasons [3-5]. The assays currently

available for this determination can be classified into binding (mostly automatic immunoassays) and chemical assays (HPLC and LC-MS/MS) [6-7]. As a consequence, and due to the poor agreement observed among all those different assays an urgent need of standardization across the different methods is needed in order to assure a correct diagnostic and treatment of the patients. Furthermore, the traditional 25(OH)D cut-offs in use for vitamin D deficiency are either 20 or 30 ng/mL, and have been established using RadioImmuno Assays (RIA). In order to deal with the problem of lack of agreement between assays, different entities with international reputation have created programs to establish world-wide standardization, including the VDSP (Vitamin D Standardization Program) from the United States and the DEQAS (Vitamin D External Quality Assessment Scheme) from the United Kingdom. According to the VDSP recommendations, a total $CV \leq 10\%$ and a maximum mean bias against a reference method of $\leq 5\%$ is accepted for the method under standardization [8].

There are several factors that can result in inadequate values for routine precision and bias. Among them, those related to method unspecificity, instrumental biased measurements, and calibration solution issues [9-12]. The last one, working with reliable standard solutions, is recognised as a key problem regardless of the analytical methodology used. Usual problems with commercial calibration solution or standards are stability and concentration not accurately certified [9,10,13,14]. In this way, it is recommended to periodically check the concentration of vitamin D isomers. A straightforward way to deal with this problem is to buy, if available, certified calibrators from prestigious entities, e.g. the National Institute of Standards and Technology (NIST). However, routine use of high quality standards is not always the best option due to their usually unattainable price. Thus, recertifying calibrator solutions can be a good choice.

Mass spectrometry is currently the method of choice for the determination of thermolabile or non-volatile compounds. Despite its known advantages, sample measurements are not free of fluctuations, either by instrument variation (injection volume, detector fluctuations, etc.) or by the composition of samples (mostly matrix effects able to

modify of the ionization in the electrospray). All these problems can be compensated by the addition of an Isotopically-Labelled Internal Standard (ILIS). This method is called isotope dilution mass spectrometry (IDMS) and is known to yield the most accurate, precise and reliable results [15]. The most common approach is to create a calibration curve by plotting the ratio of the analyte signal to the internal standard signal as a function of the analyte concentration standards, when a constant amount of ILIS is added to both samples and calibrators. A second approach is the quantification based on Isotope Pattern Deconvolution, which makes use of the artificial alteration of the natural isotopomer abundances when a known amount of a labelled analogue is added to a sample. Calculations are based on multiple linear regression without the use of methodological calibration, thus reducing the total analysis time. Being an IDMS based method, IPD results are traceable to the International System of units (SI) [16-18]. This reliable approach has been satisfactorily tested for rapid quantifications in different complex matrices, such as urine, food and environmental samples [19-22].

In this work we show a re-certification approach for 25(OH)D₂/D₃ and 24,25(OH)₂D₃ solvent standards based on Isotope Pattern Deconvolution using NIST SRM 2971 and 2972 as reference materials. With this approach, that faces the core problem of poor certification of some standards, the exact concentration of commercial standards are accurately known. Thus, the analytical method meets the requirements for external standardization criteria using in-house calibration curves.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Standards of 25-hydroxyvitamin D₂ (25(OH)D₂), ²H₃-25-hydroxyvitamin D₂ (²H₃-25(OH)D₂) and 24,25-dihydroxyvitamin D₃ (24,25(OH)₂D₃) were purchased from Isosciences (K. of Prussia, PA, USA). Standards of 25-hydroxyvitamin D₃ (25(OH)D₃), ²H₆-25-hydroxyvitamin D₃ (²H₆-25(OH)D₃) and ²H₆-24,25-hydroxyvitamin D₃ (²H₆-24,25(OH)₂D₃) were from Medical Isotopes (Pelham, NH, USA). SRM2972 solvent-based materials for

25(OH)D₂, 25(OH)D₃ (1 level) and SRM2971 solvent-based materials for 24,25(OH)₂D₃ were purchased from the National Institute for Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA). All stock solutions were stored at -20°C and employed to prepare daily gravimetrically diluted working standard solutions in methanol. MSG2000 Vitamin D-free human serum was purchased from Golden West Biological (Temecula, CA, USA). Structures of each vitamin D forms can be consulted in Table 1.

Individual stock solutions of 25(OH)D₂, ²H₃-25(OH)D₂, 25(OH)D₃, ²H₆-25(OH)D₃, 24,25(OH)₂D₃ and ²H₆-24,25(OH)₂D₃ were prepared gravimetrically by weighting the volume of methanol added. In all cases the certified amount of analyte was 1 mg, giving approximate concentrations of 1 mg/mL. Theoretical exact concentrations were obtained taking into account the purity percentage as indicated in the Certificate of Analysis (CoA). Sequential dilutions were also prepared by weight in methanol at a concentration level of 50, 10 and 0.5 µg/mL. Exact values are finally recertified using IPD calculations and SRM 2971 and 2972 as reference standards (see results section).

Methanol, acetonitrile and water were all LC-MS grade from Biosolve BV (Valkenswaard, Netherlands). Formic acid additive for LC-MS was purchased from Fisher Chemicals (Loughborough, UK).

Table 1. Structures of natural and labelled 25-hydroxyvitamin D2 and D3 and 24,25-dihydroxyvitamin D3.

	25-hydroxyvitamin D2 (25(OH)D2)	25-hydroxyvitamin D3 (25(OH)D3)	24,25-dihydroxyvitamin D3 (24,25(OH) ₂ D3)
Natural structure			
Labeled structure			

2.2. LC-MS/MS conditions

Identification and quantification of the selected compounds was carried out with an UHPLC system using a Nexera X2 UPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) interfaced to a quadrupole-linear ion trap QTRAP 6500 system from AB Sciex (Foster City, CA, USA) using an IonDrive™ Turbo V ion source. Chromatographic separation was performed on a pentafluorophenyl Kinetex PFP 100Å column (100 x 2.1 mm, 2.6 µm) fitted with a UPLC SecurityGuard ULTRA cartridge from Phenomenex (Torrance, CA, USA). The mobile phase was a time programmed gradient using A (water) and B (methanol), both modified with 0.1% formic acid. Starting from 40% methanol a final 95% was reached. Analytes were ionized by atmospheric pressure chemical ionization in positive mode (APCI+) and detected by MS/MS in Selected Reaction Monitoring (SRM). Further information can be consulted elsewhere [23].

Analyst v1.6.2 (Sciex) software was used for data acquisition. Data treatment for quantitation was performed on MultiQuant v3.0.2 (Sciex).

2.3. Isotope Pattern Deconvolution

IPD is an alternative to classical Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS) calibration procedures. that avoids the preparation of a calibration curve. It is an isotope dilution mass spectrometry quantification method which is based on the multiple linear regression calculation, after the addition of isotopically enriched analogues of the analytes under study, producing an alteration of the natural distribution of isotopic abundances. Briefly, the resulting isotopic composition ($A_{mix}^{SRM_i}$), (Figure 1C) measured after mixing the natural occurring analytes in the samples and the spiked labelled analogues, is a linear combination of the natural ($A_{nat}^{SRM_i}$) (Figure 1A) and enriched ($A_{lab}^{SRM_i}$) (Figure 1B) compound's isotopic distribution of abundances. The generic isotopic distribution also shows possible impurities in the labelled compound due to improper or incomplete labelling of the structure (Figure 1B). Using tandem MS in the SRM mode isotopic abundances can be experimentally measured from the transitions

generated by the parent ion. Thus, for n measured transitions in the MS/MS system, this can be expressed as matrix notation as follows:

$$\begin{bmatrix} A_{mix}^{SRM_1} \\ A_{mix}^{SRM_2} \\ \vdots \\ A_{mix}^{SRM_n} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^{SRM_1} & A_{lab}^{SRM_1} \\ A_{nat}^{SRM_2} & A_{lab}^{SRM_2} \\ \vdots & \vdots \\ A_{nat}^{SRM_n} & A_{lab}^{SRM_n} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X_{nat} \\ X_{lab} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{SRM_1} \\ e^{SRM_2} \\ \vdots \\ e^{SRM_n} \end{bmatrix} \quad (\text{Eq. 1})$$

Individual abundances for natural ($A_{nat}^{SRM_i}$) and labeled ($A_{lab}^{SRM_i}$) analogues must be obtained measuring the whole cluster transitions. Final calculations only need a minimum of three measured transitions in the spiked sample ($A_{mix}^{SRM_i}$) [16]. In order to solve the equation system, an error vector is included (e^{SRM_i}). Minimization of this parameter by multiple linear regression gives the values of molar fractions (X_{nat} and X_{lab} respectively) that best fit the experimental data of the mix. These calculations can be easily performed with the Excel Linest function, which uses the least squares method to calculate the line of best fit through a supplied set of y (in this cases, $A_{mix}^{SRM_i}$) and x ($(A_{nat}^{SRM_i})$ and $(A_{lab}^{SRM_i})$) values. Finally, since the amount of labelled compound (N_{lab}) spiked into the sample is known, the amount of natural compound (N_{nat}) is readily obtained:

$$N_{nat} = N_{lab} \frac{X_{nat}}{X_{lab}} \quad (\text{Eq. 2})$$

As said before, no methodological calibration is needed, and quantification is directly conducted in the sample after one injection. This methodology requires the full characterization of both compounds (natural and labelled) in terms of their isotopomer distribution of abundances. In the present work isotopomer abundances have been experimentally measured. In addition, the exact concentration of the labelled standard solutions should be obtained by reverse isotope dilution (RID), using the labelled standard, as a sample, and the certified SRM standards. (See Supplemental Data, IPD_detailed section, for a more detailed explanation and an example of calculation).

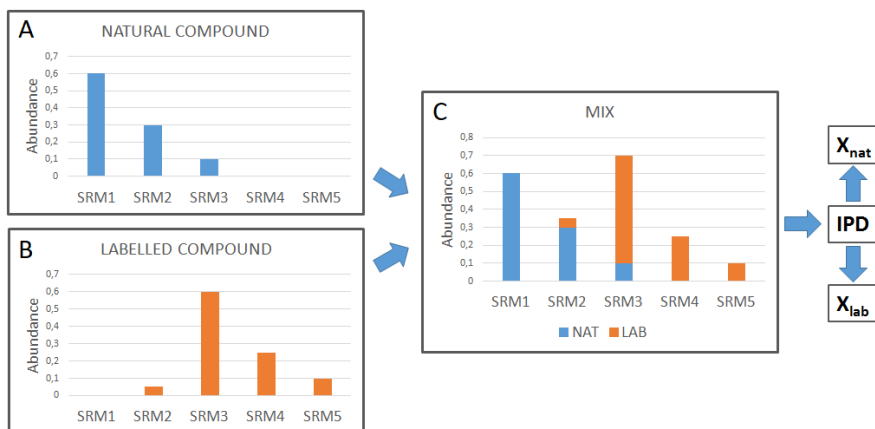


Figure 1. Generic illustration of the IPD process including the isotopic distribution of natural (A) and labelled compounds (B) and the corresponding combined distribution assuming a 1:1 mixture of both analogues (C) for five transitions in Selected Reaction Monitoring (SRM).

3. RESULTS

As a first step, in the framework a VTD study, solvent based reference materials were analysed, using external calibration, with the commercial standards available in the laboratory. Accuracy of results was unacceptable. Bias was near 30% for some of the metabolites determined. Thus, commercial standards were recertified using IDMS and IPD calculations, a tested fast, reliable and traceable methodology. The whole procedure includes the exact determination of the concentration of the labelled compounds by Reverse Isotope Dilution (RID) using the NIST SRM 2972 and SRM 2971 as reference materials and the subsequent calculation of the exact concentration of the commercial natural standards by IPD.

As said above, IPD provides a fast and reliable way to quantify analyte concentrations without the need of performing methodological calibrations while it is directly traceable to the International System of Units. Nevertheless, it is required a careful and extensive characterization of natural and labelled compounds. That is, isotopic distribution of abundances needs to be accurately known as well as the concentration of

labelled solutions used for spiking samples, which is obtained by the aforementioned RID methodology.

Detailed and extended information of IPD quantification methodology can be found in the bibliography [16-18].

3.1. Characterization of abundances

Once the suitable transitions were selected, average experimental abundances were obtained by injection of 0.5 µg/mL individual standards for each natural and labelled compounds (n=5). Enhanced Product Ion (EPI) acquisition mode was used in order to get the necessary mass resolution to avoid peak overlapping. An example of spectrum acquisition can be observed in Figure 2. Results are shown on Supplemental Data Tables 1, 2 and 3.

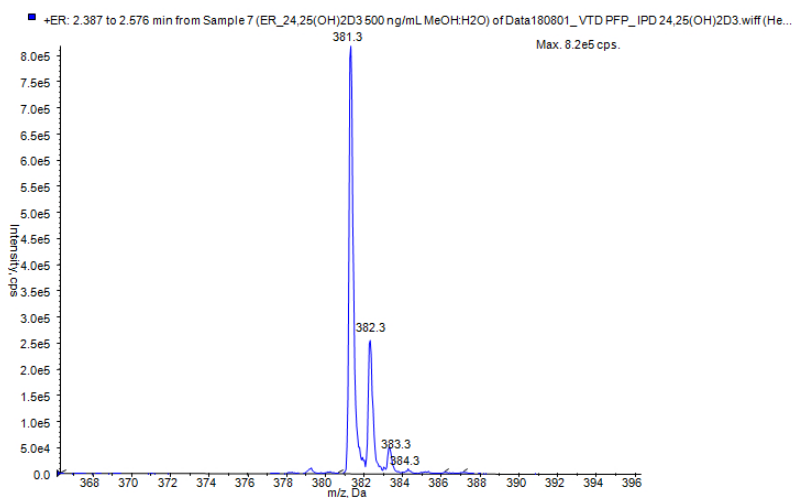


Figure 2. Enhanced product ion acquisition for 24,25(OH)2D3.

3.2. Reverse Isotope Dilution (RID) of labelled compounds

As exposed before, the proposed approach of IPD requires the determination of the exact concentration of the labelled compound. For this purpose, 0.04 g of each isotopically labelled compound solution was individually mixed with also 0.04 g of certified solution of its natural analogue, either SRM2972 (25(OH)D₃ and 25(OH)D₂) or SRM2971 (24,25(OH)₂D₃) solvent-based material and diluted with 0.1 g of water. Final solutions of approximately 500 ng/g of both compounds were gravimetrically prepared in triplicate, and injected in the LC–MS/MS system also in triplicate and finally determined by RID mass spectrometry. Table 2 summarizes the results obtained for the labelled compound solutions of 10 µg/mL of nominal concentration for 25(OH)D and 1 µg/mL for 24,25(OH)₂D₃, prepared by gravimetric dilutions of the stock solutions. Exact concentrations show high precision with CV < 2.5%.

Table 2. Experimentally calculated concentration of labelled standards used for spiking, determined by Reverse Isotope Dilution (RID).

Compound	Mean ¹ (µg/mL)	SD ²	RSD
² H ₃ -25(OH)D ₂	7.17	0.07	1.0%
² H ₆ -25(OH)D ₃	5.12	0.13	2.5%
² H ₆ -24,25(OH) ₂ D ₃	1.340	0.012	0.9%

¹ Theoretical nominal concentration should be 10 µg/mL for ²H₃-25(OH)D₂ and ²H₆-25(OH)D₃ and 1 µg/mL ²H₆-24,25(OH)₂D₃.

²SD=Standard Deviation, RSD=Relative Standard Deviation. n = 3, injected three times each

3.3. Re-certification of the natural standards by IPD

A similar approach to that used in RID was employed for IPD calculations. In this case, the real concentrations of the natural analogues were calculated with the exact concentration obtained for the labelled counterparts. Individual IPD solutions were prepared gravimetrically mixing 0.04 g of RID certified labelled solution with 0.04 g of natural solutions. Solutions were prepared in triplicate, and injected in the LC–MS/MS system also in triplicate and finally determined by IPD mass spectrometry.

For 25(OH)D₃, the concentration obtained by IPD, 732 µg/mL, was in line with the theoretical values of 765 µg/mL. In the case of 25(OH)D₂, the concentration obtained by IPD was 1258 µg/mL while the theoretical concentration, according to the commercial certificate, was 976 µg/mL. Similar results were obtained for 24,25(OH)₂D₃ (Table 3). These results mean a bias of -4.7% for the calibrator of 25(OH)D₃, a bias of +29% in the case of 25(OH)D₂ and a bias of +30% for 24,25(OH)₂D₃. As a consequence, the use of solutions prepared without any previous re-certification would imply a systematic bias of +4.7%, -29% and -30% in the determination of real samples.

Table 3. Re-certification of natural standards by IPD using their labelled analogues.

Compound	Theoretical concentration (µg/mL)	Mean (µg/mL)	SD ¹	RSD
25(OH)D ₂	976	1258	8	0.7%
25(OH)D ₃	765	732	9	1.2%
24,25(OH) ₂ D ₃	933	1210	13	1.1%

¹SD=Standard Deviation, RSD=Relative Standard Deviation. (n = 3, injected thrice each).

Results obtained for commercial (not CRMs) standards, natural and labelled, point out the need to recertify any stock standard solutions (against a suitable CRM), thus, avoiding problems of inaccuracy of commercial certifications or degradation processes, and unreliable final results.

3.4. Comparison with reference samples from the VDSP program

For comparison and validation purposes, we tested 80 reference samples provided by the VDSP program and compared them to the real total vitamin D value using the reference method [23]. Quantification of samples was performed with the corrected values obtained for the standards by IPD. An average bias of 3% was obtained which is in accordance with the VDSP recommendations that accept a ± 5% bias.

4. DISCUSSION

The results of the current study show the importance of recertify the concentration of critical standards. In addition, the suitability of Isotope Pattern Deconvolution, a tested fast and reliable method, to provide accurate diagnostics is demonstrated. The present study demonstrates the high impact that may result from the lack of knowledge of the exact values, where a simple erroneous concentration can originate high loses in the clinical laboratory. Besides, these biases are usually attributed to sample preparation instead of standard concentration.

As stated in the introduction, Isotope Pattern Deconvolution has been applied for the accurate quantification of a great variety of samples, including environmental, food and human samples. Besides some clinical applications have also been developed [19-24] but not a single recertification strategy has been described before.

The present approach permits also buying cheaper standards with either unknown concentrations or low purity and recertify their concentration against international recognised standards, directly traceable to the international system of units. Another advantage of the recertification is that it avoids the repetition of sample analyses when the systematic bias has been detected and studied. Finally, it permits to retest periodically the laboratory standards with high-level standards.

When very strict quality controls are required the concentration provided by these standards may be unacceptable. Positive bias in the concentration can be attributed to an error in the weighting by the seller or evaporation of the solvent used for the solution, while negative bias could be explained by a loss of the solid standard, including degradation.

Another possibility is the fact that some vendors include on the vial label "1 mg", being this value in some cases an approximate weighting. As a consequence, it is absolutely necessary to verify with the vendor before the shipping of the material if this value corresponds to an exact weighting. Usually, an accurate weight will increase the standard price around a 5-10 % of the total price.

In conclusion, in this study we have demonstrated the power of Isotope Pattern Deconvolution for the easy and accurate re-certification of vitamin D standards. In addition, we have shown that the preparation of solvent standards from vials containing, in theory, 1 mg of solid can be a simple yet an important source of error. Re-certification by IPD using a reference standard in solvent is able to correct these problems in a fast, reliable and cost-saving way with the highest confidence.

CONFLICTS OF INTEREST

There are no conflicts to declare.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

REFERENCES

- [1] R.M. Gathungu, C.C. Flarakos, G.S. Reddy, P. Vouros, THE ROLE OF MASS SPECTROMETRY IN THE ANALYSIS OF VITAMIN D COMPOUNDS, *Mass Spectrom. Rev.* 32 (2013) 72–86. doi:10.1002/mas.
- [2] M.L. Musteata, F.M. Musteata, Overview of extraction methods for analysis of vitamin D and its metabolites in biological samples, *Bioanalysis.* 3 (2011) 1987–2002. doi:10.4155/bio.11.195.
- [3] J.M.W. van den Ouweland, Analysis of vitamin D metabolites by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *TrAC Trends Anal. Chem.* 84 (2016) 117–130. doi:10.1016/j.trac.2016.02.005.
- [4] S.H. Atef, Vitamin D assays in clinical laboratory: Past, present and future challenges, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 175 (2018) 136–137. doi:10.1016/j.jsbmb.2017.02.011.

- [5] N. Sattar, Biomarkers for diabetes prediction, pathogenesis or pharmacotherapy guidance? Past, present and future possibilities, *Diabet. Med.* 29 (2012) 5–13. doi:10.1111/j.1464-5491.2011.03480.x.
- [6] J.M.W. van den Ouweland, Analysis of vitamin D metabolites by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *TrAC Trends Anal. Chem.* 84 (2016) 117–130. doi:10.1016/j.trac.2016.02.005.
- [7] S.H. Atef, Vitamin D assays in clinical laboratory: Past, present and future challenges, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 175 (2018) 136–137. doi:10.1016/j.jsbmb.2017.02.011.
- [8] C.T. Sempos, J.M. Betz, J.E. Camara, G.D. Carter, E. Cavalier, M.W. Clarke, K.G. Dowling, R.A. Durazo-Arvizu, A.N. Hoofnagle, A. Liu, K.W. Phinney, K. Sarafin, S.A. Wise, P.M. Coates, General steps to standardize the laboratory measurement of serum total 25-hydroxyvitamin D, *J. AOAC Int.* 100 (2017) 1230–1233. doi:10.5740/jaoacint.17-0259.
- [9] M. Bedner, K.A. Lippa, 25-Hydroxyvitamin D isomerizes to pre-25-hydroxyvitamin D in solution: considerations for calibration in clinical measurements, *Anal. Bioanal. Chem.* 25 (2015) 8079–8086. doi:10.1007/s00216-015-8980-z.
- [10] G.D. Carter, 25-Hydroxyvitamin D assays: The quest for accuracy, *Clin. Chem.* 55 (2009) 1300–1302. doi:10.1373/clinchem.2009.125906.
- [11] E.A. Yetley, C.M. Pfeiffer, R.L. Schleicher, K.W. Phinney, D.A. Lacher, S. Christakos, J.H. Eckfeldt, J.C. Fleet, G. Howard, A.N. Hoofnagle, S.L. Hui, G.L. Lensmeyer, J. Massaro, M. Peacock, B. Rosner, D. Wiebe, R.L. Bailey, P.M. Coates, A.C. Looker, C. Sempos, C.L. Johnson, M.F. Picciano, NHANES monitoring of serum 25-hydroxyvitamin D: a roundtable summary, *J. Nutr.* 140 (2010) 2030S–2045S. doi:10.3945/jn.110.121483.
- [12] D.A. Volmer, L.R.B.C. Mendes, C.S. Stokes, Analysis of vitamin D metabolic markers by mass spectrometry: current techniques, limitations of the “Gold standard” method, and anticipated future directions, *Mass Spectrom. Rev.* 34 (2015) 2–23. doi:10.1002/mas.

- [13] G.D. Carter, J.C. Jones, Use of a common standard improves the performance of liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods for serum 25-hydroxyvitamin-D, *Ann. Clin. Biochem.* 46 (2009) 79–81. doi:10.1258/acb.2008.008135.
- [14] G. D. Carter, Accuracy of 25-Hydroxyvitamin D Assays: Confronting the Issues, *Curr. Drug Targets.* 12 (2011) 19–28. doi:10.2174/138945011793591608.
- [15] A. Furey, M. Moriarty, V. Bane, B. Kinsella, M. Lehane, Ion suppression; A critical review on causes, evaluation, prevention and applications, *Talanta.* 115 (2013) 104–122. doi:10.1016/j.talanta.2013.03.048.
- [16] J.I. García Alonso, P. Rodríguez-González, *Isotope Dilution Mass Spectrometry*, Royal Society of Chemistry, 2013.
- [17] A. González-Antuña, P. Rodríguez-González, G. Centineo, J.I. García Alonso, Evaluation of minimal ¹³C-labelling for stable isotope dilution in organic analysis, *Analyst.* 135 (2010) 953. doi:10.1039/b924432h.
- [18] Á. Castillo, E. Gracia-Lor, A.F. Roig-Navarro, J. Vicente Sancho, P. Rodríguez-González, J.I. García Alonso, Isotope pattern deconvolution-tandem mass spectrometry for the determination and confirmation of diclofenac in wastewaters., *Anal. Chim. Acta.* 765 (2013) 77–85.
- [19] A. González-Antuña, P. Rodríguez-González, G. Centineo, J.I. García Alonso, Simultaneous determination of seven β 2-agonists in human and bovine urine by isotope dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry using compound-specific minimally ¹³C-labelled analogues, *J. Chromatogr. A.* 1372 (2014) 63–71. doi:10.1016/j.chroma.2014.10.065.

[20] J. Pitarch-Motellón, J. V. Sancho, M. Ibáñez, O. Pozo, A.F. Roig-Navarro, Determination of selected endogenous anabolic androgenic steroids and ratios in urine by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and isotope pattern deconvolution, *J. Chromatogr. A.* 1515 (2017) 172–178. doi:10.1016/j.chroma.2017.08.006.

[21] N. Fabregat-Cabello, P. Zomer, J.V. Sancho, A.F. Roig-Navarro, H.G.J. Mol, Comparison of approaches to deal with matrix effects in LC-MS/MS based determinations of mycotoxins in food and feed, *World Mycotoxin J.* 9 (2016) 149–161. doi:10.3920/WMJ2014.1872.

[22] N. Fabregat-Cabello, J. Pitarch-Motellón, J.V. Sancho, M. Ibáñez, A.F. Roig-Navarro, Method development and validation for the determination of selected endocrine disrupting compounds by liquid chromatography mass spectrometry and isotope pattern deconvolution in water samples. Comparison of two extraction techniques, *Anal. Methods.* 8 (2016) 2895–2903. doi:10.1039/C6AY00221H.

[23] N. Fabregat-Cabello, J. Farre-Segura, L. Huyghebaert, S. Peeters, C. Le Goff, J.-C.C. Souberbielle, E. Cavalier, A fast and simple method for simultaneous measurements of 25(OH)D, 24,25(OH)₂D and the Vitamin D Metabolite Ratio (VMR) in serum samples by LC-MS/MS, *Clin. Chim. Acta.* 473 (2017) 116–123. doi:10.1016/j.cca.2017.08.024.

[24] M. Fernández-Fernández, P. Rodríguez-González, M.E. Añón Álvarez, F. Rodríguez, F.V.Á. Menéndez, J.I.G. Alonso, Simultaneous Determination of Creatinine and Creatine in Human Serum by Double-Spike Isotope Dilution Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) and Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS), *Anal. Chem.* 87 (2015) 3755–3763. doi:10.1021/acs.analchem.5b00769.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplemental Table 1. Experimental isotopic abundances of 25(OH)D2.

<i>m/z</i>		Experimental Abundances ¹	
Precursor	Product	25(OH)D2	² H ₃ -25(OH)D2
395	377	0.7340	-
396	378	0.2265	-
397	377	0.0014	-
	379	0.0339	0.0326
398	378	0.0004	-
	380	0.0033	0.7080
399	381	-	0.2201
	380	-	0.0016
400	382	-	0.0342
	383	-	0.0035

¹5 injections of 0.5 µg/mL individual standards.

Supplemental Table 2. Experimental isotopic abundances of 25(OH)D3.

<i>m/z</i>		Experimental Abundances ¹	
Precursor	Product	25(OH)D3	² H ₆ -25(OH)D3
383	365	0.7437	-
384	366	0.2194	-
385	365	0.0014	-
	367	0.0316	-
386	366	0.0004	-
	368	0.0028	-
387	369	-	0.0093
388	370	-	0.0538
389	371	-	0.7041
390	372	-	0.2006
391	373	-	0.0282
	374	-	0.0026

¹5 injections of 0.5 µg/mL individual standards.

Supplemental Table 3. Experimental isotopic abundances of 24,25(OH)2D3.

<i>m/z</i>		Experimental Abundances ¹	
Precursor	Product	24,25(OH)2D3	² H ₆ -24,25(OH)2D3
381	363	0.738	-
382	364	0.222	-
383	363	0.001	
	365	0.034	
384	364	0.0004	-
	366	0.004	-
386	368	-	0.036
387	369	-	0.700
388	369	-	0.003
	370	-	0.214
389	371	-	0.033

¹5 injections of 0.5 µg/mL individual standards.

Re-certification of hydroxyvitamin D standards by isotope pattern deconvolution. Supplemental information.

IPD Detailed

Notes on isotope pattern deconvolution (IPD) calculation. Part of this notes are provided by JI Garcia-Alonso's "Enriched Stable Isotopes" research group. University of Oviedo. Spain.

IPD is an alternative calculation to classical calibration curve-based procedure in Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS). The addition of isotopically enriched analogues of the analytes under study produces an alteration of the natural distribution of isotopic abundances.

In IPD, the sample containing the natural abundance analyte is spiked with an exactly known amount of the isotope-labelled internal standard, which

is traditionally enriched with ^{13}C or ^2H . Thus, in the mixture we have molecules from the same compound showing two different isotope patterns: the natural abundance and the isotopically labeled. The isotope distribution of the molecule, or any fragment, in the mixture can be measured by low resolution Mass Spectrometry. Traditionally, the peak area ratio between two given masses in the mixture is measured for IDMS to build the calibration curve. In the IPD approach, the whole or part of the isotope pattern is measured. The total amount (mols) of compound in a given mixture, N_{mix} , can be distributed between the two sources by:

$$N_{mix} = N_{nat} + N_{lab} \quad [1]$$

where N_{mix} is the total amount of compound found in the mixture; N_{nat} is the amount coming from the compound with natural isotope abundances; and, N_{lab} is the known amount of the labelled compound in the mixture coming from the spike added. Similar amount balances can be also obtained for all isotope compositions of the compound considered, as shown by equation [2], illustrated for a nominal mass i as an example:

$$N_{mix}^i = N_{nat}^i + N_{lab}^i \quad [2]$$

To conduct the calculations, it is assumed that all possible isotope compositions possessing the same nominal mass are added together in the mass spectrum without differences in ionisation efficiencies or isotopic effects and are free of interferences. Then, equation [2] can be expressed as a linear combination of the total amount of each compound (natural abundance or labeled) and their corresponding isotope compositions:

$$N_{mix} \cdot A_{mix}^i = N_{nat} \cdot A_{nat}^i + N_{lab} \cdot A_{lab}^i \quad [3]$$

where A_{mix}^i is the experimentally measured relative abundance of the compound at nominal mass i in the mixture; A_{nat}^i is the theoretical relative abundance of the natural abundance compound at the same nominal mass and A_{lab}^i is the theoretical relative abundance in the isotopically

labelled compound. When we divide equation [3] by equation [1], the following expression is obtained:

$$A_{mix}^i = x_{nat} \cdot A_{nat}^i + x_{lab} \cdot A_{lab}^i \quad [4]$$

Where

$$x_{nat} = \frac{N_{nat}}{N_{nat} + N_{lab}} \quad [5]$$

and

$$x_{lab} = \frac{N_{lab}}{N_{nat} + N_{lab}} \quad [6]$$

In expressions [5] and [6] the variables x_{nat} and x_{lab} indicate the molar fractions of the compound in the spiked sample arising from the two different sources: natural abundance or isotopically labelled. A typical organic compound may show different isotope compositions at n nominal masses so, equations for all these nominal masses can be obtained in a similar way to equation [4] and they can be expressed in matrix notation as:

$$\begin{bmatrix} A_{mix}^1 \\ A_{mix}^2 \\ A_{mix}^3 \\ \dots \\ A_{mix}^{n-1} \\ A_{mix}^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^1 & A_{lab}^1 \\ A_{nat}^2 & A_{lab}^2 \\ A_{nat}^3 & A_{lab}^3 \\ \dots & \dots \\ A_{nat}^{n-1} & A_{lab}^{n-1} \\ A_{nat}^n & A_{lab}^n \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_{nat} \\ x_{lab} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad [7]$$

Where A_{mix}^i are the experimentally measured relative abundance of the compound in the mixture for the different masses i ; and A_{nat}^i and A_{lab}^i are the theoretical calculated (or experimentally measured) relative abundances of the natural and isotopically labeled compounds.

As we have more parameters (nominal masses) than unknowns (molar fractions) an error vector is included in equation [7]. The best values

of x_{nat} and x_{lab} are found by least square minimization of the error vector “e”.

Once the molar fractions of the compound are computed by the linear regression the amount of natural abundance compound can be calculated, as N_{lab} is known, using the equation:

$$\frac{N_{nat}}{N_{lab}} = \frac{x_{nat}}{x_{lab}} = R \quad [8]$$

Equation [8] comes from dividing equation [5] by equation [6]. Note that equation [8] takes the form of straight line of slope 1 and intercept 0 when the ratio of mols (N_{nat}/N_{lab}) is plotted against the ratio of molar fractions ($R = x_{nat}/x_{lab}$), regardless of the labeling of the molecule.

When tandem mass spectrometry (QqQ) in Selected Reaction Monitoring (SRM) mode is used, the different isotope compositions coming from the same nominal mass could generate fragment ions with various nominal masses, leading to a mass isotopomer distribution different from the original deprotonated ion. (Different isotopic composition with the same nominal mass are due to the presence of a ^{13}C atom or alternatively a ^{15}N atom in the molecule, for example.)

If we assume that the fragmentation efficiency does not depend on the isotope composition, the relative abundance of any precursor ion will be distributed among their corresponding product ions. In other words, the sum of the relative abundances for all the transitions coming from the same nominal mass will be equivalent to the theoretical abundance of precursor ion.

Thus, the resulting isotopic composition ($A_{mix}^{SRM_i}$), (Figure 1C in the manuscript) measured after mixing the natural occurring analytes in the samples and the spiked labelled analogues, is a linear combination of the natural ($A_{nat}^{SRM_i}$) (Figure 1A) and enriched ($A_{lab}^{SRM_i}$) (Figure 1B) compound's isotopic distribution of abundances.

For a single spike and n measured transitions in the MS/MS system, this can be expressed as matrix notation as follows:

$$\begin{bmatrix} A_{mix}^{SRM_1} \\ A_{mix}^{SRM_2} \\ \vdots \\ A_{mix}^{SRM_n} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^{SRM_1} & A_{lab}^{SRM_1} \\ A_{nat}^{SRM_2} & A_{lab}^{SRM_2} \\ \vdots & \vdots \\ A_{nat}^{SRM_n} & A_{lab}^{SRM_n} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X_{nat} \\ X_{lab} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{SRM_1} \\ e^{SRM_2} \\ \vdots \\ e^{SRM_n} \end{bmatrix} \quad [9]$$

As said before for MS mode, in order to solve the equation system, an error vector is included (e^{SRM_i}). Minimization of this parameter by multiple linear regression gives the values of molar fractions (X_{nat} and X_{lab} respectively) that best fit the experimental data of the mix. These calculations can be easily performed with the Excel “Linest” function (see an example in the Excel attached document), which uses the least squares method to calculate the line of best fit through a supplied set of “y” (in this cases, $A_{mix}^{SRM_i}$) and “x” ($(A_{nat}^{SRM_i})$ and $(A_{lab}^{SRM_i})$) values. Finally, since the amount of labelled compound (N_{lab}) spiked into the sample is known, the amount of natural compound (N_{nat}) is readily obtained:

$$N_{nat} = N_{lab} \frac{X_{nat}}{X_{lab}} \quad [10]$$

Note that equation [9] will provide an exact solution when $n = 2$ and a least squares solution when $n > 2$. Hence, the selection of the number of masses to be used in the calculations will depend on practical considerations. Three or four masses (or transitions in SRM mode) are typically measured when the method is finally applied with quantification purposes.

Previously to its application, this methodology requires the full characterization of both compounds (natural and labelled) in terms of their isotopomer distribution of abundances, i.e. calculating or measuring all the transitions to build matrix “x”. In the present work isotopomer abundances have been experimentally measured. As said before, no methodological calibration is needed, and quantification is directly conducted in the sample after one injection.

3.3 Comparación de los métodos de cuantificación de deconvolución de perfiles isotópicos y curva de calibrado para la determinación de estrona y 17 β -estradiol en suero humano

Hasta ahora hemos visto como la metodología de cálculo IPD es fiable también en análisis clínicos. Por un lado, en el campo del dopaje, la determinación de esteroides en orina ha permitido comprobar que su precisión y exactitud puede superar a la de los métodos IDMS basados en curva de calibrado a nivel de pocos ng/mL, concentraciones típicas de este tipo de análisis. Por otro lado, en relación a la falta de estandarización, la re-certificación rápida de patrones comerciales de VTD ha permitido corregir valores de sesgo cercanos al 30 % y mejorar la trazabilidad en muestras reales.

Otra característica de gran importancia en química analítica es la de los límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ, respectivamente), es decir, las concentraciones mínimas que la metodología es capaz de detectar o cuantificar con una incertidumbre aceptable de acuerdo con criterios estadísticos. Dado que IPD es una técnica de cuantificación, el LOQ es de vital importancia para todos aquellos métodos que lo utilicen en la determinación de analitos a muy baja concentración.

En el ámbito de la química clínica, existen numerosos compuestos endógenos que se encuentran en el organismo en concentraciones extremadamente bajas. Un ejemplo claro lo encontramos en el caso de los esteroides y, de forma más acusada, en la determinación de estrógenos en sangre. La cuantificación de hormonas esteroides ha permitido ampliar y comprobar la validez de la metodología IPD al análisis de muestras clínicas de matriz muy compleja como el suero humano.

Estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) y estriol (E3) son los principales compuestos estrogénicos del cuerpo humano. E3 es la menos potente y se encuentra generalmente en concentraciones más bajas, mientras que E2

es la hormona sexual principal y, junto a E1, las podemos encontrar en intervalos de concentración que oscilan entre 1 y 400 pg/mL^{39,40} pudiendo alcanzar valores de 3000 pg/mL⁴¹. Estas hormonas son sintetizadas a partir del colesterol. En una de las rutas propuestas⁴², tras la pérdida de la cadena lateral y después de diversos pasos se obtiene androstenediona. A partir de ella, mediante la enzima aromatasa se obtiene estrona y estradiol (Figura 3.6).

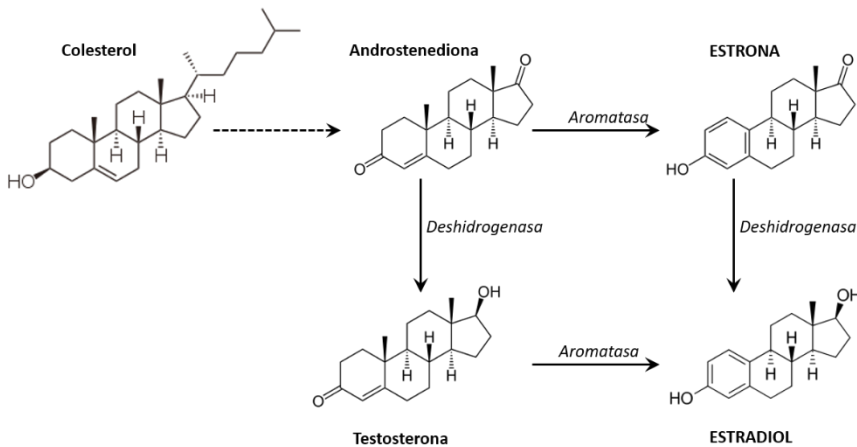


Figura 3.6. Ruta sintética de Estrona y Estradiol.

Los estrógenos afectan tanto al desarrollo de características sexuales como a funciones biológicas y al desarrollo de enfermedades^{41,43} que pueden aparecer por pequeñas variaciones en su concentración. Pueden encontrarse en tejidos y fluidos biológicos en concentraciones muy bajas en hombres adultos, mujeres y niños en general. Sólo las muestras de mujeres embarazadas presentan niveles relativamente altos, ya que pueden ver multiplicada su concentración en varios órdenes de magnitud.

Dada la naturaleza de la matriz en análisis clínico –muy compleja– y la concentración habitual esperable de estrógenos –muy baja– del orden de pocos pg/mL, resulta evidente la necesidad de métodos analíticos fiables. Métodos que sean específicos, exactos, precisos y sensibles^{41,43-45}. No existe en la actualidad un método preferido de manera universal⁴⁶,

aunque las técnicas habitualmente usadas se basan en inmunoensayo y en MS. En el presente apartado se desarrolla un método para estrógenos en suero y se ha considerado conveniente hacer un resumen comparativo mínimo de las diferentes metodologías empleadas. Cabe comentar que, como la mayoría de compuestos presentes en la sangre, los estrógenos se encuentran unidos a proteínas, en este caso proteínas enlazantes de hormonas sexuales (SHBP). La correcta cuantificación implica un primer paso para su liberación y la posterior purificación previa a la medida instrumental.

Las técnicas de IE, como se ha comentado en la introducción del capítulo, se basan en la reacción específica entre una hormona y un anticuerpo. El producto obtenido genera la señal instrumental que permite la cuantificación de dicha hormona. La reacción puede llevarse a cabo de manera directa y automatizada sobre la muestra o, de manera más rigurosa, con tratamiento previo de ésta para minimizar el efecto de posibles interferentes. Este modo más exhaustivo de tratamiento de muestra es difícilmente automatizable. Clásicamente, desde su desarrollo en las décadas de los 70 y 80, se han usado marcadores radioactivos y la técnica se conoce con el nombre de radioinmunoensayo (RIA). En la actualidad se usan preferentemente marcadores luminiscentes. Una de las técnicas luminiscentes habitualmente empleada implica la electrogeneración del reactivo y se conoce con el acrónimo ECLIA. IE presenta problemas derivados de la falta de especificidad, exactitud y precisión, sobre todo a bajas concentraciones⁴³⁻⁴⁶. Estos problemas pueden ser especialmente graves para la metodología directa. Aun así, es ampliamente usada en laboratorios de rutina con gran carga de trabajo porque es rápida, fácil de usar y económica.

En cuanto a MS, la primera técnica usada, GC-MS, fue considerada la de referencia durante algunas décadas a partir de su implantación en los años 60 del siglo pasado. Tras esta etapa, con el auge adquirido en las últimas décadas por la técnica LC-MS/MS, que necesita un tratamiento de muestra menor y presenta características analíticas comparables, GC-MS ha sido

sustituida por dicha técnica en la determinación de hormonas esteroides en muestras clínicas entre otros analitos y campos. Ambas técnicas, basadas en la separación previa mediante cromatografía y posterior detección mediante espectrometría de masas, proporcionan resultados con características analíticas adecuadas^{17,43,44,46,47}. Las desventajas de LC-MS y la manera de abordarlas son conocidas. Por un lado, el efecto matriz que se elimina o minimiza con el uso de patrones internos marcados con un isótopo estable. Por otro, la dificultad de ionizar ciertas moléculas se resuelve mediante derivatización con moléculas altamente ionizables. Este aspecto se trata en el siguiente apartado.

Cuando se comparan las características analíticas comentadas, especificidad, sensibilidad, precisión y exactitud, LC-MS/MS se muestra en general muy superior a IE. El problema principal de IE es la falta de selectividad provocada, entre otras posibilidades, por la reactividad cruzada, por lo que esta técnica está siendo apartada^{43,45}. Por ejemplo, con la expansión de espectrometría de masas en los laboratorios clínicos se observa una discrepancia en los resultados obtenidos mediante ambos enfoques. Si bien los rangos de referencia de niveles de 17 β -estradiol en suero obtenidos por LC-MS y RIA son comparables, los valores individuales obtenidos por RIA resultan aproximadamente 3 veces superiores a los de MS en el caso de pacientes con niveles muy bajos de este estrógeno (mujeres postmenopáusicas y niños prepubertales). Este hecho se atribuye generalmente a la reactividad cruzada de metabolitos de estradiol, entre ellos la estrona, con los anticuerpos de RIA, lo cual provoca una señal final anormalmente alta, aunque el problema cabe estudiarlo en cada caso⁴⁸ puesto que también afecta la presencia de otros anticuerpos endógenos. Esta situación es mucho menos probable en LC-MS debido a la separación cromatográfica y a la selectividad propia de los equipos de MS modernos.

Por otro lado, también es posible que la falta de especificidad provoque sesgo negativo respecto de técnicas basadas en MS. Puede ocurrir que un interferente presente en la muestra reaccione con mayor afinidad con el

anticuerpo, pero no genere señal instrumental⁴¹. El sesgo negativo también puede darse cuando otro anticuerpo presente en la muestra reacciona con la hormona¹⁷. Todo ello conlleva que la técnica LC-MS/MS sea considerada la más sensible y selectiva⁴⁴.

A modo de resumen, IE no genera resultados correctos por su falta de especificidad, sobre todo a bajas concentraciones y especialmente con métodos directos. Éstos son rápidos, productivos y económicos, pero nada fiables. De hecho, existen propuestas para sustituirlos^{43,46} e incluso de rechazar todos los IE con el objetivo de introducir tanto rigor en la determinación de estrógenos en muestras clínicas como el conseguido en la determinación de esteroides en el campo del dopaje⁴⁹. LC-MS/MS encuentra dificultades para implantarse en laboratorios de rutina, en los que se necesita elevada productividad, por su elevado precio de adquisición, por la complejidad de uso y por la necesidad de desarrollar métodos propios de análisis, cuando habitualmente se adquieren a vendedores especializados. Sin embargo, LC-MS/MS es la metodología ampliamente reconocida como de referencia (es la actual “*gold standard*” en este campo), pues proporciona información de más de un analito en cada análisis con elevadas especificidad, sensibilidad, precisión y exactitud.

Por otro lado, es constatable la falta de estandarización –un problema habitual en análisis clínico ya comentado– para todas las metodologías, incluidas las basadas en MS^{41,43,45}. La variabilidad entre laboratorios es un problema actual que dificulta la obtención de intervalos de concentración o valores de referencia que permitan la toma de decisiones correcta.

Por todo lo expuesto, en esta sección se presenta el desarrollo de una metodología para la determinación de E1 y E2 en suero humano mediante LC-MS. Se utilizan y comparan dos herramientas de cuantificación basadas en IDMS: la más recientemente desarrollada IPD frente a la clásica curva de calibrado con patrón interno marcado isotópicamente. Con esto se pretende explorar los parámetros

metrológicos de IPD a muy bajas concentraciones, además de comprobar su capacidad de corrección de efecto matriz en una matriz biológica de alta complejidad como es el suero.

3.3.1 Desarrollo de metodología LC-MS

Dados los niveles de concentración de los estrógenos de interés en las muestras biológicas, sumado a la escasa disponibilidad de volumen de dichas muestras, disponer de un buen procedimiento de extracción y pre-concentración de los analitos es de suma importancia. Por ello, se exploraron varias vías.

Atendiendo al enfoque general del laboratorio clínico a la máxima automatización, simplicidad y rendimiento de análisis por tiempo, se realizaron experimentos de extracción basados en placas de 96 pocillos compatibles con robot de laboratorio. Por una parte, se emplearon placas de extracción líquida soportada (SLE, *Supported Liquid Extraction*), en las que se tiene una base de un sólido inerte pulverizado en el cual se retiene la muestra líquida –suero en este caso– y por el que posteriormente se hace pasar un volumen pequeño de solvente extractante, habitualmente unas decenas de microlitros. Por otra parte, se emplearon placas de extracción en fase sólida (SPE, *Solid-Phase Extraction*) con ligandos C_{18} , en las cuales también se pueden emplear pequeños volúmenes de solvente de extracción (*Figura 3.7*). Finalmente, se testearon placas simples para realizar extracciones líquido-líquido (LLE, *Liquid-Liquid Extraction*). No obstante, todos estos experimentos, realizados con distintos volúmenes y solventes de extracción (metil tert-butil éter y acetato de etilo), produjeron resultados poco satisfactorios en términos de recuperación absoluta al extraer soluciones estándar a 3 niveles de concentración, además de no conseguir una correcta eliminación de la matriz de muestra. Por ello, se recurrió a la metodología LLE tradicional, evitando las placas de 96 pocillos.

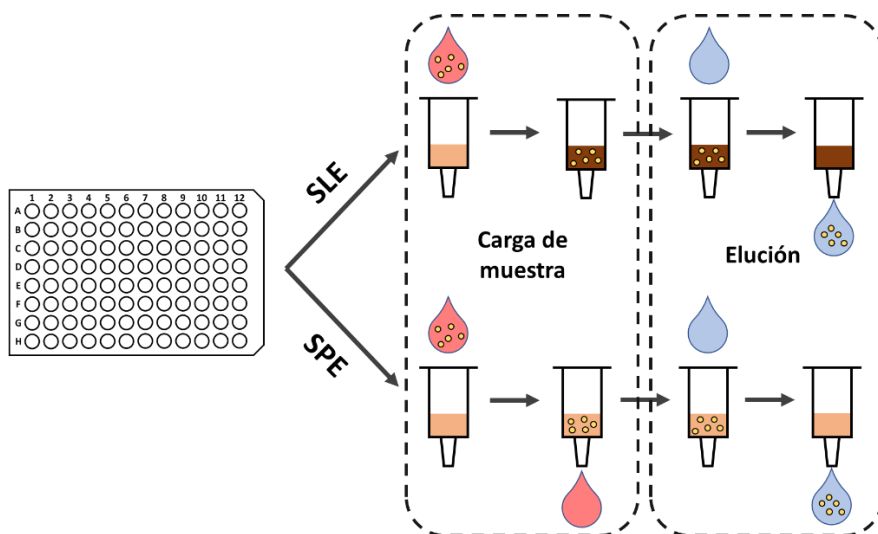


Figura 3.7. Etapas de extracción mediante SLE (superior) y SPE (inferior) en placas de 96 pocillos.

A pesar de la pre-concentración alcanzada finalmente mediante el procedimiento desarrollado y detallado en el propio artículo, junto con la alta sensibilidad proporcionada por el equipo de LC-MS/MS, resultó no ser suficiente para detectar y cuantificar de manera correcta los niveles límite establecidos como objetivo de LOQ del método (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para ambos compuestos, E1 y E2). Éste es un problema habitual cuando se pretende determinar compuestos que no presentan grupos funcionales fácilmente ionizables como es el caso de la mayoría de hormonas esteroides. Por ello, se hizo necesaria una etapa de derivatización de los analitos tras su extracción con el fin de añadir un grupo funcional altamente ionizable mediante electrospray. En la bibliografía se detallan numerosas posibilidades de derivatización. Entre otros, pueden encontrarse derivados bromados de fenazona, derivados de sulfonil-metilimidazol e incluso un éster del ácido nicotínico con la succinimida recién preparado⁵⁰⁻⁵³. Sin embargo, el de mayor facilidad de aplicación, estabilidad y rapidez es la adición del grupo dansilo a la estructura del estrógeno, mediante reacción con cloruro de dansilo (Dns-Cl) (Figura 3.8)⁵⁴. Este procedimiento permitió alcanzar el LOQ deseado.

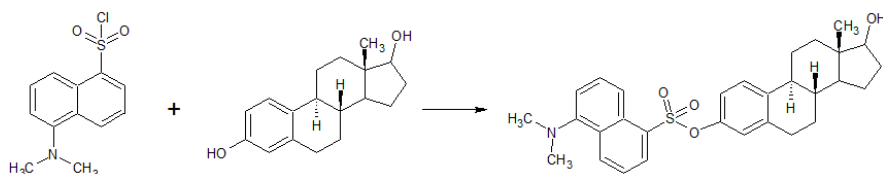


Figura 3.8. Derivatización de E2 con Dns-Cl.

Teniendo en cuenta este paso de derivatización, tanto los métodos por IDMS clásico con curva de calibrado como por IPD se desarrollaron sobre los compuestos ya derivatizados. Las matrices de referencia necesarias para la optimización y aplicación de IPD se obtuvieron por inyección en el equipo de LC-MS de soluciones estándar individuales (E1 y E2 tanto naturales como marcados con deuterio) sometidas a la reacción con Dns-Cl.

El uso de dansilo como agente derivatizante conlleva modificaciones en el método inicial. Dado que la reacción provoca un cambio en la estructura de los analitos, también cambia su comportamiento cromatográfico y de fragmentación en espectrometría de masas en tándem, por lo que es necesario optimizar de nuevo los parámetros instrumentales con los estándares derivatizados. Además, la fragmentación obtenida con este agente es considerablemente menos selectiva que la de los compuestos originales, ya que el lugar de ionización permanece en el grupo dansilo y no en el esqueleto principal de la hormona, con lo que la posibilidad de interferencias aumenta considerablemente.

Cabe comentar que inicialmente se consideró también la determinación de estriol (E3), uno de los metabolitos de E2. Sin embargo, la reacción con dansilo provocó una división de picos cromatográficos en distintos compuestos diferentes, debido a las diferentes posiciones de derivatización disponibles en su estructura (*Figura 3.9*). Por esta razón, y teniendo en cuenta que E3 es un metabolito de menor interés que E1 y E2, fue excluido del método en las fases preliminares.

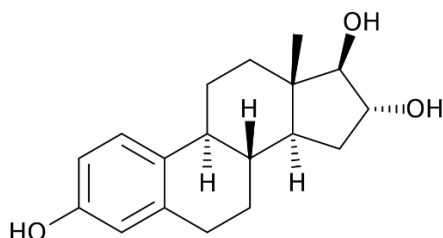


Figura 3.9. Estructura del estriol (E3), el cual presenta tres grupos hidroxilo.

3.3.2 Validación y comparación de métodos

La validación de los métodos se realizó siguiendo la guía de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA)⁵⁵. En base al conocimiento previo de la metodología LC-MS y la experiencia del laboratorio se consideró que la selectividad era suficiente. Sí se evaluaron y se obtuvieron resultados satisfactorios para los parámetros de exactitud, repetibilidad (*intra-assay* o *within-run*) y reproducibilidad (*inter-assay* o *between-run*). Se prepararon diferentes disoluciones de control de calidad (QC) y se utilizaron 3 materiales de referencia certificados específicamente para E2. El efecto matriz se consideró corregido correctamente mediante el uso de patrones internos marcados isotópicamente (ILIS) para muestras típicas. Además, fue estimado en matrices muy complejas como los tipos de suero hemolítico, renal, icterico y lipémico.

Por otro lado, se llevó a cabo la comparación de ambas metodologías de cuantificación (curva de calibrado e IPD) mediante su aplicación a un total de 40 muestras reales observándose una buena correlación.

Finalmente, el método basado en LC-MS y curva de calibrado fue comparado con otros métodos establecidos en el laboratorio clínico basados en IE: RIA para E1 y ECLIA para E2. Solamente ECLIA proporcionó resultados idénticos a LC-MS/MS, confirmando nuevamente las sospechas de interferencias en RIA.

Así, este estudio proporciona dos alternativas de cuantificación de E1 y E2 en el laboratorio clínico. Se evita el uso de RIA, que conlleva un riesgo de exposición a radiactividad, y de costosos paquetes comerciales basados en LC-MS. Cabe resaltar que se ha conseguido desarrollar, optimizar y validar un método LC-MS/MS usando IPD como herramienta de cuantificación que se ha mostrado fiable (cumple los requisitos de la guía EMEA) en la determinación de muestras reales y en CRMs. Es más rápido que el basado en curva de calibrado, lo que redundará en ahorro de recursos: tiempo y dinero. La mejora de esta metodología debe permitir, además, el análisis de muestras de suero más complejas.

3.3.3 Artículo científico 4

Comparison of isotope pattern deconvolution and calibration curve quantification methods for the determination of estrone and 17 β -estradiol in human serum

J. Pitarch-Motellón, N. Fabregat-Cabello, C. Le Goff, A. F. Roig-Navarro, J. V. Sancho-Llopis, E. Cavalier. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2019, 171, 164-170.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 171 (2019) 164–170



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

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



Comparison of isotope pattern deconvolution and calibration curve quantification methods for the determination of estrone and 17 β -estradiol in human serum



J. Pitarch-Motellón^a, N. Fabregat-Cabello^{b,c}, C. Le Goff^b, A.F. Roig-Navarro^a, J.V. Sancho-Llopis^a, E. Cavalier^{b,*}

^a Research Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, Castelló, Spain

^b Department of Clinical Chemistry, University of Liège, CHU Sart-Tilman, Liège, Belgium

^c Hematology and Hemotherapy group, Health Research Institute Hospital La Fe (IS La Fe), Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 February 2019
Received in revised form 2 April 2019
Accepted 6 April 2019
Available online 9 April 2019

Keywords:

Estrone
17 β -estradiol
Serum
LC-MS/MS
Isotope dilution mass spectrometry
Isotope pattern deconvolution

ABSTRACT

A Liquid Chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) based method have been developed for the determination of the main estrogen compounds –estrone (E1) and 17 β -estradiol (E2)– in human serum. Two isotope dilution mass spectrometry (IDMS) quantification procedures have been used: a classical calibration curve-based method were compared to a recently developed isotope pattern deconvolution (IPD) method. IPD is based on isotopic abundance measurements and multiple linear regression. Validation was performed in terms of intra-assay repeatability (n=5), inter-assay reproducibility (n=9) and accuracy using spiked steroid-free serum at 5 concentration levels and 3 certified reference materials. Both methodologies meet EMEA requirements yielding recoveries between 79–106% and coefficient of variations of 1.7–8.3% along all experiments. Limits of quantification as low as 5 ng/L were achieved. 40 real samples were analysed for comparison purposes showing a great correlation between calibration and IPD concentration values. Real samples were also quantified by routine immunoassay analysis, which showed a significant proportional bias of 2.55 for E1 and good correlation for E2. While methods were considered suitable for routine or countercheck analysis within the context of hospital's needs, IPD has demonstrated to be faster and cost saving.

© 2019 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Estrogens are sexual steroidal hormones, derived from cholesterol, which are involved in a great number of gender-specific and non-gender-specific biological processes. The two main active estrogens in humans are estrone (E1) and 17 β -estradiol (E2) and they are important in growth, nervous system maturation, bone structure and pregnancy, as well as playing a key role in breast cancer development [1–4].

Nowadays, there is an increasing interest in the simultaneous high-sensitivity and high throughput measurement of these estrogens for both clinical research and routine analysis. The main samples of interest include paediatric, pre-pubertal, post-menopausal and male serum samples. Unfortunately, most of

immunoassays are not able to reach the very low levels needed in those cases. Only competitive radioimmunoassay (RIA) [5], which is associated with the health and safety risks of using radioactive materials, shows suitable limits of quantification.

In general, immunoassay-based analysis often suffer from cross-reactivity with interfering endogenous components of the matrix, causing poor correlation with mass spectrometry-based methods, lacks of precision and accuracy, and only one estrogen is determined at a time. Thus, there is an increasing interest to shift towards stable isotope dilution (ID) in combination with Gas Chromatography and Liquid Chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS and LC-MS) or tandem mass spectrometry (MS/MS) methods for the determination of estrogens and other steroids [5–8].

Despite the known advantages of estrogen measurement by LC-MS/MS, which include increased sensitivity and specificity, and multiple determinations in one run their analysis is still challenging since these compounds do not contain highly ionisable functional groups. Thus, due to the extremely low concentration levels normally present in serum (often in the range of a few nanograms per

* Corresponding author at: Service de Chimie Médicale, CHU de Liège, Domaine Universitaire, de Sart-Tilman, 4000, Liège, Belgium.
E-mail address: Etienne.cavalier@chu.slg.ac.be (E. Cavalier).

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.04.013>
0731-7085/© 2019 Published by Elsevier B.V.

Comparison of isotope pattern deconvolution and calibration curve quantification methods for the determination of estrone and 17 β -estradiol in human serum

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

J. Pitarch-Motellón^a, N. Fabregat-Cabello^{b,c}, C. Le Goff^b, A. F. Roig-Navarro^a, J. V. Sancho-Llopis^a, E. Cavalier^{b,*}

^a*Research Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, Castelló, Spain*

^b*Department of Clinical Chemistry, University of Liège, CHU Sart-Tilman, Liège, Belgium*

^c*Hematology and Hemotherapy group, Health Research Institute Hospital La Fe (IIS La Fe), Valencia, Spain*

*Corresponding autor at: Service de Chimie Medicale, CHU de Liège, Domaine Universitaire du Sart-Tilman, 4000, Liège, Belgium.

E-mail adress: Etienne.cavalier@chu.ulg.ac.be (E. Cavalier)

ABSTRACT

A Liquid Chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) based method have been developed for the determination of the main estrogen compounds –estrone (E1) and 17 β -estradiol (E2)– in human serum. Two isotope dilution mass spectrometry (IDMS) quantification procedures have been used: a classical calibration curve-based method was compared to a recently developed isotope pattern deconvolution (IPD) method. IPD is based on isotopic abundance measurements and multiple linear regression. Validation was performed in terms of intra-assay repeatability (n=5), inter-assay reproducibility (n=9) and accuracy using spiked steroid-free serum at 5 concentration levels and 3 certified reference materials. Both methodologies meet EMEA requirements yielding recoveries between 79-106% and coefficient of variations of 1.7-8.3% along all experiments. Limits of quantification as low as 5 ng/L were achieved. 40 real samples were analysed for comparison purposes

showing a great correlation between calibration and IPD concentration values. Real samples were also quantified by routine immunoassay analysis, which showed a significant proportional bias of 2.55 for E1 and good correlation for E2. While methods were considered suitable for routine or countercheck analysis within the context of hospital's needs, IPD has demonstrated to be faster and cost saving.

KEYWORDS: estrone, 17 β -estradiol, serum, LC-MS/MS, isotope dilution mass spectrometry, isotope pattern deconvolution

1. INTRODUCTION

Estrogens are sexual steroidal hormones, derived from cholesterol, which are involved in a great number of gender-specific and non-gender-specific biological processes. The two main active estrogens in humans are estrone (E1) and 17 β -estradiol (E2) and they are important in growth, nervous system maturation, bone structure and pregnancy, as well as playing a key role in breast cancer development [1-4].

Nowadays, there is an increasing interest in the simultaneous high-sensitivity and high throughput measurement of these estrogens for both clinical research and routine analysis. The main samples of interest include paediatric, pre-pubertal, post-menopausal and male serum samples. Unfortunately, most of immunoassays are not able to reach the very low levels needed in those cases. Only competitive radioimmunoassay (RIA) [5], which is associated with the health and safety risks of using radioactive materials, shows suitable limits of quantification.

In general, immunoassay-based analysis often suffer from cross-reactivity with interfering endogenous components of the matrix, causing poor correlation with mass spectrometry-based methods, lacks of precision and accuracy, and only one estrogen is determined at a time. Thus, there is an increasing interest to shift towards stable isotope dilution (ID) in combination with Gas Chromatography and Liquid Chromatography

coupled to mass spectrometry (GC-MS and LC-MS) or tandem mass spectrometry (MS/MS) methods for the determination of estrogens and other steroids [5-8].

Despite the known advantages of estrogen measurement by LC-MS/MS, which include increased sensitivity and specificity, and multiple determinations in one run their analysis is still challenging since these compounds do not contain highly ionisable functional groups. Thus, due to the extremely low concentration levels normally present in serum (often in the range of a few nanograms per liter), several approaches have been explored in the last years to tackle this problem.

Some work has been made in terms of extraction efficiency or chromatographic separation optimization. Two dimensional (2D) LC-MS/MS [9,10] or automated exhaustive sample treatments [11,12] that allow large sample volume injection while reducing background noise have been tested. Sensitivity is also enhanced sometimes by the addition of fluoride salts to the mobile phase. All those approaches need some complex instrumental equipment.

On the other side, derivatization of analytes is a widely-spread methodology in clinical analysis for the enhancement of sensibility by introducing a highly ionisable moiety in the structure. Recently, different derivatization agents have been tested [13-16]. Nevertheless, dansyl chloride is still the most used one because the derivative shows high ionisation efficiency, is obtained in aqueous solution with mild conditions, preventing unexpected hydrolysis processes, and can be directly injected in LC columns [17-21]. However, reduced selectivity is expected since charge remains in the dansyl moiety after collision-induced fragmentation and the measured MS transitions are not compound specific.

After derivatization, rigorously validated ID-LC-MS/MS methods provide reliable results for estrogen determination in serum. Classically, isotope dilution mass spectrometry (IDMS) is used along with calibration curve to avoid any matrix effect or instrumental drift, in a procedure that is time

consuming. An alternative calculation in IDMS based on the measurement of isotopic abundances, isotope pattern deconvolution (IPD), can be used [22]. When the labelled internal standard (IS) is added to the sample, the altered isotopic abundances in the blend are a linear combination of those from the natural and from the labelled analogues. A deconvolution calculation using multiple linear regression provides the concentration of the natural compound in the sample. IDMS with IPD is a reliable, fast, and less expensive method. IPD provides one result per injection with accuracy, enhances the throughput of the whole method and it has already been successfully applied to different compounds and complex matrices. Namely, endocrine disrupting compound in wastewater [23,24], or endogenous steroids in human urine [25-27].

In this work, we present the development and validation of a method for the determination of E1 and E2 in serum by LC-MS/MS according to the European Medicines Agency's (EMA) guidelines [28]. Conventional calibration curve with internal standard quantification (the MS based method routinely applied in the laboratory) is thoroughly compared with the newly developed IPD calculations. With this new IPD quantification methodology, used for the first time to estrogen determination in serum, accurate, precise and less expensive analysis are expected.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Standard solutions of 17 β -estradiol (E2) and 17 α -estradiol were purchased from LGC Standards (Luckenwalde, Germany). Standards solutions of estrone (E1), ¹³C₃-estrone (E1-¹³C₃) and ²H₅-17 β -estradiol (E2-D₅) were purchased from Cerilliant (Round Rock, TX, USA). All stock solutions were stored at -20°C and employed to prepare gravimetrically diluted working standard solutions in acetonitrile. DC Mass Spect Gold MSG4000 ultra-low steroids and hormones human serum was purchased from Golden West

Biological (Temecula, CA, USA). Certified reference materials BCR 576, BCR 577 and BCR 578 consisting in lyophilized serum with different E2 concentrations were obtained from the Institute for Reference Materials and Measurements (Geel, Belgium).

Dansyl chloride (Dns-Cl) and carbonate-bicarbonate buffer were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Formic acid for LC was from Fischer Chemicals (Loughborough, UK). All solvents used were LC-MS grade, water, acetonitrile, ethyl acetate and methyl-tert-butyl ether (MTBE) were from Biosolve BV (Valkenswaard, The Netherlands).

Standard stock solutions were prepared by gravimetric dilution of certified 1 mg/mL solutions to approximately 50 µg/mL, writing down the exact concentrations. Subsequent solutions were also prepared by gravimetric dilution. Dansyl chloride 1 mg/mL solution was prepared by dissolving exactly 25 mg in 25 mL of acetonitrile while the carbonate/bicarbonate buffer 0.05 M was prepared by dissolving one capsule in 100 mL of water LCMS and adjusting the pH to 10.5 by addition of a NaOH solution.

Table 1. Component-dependent MS parameters.

Compound	DP ¹	EP ²	CE ³	CXP ⁴	Transitions
E1	166	10	43	10	504 > 171
					505 > 171
					504 > 115
E2	151	10	43	12	506 > 171
					507 > 171
					506 > 115
E1-13C3	166	10	43	10	507 > 171
					508 > 171
E2-D5	151	10	43	12	511 > 171
					512 > 171

¹ Declustering Potential (V)

² Entrance Potential (V)

³ Collision Energy (V)

⁴ Collision Cell Exit Potential (V)

2.2. LC-MS/MS conditions

Identification, characterization and quantification of the derivatized compounds was carried out with an UHPLC system using a Nexera x2 UPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) coupled with a quadrupole-linear ion trap QTRAP 6500 system (AB Sciex, Foster City, CA, USA) equipped with an IonDrive™ Turbo V interface. Chromatographic separation was tested with two different core-shell columns: Kinetex F5 100A (1.7 µm, 100 x 2.1 mm) and Kinetex C18 100A (2.6 µm, 100 x 3 mm). Separation was finally achieved with the C18 column fitted with a C18 AJ0-8775 guard column (all from Phenomenex, Torrance, CA, USA). The column oven was kept at 40°C, injection volume was 30 µL and samples were kept at 8°C in the autosampler. Mobile phases consisted in H₂O containing 0.01% HCOOH as phase A, and ACN containing 0.01% HCOOH as phase B. Gradient conditions were applied as follows: 50% B (0-0.5 min), linear increase to 70% B in 0.1 min, linear increase to 95% B in 4.4 min, 95% B (5-6 min), 50% B (6.1-7.5 min). In order to protect the instrument from matrix contaminations, two cuts controlled by a divert valve were programmed at the beginning and at the end of the chromatographic run, allowing only the 2.5 to 6.5 min section to reach the mass spectrometer.

Analytes were ionized by electrospray in positive mode (ESI+) and detected by MS/MS in selected reaction monitoring (SRM). Optimum signal was obtained with the following parameters: 500°C as source temperature, curtain gas at 30 psi, collision assisted dissociation at 12 psi, IonSpray at 5.5 kV, nebulizer gas (GS1) at 30 psi and 60 psi of hot air through the Turbo V™ heaters (GS2). A dwell time of 25 ms was selected. Component-dependent parameters are shown in Table 1.

Analyst software version 1.6.2 (Sciex) was used for data acquisition. MultiQuant version 3.0.2 (Sciex) was used for data treatment and quantification.

2.3. Sample preparation

Micro-solid phase extraction (μ SPE) and supported liquid extraction (SLE), both with 96-well plates platform, and Liquid-liquid extraction (LLE) methods were tested for estrogen extraction from serum at different concentrations. Ethyl acetate and methyl *tert*-butyl ether (MTBE) as eluent or acceptor phase were used. LLE was the extraction method definitely chosen. To 250 μ L of calibrators, controls or serum samples in 12x75 mm 5-mL glass tubes, 10 μ L of labelled compound mix in acetonitrile were added, then samples were vortexed for 10 s. Liquid-liquid extraction (LLE) was applied using 2 mL of MTBE, 10 s of vortex mixing and 15 min of mechanical agitation. In order to help in phase separation, samples were centrifuged at 3000 rpm for 5 min. 1.7 mL of supernatant were transferred to clean 2-mL Eppendorf vials and evaporated under vacuum at 35°C.

Then, derivatization of analytes was carried out. To the dried extracts, 20 μ L of bicarbonate/carbonate buffer and 30 μ L of 1 mg/mL dansyl chloride in acetonitrile were added. Incubation was performed in a ThermoMixer (Eppendorf) at 60°C and 1000 rpm for 10 min. Derivatized extracts were diluted with 50 μ L of H₂O, transferred to LC vials with 0.2-mL inserts and injected in the LC-MS system.

2.4. Isotope Pattern Deconvolution

Isotope pattern deconvolution (IPD) is an alternative approach of classical isotope dilution mass spectrometry methods, which are based on natural-to-labelled area ratios to build the calibration curve. In IPD, the natural distribution of abundances of the analyte of interest are altered by adding the corresponding isotope-labelled analogue and then multiple linear regression is used to mathematically deconvolute the resulting combined distribution of abundances to obtain the molar fractions [22]. Briefly, the abundance in the mix ($A_{mix}^{SRM_i}$), measured after the spike of labelled analogues to the natural occurring analytes, is a linear combination of the natural ($A_{nat}^{SRM_i}$) and labelled ($A_{lab}^{SRM_i}$) compound abundances. In the case

of n measured transitions in the tandem mass spectrometry and using a single spike of labelled compound, this can be expressed in matrix form as follows:

$$\begin{bmatrix} A_{mix}^{SRM_1} \\ A_{mix}^{SRM_2} \\ \vdots \\ A_{mix}^{SRM_n} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^{SRM_1} & A_{lab}^{SRM_1} \\ A_{nat}^{SRM_2} & A_{lab}^{SRM_2} \\ \vdots & \vdots \\ A_{nat}^{SRM_n} & A_{lab}^{SRM_n} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X_{nat} \\ X_{lab} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{SRM_1} \\ e^{SRM_2} \\ \vdots \\ e^{SRM_n} \end{bmatrix} \quad (\text{Eq. 1})$$

Where an error vector (e^{SRM_i}) has to be included in order to solve the equation system. Then, multiple linear regression is applied to minimize the error vector and to obtain the molar fractions (X_{nat} and X_{lab} respectively) that fit better the measured abundances in the mix. Calculations can be conducted easily and automatically by any spreadsheet software. Finally, as the amount of labelled compound (N_{lab}) added to the sample is known, the amount of natural analyte (N_{nat}) is obtained:

$$N_{nat} = N_{lab} \frac{X_{nat}}{X_{lab}} \quad (\text{Eq. 2})$$

As it can be seen, no methodological calibration is needed for the quantification and one injection produces one result. It requires, though, performing a full characterization of both compounds in terms of their isotopomer distribution of abundances and the certification by reverse isotope dilution of the labelled standard solutions.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Method development

Initial tests were performed to try if the quantification could be carried out without the need of derivatization. Individual 500 $\mu\text{g/L}$ standard solutions in methanol/water (1:1, v/v) of each compound were infused in the ESI-MS/MS system in both positive (0.01% of formic acid was added) and

negative modes. Instrumental conditions were optimized and the results indicated that sensitivity was insufficient for the desired lower limits of quantification. Thus, derivatization was deemed necessary.

Compound-dependent instrumental conditions were optimized by means of the Automated Compound Optimization tool from Analyst software. Individual 500 µg/L dansylated standard solutions in acetonitrile/water (30:70, v/v) were infused in the ESI-MS/MS system in positive mode at a rate of 7 µL/min. Firstly, MS full-scans were obtained to select and optimize the precursor ion ($[M+H]^+$ in all cases), followed by MS/MS scans to determine the transitions to acquire and to optimize the fragmentation parameters. Ionization source conditions were automatically optimized using Automated Source Optimization by injecting the same standards in Flow Injection Analysis (FIA) mode. The results obtained for each compound were compared and compromise values were selected in the cases where optimal values were different between analytes.

In order to achieve the chromatographic separation of all analytes and isobaric interferences, two chromatographic columns were tested under different gradient conditions and compositions, including methanol and acetonitrile with different combinations and concentrations of NH_4COOH and $HCOOH$. A Kinetex F5 pentafluorophenyl column (multiple interactions) was initially tested and optimized, which lead to a 9-min water/methanol gradient modified with 0.1% $HCOOH$ plus 0.2 mM NH_4F . Although the resulting chromatographic method was able to separate properly all analytes, including 17 α -estradiol (tested as isobaric interference of E2), the peaks presented bad chromatographic shape due to an excessive tailing in all analytes. Thus, the Kinetex C18 was tested, following the same optimization procedure, and the acetonitrile-based method described in the experimental section was found to be optimal. Although not being able to separate 17 α -estradiol from E2, as its occurrence in human serum has not been reported, the resulting 7.5-min gradient was used.

For the extraction of analytes from the serum matrix, several approaches were tentatively assayed using standard solutions in water as well as spiked steroid-free serum at 5, 50 and 500 ng/L of E1 and E2. LLE, μ SPE and SLE methods using MTBE and ethyl acetate as acceptor phase or eluent were tested. For μ SPE and SLE methods, both as 96-well plates, either resulted in bad recoveries or poor matrix elimination, with the increased difficulty of carrying out the subsequent derivatization step in the plates. Although being more time-consuming and laborious, LLE was chosen as it allowed near complete extraction (>90% recovery by absolute area when comparing the area in the extract versus the area of a standard of equivalent concentration) of the analytes and presented no problems in the following steps.

3.2. Method validation

The validation of the developed method was performed according to EMEA's "Guideline on bioanalytical method validation" [28].

For calibration-based quantification, calibration curves were prepared in steroid-free serum between 5 and 1000 ng/L of E1 and E2 (6 point plus blank –not spiked- and zero –spiked with IS only- samples), which showed deviations in the back-calculated concentrations below 15% respect the nominal value in at least 4 points in all cases (data not shown).

Validation standards were prepared in steroid-free serum at approximately 5, 10, 200, 400 and 800 ng/L of E1 and E2. In addition, additional validation assays were performed for E2 using three CRM: BCR 576, BCR 577 and BCR 578, with 31, 188 and 365 ng/L of E2 respectively (no certified concentrations of E1 were provided). Accuracy and precision were evaluated in terms of intra-assay repeatability (n=5) and inter-assay reproducibility (n=9) for all validation standards and CRM, by both calibration and IPD quantification approaches. All experiments with validation standards yielded recoveries between 79-118% and coefficient of variations of 1.2-14% for both methodologies (Tables 2 and 3).

Regarding the CRM determination, both methods gave concentrations in the range of 81-101% respect the certified values and CV below 5% in all cases, except in the inter-assay experiment for BCR576 by IPD were it resulted in 17% CV (Table 4).

Table 2. Validation results for E1 in intra- and inter-assay experiments.

E1	Intra-assay (n=5)			Inter-assay (n=9)		
	Cal	IPD	IPD	Cal	IPD	IPD
Conc. (ng/L)	Recovery (%)	CV	Recovery (%)	CV	Recovery (%)	CV
5	92	13.9%	118	9.5%	99	6.3%
10	96	6.5%	116	6.0%	102	5.4%
200	113	1.2%	103	1.3%	112	1.4%
400	106	2.0%	100	2.1%	107	4.6%
800	97	6.3%	98	7.0%	96	3.8%
					98	4.3%

Table 3. Validation results for E2 in intra- and inter-assay experiments.

E2	Intra-assay (n=5)			Inter-assay (n=9)		
	Cal	IPD	IPD	Cal	IPD	IPD
Conc. (ng/L)	Recovery (%)	CV	Recovery (%)	CV	Recovery (%)	CV
5	103	8.3%	98	5.0%	106	5.3%
10	102	4.4%	95	5.3%	105	2.5%
200	90	4.6%	80	4.6%	104	2.6%
400	92	3.1%	79	2.9%	105	3.3%
800	99	2.2%	86	1.7%	108	2.1%
					96	1.9%

Table 4. Validation results for E2 determination experiments in three certified reference materials.

CRM	Intra-assay (n=5)			Inter-assay (n=9)		
	Cal	IPD	IPD	Cal	IPD	IPD
Code	Conc. E2 (ng/L)	Recovery (%)	CV	Recovery (%)	CV	Recovery (%)
BCR576	31.05	97	5.2%	85	5.4%	101
BCR577	187.94	87	4.0%	81	4.2%	93
BCR578	364.99	94	3.8%	88	4.0%	101
						91
						84
						83
						83
						91
						17.0%
						1.6%
						4.2%

The method's LOQ was established as the minimum concentration value that was successfully validated, i.e., 5 ng/L for both analytes and quantification methods. That decision was made based on the impossibility to obtain true blank samples to which spike controlled amounts of analytes, since the theoretically steroid-free serum materials did contain some small quantities. The blank concentrations were estimated from the quantification of the zero point of the calibration curve -which is spiked only with internal standard- by IPD. MSG4000 commercial serum was found to contain on average 1.69 ng/L of E1 and 2.78 ng/L of E2. Concentrations found are clearly below our methods' LOQ, however chromatographic peaks corresponding to the analytes were clearly differentiable from background. (Figure S1, supplementary material).

Thus, after calculating the mean value for all the calibration blank points used during the validation, concentrations of E1 and E2 in the commercial serum were estimated. Subsequent quantifications of validation standards and nominal values of calibration curves were adjusted accordingly.

Table 5. Matrix effect in different types of serum, obtained by comparison with standards in solvent at the same concentration levels.

Sample type	Matrix Effect (%)			
	E1 at 3xLLOQ	E1 at nearULOQ	E2 at 3xLLOQ	E2 at nearULOQ
Serum A	88	88	80	91
Serum B	95	103	98	104
Hemolyzed	99	94	171	106
Renal	354	94	118	77
Icteric	170	99	97	99
Lipemic	121	81	97	92

The occurrence of possible matrix effects was checked for hemolyzed, renal, icteric and lipemic serum samples, as well as for two random normal serum samples. Samples were spiked at 3 times the lower limit of quantification (3xLLOQ) and near the upper limit of quantification

(nearULOQ), and then subjected to the proposed sample treatment along with non-spiked samples of each type. Ratios between areas corresponding to natural and labelled compound were calculated, subtracting the non-spiked value (blank with internal standard), and then compared with a reference standard prepared in methanol and subjected to the same treatment. Acceptance ranges were set at 85-115% of the reference ratio for nearULOQ experiments and 80-120% for 3xLLOQ. Results are shown in Table 5 for all the different matrices and spike levels tested. Renal serum samples produced the greatest deviations from the reference ratios and the method was deemed unfit for such samples. Hemolyzed serum sample spiked at 3xLLOQ also produced an abnormal recovery for E2, although the method performed well for E2 at a higher level and E1 at both levels. Similarly, performance in icteric samples was acceptable for E1 at high concentration and E2 at both levels, but unacceptable for E1 at low level. Finally, the method was suitable for E2 in lipemic samples but not for E1. Overall, no significant matrix effects were found in untreated samples, which were of main interest for the study.

3.3. Method comparison

Once the developed method was proved to meet the requirements of EMEA guidelines for both quantification procedures a thorough comparison was conducted.

To this end, the methods were applied to the analysis of 40 real serum samples, including men and women of age comprised between 7 and 81 years old, randomly and anonymously selected. Samples were previously analysed by RIA (E1) or electro-chemiluminiscence immunoassay (ECLIA) (E2) methods using the established procedures of the hospital's routine laboratories (LOQ around 17 ng/L for both approaches).

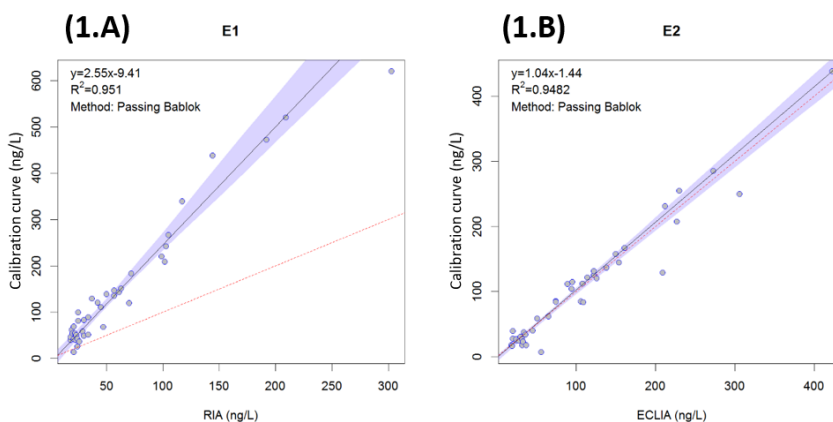


Figure 1. Passing-Bablok regression analysis. Correlation between LC-MS/MS method based on calibration curve and RIA determination of E1 (1A) and ECLIA determinations of E2 (1B).

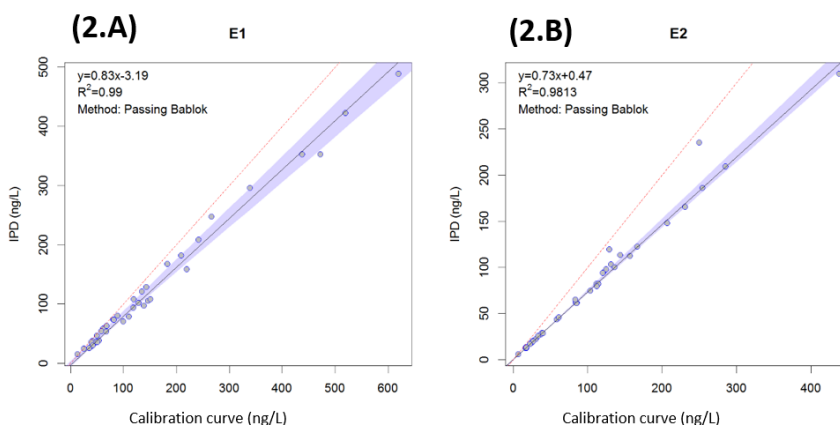


Figure 2. Passing-Bablok regression analysis. Correlation between IPD and LC-MS/MS method based on calibration curve determination of E1 (2A) and E2 (2B).

Passing-Bablok regression analysis was performed with open-source software, cp-R [29]. The correlation between the newly developed LC-MS/MS method based on calibration curve versus the Hospital’s reference RIA determination for E1 resulted in a proportional bias (slope) of 2.55 and constant bias (intercept) of -9.41 ng/L (Figure 1A). Meanwhile, E2 LC-MS/MS calibration determinations suitably correlate against

ECLIA, resulting in a proportional bias of 1.04 and constant bias of 1.44 ng/L (Figure 1B).

The differences observed in the analysis of E1 by LC-MS respect the routine analysis performed by RIA are not really unexpected. They could be caused by interferences competing in the bonding phase of the immunoassay procedure. Therefore, the implementation of a new quantification method for routine analysis would require a complete characterization of the population's normal ranges of estrone in order to be able to properly assess future diagnosis and carry out steroidal monitoring tasks.

On the other hand, the two MS-based methodologies were also compared. The proposed IPD method correlates properly with calibration-based quantification. Regression analyses presented R^2 values between 0.98 and 0.99. However, IPD provided slightly lower concentration values with proportional biases of 0.83 and 0.73 for E1 and E2 respectively, while constant biases were -3.19 and 0.47 ng/L (Figure 2A and B). These results agree with the previously observed trends in recovery values obtained with validation standards and CRMs (Tables 2-4).

The seemingly better values provided by calibration curve quantification respect those of IPD may be caused by either the process of certification of standards and the presence of analytes in the theoretically steroid-free serum employed for this study. Existence of estrogens in the blank serum do not affect calibration curve procedure as calibration and validation standards are prepared in the same way. However, if not properly quantified and taken into account, the effect on measured abundances and IPD calculations can be significant. Thus, real free-steroid or accurately quantified ultra-low steroids matrix must be used. Regarding unsuitable certification of standards, the re-certification of labeled standards by IPD and reverse isotope dilution (RID) using suitable certified reference materials, has been proved as a correct way to improve accuracy [30]. Moreover, higher bias for E2 and IPD when compared with calibration can

also be affected by deuterium scrambling problems. Losses of labile deuterium atoms during sample treatment or ionisation that can produce severe quantification problems in IPD isotopic abundance based calculations can occur for the labelled IS E2-D₅.

Finally it should be emphasized that both quantification methods meets the EMEA guidelines but IPD entail substantial savings in time and money (quantity of standards used), since one injection provides one result.

4. CONCLUSIONS

In this work we present the development of two LC-MS quantification methods for the simultaneous determination of estrone (E1) and 17 β -estradiol (E2) in human serum, sharing the same sample treatment.

Validation with laboratory prepared standard solutions in free-steroid serum and with CRM BCR 576, 577 and 578 (human serum matrix of different concentrations) showed that both methods meet EMEA guidelines requirements in terms of precision, accuracy and matrix effect compensation. The methods were applied to real samples and compared between them and against the individual reference routine analysis based on immunoassay (RIA for E1 and ECLIA for E2) by Passing-Bablok regression analysis. The novel isotope dilution quantification method, namely isotope pattern deconvolution (IPD), provided very similar results to those of calibration-based method. However, some bias related with the presence of low concentrations of estrogens in the theoretical steroid-free serum and the low accurately certified standards is shown. This low bias is regarded as not significant since both methods meet validation requirements. LC-MS/MS calibration-based method presented good correlation against immunoassay for E2 but not for E1, were a proportional bias of 2.55 was found respect immunoassay analysis. These findings agree with the raising awareness of the need to re-evaluate the validity and suitability of bioassay methods for the analysis of estrogens due to their tendency to suffer from interferences and cross-reactivity. In addition,

lower limits of quantification were achieved (5 ng/L versus 17 ng/L) while needing a relatively small volume of sample of only 250 µL.

Finally, IPD is shown as a rapid, less expensive, precise and exact method suitable for its application to estrogens in serum as a way to countercheck adverse or disagreeing results between conventional calibration-based and immunoassay methodologies, as well as being posed as a fully functional quantification method.

ACKNOWLEDGEMENTS

J. Pitarch-Motellón acknowledges the COST Action ES1307 for the STSM grant that made possible his stay at the CHU Sart-Tilman of Liège to carry out this study.

FUNDING

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

REFERENCES

- [1] T. Yasui, H. Uemura, M. Tezuka, M. Yamada, M. Irahara, M. Miura, T. Aono, Biological Effects of Hormone Replacement Therapy in Relation to Serum Estradiol Levels, *Horm. Res. Paediatr.* 56 (2002) 38–44. doi:10.1159/000048088.

- [2] B. Ettinger, A. Pressman, P. Sklarin, D.C. Bauer, J.A. Cauley, S.R. Cummings, Associations between Low Levels of Serum Estradiol, Bone Density, and Fractures among Elderly Women: The Study of Osteoporotic Fractures 1, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (1998) 2239–2243. doi:10.1210/jcem.83.7.4708.

- [3] M. Hill, A. Pašková, R. Kančeva, M. Velíková, J. Kubátová, L. Kancheva, K. Adamcová, M. Mikešová, Z. Žižka, M. Koucký, H. Šaraptková, V. Kačer, P. Matucha, M. Meloun, A. Pařízek, Steroid profiling in pregnancy: A focus on the human fetus, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 139 (2014) 201–222. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.03.008.
- [4] F.Z. Stanczyk, B.W. Mathews, M.E. Sherman, Relationships of sex steroid hormone levels in benign and cancerous breast tissue and blood: A critical appraisal of current science, *Steroids*. 99 (2015) 91–102. doi:10.1016/j.steroids.2014.12.011.
- [5] I.A. Blair, Analysis of estrogens in serum and plasma from postmenopausal women: Past present, and future, *Steroids*. 75 (2010) 297–306. doi:10.1016/j.steroids.2010.01.012.
- [6] L.M. McShane, J.F. Dorgan, S. Greenhut, J.J. Damato, Reliability and validity of serum sex hormone measurements., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 5 (1996) 923–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8922302>.
- [7] A.W. Hsing, F.Z. Stanczyk, A. Belanger, P. Schroeder, L. Chang, R.T. Falk, T.R. Fears, Reproducibility of Serum Sex Steroid Assays in Men by RIA and Mass Spectrometry, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16 (2007) 1004–1008. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0792.
- [8] A.S.P. Boggs, J.A. Bowden, T.M. Galligan, L.J. Guillette, J.R. Kucklick, Development of a multi-class steroid hormone screening method using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS), *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 4179–4190. doi:10.1007/s00216-016-9512-1.

- [9] T. Fiers, B. Casetta, B. Bernaert, E. Vandersypt, M. Debock, J.-M. Kaufman, Development of a highly sensitive method for the quantification of estrone and estradiol in serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry without derivatization, *J. Chromatogr. B.* 893–894 (2012) 57–62. doi:10.1016/j.jchromb.2012.02.034.
- [10] S. Pauwels, L. Antonio, I. Jans, A. Lintermans, P. Neven, F. Claessens, B. Decallonne, J. Billen, D. Vanderschueren, P. Vermeersch, Sensitive routine liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for serum estradiol and estrone without derivatization, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 8569–8577. doi:10.1007/s00216-013-7259-5.
- [11] L.J. Owen, F.C. Wu, B.G. Keevil, A rapid direct assay for the routine measurement of oestradiol and oestrone by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Ann. Clin. Biochem.* 51 (2014) 360–367. doi:10.1177/0004563213501478.
- [12] K.M. Wooding, J.A. Hankin, C.A. Johnson, J.D. Chosich, S.W. Baek, A.P. Bradford, R.C. Murphy, N. Santoro, Measurement of estradiol, estrone, and testosterone in postmenopausal human serum by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry without derivatization, *Steroids.* 96 (2015) 89–94. doi:10.1016/j.steroids.2015.01.007.
- [13] A. Khedr, A.M. Alahdal, Liquid chromatography–tandem mass spectrometric analysis of ten estrogen metabolites at sub-picogram levels in breast cancer women, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1031 (2016) 181–188. doi:10.1016/j.jchromb.2016.07.051.
- [14] X. Li, A.A. Franke, Improved profiling of estrogen metabolites by orbitrap LC/MS, *Steroids.* 99 (2015) 84–90. doi:10.1016/j.steroids.2014.12.005.

- [15] P. Keski-Rahkonen, R. Desai, M. Jimenez, D.T. Harwood, D.J. Handelsman, Measurement of Estradiol in Human Serum by LC-MS/MS Using a Novel Estrogen-Specific Derivatization Reagent, *Anal. Chem.* 87 (2015) 7180–7186. doi:10.1021/acs.analchem.5b01042.
- [16] W.C. Yang, F.E. Regnier, D. Sliva, J. Adamec, Stable isotope-coded quaternization for comparative quantification of estrogen metabolites by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 870 (2008) 233–240. doi:10.1016/j.jchromb.2008.06.026.
- [17] Y. Ke, J. Bertin, R. Gonthier, J.N. Simard, F. Labrie, A sensitive, simple and robust LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of seven androgen- and estrogen-related steroids in postmenopausal serum, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 144 (2014) 523–534. doi:10.1016/j.jsbmb.2014.08.015.
- [18] X. Xu, J.M. Roman, H.J. Issaq, L.K. Keefer, T.D. Veenstra, R.G. Ziegler, Quantitative measurement of endogenous estrogens and estrogen metabolites in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7813–7821. doi:10.1021/ac070494j.
- [19] M.M. Kushnir, A.L. Rockwood, J. Bergquist, M. Varshavsky, W.L. Roberts, B. Yue, A.M. Bunker, A.W. Meikle, High-Sensitivity Tandem Mass Spectrometry Assay for Serum Estrone and Estradiol, *Am. J. Clin. Pathol.* 129 (2008) 530–539. doi:10.1309/LC03BHQ5XJPJYEKG.
- [20] S.S.-C.T. and, M.J. Welch, Development and Evaluation of a Reference Measurement Procedure for the Determination of Estradiol-17 β in Human Serum Using Isotope-Dilution Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, (2005). doi:10.1021/AC050837I.

- [21] R.E. Nelson, Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Assay for Simultaneous Measurement of Estradiol and Estrone in Human Plasma, *Clin. Chem.* 50 (2004) 373–384. doi:10.1373/clinchem.2003.025478.
- [22] J.I. García-Alonso, P. Rodríguez-González, IDMS procedures and calculation methods, in: *Isot. Dilution Mass Spectrom.*, 2013: pp. 41–76.
- [23] N. Fabregat-Cabello, J. Pitarch-Motellón, J. V. Sancho, M. Ibáñez, A.F. Roig-Navarro, Method development and validation for the determination of selected endocrine disrupting compounds by liquid chromatography mass spectrometry and isotope pattern deconvolution in water samples. Comparison of two extraction techniques, *Anal. Methods*. 8 (2016) 2895–2903. doi:10.1039/C6AY00221H.
- [24] N. Fabregat-Cabello, J. V Sancho, A. Vidal, F. V González, A.F. Roig-Navarro, Development and validation of a liquid chromatography isotope dilution mass spectrometry method for the reliable quantification of alkylphenols in environmental water samples by isotope pattern deconvolution., *J. Chromatogr. A*. 1328 (2014) 43–51. doi:10.1016/j.chroma.2013.12.077.
- [25] J. Pitarch-Motellón, A.F. Roig-Navarro, J.V. Sancho, M. Ibáñez, N. Fabregat-Cabello, O.J. Pozo, R. Ventura, J.I. García Alonso, P. Rodríguez-González, A. González Gago, A. Ereño Artabe, P. Van Eenoo, K. Deventer, Y. Dehnes, S. Rzeppa, Evaluation of uncertainty sources in the determination of testosterone in urine by calibration-based and isotope dilution quantification using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. 1508 (2017) 73–80. doi:10.1016/j.chroma.2017.05.072.

[26] J. Pitarch-Motellón, J.V. Sancho, M. Ibáñez, O. Pozo, A.F. Roig-Navarro, Determination of selected endogenous anabolic androgenic steroids and ratios in urine by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and isotope pattern deconvolution, *J. Chromatogr. A.* 1515 (2017) 172–178. doi:10.1016/j.chroma.2017.08.006.

[27] A. Ereño Artabe, A. González-Gago, A. Suarez Fernández, J. Pitarch Motellón, A.F. Roig-Navarro, O.J. Pozo, P. Rodríguez-González, J.I. García Alonso, Isotope dilution LC-ESI-MS/MS and low resolution selected reaction monitoring as a tool for the accurate quantification of urinary testosterone, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 163 (2019) 113–121. doi:10.1016/j.jpba.2018.09.038.

[28] European Medicines Agency, Guideline on bioanalytical method validation, EMEA, *Comm. Med. Prod. Hum. Use.* 44 (2012) 1–23. doi:EMA/CHMP/EWP/192217/2009.

[29] D.T. Holmes, cp-R, an interface the R programming language for clinical laboratory method comparisons, *Clin. Biochem.* 48 (2015) 192–195. doi:10.1016/j.clinbiochem.2014.10.015.

[30] Pitarch-Motellón J, Fabregat-Cabello N, Le Goff C, Roig-Navarro AF, Cavalier E. Re-certification of hydroxyvitamin D standards by isotope pattern deconvolution, *J Chromatogr B.* (2018).

SUPPLEMENTARY DATA

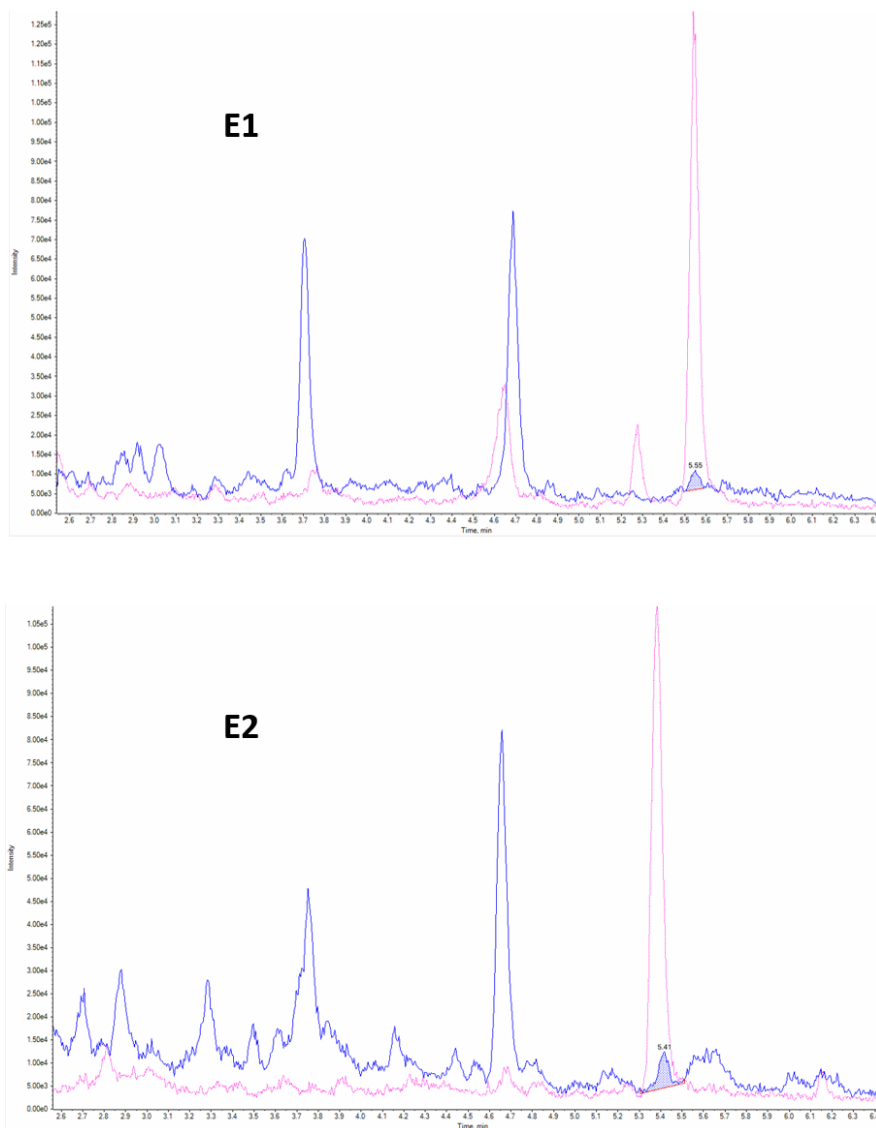


Figure S1. LC-MS/MS chromatograms of MSG4000 commercial serum spiked with $^{13}\text{C}_3$ -E1 and D5-E2. Estimated concentration of native natural compounds are 1.69 ng/L of E1 (tr, 5.55 min) and 2.78 ng/L of E2 (tr, 5.41 min). Chromatographic peaks corresponding to the analytes are clearly differentiable from background. Thin line corresponds to transitions from labelled compounds.

3.4 Bibliografía

1. Durner J. Clinical Chemistry: Challenges for Analytical Chemistry and the Nanosciences from Medicine. *Angew Chemie Int Ed.* 2009;49(6):1026-1051. doi:10.1002/anie.200903363
2. Rosenfeld L. Clinical chemistry since 1800: growth and development. *Clin Chem.* 2002;48(1):186-197. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751558>.
3. Natelson S, Natelson EA. Introduction. In: *Principles of Applied Clinical Chemistry*. Boston, MA: Springer New York; 1980. doi:10.1007/978-1-4684-3584-9
4. International Federation of Clinical Chemistry. History of the IFCC. <https://www.ifcc.org/about/history/>.
5. Georges RJ. The medical laboratory scientist in the clinical chemistry service laboratory. *S Afr Med J.* 1983;63(9):316-319. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6828952>.
6. Elston DM. Opportunities to Improve Quality in Laboratory Medicine. *Clin Lab Med.* 2008;28(2):173-177. doi:10.1016/j.cll.2007.12.001
7. Reed R. *Clinical Chemistry*. https://www.corelaboratory.abbott/sal/learningGuide/ADD-00061345_ClinChem_Learning_Guide.pdf.
8. ISO 17511:2003, In vitro diagnostic medical devices — Measurement of quantities in biological samples — Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials.
9. Kessler A. Mass spectrometry – a key technique for traceability in clinical chemistry. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2016;84:74-79. doi:10.1016/j.trac.2016.03.017
10. D. Carter G. Accuracy of 25-Hydroxyvitamin D Assays: Confronting the Issues. *Curr Drug Targets.* 2011;12(1):19-28. doi:10.2174/138945011793591608

11. Stevens JF, Vadgama P. Infrared Analysis in Clinical Chemistry: Its Use in the Laboratory and in Non-Invasive near Patient Testing. *Ann Clin Biochem An Int J Biochem Lab Med.* 1997;34(3):215-221. doi:10.1177/000456329703400301
12. Delves HT. Atomic Absorption Spectroscopy in Clinical Analysis. *Ann Clin Biochem An Int J Biochem Lab Med.* 1987;24(6):529-551. doi:10.1177/000456328702400601
13. Delafiori J, Ring G, Furey A. Clinical applications of HPLC–ICP-MS element speciation: A review. *Talanta.* 2016;153:306-331. doi:10.1016/j.talanta.2016.02.035
14. Blandford DE, Smith IC. Magnetic resonance spectroscopy in clinical chemistry: the present and the future. *J Int Fed Clin Chem.* 1998;10(1):6-8, 11-13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10181013>.
15. Wild D. Immunoassay Fundamentals. In: *The Immunoassay Handbook*. Fourth Edi. Elsevier; 2013.
16. Hoofnagle AN, Wener MH. The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry. *J Immunol Methods.* 2009;347(1-2):3-11. doi:10.1016/j.jim.2009.06.003
17. Wu AHB, French D. Implementation of liquid chromatography/mass spectrometry into the clinical laboratory. *Clin Chim Acta.* 2013;420(June):4-10. doi:10.1016/j.cca.2012.10.026
18. Maurer HH. Current role of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Anal Bioanal Chem.* 2007;388(7):1315-1325. doi:10.1007/s00216-007-1248-5
19. Van den Ouweland JMW, Kema IP. The role of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2012;883-884:18-32. doi:10.1016/j.jchromb.2011.11.044
20. JCTLM. JCTLM: Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine. <http://www.bipm.org/jctlm>. Accessed December 19, 2019.

21. Palacios C, Gonzalez L. Is vitamin D deficiency a major global public health problem? *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014;144:138-145. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.11.003
22. Anandabaskar N, Selvarajan S, Kamalanathan S. Vitamin D in Health and Disease – An Update. *J Young Pharm.* 2018;10(4):381-387. doi:10.5530/jyp.2018.10.85
23. Bikle D. *Vitamin D: Production, Metabolism, and Mechanisms of Action.*; 2000. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25905172>.
24. Sempos CT, Heijboer AC, Bikle DD, et al. Vitamin D assays and the definition of hypovitaminosis D: results from the First International Conference on Controversies in Vitamin D. *Br J Clin Pharmacol.* 2018;84(10):2194-2207. doi:10.1111/bcp.13652
25. Tai SSC, Nelson MA, Bedner M, et al. Development of Standard Reference Material (SRM) 2973 Vitamin D Metabolites in Frozen Human Serum (High Level). *J AOAC Int.* 2017;100(5):1294-1303. doi:10.5740/jaoacint.17-0182
26. Rezayi M, Ghayour-Mobarhan M, Tavakoly Sany SB, et al. A comparison of analytical methods for measuring concentrations of 25-hydroxy vitamin D in biological samples. *Anal Methods.* 2018;10(47):5599-5612. doi:10.1039/C8AY02146E
27. Garg U. 25-Hydroxyvitamin D Testing. Immunoassays Versus Tandem Mass Spectrometry. *Clin Lab Med.* 2018;38(3):439-453. doi:10.1016/j.cll.2018.05.007
28. Carter GD, Jones JC. Use of a common standard improves the performance of liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods for serum 25-hydroxyvitamin-D. *Ann Clin Biochem.* 2009;46(1):79-81. doi:10.1258/acb.2008.008135
29. Bedner M, Lippa KA. 25-Hydroxyvitamin D isomerizes to pre-25-hydroxyvitamin D in solution: considerations for calibration in clinical measurements. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407(26):8079-8086. doi:10.1007/s00216-015-8980-z
30. Yetley EA, Pfeiffer CM, Schleicher RL, et al. NHANES Monitoring of Serum 25-Hydroxyvitamin D: A Roundtable Summary. *J Nutr.* 2010;140(11):2030S-2045S. doi:10.3945/jn.110.121483

-
31. Carter GD. 25-Hydroxyvitamin D Assays: The Quest For Accuracy. *Clin Chem.* 2009;55(7):1300-1302. doi:10.1373/clinchem.2009.125906
 32. Volmer DA, Mendes LRBC, Stokes CS. Analysis of vitamin D metabolic markers by mass spectrometry: Current techniques, limitations of the “gold standard” method, and anticipated future directions. *Mass Spectrom Rev.* 2015;34(1):2-23. doi:10.1002/mas.21408
 33. Stepman HCM, Vanderroost A, Van Uytfanghe K, Thienpont LM. Candidate Reference Measurement Procedures for Serum 25-Hydroxyvitamin D3 and 25-Hydroxyvitamin D2 by Using Isotope-Dilution Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Clin Chem.* 2011;57(3):441-448. doi:10.1373/clinchem.2010.152553
 34. Binkley N, Krueger D, Cowgill CS, et al. Assay Variation Confounds the Diagnosis of Hypovitaminosis D: A Call for Standardization. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(7):3152-3157. doi:10.1210/jc.2003-031979
 35. Vogeser M. Quantification of circulating 25-hydroxyvitamin D by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;121(3-5):565-573. doi:10.1016/j.jsbmb.2010.02.025
 36. Phinney KW, Tai SSC, Bedner M, et al. Development of an Improved Standard Reference Material for Vitamin D Metabolites in Human Serum. *Anal Chem.* 2017;89(9):4907-4913. doi:10.1021/acs.analchem.6b05168
 37. Couchman L, Benton CM, Moniz CF. Variability in the analysis of 25-hydroxyvitamin D by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: The devil is in the detail. *Clin Chim Acta.* 2012;413(15-16):1239-1243. doi:10.1016/j.cca.2012.04.003
 38. Sempos CT, Betz JM, Camara JE, et al. General Steps to Standardize the Laboratory Measurement of Serum Total 25-Hydroxyvitamin D. *J AOAC Int.* 2017;100(5):1230-1233. doi:10.5740/jaoacint.17-0259
 39. Elin RJ. Reference Intervals and Laboratory Values. In: Goldman L, Bennett JC, eds. *Cecil Textbook of Medicine*. 21st Editi. W. B. Saunders Company; 2000.

40. Kushnir MM, Rockwood AL, Bergquist J, et al. High-Sensitivity Tandem Mass Spectrometry Assay for Serum Estrone and Estradiol. *Am J Clin Pathol.* 2008;129(4):530-539. doi:10.1309/LC03BHQ5XJPJYEKG
41. Vesper H, Wang Y, Botelho J. Challenges and improvements in testosterone and estradiol testing. *Asian J Androl.* 2014;16(2):178. doi:10.4103/1008-682X.122338
42. Hanukoglu I. Steroidogenic enzymes: Structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992;43(8):779-804. doi:10.1016/0960-0760(92)90307-5
43. Rosner W, Hankinson SE, Sluss PM, Vesper HW, Wierman ME. Challenges to the Measurement of Estradiol: An Endocrine Society Position Statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(4):1376-1387. doi:10.1210/jc.2012-3780
44. Bellem A, Meiyappan S, Romans S, Einstein G. Measuring estrogens and progestagens in humans: An overview of methods. *Gen Med.* 2011;8(5):283-299. doi:10.1016/j.genm.2011.07.001
45. Newman JD, Handelsman DJ. Challenges to the measurement of oestradiol: comments on an endocrine society position statement. *Clin Biochem Rev.* 2014;35(2):75-79. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25210207>.
46. Denver N, Khan S, Homer NZM, MacLean MR, Andrew R. Current strategies for quantification of estrogens in clinical research. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2019;192:105373. doi:10.1016/j.jsbmb.2019.04.022
47. Stanczyk FZ, Clarke NJ. Advantages and challenges of mass spectrometry assays for steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;121(3-5):491-495. doi:10.1016/j.jsbmb.2010.05.001
48. Stanczyk FZ, Xu X, Sluss PM, Brinton LA, McGlynn KA. Do metabolites account for higher serum steroid hormone levels measured by RIA compared to mass spectrometry? *Clin Chim Acta.* 2018;484(May):223-225. doi:10.1016/j.cca.2018.05.054

-
49. Handelsman DJ, Wartofsky L. Requirement for Mass Spectrometry Sex Steroid Assays in the Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(10):3971-3973. doi:10.1210/jc.2013-3375
 50. Khedr A, Alahdal AM. Liquid chromatography–tandem mass spectrometric analysis of ten estrogen metabolites at sub-picogram levels in breast cancer women. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2016;1031:181-188. doi:10.1016/j.jchromb.2016.07.051
 51. Li X, Franke AA. Improved profiling of estrogen metabolites by orbitrap LC/MS. *Steroids.* 2015;99(Pt A):84-90. doi:10.1016/j.steroids.2014.12.005
 52. Keski-Rahkonen P, Desai R, Jimenez M, Harwood DT, Handelsman DJ. Measurement of Estradiol in Human Serum by LC-MS/MS Using a Novel Estrogen-Specific Derivatization Reagent. *Anal Chem.* 2015;87(14):7180-7186. doi:10.1021/acs.analchem.5b01042
 53. Yang WC, Regnier FE, Sliva D, Adamec J. Stable isotope-coded quaternization for comparative quantification of estrogen metabolites by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2008;870(2):233-240. doi:10.1016/j.jchromb.2008.06.026
 54. Yang P, Natta K Van, Kozak M, Scientific TF, Jose S. LC-MS / MS Analysis of Estradiol with Dansyl Derivatization.
 55. European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. *EMA, Comm Med Prod Hum Use.* 2012;44(July 2011):1-23. doi:EMA/CHMP/EWP/192217/2009

CAPÍTULO 4

Determinación de drogas de abuso en aguas
residuales urbanas

4.1 Introducción

El abuso de las drogas es un problema de salud y seguridad pública con gran impacto en la sociedad actual. Cientos de sustancias están o bien reguladas o completamente prohibidas por los daños que son capaces de causar sobre los consumidores o por el peligro que éstas suponen sobre la sociedad.

No obstante, el abuso de las drogas como preocupación social es un concepto relativamente nuevo, especialmente en cuanto a legislación, si se compara con el extenso historial de los humanos y el consumo de sustancias.

Las primeras evidencias del uso de drogas datan de hace aproximadamente 6000 años, en Mesopotamia, donde los sumerios cultivaban la amapola de opio, a la que llamaban “la planta de la alegría”. Los romanos describían el opio no solamente como analgésico y narcótico, sino también como veneno, ya que su alto contenido en alcaloides podía utilizarse para provocar la muerte, especialmente al concentrarse los jugos contenidos en el bulbo. Desde entonces, el opio ejercería una gran influencia en las sociedades humanas, política global, economía y cultura.

Las prácticas médicas antiguas están íntimamente ligadas al opio y cientos de remedios se preparaban con este producto, habitualmente en forma de bebidas dulces y especiadas para ocultar su sabor amargo. Posteriormente, Paracelso inventaría en el siglo XVI una nueva forma de preparación de opio, el láudano. Esto no era más que un extracto de opio en alcohol, pero este término terminaría por asociarse a la propia preparación con vino y especias, remedio que se extendería por toda Europa y América.

A pesar de la amplia disponibilidad de opio (y de otras muchas sustancias naturales con efectos psicoactivos), el abuso y la adicción no era motivo de preocupación. Sí se conocían los efectos adversos del consumo extremo del opio, pero debido a su forma de consumo, la ingestión, era difícil desarrollar una adicción o incluso una sobredosis. Esto no ocurriría hasta el desarrollo de nuevas formas de administración. Por una parte, el descubrimiento de las pipas utilizadas por las tribus indígenas americanas propició que se popularizara el consumo fumado, vía por la cual el efecto es mucho más directo e intenso. Este hecho generaría una nueva clase de adictos, cuyas funciones sociales quedarían gravemente afectadas, convirtiendo los fumadores de opio en una verdadera epidemia.

Finalmente, la invención de la aguja hipodérmica en 1848 supuso un gran avance para la medicina, pero también para la historia del consumo de drogas. La vía intravenosa proporciona un efecto todavía más inmediato e intenso que fumar, con lo que el problema de salud pública se agravaría considerablemente.

El opio no sería la única droga en hacer saltar las alarmas por los problemas de adicción y abuso. Con el desarrollo de la medicina y las ciencias químicas se introdujeron nuevas formas del conocido opio. Primeramente, se descubrió una forma más potente del extracto de opio y que constituía en una purificación de su principal compuesto activo, la morfina, la cual sería rápidamente aceptada y comercializada en la sociedad. Posteriormente, la búsqueda de analgésicos menos dañinos para el organismo durante el siglo XIX se centraría en la modificación de la estructura de la propia morfina, dando como resultado la codeína y la heroína. Esta última, paradójicamente, resultaría ser un compuesto todavía más peligroso y adictivo que la morfina¹.

De esta forma, el abuso de las drogas se ha diversificado desde el predominio del opio en la antigüedad, y otras drogas derivadas de plantas como la marihuana o la cocaína –extraída de la hoja de coca–,

hasta los cientos de derivados y productos completamente nuevos desarrollados durante el último siglo.

Con los crecientes problemas causados por el comportamiento y el estado de salud de los consumidores, no resulta extraño que las drogas acabaran sufriendo una regulación estatal o incluso su total prohibición. Aquellos compuestos adictivos, pero de interés para la medicina, ya sea por sus propiedades anestésicas o curativas, son actualmente vigiladas y fuertemente controladas por el Estado, mientras que aquellos compuestos puramente recreativos y altamente adictivos están prohibidos en términos de posesión y distribución. No obstante, existe otro grupo de drogas que, debido a su íntima conexión con la cultura occidental y por sus relativamente bajos niveles de adicción, permanecen dentro de los límites legales. Estas drogas consideradas recreativas y legales son, por ejemplo, el alcohol, la cafeína o el tabaco.

La prohibición de las drogas de abuso conlleva otra consecuencia. Al no estar fácilmente disponibles, los usuarios tienden a acudir a otros recursos para obtener su dosis de estímulo. Esto lleva, bien al consumo de otras sustancias clásicas de mayor tráfico ilegal en su país o zona, o bien al consumo de lo que se conoce como drogas de diseño. Estos compuestos se elaboran habitualmente de forma clandestina a partir de drogas conocidas, e imitando los efectos de éstas, para obtener un compuesto no contemplado por la ley en ese momento y que pueden distribuir rápidamente mientras dure ese estado de ilegalidad² (este hecho también ocurre en otros campos como el del dopaje). Esto ha generado toda una nueva categoría de clasificación de drogas, llamadas ampliamente como “nuevas sustancias psicoactivas” (NPS, *New Psychoactive Substances*), de las cuales destacan por su expansión y peligrosidad los cannabinoides y las catinonas sintéticas^{3,4}.

Por otra parte, un gran número de nuevas drogas han surgido por necesidades médicas, en la búsqueda de alternativas clínicas a las drogas clásicas, como ocurrió con la heroína. Dentro de esta visión, sustancias

como la anfetamina o la metanfetamina surgen inicialmente como medicamentos para tratar la depresión o la obesidad, entre otras aplicaciones. Posteriormente, llegarían a ser consideradas una epidemia por el uso continuado y abierto de gran parte de la población, especialmente en Japón y Estados Unidos tras la Segunda Guerra Mundial, durante la cual se empleaban anfetamina y otras drogas como potenciadores de las capacidades físicas y psicológicas⁵.

La prohibición implica control. La llamada “Guerra contra las drogas”⁶ parece no tener fin y, a parte del trabajo de las fuerzas del orden por disminuir la presencia en las calles, es una lucha continua entre los nuevos diseños y los métodos de detección disponibles. Para todo esto es necesario un conocimiento preciso y fiable de los hábitos de consumo de las poblaciones, con el fin de determinar las vías de entrada, los posibles peligros para la salud ciudadana y para aprovechar de la mejor manera posible los recursos.

Pero, ¿qué se considera droga de abuso exactamente? Aparentemente no existe una definición consensuada entre las innumerables organizaciones médicas y legislativas especializadas en los temas de adicción y/o drogas, ya que cada una de ellas define los términos “droga” y “abuso” de forma distinta. No obstante, hay una serie de características comunes a todas ellas. Se trata de compuestos clasificados como sustancias ilegales, medicaciones con o sin prescripción médica, sustancias potenciadoras del rendimiento u otras sustancias susceptibles de ser utilizadas erróneamente, de manera continuada o compulsiva, y que pueden resultar en daños graves para el usuario⁷.

El Instituto Nacional sobre el Abuso de Drogas (NIDA, *National Institute on Drug Abuse*) es una de las organizaciones más reconocidas en el campo y publica periódicamente una lista de drogas de abuso, manteniendo actualizadas las estadísticas más relevantes de cada una de ellas relativas a su consumo en Estados Unidos. Las drogas más relevantes de cada categoría listada son las siguientes⁸:

- Alcohol.
- Tabaco, nicotina y cigarros electrónicos.
- Medicamentos, entre ellos:
 - Opioides: heroína, morfina, codeína, etc.
 - Con prescripción: anfetamina.
- “Club drugs”: ketamina, LSD, MDMA, metanfetamina.
- Origen natural: marihuana, cocaína, psilocibina (setas).
- Esteroides anabólicos.
- Sintéticas: cannabinoides y catinonas.

Mientras que en Estados Unidos la principal preocupación es la proliferación y aumento del consumo de opioides, especialmente opioides sintéticos, en Europa la situación es bien diferente. Según el Centro Europeo de Monitoreo de Drogas y Toxicomanías (EMCDDA, *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*), la tendencia actual muestra un aumento constante en el consumo de cocaína, así como de la producción de algunas sustancias sintéticas, de las cuales destaca el MDMA, catinonas y cannabinoides sintéticos⁹. Asimismo, la marihuana sigue siendo la droga más establecida en la región, especialmente entre la población joven¹⁰.

Tradicionalmente, la monitorización de los patrones de abuso de drogas en la población se ha realizado mediante procedimientos indirectos. Es decir, mediante estimaciones a partir de datos de incautaciones, estadísticas criminales relacionadas, cuestionarios, informes médicos o entrevistas directas con los consumidores^{11,12}. Esto genera una serie de inconvenientes. Resulta un proceso lento, de alto coste económico y, al centrarse principalmente en la población consumidora, presenta un

claro sesgo. Por ello, es necesario recurrir a algún otro método que sea anónimo, indiscriminado e inmediato.

Concretamente, el EMCDDA emplea una combinación de cinco indicadores para realizar los estudios de tendencia de consumo en Europa¹⁰:

- Datos de emergencias hospitalarias.
- Análisis de residuos de jeringas obtenidas en centros de intercambio.
- Datos de servicios de comprobación de drogas, que permiten a los usuarios analizar sus drogas y conocer su composición.
- Encuestas *online*.
- Análisis de aguas residuales.

Iniciativas inter-disciplinares como SCORE (*Sewage Analysis CORE group Europe*) y COST (*European Cooperation in Science & Technology*), amparadas por el EMCDDA, han apostado fuertemente por este último punto, desarrollando una red europea de análisis de drogas ilícitas y metabolitos en las aguas residuales de numerosas ciudades apoyado en un potente sistema de control de calidad¹³.

Con esta red en funcionamiento, mediante la cuantificación de diversos biomarcadores en el agua residual recogida por las plantas de tratamiento, se ha propuesto una metodología de cálculo para estimar las tendencias de consumo de cada ciudad, así como otros factores de riesgo. Esta sistemática se conoce como epidemiología basada en aguas residuales (WBE, *Wastewater-Based Epidemiology*)¹⁴⁻¹⁶, la cual permite realizar estudios de comparación al detalle entre ciudades pero, por encima de todo, permite estimar el abuso de drogas de una forma mucho más inmediata que mediante otras herramientas¹⁷.

4.1.1 Metodologías de análisis

Los análisis químicos relacionados con las drogas pueden ser de muy distintas características, ya que los controles de drogas se pueden realizar en multitud de matrices analíticas.

Dependiendo del objetivo del análisis, las pruebas de drogas pueden limitarse a un pequeño grupo de drogas de abuso clásicas. Los test anti-drogas en los puestos de trabajo incluyen habitualmente, al menos, marihuana (analizando el metabolito THC-COOH), cocaína y su principal metabolito benzoilecgonina, metabolitos de opioides (codeína, morfina y el metabolito principal de heroína, 6-acetilmorfina) y anfetaminas (anfetamina, metanfetamina y MDMA)¹⁸.

El tipo de muestras que pueden encontrarse en el ámbito de la monitorización de drogas de abuso pueden ser las mezclas listas para consumo o las propias sustancias en sus formas más puras, muestras biológicas de los consumidores o, como se ha comentado anteriormente, aguas expuestas a fuentes de drogas, ya sean aguas residuales o aguas superficiales cercanas a poblaciones¹⁹.

Los productos incautados o sospechosos de contener sustancias ilícitas, normalmente en estado sólido, pueden ser sometidos a procesos analíticos para determinar su naturaleza, composición y pureza. Propósito que se puede afrontar de manera directa mediante un análisis dirigido, es decir, comprobando si contiene o no una lista de compuestos escogidos de antemano. Para ello se dispone de un amplio abanico de posibilidades analíticas que van desde los kits de análisis preparados hasta la espectrometría de masas. Los primeros son rápidos y efectivos para un grupo reducido de drogas clásicas y son de gran interés para agentes de la ley y de aduanas, ya que permiten determinar rápidamente la naturaleza de objetos sospechosos²⁰. La espectrometría de masas con equipos de cuadrupolo (simple o triple) permite, en cambio, una mayor sensibilidad y la opción de cuantificar el contenido de diversos compuestos de forma simultánea.

Por otra parte, es posible abordar el análisis de la composición de una muestra mediante un enfoque no orientado. Las actuales técnicas de análisis no dirigido mediante espectrometría de masas de alta resolución (HR-MS) permiten identificar no solamente compuestos conocidos de antemano, sino familias de compuestos que incluyan derivados completamente desconocidos hasta la fecha, además de permitir el análisis retrospectivo^{21,22}.

Los controles de muestras biológicas, sin embargo, requieren de pasos de extracción y concentración de los analitos de interés, además de eliminar los posibles compuestos interferentes provenientes de la matriz.

El pelo se ha convertido en una de las matrices más importante en los últimos años. Su análisis permite una ventana de detección mucho más amplia que el de cualquier otra muestra biológica. Esto es debido a que la exposición a drogas de abuso provoca la deposición de las mismas o de sus metabolitos en el interior del tallo a medida que éste crece, por lo que el propio pelo constituye un potencial registro del consumo de drogas que se extiende hasta varios meses. Sin embargo, la extracción de los analitos es laboriosa y requiere de diversos pasos de tratamiento de muestra, incluyendo limpieza exterior, digestión y pre-concentración, tras lo cual se procede la determinación mediante LC-MS (HPLC, UHPLC o HILIC), GC-MS o electroforesis capilar²³.

No obstante, los fluidos biológicos siguen siendo la opción preferente en monitorización de drogas. Algunos implican métodos de toma de muestra menos invasivos y requieren menor manipulación de las mismas. Clásicamente, estas determinaciones se han llevado a cabo mediante el análisis de orina y técnicas de inmuno-ensayo o GC-MS²⁴, pero esta tendencia está desplazándose a matrices alternativas como la saliva²⁵ o el aliento²⁶, entre otras²⁷, preferentemente mediante LC-MS/MS o GC-MS.

Finalmente, bajo la visión de un control de abuso de drogas más general y anónima, la epidemiología basada en aguas residuales (WBE) permite la monitorización de poblaciones enteras mediante el análisis de las aguas

recogidas por plantas de tratamiento²⁸. Este procedimiento requiere de una alta pre-concentración de los analitos por SPE, a la vez que se elimina la mayor parte posible de la compleja matriz que los contiene, para luego ser detectados y/o cuantificados mediante LC-MS(/MS)¹⁴.

4.2 Deconvolución de perfiles isotópicos como alternativa a la curva de calibrado para la aplicación en epidemiología basada en aguas residuales

En este apartado se presenta una última aplicación de la metodología de cálculo de IPD en una matriz compleja como es el influente de las plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas.

En el ámbito de la epidemiología basada en aguas residuales (WBE), la disminución de la incertidumbre asociada a la estimación del consumo poblacional de drogas de abuso comienza con la aplicación de un método analítico exacto, es decir, preciso y veraz.

Bajo el marco de trabajo del proyecto WATCH (*Wastewater Analysis of Traces of illicit drug-related Chemicals for law enforcement and public Health*), directamente relacionado con el grupo SCORE y el EMCDDA, se desarrolló un método de análisis de las principales drogas de abuso en aguas residuales. Con éste, se analizaron numerosas muestras de influente de plantas de tratamiento de distintas ciudades europeas, cuantificando anfetamina (AMP), metanfetamina (METH), 3,4-metilendioxi metanfetamina (MDMA), cocaína (COC) y benzoilecgonina (BE) (*Figura 4.1*) al nivel de ng/L en muestras de 6 ciudades europeas.

Aprovechando el trabajo realizado desarrollando el procedimiento de tratamiento de muestra, de separación cromatográfica y rutas de fragmentación en espectrometría de masas en tándem para los analitos seleccionados^{29,30}, se adaptó el método instrumental de LC-MS/MS para permitir la cuantificación por IPD. Dicho de otro modo, a partir de un método de cuantificación basado en IDMS convencional con curva de calibrado y patrón interno marcado isotópicamente, se obtuvo un método basado en IPD manteniendo intactos los pasos de extracción,

pre-concentración y cromatografía líquida, añadiendo las transiciones de MS/MS necesarias.

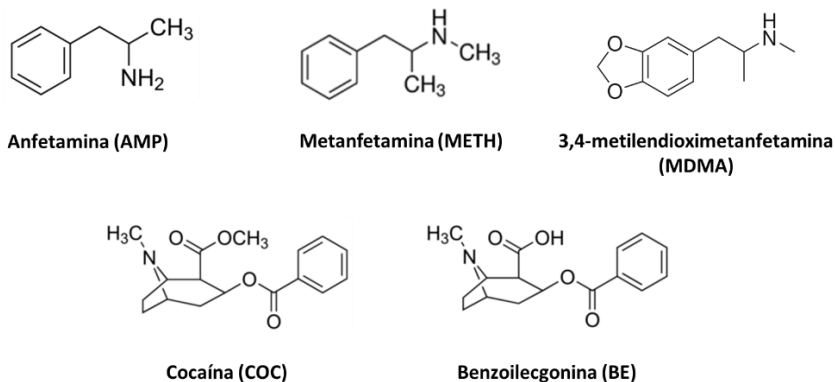


Figura 4.1. Principales analitos monitorizados en estudios comparativos europeos.

4.2.1 WBE e incertidumbre

El objetivo principal en la epidemiología basada en aguas residuales aplicada a drogas de abuso es el de evidenciar las tendencias y patrones de consumo medio de unas sustancias determinadas en una comunidad local a partir del análisis de las aguas residuales de la ciudad y una serie de cálculos³¹.

Primeramente, las muestras diarias se toman como suma de varias submuestras recogidas durante un período de 24 horas, con el fin de evitar fluctuaciones de flujo de influente y para obtener muestras representativas y homogéneas. Posteriormente, una vez en el laboratorio, se someten a un proceso de pre-concentración (en este caso mediante SPE). De esta forma se pasa de concentraciones de analitos en el rango de ng/L en las muestras iniciales a µg/L en extracto, lo cual permite una mejor cuantificación y LOQ más bajos mediante LC-MS/MS.

La concentración medida en las muestras se multiplica por el caudal del flujo de influente medido por los sistemas de la planta depuradora (m³/día), previa corrección de las posibles degradaciones ocurridas

durante el transporte. Esta carga de compuesto (mg/día) se multiplica por un factor de corrección determinado por el patrón de excreción del compuesto, determinado mediante estudios fármaco-cinéticos, obteniendo la cantidad de droga de abuso consumida por la población. Finalmente, esta cantidad se divide por la población total a la que abastece la planta depuradora para obtener el consumo en términos de mg/día por cada 1000 habitantes^{15,32} (Figura 4.2).

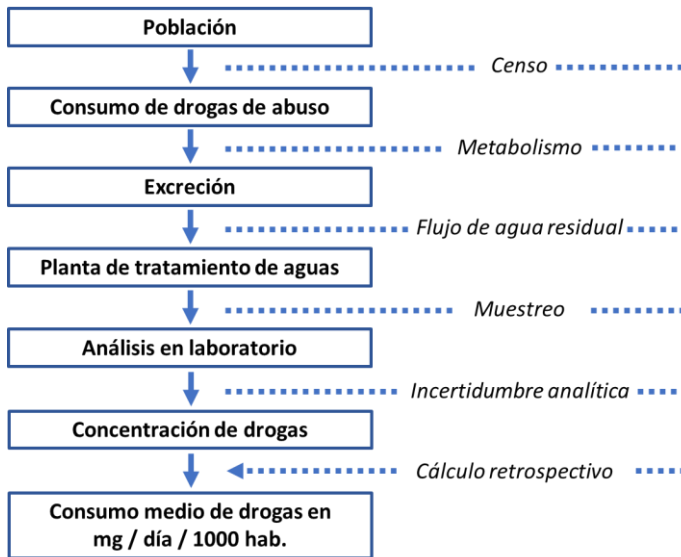


Figura 4.2. Cálculo retrospectivo del consumo medio de drogas de abuso en una población a partir del análisis de aguas residuales y aspectos que afectan al mismo en cada etapa.

Este esquema de trabajo se ha empleado satisfactoriamente para la comparación entre ciudades de distintos tamaños y patrones de consumo, en un esfuerzo conjunto entre numerosas instituciones europeas³³.

A pesar de la aparente simplicidad del cálculo, son muchos los factores a tener en cuenta. Por una parte, se debe tanto corregir la degradación provocada por el medio como estimar el efecto del metabolismo, lo que requiere de un profundo conocimiento de las condiciones de transporte –las cuales pueden a su vez variar en gran

medida– y de las transformaciones de las drogas en el cuerpo humano según distintas vías de consumo. Por otra parte, el último paso de cálculo emplea el dato de la población abastecida, que no suele coincidir con los datos de censo, sino que depende en gran medida del desplazamiento de la población por acudir al trabajo, por traslado a lugares de vacaciones, etc. Para compensar este efecto pueden emplearse estimaciones que tengan en cuenta estos fenómenos o, preferiblemente, mediante la medida de algún marcador en la propia muestra de agua residual, tal como el contenido de nitrógeno, fósforo, demanda bioquímica de oxígeno (DBO) o la demanda química de oxígeno (DQO)³².

Todos estos factores y pasos de cálculo contribuyen a la incertidumbre global asociada a la determinación del consumo de drogas en poblaciones, cuyo estudio en profundidad se ha abordado en diferentes trabajos^{31,34–36}.

La determinación analítica de las muestras de aguas constituye uno de los primeros pasos, por lo que una reducción en la incertidumbre asociada a la cuantificación puede ayudar en gran medida a mejorar la calidad de las estimaciones reportadas. Por ello, se presenta una metodología basada en IPD, método caracterizado por su rapidez, su alta calidad metrológica y su robustez frente a matrices de alta complejidad.

4.2.2 Comparación de métodos

La comparación entre ambos métodos (IDMS convencional e IPD), que experimentalmente tan solo difieren en las condiciones de medida de espectrometría de masas, se realizó de la siguiente forma.

Teniendo conjuntos de muestras de 6 ciudades europeas distintas, compuestos por muestras diarias a lo largo de una semana completa, se obtuvieron alícuotas de dos muestras de cada conjunto que fueron usadas para preparar disoluciones de control de calidad (QC). Cada QC se fortificó entonces con dos cantidades de analitos distintas, una a nivel alto (QC-H) y otra a nivel bajo (QC-L). La evaluación de cada método de cuantificación

se realizó en base al porcentaje de recuperación (Ec. 4.1), conociendo la concentración de la muestra utilizada para cada QC. Así mismo se comparó la incertidumbre combinada, $u(c)$ (Ec. 4.2), que contempla la reproducibilidad del método y el sesgo respecto al valor de referencia, 100% de recuperación, de acuerdo con la guía Nordtest³⁷.

$$\% \text{ rec} = \frac{\text{Conc. QC fortificado} - \text{Conc. muestra sin fortificar}}{\text{Conc. fortificada}} \times 100 \quad (\text{Ec. 4.1})$$

$$u(c) = \sqrt{u(\text{RSD})^2 + u(\text{bias})^2} \quad (\text{Ec. 4.2})$$

Al haber un total de 5 analitos y 12 muestras QC, se obtienen un total de 60 datos individuales de recuperación. Después de eliminar los valores discordantes mediante el test de Hampel se obtuvieron 56 valores para la metodología de cuantificación IPD y 55 para la clásica basada en curva de calibrado.

Aplicando el criterio generalmente aceptado para datos de recuperación, se establecieron límites entre el 70 y el 120% del valor nominal fortificado. Comparando ambos métodos, se obtuvo un total de 31 valores individuales anómalos (56%) para la metodología de IDMS convencional frente a tan solo 11 (20%) para IPD, lo cual muestra una gran mejora en la veracidad proporcionada por esta herramienta de cálculo. Al obtener datos medios por compuesto, IPD proporcionó valores dentro de los límites establecidos para todos los analitos, manteniendo una menor variabilidad frente a IDMS convencional, que proporcionó valores fuera de los límites establecidos para 6 de los 10 valores medios.

Para la evaluación de la incertidumbre combinada se propuso un límite del 30% de acuerdo con la curva de Horwitz³⁸. Una vez realizado el cálculo se observaron 4 valores fuera de este límite para IPD mientras que la metodología clásica mostró 9 de 10 valores superiores al 30%.

A modo de resumen, se pudo confirmar que la metodología IPD se comportó como un método más fiable para todos los parámetros relacionados con la incertidumbre.

Finalmente, se evaluó de manera aproximada la incertidumbre que acompaña al consumo medio diario de la población de Castelló. A partir de la incertidumbre de cada etapa del cálculo, y asumiendo que dichas etapas no están correlacionadas, se calculó la incertidumbre combinada de todas ellas. La contribución asociada a la concentración es una de las más importantes³⁴ y el cálculo demostró que un simple cambio de estrategia de cuantificación –el uso de IPD– puede proporcionar valores significativamente menores de incertidumbre global. Incertidumbre que puede llegar a alcanzar valores inaceptables para la estimación del consumo de una comunidad.

Adicionalmente, ambas metodologías se sometieron a la evaluación mediante ejercicio inter-laboratorio organizado durante el proyecto WATCH¹³ (datos de IPD no incluidos en los cálculos oficiales), obteniendo *z-scores* satisfactorios para todas las disoluciones problema en ambos casos.

4.2.3 Artículo científico 5

Isotope Pattern Deconvolution as an alternative to calibration curve for application in wastewater-based epidemiology

J. Pitarch-Motellón, L. Bijlsma, J.V. Sancho Llopis, A. F. Roig-Navarro.

(En revisión)

Talanta

Isotope Pattern Deconvolution as an alternative to calibration curve for application in wastewater based epidemiology

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	TAL-D-20-03750
Article Type:	Research Paper
Section/Category:	Others
Keywords:	Wastewater-based epidemiology; Illicit drugs; isotope dilution mass spectrometry; isotope pattern deconvolution; combined uncertainty
Corresponding Author:	Antoni F. Roig-Navarro, Ph.D Universitat Jaume I Castelló de la Plana, SPAIN
First Author:	Antoni F. Roig-Navarro, Ph.D
Order of Authors:	Antoni F. Roig-Navarro, Ph.D Jorge Pitarch-Motellón Lubertus Bijlsma Juan V Sancho

Isotope Pattern Deconvolution as an alternative to calibration curve for application in wastewater-based epidemiology

(Under review)

J. Pitarch-Motellón¹, L. Bijlsma¹, J.V. Sancho Llopis¹, A. F. Roig-Navarro¹

¹ Research Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, Castelló, Spain

ABSTRACT

An Isotope Pattern Deconvolution (IPD) quantification method has been developed for the determination of five substances (amphetamine, benzoylecgonine, cocaine, methamphetamine and MDMA) in wastewater for the application in wastewater-based epidemiology (WBE). A previously validated method that used a calibration curve for quantification was modified to apply IPD. The two approaches were compared in terms of analytical uncertainty in recovery studies of quality control samples i.e. six wastewater samples from different geographical origin spiked at two concentration levels. Both methods were reliable as they passed (z -score < 2) an interlaboratory exercise.

After 60 individual determinations, IPD provided 11 results outside recovery limits (70% – 120%) while the previous method produced 31 adverse results. All mean values for IPD were accurate whereas 6 out of 10 results showed RSD values higher than 30 % or recoveries outside limits when using the former method. Moreover, the calculated method bias for the latter doubles that of IPD, which, in turn, makes the combined uncertainty ($u(c)$) much higher. Consequently, this resulted in a lower uncertainty of the estimated normalized daily drug consumption through wastewater analysis when applying IPD.

The current study demonstrated that the employment of IPD can also be very interesting for future applications of WBE, especially when matrix effects are high, complicating accurate quantification. In addition, when a high number of samples and/or compounds need to be analysed IPD is

faster than calibration and, eventually, cost effective when isotopically labelled internal standard are highly expensive.

KEYWORDS: Wastewater-based epidemiology, Illicit drugs, isotope dilution mass spectrometry, isotope pattern deconvolution, combined uncertainty

1. INTRODUCTION

Wastewater-based epidemiology (WBE) is an established approach to assess illicit drug consumption by a community and produces objective and near real time data, which allows the monitoring of temporal and spatial trends [1-3]. It provides complementary information to traditional epidemiological drug use indicators based on general population surveys, data of hospitals and crime-related statistics [1, 4-6] and has been employed in several cities worldwide [2, 3, 7-9]. WBE is an emerging scientific research field to provide information on the community's health and lifestyle habits, or environmental exposure [10]. Various new and potentially new applications are being developed to monitor exposure to pesticides [11], flame retardants [12] or Bisphenol A [13]. A current hot topic is its potential as surveillance tool for disease outbreaks such as SARS-CoV-2 [14, 15]. The approach relies on a five step strategy: a) collection of representative 24h composite influent wastewater samples, b) concentration determination of human biomarkers in the samples, c) calculation of daily loads, d) normalization of daily loads to the population served by the wastewater treatment plant (WWTP) and e) back calculation to total daily consumption. Each of the steps is affected by different uncertainty sources [4,16-18]. Uncertainty related to the concentration measurement step in real samples was estimated to be 1 - 34%, and depends, among others, on the analytical methodology and quantification strategy applied [18]. A best-practice standardization for the analysis of illicit drug in wastewater has been suggested in the work of Van Nuijs et al [9] where a multi-year inter-laboratory study allowed to improve analytical methodologies and the quality of reported data.

Thus, helping to reduce the measurement uncertainty, an ever-sought goal in analytical chemistry.

Raw influent wastewater is one of the most complex environmental matrices, containing potentially thousands of interfering chemical substances. Reliable quantitative analytical methodologies for the determination of human biomarkers often at trace-levels (ng/L) in such complex matrix are needed, but is challenging. Mass spectrometry (MS) is currently the method of choice for the determination of most human biomarkers in wastewater samples. However, well known problems related with sensitivity, selectivity and precision, all of them affected by matrix effect, are to be faced. Since wastewater may vary strongly and thus each sample (i.e. matrix) can be potentially different, the matrix-matched calibration approach is not feasible. Therefore, high matrix effects are usually compensated by the addition of an Isotopically-Labelled Internal Standard (ILIS), ideally a labelled standard of the target biomarker. This approach is referred to as isotope dilution mass spectrometry (IDMS) and is known to yield the most accurate, precise and reliable results [19].

The classical approach in WBE and MS-based methods involves the construction of a calibration curve in solvent in which the ratio of analyte/internal standard signals is plotted against the concentration of standard, with a constant amount of ILIS added to samples and calibrators. This procedure is able to compensate for losses during sample pretreatment, matrix effect or instrumental drift, but can also be costly when many compounds need to be analysed *i.e.* ILIS of target compounds can be very expensive. In addition, the analysis, processing and integration of many standard lines can be time-consuming. As an alternative quantification method to calibration curve IDMS, Isotope Pattern Deconvolution (IPD) can be conducted. IPD is based on the alteration of the natural isotopologue abundances when a known amount of a labelled analogue of each analyte is added to a sample. For each substance, the isotopic abundances in the blend are a linear combination of those from the natural and from the labelled analogues. A deconvolution calculation

based on multiple linear regression provides the concentration of the natural compound in each sample *i.e.* each matrix [20-22]. Calculation is readily done with any spreadsheet software without the use of any methodological calibration, thus reducing the use of ILIS and the total analysis time. IPD calculation approach has been tested for the rapid and reliable quantifications of different compounds in several complex matrices, such as urine [23-26], serum [27], food [28] and environmental samples [22, 29-32]. Recently, the power of IPD for the easy and accurate re-certification of vitamin D standards [33] has been demonstrated.

In this study, an IPD quantification method has been developed for the determination of five illicit drugs and/or metabolites in wastewater. The aim of the present work is to demonstrate the performance of IPD in terms of accuracy (trueness and precision) and to illustrate its potential and interest as alternative quantification methodology for future WBE applications. In addition, to a standard method validation, results are compared with data obtained from the application of an in-house method based on IDMS using a calibration curve for concentration calculation. The probable dispersion of results is calculated and compared in terms of within-lab reproducibility and combined uncertainty, $u(c)$. Furthermore, results are assessed and evaluated by means of the participation in an international inter-laboratory exercise. Finally, a rough estimation of the combined uncertainty to assess the whole overall uncertainty of illicit drug consumption through WBE model has been conducted.

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1 Study summary

Daily composite raw wastewater samples were collected over seven consecutive days from six different locations. The samples were routinely treated in the lab and analysed on different days. Quality Controls (QCs) were prepared by spiking two sub-samples from each location at two

concentration levels before sample treatment. Samples for QCs preparation were selected among those collected in the middle of the week, where lower drug concentration was expected. After sample treatment, spiked concentrations in sample extracts were $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$ (QC-L) and $20 \mu\text{g L}^{-1}$ (QC-H). Recoveries were calculated by subtracting the concentration found in the sample to the concentration in the corresponding QC (Equation 1). Thus, six recovery values were obtained for each QC (six different wastewater compositions, i.e. matrices), allowing to estimate uncertainty with a sufficient level of confidence in intra-lab reproducibility conditions. A selection of 5 illicit drugs and/or metabolites was agreed in accordance to previous studies on WBE. Selected compounds for the present study were: amphetamine (AMP), benzoylecgonine (BE), cocaine (COC), methamphetamine (METH) and 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA).

$$Rec\% = \frac{\text{Found QC Conc.} - \text{Found unspiked sample Conc.}}{\text{Spiked Conc.}} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Analysis were conducted by LC-(ID)MS/MS and concentrations calculated by conventional calibration curve (CAL) and Isotope Pattern Deconvolution (IPD).

Afterwards, uncertainty was estimated from recovery values expressed as percentage according to a procedure based in the Nordtest guide [34]. Parameters calculated were: individual recovery for each compound and QC sample (Rec), mean recovery value for each compound of the six QCs, relative standard deviation of the mean value (RSD) and combined uncertainty(u(c)) taking into account all sources of bias. See measurement uncertainty assessment section below for a brief explanation, and supplementary information (SI) for a detailed example of uncertainty calculation.

Accepted limits for recovery were 70 – 120%. A limit of 30% (for comparison purposes) has been proposed for RSD and uncertainty in general. This limit is based on the Horwitz Curve [35], where the expected

within laboratory reproducibility RSD is 30% for the $\mu\text{g L}^{-1}$ range of concentration.

A total of 30 individual results (6 spiked samples x 5 compounds) and 5 mean results are obtained for each spiked concentration level (QC-L and QC-H). Previously to uncertainty assessment, outlier values were rejected using Hampel test.

Furthermore, within the framework of the European collaborative research group SCORE, inter-laboratory studies have been organized to ensure high-quality analytical data in relation to the determination of illicit drug residues in wastewater used for WBE purposes [9]. Synthetic samples from this inter-laboratory comparison experiment, designed for the evaluation of the routine calibration curve-based method, were also determined by IPD and the results were sent for separate assessment. The inter-laboratory consisted in 3 tap water samples spiked with unknown levels of the target drugs (to be analysed three times each) and a control solution in MeOH (to be analysed five times). Accuracy of the method was assessed with z-score from the group's mean value.

2.2 Chemicals and materials

Certified reference materials of AMP, METH, MDMA, COC and BE as well as their corresponding isotope-labelled analogues AMP-d6, METH-d5, MDMA-d5, COC-d3 and BE-d3 were purchased from Cerilliant (Round Rock, TX, USA). All standards were acquired as solutions in methanol or acetonitrile.

Methanol (MeOH) HPLC, acetonitrile (ACN) HPLC, ammonium acetate and formic acid for LC-MS were acquired from Scharlau (Barcelona, Spain). Ultrapure water was obtained by purifying demineralised water (H_2O) in a Milli-Q plus system from Millipore (Bedford, MA, USA). Oasis HLB cartridges (3 cm^3 , 60 mg) were from Waters (Milford, MA, USA).

Standard stock solutions of each non-labelled compound were prepared at 100 mg L⁻¹ in MeOH or ACN. Stock solutions were used to prepare intermediate 10 mg L⁻¹ solutions in MeOH or ACN and mixed to a 1 mg L⁻¹ working solution in MeOH by diluting with the appropriate solvents. Individual stock solutions of isotope-labelled compounds were prepared in MeOH or ACN at 10 mg L⁻¹. A surrogate mixed standard solution at 100 µg L⁻¹ was prepared by volumetric dilution in MeOH/H₂O 1:9 v/v.

All standard solutions were stored in amber glass bottles at -20 °C.

Each working day, final calibration curve using mixed standards and surrogates were prepared by subsequent dilutions in MeOH/H₂O 1:9.

2.3 Instrumentation

Characterization and determination of analytes were performed on an Acquity UHPLC system from Waters (Milford, MA, USA) interfaced to a Xevo TQS triple quadrupole mass spectrometer from Waters (Manchester, UK) equipped with a T-Wave and electrospray ionization interface operated in positive mode (ESI+). Chromatographic separation was achieved using an Acquity UPLC BEH C18 column (1.7 µm, 50 x 2.1 mm), also from Waters, at a flow rate of 0.3 mL min⁻¹ and 40 °C. Sample manager was kept at 5 °C. Mobile phase consisted of 5 mM ammonium acetate and 0.01% formic acid in H₂O (phase A) and MeOH (phase B). The gradient of phase B applied was: initial conditions at 10%, linear increase to 90% in 3 min, 90% (3-3.5 min), 10% (3.6-6 min) for equilibration of column.

Cone and desolvation gas (dry nitrogen) flows were set to 250 and 1200 L h⁻¹ respectively. For operation in MS/MS mode, argon 99.995% (Praxair, Madrid, Spain) was used as collision gas, kept at 4·10⁻³ mbar and 0.15 mL/min in the collision cell. Capillary voltage was 3.0 kV, source and desolvation temperatures were 150 °C and 650 °C, respectively, and dwell times of 0.01 s/transition were selected.

All data were acquired using MassLynx v4.1 software (Waters, Manchester, UK) and processed using Masslynx and Microsoft's Excel spreadsheet software.

Table 1 shows the instrumental settings for MS/MS measurements needed for IPD.

Table 1. Instrumental conditions.

Compound	MS/MS Transitions	CV (V)	CE (V)
AMP	136 > 119 137 > 120	20	10
AMP-d6	141 > 124 142 > 125	20	10
BE	290 > 168 291 > 169	40	20
BE-d3	293 > 171 294 > 172	40	20
COC	304 > 182 305 > 183	30	20
COC-d3	307 > 185 308 > 186	30	20
METH	150 > 119 151 > 120	40	40
METH-d5	154 > 121 155 > 121	40	40
MDMA	194 > 163 195 > 164	30	15
MDMA-d5	198 > 165 199 > 165	30	15

2.4 Analytical procedure

A slightly modified method previously developed and satisfactorily validated in the lab has been used [36]. Briefly, 100 mL four-fold diluted influent wastewater samples were spiked with a mix of isotope-labelled analogues (approximately $100 \mu\text{g L}^{-1}$ of AMP-d6 and $10 \mu\text{g L}^{-1}$ for the other labelled compounds) and passed through previously conditioned Oasis HLB SPE cartridges. Analytes were eluted using 5 mL of MeOH, extracts were evaporated to dryness and reconstituted in 1 mL of MeOH/H₂O 1:9 (v/v). A volume of 3 μL of the final extracts was finally injected in the UHPLC-MS/MS system. A calibration curve was prepared using 6 points plus blank in the range of 0.5 to $25 \mu\text{g L}^{-1}$ and compared with IPD methodology (see next section for a short explanation of IPD). The latter provides one result for each injected sample without the need of a calibration curve, avoiding as well processing and instrumental measurement steps. The mass spectrometry measurement of the analytes was adapted in order to apply IPD quantification (Table 1). The same sample extracts were quantified by both calculation methods and compared in terms of trueness, as percentage recovery of QCs, precision in terms of within-lab reproducibility RSD% ($n = 6$), and accuracy assessed as $u(c)$.

2.5 Quantification by isotope pattern deconvolution (IPD)

Traditionally, the peak area ratio between two given masses (or transitions in MS/MS) in the spiked sample is measured to build the calibration curve. However, when the isotope-labelled analogue is added, the natural distribution of abundances of the analyte of interest is altered. The resulting isotopic composition in the sample after the spike is a linear combination of the natural and enriched compounds. IPD takes profit of this altered abundances in the blend *i.e.* sample mixed with the labelled standard [20].

In brief, the total abundance in the mix for any transition in the mass spectrum (A_{mix}^{SRMi}) can be calculated as a combination of two sources: the contribution of the natural compound (its abundance, A_{nat}^{SRMi} , multiplied by its molar fraction, X_{nat} , in the blend) and that of the labelled compound, ($A_{lab}^{SRMi} X_{lab}$)(Equation 2).

$$(A_{mix}^{SRMi}) = (A_{nat}^{SRMi}) X_{nat} + (A_{lab}^{SRMi}) X_{lab}. \quad \text{Eq. 2}$$

In the case of n measured transitions in tandem MS this can be expressed in matrix notation as follows (Equation 3):

$$\begin{bmatrix} A_{mix}^{SRM_1} \\ A_{mix}^{SRM_2} \\ \vdots \\ A_{mix}^{SRM_n} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^{SRM_1} & A_{lab}^{SRM_1} \\ A_{nat}^{SRM_2} & A_{lab}^{SRM_2} \\ \vdots & \vdots \\ A_{nat}^{SRM_n} & A_{lab}^{SRM_n} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X_{nat} \\ X_{lab} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{SRM_1} \\ e^{SRM_2} \\ \vdots \\ e^{SRM_n} \end{bmatrix} \quad \text{Eq. 3}$$

Where abundance values in the mix, A_{mix}^{SRMi} , are experimentally measured. The matrix with the series of values A_{nat}^{SRMi} and A_{lab}^{SRMi} constitutes the reference abundance matrix and must be previously known.

In the IPD approach, the whole or part of the isotope pattern presented in the mix is measured in the MS/MS instrumental system. Usually, three or four transitions are measured. Knowing the distribution of abundances in the natural and labelled compounds, the corresponding molar fractions can be calculated by multiple linear regression. As we have more parameters (transitions) than unknowns (molar fractions) an error vector is included in Equation 2. The best values of X_{nat} and X_{lab} are found by least squares minimization of the error vector “e”. This can be straightforwardly achieved with any spreadsheet software. (See SI for a detailed IPD model and example of calculation explanation)

Finally, since the amount of labelled compound is known (N_{lab}), the amount of natural compound in the sample (N_{nat}) is readily obtained by Equation 4:

$$N_{nat} = N_{lab} \frac{X_{nat}}{X_{lab}} \quad \text{Eq. 4}$$

Hence, methodological calibration graph preparation and measuring is not needed. Quantification is directly conducted in the sample after one injection, leading to a cost and time savings. It requires, however, the full characterization of both compounds in terms of their isotopologue distribution of abundances and the exact concentration certification by reverse isotope dilution of the labelled compound standard solutions. Yet, this step only needs to be conducted once. Reference abundance of the equation matrix (Equation 2) can be theoretically calculated or experimentally measured. In the present work isotopologue abundances have been experimentally measured.

2.6 Measurement uncertainty assessment

Measurement uncertainty characterises the dispersion of the values that could reasonably be attributed to a measurement result, $x \pm u(c)$. In analytical chemistry, uncertainty is usually reported as the standard deviation calculated from within-laboratory reproducibility experiments. However, if measurement uncertainty also takes into account bias, uncertainty can reach values which may be a factor of 2 to 5 times higher than previously. This fact simply reflects a much better estimation of the real variation in the measurement as, in this case, $u(c)$ represents all possible uncertainty sources [34]. For a method applied in a specific laboratory this means within-lab precision, $u(\text{RSD})$, and bias from a reference value, $u(\text{bias})$ (Equation 5). Estimation of this whole uncertainty makes the comparison of two results more suitably conducted. In the present work, 100% recovery is the reference value for bias uncertainty calculation. According to Nordtest Guide [34] for measurement

uncertainty calculation, the sources of $u(\text{bias})$ are the bias root mean square (RMS, which includes the difference with respect to the reference value and the reproducibility of this difference), and the uncertainty of the reference value itself, $u(\text{Crec})$ (Equation 6). The later one originated by the uncertainties associated to the concentration ($u(\text{conc})$) and quantity (volume, $u(\text{vol})$) of spiked standard (Equation 7). $u(\text{conc})$ is calculated from the uncertainty of the certified standard applying error propagation in dilution steps, and $u(\text{vol})$ is calculated from the volumetric material tolerances in the lab. (See the $u(c)$ model tab in excel file provided in SI for a detailed explanation).

$$u(c) = \sqrt{u(\text{RSD})^2 + u(\text{bias})^2} \quad \text{Eq. 5}$$

$$u(\text{bias}) = \sqrt{\text{RMS}^2 + u(\text{Crec})^2} \quad \text{Eq. 6}$$

$$u(\text{Crec}) = \sqrt{u(\text{conc})^2 + u(\text{vol})^2} \quad \text{Eq. 7}$$

3. RESULTS

3.1 Characterization of analytes

Characterization of natural (AMP, BE, COC, METH and MDMA) and labelled compounds (AMP-d6, BE-d3, COC-d3, METH-d5 and MDMA-d5,) consisted in obtaining the reference matrix of isotopic abundances (Equation 2) as well as the determination of the exact concentrations of ILIS solutions. Four transitions per compound, two from the natural and two from the labelled analogue clusters, were used for quantification purposes (Table 1).

Isotopic abundances were experimentally obtained taking into account the observed fragmentation pathways [37] and measurable transitions

(around 10 transitions per compound). Suitable transitions were further selected beforehand by theoretical calculation of all possible transitions for each cluster, obtained using IsoPatrn software [38].

Concentrations of mixed labelled standard solutions (used for the spiking of samples) were certified by reverse isotope dilution (RID) analysis, which is based on the use of natural counterparts as reference for IPD calculations. Results of RID determinations were $(535 \pm 21) \mu\text{g L}^{-1}$ for AMP-d6, $(8.81 \pm 0.08) \mu\text{g L}^{-1}$ for BE-d3, $(10.75 \pm 0.08) \mu\text{g L}^{-1}$ for COC-d3, $(17.14 \pm 0.14) \mu\text{g L}^{-1}$ for METH-d5 and $(12.81 \pm 0.10) \mu\text{g L}^{-1}$ for MDMA-d5.

3.2 Method performance comparison

3.2.1 Interlaboratory study

Yearly inter-laboratory exercises are carried out with 37 participant laboratories from 25 countries [9]. As part of the validation and assessment of the calibration quantification method, the data set of IPD was also sent in 2017 to check the validity of the method. It is, however, noteworthy that the set was not included into the official testing calculations. Clearly, both methods passed the interlaboratory exercise (z -scores < 2) for the three spiked tap water samples and the methanol control solution (Table 2). This exercise being a test of the reliability of the methods. In general terms, IPD provided slightly higher concentrations than the CAL method, making it closer to group means for BE and equally well performing for AMP, while CAL results for MDMA and METH were nearer the group means. Variable results were found for COC with respect to group's mean.

3.2.2 Recovery and RSD

Comparison of both quantification approaches was carried out based on their performance in the determination of all 5 analytes in each QC

samples. Here it is important to emphasize that the spiked wastewater samples were of different origin and that the matrix of each sample was non-identical. In fact, the composition can be very different as it can be affected daily by different weather conditions, industries, agriculture and population activities. Such conditions exemplify a strong test for the method accuracy. After Hampel test for outlier detection, a total of 56 individual values (29 QC-L and 27 QC-H) for IPD and 55 (26 QC-LL and 29 QC-H) for CAL were gathered.

In general terms, IPD quantification provided higher recovery mean values for AMP, METH and MDMA, and lower for BE and COC than CAL (Tables 3 and 4). Remarkably, IPD was able to correctly quantify COC and BE, which have been usually found at high concentrations in the samples of the present study and therefore recovery experiments tend to be exceptionally difficult, especially when spiking low concentrations of standards (QC-L). This fact makes IPD a promising method, sensitive enough to accurately quantify low spiked concentrations in high blank and complex matrix samples. Taking into account the mean recovery values across the different samples, IPD showed more accurate determination of the analytes than those of CAL, where a great number of individual results were observed outside the accepted limits.

Following the accepted recovery results in typical validation studies, between 70 and 120%, IPD calculation shows only 20% of individual recovery values (11 out of 56) outside the range in comparison to the 56% (31 out of 55) in the case of CAL. Being COC, with 9 out of 10 results outside the limits, the compound showing poorer recoveries (Table 4). Moreover, no mean values were outside the accepted range for IPD while 6 (out of 10) falls beyond the limits for the CAL method. One more time COC shows the suboptimal recovery values.

Table 2. Interlaboratory participation. One standard in MeOH solution. Three fortified tap water samples. z-scores calculated from group's mean

	BE			COC			MDMA			AMPH			METH							
	MeOH	W1	W2	W3	MeOH	W1	W2	W3	MeOH	W1	W2	W3	MeOH	W1	W2	W3				
Cal	-0,30	-0,84	-0,82	-0,64	-0,20	-0,77	<LOQ	<LOQ	-0,05	0,19	0,51	0,31	-0,38	0,76	0,68	0,32	-0,33	0,29	0,27	0,05
IPD	0,87	-0,08	-0,01	0,00	0,43	0,52	-0,94	-0,40	0,66	0,98	1,17	0,66	1,96	0,77	0,66	0,30	0,84	1,93	1,50	0,72
difference	1,18	0,77	0,81	0,64	0,62	1,29	na	na	0,71	0,80	0,66	0,36	2,33	0,02	-0,02	-0,02	1,17	1,63	1,23	0,67

Table 3. Recovery values for individual determinations and mean values at two concentration levels. For the mean values RSD are also shown. In red/bold those values outside accepted limits. (See text for a more detailed explanation). IPD quantification method.

IPD	AMP		BE		COC		METH		MDMA						
	Rec%		Rec%		Rec%		Rec%		Rec%						
1-QC-L	141		72		116		107		115						
1-QC-H	87		70		105		110		108						
2-QC-L	94		120		89		115		95						
2-QC-H	99		85		110		109		109						
3-QC-L	51		80		107		105		118						
3-QC-H	116		78		109		105		112						
4-QC-L	112		33		102		114		106						
4-QC-H	126		73		113		117		115						
5-QC-L	31		24		86		129		100						
5-QC-H	95		62		110		114		104						
6-QC-L	-		265		148		135		120						
6-QC-H	-		93		-		-		116						
Mean (RSD) %	QC-L	86 (52)	QC-L	99 (89)	108 (21)	QC-L	117 (10)	109 (9)	QC-H	105 (15)	QC-H	77 (15)	109 (2)	111 (4)	111 (4)

(-) eliminated value using Hampel test.

QC-L, 2.5 ng/mL; QC-H 20 ng/mL.

Regarding precision, 2 (out of 10) RSD values higher than 30% were found for IPD whereas 6 (out of 10) falls outwards the limit for CAL method. Thus, IPD also showed a higher precision for the quantification, which makes the approach interesting and favourable for future applications.

Table 4. Recovery values for individual determinations and mean values at two centration levels. For the mean values RSD are also shown. In red/bold those values outside accepted limits. (See text for a more detailed explanation). CAL quantification method.

CAL	AMP	BE	COC	METH	MDMA	
	Rec%	Rec%	Rec%	Rec%	Rec%	
1-QC-L	101	148	172	54	72	
1-QC-H	42	111	157	53	69	
2-QC-L	108	-	204	76	104	
2-QC-H	69	85	165	84	108	
3-QC-L	78	143	190	44	78	
3-QC-H	64	137	184	56	80	
4-QC-L	76	-	108	112	100	
4-QC-H	92	124	193	95	102	
5-QC-L	0	-	-	72	99	
5-QC-H	94	14	-	128	84	
6-QC-L	36	76	148	48	68	
6-QC-H	43	165	150	52	69	
Mean (RSD) %	QC-L	67 (62)	122 (33)	164 (23)	68 (37)	87 (18)
	QC-H	67 (34)	106 (49)	170 (11)	78 (39)	85 (19)

(-) eliminated value using Hampel test. QC-L, 2.5 ng/mL; QC-H 20 ng/mL.

3.2.3 Combined uncertainty calculation and comparison

Due to the high RSD values of method reproducibility observed, negligible effect of reference value uncertainty $u(C_{rec})$ was expected on the final $u(c)$ value (see Equations 5 - 7). Method bias (RMS), however, is highly affected by recovery and RSD values and would show the main bias contribution to the combined uncertainty. Anyway, all uncertainty sources were calculated at each concentration level for each compound and sample. Table 5 summarizes results about the sources of uncertainty estimated for both quantification methods used.

Table 5. Combined, $u(c)$, and individual sources of uncertainty for IPD and CAL quantification methods. In red/bold those values outside accepted limits. (See text for a more detailed explanation).

Uncertainty source	Uncertainty (%)									
	IPD					CAL				
	AMP	BE	COC	METH	MDMA	AMP	BE	COC	METH	MDMA
u(c)-L	66	121	32	25	19	80	114	71	56	29
u(c)-H	23	31	14	16	16	52	70	67	54	30
RSD QC-L	52	89	21	10	9	62	33	23	37	18
RSD QC-H	15	15	2	4	4	34	49	11	39	19
u(bias)-L	40	81	24	23	17	51	96	67	41	22
u(bias)-H	17	27	14	15	16	40	49	66	37	23
RMS-L	39	81	22	21	13	50	96	67	40	20
RMS-H	14	25	9	11	12	39	48	65	36	21
u(C _{rec})*						11				
u(vol)*						3				
u(conc)*						10				

(*)u(conc) and u(vol) used to calculate u(C_{rec}). This one and RMS used to calculate u(bias). See SI for a detailed u(c) model and example of calculation explanation.

As it was expected $u(\text{Crec})$, the uncertainty associated to the reference value (100% recovery), is very low (11%). RMS (affected by the reproducibility of bias calculation) ranges from 9% to 81%, with 2 (out of 10) values higher than 30% for IPD, and from 21% to 96%, with 8 (out of 10) results higher than 30% for CAL. RMS stands for the highest contributor to $u(\text{bias})$ (see Equation 6), which in turn shows the same trends than RMS, as expected.

Finally, for all cases, $u(c)$ becomes significantly higher than RSD. A mean increase by a factor 2.5 was observed. However, as mean values for RSD and $u(\text{bias})$ for IPD are significantly lower than those values for CAL, $u(c)$ for IPD is lower than $u(c)$ for CAL. Specifically, after $u(c)$ calculation, CAL methodology showed 9 of 10 results outside of 30% limit. On the other hand, for IPD, 4 of 10 results exceeded this reference value. Thus, $u(c)$ reinforces IPD as a more accurate quantification method, with higher trueness and precision.

In summary, IPD shows the higher trustworthy for all parameters associated to uncertainty. Calculation of $u(c)$ definitely shows that CAL can generate highly uncertain results, whereas IPD quantification methodology significantly decreases that combined uncertainty, which is always advantageous. Specifically, in the context of assessing the effectivity of implemented measures to reduce the impact of illicit drugs consumption, decreasing the uncertainty is essential. Some works dealing with illicit drug consumption estimation through wastewater analysis have tackled the problem of the associated uncertainty [16,17]. A key paper by Castiglioni et al [18] integrally address uncertainties associated with the estimation of community drug use through wastewater analysis using questionnaires, interlaboratory studies and already published research data. All critical steps were considered. The following RSD values are assigned to each step: <10% for sampling ($u(S)$) and stability of drug

biomarkers ($u(BS)$); 7–55% for the population size estimation ($u(PE)$) in a catchment, where a case by case study is recommended; 1–34% associated to the analysis of sewage drug biomarkers ($u(BA)$); and back-calculation estimation of use step uncertainty ($u(EU)$, available only for cocaine, used as example) shows a RSD of 26%.

Thus, one more step to assess the whole uncertainty of illicit drug consumption through WBE model can be taken forward. Assuming that the different steps are not correlated a combined uncertainty ($u(NDC)$) for the final normalized daily drug consumption in a given population (mg/day/1000 people) can be estimated through error propagation (Equation 8). As an example, common values from Castiglioni et al [18] are used to assess the uncertainty for COC consumption estimation through the wastewater analysis of the local WWTP of Castelló (Spain). In that work, 23 % is assigned to the population size uncertainty, $u(PE)$. Results from the present work are used to estimate the biomarker analysis uncertainty, $u(BA)$. The rest of the values (sampling, biomarker stability and estimation of use for cocaine) are directly taken up from the cited paper. Table 6 shows a comparison of $u(NDC)$ values for IPD and CAL quantification methods. The effect of using values of RSD (within-lab reproducibility) or $u(c)$ to assess the uncertainty associated to the biomarker concentration is also compared.

$$u(NDC) = \sqrt{u(S)^2 + u(BS)^2 + u(BA)^2 + u(EU)^2 + u(EP)^2} \text{ Eq. 8}$$

RSD is the most widely used way to check measurement uncertainty in analytical chemistry. Using within-lab reproducibility obtained in the present work to estimate the uncertainty in biomarker analysis ($u(BA) = \text{RSD}$), the calculated values for $u(NDC)$ fall around 40%, no matter the quantification method used, IPD or CAL, and concentration level (Table 6).

Combined uncertainty, $u(c)$, is a less widely used although more rigorous and suitable way to evaluate measurement uncertainty. Using $u(c)$ to estimate $u(BA)$, provides similar results for $u(NDC)$ if IPD quantification method is applied. Values for low and high concentration QCs are 49% and 40% respectively. However, if CAL quantification method is used, $u(NDC)$ nearly doubles its values, which ranges close to 80%. This is in agreement with the higher $u(c)$ values for CAL method compared to IPD.

Table 6. Combined uncertainty of the normalized daily cocaine consumption in Castelló (Spain) estimated for IPD and CAL quantification methods. RSD and $u(c)$ to calculate uncertainty associated to the biomarker analytical results, $u(BA)$ are compared.

	IPD				CAL			
	QC-L		QC-H		QC-L		QC-H	
	$u(BA)$	$u(NDC)$	$u(BA)$	$u(NDC)$	$u(BA)$	$u(NDC)$	$u(BA)$	$u(NDC)$
$u(BA) = u(c)$	30	48	9	39	71	80	67	77
$u(BA) = RSD$	21	43	2	38	23	44	11	39

The recently established approach for monitoring illicit drug consumption in communities has several advantages. However, due to the different steps of the calculation model, the uncertainty of the last parameter ($u(NDC)$) can be high as it has been roughly observed in the present work. One of the main steps contributing to the final uncertainty is the analysis of the drug biomarker. Although current analytical methodology is widely regarded as reliable, higher accuracy would always be welcome. In this way, a simple change of data treatment -IPD quantification methodology- has been shown as a route to explore. IPD has been shown, one more time, as a fast and reliable method. Results are accurate, with higher trueness and precision, and no calibration curve preparation, process and measurement is needed. One sample injection produces one analytical result, which leads, in consequence, to time savings.

Present work relates to the estimation of illicit drug consumption through wastewater analysis, however, IPD can be very interesting for future applications of WBE. As previously mentioned WBE is an emerging scientific research field and is being implemented to obtain complementary information on the community's health and lifestyle habits, or environmental exposure [10, 15]. In this context, IPD emerges as a promising quantification strategy due to the features that have been shown: reliable, fast and, eventually, cost-effective. This is particularly interesting when a high number of samples need to be analysed for many biomarkers.

4. Conclusions

In this work, an IPD quantification approach was applied for the first time to the determination of illicit drugs in wastewater-based epidemiology (WBE) studies. An IPD method was developed by modification of an already developed and validated calibration curve-based isotope dilution mass spectrometry methodology. Amphetamine, benzoylecgonine, cocaine, methamphetamine and MDMA were selected as target analytes. A rough study of uncertainty was carried out for both quantification methods based on the performance in quality control analysis of routine WBE samples in 6 batches from different locations.

Reliability of the methods were successfully checked through an international inter-laboratory study with z-scores < 2 for both methods.

The proposed IPD methodology consistently showed better trueness results in terms of recovery percentage in QC analysis. The application of IPD quantification on the same QC sample extracts allowed to reduce the number of out-of-range recovery results (70-120%) from 31 to 11 out of 60 total individual values, compared to calibration-based quantification.

Although the presence of analytes on the samples employed to QC preparation produced additional difficulty in recovery studies, the average recovery percentages at high and low concentrations showed acceptable results between 70 and 120% for all compounds in the case of IPD. By contrast, most calibration average recoveries (6 out of 10) fell outside that range.

On the other hand, recovery reproducibility and bias are significantly better for IPD quantification method, being bias reproducibility (RMS) the main factor affecting bias. As a general trend, values for IPD methodology are a half those for CAL. The later showing 8 out of 10 results higher than the proposed limit of 30%.

As a consequence of the above, combined uncertainties ($u(c)$) for IPD were considerably lower than in calibration. This, in turn, resulted in lower uncertainty of normalized daily drug consumption (NDC), which is one of the main parameters of interest in WBE.

IPD can be, therefore, very interesting for future applications of wastewater-based epidemiology, especially when high matrix effects hamper an accurate quantification. IPD is more accurate, faster and eventually cost-effective than calibration methods. It has been shown as an alternative to calibration-based methods, including matrix-matched calibration, and a route to explore for future applications.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors acknowledge C. Ort from EAWAG (CH) for his invaluable comments to improve the manuscript.

The authors acknowledge the financial support of Generalitat Valenciana, Spain, as research group of excellence (PROMETEO II/2014/023).

REFERENCES

- [1] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, *Assessing Illicit Drugs in Wastewater: Advances in Wastewater-based Drug Epidemiology*, Insights 22, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2016
- [2] C. Ort, A.L.N. van Nuijs, J.D. Berset, L. Bijlsma, S. Castiglioni, A. Covaci, P. De Voogt, E. Emke, D. Fatta-Kassinos, P. Griffiths, F. Hernández, I. González- Mariño, R. Grabic, B. Kasprzyk-Hordern, N. Mastroianni, A. Meierjohann, T. Nefau, M. Ostman, Y. Pico, I. Racamonde, M. Reid, J. Slobodnik, S. Terzic, N. Thomaidis, K.V. Thomas, Spatial differences and temporal changes in illicit drug use in Europe quantified by wastewater analysis, *Addiction* 109 (2014) 1338-1352. <https://doi.org/10.1111/add.12570>
- [3] I. González-Mariño, J.A. Baz-Lomba, N. A. Alygizakis, M.J. Andrés-Costa, R. Bade, A. Bannwarth et al, Spatio-temporal assessment of illicit drug use at large scale: evidence from 7 years of international wastewater monitoring, *Addiction*, 115 (2020) 109–120, <https://doi.org/10.1111/add.14767>
- [4] E. Zuccato, C. Chiabrando, S. Castiglioni, R. Bagnati, R., Fanelli, Estimating community drug abuse by wastewater analysis, *Environmental Health Perspectives* 116(2008) 1027–1032
- [5] C. Banta-Green, J. Field, City-wide drug testing using municipal wastewater. A new tool for drug epidemiology, *Significance*, 8 (2011) 70-74, <https://doi.org/10.1111/j.1740-9713.2011.00489.x>

[6] A.L.N. van Nuijs, S. Castiglioni, I. Tarcomnicu, C. Postigo, M. Lopez de Alda, H. Neels, E. Zuccato, D. Barcelo, A. Covaci, Illicit drug consumption estimations derived from wastewater analysis: a critical review, *Sci. Total Environ.* 409 (2011) 3564-3577, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.05.030>

[7] A.L.N. van Nuijs, J.F. Mougel, I. Tarcomnicu, L. Bervoets, R. Blust, P.G. Jorens, H. Neels, A. Covaci, Sewage epidemiology - A real-time approach to estimate the consumption of illicit drugs in Brussels, Belgium, *Environ. Int.* 37 (2011) 612-621. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.12.006>

[8] K.V. Thomas, L. Bijlsma, S. Castiglioni, A. Covaci, E. Emke, R. Grabic, F. Hernandez, S. Karolak, B. Kasprzyk-Hordern, R.H. Lindberg, M. Lopez de Alda, A. Meierjohann, C. Ort, Y. Pico, J.B. Quintana, M. Reid, J. Rieckermann, S. Terzic, A.L.N. van Nuijs, P. de Voogt, Comparing illicit drug use in 19 European cities through sewage analysis, *Sci. Total Environ.* 432 (2012) 432-439. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.069>

[9] A.L.N. van Nuijs, F.Y. Lai, F. Been, M.J. Andres-Costa, L. Barron, J.A. Baz-Lomba, J.D. Berset, L. Benaglia, L. Bijlsma, D. Burgard, S. Castiglioni, C. Christophoridis, A. Covaci, P. de Voogt, E. Emke, D. Fatta-Kassinos, J. Fick, F. Hernandez, C. Gerber, I. González-Mariño, R. Grabic, T. Gunnar, K. Kannan, S. Karolak, B. Kasprzyk-Hordern, Z. Kokot, I. Krizman-Matasic, A. Li, X. Li, A.S.C. Löve, M. Lopez de Alda, A.K. McCall, M.R. Meyer, H. Oberacher, J. O'Brien, J.B. Quintana, M. Reid, S. Schneider, S.S. Simoes, N.S. Thomaidis, K. Thomas, V. Yargeau, C. Ort, Multi-year inter-laboratory exercises for the analysis of illicit drugs and metabolites in wastewater: Development of a quality control system, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 103 (2018) 34-43. [doi:10.1016/j.trac.2018.03.009](https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.009).

- [10] M. Lorenzo, Y. Picó, Wastewater-based epidemiology: current status and future prospects, *Current Opinion in Environmental Science & Health* 9 (2019) 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2019.05.007>
- [11] N. I. Rousis, E. Zuccato, S. Castiglioni, Monitoring population exposure to pesticides based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry measurement of their urinary metabolites in urban wastewater: A novel biomonitoring approach, *Science of The Total Environment*, 571 (2016)1349-1357. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.036>
- [12] F. Been, M. Bastiaensen, F.Y. Lai, A.L.N. van Nuijs, A. Covaci, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of biomarkers of exposure to phosphorus flame retardants in wastewater to monitor community-wide exposure. *Anal. Chem.* 89(2017) 10045–10053. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02705>.
- [13] L. Lopardo, B. Petrie, K. Proctor, J. Youdan, R. Barden, B. Kasprzyk-Hordern, Estimation of community-wide exposure to bisphenol A via water fingerprinting. *Environ. Int.* 125 (2019) 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.12.048>.
- [14] G. Medema, L. Heijnen, G. Elsinga, R. Italiaander, A. Brouwer, Presence of SARS-Coronavirus-2 in sewage, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.29.20045880>
- [15] N. Sims, B. Kasprzyk-Hordern, Future perspectives of wastewater-based epidemiology: Monitoring infectious disease spread and resistance to the community level, *Environment International*, 139 (2020) 105689. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105689>

[16] C. Mathieu, J. Rieckermann, J.D. Berset, S. Schürch, R. Brenneisen, Assessment of total uncertainty in cocaine and benzoylecgonine wastewater load measurements, *Water Research*, 45 (2011) 6650-6660. doi:10.1016/j.watres.2011.09.049

[17] Foon Yin Lai, Christoph Ort, Coral Gartner, Steve Carter, Jeremy Prichard, Paul Kirkbride, Raimondo Bruno, Wayne Hall, Geoff Eaglesham, Jochen F. Mueller, Refining the estimation of illicit drug consumptions from wastewater analysis: Co-analysis of prescription pharmaceuticals and uncertainty assessment, *Water Research*, 45 (2011) 4437-4448. doi:10.1016/j.watres.2011.05.042

[18] S. Castiglioni, L. Bijlsma, A. Covaci, E. Emke, F. Hernández, M. Reid, C. Ort, K.V. Thomas, A.L.N. van Nuijs, P de Voogt, E Zuccato, Evaluation of Uncertainties Associated with the Determination of Community Drug Use through the Measurement of Sewage Drug Biomarkers, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 1452–1460. dx.doi.org/10.1021/es302722f

[19] A. Furey, M. Moriarty, V. Bane, B. Kinsella, M. Lehane, Ion suppression; a critical review on causes, evaluation, prevention and applications, *Talanta* 115 (2013) 104–122, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.048>.

[20] J.I. García-Alonso, P. Rodríguez-González, *Isotope Dilution Mass Spectrometry*, Royal Society of Chemistry, 2013.

[21] A. González-Antuña, P. Rodríguez-González, G. Centineo, J.I. García Alonso, Evaluation of minimal ¹³C-labelling for stable isotope dilution in organic analysis, *Analyst* 135 (2010) 953, <https://doi.org/10.1039/b924432h>.

[22] Á. Castillo, E. Gracia-Lor, A.F. Roig-Navarro, J. Vicente Sancho, P. Rodríguez- González, J.I. García Alonso, Isotope pattern deconvolution-tandem mass spectrometry for the determination and confirmation of diclofenac in wastewaters, *Anal.Chim. Acta* 765 (2013) 77–85.

[23] A. González-Antuña, P. Rodríguez-González, G. Centineo, J.I. García Alonso, Simultaneous determination of seven β 2-agonists in human and bovine urine by isotope dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry using compound- specific minimally ^{13}C -labelled analogues, *J. Chromatogr. A* 1372 (2014) 63–71, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.065>.

[24] J. Pitarch-Motellón, A.F. Roig-Navarro, J.V. Sancho, M. Ibáñez, N. Fabregat-Cabello, O.J. Pozo, R. Ventura, J.I. García Alonso, P.Rodríguez-González, A. González Gago, A. Ereño Artabe, P. Van Eenoo, K.Deventer, Y. Dehnes, S. Rzeppa, Evaluation of uncertainty sources in the determination of testosterone in urine by calibration-based and isotope dilution quantification using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1508 (2017) 73–80, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.05.072>.

[25] J. Pitarch-Motellón, J.V. Sancho, M. Ibáñez, O. Pozo, A.F. Roig-Navarro, Determination of selected endogenous anabolic androgenic steroids and ratios in urine by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and isotope pattern deconvolution, *J. Chromatogr. A* 1515 (2017) 172–178, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.08.006>.

[26] A. Ereño Artabe, A. González-Gago, A. Suarez Fernández, J. Pitarch Motellón, A.F. Roig-Navarro, O.J. Pozo, P. Rodríguez-González, J.I. García Alonso, Isotope dilution LC-ESI-MS/MS and low resolution selected reaction monitoring as a tool for the accurate quantification of urinary testosterone, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 163 (2019) 113–121, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2018.09.038>.

[27] J. Pitarch-Motellón, N. Fabregat-Cabello, C. Le Goff, A.F. Roig-Navarro, J.V. Sancho-Llopis, E. Cavalier, Comparison of isotope pattern deconvolution and calibration curve quantification methods for the determination of estrone and 17β -estradiol in human serum, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 171 (2019) 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.04.013>

[28] N. Fabregat-Cabello, P. Zomer, J.V. Sancho, A.F. Roig-Navarro, H.G.J. Mol, Comparison of approaches to deal with matrix effects in LC-MS/MS based determinations of mycotoxins in food and feed, *World Mycotoxin J.* 9 (2016) 149–161, <https://doi.org/10.3920/WMJ2014.1872>.

[29] N. Fabregat-Cabello, J. Pitarch-Motellón, J.V. Sancho, M. Ibáñez, A.F. Roig-Navarro, Method development and validation for the determination of selected endocrine disrupting compounds by liquid chromatography mass spectrometry and isotope pattern deconvolution in water samples. Comparison of two extraction techniques, *Anal. Methods* 8 (2016) 2895–2903, <http://dx.doi.org/10.1039/C6AY00221H>.

[30] N. Fabregat-Cabello, J.V. Sancho, A. Vidal, F.V. González, A.F. Roig-Navarro, Development and validation of a liquid chromatography isotope dilution mass spectrometry method for the reliable quantification of alkylphenols in environmental water samples by isotope pattern deconvolution, *J. Chromatogr. A* 1328 (2014) 43–51, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.12.077>.

- [31] A. Castillo, P. Rodríguez-González, G. Centineo, A.F. Roig-Navarro. J.I. Garcia Alonso, Multiple Spiking Species-Specific Isotope Dilution Analysis by molecular mass spectrometry: simultaneous determination of inorganic mercury and methylmercury in fish tissues, *Analytical Chemistry* 82, 2773-2783 (2010). <https://doi.org/10.1021/ac9027033>
- [32] N Fabregat, P Rodriguez-Gonzalez, A Castillo, J Malherbe, AF Roig Navarro, S Long, JI García-Alonso, Fast and accurate procedure for the determination of Cr(VI) in solid samples by Isotope Dilution Mass Spectrometry, *Environ. Sci. Technol.* 46, 12542–12549 (2012). <https://doi.org/10.1021/es3022864>
- [33] J. Pitarch-Motellón, N. Fabregat-Cabello, C. Le Goff, A.F. Roig-Navarro, E.Cavalier, Re-certification of hydroxyvitamin D standards by isotope pattern deconvolution, *Journal of Chromatography B* 1120 (2019) 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.04.043>
- [34] Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories. B.Magnusson, T. Näykki, H. Hovind, M. Krysell. Nordtest technical report 537, ed. 3. Nordtest, 2011
- [35] Richard Albert, William Horwitz, A Heuristic Derivation of the Horwitz Curve, *Anal. Chem.* 69 (1997) 789-790
- [36] L. Bijlsma, E. Beltrán, C. Boix, J. V. Sancho, F. Hernández, Improvements in analytical methodology for the determination of frequently consumed illicit drugs in urban wastewater, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 4261–4272. doi:10.1007/s00216-014-7818-4.

[37] Lubertus Bijlsma, Juan V. Sancho, Félix Hernández, Wilfried M. A. Niessen, Fragmentation pathways of drugs of abuse and their metabolites based on QTOF MS/MS and MSE accurate-mass spectra, *J. Mass. Spectrom.* 46 (2011) 865–875. <https://doi.org/10.1002/jms.196>.

[38] L. Ramaley, L.C. Herrera, Software for the calculation of isotope patterns in tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 2707–2714. doi:10.1002/rcm.3668.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

QCs data

QCs recoveries calculated for 6 selected samples. 2017

Selected samples are spiked at two concentration levels. Afterwards, before and after fortification samples are analysed in the same run

Table below shows calibration curve results

Concentrations are in µg/L

CAL Samples	AMP			BE			COC		
	Sample	Spiked	Found	Sample	Spiked	Found	Sample	Spiked	Found
1-QC-L	6.67	2.5	9.19	51.64	2.50	55.33	18.75	2.5	23.05
1-QC-H	7.29	20	15.74	51.91	20	74.05	21.25	20	52.66
2-QC-L	0	2.5	2.7	70.6	2.5	78.7	15.6	2.5	20.7
2-QC-H	0	20	13.8	74.5	20	91.5	17.1	20	50.1
3-QC-L	1.2	2.5	3.16	2.69	2.5	6.26	1.1	2.5	5.86
3-QC-H	0.99	20	13.86	3.17	20	30.65	1.39	20	38.22
4-QC-L	0.7	2.5	2.6	53.2	2.5	51.2	18.8	2.5	21.5
4-QC-H	0.8	20	19.2	57.6	20	82.4	26.2	20	64.7
5-QC-L	0	2.5	0	63.57	2.5	46.33	27.2	2.5	35.63
5-QC-H	0	20	18.8	55.84	20	58.65	21.92	20	37.92
6-QC-L	0	2.5	0.9	31.8	2.5	33.7	9.3	2.5	13
6-QC-H	0.1	20	8.7	20.2	20	53.1	7.6	20	37.5

CAL Samples	METH			MDMA		
	Sample	Spiked	Found	Sample	Spiked	Found
1-QC-L	0.08	2.5	1.43	0.75	2.5	2.55
1-QC-H	0.06	20	10.59	0.79	20	14.65
2-QC-L	0.2	2.5	2.1	1.4	2.5	4
2-QC-H	0.2	20	16.9	1.5	20	23.1
3-QC-L	10.61	2.5	11.7	0.43	2.5	2.39
3-QC-H	11.51	20	22.67	0.49	20	16.4
4-QC-L	1.4	2.5	4.2	1	2.5	3.5
4-QC-H	2.5	20	21.5	1.3	20	21.6
5-QC-L	0	2.5	1.8	0.45	2.5	2.92
5-QC-H	0	20	25.61	0.56	20	17.44
6-QC-L	0	2.5	1.2	0.6	2.5	2.3
6-QC-H	0	20	10.4	0.4	20	14.2

Outliers

Hampel test to check for outliers based on deviation from sample median.

Recovery values with Hampel score, H, higher than 3 are eliminated

CAL Samples	AMP				BE			
	Rec%	Desv	H	Elim	Rec%	Desv	H	Elim
1-QC-L	101	24	0.6	101	148	2	0.0	148
1-QC-H	42	24	0.7	42	111	7	0.2	111
2-QC-L	108	31	0.8	108	324	179	3.4	
2-QC-H	69	2	0.1	69	85	32	0.8	85
3-QC-L	78	1	0.0	78	143	2	0.0	143
3-QC-H	64	2	0.1	64	137	20	0.5	137
4-QC-L	76	1	0.0	76	-80*			
4-QC-H	92	25	0.7	92	124	7	0.2	124
5-QC-L	0	77	1.9	0	-690*			
5-QC-H	94	27	0.8	94	14	103	2.7	14
6-QC-L	36	41	1.0	36	76	69	1.3	76
6-QC-H	43	24	0.7	43	165	47	1.2	165
Median-L	77	27			145	36		
Median-H	67	24			117	26		

CAL Samples	COC				METH				MDMA			
	Rec%	Desv	H	Elim	Rec%	Desv	H	Elim	Rec%	Desv	H	Elim
1-QC-L	172	9	0.2	172	54	9	0.4	54	72	17	0.8	72
1-QC-H	157	4	0.2	157	53	17	0.7	53	69	13	0.7	69
2-QC-L	204	23	0.5	204	76	13	0.6	76	104	15	0.8	104
2-QC-H	165	4	0.2	165	84	14	0.5	84	108	26	1.4	108
3-QC-L	190	9	0.2	190	44	19	0.9	44	78	10	0.5	78
3-QC-H	184	23	0.9	184	56	14	0.5	56	80	2	0.1	80
4-QC-L	108	73	1.8	108	112	49	2.4	112	100	11	0.6	100
4-QC-H	193	31	1.2	193	95	25	1.0	95	102	20	1.0	102
5-QC-L	337	156	3.8		72	9	0.4	72	99	10	0.5	99
5-QC-H	80	81	3.2		128	58	2.3	128	84	2	0.1	84
6-QC-L	148	33	0.8	148	48	15	0.7	48	68	21	1.0	68
6-QC-H	150	12	0.4	150	52	18	0.7	52	69	13	0.7	69
Median-L	181	28			63	14			89	13		
Median-H	161	17			70	17			82	13		

*Analytical artifact. Found concentration after spiking lower than native concentration in sample

U(c) model

Experimental

A 6 working day period were used to check the performance of the analytical method. Each day seven wastewater samples (different city) and two QCs were prepared and analysed:

- one at low concentration, ca. 2.5 ppb.
- one at high concentration, ca. 20 ppb.

QCs were prepared by spiking two randomly chosen samples from each batch. The matrix, wastewater, were regarded the same for the purpose of the present study. Thus, for each spiking level 6 replicates were generated (reproducibility).

Recovery and relative standard deviation (RSD) from that reproducibility assay were calculated. Solutions (including standards) were prepared by volume dilution. External calibration curve (CAL) and Isotope Pattern deconvolution (IPD) calculation methods were compared.

Model for measurement uncertainty calculation

Nordtest, Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories, (2012)

Combined uncertainty, $u(c)$, for each quantification method and concentration level were calculated. Laboratory RSD (reproducibility) is combined with estimates of the method and laboratory bias. The bias is estimated from the 100% recovery.

$$y = m + u(\text{random error}) + u(\text{bias})$$

m : expected value of y

$u(y)^2 = u(\text{bias})^2 + u(\text{random error})^2$ [combined uncertainty, $u(c)$]

$u(\text{bias})^2$: the estimated variance of method bias and laboratory bias.

$u(R_w)^2$: the estimated variance of random error under within-laboratory reproducibility conditions.

$$u_c = \sqrt{u(R_w)^2 + (u(\text{bias}))^2}$$

$$u(\text{bias}) = \sqrt{RMS_{\text{bias}}^2 + u(\text{Crecovery})^2}$$

$$RMS_{\text{bias}} = \sqrt{\frac{\sum(\text{bias}_i)^2}{n}}$$

$$u(\text{Crecovery}) = \sqrt{u(\text{conc})^2 + u(\text{vol})^2}$$

$$u(vol) = \sqrt{\left(\frac{Ac}{\sqrt{3}}\right)^2 + R^2}$$

u(Rw): is the intra-laboratory reproducibility standard deviation for "n" replicates. RSD(%)

u(bias): bias reproducibility against a reference (RMS) and reference uncertainty u(Crec). Reference = 100% recovery

RMS: root mean square of the bias of the "n" replicates

u(Crec): uncertainty of the standard used to spike and recovery calculation

u(conc): uncertainty of the concentration of the standard

u(vol): uncertainty of the quantity spiked (volume o mass)

Ac: laboratory tolerance for volumetric material or balances accuracy

R: laboratory tolerance volumetric material or balances repeatability

U(c) calculation

QCs recoveries calculated for 6 selected samples. 2017

Selected samples are spiked at two levels an recovery calculated as:

$$\%recovery = \frac{C_{found} - C_{sample}}{C_{spiked}} * 100$$

Bias calculated as the diference from 100% recovery.

Combined uncertainty, uc, calculated from recovery experiments accordind to the Nordtest Guide. See U(c) Model section.

Samples	CAL			AMP			BE			COC					
	Blank	Spiked	Found	Blank	Spiked	Found	Blank	Spiked	Found	Blank	Spiked	Found			
1-QC-L	6.67	2.5	9.19	101%	1%	51.64	2.50	55.33	148%	48%	18.75	2.5	23.05	172%	72%
1-QC-H	7.29	20	15.74	42%	-58%	51.91	20	74.05	111%	11%	21.25	20	52.66	157%	57%
2-QC-L	0	2.5	2.7	108%	8%	70.6	2.5	78.7		-	15.6	2.5	20.7	204%	104%
2-QC-H	0	20	13.8	69%	-31%	74.5	20	91.5	85%	15%	17.1	20	50.1	165%	65%
3-QC-L	1.2	2.5	3.16	78%	-22%	2.69	2.5	6.26	143%	43%	1.1	2.5	5.86	190%	90%
3-QC-H	0.99	20	13.86	64%	-36%	3.17	20	30.65	137%	37%	1.39	20	38.22	184%	84%
4-QC-L	0.7	2.5	2.6	76%	-24%	53.2	2.5	51.2		-	18.8	2.5	21.5	108%	8%
4-QC-H	0.8	20	19.2	92%	-8%	57.6	20	82.4	124%	24%	26.2	20	64.7	193%	93%
5-QC-L	0	2.5	0	0%	100%	63.57	2.5	46.33		-	27.2	2.5	35.63		
5-QC-H	0	20	18.8	94%	-6%	55.84	20	58.65	14%	86%	21.92	20	37.92		
6-QC-L	0	2.5	0.9	36%	-64%	31.8	2.5	33.7	76%	24%	9.3	2.5	13	148%	48%
6-QC-H	0.1	20	8.7	43%	-57%	20.2	20	53.1	165%	65%	7.6	20	37.5	150%	50%
Mean QC-L				67%					122%					164%	
RSD% QC-L				61.9					32.8					23.1	
Mean QC-H				67%					106%					170%	
RSD% QC-H				33.5					49.3					10.7	
RMS-L%					50.3					27.9				66.5	
RMS-H%					38.5					48.1				65.3	
u_bias_L%					51.4					29.8				67.3	
u_bias_H%					39.9					49.2				66.1	
u_c_L%					80.5					44.3				71.2	
u_c_H%					52.1					69.7				67.0	

CAL Samples	METH				MDMA			
	Blank	Spiked	Found	Rec Bias	Blank	Spiked	Found	Rec Bias
1-QC-L	0.08	2.5	1.43	54% -46%	0.75	2.5	2.55	72% -28%
1-QC-H	0.06	20	10.59	53% -47%	0.79	20	14.65	69% -31%
2-QC-L	0.2	2.5	2.1	76% -24%	1.4	2.5	4	104% 4%
2-QC-H	0.2	20	16.9	84% -17%	1.5	20	23.1	108% 8%
3-QC-L	10.61	2.5	11.7	44% -56%	0.43	2.5	2.39	78% -22%
3-QC-H	11.51	20	22.67	56% -44%	0.49	20	16.4	80% -20%
4-QC-L	1.4	2.5	4.2	112% 12%	1	2.5	3.5	100% 0%
4-QC-H	2.5	20	21.5	95% -5%	1.3	20	21.6	102% 2%
5-QC-L	0	2.5	1.8	72% -28%	0.45	2.5	2.92	99% -1%
5-QC-H	0	20	25.61	128% 28%	0.56	20	17.44	84% -16%
6-QC-L	0	2.5	1.2	48% -52%	0.6	2.5	2.3	68% -32%
6-QC-H	0	20	10.4	52% -48%	0.4	20	14.2	69% -31%
Mean QC-L				68%				87%
RSD% QC-L				37.5				18.3
Mean QC-H				78%				85%
RSD% QC-H				39.1				19.1
RMS-L%				39.8				19.5
RMS-H%				35.6				20.9
u_bias_L%				41.2				22.2
u_bias_H%				37.1				23.4
u_c_L%				55.6				28.7
u_c_H%				53.9				30.2

u(Crec%) = 10.5 Dilution by volume

u(vol)% = 3.1

u(Conc)% = 10 Applying error propagation theory. Three (500 ppb) or four (50 ppb) step dilution process by volume

Accu. Tol.% = 5

Repe. Tol.% = 1

Stock standard solution: 1 ± 0,005 mg/mL (From CoA)

IPD model

Isotope pattern deconvolution (IPD) is an alternative approach of classical isotope dilution mass spectrometry methods, which are based on natural-to-labelled area ratios to build the calibration curve. In IPD, the natural distribution of abundances of the analyte of interest are altered by adding the corresponding isotope-labelled analogue and then multiple linear regression is used to mathematically deconvolute the resulting combined distribution of abundances to obtain the molar fractions. Briefly, the abundance in the mix (A^{SRMi}_{mix}), measured after the spike of labelled analogues to the natural occurring analytes, is a linear combination of the natural (A^{SRMi}_{nat}) and labelled (A^{SRMi}_{lab}) compound abundances. In the case of n measured transitions in the tandem mass spectrometry and using a single spike of labelled compound, this can be expressed in matrix form as follows:

$$\begin{bmatrix} A^{SRM1}_{mix} \\ A^{SRM2}_{mix} \\ \vdots \\ A^{SRMn}_{mix} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A^{SRM1}_{nat} & A^{SRM1}_{lab} \\ A^{SRM2}_{nat} & A^{SRM2}_{lab} \\ \vdots & \vdots \\ A^{SRMn}_{nat} & A^{SRMn}_{lab} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} X_{nat} \\ X_{lab} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{SRM1} \\ e^{SRM2} \\ \vdots \\ e^{SRMn} \end{bmatrix}$$

Where an error vector (e^{SRMi}) has to be included in order to solve the equation system. Then, multiple linear regression is applied to minimize the error vector and to obtain the molar fractions (X_{nat} and X_{lab} respectively) that fit better the measured abundances in the mix. Calculations can be conducted easily and automatically by any spreadsheet. Finally, as the amount of labelled compound (N_{lab}) added to the sample is known, the amount of natural analyte (N_{nat}) is obtained:

$$N_{nat} = N_{lab} \frac{X_{nat}}{X_{lab}}$$

As it can be seen, no methodological calibration is needed for the quantification and one injection produces one result. It requires, though, performing a full characterization of both compounds in terms of their isotopomer distribution of abundances and the certification by reverse isotope dilution of the labelled standard solutions.

IPD refecence matrix

Experimental determination of reference matrix abundances

First step. The reference matrix can be theoretically calculated with the available software, or be determined experimentally. In this study, experimental abundances were used. After optimization of fragmentation conditions, a product scan is performed for each precursor ion of the observed cluster in order to select all the measurable products of each precursor, thus obtaining all the possible transitions of the full MSMS cluster. Measurement of those transitions of natural and labelled compounds are carried out five times each to obtain the reference matrices.

Experimental abundances of natural Cocaine

<i>m/z</i>	Avge (n=5)
304>180	0.0002
304>181	0.0017
304>182	0.8172
304>183	0.0001
305>181	0.0002
305>182	0.0728
305>183	0.1077

Experimental abundances of labelled 2H3-Cocaine

<i>m/z</i>	Avg (n=5)
307 > 183	0.0003
307 > 184	0.0035
307 > 185	0.8385
308 > 184	0.0003
308 > 185	0.0649
308 > 186	0.0924

Resulting reference matrix for Cocaine

<i>m/z</i>	Natural	Labelled
304>180	0.0002	
304>181	0.0017	
304>182	0.8172	
304>183	0.0001	
305>181	0.0002	
305>182	0.0728	
305>183	0.1077	
307 > 183		0.0003
307 > 184		0.0035
307 > 185		0.8385
308 > 184		0.0003
308 > 185		0.0649
308 > 186		0.0924

		D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
1	Ex#	Cocaine												
2		First, the peak areas (the only experimental measurement) obtained for each transition are converted to abundances (Ab mix)												
3		Then, the multiple linear regression is performed to obtain the molar fractions of natural and labelled compounds.												
4		As this calculation provides two values that do not comply with $X_{lab} + X_{nat} = 1$, those values are normalized (black box).												
5														
6														
7		Information provided by linear regression												
8	Injection 1	Abundances			Linear Regression			Molar fractions (x)		Linear regression				
		Labelled	Natural	Ab mix	Natural	Labelled	Natural	Labelled	Nat	Lab				
		0	0.817219	0.772752	0.943344	0.150448	0.862453	0.137547	Xnat	Xlab				
		0	0.107707	0.087696	0.012045	0.011769			error Xnat	error Xlab				
9	304 > 182	649669												
10	305 > 183	73728												
11	307 > 185	106107												
12	308 > 186	11218												
13	Sum	840722												
14														
15	Mw Cocaine		303.35											
16	Mw D3-Cocaine		306.37											
17	Conc. Lab solution		10.75	µg/L										
18														
19	Volume of solutions added to the vial													
20	Nat solution		1000	µL										
21	Nat+Lab solutions		200	µL										
22														
23	Moles of labelled compound added to vial													
24	N D3-Cocaine		7.018E-12	mol										
25														
26	Calculation of moles added to vial from the information provided by IPD													
27	X Lab		0.137547											
28	X Nat		0.862453											
29	N Cocaine		4.4E-11	mol										
30	Conc. Nat solution		13.35	µg/L										
31														
32		This calculations are performed for each replicate and injection and the final concentration value is calculated as the average ± standard deviation.												

To perform calculations select cells G9:H13, where the results will be shown. (for example)

Copy linear regression formula =LINEST(E9:E12;C9:D12;0;1). (for example)

E9:E12 are known "y" set of data. Experimental abundances in the mix

C9:D12 are known "x" set of data. Abundances in the reference matrix

","0" regression passes through the origin

";,1" gives statistics

Press simultaneously "Ctrl" + "Shift" + "Enter" to obtain results

Please, look at the inverted column order to introducing and showing data and calculation results

4.3 Bibliografía

1. Gahlinger P. The Long, Strange History of Psychoactive Drugs. In: *Illegal Drugs: A Complete Guide to Their History, Chemistry, Use and Abuse*. Penguin Books; 2004.
2. Nelson ME, Bryant SM, Aks SE. Emerging drugs of abuse. *Emerg Med Clin North Am.* 2014;32(1):1-28. doi:10.1016/j.emc.2013.09.001
3. Lovrecic B, Lovrecic M. Novel psychoactive synthetic cannabinoids and synthetic cathinones: The never-ending story of potential clinical toxicity. *Heroin Addict Relat Clin Probl.* 2018;20(3):13-24.
4. Rech MA, Donahey E, Cappiello Dziedzic JM, Oh L, Greenhalgh E. New Drugs of Abuse. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther.* 2015;35(2):189-197. doi:10.1002/phar.1522
5. Anglin MD, Burke C, Perrochet B, Stamper E, Dawud-Noursi S. History of the Methamphetamine Problem. *J Psychoactive Drugs.* 2000;32(2):137-141. doi:10.1080/02791072.2000.10400221
6. Gahlinger P. The War on Drugs. In: *Illegal Drugs: A Complete Guide to Their History, Chemistry, Use and Abuse*. Penguin Books; 2004.
7. Dasgupta A, Langman LJ, eds. Introduction to Drugs of Abuse. In: *Pharmacogenomics of Alcohol and Drugs of Abuse*. 1st ed. CRC Press; 2012. doi:10.1201/b11879
8. National Institute on Drug Abuse. Drugs of Abuse. <https://www.drugabuse.gov/drugs-abuse>. Accessed August 26, 2019.
9. Papaseit E, Farré M, Schifano F, Torrens M. Emerging drugs in Europe. *Curr Opin Psychiatry.* 2014;27(4):243-250. doi:10.1097/YCO.0000000000000071
10. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. *European Drug Report 2019: Trends and Developments.*; 2019.

11. Hernandez SH, Nelson LS. Prescription Drug Abuse: Insight Into the Epidemic. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;88(3):307-317. doi:10.1038/clpt.2010.154
12. Degenhardt L, Bucello C, Calabria B, et al. What data are available on the extent of illicit drug use and dependence globally? Results of four systematic reviews. *Drug Alcohol Depend.* 2011;117(2-3):85-101. doi:10.1016/j.drugalcdep.2010.11.032
13. van Nuijs ALN, Lai FY, Been F, et al. Multi-year inter-laboratory exercises for the analysis of illicit drugs and metabolites in wastewater: Development of a quality control system. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2018;103:34-43. doi:10.1016/j.trac.2018.03.009
14. Castiglioni S, Bijlsma L, Covaci A, et al. *Estimating Community Drug Use through Wastewater-Based Epidemiology.*; 2016. doi:10.2810/017397
15. van Nuijs ALN, Castiglioni S, Tarcomnicu I, et al. Illicit drug consumption estimations derived from wastewater analysis: A critical review. *Sci Total Environ.* 2011;409(19):3564-3577. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.05.030
16. Kasprzyk-Hordern B. Wastewater Profiling assessing community health. *Environ Mag.* 2014. environmental.magazine.co.uk.
17. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. *Wastewater Analysis and Drugs: A European Multi-City Study.*; 2019. www.emcdda.europa.eu/.
18. Peters FT. Drugs of abuse: type and methods of analysis. In: *Forensic Drug Analysis.* Unitec House, 2 Albert Place, London N3 1QB, UK: Future Science Ltd; 2013:72-86. doi:10.4155/ebo.13.55
19. Zuccato E, Castiglioni S. Illicit drugs in the environment. *Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci.* 2009;367(1904):3965-3978. doi:10.1098/rsta.2009.0107

20. Philp M, Fu S. A review of chemical 'spot' tests: A presumptive illicit drug identification technique. *Drug Test Anal.* 2018;10(1):95-108. doi:10.1002/dta.2300
21. Hernández F, Castiglioni S, Covaci A, et al. Mass spectrometric strategies for the investigation of biomarkers of illicit drug use in wastewater. *Mass Spectrom Rev.* 2018;37(3):258-280. doi:10.1002/mas.21525
22. Hernández F, Portolés T, Pitarch E, López FJ. Gas chromatography coupled to high-resolution time-of-flight mass spectrometry to analyze trace-level organic compounds in the environment, food safety and toxicology. *TrAC Trends Anal Chem.* 2011;30(2):388-400. doi:10.1016/j.trac.2010.11.007
23. Baciú T, Borrull F, Aguilar C, Calull M. Recent trends in analytical methods and separation techniques for drugs of abuse in hair. *Anal Chim Acta.* 2015;856:1-26. doi:10.1016/j.aca.2014.06.051
24. Vearrier D, Curtis JA, Greenberg MI. Biological testing for drugs of abuse. *EXS.* 2010;100:489-517. doi:10.1007/978-3-7643-8338-1_14
25. Allen KR. Screening for drugs of abuse: Which matrix, oral fluid or urine? *Ann Clin Biochem.* 2011;48(6):531-541. doi:10.1258/acb.2011.011116
26. Trefz P, Kamysek S, Fuchs P, Sukul P, Schubert JK, Miekisch W. Drug detection in breath: non-invasive assessment of illicit or pharmaceutical drugs. *J Breath Res.* 2017;11(2):024001. doi:10.1088/1752-7163/aa61bf
27. R. de Oliveira C, Roehsig M, de Almeida R, Rocha W, Yonamine M. Recent Advances in Chromatographic Methods to Detect Drugs of Abuse in Alternative Biological Matrices. *Curr Pharm Anal.* 2007;3(2):95-109. doi:10.2174/157341207780598931

28. Banta-Green C, Field J. City-wide drug testing using municipal wastewater. *Significance*. 2011;8(2):70-74. doi:10.1111/j.1740-9713.2011.00489.x
29. Bijlsma L, Sancho J V., Hernández F, Niessen WMA. Fragmentation pathways of drugs of abuse and their metabolites based on QTOF MS/MS and MSE accurate-mass spectra. *J Mass Spectrom*. 2011;46(9):865-875. doi:10.1002/jms.1963
30. Bijlsma L, Beltrán E, Boix C, Sancho J V., Hernández F. Improvements in analytical methodology for the determination of frequently consumed illicit drugs in urban wastewater. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406(17):4261-4272. doi:10.1007/s00216-014-7818-4
31. Zuccato E, Chiabrando C, Castiglioni S, Bagnati R, Fanelli R. Estimating community drug abuse by wastewater analysis. *Environ Health Perspect*. 2008;116(8):1027-1032. doi:10.1289/ehp.11022
32. van Nuijs ALN, Mougél J-F, Tarcomnicu I, et al. Sewage epidemiology — A real-time approach to estimate the consumption of illicit drugs in Brussels, Belgium. *Environ Int*. 2011;37(3):612-621. doi:10.1016/j.envint.2010.12.006
33. Thomas K V., Bijlsma L, Castiglioni S, et al. Comparing illicit drug use in 19 European cities through sewage analysis. *Sci Total Environ*. 2012;432:432-439. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.06.069
34. Castiglioni S, Bijlsma L, Covaci A, et al. Evaluation of uncertainties associated with the determination of community drug use through the measurement of sewage drug biomarkers. *Environ Sci Technol*. 2013;47(3):1452-1460. doi:10.1021/es302722f
35. Mathieu C, Rieckermann J, Berset J-D, Schürch S, Brenneisen R. Assessment of total uncertainty in cocaine and benzoylecgonine wastewater load measurements. *Water Res*. 2011;45(20):6650-6660. doi:10.1016/j.watres.2011.09.049

36. Lai FY, Ort C, Gartner C, et al. Refining the estimation of illicit drug consumptions from wastewater analysis: Co-analysis of prescription pharmaceuticals and uncertainty assessment. *Water Res.* 2011;45(15):4437-4448. doi:10.1016/j.watres.2011.05.042
37. Magnusson B, Näykki T, Hovind H, Krysell M. *Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories*. Vol 537. ed. 3. Nordtest; 2012.
38. Albert R, Horwitz W. A Heuristic Derivation of the Horwitz Curve. *Anal Chem.* 1997;69(4):789-790. doi:10.1021/ac9608376

CAPÍTULO 5

Conclusiones

Conclusiones

La espectrometría de masas es, sin duda, una de las herramientas más potentes en el campo de la química analítica, tanto para análisis cuantitativo como cualitativo. Proporciona información veraz y precisa a muy bajas concentraciones. La gran capacidad de identificar compuestos desconocidos asociada a la alta resolución (HRMS) ha dado un nuevo auge a la química analítica cualitativa, aunque, por motivos obvios, siempre será necesario poder cuantificar.

Los problemas asociados a las medidas analíticas son bien conocidos. Deriva instrumental, efecto matriz, falta de selectividad provocada por las interferencias, recuperaciones no cuantitativas o pérdidas de analito durante el proceso de medida química son algunos ejemplos y, en su mayoría, minimizables mediante IDMS. Su uso, ampliamente extendido en química analítica, se basa en la naturaleza multi-isotópica de la mayoría de elementos, que presentan idénticas propiedades químicas, aunque diferente respuesta en el espectrómetro de masas debido a su diferente masa.

La adición a la muestra del compuesto de interés marcado altera la composición isotópica del analito, lo que permite emplear la metodología de cálculo IPD, basada a su vez en la medida de abundancias. Una vez hecha la mezcla, el equilibrio isotópico se alcanza rápidamente en muestras líquidas y la proporción entre compuesto natural y marcado ya no varía. La medida de abundancias es relativa y, por tanto, las posibles pérdidas o etapas no cuantitativas durante el tratamiento de muestra no afectan a la cuantificación. El resultado tampoco está afectado por la deriva instrumental y, en ausencia de efecto isotópico, se corrige el efecto matriz en la medida instrumental.

Cabe resaltar que, mediante IPD, se evita la preparación, el procesamiento y la medida de curva de calibrado. Para cada muestra, una medida instrumental genera un resultado. Se trata pues de un método rápido,

exacto y preciso, el resultado que genera es directamente trazable a la cantidad de materia del SI, el mol, y es considerado como un método de elevada calidad metrológica.

IPD representa una alternativa de cálculo hoy en día infrautilizado, probablemente por la aparente complejidad del cálculo matemático y por la dificultad de encontrar patrones marcados. Los cálculos asociados, en realidad, no son más complejos que los implicados en un ajuste por mínimos cuadrados y son fácilmente automatizables una vez elaboradas las hojas de cálculo. Por otro lado, el trabajo extra de obtener las abundancias de la matriz de referencia y la recertificación de la concentración del patrón marcado es escaso, solo es necesario llevarlas a cabo la primera vez. La tarea de comprobaciones periódicas de su validez no es diferente de la necesaria para los patrones naturales. Una primera observación general es, pues, que siempre que se disponga de patrones marcados, la rapidez y la fiabilidad de los resultados compensa el poco trabajo extra necesario para comenzar.

A modo de conclusión, la presente tesis muestra la extensión de aplicabilidad de la metodología de cálculo de deconvolución de perfiles isotópicos, basada en la espectrometría de masas de dilución isotópica, a muestras de alta complejidad analítica como son orina, suero y aguas residuales.

Además, su desempeño es no solo comparable a los métodos basados en calibrado con patrón interno, sino que en la mayor parte de los casos proporciona mejoras en la exactitud y precisión de los resultados.

Atendiendo a los artículos científicos presentados como parte de los capítulos anteriores, se extraen las siguientes conclusiones específicas:

1. El estudio de las incertidumbres asociadas a la determinación de testosterona en 6 muestras de orina mediante distintos métodos de cuantificación indica una similitud de resultados entre IPD y calibrado ponderado, siendo sus incertidumbres menores que en

calibrado no ponderado. Similares resultados se obtuvieron mediante un ejercicio inter-laboratorio, siendo IPD el método con menor incertidumbre.

2. Los parámetros que más contribuyen a la incertidumbre analítica en calibrado con patrón interno son los parámetros de regresión (pendiente y ordenada en el origen), mientras que en IPD es el volumen de disolución de patrón interno, cuya incertidumbre puede reducirse mediante adiciones gravimétricas.
3. La metodología IPD se amplió satisfactoriamente a los cuatro principales esteroides androgénicos endógenos, con LOQs por debajo de los niveles habituales en adultos e incertidumbres combinadas por debajo de los límites requeridos por la WADA, excepto para la androsterona.
4. En algunas ocasiones, los estándares adquiridos para su uso en laboratorio presentan certificaciones inadecuadas, incompletas o erróneas. Es necesario re-certificar dichos estándares frente a materiales de referencia certificados. IPD y RID se han mostrado como herramientas rápidas y fiables para esta finalidad.
5. Toda disolución estándar utilizada en estudios de cuantificación, y en especial en IPD, ha de ser comprobada y re-certificada periódicamente frente a materiales de referencia. De esta manera se pueden detectar posibles degradaciones del estándar, así como corregir la evaporación de disolventes.
6. La cuantificación por IPD se aplicó por primera vez a muestras de suero para la determinación de estrógenos, proporcionando resultados comparables a los de calibrado con patrón interno y cumpliendo con la guía de validación de la EMEA.
7. La comparación de ambos métodos basados en LC-MS/MS (calibrado e IPD) presenta una correlación correcta. Sin embargo,

en la comparación de éstos frente a técnicas de inmunoensayo se observaron desviaciones en los resultados, en concordancia con la creciente preocupación de reevaluar dichas técnicas.

8. Se aplicó por primera vez IPD a muestras de aguas residuales para la determinación de drogas de abuso bajo el marco de la epidemiología basada en aguas residuales, proporcionando características analíticas adecuadas según las referencias habituales de precisión y exactitud, además de validarse mediante un ejercicio inter-laboratorio.
9. El estudio de resultados de análisis de muestras de control de calidad mostró un menor número de valores anómalos al cuantificar con IPD que al emplear calibrado con patrón interno, en igualdad de tratamiento de muestra y separación cromatográfica.

Trabajos futuros

Como se ha visto, la aplicación de IPD a muestras de muy diferente naturaleza supone una alternativa a los métodos convencionales basados en calibrado, con la ventaja de su rapidez y coste reducido. Sin embargo, los métodos presentados son tan solo algunas de las ideas consideradas durante la elaboración de esta tesis. IPD es una herramienta potente y versátil que podría ser empleada en el futuro en muchos otros campos. A continuación, se presentan una serie de líneas de trabajo y de mejoras de las presentadas aquí que podrían constituir el futuro desarrollo de la metodología IPD:

- Aplicación de IPD a la determinación directa de glucurónidos de esteroides, reduciendo el tratamiento de muestra a la técnica de dilución e inyección (*dilute-and-shoot*) y permitiendo la determinación de los dioles no ionizables de forma libre mediante interfase ESI en LC-MS/MS. Utilización de IPD para estudios longitudinales acordes al pasaporte biológico (ABP).
- Determinación de metabolitos de vitamina D en suero mediante IPD, incluyendo aquellos de especial interés para aplicaciones clínicas y de diagnóstico.
- Ampliación del método IPD desarrollado para la determinación de drogas en aguas residuales a un abanico más amplio de drogas de abuso, incluyendo cannabis (mediante el metabolito THC-COOH), morfina y heroína, entre otros.
- Cuantificación por IPD de las nuevas sustancias psicoactivas detectadas en aguas residuales durante la monitorización mediante estudios no dirigidos.
- Estudiar la posibilidad de aplicación de IPD en equipos de espectrometría de masas de alta resolución (Q-TOF u otros) para distintas aplicaciones y tipos de compuestos y/o analitos.

Artículos científicos relacionados

Pitarch-Motellón J., Roig-Navarro A.F., Sancho J.V., Ibáñez M., Fabregat-Cabello N., Pozo O.J., Ventura R., García Alonso J.I., Rodríguez-González P., González Gago A., Ereño Artabe A., Van Eenoo P., Deventer K., Dehnes Y., Rzeppa S., 2017. *Evaluation of uncertainty sources in the determination of testosterone in urine by calibration-based and isotope dilution quantification using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1508: 73-80.

Pitarch-Motellón J., Sancho J.V., Ibáñez M., Pozo O., Roig-Navarro A.F., 2017. *Determination of selected endogenous anabolic androgenic steroids and ratios in urine by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and isotope pattern deconvolution*. Journal of Chromatography A, 1515: 172-178.

Pitarch-Motellón J., Roig-Navarro A.F., Le Goff C., Cavalier E., Favregat-Cabello N., 2019. *Re-certification of hydroxyvitamin D standards by isotope pattern deconvolution*. Journal of Chromatography B, 1120: 89-94.

Pitarch-Motellón J., Fabregat-Cabello N., Le Goff C., Roig-Navarro A.F., Sancho-Llopis J.V., Cavalier E., 2019. *Comparison of isotope pattern deconvolution and calibration curve quantification for the determination of estrone and 17 β -estradiol in human serum*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 171: 164-170.

Pitarch-Motellón J., Bijlsma L., Sancho-Llopis J.V., Roig-Navarro A.F. *Isotope Pattern Deconvolution as an alternative to calibration curve for application in wastewater-based epidemiology (En revisión)*.

Otros artículos

Fabregat-Cabello N., Pitarch-Motellón J., Sancho J.V., Ibáñez M., Roig-Navarro A.F., 2016. *Method development and validation for the determination of selected endocrine disrupting compounds by liquid chromatography mass spectrometry and isotope pattern deconvolution in water samples. Comparison of two extraction techniques.* Analytical Methods, 8: 2895-2903.

Ereño Artabe A., González Gago A., Suarez Fernández A., Pitarch-Motellón J., Roig-Navarro A.F., Pozo O.J., Rodríguez-González P., García Alonso J.I., 2019. *Isotope dilution LC-ESI-MS/MS and low resolution selected reaction monitoring as a tool for the accurate quantification of urinary testosterone.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 163: 113-121.

Agradecimientos

Por encima de todo, quiero dar las gracias al Dr. Antoni Francesc Roig i Navarro y al Dr. Juan Vicente Sancho Llopis por dirigir esta tesis, por sus extensos conocimientos y la ayuda recibida durante estos años de formación. No habría sido posible sin vosotros.

A la Dra. Neus Fabregat Cabello por dar forma a mi figura de investigador, por enseñarme a trabajar dura, correcta y sistemáticamente, por destrozarme las presentaciones y escritos, y por ayudarme más que nadie desde mis inicios durante el máster hasta la estancia en Lieja. Sin ti tampoco habría llegado hasta aquí.

Quiero dar las gracias también a todo el equipo del Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas (IUPA) por acogerme y acompañarme en este periodo. Profesorado, personal técnico, compañeros de becaría, de tesis, de laboratorio o de sala de café. Gracias por darme vuestro *feedback* a mis “preguntas tontas” y quebraderos de cabeza. Gracias a todos por vuestra compañía, y en especial a David por su paciencia, visión crítica y discusiones locas con una cerveza entre manos.

I would like to thank all the support received from the Liege Hospital's staff during my three-month stay in Belgium. Special thanks to Dr. Etienne Cavalier and Caroline Le Goff for having me in the laboratory and for building such a nice and friendly environment. Merci beaucoup!

Antoni Francesc Roig Navarro, como coautor/ coautora doy mi **autorización** a **Jorge Pitarch Motellón** para la presentación de las siguientes publicaciones como parte de su tesis doctoral.

Relación de publicaciones:

Evaluation of uncertainty sources in the determination of testosterone in urine by calibration-based and isotope dilution quantification using ultra high performance tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1506 (2017) 73-80

Determination of selected endogenous anabolic androgenic steroids and ratios in urine by UHPLC-MS/MS and isotope pattern deconvolution. Journal of Chromatography A, 1515 (2017) 172-178

Re-certification of hydroxyvitamin D standards by isotope pattern deconvolution, Journal of Chromatography B, 1120 (2019) 89-94

Comparison of isotope pattern deconvolution and calibration curve quantification methods for the determination of estrone and 17 β -estradiol in human serum, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 171 (2019) 164-170

Isotope Pattern Deconvolution as an alternative to calibration curve for application in wastewater-based epidemiology (en preparación)

Asimismo, **renuncio** a poder utilizar estas publicaciones como parte de otra tesis doctoral.

Y para que conste firmo el presente documento,

Castelló de la Plana, 22 de setembre de 2020

ANTONI FRANCESC ROIG NAVARRO - NIF: 29017437Q

Digitally signed by ANTONI FRANCESC ROIG NAVARRO - NIF:29017437Q
DN: CN=ANTONI FRANCESC ROIG NAVARRO - NIF:29017437Q, SERIALNUMBER=29017437Q, O=ANTONI FRANCESC, SN=ROIG NAVARRO, OU=Ciudadanos, OuACCV, C=ES
Reason: I agree to the terms defined by the placement of my signature in this document
Location: your signing location here
Date: 2020.09.22 10:33:08
Foxit Reader Version: 10.0.1

Todo ello, atendiendo al artículo 23 de la Normativa de los Estudios de Doctorado, regulados por el RD 99/2011, en la Universitat Jaume I (Aprobada por el Consejo de Gobierno núm. 19 de 26 de Enero de 2012, modificada por el Consejo de Gobierno núm. 29 de 27 de Noviembre de 2012 y con posterior modificación por el Consejo de Gobierno núm. 37 de 25 de Julio de 2013):

“(…)”
“*Aquellas tesis doctorales que opten por la incorporación de artículos (compendio de publicaciones) deben de ajustarse, en la medida de lo posible, a la siguiente estructura: -Introducción/objetivos - Un capítulo por artículo incorporado - Discusión general de los resultados - Conclusiones. -Aceptación de los coautores de que el doctorando presente el trabajo como tesis y renuncia expresa de estos a presentarlo como parte de otra tesis doctoral.*”

Juan Vicente Sancho Llopis, como coautor/ coautora doy mi **autorización a Jorge Pitarch Motellón** para la presentación de las siguientes publicaciones como parte de su tesis doctoral.

Relación de publicaciones:

Evaluation of uncertainty sources in the determination of testosterone in urine by calibration-based and isotope dilution quantification using ultra high performance tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1506 (2017) 73-80

Determination of selected endogenous anabolic androgenic steroids and ratios in urine by UHPLC-MS/MS and isotope pattern deconvolution. Journal of Chromatography A, 1515 (2017) 172-178

Comparison of isotope pattern deconvolution and calibration curve quantification methods for the determination of estrone and 17 β -estradiol in human serum, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 171 (2019) 164-170

Isotope Pattern Deconvolution as an alternative to calibration curve for application in wastewater-based epidemiology (en preparación)

Asimismo, **renuncio** a poder utilizar estas publicaciones como parte de otra tesis doctoral.

Y para que conste firmo el presente documento,

Castelló, 22 de septiembre de 2020

Lugar, fecha y firma

JUAN VICENTE
SANCHO|
LLOPIS

Firmado digitalmente
por JUAN VICENTE|
SANCHO|LLOPIS
Fecha: 2020.09.22
09:05:42 +02'00'

Todo ello, atendiendo al artículo 23 de la Normativa de los Estudios de Doctorado, regulados por el RD 99/2011, en la Universitat Jaume I (Aprobada por el Consejo de Gobierno núm. 19 de 26 de Enero de 2012, modificada por el Consejo de Gobierno núm. 29 de 27 de Noviembre de 2012 y con posterior modificación por el Consejo de Gobierno núm. 37 de 25 de Julio de 2013):

"(...)
"Aquellas tesis doctorales que opten por la incorporación de artículos (compendio de publicaciones) deben de ajustarse, en la medida de lo posible, a la siguiente estructura: -Introducción/objetivos - Un capítulo por artículo incorporado - Discusión general de los resultados - Conclusiones. -Aceptación de los coautores de que el doctorando presente el trabajo como tesis y renuncia expresa de estos a presentarlo como parte de otra tesis doctoral."

Adriana González Gago, como coautor/ coautora doy mi **autorización** a **Jorge Pitarch Motellón** para la presentación de las siguientes publicaciones como parte de su tesis doctoral.

Relación de publicaciones:

Evaluation of uncertainty sources in the determination of testosterone in urine by calibration-based and isotope dilution quantification using ultra high performance tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1506 (2017) 73-80

Asimismo, **renuncio** a poder utilizar estas publicaciones como parte de otra tesis doctoral.

Y para que conste firmo el presente documento,

Oviedo, 24 de junio de 2020



Adriana González Gago

Todo ello, atendiendo al artículo 23 de la Normativa de los Estudios de Doctorado, regulados por el RD 99/2011, en la Universitat Jaume I (Aprobada por el Consejo de Gobierno núm. 19 de 26 de Enero de 2012, modificada por el Consejo de Gobierno núm. 29 de 27 de Noviembre de 2012 y con posterior modificación por el Consejo de Gobierno núm. 37 de 25 de Julio de 2013):

“(…)

“Aquellas tesis doctorales que opten por la incorporación de artículos (compendio de publicaciones) deben de ajustarse, en la medida de lo posible, a la siguiente estructura: -Introducción/objetivos - Un capítulo por artículo incorporado - Discusión general de los resultados - Conclusiones. -Aceptación de los coautores de que el doctorando presente el trabajo como tesis y renuncia expresa de estos a presentarlo como parte de otra tesis doctoral.”

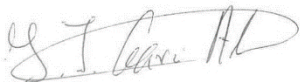
Jose Ignacio García Alonso, como coautor/ coautora doy mi **autorización** a **Jorge Pitarch Motellón** para la presentación de las siguientes publicaciones como parte de su tesis doctoral.

Relación de publicaciones:

Evaluation of uncertainty sources in the determination of testosterone in urine by calibration-based and isotope dilution quantification using ultra high performance tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1506 (2017) 73-80

Asimismo, **renuncio** a poder utilizar estas publicaciones como parte de otra tesis doctoral.

Y para que conste firmo el presente documento,



Oviedo, 24 de Junio de 2020

Todo ello, atendiendo al artículo 23 de la Normativa de los Estudios de Doctorado, regulados por el RD 99/2011, en la Universitat Jaume I (Aprobada por el Consejo de Gobierno núm. 19 de 26 de Enero de 2012, modificada por el Consejo de Gobierno núm. 29 de 27 de Noviembre de 2012 y con posterior modificación por el Consejo de Gobierno núm. 37 de 25 de Julio de 2013):

(...)
"Aquellas tesis doctorales que opten por la incorporación de artículos (compendio de publicaciones) deben de ajustarse, en la medida de lo posible, a la siguiente estructura: -Introducción/objetivos - Un capítulo por artículo incorporado - Discusión general de los resultados - Conclusiones. -Aceptación de los coautores de que el doctorando presente el trabajo como tesis y renuncia expresa de estos a presentarlo como parte de otra tesis doctoral."

Lubertus Bijlsma, como coautor/ coautora doy mi **autorización** a **Jorge Pitarch Motellón** para la presentación de las siguientes publicaciones como parte de su tesis doctoral.

Relación de publicaciones:

Isotope Pattern Deconvolution as an alternative to calibration curve for application in wastewater-based epidemiology (en preparación)

Asimismo, **renuncio** a poder utilizar estas publicaciones como parte de otra tesis doctoral.

Y para que conste firmo el presente documento,



Castellón, 22 septiembre 2020

Todo ello, atendiendo al artículo 23 de la Normativa de los Estudios de Doctorado, regulados por el RD 99/2011, en la Universitat Jaume I (Aprobada por el Consejo de Gobierno núm. 19 de 26 de Enero de 2012, modificada por el Consejo de Gobierno núm. 29 de 27 de Noviembre de 2012 y con posterior modificación por el Consejo de Gobierno núm. 37 de 25 de Julio de 2013):

(...)
"Aquellas tesis doctorales que opten por la incorporación de artículos (compendio de publicaciones) deben de ajustarse, en la medida de lo posible, a la siguiente estructura: -Introducción/objetivos - Un capítulo por artículo incorporado - Discusión general de los resultados - Conclusiones. -Aceptación de los coautores de que el doctorando presente el trabajo como tesis y renuncia expresa de estos a presentarlo como parte de otra tesis doctoral."

María Ibáñez Martínez, como coautor/ coautora doy mi **autorización** a **Jorge Pítarh Motellón** para la presentación de las siguientes publicaciones como parte de su tesis doctoral.

Relación de publicaciones:

Evaluation of uncertainty sources in the determination of testosterone in urine by calibration-based and isotope dilution quantification using ultra high performance tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1506 (2017) 73-80

Determination of selected endogenous anabolic androgenic steroids and ratios in urine by UHPLC-MS/MS and isotope pattern deconvolution. Journal of Chromatography A, 1515 (2017) 172-178

Asimismo, **renuncio** a poder utilizar estas publicaciones como parte de otra tesis doctoral.

Y para que conste firmo el presente documento,



Lugar, fecha y firma

Castello, 1/7/2020

Todo ello, atendiendo al artículo 23 de la Normativa de los Estudios de Doctorado, regulados por el RD 99/2011, en la Universitat Jaume I (Aprobada por el Consejo de Gobierno núm. 19 de 26 de Enero de 2012, modificada por el Consejo de Gobierno núm. 29 de 27 de Noviembre de 2012 y con posterior modificación por el Consejo de Gobierno núm. 37 de 25 de Julio de 2013):

"(...)

"Aquellas tesis doctorales que opten por la incorporación de artículos (compendio de publicaciones) deben de ajustarse, en la medida de lo posible, a la siguiente estructura: -Introducción/objetivos - Un capítulo por artículo incorporado - Discusión general de los resultados - Conclusiones. -Aceptación de los coautores de que el doctorando presente el trabajo como tesis y renuncia expresa de estos a presentarlo como parte de otra tesis doctoral."

Neus Fabregat Cabello, como coautor/ coautora doy mi **autorización** a **Jorge Pitarch Motellón** para la presentación de las siguientes publicaciones como parte de su tesis doctoral.

Relación de publicaciones:

Evaluation of uncertainty sources in the determination of testosterone in urine by calibration-based and isotope dilution quantification using ultra high performance tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1506 (2017) 73-80

Re-certification of hydroxyvitamin D standards by isotope pattern deconvolution. Journal of Chromatography B, 1120 (2019) 89-94

Comparison of isotope pattern deconvolution and calibration curve quantification methods for the determination of estrone and 17 β -estradiol in human serum. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 171 (2019) 164-170

Asimismo, **renuncio** a poder utilizar estas publicaciones como parte de otra tesis doctoral.

Y para que conste firmo el presente documento,

Lugar, fecha y firma

En Castellón, a 29 de Junio 2020.



Todo ello, atendiendo al artículo 23 de la Normativa de los Estudios de Doctorado, regulados por el RD 99/2011, en la Universitat Jaume I (Aprobada por el Consejo de Gobierno núm. 19 de 26 de Enero de 2012, modificada por el Consejo de Gobierno núm. 29 de 27 de Noviembre de 2012 y con posterior modificación por el Consejo de Gobierno núm. 37 de 25 de Julio de 2013):

(...)

"Aquellas tesis doctorales que opten por la incorporación de artículos (compendio de publicaciones) deben de ajustarse, en la medida de lo posible, a la siguiente estructura: -Introducción/objetivos - Un capítulo por artículo incorporado - Discusión general de los resultados - Conclusiones. -Aceptación de los coautores de que el doctorando presente el trabajo como tesis y renuncia expresa de estos a presentarlo como parte de otra tesis doctoral."

Óscar Pozo Mendoza, como coautor doy mi **autorización** a **Jorge Pitarch Motellón** para la presentación de las siguientes publicaciones como parte de su tesis doctoral.

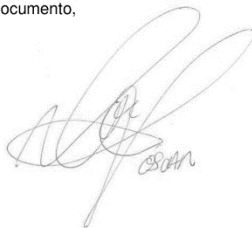
Relación de publicaciones:

Evaluation of uncertainty sources in the determination of testosterone in urine by calibration-based and isotope dilution quantification using ultra high performance tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1506 (2017) 73-80

Determination of selected endogenous anabolic androgenic steroids and ratios in urine by UHPLC-MS/MS and isotope pattern deconvolution. Journal of Chromatography A, 1515 (2017) 172-178

Asimismo, **renuncio** a poder utilizar estas publicaciones como parte de otra tesis doctoral.

Y para que conste firmo el presente documento,



Lugar, fecha y firma

Barcelona, 23 de junio de 2020

Todo ello, atendiendo al artículo 23 de la Normativa de los Estudios de Doctorado, regulados por el RD 99/2011, en la Universitat Jaume I (Aprobada por el Consejo de Gobierno núm. 19 de 26 de Enero de 2012, modificada por el Consejo de Gobierno núm. 29 de 27 de Noviembre de 2012 y con posterior modificación por el Consejo de Gobierno núm. 37 de 25 de Julio de 2013):

"(...)

"Aquellas tesis doctorales que opten por la incorporación de artículos (compendio de publicaciones) deben de ajustarse, en la medida de lo posible, a la siguiente estructura: -Introducción/objetivos - Un capítulo por artículo incorporado - Discusión general de los resultados - Conclusiones. -Aceptación de los coautores de que el doctorando presente el trabajo como tesis y renuncia expresa de estos a presentarlo como parte de otra tesis doctoral."

Pablo Rodríguez González, como coautor/ coautora doy mi **autorización a Jorge Pitarch Motellón** para la presentación de las siguientes publicaciones como parte de su tesis doctoral.

Relación de publicaciones:

Evaluation of uncertainty sources in the determination of testosterone in urine by calibration-based and isotope dilution quantification using ultra high performance tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1506 (2017) 73-80

Asimismo, **renuncio** a poder utilizar estas publicaciones como parte de otra tesis doctoral.

Y para que conste firmo el presente documento,

Lugar, fecha y firma

Oviedo, 24 de Junio de 2020



Todo ello, atendiendo al artículo 23 de la Normativa de los Estudios de Doctorado, regulados por el RD 99/2011, en la Universitat Jaume I (Aprobada por el Consejo de Gobierno núm. 19 de 26 de Enero de 2012, modificada por el Consejo de Gobierno núm. 29 de 27 de Noviembre de 2012 y con posterior modificación por el Consejo de Gobierno núm. 37 de 25 de Julio de 2013):

*"(...)
"Aquellas tesis doctorales que opten por la incorporación de artículos (compendio de publicaciones) deben de ajustarse, en la medida de lo posible, a la siguiente estructura: -Introducción/objetivos - Un capítulo por artículo incorporado - Discusión general de los resultados - Conclusiones. -Aceptación de los coautores de que el doctorando presente el trabajo como tesis y renuncia expresa de estos a presentarlo como parte de otra tesis doctoral."*

Liège, 24 th june 2020

I, **Caroline Le Goff**, hereby authorise **Jorge Pitarch Motellón** to include the publications listed below in his/her doctoral thesis. In addition, I waive the right to use those articles as part of any other doctoral thesis.

List of articles:

Re-certification of hydroxyvitamin D standards by isotope pattern deconvolution. Journal of Chromatography B, 1120 (2019) 89-94

Comparison of isotope pattern deconvolution and calibration curve quantification methods for the determination of estrone and 17 β -estradiol in human serum. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 171 (2019) 164-170

Signed,



In accordance with article 23 of the Regulation of Doctoral Studies, regulated by RD 99/2011, at the Universitat Jaume I (Approved by the Governing Council No. 19 of January 26, 2012, modified by the Governing Council no. 29 of November 27, 2012 and subsequent amendment by the Governing Council No. 37 of July 25, 2013): "[...] Those doctoral theses that opt for the incorporation of articles (compendium of publications) must include..... the acceptance of the co-authors of the publications that have waived the right to present them as a part of another PhD thesis"

Place, day,
month, year

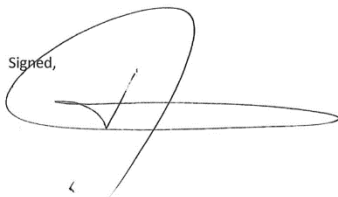
I, **Etienne Cavalier**, hereby authorise **Jorge Pitarch Motellón** to include the publications listed below in his/her doctoral thesis. In addition, I waive the right to use those articles as part of any other doctoral thesis.

List of articles:

Re-certification of hydroxyvitamin D standards by isotope pattern deconvolution. Journal of Chromatography B, 1120 (2019) 89-94

Comparison of isotope pattern deconvolution and calibration curve quantification methods for the determination of estrone and 17 β -estradiol in human serum. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 171 (2019) 164-170

Signed,



**CENTRE HOSPITALIER
UNIVERSITAIRE DE LIEGE**
Prof. E. CAVALIER
Service de Chimie Clinique
4000 Liège - Belgique
24.6.2020

In accordance with article 23 of the Regulation of Doctoral Studies, regulated by RD 99/2011, at the Universitat Jaume I (Approved by the Governing Council No. 19 of January 26, 2012, modified by the Governing Council no. 29 of November 27, 2012 and subsequent amendment by the Governing Council No. 37 of July 25, 2013): "(...) "Those doctoral theses that opt for the incorporation of articles (compendium of publications) must include..... the acceptance of the co-authors of the publications that have waived the right to present them as a part of another PhD thesis"

Ghent, Tuesday,

23th of June, 2020

I, **Koen Deventer**, hereby authorise **Jorge Pitarch Motellón** to include the publications listed below in his/her doctoral thesis. In addition, I waive the right to use those articles as part of any other doctoral thesis.

List of articles:

Evaluation of uncertainty sources in the determination of testosterone in urine by calibration-based and isotope dilution quantification using ultra high performance tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1506 (2017) 73-80

Signed,



In accordance with article 23 of the Regulation of Doctoral Studies, regulated by RD 99/2011, at the Universitat Jaume I (Approved by the Governing Council No. 19 of January 26, 2012, modified by the Governing Council no. 29 of November 27, 2012 and subsequent amendment by the Governing Council No. 37 of July 25, 2013): "(...) "Those doctoral theses that opt for the incorporation of articles (compendium of publications) must include..... the acceptance of the co-authors of the publications that have waived the right to present them as a part of another PhD thesis"

Zwijnaarde, 25-06-2020

I, **Peter Van Eenoo**, hereby authorise **Jorge Pitarch Motellón** to include the publications listed below in his/her doctoral thesis. In addition, I waive the right to use those articles as part of any other doctoral thesis.

List of articles:

Evaluation of uncertainty sources in the determination of testosterone in urine by calibration-based and isotope dilution quantification using ultra high performance tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1506 (2017) 73-80

Signed,



Prof. Dr. ir. P. VAN EENOO

In accordance with article 23 of the Regulation of Doctoral Studies, regulated by RD 99/2011, at the Universitat Jaume I (Approved by the Governing Council No. 19 of January 26, 2012, modified by the Governing Council no. 29 of November 27, 2012 and subsequent amendment by the Governing Council No. 37 of July 25, 2013): "(...) Those doctoral theses that opt for the incorporation of articles (compendium of publications) must include..... the acceptance of the co-authors of the publications that have waived the right to present them as a part of another PhD thesis"

Oslo, July 6th 2020

I, **Yvette Dehnes**, hereby authorise **Jorge Pitarch Motellón** to include the publications listed below in his/her doctoral thesis. In addition, I waive the right to use those articles as part of any other doctoral thesis.

List of articles:

Evaluation of uncertainty sources in the determination of testosterone in urine by calibration-based and isotope dilution quantification using ultra high performance tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 1506 (2017) 73-80

Signed,



In accordance with article 23 of the Regulation of Doctoral Studies, regulated by RD 99/2011, at the Universitat Jaume I (Approved by the Governing Council No. 19 of January 26, 2012, modified by the Governing Council no. 29 of November 27, 2012 and subsequent amendment by the Governing Council No. 37 of July 25, 2013): "(...) "Those doctoral theses that opt for the incorporation of articles (compendium of publications) must include..... the acceptance of the co-authors of the publications that have waived the right to present them as a part of another PhD thesis"

Dortmund,

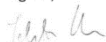
23.09.2020

I, **Sebastian Rzeppa**, hereby authorise **Jorge Pitarch Motellón** to include the publications listed below in his/her doctoral thesis. In addition, I waive the right to use those articles as part of any other doctoral thesis.

List of articles:

Evaluation of uncertainty sources in the determination of testosterone in urine by calibration-based and isotope dilution quantification using ultra high performance tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1506 (2017) 73-80

Signed,



In accordance with article 23 of the Regulation of Doctoral Studies, regulated by RD 99/2011, at the Universitat Jaume I (Approved by the Governing Council No. 19 of January 26, 2012, modified by the Governing Council no. 29 of November 27, 2012 and subsequent amendment by the Governing Council No. 37 of July 25, 2013):“(…) “Those doctoral theses that opt for the incorporation of articles (compendium of publications) must include……… the acceptance of the co-authors of the publications that have waived the right to present them as a part of another PhD thesis”

Rosa Ventura, como coautor/ coautora doy mi **autorización** a **Jorge Pitarch Motellón** para la presentación de las siguientes publicaciones como parte de su tesis doctoral.

Relación de publicaciones:

Evaluation of uncertainty sources in the determination of testosterone in urine by calibration-based and isotope dilution quantification using ultra high performance tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1506 (2017) 73-80

Asimismo, **renuncio** a poder utilizar estas publicaciones como parte de otra tesis doctoral.

Y para que conste firmo el presente documento,



Lugar, fecha y firma
Barcelona, 24 de septiembre de 2020

Todo ello, atendiendo al artículo 23 de la Normativa de los Estudios de Doctorado, regulados por el RD 99/2011, en la Universitat Jaume I (Aprobada por el Consejo de Gobierno núm. 19 de 26 de Enero de 2012, modificada por el Consejo de Gobierno núm. 29 de 27 de Noviembre de 2012 y con posterior modificación por el Consejo de Gobierno núm. 37 de 25 de Julio de 2013):

"(...)
"A aquellas tesis doctorales que opten por la incorporación de artículos (compendio de publicaciones) deben de ajustarse, en la medida de lo posible, a la siguiente estructura: -Introducción/objetivos - Un capítulo por artículo incorporado - Discusión general de los resultados - Conclusiones. -Aceptación de los coautores de que el doctorando presente el trabajo como tesis y renuncia expresa de estos a presentarlo como parte de otra tesis doctoral."

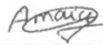
Amaia Ereño Artabe, como coautor/ coautora doy mi **autorización a Jorge Pitarch Motellón** para la presentación de las siguientes publicaciones como parte de su tesis doctoral.

Relación de publicaciones:

Evaluation of uncertainty sources in the determination of testosterone in urine by calibration-based and isotope dilution quantification using ultra high performance tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1506 (2017) 73-80

Asimismo, **renuncio** a poder utilizar estas publicaciones como parte de otra tesis doctoral.

Y para que conste firmo el presente documento,



28 de septiembre de 2020

Todo ello, atendiendo al artículo 23 de la Normativa de los Estudios de Doctorado, regulados por el RD 99/2011, en la Universitat Jaume I (Aprobada por el Consejo de Gobierno núm. 19 de 26 de Enero de 2012, modificada por el Consejo de Gobierno núm. 29 de 27 de Noviembre de 2012 y con posterior modificación por el Consejo de Gobierno núm. 37 de 25 de Julio de 2013):

“(…)
“Aquellas tesis doctorales que opten por la incorporación de artículos (compendio de publicaciones) deben de ajustarse, en la medida de lo posible, a la siguiente estructura: -Introducción/objetivos - Un capítulo por artículo incorporado - Discusión general de los resultados - Conclusiones. -Aceptación de los coautores de que el doctorando presente el trabajo como tesis y renuncia expresa de estos a presentarlo como parte de otra tesis doctoral.”