



## TESIS DOCTORAL

---

**Desarrollo de métodos cromatográficos de alta resolución para el estudio y cuantificación de folatos, pteridinas y biomarcadores del riesgo a la exposición de contaminantes ambientales, en fluidos biológicos y alimentos**

Programa de Doctorado en  
Modelización y Experimentación en Ciencia y Tecnología

Memoria para optar al Grado de Doctora en Química  
con Mención Internacional

**Elísabet Martín Tornero  
2018**





## TESIS DOCTORAL

---

**Desarrollo de métodos cromatográficos de alta resolución para el estudio y cuantificación de folatos, pteridinas y biomarcadores del riesgo a la exposición de contaminantes ambientales, en fluidos biológicos y alimentos**

Programa de Doctorado en  
Modelización y Experimentación en Ciencia y Tecnología

**Elísabet Martín Tornero**

Conformidad de los directores:

Anunciación Espinosa Mansilla  
Catedrática de Universidad  
Departamento de Química Analítica  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Extremadura

Isabel Durán Martín-Merás  
Catedrática de Universidad  
Departamento de Química Analítica  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Extremadura

**2018**





## Agradecimientos

- Ministerio de Economía y Competitividad y Fondo Social Europeo. Ayuda para contratos predoctorales para la formación de doctores (FPI). Resolución de 5 de junio de 2015, de la Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación. BOE nº 140, de 12 de junio de 2015. (REF. BES-2015-075407).
- Ministerio de Economía y Competitividad. Proyecto de investigación. Resolución de 1 de agosto de 2014, de la Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación. BOE nº 192, de 8 de agosto de 2014. (REF. CTQ2014-52309-P). Cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional.
- Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Proyecto de investigación. Resolución de la Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación y de la Presidencia de la Agencia Estatal de Investigación. BOE nº 140, de 13 de junio de 2017. (REF. CTQ2017-82496-P). Cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional.
- Junta de Extremadura y Fondo Europeo de Desarrollo Regional. Ayuda a Grupos de Investigación. Consejería de Economía, Competitividad e Innovación. Decreto 279/2014, de 30 de diciembre de 2014. DOE nº 6, de 12 de enero de 2015. (REF. GR15090-Grupo de Investigación FQM003). Cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional.
- Junta de Extremadura y Fondo Europeo de Desarrollo Regional. Ayuda a Grupos de Investigación. Consejería de Economía, Competitividad e Innovación. Decreto 14/2018, de 6 de febrero de 2018. DOE nº 30, de 12 de febrero de 2018. (REF. GR18041-Grupo de Investigación FQM003). Cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional.
- Junta de Extremadura y Fondo Europeo de Desarrollo Regional. Proyecto de investigación. Consejería de economía e infraestructuras. Decreto 68/2016, de 31 de mayo de 2016. DOE nº 107, de 6 de junio de 2016. (REF. IB16058 y REF. IB16022). Cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional.

Fondo Europeo de  
Desarrollo Regional  
"Una manera de hacer Europa"



# Índice

<b>RESUMEN</b>	1
<b>SUMMARY</b>	5
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	9
1. Las tecnologías ómicas	11
2. La metabolómica	12
3. Biomarcadores	16
4. El proceso analítico en metabolómica	19
5. Bibliografía	22
<b>PARTE I. OPTIMIZACIÓN DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE PTERIDINAS</b>	27
<b>1. Introducción</b>	29
1.1. Estructura química de las pteridinas	31
1.2. Características físico-químicas de las pteridinas	33
1.3. Biosíntesis de pteridinas	36
1.4. Actividad e importancia de las pteridinas	38
1.5. Análisis de pteridinas en fluidos biológicos	42
1.6. Pteridinas como precursores de folatos en tejidos vegetales. Concepto de biofortificación	52
1.7. Métodos cromatográficos para el análisis de pteridinas en alimentos vegetales	55
1.8. Bibliografía	58
<b>2. Desarrollo de un método mediante HPLC-ESI-MS para la determinación de pteridinas en orina humana</b>	69
<b>3. Desarrollo de un método HPLC-MS para la determinación de pteridinas en muestras de tomate</b>	93
<b>4. Determinación mediante HPLC-FSFD de pteridinas marcadoras en suero humano</b>	109

<b>PARTE II. ESTUDIO FOTOQUÍMICO DE FOLATOS. DETERMINACIÓN DE FOLATOS MEDIANTE FLUORESCENCIA FOTOINDUCIDA</b>	129
<b>1. Introducción</b>	131
1.1. Estructura química de los folatos	133
1.2. Características físico-químicas de los folatos	135
1.3. Folatos naturales en alimentos	139
1.4. Absorción y transporte de folatos	141
1.5. Biodisponibilidad	143
1.6. Actividad e importancia de folatos en la salud humana	145
1.7. Análisis de folatos	147
1.8. Fluorescencia fotoinducida	155
1.9. La fotoquímica de los folatos	157
1.10. Bibliografía	158
<b>2. Estudios de fotoirradiación de folatos. Efecto de la radiación UV en sus propiedades fluorescentes</b>	169
<b>3. Análisis de ácido fólico y sus metabolitos en diversas matrices mediante HPLC con detección fluorescente previa foto-derivatización post-columna en línea</b>	213
 <b>PARTE III. ANÁLISIS DE MARCADORES DEL RIESGO A LA EXPOSICIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS</b>	 237
<b>1. Introducción</b>	239
1.1. Estructura química de los hidrocarburos aromáticos policíclicos	241
1.2. Características físico-químicas de los hidrocarburos aromáticos policíclicos	242
1.3. Fuentes de hidrocarburos aromáticos policíclicos	243
1.4. Toxicidad y riesgo a la exposición	244
1.5. Biomarcadores de exposición a los hidrocarburos aromáticos policíclicos	245
1.6. Análisis de metabolitos de los hidrocarburos aromáticos policíclicos	248
1.7. Análisis multivariante como herramienta analítica	252
1.8. Bibliografía	261

<b>2. Determinación de los metabolitos del fenantreno en leche materna y leche de vaca mediante combinación de datos cromatográficos de segundo orden y calibración multivariante</b>	269
<b>CONCLUSIONES</b>	291
<b>CONCLUSIONS</b>	297
<b>ANEXOS</b>	301
<b>Anexo 1. Estructuras</b>	303
<b>Anexo 2. Materiales, instrumentación y programas informáticos</b>	309
<b>Anexo 3. Artículos publicados</b>	317

## Abreviaturas y acrónimos

<b>AF</b>	ácido fólico (folic acid)
<b>BIO</b>	6-biopterin (6-biopterin)
<b>7BIO</b>	7-biopterin (7-biopterin)
<b>BIOPAHs</b>	metabolitos de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (polycyclic aromatic hydrocarbons metabolites)
<b>BH2</b>	7,8-dihidrobiopterin (7,8-dihydrobiopterin)
<b>CE</b>	electroforesis capilar (capilar electrophoresis)
<b>CHES</b>	ácido 2-(ciclohexilamino)etanosulfónico (2-(cyclohexylamino) ethanesulfonic acid)
<b>CREA</b>	creatinina (creatinine)
<b>DAD</b>	detector de diodos en serie (diode array detector)
<b>ESI</b>	ionización por electrospray (electrospray ionization)
<b>FIA</b>	análisis por inyección en flujo (flow injection analysis)
<b>FLD</b>	detección fluorescente (fluorescence detection)
<b>FSFD</b>	detector fluorescente de registro rápido (fast scanning fluorescence detector)
<b>GC</b>	cromatografía de gases (gas chromatography)
<b>GTP</b>	guanosina trifosfato (guanosine triphosphate)
<b>6HMPT</b>	6-hidroximetilpterin (6-hydroxymethylpterin)
<b>HEPES</b>	ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico (4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid)
<b>HILIC</b>	cromatografía de líquidos de interacción hidrofílica (hydrophilic interaction liquid chromatography)
<b>HPLC</b>	cromatografía líquida de alta resolución (high performance liquid chromatography)
<b>ISO</b>	isoxantopterin (isoxanthopterin)
<b>k'</b>	factor de capacidad (capacity factor)
<b>LC</b>	cromatografía líquida (liquid chromatography)
<b>LOD</b>	límite de detección (limit of detection)
<b>LOQ</b>	límite de cuantificación (limit of quantification)

<b>MCR-ALS</b>	resolución multivariada de curvas por mínimos cuadrados alternantes (multivariate curve resolution – alternating least – squares)
<b>MS</b>	espectrometría de masas (mass spectrometry)
<b>MON</b>	monapterin (monapterin)
<b>6MPT</b>	6-metilpterin (6-methylpterin)
<b>5MTHF</b>	ácido 5-metiltetrahidrofólico (5-methyltetrahydrofolic acid)
<b>N</b>	número de platos teóricos (theoretical plate number)
<b>NEO</b>	neopterín (neopterín)
<b>NH2</b>	7,8-dihidroneopterín (7,8-dihydroneopterín)
<b>N-PLS</b>	mínimos cuadrados parciales multidimensionales (N-dimensional partial least-squares)
<b>9-OHB[a]Py</b>	3-hidroxibenzo(a)pireno (3-hydroxybenzo(a)pyrene)
<b>OHPAHs</b>	hidroxiderivados de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (polycyclic aromatic hydrocarbons hydroxyderivates)
<b>OHPhs</b>	derivados hidroxilados del fenantreno (hydroxyderivates of phenanthrene)
<b>1-OHPPh</b>	1-hidroxifenantreno (1-hydroxyphenanthrene)
<b>2-OHPPh</b>	2-hidroxifenantreno (2-hydroxyphenanthrene)
<b>3-OHPPh</b>	3-hidroxifenantreno (3-hydroxyphenanthrene)
<b>4-OHPPh</b>	4-hidroxifenantreno (4-hydroxyphenanthrene)
<b>9-OHPPh</b>	9-hidroxifenantreno (9-hydroxyphenanthrene)
<b>1-OHPy</b>	1-hidroxipireno (1-hydroxypyrene)
<b>PABA</b>	ácido para-aminobenzóico (para-aminobenzoic acid)
<b>PAHs</b>	hidrocarburos aromáticos policíclicos (polycyclic aromatic hydrocarbons)
<b>PT</b>	pterín (pterín)
<b>PT6C</b>	ácido pterín-6-carboxílico (pterín-6-carboxylic acid)
<b>PT6F</b>	6-formilpterín (6-formylpterín)
<b>PTFE</b>	politetrafluoroetileno (polytetrafluoroethylene)
<b>R</b>	resolución (resolution)
<b>RBL</b>	bilinealización de los residuos (residual bilinearization)
<b>RP</b>	fase inversa (reverse phase)
<b>RSD</b>	desviación estándar relativa (relative standard deviation)
<b>SD</b>	desviación estándar (standard deviation)
<b>SIM</b>	seguimiento de ion seleccionado (selected ion monitoring)
<b>SPE</b>	extracción en fase sólida (solid phase extraction)

<b>THF</b>	ácido tetrahidrofólico (tetrahydrofolic acid)
<b>TIC</b>	cromatograma de iones totales (total ion chromatogram)
<b>TOF</b>	analizador de masas de tiempo de vuelo (time of flight)
<b>UHPLC</b>	cromatografía líquida de ultra alta resolución (ultra-high performance liquid chromatography)
<b>U-PLS</b>	mínimos cuadrados parciales concatenados (unfolded partial least-square)
<b>UV</b>	ultravioleta (ultraviolet)
<b>XAN</b>	xantopterin (xanthopterin)

## **RESUMEN**

---





La presente Tesis Doctoral aborda el desarrollo de nuevos métodos cromatográficos para la determinación de compuestos de interés en el campo bioanalítico y alimentario. Todos los analitos analizados son considerados como biomarcadores, bien de la alteración de rutas bioquímicas, debido a causas patológicas o por intervención humana; o del riesgo a la exposición de contaminantes ambientales. Los compuestos en estudio son concretamente pteridinas, folatos y los metabolitos del fenantreno.

La primera parte de este estudio se dedica al desarrollo de nuevos métodos para el análisis de pteridinas tanto en fluidos biológicos como en matrices vegetales. Debido a la importancia que estos compuestos presentan como biomarcadores de diversas alteraciones metabólicas por causas patológicas, se han propuesto métodos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El uso de un detector de masas permite el análisis de estos compuestos en orina humana sin necesidad de pretratamiento previo de la muestra, es decir en el estado de oxidación en el que son excretadas. Además, y con el objetivo de poder establecer un perfil de pteridinas en suero humano de individuos sanos, se ha optimizado un método mediante HPLC con detección fluorescente de registro rápido. Por primera vez, se ha establecido un patrón de referencia que involucra la presencia de ocho pteridinas en suero humano.

Otra de las funciones bioquímicas de las pteridinas es ser intermediarias de la biosíntesis de folatos en los vegetales. Establecer el contenido y la naturaleza de las pteridinas en los vegetales durante los procesos de modificación genética (biofortificación) de folatos, es de gran utilidad para comprobar la efectividad de dicho proceso. Así, se ha propuesto un nuevo método analítico para analizar las pteridinas presentes en muestras de tomate mediante HPLC con detector de masas.

En la segunda parte de esta Tesis Doctoral se llevan a cabo estudios sobre folatos, que estructuralmente son pteridinas conjugadas; en concreto sobre el ácido fólico y sus dos principales metabolitos, el ácido tetrahidrofólico y el ácido 5-metiltetrahidrofólico. Estos compuestos son micronutrientes esenciales para el ser humano, que sin embargo éste no puede sintetizar y por tanto necesitan ser suministrados al organismo a través de la dieta. Establecer sus contenidos en los alimentos mediante métodos analíticos simples y sensibles es de primordial importancia. Por ello, se ha focalizado la investigación en el estudio del comportamiento fotoquímico de los folatos, con objeto de posibilitar el uso de técnicas fluorimétricas y aumentar por tanto, la sensibilidad de los análisis. Los folatos por irradiación

con luz UV generan fotoproductos fluorescentes. Se han establecido mediante espectrometría de masas la naturaleza de los fotoproductos generados mediante irradiación off-line. Por otro lado, se ha desarrollado un método mediante cromatografía líquida con fotoderivatización on-line postcolumna y detector fluorimétrico, para el análisis de ácido fólico, ácido tetrahidrofólico y ácido 5-metiltetrahidrofólico. El método optimizado se ha aplicado a diversas matrices alimentarias, como son tomate, espinacas y cereales de desayuno enriquecido con folatos, también se ha ensayado su análisis en suero humano.

Finalmente, la tercera parte de esta Memoria se ha dedicado a otro grupo de biomarcadores de especial importancia, como son los biomarcadores del riesgo a la exposición de hidrocarburos aromáticos policíclicos, concretamente a la exposición al fenantreno. Estos metabolitos son excretados a través de la orina; sin embargo, también pueden ser transferidos a la leche en los mamíferos. Así, con el objetivo de determinar estos compuestos en muestras de leche, se ha optimizado un método mediante HPLC con detección fluorescente de registro rápido para determinar cinco hidroxiderivados del fenantreno, que son sus principales metabolitos, en leche materna y en leche de vaca. Dada su similitud estructural, algunos de los isómeros coeluyen y, para su resolución y cuantificación se ha hecho uso del tratamiento quimiométrico de las señales dinámicas obtenidas en la separación cromatográfica. Se han registrado las matrices de tiempo de elución-longitud de onda de emisión y se ha evaluado la capacidad de diferentes algoritmos quimiométricos de segundo orden, tales como son MCR-ALS, U-PLS/RBL o N-PLS/RBL para resolver y analizar dichos isómeros en muestras de leche.

## **SUMMARY**

---



## Summary

---

This Doctoral Thesis presents the development of new chromatographic methods for the determination of compounds of interest in the bioanalytic and food field. The entire compounds analysed are considered as biomarkers, either of the alteration of biochemical pathways, due to pathological causes or by human intervention; or the risk to exposure of environmental pollutants. The compounds under study are specifically pteridines, folates and phenantrene metabolites.

The first part of this Report is focused on the development of new methods for the analysis of pteridines in both biological fluids and plant matrices. High performance liquid chromatography (HPLC) methods have been proposed due to the importance that these compounds present as biomarkers of several metabolic alterations due to pathological causes. The use of a mass detector allows the analysis of these compounds in human urine without the need of a pre-treatment of the sample, that is, on the oxidation state in which they are excreted. In addition, a new method has been optimized by means of HPLC with fast scanning fluorescence detector with the aim of being able to establish a pteridine profile in human serum of healthy people. For the first time, a reference pattern, involving the presence of eight pteridines in human serum, has been established.

Another biochemical function of pteridines is to intermediate the folate biosynthesis in plants. Establishing the content and nature of pteridines in plants during the genetic modification processes (biofortification) of folates, is very useful to verify the effectiveness of the process. Thus, a new analytical method has been proposed to analyse the pteridines present in tomato sample by HPLC with mass detector.

In the second part of this Thesis, studies are carried out on folates, which are structurally conjugated pteridines; specifically on folic acid and its two main metabolites, tetrahydrofolic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid. These compounds are essential micronutrients for humans, who can't synthesize them and therefore these compounds need to be supplied through the diet. Establishing their contents in foods through a simple and sensitive analytical method is of paramount importance. For this reason, research has focused on the study of the photochemical behavior of folates, in order to enable the use of fluorometric techniques and therefore increase the analysis sensitivity. Folates generate fluorescent photoproducts by irradiation with UV light. The nature of the generated photoproducts by off-line irradiation has been established by mass spectrometry. On the other hand, a method for the analysis of folic acid, tetrahydrofolic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid by liquid chromatography with post-column on-line

photoderivatization and fluorimetric detector, has been developed. The optimized method has been applied to various dietary matrices, such as tomato, spinach and breakfast cereals fortified with folates. They have also been tested in human serum.

Finally, the third part of this Report is focused on another group of important biomarkers, such as the biomarkers of the risk to exposure of polycyclic aromatic hydrocarbons, specifically, Phenanthrene. Those metabolites are excreted through the urine; however, they can also be transferred to milk in mammals. Thus, in order to determine these compounds in milk samples, a method using HPLC with fast scanning fluorescence detector has been optimized to determine the five hydroxylated isomers, which are the main phenanthrene metabolites, in breast and cow milk. Due to their structural similarity, some of the isomers coelute and, for their resolution and quantification, the chemometric treatment of the dynamic signals obtained in the chromatographic separation has been used. The elution time-emission wavelength matrices have been registered and the capacity of resolution of different second-order chemometric algorithms, such as MCR-ALS, U-PLS/RBL or N-PLS/RBL, has been evaluated to solve and analyse those isomers in milk samples.

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

---





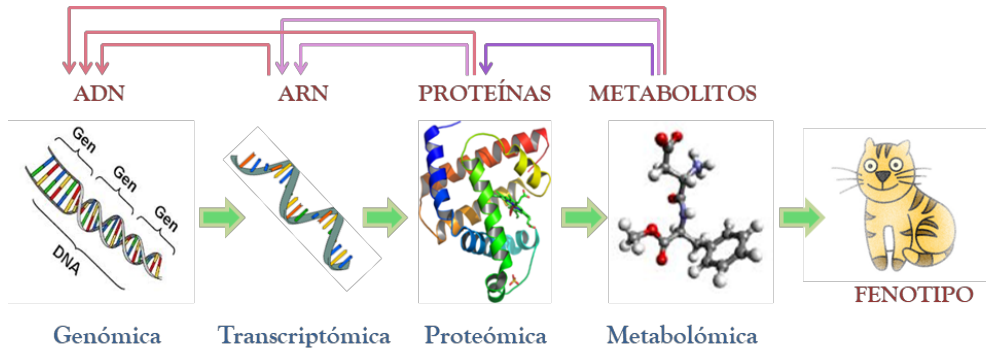
Esta introducción tiene como objetivo dar una visión general de conceptos relacionados con el trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral y que permitirán un mejor entendimiento del porqué de su realización. En ella se definirán términos como la Metabolómica, en el contexto de las técnicas ómicas, sus características generales y los distintos tipos de análisis más utilizados en este campo. También se abordará el papel que juegan los denominados biomarcadores.

## 1. Las tecnologías ómicas

Las tecnologías ómicas son un conjunto de tecnologías analíticas de alto rendimiento, empleadas en diferentes disciplinas y que permiten detectar a gran escala los genes (Genómica), genes transcritos (Transcriptómica), proteínas (Proteómica) y metabolitos (Metabolómica) en cualquier sistema biológico, permitiendo agrupar esta información con el fin de obtener una visión lo más completa del sistema en estudio [1].

Los objetivos de esta Tesis Doctoral se centran en la Metabolómica, como la ciencia encargada de identificar y cuantificar la composición global de los metabolitos en muestras biológicas. Es la tecnología ómica de más reciente aparición, capaz de revelar la respuesta de los sistemas biológicos a la influencia genética, nutricional y ambiental, a través del análisis del conjunto de metabolitos (metaboloma). El metaboloma representa la expresión final del genoma, transcriptoma y proteoma, dando así cuenta de la interrelación existente entre los distintos niveles del flujo de información en biología. Este flujo de información se inicia en el ADN, concretamente en la información genética que contiene, y que transcrita a través del ARN, determina la síntesis de proteínas y éstas a su vez, la síntesis de los metabolitos presentes en cierto sistema biológico. En la **Figura 1** se presenta la relación e interdependencia de estas disciplinas, conocida como cascada ómica.

La Metabolómica, como complemento a la Transcriptómica y Proteómica tiene ciertas ventajas como, por ejemplo, que hay menos metabolitos que genes y proteínas. Así, se estima que en un ser vivo el número de metabolitos oscila entre un mínimo de 2000 a 3000 y un máximo de 20000, el de genes está alrededor de 30000 y el de proteínas alrededor de 60000 [2]. Además, otra de las ventajas es que los procesos involucrados en Metabolómica son siempre los mismos para un metabolito dado, independientemente del individuo que lo contiene, a diferencia de lo que ocurre en Transcriptómica o Proteómica.



**Figura 1.** Flujo de información en biología.

Mientras la Genómica y la Proteómica indican lo que podría haber pasado, la Metabolómica informa de lo que realmente ha pasado y, por lo tanto, es la ciencia que mejor puede caracterizar los fenotipos de los seres vivos. Así, en la respuesta metabolómica intervienen todos los factores que rodean la vida, como la alimentación, el ejercicio, el estrés, el ciclo diurno, etc. [3].

## 2. La metabolómica

Los metabolitos pueden definirse como compuestos de bajo peso molecular (normalmente <1500 Da) presentes en células, tejidos o fluidos biológicos, que son los productos finales o intermediarios de los procesos regulatorios celulares y que se requieren para el mantenimiento, crecimiento y funciones normales de las células. Éstos pueden ser iones inorgánicos, aminoácidos, ácidos orgánicos, lípidos, etc, los cuales presentan un amplio intervalo de polaridades, tamaños moleculares, carga a pH fisiológico, etc.

La ausencia o presencia de algunos de estos compuestos, así como la concentración relativa entre ellos, puede ser un indicador de estados de enfermedad o de factores de predisposición a ella, ya que sus niveles pueden considerarse como la respuesta final de los sistemas biológicos a los cambios genéticos o ambientales.

El conjunto de metabolitos o metaboloma de un individuo está compuesto por diferentes partes o fracciones [4]:

- El *metaboloma endógeno*, proveniente del metabolismo de las células y tejidos del individuo. En este grupo de metabolitos se encuentran los compuestos pteridínicos que se han estudiado en la Parte I de esta Tesis.
- El *“food metabolome”* procedente de los metabolitos derivados de la digestión de los compuestos nutricionales esenciales y no esenciales, del metabolismo derivado del individuo (o huésped) y de su microbiota intestinal. Los metabolitos del ácido fólico, estudiados en la Parte II de esta Tesis se encontrarían dentro de este grupo.
- El *“drug metabolome”* procedente de compuestos xenobióticos derivados de fármacos, etc.
- El *“pollutant metabolome”*, derivado del ambiente, polución, etc. Los metabolitos del fenantreno, estudiados en la tercera Parte, se encontrarían dentro de este tipo de metabolitos.

La tecnología que se encarga del estudio sistemático del metaboloma, como se ha indicado anteriormente, se llama Metabolómica [5]. Se definió en la década de los 90 para describir las técnicas destinadas a medir los metabolitos presentes en una célula, tejido u organismo durante una alteración genética o estímulo fisiológico [6,7], más tarde fue definido por Oliver Fiehn como “el análisis amplio y cuantitativo de los metabolitos en un sistema” [8].

Este término es a menudo confundido con el término Metabonómica, que fue definido por primera vez en 1999 por J. Nicholson et al. [7] como “la medida cuantitativa de las respuestas dinámicas metabólicas multi-paramétricas de los sistemas vivos, a los estímulos fisiopatológicos o modificaciones genéticas”. Así, mientras la Metabonómica se centra en los cambios de los niveles de ciertos metabolitos con la influencia de los estímulos externo, la Metabolómica trata la identificación no sesgada de los metabolitos de un sistema biológico.

Posteriormente, en 2009 se complementó la definición de Metabolómica como “el estudio sistemático de un gran número de metabolitos de bajo peso molecular, generados por procesos celulares bajo condiciones específicas” [9], considerando en esta definición los dos conceptos anteriormente mencionados. Actualmente, ambos términos se utilizan indistintamente entre los miembros de la comunidad científica.

La Metabolómica permite mostrar cambios mínimos en las rutas metabólicas, incluso antes de que sea posible detectar alteraciones a nivel del fenotipo [10,11]. Posee un gran potencial en estudios clínicos, ya que permite asociar perfiles metabólicos a distintos estados fisiológicos o fisiopatológicos. Se considera que actualmente está jugando un papel esencial en el conocimiento y diagnóstico de enfermedades [11]. Por otro lado, también se pueden detectar las rutas metabólicas alteradas, identificando de esta manera nuevas dianas terapéuticas, con el consiguiente impacto en el desarrollo de nuevos fármacos. La metabolómica clínica tiene diferentes propósitos, incluido el diagnóstico de enfermedades, su seguimiento y el monitoreo de drogas terapéuticas. Además, la información obtenida mediante los estudios metabolómicos, junto con la información proporcionada por el resto de tecnologías ómicas, son la base para el desarrollo de la denominada medicina personalizada [12], la cual busca mejorar la adaptación y el tiempo de medidas preventivas y terapéuticas.

Los estudios clínicos de Metabolómica pueden dirigirse hacia comprender o descubrir que rutas metabólicas se ven alteradas por la presencia de una enfermedad dada, o hacia el descubrimiento de nuevos biomarcadores y su caracterización.

Otra parte de la Metabolómica muy importante es la Metabolómica nutricional o Nutrimetabolómica, que estudia cómo afecta la dieta al conjunto del metaboloma [13]. Ha sido propuesta como una poderosa herramienta para explotar la relación entre la nutrición y la salud [14]. Pretende profundizar en cómo los alimentos repercuten en la prevención o la evolución de las enfermedades, porque se sabe que muchas enfermedades metabólicas pueden prevenirse mediante la nutrición [15].

### **2.1. Principales tipos de análisis metabólicos**

En función de la información que se quiera obtener del estudio, y del conocimiento previo acerca del problema, se pueden distinguir dos tipos de análisis metabólicos. Cuando se conoce el número y tipo de metabolitos de interés, se puede realizar una *aproximación dirigida*. Por el contrario, en los casos en los que no se tenga suficiente información de los metabolitos que puedan estar implicados en el proceso estudiado, se llevarán a cabo *aproximaciones no-dirigidas*. Por tanto, en función del enfoque utilizado para dar respuesta a las preguntas específicas del análisis, los diferentes estudios se podrán clasificar en análisis dirigidos (*Targeted*) o análisis no dirigidos (*Untargeted*) [18,19]. Cada una de estas

estrategias tiene sus propias ventajas y desventajas, pero pueden ser complementarias cuando se usan en combinación.

### **2.1.1. Análisis dirigido (targeted analysis)**

Su objetivo es el estudio cuantitativo o cualitativo de uno o de un pequeño grupo de metabolitos químicamente similares. En este tipo de análisis podremos particularizar tanto la preparación de la muestra como la técnica de análisis más conveniente para identificar y cuantificar los compuestos seleccionados en el estudio. Mediante el uso de patrones el análisis puede realizarse de forma cuantitativa o semicuantitativa [18].

Una de las ventajas de este tipo de análisis, si se usa la espectrometría de masas como técnica de detección, es la mayor sensibilidad de este instrumento al tener que medir menor número de compuestos. Desde la perspectiva de los biomarcadores, esta ventaja puede facilitar la asociación de los metabolitos menos abundantes con distintos estados de la enfermedad. En este tipo de análisis dirigido es donde se centra esta Tesis Doctoral.

### **2.1.2. Análisis no dirigido (untargeted analysis)**

En este tipo de análisis se pretende determinar simultáneamente, tantos metabolitos como sea posible para obtener una visión global del problema. Debido a que en estos estudios no se posee información previa, es muy importante aplicar un análisis detallado que permita detectar el mayor número posible de metabolitos sin introducir ningún sesgo, ya sea debido a la preparación de la muestra o a la técnica de detección seleccionada. El análisis no dirigido se debe combinar con técnicas quimiométricas avanzadas para reducir el gran número de datos generados en conjuntos de datos más pequeños y manejables. Desde la perspectiva del descubrimiento de nuevos biomarcadores, este tipo de análisis ofrece la oportunidad de encontrar nuevas especies y, por lo tanto, la identificación de biomarcadores específicos.

Este tipo de análisis tiene una serie de limitaciones, como son la gran diversidad de metabolitos que hay en cualquier sistema biológico, los cuales presentan un amplio intervalo de polaridades tamaños moleculares, carga a pH fisiológico, etc.; el tiempo necesario para procesar la gran cantidad de datos generados y su complejidad, y la lentitud del proceso de identificación de los metabolitos [19,20]. Otro factor restrictivo es la acusada diferencia en sus concentraciones, que se estima que pueden variar entre 7-9 órdenes de

magnitud (pmol-mmol) [21] y en algunos casos la tendencia hacia la detección de especies más abundantes en detrimento de otras menos abundantes.

### **3. Biomarcadores**

En 2001, un grupo de trabajo formado por el Instituto Nacional de Salud define el término biomarcador como “una característica que es medida y evaluada como un indicador de un proceso biológico normal, un proceso patogénico, o la respuesta farmacológica a una intervención terapéutica” [22]. Juegan un papel muy importante en la comprensión de las relaciones entre la exposición al medio ambiente, el desarrollo de enfermedades crónicas y la identificación de subgrupos que tienen un mayor riesgo de enfermedad [23]. Los biomarcadores pueden ser células específicas, genes o productos genéticos, proteínas, enzimas, moléculas, hormonas, funciones orgánicas complejas o cambios característicos generales en las estructuras biológicas. Es decir, cualquier alteración molecular específica de una célula en el nivel de ADN, ARN, proteína o metabolito puede denominarse biomarcador molecular [24].

Estos se usan, en distinta extensión, por médicos, epidemiólogos y científicos para estudiar enfermedades humanas y en la investigación preclínica y el diagnóstico clínico. Algunos biomarcadores ampliamente utilizados como indicadores de riesgo son, por ejemplo, la temperatura corporal elevada para la fiebre, la determinación de la presión arterial para el accidente cerebrovascular, los valores de colesterol para la enfermedad coronaria y vascular o la creatinina en suero como marcador de la función renal.

Los biomarcadores se pueden detectar y analizar en tejidos, células de interés o en fluidos corporales, pero la tendencia actual es elegir biomarcadores que se puedan determinar en fluidos biológicos de forma no invasiva porque son más fácilmente accesibles.

Las células, directa o indirectamente (a través del fluido extracelular), se comunican con los fluidos corporales. Los metabolitos celulares, péptidos y proteínas se liberan en los fluidos corporales y los cambios en sus concentraciones reflejan los cambios bioquímicos y proteicos, y si éstos están vinculados a procesos de enfermedad pueden servir como biomarcadores.

Las investigaciones sobre nuevos biomarcadores han cambiado el enfoque de la detección de la enfermedad y su progreso. Así, por ejemplo, la detección precoz de una de las enfermedades actuales más importantes como es el cáncer, se ha visto modificada

gracias al desarrollo de biomarcadores moleculares, capaces de reflejar la biología subyacente de esta enfermedad. Mientras que los métodos de detección convencionales tienen una resolución temporal y espacial limitada, los cuales requieren que el tumor crezca a un tamaño determinado antes de que la detección sea posible, los biomarcadores moleculares son capaces de proporcionar detalles antes del inicio de la enfermedad y en toda su progresión.

Para considerar a un biomarcador como ideal debería tener las siguientes características [25]:

- Ser seguro y fácilmente cuantificable en fluidos biológicos o muestras clínicas fácilmente accesibles, de tal manera que la medición pueda ser repetida, si es necesario, sin peligro para el paciente.
- Ser consistente entre todos los grupos étnicos y géneros.
- Poseer alta especificidad para una determinada enfermedad y ser capaz de diferenciar entre dos estados fisiológicos.
- Poseer alta precisión predictiva para detectar una enfermedad y alta sensibilidad (detección de la enfermedad cuando está realmente presente).
- Permitir adoptar medidas preventivas.
- El costo de la prueba inicial y de las pruebas de seguimiento debe ser relativamente bajo.
- Capaz de dar un diagnóstico rápido.

Aunque estas sean las características de un biomarcador ideal, cabe señalar que un biomarcador puede ser muy útil aunque no cumpla algunos de estos criterios.

La Organización Mundial de la Salud [26] clasifica los marcadores biológicos para el seguimiento de la exposición a agentes biológicos en tres categorías:

- Biomarcadores de respuesta o efecto:

Son alteraciones bioquímicas y/o fisiológicas dentro de un organismo que, dependiendo de su magnitud, pueden ser asociadas a una posible alteración de la salud.

Dentro de este tipo de biomarcadores se encuentran los compuestos estudiados en la Parte I de esta Tesis Doctoral que son las pterinas.



- Biomarcadores de exposición:

Se trata de una sustancia exógena, o bien un producto formado en su metabolización (su metabolito o metabolitos), que se determina en un medio biológico (sangre, orina, leche, saliva, aire espirado) y que refleja exposición al mismo.

La exposición a un determinado contaminante implica una dosis interna capaz de interactuar con sus receptores o dianas en los diferentes órganos y sistemas, dando lugar a una respuesta biológica, que a su vez, se ve modificada por la diferente susceptibilidad individual. Estos biomarcadores permiten la medida de la dosis interna. Esta dosis interna puede reflejar también, en el caso de tóxicos acumulativos, la cifra de agente tóxico almacenado en uno o varios compartimentos corporales.

En este grupo de biomarcadores se encuentran los metabolitos del fenantreno como indicadores del riesgo de exposición al fenantreno, en los que se centra la Parte III de esta Memoria.

Dentro de este tipo de biomarcadores podemos diferenciar los biomarcadores de ingesta, los cuales se tratan principalmente de metabolitos derivados del consumo o ingesta de un determinado alimento. El interés en la identificación de este tipo de biomarcadores relacionados con el estilo de vida está aumentando considerablemente.

Entre los biomarcadores de ingesta se encuentran los folatos, los cuales son objeto de estudio en la Parte II de esta Tesis.

- Biomarcadores de susceptibilidad:

Son indicadores de la sensibilidad individual al efecto de un xenobiótico o de un grupo de compuestos tóxicos específicos. En general, son debidos a factores genéticos.

Esta subdivisión resulta algunas veces muy difusa, ya que a menudo es imposible establecer claramente la pertenencia a una de estas clases; por ejemplo, los biomarcadores de respuesta pueden interpretarse como el “efecto” bioquímico o biológico después de la “exposición” a un cierto tóxico, por lo que, teóricamente, resultan útiles a la vez como biomarcadores de exposición y/o de efecto.

#### **4. El proceso analítico en metabolómica**

Un campo muy importante en el ámbito de la metabolómica, ya que tiene gran repercusión en los resultados finales, es el proceso analítico. Este empieza con el muestreo, siguiendo por la obtención de la muestra analítica, su análisis mediante la técnica adecuada y termina con el tratamiento de datos para proporcionar la información deseada. La muestra analítica es la fracción de la muestra real obtenida después de su pretratamiento y que es adecuada para ser analizada.

En una publicación reciente, Luque de Castro y col. [27] hacen una revisión detallada de cada uno de los pasos del proceso analítico. En él se informa de que uno de los principales problemas que se encuentran los investigadores es la ausencia en las publicaciones de información crucial relativa al proceso analítico, lo cuál dificulta tanto la utilización de los datos publicados previamente como punto de partida o para la comparación de los resultados, como para reproducir los experimentos.

En esta apartado se tratará de forma resumida algunos de los aspectos claves del proceso analítico.

Las principales muestras utilizadas en el análisis metabolómico son las muestras sanguíneas (suero y plasma), orina y en menor extensión saliva, semen, líquido cefaloraquídeo y tejidos. En función de cada tipo de muestra en particular es necesario optimizar cada uno de los pasos, tanto de la etapa de muestreo como del pretratamiento de la muestra (extracción sólido-líquido, extracción líquido-líquido, precipitación de proteínas, centrifugación, extracción en fase sólida, etc.). Así, por ejemplo, en algunos tipos de muestra como el suero o el plasma es muy importante la selección del material utilizado para el muestreo [28], mientras que en la orina no tiene mucha influencia.

Además, también en función del tipo de análisis (análisis dirigido o no dirigido) se requiere un tratamiento de la muestra específico u otro.

En cuanto a la técnica de análisis a usar también tiene que ser la apropiada en función del tipo de información requerida, del tipo de muestra o de las características de los propios metabolitos de interés.

Los análisis metabolómicos pueden realizarse mediante análisis por inyección directa de la muestra o mediante el acoplamiento de diferentes detectores a técnicas de separación (cromatografía de líquidos, cromatografía de gases o electroforesis capilar). Actualmente, el análisis mediante inyección directa de las muestras se lleva a cabo principalmente mediante

instrumentos de resonancia magnética nuclear (RMN) o mediante espectrometría de masas (MS), permitiendo el análisis de un amplio número de metabolitos en un corto período de tiempo [29]. Es recomendable combinar estos detectores con técnicas de separación para obtener una información adicional como es el tiempo de retención.

La electroforesis capilar se ha convertido en una técnica prometedora para la obtención de perfil metabólico de fluidos biológicos y su combinación con la detección de masas es ampliamente utilizada en la actualidad [30].

Para la identificación de compuestos volátiles en matrices biológicas complejas, la técnica más adecuada hoy en día es el acoplamiento de la cromatografía de gases a la espectrometría de masas (GC-MS) debido a que combina la alta eficiencia de la separación con una detección sensible y reproducible.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es la técnica de separación más común en las aplicaciones metabolómicas debido a su gran versatilidad para la resolución de varias clases de metabolitos y la menor complejidad del tratamiento de la muestra. Aunque se pueden usar otro tipo de detectores más sencillos, como el detector fluorescente o detector de diodos, el detector más ampliamente utilizado en análisis metabolómico es el detector de masas dada su capacidad identificativa [31].

Con respecto a la modalidad de cromatografía líquida, la cromatografía de fase inversa (reverse phase, RP) se ha convertido en la primera opción para el análisis de metabolitos con polaridad media y baja, los cuales constituyen aproximadamente el 70% del metaboloma humano, según la base de datos del metabolismo humano (Human Metabolome Database, HMDB) [32]. Además, la aparición en la última década de la cromatografía de líquidos de ultra alto rendimiento (UHPLC) permite una mejor resolución, sensibilidad y menor tiempo de análisis.

Hay que tener en cuenta que los metabolitos de elevada polaridad no se retienen en las columnas RP y para mejorar la aplicabilidad de este tipo de columnas se han propuesto diferentes estrategias. Diversos fabricantes han desarrollado nuevas columnas RP con mayor retención de compuestos polares [33,34].

La cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) ha ganado gran popularidad en los últimos años para el perfil de metabolitos polares [35,36]. Esta técnica se basa en la combinación de columnas polares y fases móviles como las normalmente usadas en las

separaciones RP, que están formadas por agua y un disolvente miscible, empleando gradientes que comienzan con altas concentraciones del componente orgánico.

Finalmente, la última etapa del proceso analítico es el tratamiento estadístico de los datos, es decir, la aplicación de herramientas univariantes y multivariantes para extraer la información de interés.

## 5. Bibliografía

- [1] R. Romero, J. Espinoza, F. Gotsch, J.P. Kusanovic, L.A. Friel, O. Erez, S. Mazaki-Tovi, N.G. Than, S. Hassan, G. Tromp, The use of high-dimensional biology (genomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomics) to understand the preterm parturition syndrome, *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* 113 (2006) 118–135.
- [2] W.M. Claudino, A. Quattrone, L. Biganzoli, M. Pestrin, I. Bertini, A. Di Leo, Metabolomics: Available results, current research projects in breast cancer, and future applications, *J. Clin. Oncol.* 25 (2007) 2840–2846.
- [3] D. Ryan, Robards K., Metabolomics: The Greatest Omics of Them All?, *Anal. Chem.* 78 (2006) 7954–7958.
- [4] A. Scalbert, L. Brennam, C. Manach, C. Andres-Lacueva, L.O. Dragsted, J. Draper, S.M. Rappaport, J.J. Van der Hooft, D.S. Wishart, Prebiotics: Preferential substrates for specific germs?, *Am. J. Clin. Nutr.* 99 (2014) 1286–1308.
- [5] O. Fiehn, Combining geonomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks, *Comp Funct Genom.* 2 (2001) 155–168.
- [6] S. Oliver, M. Winson, D. Kell, F. Baganz, Systematic functional analysis of the yeast genome, *Trends Biotechnol.* 16 (1998) 373–378.
- [7] J.K. Nicholson, J.C. Lindon, E. Holmes, “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data., *Xenobiotica.* 29 (1999) 1181–1189.
- [8] O. Fiehn, Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes, *Plant Mol. Biol.* 48 (2002) 155–171.
- [9] D.S. Wishart, Computational strategies for metabolite identification in metabolomics, *Bioanalysis.* 1 (2009) 1579–1596.
- [10] P.R. Nambiar, R.R. Gupta, V. Misra, An “Omics” based survey of human colon cancer, *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 693 (2010) 3–18.
- [11] M. Kussmann, F. Raymond, M. Affolter, OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health, *J. Biotechnol.* 124 (2006) 758–787.
- [12] A.D. Eckhart, K. Beebe, M. Milburn, Metabolomics as a Key Integrator for “Omic” Advancement of Personalized Medicine and Future Therapies, *Clin. Transl. Sci.* 5

- (2012) 285–288.
- [13] X. Zhang, L. You, W. Wang, K. Xiao, Novel Omics Technologies in Food Nutrition, Genomics, Proteomics Metabolomics Nutraceuticals *Funct. Foods* Second Ed. 26 (2015) 1–13.
- [14] E.M.S. McNiven, J.B. German, C.M. Slupsky, Analytical metabolomics: Nutritional opportunities for personalized health, *J. Nutr. Biochem.* 22 (2011) 995–1002.
- [15] E. Trujillo, C. Davis, J. Milner, Nutrigenomics, proteomics, metabolomics, and the practice of dietetics., *J. Am. Diet. Assoc.* 106 (2006) 403–413.
- [16] E. Gorrochategui, J. Jaumot, S. Lacorte, R. Tauler, Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: overview and workflow, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 82 (2016) 425–442.
- [17] L. Laghi, G. Picone, F. Capozzi, Nuclear magnetic resonance for foodomics beyond food analysis, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 59 (2014) 93–102.
- [18] L.D. Roberts, A.L. Souza, R.E. Gerszten, C.B. Clish, Targeted metabolomics, *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 98 (2012) 1–24.
- [19] R. Tautenhahn, K. Cho, W. Uritboonthai, Z. Zhu, G.J. Patti, G. Siuzdak, An accelerated workflow for untargeted metabolomics using the METLIN database, *Nat. Biotechnol.* 30 (2012) 826–828.
- [20] A. Alonso, S. Marsal, A. Juliá, Analytical Methods in Untargeted Metabolomics: State of the Art in 2015, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3 (2015) 1–20.
- [21] W.B. Dunn, D.I. Ellis, Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 285–294.
- [22] Biomarkers Definitions Working Group, Biomarkers and surrogate endpoints; preferred definitions and conceptual framework., *Clin. Pharmacol. Ther.* 69 (2001) 89–95.
- [23] A.S. Badge, V.J. Kadam, V.V. Khanvilkar, Kothekar. R.R., Biomarkers: A Review, *Int. J. Pharm. Res. Sch.* 4 (2015) 66–77.
- [24] K.K. Jain, *The Handbook of Biomarker*, Humana Press, 2010.
- [25] P. Sahu, N. Pinkalwar, R.D. Dubey, S. Paroha, S. Chatterjee, T. Chatterjee, Biomarkers: an emerging tool for diagnosis of a disease and drug development., *Asian J. Res.*

- Pharm. Sci. 1 (2011) 9–16.
- [26] WHO Internacional Programme on Chemical Safety (IPCS)., Biomarkers and risk assessment: concepts and principles, in: Environ. Heal. Criteria, World health organization, 1993.
- [27] M.D. Luque de Castro, F. Priego-Capote, The analytical process to search for metabolomics biomarkers, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 147 (2018) 341–349.
- [28] M.A. López-Bascón, F. Priego-Capote, A. Peralbo-Molina, M. Calderón-Santiago, M.D. Luque De Castro, Influence of the collection tube on metabolomic changes in serum and plasma, *Talanta*. 150 (2016) 681–689.
- [29] R. González-Domínguez, A. Sayago, Á. Fernández-Recamales, Metabolomics in Alzheimer’s disease: The need of complementary analytical platforms for the identification of biomarkers to unravel the underlying pathology, *J. Chromatogr. B.* 1071 (2017) 75–92.
- [30] K.T. Rodrigues, Z. Cieslarová, M. Franco, M. Tavares, A. Valéria, C. Simionato, Strategies involving mass spectrometry combined with capillary electrophoresis in metabolomics, in: Springer (Ed.), *Metabolomics From Fundam. to Clin. Appl. Adv. Exp. Med. Biol.*, 2017: pp. 99–141.
- [31] A.S. Lopes, E.C. Santa Cruz, A. Sussulini, A. Klassen, Metabolomic strategies involving mass spectrometry combined with liquid and gas chromatography, in: Springer (Ed.), *Metabolomics From Fundam. to Clin. Appl. Adv. Exp. Med. Biol.*, 2017: pp. 77–98.
- [32] D.S. Wishart, T. Jewison, A.C. Guo, M. Wilson, C. Knox, Y. Liu, Y. Djoumbou, R. Mandal, F. Aziat, E. Dong, S. Bouatra, I. Sinelnikov, D. Arndt, J. Xia, P. Liu, F. Yallou, T. Bjorndahl, R. Perez-Pineiro, R. Eisner, F. Allen, V. Neveu, R. Greiner, A. Scalbert, HMDB 3.0-The Human Metabolome Database in 2013, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 801–807.
- [33] K.T. Myint, K. Aoshima, S. Tanaka, T. Nakamura, Y. Oda, Quantitative profiling of polar cationic metabolites in human cerebrospinal fluid by reversed-phase nanoliquid chromatography / mass spectrometry, *Anal. Chem.* 81 (2009) 1121–1129.
- [34] T. Takayama, T. Mochizuki, K. Todoroki, J.Z. Min, H. Mizuno, K. Inoue, H. Akatsu, I. Noge, T. Toyooka, A novel approach for LC-MS/MS-based chiral metabolomics fingerprinting and chiral metabolomics extraction using a pair of enantiomers of

chiral derivatization reagents, *Anal. Chim. Acta.* 898 (2015) 73–84.

- [35] S.F. Graham, O.P. Chevallier, C.T. Elliott, C. Hölscher, J. Johnston, B. McGuinness, P.G. Kehoe, A.P. Passmore, B.D. Green, Untargeted metabolomic analysis of human plasma indicates differentially affected polyamine and L-arginine metabolism in mild cognitive impairment subjects converting to Alzheimer's disease, *PLoS One.* 10 (2015) 1–16.
- [36] K. Inoue, H. Tsuchiya, T. Takayama, H. Akatsu, Y. Hashizume, T. Yamamoto, N. Matsukawa, T. Toyo'oka, Blood-based diagnosis of Alzheimer's disease using fingerprinting metabolomics based on hydrophilic interaction liquid chromatography with mass spectrometry and multivariate statistical analysis, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 974 (2015) 24–34.

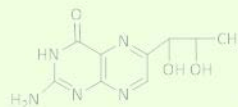
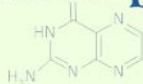
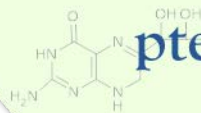
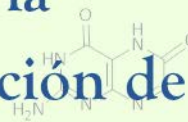
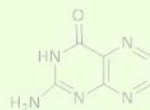
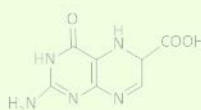






# PARTE I

Optimización de métodos  
cromatográficos para la  
identificación y determinación de  
pteridinas precursoras.



*“Solo porque algo no haga lo que era previsto  
no quiere decir que sea inútil el esfuerzo”*

*Thomas Alba Edison*



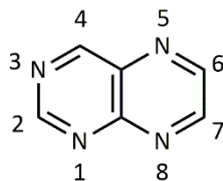
## **1. Introducción**

---



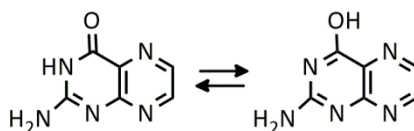
### 1.1. Estructura química de las pteridinas

Las pteridinas no conjugadas son una familia de compuestos en los que la estructura básica de la forma oxidada está formada por un anillo condensado pirazino [2,3-d] pirimidino como se muestra en la **Figura 1.1**.



**Figura 1.1.** Estructura del anillo pirazino-pirimidino.

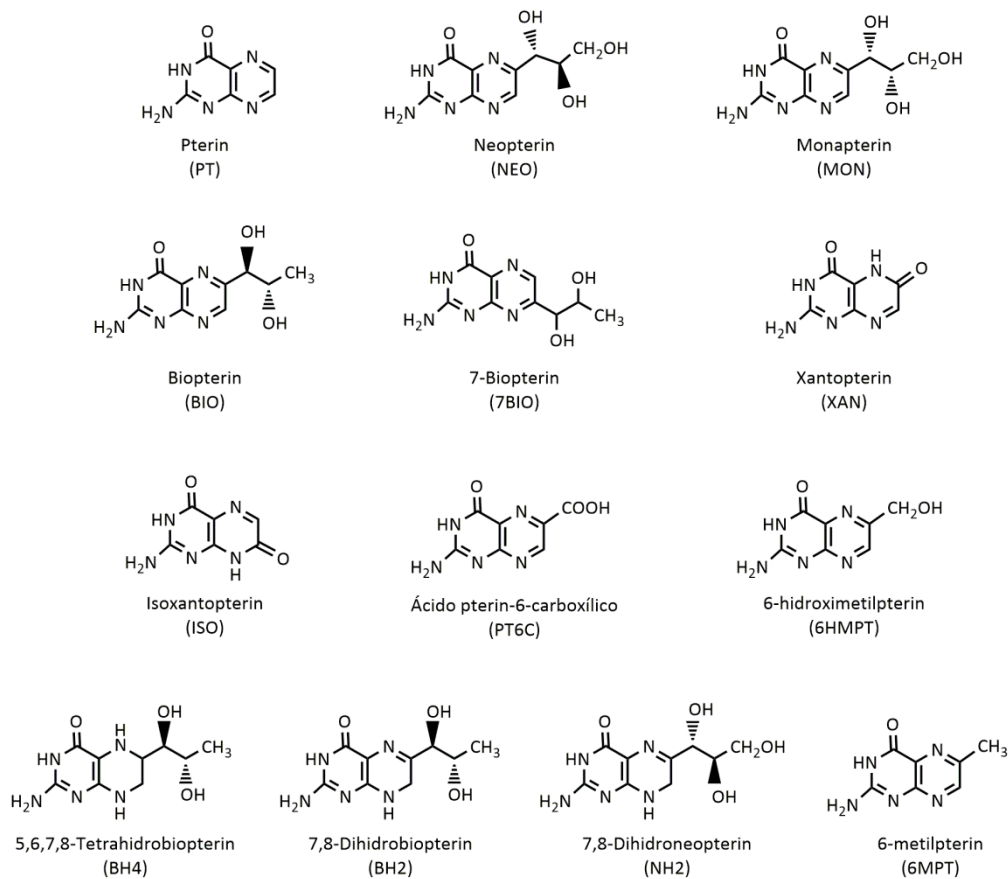
La mayoría de las pteridinas naturales presentan este anillo sustituido en la posición 2 por un grupo amino y en la posición 4 por un grupo hidroxilo. Debido a estos sustituyentes existen dos formas tautoméricas las cuales se muestran en la **Figura 1.2**, siendo la más probable aquella que posee el átomo de hidrógeno en el nitrógeno N3. Realmente no se puede hablar de una estructura de amida pura sino de dos híbridos resonantes de los cuales uno es un zwitterion [1].



**Figura 1.2.** Equilibrio tautomérico.

Pueden existir en diferentes estados de oxidación y de acuerdo a esta propiedad pueden dividirse en dos grupos: pteridinas oxidadas, que son aromáticas, y pteridinas reducidas, que parcialmente pierden esa aromaticidad. Dentro del primer grupo, el compuesto más simple es el pterin (PT) o 2-amino-4-hidroxipteridina. El resto de pteridinas oxidadas naturales suelen estar sustituidas en posición 6 presentando una gran variedad de estructuras, tales como L-biopterin (BIO), D-neopterin (NEO) o el ácido pterin-6-carboxílico (PT6C) entre otras, como se muestra en la **Figura 1.3**. Solo dos pteridinas de las más frecuentes presentan sustituyentes en posición 7, el isoxantopterin (ISO) y el 7-biopterin (7BIO). Por otro lado, las formas reducidas más comunes son los 7,8-dihidro y los 5, 6, 7, 8-tetrahidro derivados.

En la **Figura 1.3** se muestran las estructuras de las pteridinas más comunes y que han sido objeto de estudio en esta parte de la Tesis Doctoral.



**Figura 1.3.** Estructura química de derivados pteridínicos.



## 1.2. Características físico-químicas de las pteridinas

Algunas de las características físico-químicas de las pteridinas que serán de gran importancia en los estudios desarrollados son las siguientes:

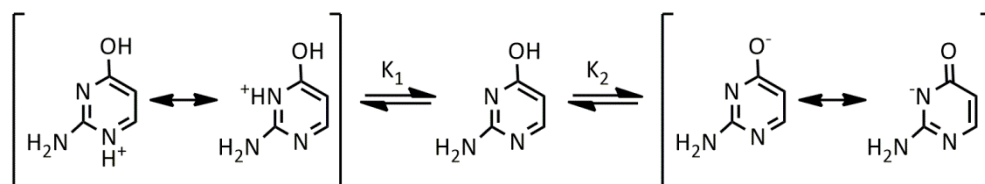
### 1.2.1. Solubilidad

Las pteridinas no sustituidas son solubles en agua ya que el par de electrones libres de los átomos de nitrógeno de los heterociclos son deficientes en electrones  $\pi$  y forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua. Sin embargo, la incorporación al anillo básico de sustituyentes como los grupos amino o hidroxilo genera una disminución de la solubilidad [2]. Este fenómeno se explica teniendo en cuenta las fuertes interacciones intermoleculares por puente de hidrógeno entre los grupos aminos (o hidroxilo) con los átomos de nitrógeno que evitan la formación de puentes de hidrógeno con el agua [3]. Como consecuencia si comparamos la solubilidad del anillo de pteridina con el 4-hidroxisustituido, la solubilidad se ve disminuida en unas 30 veces.

### 1.2.2. Características ácido-base

En cuanto a su comportamiento ácido-base, sabemos que los compuestos con dos átomos de nitrógeno en un mismo anillo son bases débiles, por tanto las pteridinas se comportarán como bases débiles.

Las pteridinas presentan un primer equilibrio de disociación correspondiente al protón en N1 y un segundo equilibrio asignado a la pérdida del protón del hidroxilo afectando a N3, según se indica en los siguientes esquemas, **Figura 1.4**.



**Figura 1.4.** Equilibrios de disociación.

En la **Tabla 1.1** se resumen los valores de las constantes de acidez para diversos derivados pteridínicos [4].

**Tabla 1.1.** Constantes de acidez de derivados pteridínicos calculados espectrofluorimétricamente mediante los métodos de Wilson y Lester.

Compuesto	Grupo 1	pK <sub>1</sub>	Grupo 2	pK <sub>2</sub>
pterin		2.54		8.06
6-hidroximetil-pterin		2.66		7.76
biopterin	R- <sup>+</sup> N <sup>1</sup> H-R'	2.36	R-N <sup>3</sup> =C <sup>4</sup> (O <sup>-</sup> )-R'	7.80
neopterin		2.36		7.70
monapterin		2.61		7.86

En el intervalo de pH entre 3 y 6, la forma predominante es la forma neutra. Por debajo de estos valores se tendría que considerar la formación de una forma catiónica por protonación en N1, incluso a medida que disminuye el pH se podría considerar la aparición de protonaciones en otros grupos aminos presentes, por ejemplo 2-amino, dando lugar a diversas formas catiónicas, +2, etc. Entre pH 6 y 9, el grupo amida comienza a dar lugar a un anión que es la forma predominante a pH superiores. Las pteridinas reducidas, por ejemplo, el BH4, presentan además un tercer equilibrio asignado a la desprotonación en el N8 presentando valores de  $pK \approx 10$ .

### 1.2.3. Características espectrales

Las pteridinas presentan grupos cromóforos y las formas oxidadas son además potentes fluoróforos estando el rendimiento cuántico de fluorescencia fuertemente influenciado por la acidez del medio.

La forma neutra, es intensamente fluorescente presentando dos máximos de excitación aproximadamente a 275 y 345 nm y un máximo de emisión sobre 445 nm, aunque este último se va a ver influenciado por la presencia de sustituyentes en posición 6 y 7. Para pH inferiores a 2, cuando predomina la forma catiónica, se produce una drástica pérdida de fluorescencia, mientras que a pH superiores a 7 se observa un desplazamiento hipsocrómico de la  $\lambda_{ex}$  a 257 nm, y un elevado rendimiento cuántico de fluorescencia. A pH > 11 con frecuencia la fluorescencia disminuye y prácticamente llega a desaparecer, sin

embargo, las 6-hidroxi pteridinas presentan fluorescencia incluso a pH > 12 [4,5]. Por otra parte, las pteridinas en sus formas reducidas no presentan fluorescencia notable. Así las denominadas tetrahidropteridinas son escasamente fluorescentes debido a la pérdida de aromaticidad del anillo pirazínico por formación de di- y tetrahidro derivados. La química de las hidropteridinas ha sido descrita en detalle en el libro titulado "Chemistry and properties of dihydropterins" [6].

### **1.2.4. Estabilidad de las disoluciones de pteridinas**

Las pteridinas, fundamentalmente las formas reducidas, presentan baja estabilidad en disolución que depende de las condiciones del medio tales como la acidez, el oxígeno ambiental o la luz. Así, a pH neutro las pteridinas reducidas se oxidan fácilmente y es frecuente encontrar en las disoluciones patrón de éstas, cantidades notables de las formas oxidadas. Para proteger las disoluciones de estas oxidaciones se han utilizado diversas sustancias como ácido ascórbico, 1,4-ditioeritritol (DTE) o ditioneitol (DTT) [7], siendo esta última la más utilizada actualmente. Por ello, se recomienda la preparación de las disoluciones patrón de hidropterinas diariamente, en presencia de un 0.1 % de DTT y evitar la exposición a la luz solar [8]. En el caso de las pteridinas oxidadas evitar la exposición a la luz solar y congelar las disoluciones parece ser suficiente para asegurar la estabilidad y que puedan ser utilizadas al menos durante tres semanas después de su preparación.

### 1.3. Biosíntesis de pteridinas

En la **Figura 1.5** se muestra esquemáticamente la ruta biosintética para varias pteridinas no conjugadas oxidadas y reducidas, aquellas cuyas alteraciones indican modificaciones metabólicas de gran importancia.

Las pteridinas se forman a partir de la guanosina trifosfato (GTP). El primer paso es la liberación hidrolítica de formiato del anillo de imidazol del GTP, proceso que es catalizado por la enzima GTP ciclohidrolasa I. La reacción de hidrólisis es seguida por la formación del anillo de pirazina para formar el 7,8-dihidroneopterin trifosfato [9]. Todos los átomos de carbono del anillo pteridínico, menos dos, provienen de la purina, mientras que los otros dos átomos de carbono son suministrados por la fracción de ribosa.

El 7,8-dihidroneopterin trifosfato puede por un lado, mediante oxidación en condiciones ácidas y en presencia de fosfatasa alcalina producir neopterin. En otras ocasiones el grupo trifosfato del 7,8-dihidroneopterin se elimina enzimáticamente mediante la 6-piruvoil-5, 6, 7, 8-tetrahidropterin sintasa, que también reduce la pteridina a 6-piruvoil tetrahidropterin.

Seguidamente este compuesto se convierte en tetrahidrobiopterin bajo la influencia de la enzima sepiapterin reductasa y NADPH que, tras la oxidación en condiciones ácidas produce BIO [10]. En otra ruta el 6-piruvoil tetrahidropterin se reduce mediante la 6-piruvoil tetrahidropterin reductasa en presencia de NADPH en 6-lactoil tetrahidrobiopterin que a su vez se oxida por el oxígeno del aire a sepiapterin.

Se sabe que hay tres errores congénitos que causan alteración de los niveles normales de pteridinas en el ser humano: la deficiencia de GTP ciclohidrolasa I, deficiencia de la 6-piruvoil-5,6,7,8-tetrahidropterin sintasa y deficiencia de la dihidropteridina reductasa. Si existe déficit de GTP ciclohidrolasa I, no se sintetizan pteridinas y estos pacientes se caracterizan por la deficiencia de NEO y BIO. En pacientes con deficiencia de la 6-piruvoil tetrahidropterin reductasa se acumula NEO y se observa un déficit de otras pteridinas como BH<sub>4</sub>, mientras que si la deficiencia es de la dihidropteridina reductasa se acumula 6-biopterin.

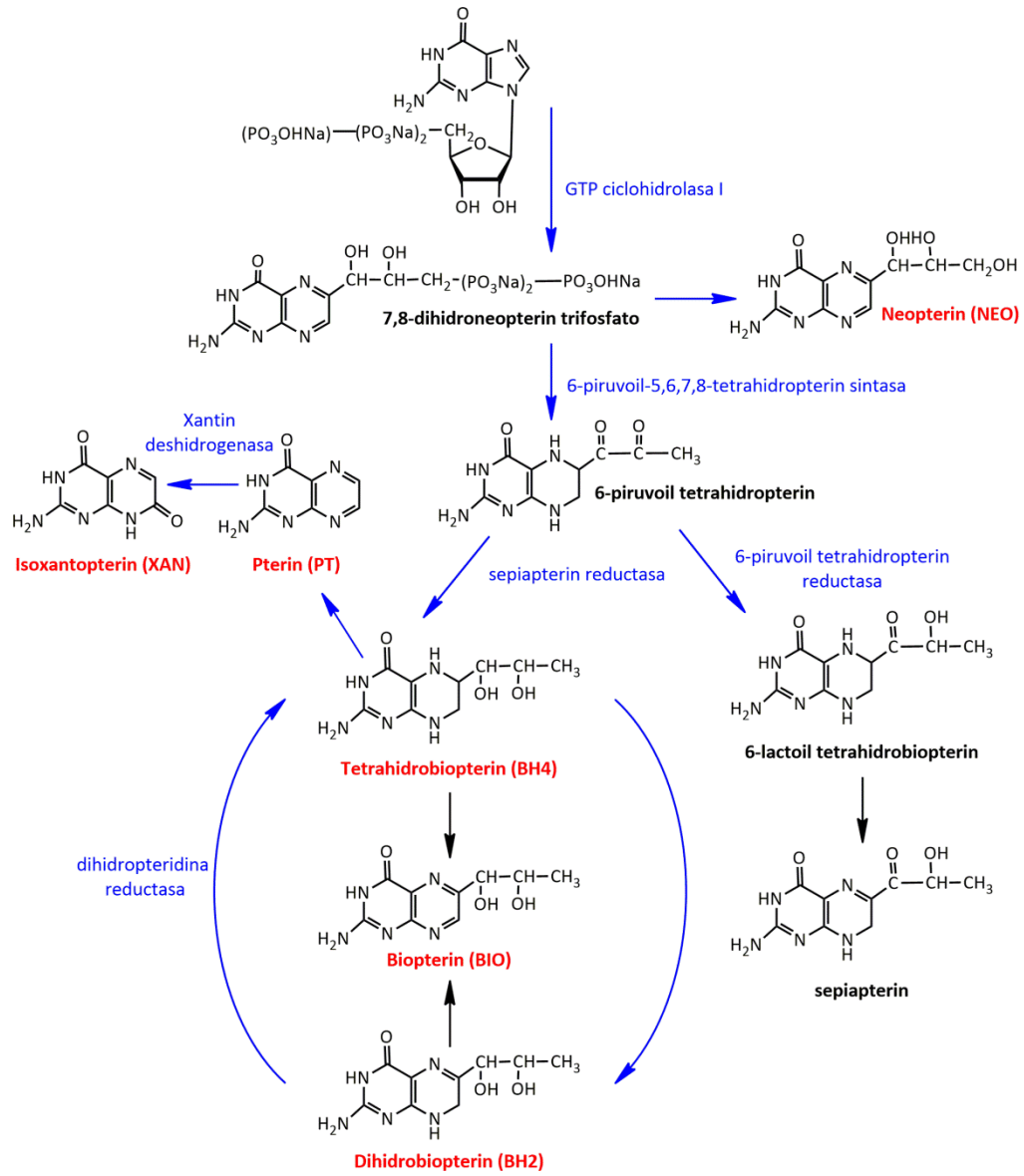


Figura 1.5. Rutas metabólicas de generación de pteridinas.

#### **1.4. Actividad e importancia de las pteridinas**

En el organismo humano, las pteridinas están implicadas en diversas rutas bioquímicas y son cofactores responsables del equilibrio hormonal en los seres superiores. Además, en las plantas son intermediarias en la síntesis del ácido fólico (AF), a través de complejas rutas bioquímicas, aspecto que se tratará posteriormente.

Como se comentó en la Introducción general, mientras que los síntomas clínicos de una enfermedad, en muchos casos no son adecuados para su prevención, en la actualidad el uso de biomarcadores puede relacionar los cambios funcionales debidos a la enfermedad y poder prevenirla antes de que los síntomas clínicos aparezcan. Las pteridinas pueden ser utilizadas potencialmente como biomarcadores en diagnosis clínica ya que juegan un papel importante en la síntesis de algunas vitaminas y son cofactores importantes en los procesos del metabolismo celular [11]. Se ha demostrado que sus concentraciones en fluidos biológicos se ven alteradas en varios procesos patológicos, lo cual las ha convertido en prometedores biomarcadores moleculares para la detección, diagnóstico y seguimiento de ciertas enfermedades.

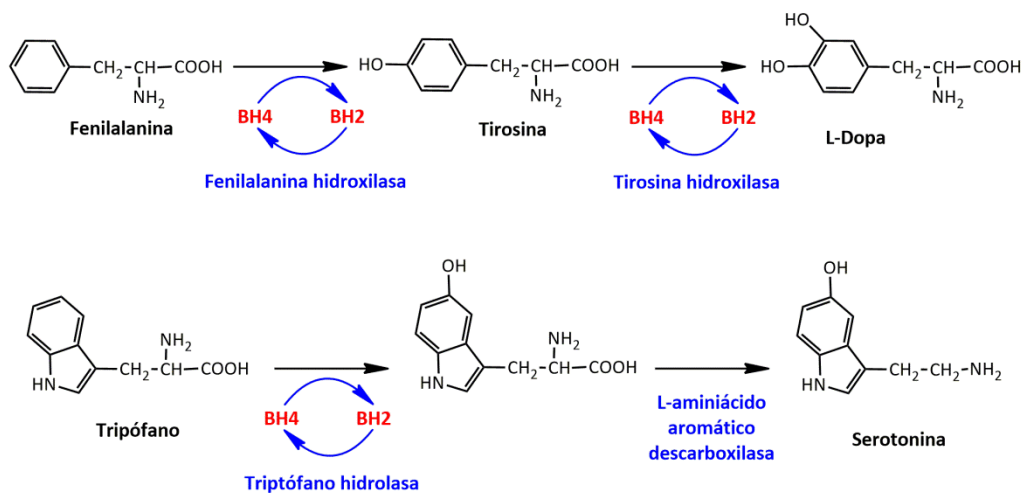
Aunque se han publicado alteraciones de los niveles de pteridinas en diferentes fluidos biológicos tales como suero, orina o líquido céfalo-raquídeo, su estudio como biomarcadores de enfermedades se ha centrado principalmente en muestras de orina. Los nuevos métodos de análisis se han desarrollado principalmente para el análisis de pteridinas en orina dado que en este fluido fueron detectadas por primera vez y a que es su principal vía de excreción [12]. Además, se trata de una muestra muy fácil de recolectar, a diferencia de otro tipo de muestras para los que hay que utilizar procedimientos invasivos.

Ya en 1949 Norris y Majnarich examinaron los efectos del XAN en la proliferación de células neoplásicas [13] y en los próximos años se comenzaron a aislar BIO [14], ISO [15] y NEO [16] de orina humana. El papel de las pteridinas no conjugadas se comenzó a reconocer más en 1959, cuando se estableció que el BH4 es el cofactor de la enzima aromático-aminoácido hidroxilasa [17] y puede considerarse como la pteridina no conjugada más importante presente en los fluidos biológicos.

El BH4 es un cofactor esencial para varias enzimas encargadas de la hidroxilación de la fenilalanina, tirosina y triptófano; y como consecuencia influye en la biosíntesis de varios neurotransmisores [18], como se puede observar en la **Figura 1.6**. La fenilalanina hidroxilasa hidroxila a la molécula de fenilalanina convirtiéndola en tirosina, siendo el donador de electrones el BH4 que, a su vez, se oxida convirtiéndose en BH2. El BH2 se reduce de nuevo a BH4 por acción de la dihidropterina reductasa, reciclando el BH4. Posteriormente, la tirosina-3-hidroxilasa hidroxila a la L-tirosina para formar L-DOPA (3,4-dihidroxi-fenilalanina).

Por otra parte, la enzima triptófano-5-hidroxilasa cataliza la hidroxilación del L-triptófano a 5-hidroxitriptófano para tras una descarboxilación formar serotonina.

Además, el BH4 también influye en otras enzimas implicadas en procesos importantes como la síntesis de óxido nítrico requerido para procesos de regulación sanguínea o defensa contra agentes patógenos [19].



**Figura 1.6.** Ruta de la síntesis de neurotransmisores.

Quizás las alteraciones metabólicas más directamente relacionadas con las pteridinas son las denominadas hiperfenilalaninemia y por ello se van a tratar en más profundidad. Su nombre se debe a que presentan como síntoma principal la acumulación de la fenilalanina en el organismo, debido a que ésta no se transforma adecuadamente en tirosina. Se pueden definir dos tipos de fenilalaninemia [20]:

- La denominada *fenilcetonuria* cuando el defecto enzimático se encuentra en la fenilalanina hidroxilasa.
- La *fenilalaninemia no fenilcetonúrica* cuando el defecto enzimático se encuentra en alguna de las enzimas de los sistemas de síntesis y/o reciclaje del BH4.

En este último caso no solo se afecta el sistema de hidroxilación de la fenilalanina, sino que también se afecta la síntesis de neurotransmisores dopaminérgicos y serotoninérgicos, dando lugar a un grupo de enfermedades conocidas como hiperfenilalaninemia por defecto del cofactor BH4. Mientras que el primer caso puede ser modulado mediante una dieta pobre en fenilalanina, el segundo caso no responde a esta reducción.

En ambos tipos de fenilalaninemias, los efectos son los mismos, acumulación de la fenilalanina causando graves trastornos neurológicos, frecuentemente congénitos, y que tienen como consecuencia el deterioro cognitivo y el retraso mental en niños.

Realizar un diagnóstico diferencial de los diversos tipos de fenilalaninemias es fundamental para prescribir la terapia oportuna lo más rápidamente posible en neonatos y minimizar los daños cerebrales. Este diagnóstico se lleva a cabo mediante el control de ciertas pteridinas involucradas en el metabolismo del BH4.

La clásica fenilcetonuria produce incrementos en los niveles urinarios de NEO y BIO, mientras que la generada por deficiencia de BH4 depende del tipo de enzima que se vea afectada. Así, si el defecto se produce en la 6-piruvil-5,6,7,8-tetrahidropterin sintasa se observan altos niveles de NEO en orina y no detectables de BIO, mientras que si la afectada es la GTP ciclohidroxilasa, en orina los niveles de NEO y BIO son muy bajos y la relación NEO/BIO es normal. También se ha detectado la presencia de 7BIO en pacientes con déficit de la enzima carbinolamina deshidratasa [20].

Establecer la relación NEO/BIO y el contenido de BH4, en individuos sanos y en diversas patologías, tanto en orina como en suero, es de primordial importancia para su aplicación como biomarcador. Por tanto, es fundamental disponer de métodos de análisis rápidos y robustos en los laboratorios de análisis clínico.

Estas alteraciones se manifiestan en los primeros meses de vida, ya que tras comenzar la alimentación por boca después de nacer, en los niños con fenilcetonuria, la fenilalanina se acumula en la sangre y en los tejidos, encontrándose en cantidades anormalmente elevadas y provocando las deficiencias anteriormente comentadas. Durante



el embarazo no se manifiesta este daño en el niño porque la madre no está enferma y tiene la capacidad de regular los niveles de fenilalanina transmitiendo a su hijo, a través de la placenta, las cantidades necesarias para que crezca y se desarrolle dentro del útero de manera adecuada, sin daño neurológico.

Por ello, desde 1973 a todo recién nacido, a partir de 3-5 días de nacimiento, se le efectúa una extracción de sangre del talón para la valoración de fenilalanina, con objeto de detectar la denominada fenilalaninemia o fenilcetonuria [21].

Además de la patología anteriormente mencionada, en la última década, los niveles de pteridinas en fluidos biológicos como orina y suero humano, se proponen como importantes criterios clínicos en otro tipo de enfermedades, ya que su excreción se ve alterada respecto a los valores normales como consecuencia de diversos procesos patológicos tales como infecciones virales [22] o procesos cancerosos.

Con respecto a los procesos tumorales, recientemente se ha publicado una revisión donde se concluyó que las pteridinas pueden ser biomarcadores de cáncer muy útiles, tanto para su detección como para controlar el curso de la enfermedad [23]. Así, por ejemplo, se han encontrado niveles más elevados de 6HMPT que los del grupo de control en pacientes con tumores cerebrales [24]. Se ha publicado también que los niveles de NEO, PT, XAN y PT6C fueron significativamente más elevados en la orina de pacientes con cáncer, mientras que la concentración de ISO es menor y los niveles de BIO no variaron [25]. Se han comparado los niveles de XAN e ISO entre pacientes con cáncer de mama y de pulmón no encontrándose diferencias significativas entre ellos. En el mismo artículo se muestra que los niveles de BIO, 6HMPT, PT, XAN e ISO fueron más altos en pacientes con cáncer [11]. Otras publicaciones informan de niveles de NEO superiores a los normales en pacientes con cáncer de mama [26,27], cáncer de tiroides [28] o tumores ováricos malignos [29]. Como se expone en una publicación reciente [30] aunque han transcurrido casi cuarenta años desde el descubrimiento de que las concentraciones de NEO aumentan en pacientes con cáncer, no ha sido hasta muy recientemente cuando se ha empezado a establecer su potencial uso como biomarcador. Está descrito que en pacientes con cáncer, el aumento de las concentraciones de NEO en orina o en suero predice un mal pronóstico y su medición podría utilizarse para controlar a los pacientes y prevenir complicaciones [31].

En otro tipo de patologías también se han encontrado niveles alterados, por ejemplo aumento de NEO y de la relación NEO/CREA en pacientes con psoriasis [32] y, de BIO y NEO en niños autistas [33]. También se ha correlacionado la concentración de NEO con la

enfermedad de Alzheimer [34] y con la mononucleosis [35], encontrándose en el primero de los casos que el deterioro cognitivo de la enfermedad se acompaña de un aumento de la concentración de este compuesto en plasma. En el segundo se observa el aumento de la excreción de NEO durante la enfermedad y una disminución drástica cuando desaparece la infección. Muy recientemente [36] se han analizado pteridinas reducidas en líquido cefalorraquídeo de personas en diferentes estados de la enfermedad de Parkinson, encontrándose niveles menores de BH4 en pacientes con síntomas o síntomas esporádicos de la enfermedad frente a los que presentan mutación en el gen pero que aún no presentan síntomas. Además los niveles de NEO total, calculados como la suma de NEO en forma oxidada más todas las formas reducidas, fueron significativamente mayores para los individuos con síntomas constantes de la enfermedad frente a los otros dos estados, lo que indica un aumento de la respuesta inflamatoria en el cerebro de las personas con la enfermedad completamente desarrollada.

### **1.5. Análisis de pteridinas en fluidos biológicos**

En general, la determinación cuantitativa de pteridinas en fluidos biológicos es complicada debido a la baja concentración en la que se encuentran presentes, la baja solubilidad de estos compuestos, su fotolabilidad, su fácil oxidación con el oxígeno del aire y la diversidad de polaridades que presentan. Además, el bajo rendimiento cuántico de fluorescencia de las formas reducidas, a diferencia de las oxidadas, dificulta su determinación mediante detección fluorescente, siendo necesario realizar un paso previo de oxidación para generar las formas fluorescentes.

Con respecto a las técnicas analíticas, la primera técnica de separación que se utilizó para el análisis de pteridinas fue la cromatografía en capa fina [37]. Posteriormente, aunque se han publicado métodos que emplean electroforesis capilar [11,25,38] o cromatografía de gases [39–41] para el análisis de estos compuestos, la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) ha sido la técnica más ampliamente utilizada.

En la Parte I de esta Tesis, se proponen nuevos métodos de análisis de compuestos pteridínicos en fluidos biológicos mediante HPLC, por lo tanto se va a describir más en profundidad los métodos publicados hasta este momento que utilizan esta técnica.

En relación a la detección, la baja concentración en la que se encuentran presentes estos compuestos en los fluidos biológicos, imposibilita su detección mediante

espectrofotometría UV-Visible, ya que no se alcanzan los límites de cuantificación necesarios. Se ha utilizado detección electroquímica (ED) [42], pero fundamentalmente, se han empleado detectores fluorescentes (FLD) y detectores de masas (MS) de distintas modalidades.

Quizás la detección más utilizada en la determinación de pteridinas en fluidos biológicos haya sido la detección fluorescente debido a su alta sensibilidad. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente se necesita un paso previo de oxidación para convertir a las hidropteridinas no fluorescentes en sus formas oxidadas fluorescentes.

El uso de la detección por MS en fluidos biológicos se ha incrementado considerablemente en los últimos años debido a su universalidad, su habilidad para elucidar estructuras y su alta sensibilidad en muchos casos. Esta técnica posee la ventaja de que se pueden determinar las pteridinas en el estado de oxidación en el que son excretadas sin necesidad de pretratamiento previo, sin embargo, el coste de los equipos es considerablemente más elevado y puede no ser accesible por todos los laboratorios de análisis clínicos. Cuando se emplea detección por MS en el análisis de pteridinas la fuente de ionización más ampliamente utilizada es la ionización por electroespray (ESI) debido a que tanto la polaridad como el peso molecular de estos compuestos son los adecuados para emplear esta interfase.

Los fluidos biológicos en los que se han determinado pteridinas han sido sobre todo orina, suero y plasma debido a su fácil muestreo, aunque también ha sido utilizado el líquido cefalorraquídeo [43,44] y hay alguna publicación en la que se usan cultivos celulares [45] o tejidos cardíacos [46]. Recientemente se han publicado tres revisiones donde se describen en profundidad todas las características del análisis de pteridinas en orina [12], suero [47] y líquido cefalorraquídeo [48]. En las siguientes Tablas se muestra un resumen de los métodos cromatográficos recientes más significativos propuestos para el análisis en orina (**Tabla 1.2**) y para el análisis en suero y plasma (**Tabla 1.3**). La información proporcionada se encuentra recogida de forma más extensa, además de en las respectivas publicaciones, en las revisiones publicadas por Koslinski y col. [23], Tomsíková y col. [7] y recientemente por Burton y col. [12] y Espinosa-Mansilla y col. [47].

**Tabla 1.2.** Métodos cromatográficos para la determinación de pteridinas en orina.

Analitos	Tratamiento muestra	Características método cromatográfico	Ref.
NEO, PT, BIO, BH2, BH4	Tampón citrato 10 mM (pH 5.5)	<u>Fase estacionaria:</u> Zorbax Eclipse XDB-C <sub>18</sub> (250 × 4.6 mm, 5µm) <u>Fase móvil:</u> 98% (tampón citrato 10 mM, pH 5.5) y 2% (ACN). Modo isocrático Fotorreactor en modo ON/OFF <u>Detección:</u> FLD ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=272/445$ nm) y DAD (256 nm)	[35]
PT6C, NEO, MON, XAN, ISO, PT, BIO, 7BIO, 6HMPT	Oxidación alcalina I <sub>2</sub> /I <sup>-</sup> Oxidación con KMnO <sub>4</sub>	<u>Fase estacionaria:</u> Zorbax Eclipse XDB-C <sub>18</sub> (250 × 4.6 mm, 5µm) <u>Fase móvil:</u> tampón Tris/HCl 15 mM a pH 6.10 en agua (eluyente A) y tampón Tris/HCl 15 mM a pH 6.40 en agua (eluyente B). Modo gradiente <u>Detección:</u> FLD ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=280/444$ nm) y DAD (230 nm)	[49]
NEO, XAN, ISO, PT, BIO	Ninguno	<u>Fase estacionaria:</u> Zorbax Eclipse XDB-C <sub>18</sub> (250 × 4.6 mm, 5µm) <u>Fase móvil:</u> 10 mM ácido cítrico (pH=5.44)/ACN (94.5/5.5, v/v). Modo isocrático <u>Detección:</u> FLD ( $\lambda_{ex} = 272$ nm / $\lambda_{em} =$ desde 380 hasta 500 nm cada 1 nm) Algoritmo quimiométrico: MCR-ALS	[50, 51]
NEO, MON, ISO, PT, BIO, 7BIO	Oxidación ácida con MnO <sub>2</sub>	<u>Fase estacionaria:</u> LUNA amino (150 × 2.0 mm, 3µm) <u>Fase móvil:</u> 85% (CH <sub>3</sub> CN/0.1% ácido fórmico) y 15% (0.1% ácido fórmico/10 mM formiato amónico). Modo isocrático <u>Detección:</u> MS/MS, ionización negativa, voltaje capilar: -4500 V, presión gas: 45 psi, temperatura: 400 °C	[52]
PT6C, NEO, XAN, ISO, PT, BIO, 6HMPT, 6,7-DMPT	Oxidación alcalina I <sub>2</sub> /I <sup>-</sup>	<u>Fase estacionaria:</u> fenil-hexil (150 × 3.0 mm, 3µm) <u>Fase móvil:</u> 0.1% ácido fórmico en agua (eluyente A) y 0.2% ácido fórmico en ACN (eluyente B). Modo gradiente <u>Detección:</u> MS/MS ionización positiva, voltaje capilar: 5500V, curtain gas: 14 psi, presión gas colisión: 6 psi, GS1: 35 psi, GS2: 35 psi, temperatura fuente: 425 °C	[53]

Tabla 1.2 (continuación).

Analitos	Tratamiento muestra	Características método cromatográfico	Ref.
PT6C, NEO, XAN, ISO, PT, BIO, 6HMPT, 6,7-DMPT	Oxidación alcalina I <sub>2</sub> /I <sup>-</sup> Oxidación con KMnO <sub>4</sub>	<u>Fase estacionaria:</u> LiChrospher C <sub>8</sub> (250 × 4.0 mm, 5µm) <u>Fase móvil:</u> 5% (metanol) y 95% (10 mM tampón fosfato pH 7). Modo isocrático <u>Detección:</u> FLD ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ =280/444 nm) y DAD (215 y 254 nm)	[54, 55]
NEO, BIO, NH <sub>2</sub> , BH <sub>2</sub>	SPE (DSC-MCAX)	<u>Fase estacionaria:</u> BEH amida (100 × 2.1 mm, 1.7µm) <u>Fase móvil:</u> 15% (50 mM acetato amónico, pH 6.8) y 85% (ACN). Modo isocrático <u>Detección:</u> FLD ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ =353/438 nm) y DAD (253 nm)	[56]
NEO, PT, BIO	Oxidación ácida con MnO <sub>2</sub>	<u>Fase estacionaria:</u> Nucleosil C <sub>18</sub> (150 × 3.2 mm, 5µm) <u>Fase móvil:</u> 97% (10 Mm KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) y 3% (metanol). Modo isocrático <u>Detección:</u> FLD ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ =250/450 nm) y DAD ( $\lambda$ =250 nm)	[29]
PT6C, NEO, MON, XAN, ISO, PT, SEP, BIO, 6MPT, 6HMPT, 6,7-DMPT, XH <sub>2</sub> , BH <sub>2</sub>	ninguno	<u>Fase estacionaria:</u> LUNA fenil (150 × 3.0 mm, 3µm) <u>Fase móvil:</u> 0.025% ácido fórmico en 99% agua/1% nitrilo (eluyente A) y metanol (eluyente B). Modo gradiente <u>Detección:</u> ESI-MS/MS ionización positiva, voltaje capilar: 5500V, curtain gas: 45 psi N <sub>2</sub> , GS1: 25 psi N <sub>2</sub> , GS2: 35 psi N <sub>2</sub> , temperatura fuente: 600 °C	[57]
PT6C, NEO, XAN, ISO, PT, SEP, BIO, 7MPT, 6,7-DMPT, DMH4PT, NH <sub>2</sub> , BH <sub>2</sub> , BH <sub>4</sub> , d <sub>3</sub> -BIO, <sup>13</sup> C <sub>5</sub> -NEO	ninguno	<u>Fase estacionaria:</u> ZIC-HILIC (100 × 2.1 mm, 3.5 µm) <u>Fase móvil:</u> 14 mM formiato amónico, pH 6.8 (eluyente A) y ACN (eluyente B). Modo gradiente <u>Detección:</u> ESI-MS/MS ionización positiva, voltaje capilar: 5500V, curtain gas: 30 psi N <sub>2</sub> , GS1: 40 psi N <sub>2</sub> , GS2: 60 psi N <sub>2</sub> , temperatura fuente: 600 °C	[58]

SEP: sepiapterin; 6,7-DMPT: 6,7-dimetilpterin; XH<sub>2</sub>: 7,8-dihidroantopterin; DMH4PT: 6,7-dimetiltetrahydropterin

Cabe mencionar que en las Tablas solamente se muestran los compuestos pteridínicos analizados, aunque en algunos de los casos, otros compuestos, como por ejemplo lumazinas o la creatinina (CREA), también están incluidos en el método cromatográfico. Además, solamente se han mostrado métodos en los que se han analizado varias pteridinas, sin embargo, existen numerosos métodos en los que se determina una única pteridina que suele ser NEO o BIO y los niveles encontrados se relacionan con diversas patologías como ya se ha indicado anteriormente.

Con respecto al tratamiento de la muestra, no se han incluido los procesos de centrifugación, dilución o filtrado, ya que estos están presentes en casi todos ellos. Finalmente, en los que se han ensayado varias columnas o fases móviles, solamente se muestran las que proporcionan mejores resultados.

Con frecuencia se han utilizado derivados pteridínicos tales como 6MPT [59] y 6,7-DMPT que no se encuentran en las muestras de orina, como patrón interno.

En cuanto a la preparación de las muestras de orina hay una serie de aspectos comunes que se aplican en todos los métodos propuestos. Estos incluyen en primer lugar las condiciones de almacenamiento de la muestra desde su recogida hasta su análisis. Debido a las características de las pteridinas las muestras de orina deben ser mantenidas en la oscuridad y a temperatura baja hasta su análisis. Los valores de la temperatura de almacenamiento indicados en la bibliografía varían desde -70 °C hasta 20 °C [7]. Además, es necesario un proceso de centrifugación y filtración para eliminar los sedimentos de la orina. Por último, las muestras de orina en general son diluidas antes de su inyección en el sistema cromatográfico, entre otras cosas para reducir el efecto matriz, variando el factor de dilución para cada método cromatográfico propuesto según la sensibilidad del mismo.

Con respecto a la oxidación de las dihidro- y tetrahidropteridinas para generar sus formas fluorescentes y poder ser analizados con detección fluorimétrica, se pueden distinguir distintos tipos de agentes oxidantes. Además, también se puede distinguir entre oxidación pre-columna y post-columna.

El método de oxidación química clásicamente empleado es el propuesto por Trehan y col. [60], que utiliza  $I_2/I^-$  como agente oxidante y que se basa en un método propuesto anteriormente por Fukushima y Nixon [61]. Si la oxidación se lleva a cabo en medio ácido, BH4 y BH2 se transforman en su forma oxidada BIO y todas las formas presentes de este compuesto son cuantificadas como BIO total. En cambio, bajo condiciones básicas, el BH2 se

transforma en BIO, mientras que el BH4 se oxida a PT. Así, si se realiza la oxidación en ambas condiciones, se puede conocer el contenido original de BH4 en la muestra [62].

Durán Merás y col. [63] revisaron el método de Trehan y col. (oxidación con  $I_2/I^-$  en medio alcalino) y concluyeron que las muestras no se oxidaban completamente y propusieron un método de oxidación alternativo en el que se utiliza  $KMnO_4$   $10^{-3}$  M, a pH 5, durante 35 minutos. También se ha propuesto una oxidación ácida con dióxido de manganeso mediante el cual todas las hidopterinas se transforman en sus formas totalmente oxidadas [52].

Estos métodos se han utilizado como métodos previos antes de realizar la separación cromatográfica, pero también se ha descrito algún método on-line de oxidación química postcolumna [64,65] usando nitrito de sodio.

Una alternativa a la oxidación química, es la fotoirradiación ultravioleta, que ha sido utilizada para la conversión de BH4 y BH2 a BIO [34, 64, 65]. Espinosa-Mansilla y col. [66] propusieron un nuevo método de oxidación mediante fotoirradiación UV en modo off-line y posteriormente Cañada-Cañada y col. [35] desarrollaron un nuevo método usando un fotorreactor postcolumna en línea para generar fluorescencia inducida. Los autores propusieron el uso de un fotorreactor online situado entre el DAD y el detector FLD. NEO, BIO, PT y BH2 se determinaron por medida de la fluorescencia nativa, usando el fotorreactor en modo OFF, y el BH4 se determinó midiendo la fluorescencia del fotoproducto generado cuando se usa el fotorreactor en modo ON.

Tomsiková y col. [68] en una revisión publicada en 2013 muestran en detalle todas las condiciones usadas en los diferentes tipos de oxidación.

Por último, en algunos casos también se ha utilizado un proceso de extracción en fase sólida (SPE) como procedimiento de limpieza de la muestra de orina. Tomšíková y col. [56] estudiaron tres tipos de rellenos: Oasis HLB (polímero con fase hidrofílica y lipofílica balanceada), HyperSep Hypercarb (carbón grafito poroso) y DSC-MCAX (relleno de tipo mixto, por combinación de fase inversa  $C_8$  e intercambio catiónico), con el que se encontraron los mejores resultados.

Las separaciones cromatográficas de las pteridinas se han realizado, fundamentalmente en fase inversa con columnas C18 o C8 en la mayoría de los casos. Las fases móviles para estas separaciones generalmente consistieron en mezcla de fases acuosas con un pequeño porcentaje de algún componente orgánico como acetonitrilo (ACN)

o metanol. Cuando se utiliza detección de masas en modo positivo, se añade una pequeña cantidad de ácido fórmico a las fases móviles para facilitar la ionización de los compuestos. Un factor clave en la separación de las pteridinas es el pH de la fase móvil, ya que la acidez del medio afecta drásticamente a los factores de capacidad de los compuestos pteridínicos.

Por otro lado, las columnas de interacción hidrofílica (HILIC) se han convertido en una alternativa a la fase inversa ya que proporcionan una alta selectividad y alta retención para compuestos polares. Nováková y col. [69] estudiaron la separación de un grupo de pteridinas en varias columnas HILIC encontrándose que la columna BEH amida proporcionó suficiente retención y selectividad para los cuatro analitos ensayados (BIO, BH2, NEO, NH2). Esta columna fue usada posteriormente por Tomsikova y col. [56] para cuantificar estos cuatro analitos en muestras de orina. Más recientemente Xiong y col. [70] han analizado también diferentes tipos de columnas HILIC incluyendo fases de tipo neutro (diol y amida), catiónico (triazol), aniónico (sílica gel) y zwitteriónico (ZIC HILIC) y los resultados indican que el mecanismo de retención de las pteridinas en estas fases estacionarias se debe a una combinación entre interacciones por partición e interacciones electrostáticas o por enlaces de hidrógeno. La fase zwitteriónica fue la que proporcionó mayor retención y más alta selectividad en la separación de estos compuestos. El mismo autor ha publicado en el último año el empleo de esta columna para determinar doce pteridinas en orina usando detección de masas [58]. Este tipo de columnas puede abrir un nuevo campo en el desarrollo de métodos cromatográficos para la determinación de pteridinas.

En cuanto a la detección, como se dijo anteriormente, los dos detectores más utilizados en el análisis de pteridinas en fluidos biológicos han sido el FLD y el MS. Son muchos los métodos que han utilizado la fluorescencia como detección empleando diferentes tipos de oxidaciones de la muestras. En algunos casos se ha combinado con análisis quimiométrico utilizando datos espectrales de segundo orden y el algoritmo quimiométrico MCR-ALS para cuantificar separadamente los analitos que coeluyen [50,51].

La detección por masas se ha empezado a utilizar en la última década en el análisis de pteridinas. Sin embargo, aunque ya se había publicado algún artículo en el que se empleaba HPLC-MS, por ejemplo para el análisis individual de 6HMPT en tomate [71] y para la evaluación de las columnas HILIC, no es hasta la publicación del primer artículo incluido en esta Memoria cuando se ha utilizado por primera vez para el análisis de todas las pteridinas consideradas como biomarcadoras en muestras de orina. Posteriormente, como se observa en la tabla, han sido varios los artículos publicados en los que se usan espectrometría de



masas como detección, permitiendo la determinación de un gran número de pteridinas tanto oxidadas como reducidas. Todos los métodos que usan detección de masas, excepto el desarrollado por Allegri y col. [52] utilizan ionización positiva en el ESI.

Entre estos dos sistemas de detección fluorimétrica y de masas, no es fácil establecer una elección prioritaria, ya que dependerá del objetivo de la determinación, de la sensibilidad necesaria e incluso de las capacidades del laboratorio de análisis.

Una última cuestión a tener en cuenta es que los contenidos de estos metabolitos en orina se deben calcular respecto a un compuesto de referencia que normalice la excreción. Este compuesto es la creatinina (CREA), compuesto naturalmente presente en la orina. De esta forma se evita la necesidad de recolectar las muestras de orina durante 24 horas. La CREA se ha establecido como el mejor patrón de referencia para normalizar la excreción de la mayoría de los metabolitos en orina. Algunos métodos descritos en la bibliografía para la determinación de pteridinas incluyen la separación de la CREA junto con las pteridinas y su determinación mediante detección UV a 230 nm [29,35,49,51,54,56,72] o también mediante la detección de masas [53]. En otros casos se procede a su determinación independientemente mediante alguno de los métodos clásicos descritos tal como el método de Jaffe [73].

Todas estas diferencias en los pretratamientos de las muestras (oxidación, dilución...) y las diferencias en las técnicas analíticas hacen que los niveles de los derivados pteridínicos en muestras de orina no patológicas publicados varíen considerablemente lo que dificulta el establecimiento de unos valores de referencia para estos compuestos en individuos sanos.

Con respecto a las muestras de suero, es necesario destacar que mientras que son numerosas las referencias para el control de pteridinas en orina, los datos sobre el análisis de estos analitos en suero son más escasos. Este hecho se debe principalmente a la baja concentración presente en suero y a la mayor complejidad de la matriz, existiendo por tanto gran cantidad de compuestos potencialmente interferentes.

En la **Tabla 1.3** se resumen los métodos cromatográficos para el análisis en suero y plasma. En primer lugar, hay que tener en cuenta que, en la muestra de suero antes de su inyección en el sistema cromatográfico, es necesario eliminar las proteínas. En algunos de los casos se ha realizado la separación mediante centrifugación o ultrafiltración pero en la mayoría de los métodos propuestos se ha realizado la precipitación ácida de las proteínas. La oxidación ácida o alcalina con  $I_2/I^-$  también se ha utilizado en algunos de los métodos para

transformar las hidropterinas a sus formas fluorescentes y en algunos de los casos un último paso de limpieza de la muestra mediante columnas de intercambio catiónico [74] o SPE [75] fue necesario.

**Tabla 1.3.** Métodos cromatográficos propuestos para la determinación de pteridinas en suero y plasma.

Analitos	Tratamiento muestra	Características método cromatográfico	Ref.
NEO BIO	Oxidación ácida I <sub>2</sub> /I <sup>-</sup> Columna de intercambio catiónico	<u>Fase estacionaria:</u> Excalibur octadecilsilano (ODS) (250 × 4.5 mm, 5µm) <u>Fase móvil:</u> 85% (agua) y 15% (metanol). Modo isocrático <u>Detección:</u> FLD	[74]
NEO	Incubación en nitrato férrico/EDTA SPE (SCX Bond-Elut)	<u>Fase estacionaria:</u> Excel octadecilsilano (250 × 4.5 mm, 5µm) <u>Fase móvil:</u> 98% (50 mM fosfato potásico, pH 6.0) y 98% metanol. Modo isocrático <u>Detección:</u> FLD (λ <sub>ex</sub> /λ <sub>em</sub> =360/440 nm)	[75]
NEO	Separación proteínas por ultrafiltración	<u>Fase estacionaria:</u> Ultrasphere ODS (250 × 4.6 mm, 5µm) <u>Fase móvil:</u> 98% (0.015 M tampón fosfato, pH 6.4) y 98% metanol. Modo isocrático <u>Detección:</u> FLD (λ <sub>ex</sub> /λ <sub>em</sub> =340-370/430-470 nm)	[76]
NEO	Precipitación por centrifugación	Cromatografía bidimensional <u>Fase estacionaria:</u> LiChrospher C18 (35 × 4 mm, 5µm) y LiChroCART C18 (125 × 4 mm, 5µm) <u>Fase móvil:</u> 9 mM acetato sódico, pH 5.1 (eluyente A), etanodiol:2-propanol, 75:25 (eluyente B) y acetonitrilo:1-propanol, 65:35 (eluyente C). Modo gradiente <u>Detección:</u> FLD (λ <sub>ex</sub> /λ <sub>em</sub> =353/438 nm)	[77]
NEO	Precipitación ácida (HClO <sub>4</sub> )	<u>Fase estacionaria:</u> Nucleosil C18 (150 × 4.6 mm, 3µm) <u>Fase móvil:</u> 15 mM tampón fosfato potásico, pH 6.4. Modo isocrático <u>Detección:</u> FLD (λ <sub>ex</sub> /λ <sub>em</sub> =353/438 nm)	[78]

Tabla 1.3 (continuación).

Analitos	Tratamiento muestra	Características método cromatográfico	Ref.
NEO	Precipitación ácida (TCA)	Fase estacionaria: spherisorb C18 (250 × 4.6 mm, 5µm) Fase móvil: 99% (agua) y 1% (ACN) Detección: FLD ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=353/438$ nm)	[79]
BIO BH4	Precipitación ácida (TCA) Oxidación alcalina y ácida I <sub>2</sub> /I <sup>-</sup>	Fase estacionaria: Hypersil C18 (200 × 2.1 mm, 5µm) Fase móvil: 15 mM tampón fosfato potásico, pH 6.45 (eluyente A) y metanol (eluyente B) Modo gradiente Detección: FLD ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=360/435$ y 440 nm)	[8]
BIO BH4	Oxidación fotoquímica offline en medio ácido	Fase estacionaria: Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 × 4.6 mm, 5µm) Fase móvil: 99% (10 mM ácido cítrico, pH 5.5) y 1% (ACN) Modo isocrático. Detección: FLD ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=272/435$ y 444 nm) y DAD ( $\lambda=256, 272$ y 330 nm)	[66]

En la literatura, y como se puede observar de los datos recogidos en la **Tabla 1.3**, la determinación de una sola o dos pteridinas en plasma o suero es frecuente, pero hay muy pocos datos sobre el análisis de todas las pteridinas marcadoras.

Con respecto a los métodos cromatográficos la gran mayoría se basan en una separación mediante fase inversa y detección fluorescente. No se ha encontrado ningún método en el que utilice la detección por masas para la determinación de pteridinas en suero.

Entre las perspectivas de futuro se pueden encontrar la utilización de columnas HILIC o solventar las limitaciones en la selectividad y la necesidad de tratamientos previos con el empleo de herramientas quimiométricas usando datos de segundo orden y superior.

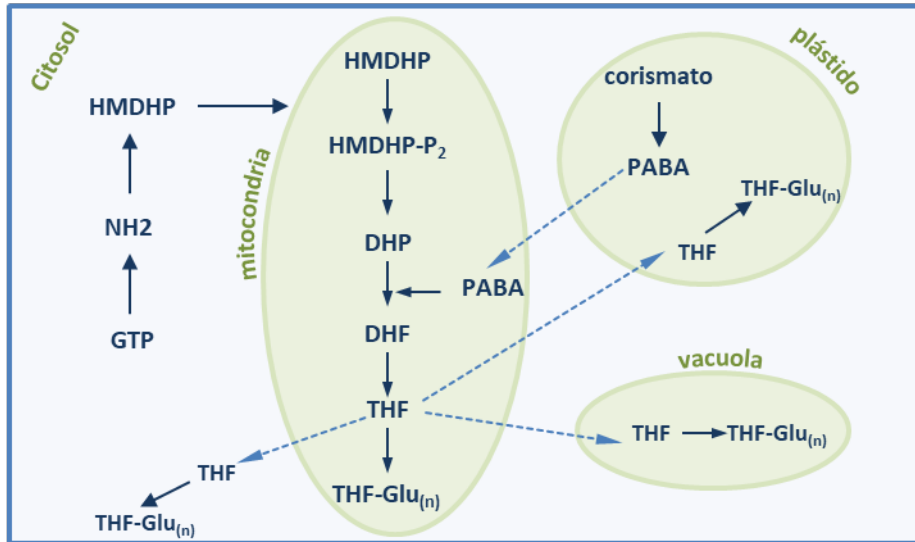
### **1.6. Pteridinas como precursores de folatos en tejidos vegetales. concepto de biofortificación**

Desde 1998, la *Food and Drug Administration* (FDA) comenzó, con carácter preventivo, un protocolo de adición de AF a ciertos alimentos con objeto de establecer los niveles en suero y plasma de la población y posteriormente estudiar la influencia del mismo sobre la incidencia de ciertas enfermedades [80]. Estas campañas se han puesto en marcha como consecuencia de la constatación de los efectos beneficiosos del consumo de estos derivados, que generan una menor incidencia de defectos del tubo neuronal neonatal [81]. La importancia de los folatos en el organismo se tratará con más detalle en la introducción de la Parte II de esta Memoria.

Recientemente, en lugar de la adición de ácido fólico a los alimentos, las investigaciones biotecnológicas más actuales se dirigen a la modificación genética de los alimentos vegetales, con objeto de que contengan mayor cantidad de AF. A este proceso se le denomina *biofortificación*. El desarrollo de alimentos biofortificados con objeto de producir cantidades suficientes para asegurar la adecuada ingesta de folatos, es uno de los objetivos fundamentales en el desarrollo alimentario. En concreto, hay mucho interés en la ingeniería de las plantas para aumentar su contenido en ácido fólico debido a que son la mayor fuente de folatos para los humanos [82].

En las células vegetales, las pteridinas se sintetizan en el citosol a partir de la guanosina trifosfato (GTP), después se unen al ácido p-aminobenzoico (PABA) en la mitocondria para formar un dihidropteroato, el cuál es posteriormente glutamilado y reducido. El PABA parece tener un origen plastidial, debido a que la primera enzima de su síntesis (aminodeoxicorismato sintasa) se localiza en los cloroplastos [83]. Una detallada descripción de cada uno de los pasos es descrita en una revisión publicada recientemente por Gorelova y col. [84].

Un esquema muy sencillo de la síntesis de folatos se muestra en la **Figura 1.7**.



**Figura 1.7.** Esquema de la biosíntesis de folatos en plantas.

GTP: guanosina trifosfato; NH<sub>2</sub>: dihidoneopterin; HMDHP: 6-hidroximetildihidropterin; HMDHP-P<sub>2</sub>: 6-hidroximetildihidropterin pirofosfato; DHP: dihidropteroato; DHF: dihidrofolato; THF: tetrahidrofolato; THF-Glu<sub>(n)</sub>: tetrahidrofolato poliglutamato; PABA: ácido para-aminobenzóico.

Se han descrito varias estrategias para aumentar la síntesis de folatos y su acumulación en las plantas, a través de procesos de biofortificación. Una de estas opciones es la sobreexpresión de enzimas que intervienen en procesos limitantes de la biosíntesis de folatos [85–87].

Recientemente se ha investigado la alteración enzimática de la producción de pteridinas precursoras, con objeto de generar así un aumento en la producción del ácido fólico. Diversas publicaciones estudian la relación entre los contenidos de pteridinas precursoras presentes inicialmente, con los contenidos de AF formados en alimentos que han sido genéticamente modificados.

Hossain y col. [88] proponen que un aumento de la GTP ciclohidrolasa I, la primera enzima de la síntesis de pteridinas, genera una acumulación de pteridinas y como consecuencia un aumento de la producción de folatos en ciertos cultivos. Concretamente la introducción de GTP ciclohidrolasa I (obtenida de *Escherichia coli*) en *Arabidopsis thaliana*

(una planta herbácea) generó un aumento de 1250 veces para pteridinas y de 2 a 4 veces para folatos respectivamente. En el mismo año, Díaz de Garza y col. [71], usan tomates como fruto de ensayo e indican que la capacidad de síntesis de pteridinas disminuye en el fruto maduro, y este descenso puede ser modificado por la sobreexpresión específica de la GTP ciclohidrolasa I. Sin embargo, aunque los niveles de AF se incrementaron significativamente, los niveles de PABA y pteridinas son todavía altos, lo que implica que hay otras sustancias que inhiben la síntesis de folatos en vegetales transgénicos. Los autores informan de un aumento de 3-140 veces la concentración de pteridinas y de solo 2 veces la de folatos. En ambos casos, el cantidad de PABA libre en la planta se agotó y se observó un aumento del contenido de folatos entre 2.5 y 10 veces mayor al suplementar la planta con PABA exógeno.

Por ello, un paso más adelante ha sido intentar aumentar la producción de pteridinas en tomates a la vez que la de PABA. Combinan así la acción de una modificada aminodeoxicorismato sintasa para aumentar la producción de PABA y la modificación antes comentada de la GTP ciclohidrolasa I, para aumentar la producción de pteridinas [89]. La fruta transgénica obtenida mediante estas modificaciones si acumulaba cantidades notables de folatos del orden de 840  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ , aproximadamente 25 veces más que en el fruto no modificado genéticamente. En concreto los tomates acumulaban más de siete veces los contenidos en folatos considerados como normales en vegetales de hoja verde. También se llevaron a cabo estudios de biofortificación de folatos en arroz presentando resultados similares [90].

En dos revisiones publicadas en 2007 se resumen los aspectos más relevantes sobre los procesos de biofortificación que se realizaron hasta esa fecha en arroz, tomate y *Arabidosis* [91,92] y se propone que estos métodos de biofortificación son útiles y que se podrían utilizar en otro tipo de vegetales.

Más tarde, se empezó a aplicar la biofortificación de folatos de forma similar a otras matrices como maíz [93], lechuga [94], frijoles [95] o patata [96], aunque en este último cultivo no se produjo un aumento considerable del contenido de folatos.

En los estudios en los que se combina la sobreexpresión de las dos enzimas, aunque el aumento del contenido de folatos sea mucho mayor que en los primeros estudios, los niveles de PABA y pteridinas aún son elevados en comparación con las plantas no modificadas, lo que indica que hay un cuello de botella adicional en contra de una mayor acumulación de tetrahidrofolato.

Recientemente, se han publicado diversos artículos de revisión donde se resumen las principales estrategias empleadas en la biofortificación de folatos y se proponen nuevas para solventar los problemas encontrados. Estas nuevas estrategias se basan en la sobreexpresión de las dos enzimas anteriormente mencionadas además de incidir en otras enzimas responsables de pasos mitocondriales de la síntesis de folatos [84,97]. También se han publicado otros artículos de investigación donde estas nuevas estrategias de biofortificación se han aplicado con resultados satisfactorios [98].

### **1.7. Métodos cromatográficos para el análisis de pteridinas en alimentos vegetales**

Teniendo en cuenta el futuro incremento de la biofortificación de folatos en alimentos de origen vegetal, es de gran importancia el análisis de las pteridinas precursoras, tanto desde un punto de vista identificativo como cuantitativo, con objeto de llevar a cabo su control a lo largo de todo el proceso y con objeto de evaluar su acumulación en los tejidos y relacionarlos con los contenidos de folatos presentes.

Son escasos los trabajos relacionados con el análisis de pteridinas en tejidos vegetales. La escasez de estos datos contrasta con la variedad de información sobre dichos compuestos tanto en tejidos animales como fluidos biológicos.

En la mayoría de los trabajos revisados se emplea la detección fluorimétrica. En uno de los primeros trabajos se cuantificó el contenido de pteridinas en judías, plátanos y espinacas mediante detección fluorimétrica y se obtuvieron patrones característicos de pteridinas en cada producto [99].

Posteriormente, Díaz de la Garza y col. [71], propusieron un método mediante HPLC con detección fluorimétrica para la determinación de pteridinas y PABA en tomates biofortificados, donde se llevó a cabo un pretratamiento de las muestras, usando una extracción líquido-líquido, seguido por una preoxidación ácida con  $I_2/I^-$  de la muestra previamente extraída, de esta forma se transforman todas las pteridinas en sus formas fluorescentes y ya no pueden ser identificados ni cuantificados en su estado de oxidación natural. Las pteridinas que se encontraban en mayor concentración en el tomate genéticamente modificado fueron NEO, MON, 6HMPT y PT6C. En las muestras de tomate sin modificar el perfil de pteridinas fue similar pero en mucha menor concentración. Este mismo método fue utilizado posteriormente por los mismos autores pero expresando el contenido total de pteridinas como 6HMPT [89], pero no proporcionaron el contenido individual de

pteridinas. También este mismo método fue utilizado para determinar el contenido de pteridinas en judías encontrándose que los compuestos más abundantes fueron PT y NEO [95]. Otro método empleando HPLC-FLD fue aplicado a extractos de *Arabidopsis thaliana* transgénico expresando el contenido total de pteridinas como NEO [88].

Si los trabajos con detección fluorescente son escasos, más aún lo son los que utilizan la detección de espectrometría de masas para la determinación de pteridinas en vegetales. Se ha aplicado la cromatografía de líquidos con detección de masas de triple cuadrupolo para determinar pteridinas en patatas y en *Arabidopsis thaliana* después de un estudio de biofortificación [96,100] y el mismo método fue aplicado recientemente en un artículo sobre la degradación de pteridinas durante la preparación de las muestras [101].

Otros estudios reflejan que las plantas contienen pequeñas cantidades de NH<sub>2</sub> y 6-hidroximetil-7,8-dihidropteridina (6HMDHPT) ambos detectados como sus formas oxidadas, NEO y 6HMPT [102] o que en espinacas, guisantes y tomates se han encontrado cantidades cuantificables de NEO, MON, 6HMPT y PT6C, siendo su contenido total de 1 nmol g<sup>-1</sup> [103].

A modo de resumen en la **Tabla 1.4** se exponen las principales características de los métodos descritos hasta ahora para la determinación de pteridinas en vegetales.

Dado el interés que estos compuestos tienen tanto en fluidos biológicos como en vegetales, en esta Tesis Doctoral se han desarrollado métodos mediante HPLC para la cuantificación de pteridinas en orina con detección de espectrometría de masas, pteridinas en suero mediante detección fluorimétrica y pteridinas en vegetales, particularmente en tomates como cultivo tipo utilizado en procesos de biofortificación, mediante detección de espectrometría de masas.



**Tabla 1.4.** Métodos cromatográficos para la determinación de pteridinas en vegetales.

Analitos	Matriz	Características método cromatográfico	Ref.
PT6C, NEO, MON, XAN, BIO, ISO, 6HMPT	Plátano, judías, nuez, cereales, hojas, jalea real	<u>Fase estacionaria:</u> SS-10 ODS-B (250 x4.6 mm, 10 $\mu$ m) <u>Fase móvil:</u> 5% metanol <u>Detección:</u> fluorescente ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 365/465 nm)	[99]
Expresado como NEO	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<u>Fase estacionaria:</u> Coulter C18 RP column <u>Fase móvil:</u> no dice <u>Detección</u> fluorescente ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 365/446 nm) Absorbancia a 280 y 330 nm	[88]
PT, PT6C, NEO, MON, 6HMPT	Tomate judías	<u>Fase estacionaria:</u> Ultremex C18 IP column (250 x4.6 mm, 5 $\mu$ m) or Synergi Fusion-RP 80 column (250 x4.6 mm, 4 $\mu$ m) <u>Fase móvil:</u> 10 mM Na-phosphate (pH 6.0) <u>Detección</u> fluorescente ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 350/450 nm)	[71,89,95]
NH <sub>2</sub> , 6HMDHP, NEO, XAN, 6HMPT, 6FPT, PT6C, PT	<i>Arabidopsis thaliana</i> Patata	<u>Fase estacionaria:</u> Acquity HSS T3 C18 column (150 x 2.1 mm, 1.8 $\mu$ m) <u>Fase móvil:</u> A: 0.1% ácido acético en agua, B: 0.1% ácido acético en ACN. Modo gradiente <u>Detección:</u> ESI-MS/MS ionización positiva, voltaje capilar: 5500V, temperatura fuente: 500 °C	[97, 101, 102]

### 1.8. Bibliografía

- [1] J.A. Elvidge, L.M. Jackman, Studies of aromaticity by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Part I. 2-pyridones and related systems, *J. Chem. Soc. O* (1961) 859–866.
- [2] W. Pfeleiderer, Pteridines. Properties, Reactivities and Biological Significance, *J. Heterocycl. Chem.* 29 (1992) 583–605.
- [3] A.R. Katritzky, C.A. Ramsdem, J.A. Joule, V. V. Zhdankin, *Handbook of Heterocyclic Chemistry*, 3rd ed., Elsevier, 2010.
- [4] A. Mancha de Llanos, Nuevas estrategias analíticas para la determinación de pteridinas biomarcadoras en fluidos biológicos mediante métodos separativos y quimiométricos., Universidad de Extremadura, 2010.
- [5] A.H. Thomas, C. Lorente, A.L. Capparelli, M.R. Pokhrel, A.M. Braun, E. Oliveros, Fluorescence of pterin, 6-formylpterin, 6-carboxypterin and folic acid in aqueous solution: pH effects., *Photochem. Photobiol. Sci.* 1 (2002) 421–426.
- [6] W. Pfeleiderer, Chemistry and properties of dihydropterins, in: W. Pfeleiderer, H. Wachter, J.A. Blair (Eds.), *Biochem. Clin. Asp. Pteridines*, 1987.
- [7] H. Tomšíková, P. Tomšík, P. Solich, L. Nováková, Determination of pteridines in biological samples with an emphasis on their stability, *Bioanalysis.* 5 (2013) 2307–2326.
- [8] D. Fekkes, A. Voskuilen-Kooijman, Quantitation of total biopterin and tetrahydrobiopterin in plasma, *Clin. Biochem.* 40 (2007) 411–413.
- [9] J. Rebelo, G. Auerbach, G. Bader, A. Bracher, H. Nar, C. Hösl, N. Schramek, J. Kaiser, A. Bacher, R. Huber, M. Fischer, Biosynthesis of pteridines. Reaction mechanism of GTP cyclohydrolase I, *J. Mol. Biol.* 326 (2003) 503–516.
- [10] G. Schoedon, J. Troppmair, A. Fontana, C. Huber, H. Curtius, A. Niederwieser, Biosynthesis and metabolism of pterins in peripheral blood mononuclear cells and leukemia lines of man and mouse, *Eur. J. Biochem.* 166 (1987) 303–310.
- [11] S. Gamagedara, S. Gibbons, Y. Ma, Investigation of urinary pteridine levels as potential biomarkers for noninvasive diagnosis of cancer, *Clin. Chim. Acta.* 412 (2011) 120–128.

- 
- [12] C. Burton, Y. Ma, The role of urinary pteridines as disease biomarkers, *Pteridines*. 28 (2017) 1–21.
- [13] E.R. Norris, J.J. Majnarich, Cell proliferation accelerating and inhibiting substances in normal and cancer blood and urine, *Exp. Biol. Med.* 70 (1949) 229–234.
- [14] E.L. Patterson, M. Von Saltza, E. Stokstad, The isolation and characterization of a pteridine required for the growth of crithidia fasciculata<sup>1</sup>, *J. Am. Chem. Soc.* 78 (1956) 5871–5873.
- [15] J.A. Blair, Isolation of isoxanthopterin from human urine, *Biochem. J.* 68 (1958) 385–387.
- [16] A. Sakurai, M. Goto, Neopterin: isolation from human urine., *J. Biochem.* 61 (1967) 142–145.
- [17] J.L. Dhondt, J.M. Hayte, J.P. Farriaux, Metabolism of non-conjugated pteridines in man, *Pathol. Biol. (Paris)*. 37 (1989) 283–295.
- [18] B. Thöny, G. Auerbach, N. Blau, Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions., *Biochem. J.* 347 (2000) 1–16.
- [19] K. Watschinger, M.A. Keller, G. Golderer, M. Hermann, M. Maglione, B. Sarg, H.H. Lindner, A. Hermetter, G. Werner-Felmayer, R. Konrat, N. Hulo, E.R. Werner, Identification of the gene encoding alkylglycerol monooxygenase defines a third class of tetrahydrobiopterin-dependent enzymes., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 13672–13677.
- [20] G. Bjelakovic, T. Jevtovic-Stoimenov, B. Bejelakovic, I. Stajanovic, Biochemical functions and clinical importance of unconjugated pteridines, *FACTA Univ. Med Biol.* 11 (2004) 49–54.
- [21] M. Martinez Pardo, A. Bélanger Quintana, M.J. García Muñoz, L. Desviat, B. Pérez, M. Ugarte, Protocolo de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las hiperfenilalaninemias, *Asoc. Española Para El Estud. Los Errores Congénitos Del Metab. AECOM.* (2008).
- [22] D. Fuchs, A. Krämer, G. Reibnegger, E.R. Werner, M.P. Dierich, J.J. Goedert, H. Wachter, Neopterin and beta 2-microglobulin as prognostic indices in human immunodeficiency virus type 1 infection., *Infection*. 19 Suppl.2 (1991) 98–102.

- [23] P. Koslinski, R. Bujak, E. Dagher, M.J. Markuszewski, Metabolic profiling of pteridines for determination of potential biomarkers in cancer diseases, *Electrophoresis*. 32 (2011) 2044–2054.
- [24] S. Manjula, A.R. Aroor, A. Raja, S. Rao, A. Rao, Urinary excretion of pseudouridine in patients with brain tumours, *Acta Oncol. (Madr)*. 32 (1993) 29–31.
- [25] F. Han, B.H. Huymh, S. Honglan, L. Bingcheng, Y. Ma, Pteridine analysis in urine by capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1265–1269.
- [26] H. Kalábová, L. Krčmová, M. Kašparová, J. Plíšek, J. Laco, R. Hýspler, H. Klozová, D. Solichová, B. Melichar, Prognostic significance of increased urinary neopterin concentrations in patients with breast carcinoma, *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 32 (2011) 525–529.
- [27] O. Yuksel, T.T. Sahin, G. Girgin, H. Sipahi, K. Dikmen, O. Samur, A. Barak, E. Tekin, T. Baydar, Neopterin, catalase and superoxide dismutase in females with benign and malignant breast tumors, *Pteridines*. 18 (2007) 132–138.
- [28] S.S. Inancli, S. Caner, F. Balkan, A.A. Tam, G. Guler, R. Erosy, B. Cakir, Urinary neopterin levels in patients with thyroid cancer, *Indian J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 66 (2014) 302–308.
- [29] M. Zvarik, D. Martinicky, L. Hunakova, L. Sikurova, Differences in pteridine urinary levels in patients with malignant and benign ovarian tumors in comparison with healthy individuals, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 153 (2015) 191–197.
- [30] B. Melichar, M. Spisarová, M. Bartoušková, L.K. Krčmová, L. Javorská, H. Študentová, Neopterin as a biomarker of immune response in cancer patients, *Ann. Transl. Med.* 5 (2017) 280–280.
- [31] A.B. Engin, R.O. Gunaydin, S.A. Kesikli, D. Fuchs, A.S. Hosal, Serum neopterin concentrations and tryptophan degradation pattern in patients with late stage larynx carcinoma, *Pteridines*. 28 (2017) 91–95.
- [32] C.C. Harland, R.P. Whitaker, J.L. Barron, C.A. Holde, Increased urine neopterin levels in psoriasis, *Br. J. Dermatol.* 127 (1992) 453–457.
- [33] S. Messahel, A.E. Pheasant, H. Pall, J. Ahmed-Choudhury, R.S. Sungum-Paliwal, P. Vostanis, Urinary levels of neopterin and biopterin in autism, *Neurosci. Lett.* 241

- (1998) 17–20.
- [34] I. Blasko, G. Knaus, E. Weiss, G. Kemmler, C. Winkler, G. Falkensammer, A. Griesmacher, R. Würzner, J. Marksteiner, D. Fuchs, Cognitive deterioration in Alzheimer's disease is accompanied by increase of plasma neopterin, *J. Psychiatr. Res.* 41 (2007) 694–701.
- [35] F. Cañada-Cañada, A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña, A. Mancha de Llanos, Determination of marker pteridins and biopterin reduced forms, tetrahydrobiopterin and dihydrobiopterin, in human urine, using a post-column photoinduced fluorescence liquid chromatographic derivatization method, *Anal. Chim. Acta.* 648 (2009) 113–122.
- [36] H. Ichinose, K. ichi Inoue, S. Arakawa, Y. Watanabe, H. Kurosaki, S. Koshiba, E. Hustad, M. Takada, J.O. Aasly, Alterations in the reduced pteridine contents in the cerebrospinal fluids of LRRK2 mutation carriers and patients with Parkinson's disease, *J. Neural Transm.* 125 (2018) 45–52.
- [37] R. Halpern, B.C. Halpern, B. Stea, A. Dunlap, K. Conklin, B. Clark, H. Ashe, L. Sperling, J. a Halpern, D. Hardy, R. a Smith, Pterin-6-aldehyde, a cancer cell catabolite: identification and application in diagnosis and treatment of human cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74 (1977) 587–91.
- [38] S.E. Gibbons, I. Stayton, Y. Ma, Optimization of urinary pteridine analysis conditions by CE-LIF for clinical use in early cancer detection, *Electrophoresis.* 30 (2009) 3591–3597.
- [39] F. Röthler, M. Karobath, Quantitative determination of uncpnjugated pterins in unire by gas chromatography/mass fragmentography, *Clin. Chim. Acta.* 69 (1976) 457–462.
- [40] B. Stea, P.S. Backlund, P.B. Berkey, a K. Cho, B.C. Halpern, R.M. Halpern, R. a Smith, Folate and pterin metabolism by cancer cells in culture., *Cancer Res.* 38 (1978) 2378–2384.
- [41] C. Adler, S. Ghisla, I. Rebrin, J. Haavik, C.W. Heizmann, N. Blau, T. Kuster, H. Curtius, 7-Substituted pterins in humans with suspected pterin-4a-carbinolamine dehydratase deficiency: mechanism of formation via non-enzymatic transformation from 6-substituted pterins, *Eur. J. Biochem.* 208 (1992) 139–144.
- [42] D.W. Howells, K. Hyland, Direct analysis of tetrahydrobiopterin in cerebrospinal fluid

- by high-performance liquid chromatography with redox electrochemistry: Prevention of autoxidation during storage and analysis, *Clin. Chim. Acta.* 167 (1987) 23–30.
- [43] P. Guibal, N. Lévêque, D. Doummar, N. Giraud, E. Roze, D. Rodriguez, R. Couderc, T. Billette De Villemeur, F. Moussa, Simultaneous determination of all forms of biopterin and neopterin in cerebrospinal fluid, *ACS Chem. Neurosci.* 5 (2014) 533–541.
- [44] E. Arning, T. Bottiglieri, LC-MS/MS analysis of cerebrospinal fluid metabolites in the pterin biosynthetic pathway, *JIMD Rep.* 23 (2014) 1–9.
- [45] C. Burton, R. Weng, L. Yang, Y. Bai, H. Liu, Y. Ma, High-throughput intracellular pteridinic profiling by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 853 (2015) 442–450.
- [46] C. Valdés, D. Arauna, D. González, J. Villaseñor, Simplified HPLC methodology for quantifying biological pterins by selective oxidation, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1055–1056 (2017) 113–118.
- [47] A. Espinosa-Mansilla, I. Durán-Merás, Pteridine determination in human serum with special emphasis on HPLC methods with fluorimetric detection, *Pteridines.* 28 (2017) 67–81.
- [48] P. Guibal, A. Lo, P. Maitre, F. Moussa, Pterin determination in cerebrospinal fluid: State of the art, *Pteridines.* 28 (2017) 83–89.
- [49] A. Mancha de Llanos, A. Espinosa-Mansilla, F. Cañada-Cañada, A. Muñoz de la Peña, Separation and determination of 11 marker pteridines in human urine by liquid chromatography and fluorimetric detection., *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1283–1292.
- [50] A. Mancha De Llanos, M.M. De Zan, M.J. Culzoni, A. Espinosa-Mansilla, F. Cañada-Cañada, A. Muñoz De La Peña, H.C. Goicoechea, Determination of marker pteridines in urine by HPLC with fluorimetric detection and second-order multivariate calibration using MCR-ALS, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 2123–2135.
- [51] M.J. Culzoni, A. Mancha De Llanos, M.M. De Zan, A. Espinosa-Mansilla, F. Cañada-Cañada, A. Muñoz De La Peña, H.C. Goicoechea, Enhanced MCR-ALS modeling of HPLC with fast scan fluorimetric detection second-order data for quantitation of metabolic disorder marker pteridines in urine, *Talanta.* 85 (2011) 2368–2374.
- [52] G. Allegri, H.J. Netto, L.N. Gomes, M.L. de Oliveira, F.B. Scalco, F.R. De Aquino Neto,

- Determination of six pterins in urine by LC–MS/MS, *Bioanalysis*. 4 (2012) 1739–1746.
- [53] C. Burton, H. Shi, Y. Ma, Simultaneous detection of six urinary pteridines and creatinine by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for clinical breast cancer detection, *Anal. Chem.* 85 (2013) 11137–11145.
- [54] P. Kośliński, P. Jarzemski, M.J. Markuszewski, R. Kaliszan, Determination of pterins in urine by HPLC with UV and fluorescent detection using different types of chromatographic stationary phases (HILIC, RP C8, RP C18), *J. Pharm. Biomed. Anal.* 91 (2014) 37–45.
- [55] P. Kośliński, E. Dagher-Wojtkowiak, P. Szatkowska-Wandas, M. Markuszewski, M.J. Markuszewski, The metabolic profiles of pterin compounds as potential biomarkers of bladder cancer-Integration of analytical-based approach with biostatistical methodology, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 127 (2016) 256–262.
- [56] H. Tomšíková, P. Solich, L. Nováková, Sample preparation and UHPLC-FD analysis of pteridines in human urine, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 95 (2014) 265–272.
- [57] C. Burton, H. Shi, Y. Ma, Development of a high-performance liquid chromatography - Tandem mass spectrometry urinary pterinomics workflow, *Anal. Chim. Acta.* 927 (2016) 72–81.
- [58] X. Xiong, Y. Zhang, W. Zhang, Simultaneous determination of twelve polar pteridines including dihydro- and tetrahydropteridine in human urine by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *Biomed. Chromatogr.* (2018) 1–12.
- [59] A. Jiménez Girón, E. Martín-Tornero, M.C. Hurtado Sánchez, I. Durán Merás, A. Espinosa Mansilla, A simple HPLC-ESI-MS method for the direct determination of ten pteridinic biomarkers in human urine, *Talanta*. 101 (2012) 465–472.
- [60] S. Trehan, J.M. Noronha, A rapid assay for urinary pteridine levels for monitoring cancer, *J. Clin. Biochem. Nutr.* 14 (1993) 195–203.
- [61] T. Fukushima, J.C. Nixon, Analysis of reduced forms of biopterin in biological tissues and fluids, *Anal. Biochem.* 102 (1980) 176–188.
- [62] K. Hyland, D.W. Howells, Analysis and clinical significance of pterins, *J. Chromatogr.* 429 (1988) 95–121.

- [63] I. Durán Merás, A. Espinosa Mansilla, M.J. Rodríguez Gómez, Determination of methotrexate, several pteridines, and creatinine in human urine, previous oxidation with potassium permanganate, using HPLC with photometric and fluorimetric serial detection, *Anal. Biochem.* 346 (2005) 201–209.
- [64] K. Suzuki, M. Owada, A simple and sensitive method for the determination of pterins in cerebrospinal fluid. Clinical usefulness for management of tetrahydrobiopterin deficiency, *J. Inherit. Metab. Dis.* 14 (1991) 825–830.
- [65] Y. Tani, T. Ohno, Analysis of 6R- and 6S-tetrahydrobiopterin and other pterins by reversed-phase ion-pair liquid chromatography with fluorimetric detection by post-column sodium nitrite oxidation, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 617 (1993) 249–255.
- [66] A. Espinosa-Mansilla, A.M. de la Peña, F. Cañada-Cañada, A.M. de Llanos, LC determination of biopterin reduced forms by UV-photogeneration of biopterin and fluorimetric detection, *Talanta.* 77 (2008) 844–851.
- [67] T.A. Lyudnikova, O.A. Dashina, T.A. Telegina, M.S. Kritsky, Investigation of the photochemical properties of biopterin and its reduced forms, *Appl. Biochem. Microbiol.* 45 (2009) 104–109.
- [68] H. Tomšíková, P. Tomšík, P. Solich, L. Nováková, Determination of pteridines in biological samples with an emphasis on their stability., *Bioanalysis.* 5 (2013) 2307–2326.
- [69] L. Nováková, I. Kaufmannová, J. Radka, Evaluation of hybrid hydrophilic interaction chromatography stationary phases for ultra-HPLC in analysis of polar pteridines, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 765–772.
- [70] X. Xiong, Y. Liu, Chromatographic behavior of 12 polar pteridines in hydrophilic interaction chromatography using five different HILIC columns coupled with tandem mass spectrometry, *Talanta.* 150 (2016) 493–502.
- [71] R. Díaz de la Garza, E.P. Quinlivan, S.M.J. Klaus, G.J.C. Basset, J.F. Gregory III, A.D. Hanson, Folate biofortification in tomatoes by engineering the pteridine branch of folate synthesis, *PNAS.* 101 (2004) 13720–13725.
- [72] A.M. De Llanos, M.M. De Zan, M.J. Culzoni, A. Espinosa-Mansilla, F. Cañada-Cañada, A.M. De La Peña, H.C. Goicoechea, Determination of marker pteridines in urine by



- HPLC with fluorimetric detection and second-order multivariate calibration using MCR-ALS, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 2123–2135.
- [73] M. Jaffe, Ueber den Niederschlag welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine neue reaction des Kreatinins, *Z Physiol. Chem.* 10 (1886) 391–400.
- [74] W.E. Slazyk, F.W. Spierto, Liquid-chromatographic measurement of biopterin and neopterin in serum and urine, *Clin. Chem.* 36 (1990) 1364–1368.
- [75] J.J. Rippin, Analysis for fully oxidized neopterin in serum by high-performance liquid chromatography, *Clin. Chem.* 38 (1992) 1722–1724.
- [76] M. Candito, C. Cavenel, J. Gugenheim, J. Mouiel, F. Parisot, Y. Jacomet, P. Sudaka, P. Chambon, Short Communication Simple column liquid chromatographic assay for serum neopterin, *J. Chromatogr.* 614 (1993) 164–168.
- [77] J.F.K. Huber, G. Lamprecht, Assay of neopterin in serum by means of two-dimensional high-performance liquid chromatography with automated column switching using three retention mechanisms, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 666 (1995) 223–232.
- [78] N. Turgan, S. Habif, Z. Parildar, D. Özmen, I. Mutaf, D. Erdener, O. Bayindir, Association between homocysteine and neopterin in healthy subjects measured by a simple HPLC-fluorometric method, *Clin. Biochem.* 34 (2001) 271–275.
- [79] C. Carru, A. Zinellu, S. Sotgia, R. Serra, M.F. Usai, G.F. Pintus, G.M. Pes, L. Deiana, A new HPLC method for serum neopterin measurement and relationships with plasma thiols levels in healthy subjects, *Biomed. Chromatogr.* 18 (2004) 360–366.
- [80] E.P. Quinlivan, J.F. Gregory III, Effect of food fortification on folic acid intake in the United States, *Am. J. Clin. Nutr.* 77 (2003) 221–225.
- [81] P. Kelly, J. McPartlin, M. Goggins, D.G. Weir, J.M. Scott, Unmetabolized folic acid in serum: acute studies in subjects consuming fortified food and supplements, *Am. J. Clin. Nutr.* 65 (1997) 1790–1795.
- [82] G.J.C. Basset, E.P. Quinlivan, S. Ravel, F. Rébeillé, B.P. Nichols, K. Shinozaki, M. Seki, L.C. Adams-Phillips, J.J. Giovannoni, J.F. Gregory, A.D. Hanson, Folate synthesis in plants: the p-aminobenzoate branch is initiated by a bifunctional PabA-PabB protein that is targeted to plastids., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 1496–1501.

- [83] G.J.C. Basset, S. Ravel, E.P. Quinlivan, R. White, J.J. Giovannoni, F. Rébeillé, B.P. Nichols, K. Shinozaki, M. Seki, J.F. Gregory III, A.D. Hanson, Folate synthesis in plants: The last step of the p-aminobenzoate branch is catalyzed by a plastidial aminodeoxychorismate lyase, *Plant J.* 40 (2004) 453–461.
- [84] V. Gorelova, L. Ambach, F. Rébeillé, C. Stove, D. Van Der Straeten, Foliates in Plants: Research Advances and Progress in Crop Biofortification, *Front. Chem.* 5 (2017) 21.
- [85] J. Scott, F. Rébeillé, J. Fletcher, Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods, *J. Sci. Food Agric.* 80 (2000) 795–824.
- [86] G.J.C. Basset, E.P. Quinlivan, J.F. Gregory III, A.D. Hanson, Folate synthesis and metabolism in plants and prospects for biofortification, *Crop Sci. Soc. Am.* 45 (2005) 449–453.
- [87] G. Basset, E.P. Quinlivan, M.J. Ziemak, R. Diaz De La Garza, M. Fischer, S. Schiffmann, A. Bacher, J.F. Gregory III, A.D. Hanson, Folate synthesis in plants: the first step of the pterin branch is mediated by a unique bimodular GTP cyclohydrolase I., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 12489–12494.
- [88] T. Hossain, I. Rosenberg, J. Selhub, G. Kishore, R. Beachy, K. Schubert, Enhancement of folates in plants through metabolic engineering, *PNAS.* 101 (2004) 5158–5163.
- [89] R.I. Diaz de la Garza, J.F. Gregory III, A.D. Hanson, Folate biofortification of tomato fruit, *PNAS.* 104 (2007) 4218–4222.
- [90] S. Storozhenko, V. de Brouwer, M. Volckaert, O. Navarrete, D. Blancquaert, G.-F. Zhang, W. Lambert, D. Van Der Straeten, Folate fortification of rice by metabolic engineering, *Nat. Biotechnol.* 25 (2007) 1277–1279.
- [91] S. Bekaert, S. Storozhenko, P. Mehrshahi, M.J. Bennett, W. Lambert, J.F. Gregory III, K. Schubert, J. Hugenholtz, D. Van Der Straeten, A.D. Hanson, Folate biofortification in food plants, *Trends Plant Sci.* 13 (2008) 28–35.
- [92] D. Dellapenna, Biofortification of plant-based food: Enhancing folate levels by metabolic engineering, *PNAS.* 104 (2007) 3675–3676.
- [93] S. Naqvi, C. Zhu, G. Farre, K. Ramessar, L. Bassie, J. Breitenbach, D. Perez Conesa, G. Ros, G. Sandmann, T. Capell, P. Christou, Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways, *PNAS.* 106 (2009) 7762–7767.

- [94] A.C.S. Nunes, D.C. Kalkmann, F.J.L. Aragão, Folate biofortification of lettuce by expression of a codon optimized chicken GTP cyclohydrolase I gene., *Transgenic Res.* 18 (2009) 661–667.
- [95] N.G. Ramírez Rivera, C. García-Salinas, F.J.L. Aragão, R.I. Díaz de la Garza, Metabolic engineering of folate and its precursors in Mexican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Plant Biotechnol. J.* 14 (2016) 2021–2032.
- [96] D. Blancquaert, S. Storozhenko, J. Van Daele, C. Stove, R.G.F. Visser, W. Lambert, D. Van Der Straeten, Enhancing pterin and para-aminobenzoate content is not sufficient to successfully biofortify potato tubers and *Arabidopsis thaliana* plants with folate, *J. Exp. Bot.* 64 (2013) 3899–3909.
- [97] D. Blancquaert, H. De Steur, X. Gellynck, D. Van Der Straeten, Present and future of folate biofortification of crop plants, *J. Exp. Bot.* 65 (2014) 895–906.
- [98] J. De Lepeleire, S. Strobbe, J. Verstraete, D. Blancquaert, L. Ambach, R.G.F. Visser, C. Stove, D. Van Der Straeten, Folate biofortification of potato by tuber-specific expression of four folate biosynthesis genes, *Mol. Plant.* 11 (2018) 175–188.
- [99] M. Kohashi, K. Tomita, K. Iwai, Analysis of unconjugated pterins in food resources and human urine, *Agric. Biol. Chem.* 44 (1980) 2089–2094.
- [100] O. Navarrete, J. Van Daele, C. Stove, W. Lambert, D. Van Der Straeten, S. Storozhenko, A folate independent role for cytosolic HPPK/DHPS upon stress in *Arabidopsis thaliana*, *Phytochemistry.* 73 (2012) 23–33.
- [101] J. Van Daele, D. Blancquaert, F. Kiekens, D. Van Der Straeten, W.E. Lambert, C.P. Stove, Degradation and interconversion of plant pteridines during sample preparation and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Chem.* 194 (2016) 1189–1198.
- [102] A. Goyer, V. Illarionova, S. Roje, M. Fischer, A. Bacher, A.D. Hanson, Folate biosynthesis in higher plants. cDNA Cloning, heterologous expression, and characterization of dihydroneopterin aldolases, *Plant Physiol.* 135 (2004) 103–111.
- [103] V. Rodrigues da Silva, E. Quinlivan, A.D. Hanson, J.F. Gregory, Quantification of pteridines in plant-derived foods by high performance liquid chromatography (HPLC), *FASEB J.* 21 (2007) A346.





## **2. Desarrollo de un método mediante HPLC-ESI-MS para la determinación de pteridinas en orina humana**

---



Las pteridinas, tal y como se ha descrito en la Introducción de esta Memoria, son metabolitos que juegan un papel muy importante en el organismo humano y se consideran biomarcadores de diversas enfermedades. En este trabajo, por primera vez se aborda la optimización de un método cromatográfico con detección de masas, para el análisis de pteridinas marcadoras en muestras de orina humana. Las pteridinas consideradas en este estudio han sido neopterin (NEO), monapterin (MON), biopterin (BIO), 7-biopterin (7BIO), ácido pterin-6-carboxílico (PT6C), pterin (PT), isoxantopterin (ISO), xantopterin (XAN), 6-hidroximetilpterin (6HMPT), 7,8-dihidroneopterin (NH<sub>2</sub>) y 7,8-dihidrobiopterin (BH<sub>2</sub>).

Esta es la primera contribución en la que se ha desarrollado un método mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de masas con fuente de ionización de electro spray (HPLC-ESI-MS) para la determinación de pteridinas biomarcadoras en orina sin tratamiento previo, es decir en el estado de oxidación natural en el que son excretadas.

### 2.1. Material y métodos

#### 2.1.1. Preparación de disoluciones

Se prepararon disoluciones patrón de 15  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  mediante pesada exacta de cada pteridina/hidropteridina, y disolución en agua ultrapura previamente alcalinizada. Una vez disuelto el sólido se procedió a la neutralización de la disolución con ácido clorhídrico y posterior enrase con agua ultrapura. Las disoluciones de BH<sub>2</sub> y NH<sub>2</sub> se prepararon en presencia del antioxidante ditioneitol (DTT) al 0.1 %, con objeto de minimizar la oxidación espontánea debido al oxígeno ambiental. En todos los casos, se evitó la exposición directa a la luz solar con objeto de preservar su estabilidad fotoquímica. Una vez preparadas se almacenaron en la oscuridad a -18 °C hasta su utilización. Se realizó un seguimiento espectral para establecer la estabilidad de las disoluciones y se comprobó que eran estables al menos durante cinco días. Las disoluciones diluidas de NH<sub>2</sub> y BH<sub>2</sub> se prepararon diariamente.

La disolución de creatinina (CREA) patrón de 1.0  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  se preparó por pesada y posterior disolución en agua ultrapura, manteniéndola hasta su uso a 4 °C. No se observaron problemas de inestabilidad.



Se preparó una disolución de trabajo de todas las pteridinas conteniendo  $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de cada una de ellas mediante dilución de las disoluciones madres en agua ultrapura. También, se preparó una disolución de trabajo conteniendo solo  $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de NH<sub>2</sub> y BH<sub>2</sub> respectivamente y en presencia de 0.1 % de DTT. Disoluciones diluidas se prepararon por dilución y conteniendo un 0.1% DTT en el caso de las hidropterinas.

### **2.1.2. Preparación de muestras de orina**

Las muestras de orina se recogieron a primera hora de la mañana. Los voluntarios fueron siete adultos sanos, cinco mujeres y dos hombres, en el intervalo de edades comprendido entre 17 y 51 años. Las muestras se mantuvieron a 4 °C para su análisis inmediato, o congeladas a -18 °C para análisis posteriores. Antes del análisis las muestras se llevaron a temperatura ambiente. Alícuotas de 3 mL se filtraron a través de un filtro de nylon de 0.2  $\mu\text{m}$ . A 100  $\mu\text{L}$  de este filtrado se le añadieron 20  $\mu\text{L}$  de la disolución del estándar interno (6MPT) de concentración  $1.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 0.1% de DTT, volúmenes variables de la disolución de trabajo de pteridinas e hidropterinas y se diluyó con agua ultrapura hasta completar 1 mL de volumen final. Cada análisis se realizó por triplicado.

### **2.1.3. Instrumentación**

Los estudios cromatográficos se llevaron a cabo en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución con muestreador automático termostatzado a 5 °C según se detalla en el Anexo 2. La columna analítica empleada fue una Zorbax Eclipse XDB-C18, de 250 mm x 4.6 mm y 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, cuya temperatura se fijó a 22 °C

Se prepararon fases móviles compuestas por dos disoluciones: ácido fórmico al 0.1 % conteniendo un 2% acetonitrilo (disolución A) y acetonitrilo conteniendo un 0.1 % de ácido fórmico (disolución B). El gradiente empleado fue: 100% de disolución A durante 8 minutos, seguido de un gradiente lineal hasta alcanzar el 20% de B en 8 minutos y esta proporción se mantuvo constante durante 4 minutos. Finalmente, se aplicó un post-run de 10 minutos hasta alcanzar la composición inicial. Las disoluciones A y B se filtraron previamente a su uso mediante filtros de nylon de 0.22  $\mu\text{m}$  y se desgasificaron mediante ultrasonido. El caudal de la fase móvil se fijó en  $0.6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  y se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  de muestra en el sistema.

La detección se realizó mediante un espectrómetro de masas de simple cuadrupolo equipado con una interfase de electrospray (ESI) operando en modo positivo y empleando nitrógeno como gas nebulizador. Las condiciones óptimas de ionización se establecieron

mediante análisis por inyección en flujo, inyectando disoluciones patrón de los analitos individuales directamente en la fuente de iones. Se ensayaron ambos modos, polaridad positiva y negativa y se decidió fijar polaridad positiva debido a la mayor sensibilidad observada. Se seleccionó la monitorización de ion individual (SIM) como modo apropiado de análisis utilizando el ión  $[M+H]^+$  para todos los analitos ensayados. El control del instrumento, la adquisición y el tratamiento de datos se hizo mediante el paquete informático CHEMSTATION.

Los estudios espectrofotométricos complementarios usados en la determinación de CREA se llevaron a cabo mediante un espectrofotómetro equipado con lámpara de Xe y sistema Peltier de termostatación.

Las rectas de regresión y el cálculo de los parámetros de calidad de los métodos, se realizaron mediante el programa ACOC, indicado en el Anexo 2.

### **2.1.4. Rectas de calibrado y estudio del efecto matriz**

Las muestras de orina presentan una composición compleja y por ello se construyeron rectas de calibrado tanto en ausencia, como en presencia de orina. En cada caso se ensayaron cinco niveles de concentración (por triplicado), en el intervalo comprendido entre 20 y 200  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  para todas las pteridinas, excepto para el XAN, para el cual y debido a su baja sensibilidad el rango de concentración fue de 40 a 400  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Todas las muestras contenían 6MPT como patrón interno en concentración 25  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Para estudiar el efecto matriz, se prepararon rectas de calibrado en ausencia de orina y en presencia, usando diferentes factores de dilución: 5, 10, 20 y 50. Se compararon las pendientes de las rectas de calibrado para cada una de las diferentes diluciones de la orina ensayadas con la pendiente de la recta de patrones externos. Para el patrón interno (6MPT), el efecto matriz se evaluó comparando las áreas de pico del 6MPT al nivel de concentración seleccionado para el estudio (25  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) en las diferentes diluciones de la orina y en agua. Para cada dilución, se prepararon 10 muestras idénticas enriquecidas con el estándar interno y se calculó el valor medio del área de pico.

#### **2.1.5. Validación del método**

Con objeto de establecer las características del método propuesto con fines cuantitativos, se procedió a la preparación de un grupo de cinco rectas de calibrado compuestas por muestras de orina enriquecidas con diferentes volúmenes de patrones de pteridinas de manera que el intervalo de concentraciones estuvo comprendido entre 0-1.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (referido a orina original) excepto para el XAN donde se enriqueció hasta 4.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  debido a su baja sensibilidad. Las muestras se prepararon por triplicado. Se calculó la relación área de pico pteridina/área de pico del patrón interno obtenido en el cromatograma del ión individual en modo selección de ión (extracted ion chromatograms, EICs).

El límite de detección (LOD) se calculó según el criterio de Long & Winefordner [1]. El límite de cuantificación (LOQ) se definió como 10/3 LOD. La precisión se estableció como el porcentaje de desviación estándar relativa (% RSD) para la repetitividad en el mismo día (n=6) y entre diferentes días (n=5). Para ello se emplearon muestras de orina diluidas 10 veces y enriquecidas con mezclas estándares de pteridinas a una concentración en el rango de las concentraciones de las rectas de calibrado.

#### **2.1.5. Determinación de creatinina**

La CREA se determinó en orina mediante el método cinético-fotométrico basado en la reacción de Jaffe [2]. A 200  $\mu\text{L}$  de orina diluida 1:10 se le añaden 2 mL del reactivo derivatizante (ácido pícrico 25  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , preparado en tampón fosfato 300  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (pH=12.1) y 2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de dodecilsulfato de sodio (SDS)) y se registra la evolución de la absorbancia a 510 nm durante dos minutos. La velocidad de la reacción se calculó como la tangente en la zona lineal de la curva cinética comprendida entre 0.3 y 1.5 minutos. Cada muestra fue analizada por triplicado.

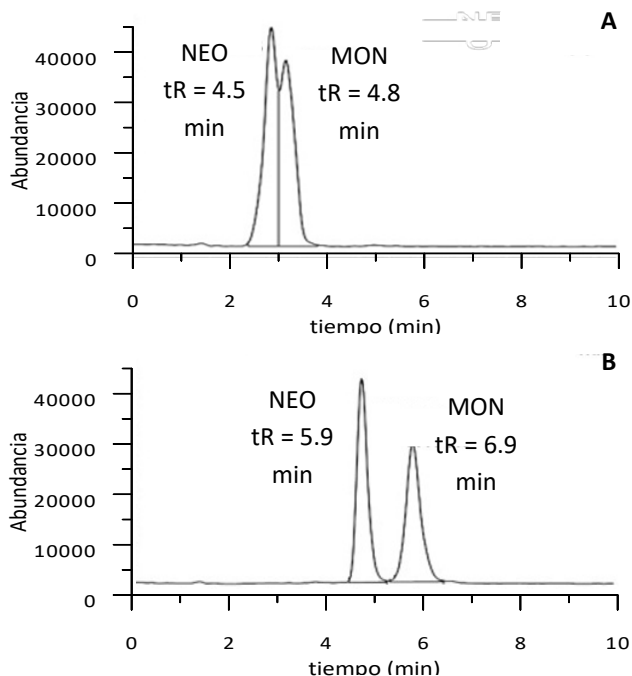
## 2.2. Resultados y discusión

### 2.2.1. Estudio y optimización de la separación cromatográfica

En las condiciones instrumentales comentadas anteriormente y de acuerdo a los datos bibliográficos y la experiencia previa con este tipo de compuestos, se procedió a estudiar la influencia de la presencia de modificadores orgánicos en la separación de dichas pteridinas. Está descrito el drástico efecto que la presencia de modificadores orgánicos ejerce sobre la elución de las pteridinas en columnas C18 [3]. Muy bajas proporciones de los mismos generan disminuciones muy notables de los tiempos de retención. En primer lugar y con objeto de estudiar la influencia de la naturaleza del disolvente orgánico, se seleccionaron metanol y acetonitrilo (ACN). Por otra parte también se ensayaron, para la regulación de la acidez del medio, compuestos volátiles tales como ácido fórmico y formiato amónico. Como condiciones iniciales se ensayó una fase móvil formada por acetonitrilo y ácido fórmico en agua al 0.1 % comprobándose una adecuada relación señal/ruido.

Después de diversos ensayos variando los porcentajes del modificador orgánico, se puso de manifiesto la imposibilidad de aplicar un modo de elución isocrático, dada la diversidad de polaridades del amplio grupo de pteridinas objeto de estudio y por tanto, el notable intervalo de factores de capacidad mostrado por dichas pteridinas.

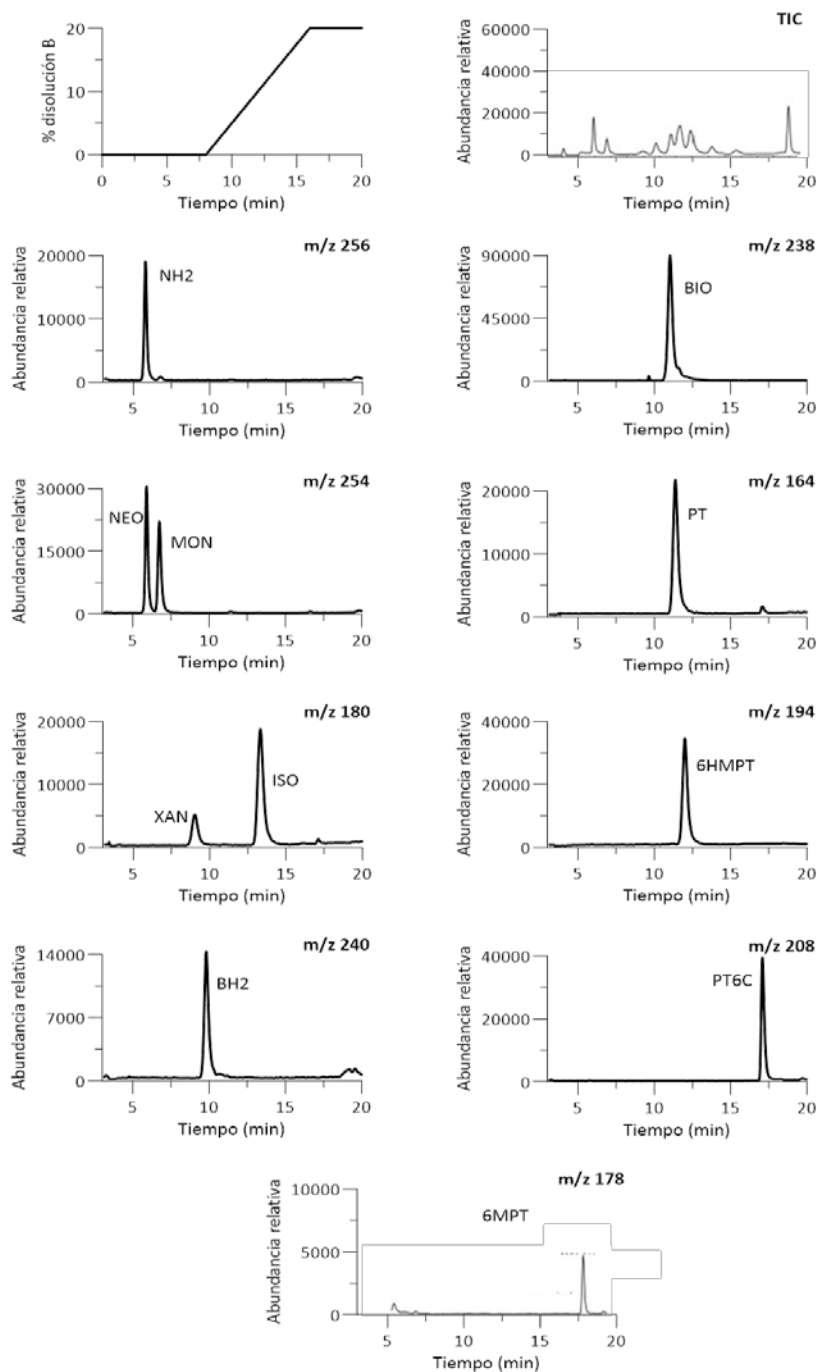
Se planteó el establecimiento de un gradiente de elución comenzando por evaluar el porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil inicial. Un primer problema que se planteó fue la resolución de los picos correspondientes a los isómeros NEO y MON, que provocarían un potencial problema en el detector de masas al presentar la misma relación m/z. En la **Figura 2.1** se representan los cromatogramas EICs a m/z 254 obtenidos para una mezcla de NEO y MON con dos fases móviles diferentes, ACN y ácido fórmico al 0.1 % en proporción 2:98 y en proporción 5:95. Como se puede observar con un 5% de ACN los picos correspondientes a ambos compuestos aparecen fuertemente solapados; cuando la proporción disminuye hasta un 2% se observa un notable incremento en los tiempo de retención y una adecuada resolución siendo el orden de elución el mismo, NEO y posteriormente MON. Así, se fijó una fase móvil compuesta por 2% de ACN y 98% de ácido fórmico al 0.1% denominándola disolución A. En estas condiciones eluirán adecuadamente los componentes más polares.



**Figura 2.1.** Cromatogramas obtenidos para una mezcla de los isómeros NEO y MON ( $m/z$  254), empleando elución isocrática con diferentes fases móviles: A) ACN : ácido fórmico 0.1%, 2:98 (v:v) y B) ACN : ácido fórmico 0.1%, 5:95 (v:v).

Con el objetivo de resolver las pteridinas menos polares, se ensayaron diferentes gradientes mediante mezclas de la disolución A con otra denominada B constituida por ACN y ácido fórmico al 0.1%. La mayor dificultad fue lograr la separación de PT6C y un compuesto no identificado de la misma masa atómica en las muestras de orina, lo cuál fue el parámetro más restrictivo para acortar el tiempo cromatográfico. Finalmente, el gradiente que proporcionó la mejor separación fue el siguiente: 100% de la disolución A durante 8 minutos, seguido de un gradiente lineal hasta alcanzar el 80% de A a los 16 minutos y entonces mantener un periodo isocrático hasta los 20 minutos. Se optimizó también un post-run de 10 minutos para alcanzar el equilibrio de la columna a las condiciones iniciales de elución. En la **Figura 2.2** se muestra un perfil del gradiente de elución empleado, un cromatograma de MS completo (total ionization chromatogram, TIC) y los EICs para los diferentes relaciones  $m/z$  analizadas. Como se puede observar con estas condiciones se logró una buena resolución para las dos parejas de isómeros NEO/MON y XAN/ ISO.

## 2. Determinación de pteridinas en orina



**Figura 2.2.** Perfil del gradiente optimizado. TIC y EICs para una mezcla de pteridinas e hidropteridinas en las condiciones óptimas de gradiente.

### 2.2.2. Optimización de las condiciones de la detección en MS

La optimización de los principales parámetros instrumentales para llevar a cabo la detección mediante espectrometría de masas, se llevó a cabo mediante la inyección en flujo de patrones individuales de las pteridinas en estudio, con concentraciones de 300 ng·mL<sup>-1</sup>. Los parámetros optimizados fueron: el voltaje del fragmentador y del capilar, la presión de nebulización, el caudal de nitrógeno, y la temperatura.

En primer lugar se estudió la influencia de voltaje del fragmentador, registrando cromatogramas en modo ionización completa (full scan) para distintos valores comprendidos entre 50 y 325 V. Se ensayaron ionización positiva y negativa con objeto de obtener la máxima sensibilidad para cada analito. Los resultados mostraron que para todos los analitos se puede seleccionar como pico base, pico de mayor intensidad, el correspondiente a la molécula protonada, [M+H]<sup>+</sup>. Un valor de voltaje de 150 V o superior da lugar a una extensa fragmentación. Las intensidades relativas del pico del [M+H]<sup>+</sup> para PT, 6HMPT y PT6C aumenta hasta valores de 75 V y para valores superiores, dicha intensidad disminuye. Sin embargo, el resto de los analitos presentan intensidades máximas incluso a 100 V. Para los posteriores estudios se seleccionó un valor de compromiso de 100 V para el voltaje del fragmentador.

Los otros parámetros instrumentales se evaluaron en modo SIM y se optimizaron para obtener la máxima intensidad del [M+H]<sup>+</sup>. En la **Tabla 2.1** se muestran los valores optimizados de las variables instrumentales.

**Tabla 2.1.** Parámetros instrumentales óptimos para la ionización de pteridinas en un sistema ESI.

Parámetro	Valor fijado
Presión del nebulizador, psi	40
Caudal gas de secado, L·min <sup>-1</sup>	10
Temperatura del gas, °C	300
Voltaje del capilar, V	4000
Voltaje de fragmentador, V	100

### 2.2.3. Evaluación del efecto matriz en MS

Una de las principales dificultades cuando se emplea la ionización por electrospray en el análisis de fluidos biológicos es la presencia del denominado efecto matriz. Dicho efecto puede afectar a la sensibilidad del análisis de forma drástica. Se han descrito efectos de supresión de la ionización del ion seleccionado y como consecuencia una disminución de la señal obtenida [4], que frecuentemente va acompañada de un deterioro significativo tanto de la precisión, como de la exactitud del método. Para poder evaluar la extensión de dicho efecto se suelen realizar análisis sobre un elevado número de muestras del fluido biológico en estudio (suero, orina, plasma, etc.) de diferentes individuos [5].

En nuestro caso, para evaluar la extensión de este efecto, se preparó una mezcla de orinas de diferentes individuos, a varias diluciones 1/5, 1/10, 1/20 y 1/50 y fueron enriquecidas con mezclas patrón de pteridinas a cinco niveles de concentración (por triplicado). Se llevó a cabo una comparación estadística entre las pendientes de las curvas de calibrado en ausencia y en presencia de orina para cada analito, por aplicación de los test estadísticos de  $F$  y  $t$  [6] mediante el programa ACOC. Cuando se aplicaron dichos test se observó que el test  $F$  indica que no hay diferencias significativas, sin embargo, al realizar una comparación entre las pendientes utilizando el test  $t$  se obtuvo que para todos los analitos el valor del  $t_{cal} > t_{tab}$  para un 95 % de confianza, lo que indica que las pendientes de calibración no eran comparables y existe efecto matriz. Los resultados obtenidos para las diferentes diluciones se resumen en la **Tabla 2.2**.

Se observa supresión de señal para todos los analitos y en todas las diluciones de las muestras de orina analizadas, aunque se encontró un efecto matriz más suave para la dilución de la muestra de orina 1/20 o mayor. Sin embargo, a ese nivel de dilución la detección de XAN no puede asegurarse en el rango de concentraciones estudiadas (40 – 400 ng·mL<sup>-1</sup>) debido a su menor sensibilidad. Por otro lado, cuando se empleó un factor de dilución de 1/5, se observó un fuerte efecto matriz para todos los compuestos ( $\geq 44\%$ ). Por lo tanto, se seleccionó como factor de dilución de compromiso 1/10 asegurándose así la detección de todos los compuestos.

Para el patrón interno (25 ng·mL<sup>-1</sup>) se calculó un efecto de supresión del 10% cuando se emplea una dilución 1/10. En general, la influencia del efecto matriz es superior para los compuestos menos retenidos probablemente debido a su coelución con compuestos polares presentes en la orina.



**Tabla 2.2.** Tiempos de retención y efecto matriz calculado para el análisis de pteridinas en orina en diferentes diluciones.

Analito	$t_R$ min	Curvas de calibrado (en ausencia de orina)			Curvas de calibrado (en presencia de orina) % de efecto matriz <sup>a</sup>			
		(Pendiente $\pm$ SD) $\times(10^3)$ mL $\cdot$ ng <sup>-1</sup>	$S_{y/x}$	$R^2$	Factor de dilución			
					1/5	1/10	1/20	1/50
NEO	5.9	26.1 $\pm$ 0.8	8.11	0.994	-65	-44	-40	-15
NH2	6.0	17.9 $\pm$ 0.6	6.57	0.992	-57	-40	-35	-5
MON	6.9	23.0 $\pm$ 0.7	7.30	0.994	-79	-33	-28	-14
XAN	9.4	17.0 $\pm$ 0.3	7.42	0.992	-67	-44	nd	nd
BH2	9.9	17.3 $\pm$ 0.6	6.00	0.993	-44	-31	-14	6
BIO	10.7	26.9 $\pm$ 0.9	9.13	0.993	-63	-23	-14	-12
PT	11.7	32.0 $\pm$ 1.0	10.3	0.994	-79	-15	-10	-2
6HMPT	12.3	23.5 $\pm$ 0.8	8.20	0.993	-66	-14	-10	-4
ISO	13.8	11.8 $\pm$ 0.5	4.92	0.990	-76	-22	-13	-3
PT6C	18.1	47.2 $\pm$ 1.8	17.7	0.993	-71	-20	-15	-8

nd: no detectado; curva de calibrado entre 20 – 200 ng $\cdot$ mL<sup>-1</sup> para todos los analitos excepto XAN: 40 – 400 ng $\cdot$ mL<sup>-1</sup>.

SD: desviación estándar,  $S_{y/x}$ : desviación de la regresión

a: % efecto matriz = [(pendiente curva calibrado adición patrón/pendiente curva calibrado patrón externo) – 100]  $\times$  100

#### 2.2.4. Validación del método

La validación del método se realizó en términos de la linealidad, precisión, exactitud y límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).

Las curvas de calibrado se prepararon a partir de muestras de orina enriquecidas a cinco niveles de concentración por triplicado, en el intervalo 0-100 ng $\cdot$ mL<sup>-1</sup> para todas las pteridinas excepto para el XAN que se fijó en el intervalo entre 0-400 ng $\cdot$ mL<sup>-1</sup> debido a su menor sensibilidad. Una vez optimizados los parámetros de la ionización en MS, se ensayó la respuesta del patrón interno, el 6MPT, usando disoluciones de concentraciones comprendidas entre 10-100 ng $\cdot$ mL<sup>-1</sup>. Considerando la respuesta del detector, para los posteriores estudios se fijó una concentración de 25 ng $\cdot$ mL<sup>-1</sup> de 6MPT como patrón interno y

se utilizó la relación área de pico pteridina/área de pico 6MPT en los EICs como señal analítica.

Las rectas de regresión para todos los analitos proporcionaron un coeficiente de determinación  $R^2 > 0.99$ . En la **Tabla 2.3**, se resumen los resultados del análisis de regresión de mínimos cuadrados y los LOD y LOQ para siete muestras de orina analizadas de diferentes voluntarios, hombres y mujeres.

Como se puede observar, el LOD más bajo lo presenta el PT, entre 1.70 y 3.88 ng·mL<sup>-1</sup>, y el más alto el XAN con valores de LOD entre 10.5 y 49.9 ng·mL<sup>-1</sup>. El BH2 es quien presenta los valores del LOD más dispersos mientras que el ISO es el que los presenta menos dispersos.

Es necesario indicar que los LOD calculados son superiores a aquellos publicados previamente en la bibliografía, determinados por HPLC con detección fluorimétrica por investigadores de nuestro Grupo de Investigación [3,7,8] trabajos que ya se comentaron en la introducción de esta parte de la Memoria. Sin embargo, consideramos de interés el hecho de no haber realizado un paso previo de oxidación de las muestras de orina, lo cual posibilita poder llevar a cabo la detección de un número elevado, tanto de pteridinas como de hidropteridinas, en su estado natural de excreción, en una única inyección y en un único registro.

**Tabla 2.3.** Parámetros de calidad de las rectas de regresión para las diferentes pteridinas.

		Mujer (51) <sup>a</sup>	Hombre (51) <sup>a</sup>	Hombre (50) <sup>a</sup>	Mujer (33) <sup>a</sup>	Mujer (32) <sup>a</sup>	Mujer (22) <sup>a</sup>	Mujer (18) <sup>a</sup>
NEO	pendiente <sup>b</sup> (±SD) (x 10 <sup>2</sup> )	1.38 (± 0.04)	1.95 (± 0.07)	2.14 (± 0.07)	1.38 (± 0.03)	2.20 (± 0.03)	1.87 (± 0.03)	1.48 (± 0.04)
	Ordenada (±SD) (x10 <sup>2</sup> )	40.9 (± 2.2)	66.0 (± 3.3)	45.0 (± 2.9)	45.1 (± 1.5)	36.6 (± 1.8)	67.8 (± 1.6)	70.8 (± 2.1)
	Sy/x <sup>c</sup>	0.054	0.081	0.069	0.039	0.049	0.043	0.049
	LOD <sup>d</sup> /LOQ <sup>e</sup>	6.89/22.9	7.75/25.8	5.74/19.1	5.03/16.7	3.06/10.2	4.24/14.1	7.92/26.4
NH2	pendiente <sup>b</sup> (±SD) (x 10 <sup>2</sup> )	1.56 (± 0.04)	1.33 (± 0.05)	2.00 (± 0.08)	1.81 (± 0.05)	2.45 (± 0.08)	1.45 (± 0.06)	1.21 (± 0.05)
	Ordenada (±SD) (x10 <sup>2</sup> )	242.2 (± 2.0)	238.1 (± 2.6)	246.9 (± 3.6)	395.9 (± 2.6)	183.1 (± 6.2)	268.6 (± 2.8)	244.8 (± 0.4)
	Sy/x <sup>c</sup>	0.054	0.068	0.069	0.071	0.126	0.070	0.074
	LOD <sup>d</sup> /LOQ <sup>e</sup>	14.5/48.3	24.5/81.6	19.0/63.3	22.4/74.6	14.1/46.9	27.3/90.9	33.1/110
MON	pendiente <sup>b</sup> (±SD) (x 10 <sup>2</sup> )	1.10 (± 0.04)	1.84 (± 0.05)	1.78 (± 0.05)	9.40 (± 0.02)	1.79 (± 0.03)	1.63 (± 0.03)	1.35 (± 0.05)
	Ordenada (±SD) (x10 <sup>2</sup> )							
	Sy/x <sup>c</sup>	0.043	0.061	0.051	0.025	0.031	0.033	0.063
	LOD <sup>d</sup> /LOQ <sup>e</sup>	6.22/20.7	4.72/15.7	4.15/13.8	3.70/12.3	2.88/9.6	2.91/9.7	6.28/20.9
XAN	pendiente <sup>b</sup> (±SD) (x 10 <sup>2</sup> )	2.16 (± 0.08)	1.09 (± 0.03)	2.19 (± 0.13)	1.38 (± 0.06)	1.91 (± 0.08)	1.68 (± 0.02)	1.60 (± 0.06)
	Ordenada (±SD) (x10 <sup>2</sup> )							
	Sy/x <sup>c</sup>	0.158	0.066	0.399	0.118	0.148	0.040	0.182
	LOD <sup>d</sup> /LOQ <sup>e</sup>	32.3/108	24.9/82.9	49.9/166	37.7/125	34.0/113	10.5/35.0	31.2/104
BH2	pendiente <sup>b</sup> (±SD) (x 10 <sup>2</sup> )	2.61 (± 0.11)	2.00 (± 0.07)	2.07 (± 0.06)	3.18 (± 0.15)	4.00 (± 0.16)	1.84 (± 0.05)	1.95 (± 0.09)
	Ordenada (±SD) (x10 <sup>2</sup> )	280.1 (± 5.8)	101.8 (± 1.9)	97.2 (± 3.1)	589.8 (± 7.6)	338.1 (± 14.4)	171.2 (± 1.8)	645.7 (± 6.1)
	Sy/x <sup>c</sup>	0.160	0.034	0.079	0.207	0.291	0.042	0.091
	LOD <sup>d</sup> /LOQ <sup>e</sup>	20.9/69.6	7.37/24.5	9.75/32.5	31.3/104	20.0/66.7	9.05/30.1	55.5/185

## 2. Determinación de pteridinas en orina

Tabla 2.3 (continuación).

		Mujer (51) <sup>a</sup>	Hombre (51) <sup>a</sup>	Hombre (50) <sup>a</sup>	Mujer (33) <sup>a</sup>	Mujer (32) <sup>a</sup>	Mujer (22) <sup>a</sup>	Mujer (18) <sup>a</sup>
BIO	pendiente <sup>b</sup> (±SD) (x 10 <sup>2</sup> )	2.03 (± 0.04)	2.92 (± 0.11)	2.44 (± 0.08)	1.69 (± 0.07)	2.56 (± 0.04)	2.26 (± 0.07)	1.91 (± 0.06)
	Ordenada (±SD) (x10 <sup>2</sup> )	29.1 (± 1.9)	80.9 (± 4.5)	21.6 (± 3.4)	42.3 (± 3.3)	27.9 (± 2.1)	35.8 (± 2.6)	61.1 (± 2.9)
	Sy/x <sup>c</sup>	0.0469	0.1084	0.0674	0.0804	0.0439	0.0698	0.0747
	LOD <sup>d</sup> /LOQ <sup>e</sup>	3.42/11.4	7.2/24.0	4.87/16.2	7.16/23.8	2.48/8.26	4.64/15.5	6.95/23.1
PT	pendiente <sup>b</sup> (±SD) (x 10 <sup>2</sup> )	1.95 (± 0.03)	3.70 (± 0.08)	2.43 (± 0.09)	1.69 (± 0.05)	3.49 (± 0.04)	3.18 (± 0.04)	2.12 (± 0.05)
	Ordenada (±SD) (x10 <sup>2</sup> )	35.6 (± 2.0)		25.3 (± 1.1)	18.9 (± 2.3)		26.6 (± 2.0)	30.8 (± 1.8)
	Sy/x <sup>c</sup>	0.0245	0.0867	0.0212	0.0630	0.0387	0.0559	0.0430
	LOD <sup>d</sup> /LOQ <sup>e</sup>	3.88/12.9	3.49/11.6	2.34/7.79	2.63/8.76	1.70/5.66	2.20/7.33	3.13/10.4
6HMPT	pendiente <sup>b</sup> (±SD) (x 10 <sup>2</sup> )	1.91 (± 0.05)	1.83 (± 0.04)	2.45 (± 0.09)	1.79 (± 0.06)	2.49 (± 0.06)	2.15 (± 0.07)	1.42 (± 0.06)
	Ordenada (±SD) (x10 <sup>2</sup> )							
	Sy/x <sup>c</sup>	0.0648	0.0413	0.0928	0.0614	0.0674	0.0816	0.0593
	LOD <sup>d</sup> /LOQ <sup>e</sup>	5.23/17.4	3.31/11.0	5.46/18.2	4.94/16.5	3.82/12.7	5.49/18.3	6.59/21.9
ISO	pendiente <sup>b</sup> (±SD) (x 10 <sup>2</sup> )	1.89 (± 0.05)	1.19 (± 0.03)	1.01 (± 0.02)	1.83 (± 0.04)	1.55 (± 0.03)	1.01 (± 0.02)	0.10 (± 0.02)
	Ordenada (±SD) (x10 <sup>2</sup> )	5.78 (± 2.59)		3.00 (± 0.92)	10.4 (± 1.9)		10.1 (± 0.8)	15.1 (± 0.9)
	Sy/x <sup>c</sup>	0.0662	0.0219	0.0183	0.0511	0.0376	0.0150	0.0243
	LOD <sup>d</sup> /LOQ <sup>e</sup>	4.06/13.5	2.82/9.39	2.88/9.59	3.37/11.2	3.42/11.4	2.76/9.19	3.27/10.9
PT6C	pendiente <sup>b</sup> (±SD) (x 10 <sup>2</sup> )	2.90 (± 0.06)	1.16 (± 0.05)	1.76 (± 0.04)	2.99 (± 0.08)	3.61 (± 0.04)	3.47 (± 0.05)	3.27 (± 0.05)
	Ordenada (±SD) (x10 <sup>2</sup> )							
	Sy/x <sup>c</sup>	0.0799	0.0481	0.0330	0.0395	0.0537	0.0521	0.0449
	LOD <sup>d</sup> /LOQ <sup>e</sup>	3.94/13.1	4.20/14.0	2.85/9.50	4.13/13.8	2.19/7.29	2.32/7.73	1.68/5.59

Los valores de ordenada cero o negativos se han eliminado; a: edad; b: pendiente expresada como mL·ng<sup>-1</sup>; c: desviación de la regresión; d: límite de detección según el criterio de Long & Winefordner (k=3); e: LOQ = (10/3) LOD, ambos expresados como ng·mL<sup>-1</sup>.

Los estudios de precisión para la determinación de pteridinas se realizaron evaluando tanto la repetibilidad intra-día como inter-día, utilizando la metodología de adición patrón, con y sin patrón interno. Como era de esperar la repetibilidad es mejor cuando se emplea el método del patrón interno. En la **Tabla 2.4** se han resumido los valores de desviación estándar relativa (RSD) para análisis realizados en el mismo día (n=6) y en días diferentes (n=5), de muestras de orina diluida 1:10 a un nivel de enriquecimiento incluido en las rectas de regresión establecidas para cada pteridina. Se obtuvieron valores de % RSD entre 1.9 y 9.2 % para análisis de la muestra en el mismo día y entre 2.8 a 17 % entre días diferentes, cuando se aplicó el método del patrón interno.

**Tabla 2.4.** Precisión del método HPLC-ESI-MS.

Compuesto	Repetitividad			
	Intra-día (n=6)		Inter-días (n=5)	
	RSD (%) <sup>a</sup>	RSD (%) <sup>b</sup>	RSD (%) <sup>a</sup>	RSD (%) <sup>b</sup>
NEO	4.6	2.7	12	2.8
NH2	10.5	9.2	26	17
MON	3.4	3.3	12	5.4
XAN	6.7	5.0	13	5.3
BH2	6.4	4.8	20	11
BIO	3.3	2.3	11	4.7
PT	3.7	2.5	17	12
6HMPT	2.9	2.5	9.5	9.1
ISO	5.0	1.9	7.3	4.6
PT6C	4.1	2.7	12	9.5
6MPT	2.8	-	11	-

a: señal del área de pico del cromatograma EIC; b: señal de la relación entre área de pico pteridina/área de pico del patrón interno en el cromatograma EIC

Los valores de RSD más desfavorables se obtuvieron para las hidropteridinas en los ensayos inter-días. Este comportamiento es probablemente debido a la posible oxidación aérea de las formas reducidas, difícilmente evitable. Sin embargo, se observa una notable mejoría cuando se emplea el patrón interno. Los valores obtenidos en un mismo día son adecuados para poder llevar a cabo la determinación cuantitativa de estos analitos.

### 2.2.5. Discusión de los resultados

Se ha llevado a cabo la determinación de pteridinas en muestras de orina proveniente de siete individuos, sin patologías diagnosticadas, voluntarios y pertenecientes a nuestro Grupo de Investigación. Estas muestras están formadas por orinas procedentes de hombre y mujeres de diversas edades en el intervalo comprendido entre 18 y 51 años. Aunque no es nuestro propósito realizar análisis estadísticos de composición referente a la edad, si hemos creído conveniente estudiar resultados de cada una de las muestras analizadas con objeto de observar las posibles diferencias o tendencias si las hubiera.

Teniendo en cuenta que la concentración de metabolitos en las muestras de orina se ve afectada por la ingesta de líquidos es necesario considerar esta variabilidad a la hora de expresar los resultado. Clásicamente, este aspecto se soslayaba expresando el contenido de metabolitos referido a la orina total excretada en 24 h. Actualmente, los contenidos de metabolitos en las orinas se expresan con respecto a una referencia de excreción naturalmente presente en las mismas y analizando esta en cada orina analizada. La referencia habitualmente aceptada es la CREA, que es un subproducto de la creatina, excretado en la orina de forma natural. Por tanto, se realizó una determinación de CREA en cada orina mediante el método cinético-espectrofotométrico propuesto por Jaffe [2]. Finalmente, los contenidos de metabolitos se expresaron como mmol pteridinas/mol de CREA, dado el elevado contenido de CREA en las orinas.

Las relaciones tanto de pteridinas/CREA como de NEO/BIO se calcularon como valores medios (n=3) para cada orina analizada. En la **Tabla 2.5** se muestran los resultados obtenidos en el análisis de las siete orinas ensayadas mediante el método de la adición patrón y usando como señal la relación entre el área de pico de la pteridina/área de pico del 6MPT en el cromatograma de EIC correspondiente.

En las orinas analizadas, las pteridinas se encuentran en sus formas naturales de excreción, ya que no se ha aplicado oxidación previa de las muestras. Las pteridinas cuantificables fueron: NH<sub>2</sub>, NEO y BH<sub>2</sub>. BIO se pudo cuantificar en todas excepto en una orina, mientras que PT se detectó en cinco orinas pero en concentraciones inferiores al límite de cuantificación. ISO fue determinada solamente en dos orinas correspondientes a los dos individuos más jóvenes. Las demás, XAN, MON, 6HMPT y PT6C no se detectaron en las condiciones aplicadas. En todos los casos, las formas dihidropteridínicas se encontraron en mayor concentración que las formas oxidadas.

Además en la **Figura 2.3** se han representado los valores medios obtenidos de todas las orinas para las diferentes relaciones y su dispersión.

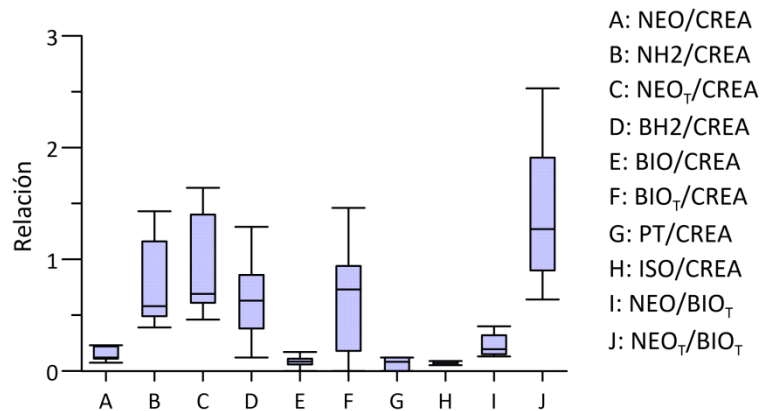
**Tabla 2.5.** Relaciones pteridinas/CREA y NEO/BIO calculadas en las muestras de orina mediante el método propuesto<sup>a</sup>.

	<u>NEO</u> CREA	<u>NH2</u> CREA	<u>NEO<sub>T</sub></u> CREA	<u>BH2</u> CREA	<u>BIO</u> CREA	<u>BIO<sub>T</sub></u> CREA	<u>PT</u> CREA	<u>ISO</u> CREA	<u>NEO</u> BIO <sub>T</sub>	<u>NEO<sub>T</sub></u> BIO <sub>T</sub>
Hombre (51) <sup>b</sup>	0.074	0.39	0.46	0.12	0.065	0.18	<LOD		0.40	2.5
Hombre (50) <sup>b</sup>	0.16	0.94	1.1	0.38	<LOQ	-----	0.12		-----	-----
Mujer (51) <sup>b</sup>	0.11	0.58	0.69	0.42	0.058	0.48	0.11	<LOD	0.23	1.4
Mujer (33) <sup>b</sup>	0.22	1.4	1.6	1.3	0.17	1.4	0.12		0.15	1.1
Mujer (32) <sup>b</sup>	0.12	0.55	0.67	0.66	0.086	0.75	<LOD		0.16	0.90
Mujer (22) <sup>b</sup>	0.23	1.1	1.4	0.63	0.11	0.73	0.082	0.089	0.32	1.9
Mujer (17) <sup>b</sup>	0.12	0.49	0.61	0.86	0.084	0.94	0.055	0.052	0.13	0.64

a: valores medios (n=3) para cada orina expresados como mmol pteridina/mol de CREA;

b: edad

NEO<sub>T</sub>= NEO + NH2; BIO<sub>T</sub>=BIO + BH2



**Figura 2.3.** Valor de las relaciones pteridinas/CREA y NEO/BIO en orinas.

En la bibliografía se encuentran datos referidos a los niveles de pteridinas en orina, fundamentalmente expresados como NEO, BIO y NEO/BIO, tanto para personas sanas como con diferentes patologías. Cuando se van a comparar valores con el objetivo de establecer referencias es fundamental tener en cuenta el pretratamiento aplicado a las muestras. En este trabajo se han utilizado muestras de orina sin oxidación previa, de manera que los contenidos de cada hidropteridina y/o pteridina se han podido calcular independientemente, y los contenidos de NEO y BIO son los naturalmente excretados. Sin embargo, las orinas podrían ser previamente oxidadas y convertir todas las formas presentes a las formas totalmente oxidadas. Entonces se calcularía un contenido total de pteridinas generado por las formas reducidas (hidropteridinas) y las oxidadas (pteridinas) presentes.

En la **Tabla 2.6** se han resumido algunos de los datos más significativos encontrados en la bibliografía sobre el contenido de pteridinas en orinas de diferente naturaleza expresados como mmol de pteridina/mol CREA.

En el análisis directo de muestras de orina sin oxidar se han publicado valores de la relación NEO/CREA de 0.094 y 0.21 para adultos y niños sanos respectivamente [8] y valores de 0.29-1.08 [8] y de 0.06-1.05 [9] para niños con patologías diagnosticadas. También se han publicado valores de la relación NEO/BIO<sub>T</sub> de 0.12 para adultos y niños sanos y entre 0.32 y 0.83 para niños con patologías diagnosticadas [8].



Por otro lado, se han descrito diferentes reactivos para llevar a cabo la oxidación de manera que, en función del método empleado los valores de pteridinas varían en un cierto intervalo. Así, se han publicado valores de  $NEO_T/CREA$  de 0.12 y 0.21 y  $NEO_T/BIO_T$  de 1.27 y 2.59 para voluntarios sanos y enfermos de cáncer, respectivamente, utilizando la técnica de EC-LIF previa oxidación con  $I_2/I^-$  [10].

También para muestras preoxidadas con  $I_2/I^-$  se han publicado valores de 0.20 y 0.39 de  $NEO_T/CREA$  y valores de 0.98 y 0.86 para  $NEO_T/BIO_T$  para adultos y niños sanos, mientras que si se usa permanganato como oxidante, los valores que se encontraron mediante HPLC fueron 0.21 y 0.45 [3].

El método propuesto en esta Memoria ha proporcionado valores de 0.14 y 0.17 para las relaciones  $NEO/CREA$ ; 0.91 y 1.0 para  $NEO_T/CREA$  para adultos >25 años y <25 años, respectivamente. Estos valores son superiores a los encontrados en trabajos previos por oxidación total del  $NH_2$  a NEO, hecho que hace pensar en si la oxidación química puede no ser completa en las condiciones habitualmente usadas o que el  $NH_2$  puede descomponerse a otro producto final diferente del NEO. Ambas causas justificarían los menores valores descritos. En cuanto a la relación  $NEO/BIO_T$  y  $NEO_T/BIO_T$ , los valores de 0.24 y 0.22, para la primera relación y 1.49 y 1.28 para la segunda, para adultos sanos menores y mayores de 25 años, respectivamente, son comparables a los descritos en la literatura teniendo en cuenta la diversidad de edad y sexo.

**Tabla 2.6.** Referencias bibliográficas referidas a valores de NEO/CREA y NEO/BIO.

Tipo de orina	NEO CREA	NEO <sub>T</sub> CREA	NEO BIO <sub>T</sub>	NEO <sub>T</sub> BIO <sub>T</sub>	Pretratamiento	Ref
Niños con patologías < 10 años	0.29 -1.08	----	0.32-0.83	----	Sin oxidación	[8]
	0.06-1.05	----	----	----	Sin oxidación	[9]
Adultos con patologías > 25 años	----	0.21	----	2.59	Pre-oxidación con I <sub>2</sub> /I <sup>-</sup>	[10]
	0.21	----	0.12	----	Sin -oxidación	[8]
Niños sanos < 10 años	----	0.39	----	0.86	Pre-oxidación con I <sub>2</sub> /I <sup>-</sup>	[3]
	----	0.46	----	0.57	Pre-oxidación con KMnO <sub>4</sub>	[3]
Adultos sanos > 25 años	0.094	----	0.12	----	Sin oxidación	[8]
	----	0.20	----	0.98	Pre-oxidación con I <sub>2</sub> /I <sup>-</sup>	[3]
	----	0.21	----	0.45	Pre-oxidación 10 con KMnO <sub>4</sub>	[3]
	----	0.12	----	1.27	Pre-oxidación con I <sub>2</sub> /I <sup>-</sup>	[10]
Adultos sanos < 25 años	0.17	1.00	0.22	1.28	Sin oxidación	Método propuesto
Adultos sanos > 25 años	0.14	0.91	0.24	1.49	Sin oxidación	

### 2.3. Conclusiones

El uso de pteridinas como biomarcadores para diversas enfermedades ha ido alcanzando un considerable protagonismo en los últimos años. Fundamentalmente se ha potenciado su utilización como posible marcador de enfermedades malignas. Como consecuencia es de capital importancia establecer los niveles normales que se utilizarán como referencia para diagnosticar posibles patologías utilizando como criterio clínico la variación de los contenidos en pteridinas potencialmente patológicas con respecto a estos valores normales. La dificultad estriba en disponer de métodos seguros y rápidos debido a la sensibilidad necesaria y a los tratamientos previos habitualmente aplicados a las muestras como es la preoxidación.

El método propuesto en este trabajo, permite la determinación de un número relativamente elevado de pteridinas en muestras de orina mediante un sistema de HPLC y utilizando como detección un ESI-MS de simple cuadrupolo. Se ha procurado llevar a cabo con la mínima manipulación de las muestras no utilizando evitando la preoxidación, por lo cual las pteridinas se determinan en las formas naturalmente excretadas. Esta forma de actuar nos ha permitido determinar tanto las pteridinas como las hidropteridinas presentes. Se pone de manifiesto un notable efecto matriz habitual cuando se aplica este sistema de detección al análisis de muestras biológicas. Como consecuencia ha sido necesario emplear la metodología de la adición patrón. En aras de conseguir la máxima exactitud y precisión en los análisis se ha utilizado un patrón interno, el 6MPT.

Los resultados obtenidos indican que las muestras de orina de voluntarios sanos contienen dihidropteridinas como formas predominantes. Los valores de NEO/CREA son similares a los publicados mediante otros métodos en muestras sin oxidar. Estos valores son menores que los publicados en diversas patologías, ya que NEO suele presentar mayores contenidos como consecuencia de diversas alteraciones. Hay que puntualizar que son escasos los métodos publicados con el empleo de orinas sin oxidar. Creemos que esta forma de trabajar aporta información sobre la composición de la orina naturalmente excretada, la cual se pierde cuando se realiza una pre-oxidación de las mismas,

En cuanto a los valores de la relación  $NEO_T/CREA$  (es decir  $NEO+NH_2$  calculados individualmente) son comparativamente mayores que los obtenidos en las muestras pre-oxidadas, lo que hace pensar que la oxidación química global puede dar lugar a reacciones secundarias indeseables que provoquen la rotura de las cadenas en posición 6, dando lugar a menores contenidos de NEO procedente del  $NH_2$  inicialmente presente. Las relaciones  $NEO_T/BIO_T$  son similares a los encontrados en la bibliografía para individuos sanos.

Dada la dispersión de los niveles de pteridinas encontrados en la bibliografía, sería interesante establecer protocolos más detallados sobre todo el pretratamiento de la muestra para poder establecer los valores considerados normales y como consecuencia las posibles alteraciones en presencia de diferentes patologías.

#### 2.4. Bibliografía

- [1] G.L. Long, J.D. Winefordner, Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition, *Anal. Chem.* 55 (1983) 712A–724A.
- [2] M. Jaffe, Ueber den Niederschlag welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine neue reaction des Kreatinins, *Z Physiol. Chem.* 10 (1886) 391–400.
- [3] A. Mancha de Llanos, A. Espinosa-Mansilla, F. Cañada-Cañada, A. Muñoz de la Peña, Separation and determination of 11 marker pteridines in human urine by liquid chromatography and fluorimetric detection., *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1283–92.
- [4] R. King, R. Bonfiglio, C. Fernandez-Metzler, C. Miller-Stein, T. Olah, Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11 (2000) 942–950.
- [5] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019–3030.
- [6] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, 1997.
- [7] I. Durán Merás, A. Espinosa Mansilla, M.J. Rodríguez Gómez, Determination of methotrexate, several pteridines, and creatinine in human urine, previous oxidation with potassium permanganate, using HPLC with photometric and fluorimetric serial detection, *Anal. Biochem.* 346 (2005) 201–209.
- [8] F. Cañada-Cañada, A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña, A. Mancha de Llanos, Determination of marker pteridins and biopterin reduced forms, tetrahydrobiopterin and dihydrobiopterin, in human urine, using a post-column photoinduced fluorescence liquid chromatographic derivatization method, *Anal. Chim. Acta.* 648 (2009) 113–122.
- [9] A.M. De Llanos, M.M. De Zan, M.J. Culzoni, A. Espinosa-Mansilla, F. Cañada-Cañada, A.M. De La Peña, H.C. Goicoechea, Determination of marker pteridines in urine by HPLC with fluorimetric detection and second-order multivariate calibration using MCR-ALS, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 2123–2135.
- [10] F. Han, B.H. Huynh, H. Shi, B. Lin, Y. Ma, Pteridine Analysis in Urine by Capillary Electrophoresis Using Laser-Induced Fluorescence Detection, *Anal. Chem.* 71 (1999)

1265–1269.

### **3. Desarrollo de un método HPLC-MS para la determinación de pteridinas en muestras de tomate**

---



Las pteridinas son compuestos precursores de la síntesis de folatos en las plantas, y el control de la cuantía de estos precursores se considera crucial para establecer la viabilidad y la eficacia de los procesos de biofortificación.

En este capítulo se aplica el método anteriormente descrito mediante HPLC-ESI-MS, a la determinación de pteridinas en tomates con el objetivo de establecer la naturaleza y cantidad de las pteridinas naturalmente presentes en este tipo de muestras, como una herramienta útil para aplicar en el seguimiento de los procesos de biofortificación.

Las pteridinas analizadas han sido las mismas que en el capítulo anterior: neopterin (NEO), monapterin (MON), biopterin (BIO), 7-biopterin (7BIO), ácido pterin-6-carboxílico (PT6C), pterin (PT), isoxantopterin (ISO), xantopterin (XAN), 6-hidroximetilpterin (6HMPT), 7,8-dihidroneopterin (NH2) y 7,8-dihidrobiopterin (BH2), pero además se ha incluido el 6-hidroximetil-7,8-dihidropterin (6HMDHPT) debido a que en una publicación anterior se ha descrito la presencia de pequeñas cantidades de este compuesto en plantas [1].

#### 3.1. Material y métodos

La preparación de las disoluciones patrón de pteridinas y la instrumentación utilizada en este capítulo ha sido similar a la descrita en el capítulo anterior.

##### 3.1.1. Preparación de las muestras de tomate

Las muestras seleccionadas han sido tomates maduros proporcionados por supermercados locales. El día de su compra y después de lavados, se trituraron y se congelaron en nitrógeno líquido, previamente a su liofilización. Los tomates liofilizados se almacenaron a -18°C hasta su uso. Para la extracción de las pteridinas, se pesó con exactitud aproximadamente un gramo de tomate liofilizado y se realizó una extracción sólido-líquido con 10 mL de una mezcla metanol:agua (1:1, v:v), alcalinizada a pH 12, en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos. La muestra se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se separó la fase acuosa-orgánica. Se repitió el proceso de extracción añadiendo otros 10 mL de la mezcla metanol:agua, sobre el extracto sólido.

Los sobrenadantes se combinaron, se neutralizaron y se diluyeron hasta 25 mL con agua ultrapura y finalmente se filtraron a través de filtros de politetrafluoroetileno de 0.2 µm. Se comprobó que este extracto de tomate era estable durante al menos 10 días.



### 3.1.2. Purificación de los extractos de tomate

Los extractos obtenidos después de la extracción sólido-líquido se purificaron mediante extracción en fase sólida (SPE). Para ello alícuotas de 3 mL de los extractos de tomate se adicionaron a un cartucho ISOLUTE ENV+, previamente acondicionado con 5 mL de metanol y con 5 mL de agua ultrapura. La elución de las pteridinas retenidas se llevó a cabo con 3 mL de una mezcla acetonitrilo:agua, (80:20, v:v). Finalmente, 1 mL del eluido se evaporó a sequedad mediante una corriente de nitrógeno y el residuo se redisolvió con 1 mL de agua ultrapura. Antes de la inyección en el cromatógrafo, las disoluciones se filtraron a través de un filtro de PTFE de 0.2  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.3. Cuantificación de pteridinas presentes en las muestras de tomate

La cuantificación de las pteridinas se llevó a cabo mediante el método de la adición patrón. Para ello, se prepararon muestras de tomate liofilizado enriquecidas con las pteridinas de interés, a cinco niveles de concentración comprendido entre 30 y 200  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Cada muestra se preparó adicionando 800  $\mu\text{L}$  del extracto de tomate (o 200  $\mu\text{L}$  en el caso de la determinación de NH<sub>2</sub>) en un vial conteniendo volúmenes variables de las disoluciones patrón de trabajo de pteridinas e hidropterinas y diluyendo a 1 mL con agua ultrapura. Para la cuantificación de todos los analitos ensayados se utilizó como señal analítica el área de los picos del ión molecular protonado,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , del cromatograma de iones extraídos (Extracted Ion Chromatogram, EIC).

### 3.1.4. Sensibilidad, precisión y exactitud

Los límites de detección (LODs) se calcularon de acuerdo con el criterio de Long and Winefordner [2] ( $k=3$ ), y los límites de cuantificación (LOQs) como  $(\text{LOD}/3) \times 10$ , usando muestras de tomate contaminado a cinco niveles de concentración entre 30 y 200  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  (por triplicado). La precisión intra día ( $n=6$ ) e interday ( $n=5$ ), expresadas como desviación estándar relativa (RSD), se calculó utilizando muestras que contenían concentraciones de NH<sub>2</sub>, NEO, 6HMPT y PT6C correspondientes al LOQ.

### 3.2. Resultados y discusión

#### 3.2.1. Optimización de la separación cromatográfica y variables instrumentales del MS

Tanto las condiciones de la separación cromatográfica, como los parámetros instrumentales del detector de masas fueron optimizadas en el capítulo anterior. Se comprobó que el nuevo compuesto incluido, el 6HMDHPT, eluye a un tiempo de retención aceptable (8.0 min) lo cual nos permite seguir utilizando el mismo gradiente.

En la **Tabla 3.1**, se resumen los tiempos de retención para cada pteridina en una disolución estándar que contiene todos los derivados pteridínicos, la relación m/z para el ion  $[M+H]^+$  y los valores de resolución en los cromatogramas EIC de los compuestos con idénticos iones moleculares (NEO-MON y XAN-ISO).

**Tabla 3.1.** Características de la separación de las pteridinas analizadas usando modo gradiente en HPLC-MS en el cromatograma de EIC.

Derivado pteridínico	$t_R$ (min)	m/z $[M+H]^+$	Resolution <i>EICs mode</i>
NEO	5.90	<b>254</b>	$R_{MON/NEO} = 2.98$
NH2	6.00	256	
MON	6.86	<b>254</b>	
6HMDHPT	8.00	196	$R_{ISO/XAN} = 10.48$
XAN	9.40	<b>180</b>	
BH2	9.90	240	
BIO	10.72	238	
PT	11.73	164	
6HMPT	12.28	194	
ISO	13.76	<b>180</b>	
PT6C	18.12	208	

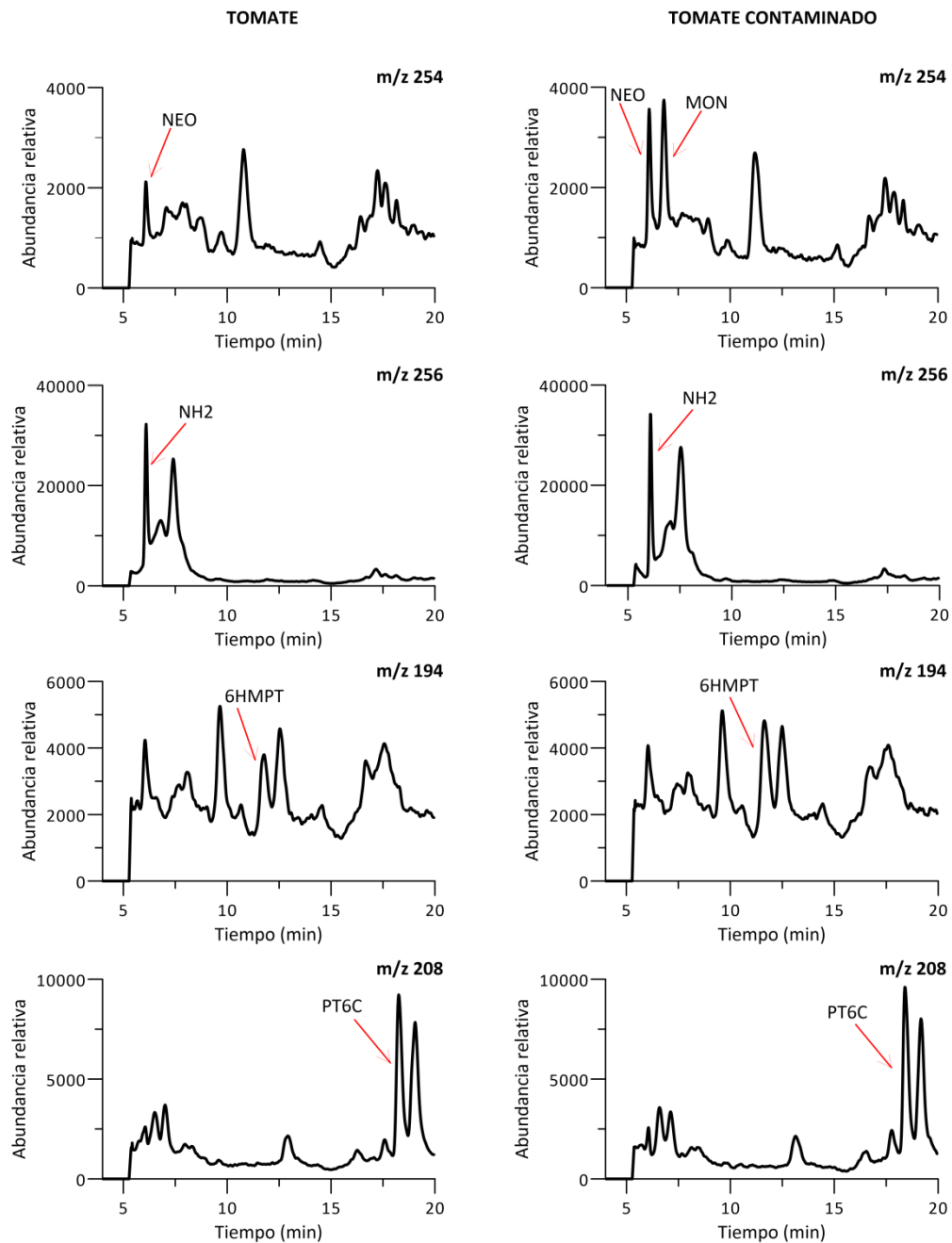
### 3.2.2. Proceso de limpieza de las muestras de tomate

Cuando se usa la detección de espectrometría de masas en el análisis de muestras complejas, como vegetales, se recomienda un paso de limpieza previo a la separación cromatográfica para proteger la columna y minimizar el efecto matriz. La SPE es la metodología seleccionada en la mayoría de las referencias bibliográficas relativas al análisis de alimentos, debido a su fácil uso, velocidad y variedad de adsorbentes. En nuestro caso, las muestras de tomate se limpiaron mediante SPE, usando cartuchos ISOLUTE ENV+ (200 mg) que contienen como sorbente un copolímero hidroxilado de poliestireno-divinilbenceno. En primer lugar, el cartucho se acondicionó con 5 mL de metanol y a continuación con 5 mL de agua ultrapura. Este procedimiento de extracción se optimizó con 3 mL de los extractos de tomate contaminados con pteridinas entre 150 y 300 ng·mL<sup>-1</sup>. Con el objetivo de verificar si las pteridinas se retienen en el cartucho, el eluido fue inyectado en el sistema cromatográfico. La ausencia de señales a los tiempos de retención de los compuestos seleccionados indicaba que las pteridinas ensayadas quedan retenidas en el cartucho. Para la elución y con el objetivo de lograr una máxima recuperación, se ensayaron diferentes disolventes como acetonitrilo (ACN), metanol y diferentes mezclas de estos disolventes orgánicos con agua ultrapura en proporciones 80:20, 50:50 y 20:80 (v:v, disolvente orgánico:agua ultrapura). Un sistema neumático nos permitió eluir simultáneamente 24 muestras de tomate utilizando un flujo fijo de eluyente. Los mejores valores de recuperación se obtuvieron usando entre 1.5 y 3 mL de mezcla acetonitrilo:agua 80:20, v:v. La repetitividad del procedimiento de extracción se comprobó realizando nueve extractos independientes y calculando los valores de recuperación medios. Dichos valores oscilaron entre 80 % para XAN e ISO y 118 % para BH2, independientemente de que la elución se realizara con 1.5 o con 3 mL de eluyente, permitiendo así poder realizar un paso de preconcentración en este punto en caso de ser necesario. Finalmente, se decidió realizar la elución con 3 mL del eluyente.

Por último, 1 mL del eluido se evaporó a sequedad mediante una corriente de nitrógeno, de manera que así se elimina el disolvente en el que se encuentran los analitos y el residuo se redisolvió con 1 mL de agua ultrapura para ser inyectados en las mismas condiciones que los patrones.

### 3.2.3. Análisis de muestras de tomates

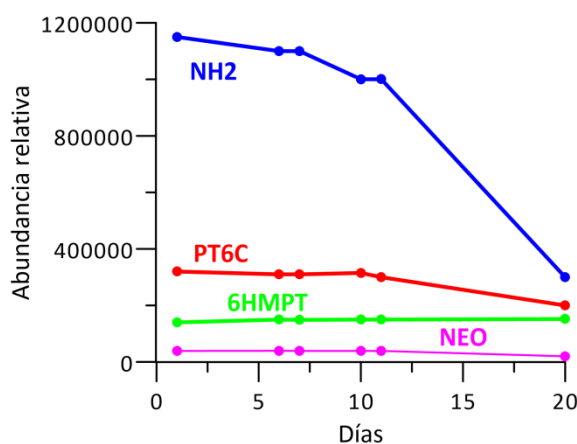
En primer lugar se focalizó el estudio en establecer cuáles eran las pteridinas presentes en las muestras de tomates. Para ello, se compraron los cromatogramas obtenidos para una alícuota de extracto de tomate contaminado con una mezcla estándar de pteridinas y otra alícuota no contaminada. Los EICs obtenidos en modo SIM se muestran en la **Figura 3.1**. Como se puede observar, solo cuatro pteridinas se detectaron en las muestras de tomate: NEO, NH<sub>2</sub>, 6HMPT y PT6C pero, debido a que los datos bibliográficos indican la presencia de MON en tomates [3], esta pteridina fue también incluida en algunas partes de este estudio.



**Figura 3.1.** EICs de una muestra de tomate (izquierda) y de una muestra de tomate enriquecida con pteridinas (derecha).

### 3.2.4. Estabilidad de las pteridinas en los extractos de tomate

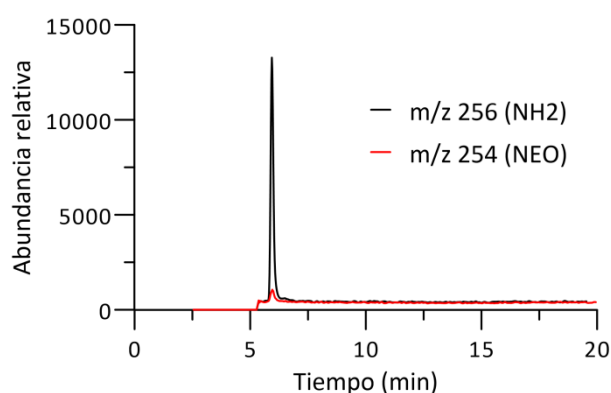
Como paso previo y debido a la conocida inestabilidad de las dihidropteridinas, se procedió a estudiar la estabilidad de las disoluciones de los extractos de tomate. Para ello durante 20 días se analizaron cromatográficamente alícuotas del mismo extracto de tomate contaminado con NEO, NH<sub>2</sub>, 6HMPT y PT6C. En la **Figura 3.2** se representa el valor medio de la abundancia relativa obtenida para tres inyecciones diarias durante 20 días. Se observa que las señales de NEO y PT6C, permanecen constantes durante los primeros 10 días y posteriormente decrecen ligeramente. La señal del 6HMPT permanece prácticamente constante durante los 20 días estudiados. Por último, el NH<sub>2</sub> es la pteridina que presenta menor estabilidad permaneciendo relativamente estable durante los 7 primeros días y decreciendo a menos de un tercio de su valor inicial después de 20 días. Se fijó un tiempo máximo de una semana para la realización del análisis después de la preparación de la muestra de tomate.



**Figura 3.2.** Estabilidad de las pteridinas detectadas en el tomate.

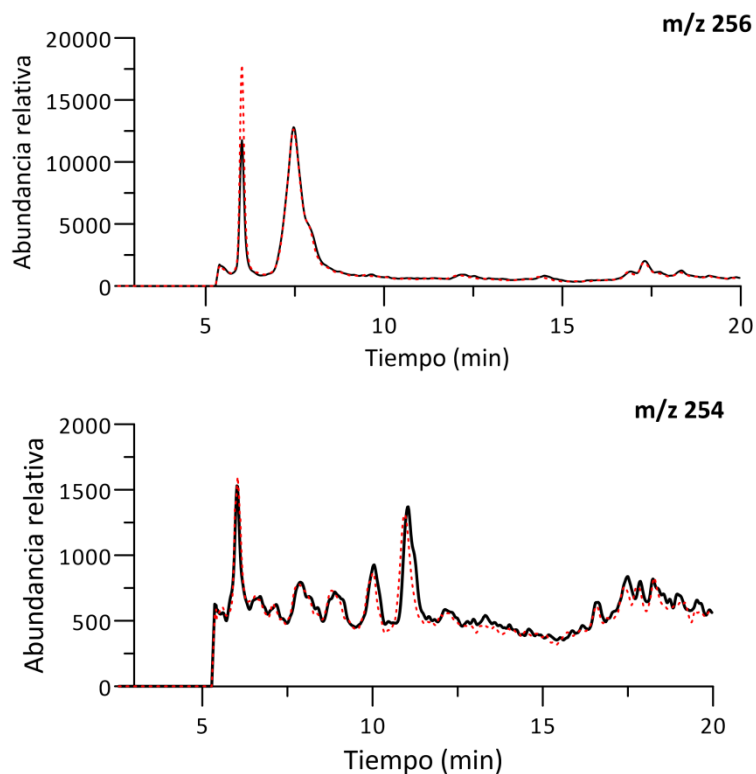
Además, para comprobar si los compuestos sufren degradación y/o procesos de interconversión, se realizó un estudio más en profundidad con patrones individuales y con extractos de tomate contaminados individualmente con cada pteridina y sometidos al proceso de limpieza. Para cada disolución se registraron las señales m/z de todos los iones no solo la del analito adicionado a la muestra, con el objetivo de ver si se produce además aumento de alguna otra señal, lo que significaría que se habría producido algún proceso de degradación.

Teniendo en cuenta que las hidropteridinas son más inestables y fácilmente oxidables, se llevó a cabo un estudio exhaustivo de la posible degradación del NH<sub>2</sub>. En primer lugar, una disolución patrón de NH<sub>2</sub>, sujeta al tratamiento de limpieza mediante SPE descrito anteriormente, se inyectó en el sistema cromatográfico y se registraron los EICs a valores de m/z de 256 y 254 correspondientes a NH<sub>2</sub> y NEO (forma oxidada del NH<sub>2</sub>) respectivamente. En la **Figura 3.3** se muestran ambos cromatogramas donde se puede apreciar que la señal correspondiente al posible NEO formado resulta ser extremadamente pequeña y prácticamente despreciable comparado con la señal del NH<sub>2</sub>.



**Figura 3.3.** EICs de una disolución patrón de NH<sub>2</sub> a m/z 256 y 254.

En segundo lugar se estudió el comportamiento del NH<sub>2</sub> en las muestras de tomate. Para ello, se comparan los EICs para m/z 256 y 254, obtenidos de muestras de tomate contaminadas a dos niveles, 100 ng·mL<sup>-1</sup> y 200 ng·mL<sup>-1</sup> con NH<sub>2</sub>. En la **Figura 3.4**, se puede observar que la señal del NEO (m/z =254) permanece constante independientemente de la concentración inicialmente adicionada de NH<sub>2</sub>. Esto nos permite confirmar que en esta matriz, y con el tratamiento de muestra propuesto, en presencia de disolventes orgánicos y a temperatura ambiente, el NH<sub>2</sub> es estable. Estos datos son contradictorios con los resultados publicados por Van Daele y col [4]. Sin embargo, resultados similares a los nuestros han sido descritos por Burton y colaboradores [5], quienes describen que la oxidación del 7,8-dihidroantopterin en la fuente de ionización es despreciable, en contradicción con lo indicado anteriormente por otros autores sobre la posible oxidación de las hidropteridinas en el propio sistema de MS.



**Figura 3.4.** EICs de extractos de tomate contaminado con 100 ng·mL<sup>-1</sup> de NH<sub>2</sub> (línea roja discontinua) y tomate contaminado con 200 ng·mL<sup>-1</sup> de NH<sub>2</sub> (línea negra continua).

### 3.2.5. Estudio del efecto matriz

Antes de realizar la calibración y cuantificación de las pteridinas, se evaluó la influencia de la matriz del tomate sobre el método HPLC-ESI-MS previamente descrito. Para ello, se realizó una comparación de las pendientes entre la curva de patrones externos en agua ultrapura y la curva de adición patrón con extracto de tomate contaminado con NH<sub>2</sub>, NEO, MON, 6HMPT y PT6C, a cinco niveles de concentración en el rango 0-200 ng·mL<sup>-1</sup> (por triplicado). Este estudio se realizó para cada pteridina y tanto en extractos de tomate sin limpieza, como en extractos de tomate que habían sido purificados mediante SPE.

En ambos casos, se calculó la curva de regresión y se compararon las pendientes entre ambas curvas aplicando el test estadístico *F* y *t* al 95% de confianza [6]. El efecto



matriz, expresado como porcentaje, se calculó como: % efecto matriz=  $100 \times (\text{pendiente adición patrón} / \text{pendiente patrón externo}) - 100$ .

Cuando se analizaron los extractos que no habían sido sometidos al proceso de limpieza mediante SPE se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes de la calibración por patrones externos y la de adición patrón. Este hecho indica que hay efecto matriz para todas las pteridinas presentando un valor absoluto en el intervalo 29.5-69.2 %. Para la mayoría de las pteridinas se observó un efecto de supresión de señal, aunque para el 6HMPT se observó un aumento de la señal. Cuando se usó la limpieza previa mediante SPE, se observó una disminución del efecto matriz, con valores absolutos entre 6.3 y 50.4%, para NH<sub>2</sub>, NEO y PT6C, sin embargo, para MON los resultados no mejoraron. Por lo tanto, la metodología de adición patrón, previa limpieza con SPE, es la recomendada para el análisis de pteridinas en muestras de tomate.

### 3.2.6. Validación del método

La linealidad de la señal del método se estableció utilizando extractos de tomate liofilizados y sometidos al proceso de limpieza mediante SPE, en un intervalo de concentraciones comprendido entre el LOQ para cada componente y 300 ng·mL<sup>-1</sup>. Se obtuvieron diferentes intervalos de linealidad dependiendo del compuesto y se calcularon los parámetros estadísticos. Se observó buena linealidad para las cinco pteridinas y los coeficientes de determinación fueron siempre superiores a 0.99, para todos los analitos. Los resultados del análisis de la regresión de mínimos cuadrados para la calibración y los LOD y LOQ se resumen en la **Tabla 3.2**. Los LOD están en un intervalo entre 8 y 12 ng·mL<sup>-1</sup>. El menor límite de detección se encontró para NEO (8 ng·mL<sup>-1</sup>) y valores muy similares se obtuvieron para MON, NH<sub>2</sub> y PT6C. Los LOQs se encuentran en el intervalo comprendido entre 27 y 41 ng·mL<sup>-1</sup>. Para evaluar la repetitividad (precisión intradía, n=6) del método, se calcularon los valores del % RSD usando disoluciones de extractos de tomate purificadas mediante SPE conteniendo 27 ng·mL<sup>-1</sup> de NEO, 40 ng·mL<sup>-1</sup> de MON ng·mL<sup>-1</sup>, 41 ng·mL<sup>-1</sup> de NH<sub>2</sub> 35 ng·mL<sup>-1</sup> de 6HMPT y 40.7 ng·mL<sup>-1</sup> de PT6C. La precisión inter-día fue analizada en 5 días consecutivos al mismo nivel de concentración. Los valores de la precisión intra-día oscilaron entre el 1.1 % para NEO y 6HMPT, hasta el 4.1 % para NH<sub>2</sub>, siendo los valores de la precisión inter-día < 9.6 % para todos los analitos, lo que indica la buena repetitividad del método propuesto.

**Tabla 3.2.** Parámetros estadísticos de la recta de calibrado de adición patrón.

Parámetros	NEO	MON	NH2	6HMPT	PT6C
Pendiente $\pm$ Sb <sup>a</sup>	690 $\pm$ 17	1341 $\pm$ 44	617 $\pm$ 2	2708 $\pm$ 83	520 $\pm$ 18
Ordenada $\pm$ Sa <sup>b</sup>	6331 $\pm$ 1856	1182 $\pm$ 535	33990 $\pm$ 223	56853 $\pm$ 9260	22113 $\pm$ 1971
R <sup>2</sup>	0.9948	0.9935	0.9903	0.9906	0.9886
Linealidad <sup>c</sup> (%)	98	97	98	97	98
LOD <sup>d</sup> (ng·ml <sup>-1</sup> )	8.1	12.0	12.3	10.5	12.2
LOQ <sup>e</sup> (ng·ml <sup>-1</sup> )	27.0	40.0	41.0	35.0	40.7

a: Sb, desviación estándar de la pendiente;

b: Sa, desviación estándar de la ordenada (n= 15); c:  $\alpha=\beta= 0.05$ ;

d: LOD, límite de detección de acuerdo al criterio de Long-Winefordner (k=3);

e: LOQ, límite de cuantificación: LOD x 10/3

### 3.2.7. Análisis de las muestras de tomate

Finalmente, el método LC-ESI-MS se aplicó al análisis de muestras de tomate liofilizadas. Se empleó la metodología de adición patrón y los extractos de tomate se contaminaron a cinco niveles de concentración, para cada pteridina, en el intervalo entre 30 y 200 ng·mL<sup>-1</sup>. Las muestras se prepararon por triplicado y los resultados se muestran en la **Tabla 3.3**, como los valores y recuperaciones medios. La precisión se evaluó a través del cálculo del porcentaje de recuperación para cada pteridina y, en todos los casos, se obtuvieron valores satisfactorios entre 83 y 117%. Para las pteridinas oxidadas, se encontraron concentraciones de 0.29  $\pm$  0.10, 0.68  $\pm$  0.19 y 1.33  $\pm$  0.34  $\mu$ g pteridina/g de tomate liofilizado para NEO, 6HMPT y PT6C, respectivamente. Y para la hidropteridina (NH2) la cantidad encontrada fue 6.90  $\pm$  1.15  $\mu$ g pteridina/g de tomate liofilizado. Los resultados obtenidos indican que NH2 es el compuesto más abundante y NEO es el compuesto que está en menor concentración. MON no se detectó bajo las condiciones ensayadas.

Teniendo en cuenta el proceso de liofilización aplicado, y el valor medio del contenido en agua de las muestras de tomate ensayadas, 93.5  $\pm$  2.0 %, la concentración de pteridinas también se expresa como  $\mu$ g de pteridina/g de tomate fresco para poder ser comparado con algunos datos bibliográficos. Los valores obtenidos fueron 0.019  $\pm$  0.006  $\mu$ g·g<sup>-1</sup> (0.075 nmol·g<sup>-1</sup>) para NEO, 0.44  $\pm$  0.11  $\mu$ g·g<sup>-1</sup> (1.72 nmol·g<sup>-1</sup>) para NH2, 0.043  $\pm$  0.012  $\mu$ g·g<sup>-1</sup> (0.17 nmol·g<sup>-1</sup>) para 6HMPT y 0.087  $\pm$  0.011  $\mu$ g·g<sup>-1</sup> (0.34 nmol·g<sup>-1</sup>) para PT6C.

Estos resultados están en concordancia con los publicados previamente por Rodrigues y col [7], quienes, habían cuantificado varias pteridinas en un tipo de tomate salvaje usando HPLC con detección fluorimétrica. El contenido de pteridinas totales publicado fue del orden de  $1 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ , pero en este procedimiento el NH2 no pudo ser detectado debido al paso de oxidación previo necesario para poder utilizar un detector fluorimétrico.

**Tabla 3.3.** Cantidad de pteridinas encontradas y recuperaciones en las muestras de tomate.

Analito	Añadido ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Encontrado <sup>a</sup> ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Rec <sup>a</sup> (%)	$\mu\text{g}$ pteridina/g de tomate liofilizado) $\pm$ interval de confianza <sup>b</sup>	( $\mu\text{g}$ pteridina/g de tomate fresco) $\pm$ interval de confianza <sup>b</sup>
NEO	0	<LOQ	---	0.29 $\pm$ 0.10	0.019 $\pm$ 0.006
	29.92	37.98	83		
	49.37	57.07	89		
	89.76	102.87	100		
	149.60	157.59	97		
	198.97	209.19	99		
NH2	0	54.53	---	6.90 $\pm$ 1.15	0.44 $\pm$ 0.11
	29.72	83.45	97		
	49.60	106.89	106		
	99.20	149.57	96		
	148.80	211.75	106		
	198.40	245.86	96		
MON	0	<LOD	---	< LOD	-----
	30.00	<LOQ	---		
	49.50	90.60	112		
	90.00	137.70	114		
	150.00	191.26	104		
	199.50	242.18	104		
6HMPT	0	<LOQ	---	0.68 $\pm$ 0.19	0.043 $\pm$ 0.012
	30.08	49.48	82		
	49.63	65.11	82		
	90.27	115.06	100		
	150.40	169.39	96		
	200.03	222.35	99		
PT6C	0	42.02	---	1.33 $\pm$ 0.34	0.087 $\pm$ 0.011
	30.16	77.23	117		
	49.76	96.26	109		
	90.48	144.35	113		
	150.08	192.10	100		

a: valor medio de tres réplicas de cada cantidad añadida, b:  $\alpha= 0.05$

### 3.3. Conclusiones

Se ha desarrollado un nuevo método analítico mediante HPLC-ESI-MS para determinar precursores pteridínicos de folatos en tomates como una alternativa a la detección fluorimétrica, permitiendo así la determinación de hidropteridinas, a diferencia de los publicados anteriormente. El método propuesto permite la determinación de pteridinas en el estado de oxidación natural en el que se encuentran en el tomate de manera simple.

Por otro lado, el uso de un analizador de simple cuadrupolo facilita su uso debido a que es un detector fácil, económico y robusto para el análisis de rutina. No se realizaron procesos de preoxidación o calentamiento, con el objetivo de mantener el estado natural en el que las pteridinas están presentes en la muestra de tomate. Se ha demostrado que con las condiciones propuestas en este método la oxidación del NH<sub>2</sub> es despreciable y que es esta forma reducida del NEO, la predominante y no el NEO. Es importante destacar que no se ha encontrado MON en contra de lo indicado en la bibliografía.

Por lo tanto, este método podría ser utilizado para monitorizar la cantidad de pteridinas en estudios de biofortificación de folatos en tomate y podría ser fácilmente adaptable para su control en otros vegetales.

### 3.4. Bibliografía

- [1] A. Goyer, V. Illarionova, S. Roje, M. Fischer, A. Bacher, A.D. Hanson, Folate Biosynthesis in Higher Plants . cDNA Cloning , Heterologous Expression, and Characterization of Dihydroneopterin Aldolases, *Plant Physiol.* 135 (2004) 103–111.
- [2] G.L. Long, J.D. Winefordner, Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition, *Anal. Chem.* 55 (1983) 712A–724A.
- [3] R.I. Diaz de la Garza, J.F. Gregory III, A.D. Hanson, Folate biofortification of tomato fruit, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (2007) 4218–4222.
- [4] J. Van Daele, D. Blancquaert, F. Kiekens, D. Van Der Straeten, W.E. Lambert, C.P. Stove, Degradation and interconversion of plant pteridines during sample preparation and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Chem.* 194 (2016) 1189–1198.
- [5] C. Burton, H. Shi, Y. Ma, Development of a high-performance liquid chromatography - Tandem mass spectrometry urinary pterinomics workflow, *Anal. Chim. Acta.* 927 (2016) 72–81.
- [6] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, 1997.
- [7] V. Rodrigues da Silva, E. Quinlivan, A.D. Hanson, J.F. Gregory, Quantification of Pteridines in Plant-Derived Foods by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), *FASEB J.* 21 (2007) A346.

#### **4. Determinación mediante HPLC-FSFD de pteridinas marcadoras en suero humano**

---



El objetivo de este trabajo es establecer un patrón de referencia para el contenido de pteridinas en suero procedente de personas sanas. Para ello se optimizará un método mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con detección fluorimétrica de alta velocidad (HPLC-FSFD) para determinar las siguientes pteridinas: ácido pterin-6-carboxílico (PT6C), xantopterin (XAN), neopterin (NEO), monapterin (MON), isoxantopterin (ISO), pterin (PT), biopterin (BIO), 7-biopterin (7BIO) y 6-hidroximetilpterin (6HMPT). Teniendo en cuenta los escasos datos referentes al contenido de pteridinas en sueros, se llevará a cabo una preoxidación con objeto de expresar finalmente los contenidos como pteridinas totales y poder comparar los resultados obtenidos con los datos existentes en la bibliografía, ya que estos han sido obtenidos mayoritariamente mediante preoxidaciones químicas clásicas.

#### **4.1. Material y métodos**

##### **4.1.1. Preparación de disoluciones**

Disoluciones patrón de las nueve pteridinas individuales ( $15\text{-}30\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ) se prepararon por pesada exacta del sólido, disolución en agua ultrapura alcalinizada y posterior neutralización con ácido clorhídrico. Las disoluciones se almacenaron a  $-18^{\circ}\text{C}$  en la oscuridad en viales que contenían pequeñas alícuotas. Cada vial se descongeló una única vez. Estas disoluciones fueron estables durante tres semanas. Diariamente, se prepararon disoluciones de trabajo mezcla de todas las pteridinas por dilución de las disoluciones patrón con agua ultrapura.

Para llevar a cabo la aplicación del método se utilizó una mezcla de sueros sanguíneos procedentes de veinte voluntarios sanos, con edades comprendidas entre 25-50 años. De ellos el 80% fueron mujeres y el 20% hombres, pertenecientes a nuestro Grupo de Investigación, ANAYCO, de la Universidad de Extremadura. Los viales que contenían alícuotas de estos sueros, sin enriquecer y enriquecidos con pteridinas, se mantuvieron a  $-18\ ^{\circ}\text{C}$  y en la oscuridad.

##### **4.1.2. Instrumentación**

Los estudios cromatográficos se realizaron en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución, cuyas características se detallan en el Anexo 2.

Para la separación, se emplearon dos columnas cromatográficas: Zorbax-Eclipse SDB C18 (150 x 4.6 mm, 5.6  $\mu\text{m}$ ) y Poroshell 120 (150 x 3 mm, 2.7  $\mu\text{m}$ ). La temperatura del horno



de columnas se fijó a 22 °C. La fase móvil estuvo compuesta por formiato amónico 2 mmol·L<sup>-1</sup> (pH=7.1) en modo isocrático seguido de una limpieza con acetonitrilo al 100% durante tres minutos. Se optimizó un post-run de 10 minutos para reequilibrar la columna antes de cada nueva inyección. La fase móvil se filtró a través de filtros de nylon de 0.22 µm y se desgasificó mediante ultrasonidos. El flujo se fijó en 1.7 mL·min<sup>-1</sup> en la columna Zorbax-Eclipse y en 0.4 mL·min<sup>-1</sup> en la Poroshell. Los volúmenes de muestra inyectados fueron 20 µL en la columna Zorbax-Eclipse y 10 µL en la columna Poroshell.

Como consecuencia de las diferentes longitudes de onda de emisión que presentan las pteridinas en estudio se utilizó el modo de multiemisión en el detector FSPD, cuya longitud de onda de excitación ( $\lambda_{exc}$ ) se fijó en 272. Se registraron los cromatogramas a longitudes de onda de emisión ( $\lambda_{em}$ ) de 410, 445 y 465 nm. Además, se registraron los espectros de emisión entre 350-500 nm en los picos cromatográficos.

Las curvas de calibración así como el cálculo de los parámetros de calidad de los métodos se realizaron mediante el programa ACOC desarrollado en nuestro Grupo de Investigación (Anexo 2).

#### **4.1.3. Procedimiento de calibración**

Las curvas de calibrado se construyeron a partir de disoluciones patrón de pteridinas a cinco niveles de concentración, con valores comprendidos entre 0.2-7.0 ng·mL<sup>-1</sup>. Las muestras se prepararon por dilución de los volúmenes apropiados de las disoluciones patrón y fueron enrasadas con fase móvil. Para cada nivel de concentración se prepararon tres réplicas y se filtraron a través de filtros de nylon de 0.22 µm antes de su inyección en el cromatógrafo. Como señal analítica se utilizó el área de pico obtenida a  $\lambda_{exc} = 272$  nm y  $\lambda_{em} = 410$  nm para ISO, 465 nm para XAN y 445 nm para las demás pteridinas.

#### **4.1.4. Análisis de pteridinas en las muestras de suero**

Las alícuotas de suero (3 mL) se descongelaron y centrifugaron a 3000 rpm durante 30 minutos transcurridos los cuáles se filtraron mediante filtros de nylon de 0.22 µm. Posteriormente, se añadieron 750 µL de una disolución de ácido tricloroacético 3 mol·L<sup>-1</sup> y 400 µL de disolución de iodo (2%/4% I<sub>2</sub>/I<sup>-</sup>) como oxidante. La mezcla obtenida se mantuvo en la oscuridad durante 1.0 h a temperatura ambiente y se centrifugó a 3000 rpm durante 30 minutos. Del sobrenadante se tomaron 3 mL, se neutralizaron con hidróxido sódico y se pasaron a través de un cartucho SPE ISOLUTE ENV, el cual había sido previamente

#### 4. Determinación de pteridinas en suero humano

---

acondicionado con 5 mL de metanol y 5 mL de agua ultrapura. Como eluyente de las pteridinas retenidas se empleó 3.0 mL de una mezcla acetonitrilo-agua (80-20). Finalmente, 1.0 mL del eluido se evaporó hasta sequedad mediante corriente de N<sub>2</sub> a temperatura ambiente y el residuo se redisolvió con 0.5 mL de fase móvil.

Se analizaron muestras de suero no enriquecidas y enriquecidas a cuatro niveles de concentración hasta 3.0 ng·mL<sup>-1</sup> para todos los analitos, excepto para XAN e ISO para los cuáles los valores máximos fueron 4.2 y 1.2 ng·mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Se empleó una columna cromatográfica Poroshell y como señal analítica se utilizó el área del pico cromatográfico obtenida a la longitud de onda seleccionada anteriormente y empleando la metodología del patrón externo y de la adición patrón para cada una de las pteridinas analizadas.

## 4.2. Resultados y discusión

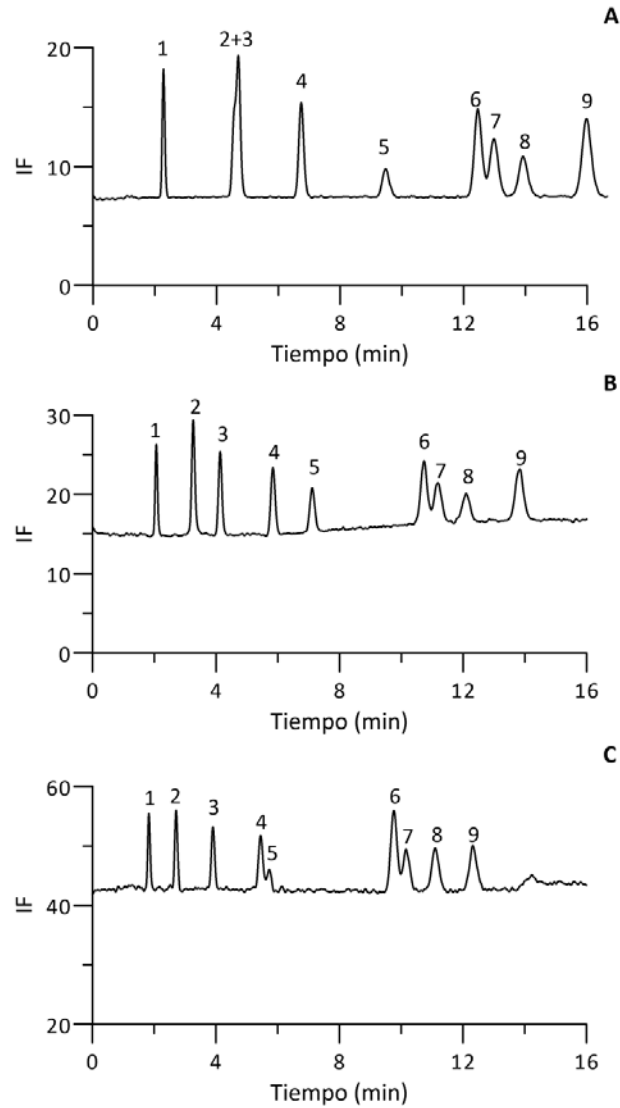
### 4.2.1 Optimización de la separación cromatográfica y comparación de la eficiencia de las columnas

Con el objetivo de obtener una adecuada separación de las nueve pteridinas marcadoras en estudio, se ensayaron dos columnas C18 diferentes. Una columna Zorbax-Eclipse XDB (150 mm x 4.6 mm, 5.6  $\mu\text{m}$ ) rellena con partículas porosas y otra Poroshell 120 (150 mm x 3 mm, 2.7  $\mu\text{m}$ ) rellena con partículas de núcleo sólido. Con ambas se estudió la influencia de parámetros que influyen en la separación cromatográfica, tales como la composición de la fase móvil y el flujo de la misma.

En estudios anteriores está descrito el drástico efecto que la acidez del medio ejerce sobre la retención de las pteridinas en fase inversa y por ello se ha puesto un énfasis especial en el estudio de la influencia de la acidez de la fase móvil. Para ello se ensayaron diferentes fases móviles compuestas por ácido fórmico y formiato amónico a diferentes pH.

Se observó que tanto los tiempos de retención como los valores de resolución estaban fuertemente influenciados por la acidez de la fase móvil. En ambas columnas se observó que un aumento del pH de la fase móvil daba lugar a una disminución de los tiempos de retención. En la **Figura 4.1** se muestran los cromatogramas obtenidos con fases móviles a tres valores de pH (6.5, 7.1 y 7.5) y utilizando la columna Zorbax. Como se puede observar, tanto a pH 7.1 como pH 7.5, aparecen nueve picos cromatográficos, pero a pH 7.5 se observa una baja resolución entre los picos 4 y 5, correspondientes a MON e ISO. A pH 7.1 el tiempo de retención del ISO aumenta notablemente de manera que se obtiene una adecuada resolución entre los picos 4 y 5, retrasándose, en general, la elución de todos los compuestos. Tanto es así, que a pH 6.5 el retraso en la elución del pico 2 correspondiente a XAN hace que coeluya con el pico 3, NEO, haciendo inviable la separación a este pH. Por lo tanto, a pH=7.1 se observa una adecuada resolución para las pteridinas más polares sin embargo, la resolución entre los picos 6-7 correspondientes a PT y BIO es bastante baja.

Estos estudios se realizaron usando una velocidad de flujo de 1 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>. Sin embargo, se comprobó que se podían emplear flujos elevados con objeto de disminuir el tiempo total de registro. Para los estudios posteriores se fijó 1.7 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>, consiguiéndose la elución de todas las pteridinas en aproximadamente 10 minutos.



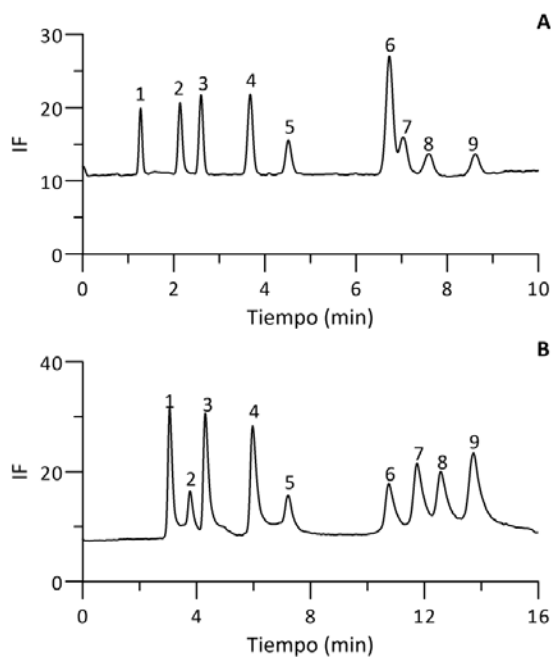
**Figura 4.1.** Influencia de la acidez de la fase móvil (fórmico-formiato) en la separación de pteridinas en columna de partículas porosas C18 (Zorbax-Eclipse XDB), Caudal: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>.

A) pH = 6.5, B) pH = 7.1, C) pH=7.5.  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 272 \text{ nm}/445 \text{ nm}$ .

1: PT6C, 2: XAN, 3: NEO, 4: MON, 5: ISO, 6: PT, 7: BIO, 8: 7BIO, 9: 6HMPT

Cuando se lleva a cabo esta misma experiencia utilizando una columna Poroshell 120 se observó un comportamiento similar, sin embargo, se obtenía una mejor resolución entre los picos correspondientes a las pteridinas menos polares. Concretamente a pH 7.1 se observó una adecuada resolución entre PT y BIO.

Como consecuencia, se seleccionó una fase móvil compuesta por formiato amónico, 2 mmol·L<sup>-1</sup> (pH 7.1) como óptima para realizar la separación en ambas columnas, empleando una elución en modo isocrático. Hay que tener en cuenta que para la columna de núcleo sólido el caudal usado debe ser pequeño y para esta separación se optimizó un caudal de 0.4 mL·min<sup>-1</sup>. En la **Figura 4.2**, se muestran los cromatogramas obtenidos en las condiciones óptimas con la columna porosa (A) y con la columna de núcleo sólido (B). Con esta última, los picos aparecen resueltos en todos los casos empleándose un tiempo total de aproximadamente 15 minutos. Se observa una menor resolución para las pteridinas más polares pero aumenta la resolución entre BIO y PT, aspecto este de capital importancia en el análisis de fluidos biológicos.



**Figura 4.2.** A) Cromatograma obtenido con la columna porosa Zorbax Eclipse (1.7 mL·min<sup>-1</sup>) y B) Cromatograma obtenido con la columna de núcleo sólido Poroshell (0.4 mL·min<sup>-1</sup>).

$\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 272 \text{ nm}/445 \text{ nm}$ . Fase móvil: 2 mmol·L<sup>-1</sup> formiato amónico (pH 7.1).

1: PT6C, 2: XAN, 3: NEO, 4: MON, 5: ISO, 6: PT, 7: BIO, 8: 7BIO, 9: 6HMPT

#### 4.2.2. Influencia de la concentración de las pteridinas en la separación mediante HPLC con detección fluorimétrica

Para estudiar como influye la concentración de pteridinas en la señal fluorescente, se prepararon patrones de concentraciones conocidas, en diferentes intervalos y se ensayaron varias columnas. En la columna Zorbax de partícula porosa, la concentración de pteridinas estaba comprendida entre 1.0 y 6.0 ng·mL<sup>-1</sup>, excepto para XAN y PT, que estaba comprendida entre 2.0 y 12.0 ng·mL<sup>-1</sup> y para ISO entre 1.5 y 8.5 ng·mL<sup>-1</sup>. En la columna Poroshell de núcleo sólido los intervalos fueron 0.7-7.0 ng·mL<sup>-1</sup> para XAN; 0.4-4.0 ng·mL<sup>-1</sup> para MON; 0.2-2.0 ng·mL<sup>-1</sup> para ISO; 0.6-6.0 ng·mL<sup>-1</sup> para PT y entre 0.5-5.0 ng·mL<sup>-1</sup> para las restantes pteridinas. La detección se llevó a cabo en modo multiemisión, manteniendo fija la longitud de onda de excitación a 272 nm y la de emisión se fijó para obtener la mayor sensibilidad en cada caso, así se usó  $\lambda_{em} = 410$  nm para ISO; 465 nm para XAN y 445 nm para las demás pteridinas. Cada muestra se inyectó por triplicado y se empleó las áreas de pico como señal analítica.

En la **Tabla 4.1** se resumen los parámetros de calibración obtenidos mediante el método de patrón externo para ambos tipos de columna. Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) se obtuvieron según el criterio de Long and Winefordner [1]. Se observa una adecuada linealidad, obteniéndose en todos los casos coeficientes de determinación  $R^2 > 0.99$ . Los LODs obtenidos en la columna Poroshell son en todos los casos mejores que los obtenidos en la columna Zorbax. Los valores oscilan entre 0.23 ng·mL<sup>-1</sup> para MON y 0.88 ng·mL<sup>-1</sup> para ISO en la columna Zorbax y entre 0.044 ng·mL<sup>-1</sup> para MON y 0.37 ng·mL<sup>-1</sup> para XAN en la columna Poroshell. Como podemos observar en todos los casos los LODs son del orden de cuatro veces más sensibles en esta última columna.

**Tabla 4.1.** Parámetros analíticos para la determinación de pteridinas mediante HPLC con detección fluorescente.

Analito	$t_R \pm SD^a$ (min)	Intervalo lineal (ng mL <sup>-1</sup> )	Pendiente $\pm SD^a$	R <sup>2</sup>	Linealidad (%)	LOD <sup>b</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )	LOQ <sup>c</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )
Columna Zorbax Eclipse (partícula porosa)							
PT6C	1.3 ± 0.1	1.0 - 6.0	24.2 ± 0.4	0.9974	98	0.31	1.0
XAN	2.1 ± 0.1	2.0 - 12.0	21.9 ± 0.3	0.9988	99	0.47	1.6
NEO	2.6 ± 0.1	1.0 - 6.0	35.3 ± 0.6	0.9973	98	0.32	1.1
MON	3.7 ± 0.1	1.0 - 6.0	44.6 ± 0.6	0.9986	99	0.23	0.77
ISO	4.5 ± 0.1	1.5 - 8.5	39.6 ± 0.6	0.9901	97	0.88	2.9
PT	6.8 ± 0.1	2.0 - 12.0	54.7 ± 0.7	0.9989	99	0.43	1.4
BIO	7.1 ± 0.1	1.0 - 6.0	30.4 ± 0.7	0.9961	98	0.38	1.3
7BIO	7.6 ± 0.1	1.0 - 6.0	20.2 ± 0.5	0.9964	98	0.34	1.1
6HMPT	8.7 ± 0.1	1.0 - 6.0	20.9 ± 0.5	0.9948	97	0.44	1.5
Columna Poroshell (partícula de núcleo sólido)							
PT6C	3.1 ± 0.1	0.5 - 5.0	118 ± 1	0.9994	99	0.076	0.37
XAN	3.8 ± 0.1	0.7 - 7.0	61 ± 2	0.9921	97	0.37	2.0
NEO	4.3 ± 0.1	0.5 - 5.0	137 ± 1	0.9989	99	0.065	0.51
MON	5.9 ± 0.1	0.4 - 4.0	181 ± 11	0.9996	99	0.044	0.23
ISO	7.3 ± 0.2	0.2 - 3.0	440 ± 10	0.9951	98	0.059	0.34
PT	10.7 ± 0.2	0.6 - 6.0	77 ± 1	0.9986	99	0.13	0.77
BIO	11.7 ± 0.2	0.5 - 5.0	101 ± 2	0.9977	98	0.14	0.87
7BIO	12.6 ± 0.2	0.5 - 5.0	88 ± 1	0.9991	99	0.076	0.47
6HMPT	13.7 ± 0.2	0.5 - 5.0	153 ± 2	0.9987	99	0.11	0.57

a: SD, desviación estándar, (n=15).

b: LOD, límite de detección de acuerdo al criterio de Long and Winefornerd [1].  $\alpha = \beta = 0.05$ .

c: LOQ, límite de cuantificación.

Señal analítica: área del pico obtenida a  $\lambda_{ex} = 272$  nm y  $\lambda_{em} = 410, 465$  y  $445$ nm para ISO, XAN y el resto de pteridinas respectivamente; concentraciones expresadas como ng·mL<sup>-1</sup>.

#### 4.2.3. Aplicación del método propuesto al análisis de muestras de suero

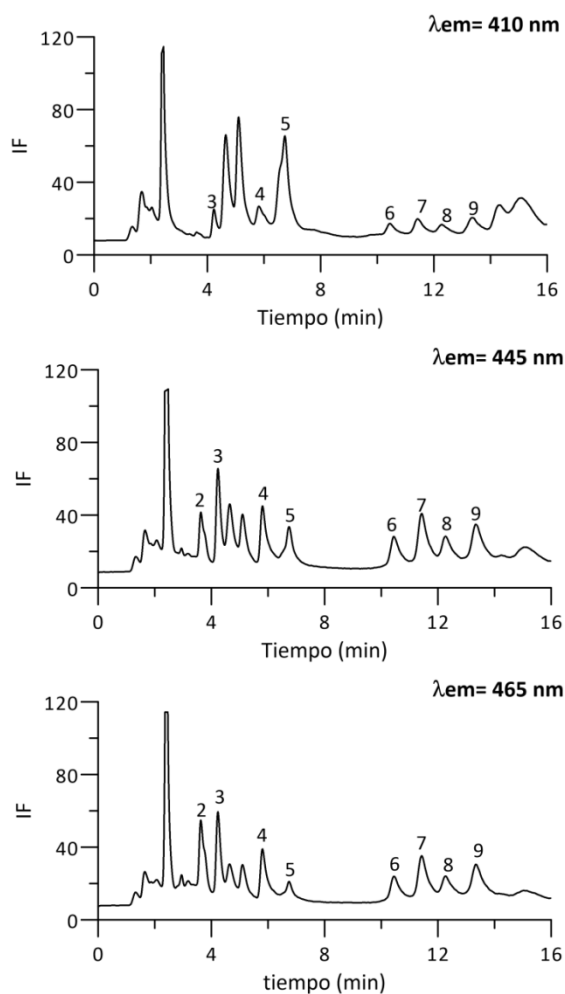
Los niveles de pteridinas en suero humano son del orden de  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  o menores, como consecuencia se eligió para su análisis la columna Poroshell con objeto de obtener la máxima sensibilidad. Por otra parte, la resolución obtenida para BIO con respecto a PT es mejor con esta columna de núcleo sólido. Aunque la elección de esta columna supone incrementar los tiempos totales de análisis, ésto se compensa con su mayor sensibilidad y resolución, dada la importancia que tiene el análisis de BIO en los fluidos biológicos. En cualquier caso, se llevó a cabo un estudio completo que involucra el cálculo de los parámetros cromatográficos en presencia de suero con ambas columnas.

Las muestras de suero se trataron como se ha descrito en el apartado 4.1.4. En primer lugar se lleva a cabo la precipitación de las proteínas del suero con ácido tricloroacético y la posterior oxidación de las pteridinas reducidas (dihidropteridinas y tetrahidropteridinas) para generar los compuestos fluorescentes correspondientes a las pteridinas en su estado máximo de oxidación. Se empleó  $\text{I}_2/\text{I}^-$  como agente oxidante, de acuerdo con el procedimiento clásico descrito por Fukushima [2]. Este tratamiento, que generalmente es suficiente cuando el análisis se realiza mediante HPLC empleando columnas C18 con partículas de  $5.6\ \mu\text{m}$ , no resulta suficiente cuando se emplean columnas con partículas de núcleo sólido. En este segundo tipo de columnas se producían fuertes retenciones de compuestos presentes en la matriz del suero que llegaban a bloquear a la columna afectando a su eficacia. Como consecuencia fue necesario llevar a cabo una limpieza más exhaustiva de las muestras antes de su inyección por lo que se optimizó un proceso previo de limpieza mediante extracción en fase sólida (SPE).

Se realizó la purificación de las muestras previamente oxidadas mediante cartuchos ISOLUTE ENV+, que habían sido ensayados con éxito previamente para las muestras de tomate. Para la elución de la muestra se ensayaron mezclas metanol-agua y acetonitrilo-agua en los intervalos de 20% a 100% del disolvente orgánico. Se obtuvieron recuperaciones satisfactorias para las mezclas 80/20 (disolvente orgánico/agua) y 50/50 (disolvente orgánico/agua) preferentemente empleando acetonitrilo como disolvente orgánico. Para porcentajes menores de acetonitrilo las recuperaciones disminuyen notablemente. Se estableció una mezcla 80/20, acetonitrilo/agua como óptima para llevar a cabo la elución. En estas condiciones los valores de recuperación oscilan entre 80% ( $\pm 8.6$ ) y 99% ( $\pm 3.4$ ). En la **Figura 4.3** se han representado los cromatogramas obtenidos a las diferentes longitudes de onda para una muestra de suero enriquecida con las pteridinas en estudio. Como se puede



observar la señal de ISO (pico 5) sufre un notable incremento a  $\lambda_{em} = 410$  nm mientras que la señal correspondiente al XAN (pico 2) es más fácilmente detectable a 465 nm. Para el resto de los compuestos analizados en las muestras de suero, se seleccionó 445 nm como  $\lambda_{em}$ . También se puede observar como el pico 1 correspondiente al PT6C, aparece solapado con los compuestos polares de la matriz que aparecen a tiempos más cortos, por lo que la detección de este analito en las muestras de suero no fue posible.

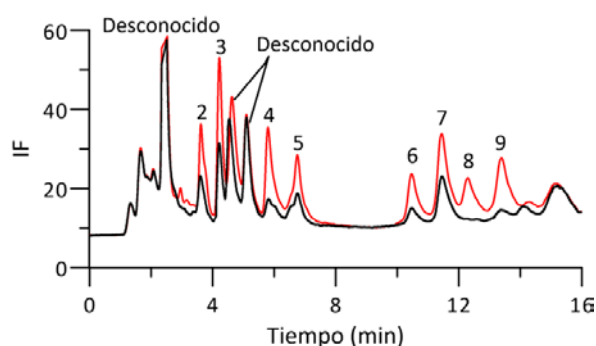


**Figura 4.3.** Cromatogramas de muestras de suero enriquecido con las pteridinas en estudio previa oxidación  $I_2/I^-$  y limpieza mediante SPE.

Condiciones: columna Poroshell,  $\lambda_{exc} = 272$  nm.

2: XAN, 3: NEO, 4: MON, 5: ISO, 6: PT, 7: BIO, 8: 7BIO, 9: 6HMPT

En la **Figura 4.4** se pueden observar los cromatogramas correspondientes a una muestra de suero enriquecida y otra sin enriquecer, en ambos casos pre-oxidadas y extraídas mediante SPE. En la muestra de suero sin enriquecer se encontraron picos correspondientes a todos los analitos en mayor o menor extensión, excepto para el 7BIO, ya que como se comentó en la introducción, este analito solo aparece en fluidos biológicos procedentes de personas con patologías muy específicas.



**Figura 4.4.** Cromatogramas de una muestra de suero preoxidada sin enriquecer (línea negra) y de una muestra de suero preoxidada y enriquecida (línea roja) con PT6C, NEO, BIO, 7BIO y 6HMPT ( $3 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); XAN ( $4.2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), MON ( $2.4 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), ISO ( $1.2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y PT ( $3.5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; Condiciones: columna Poroshell,  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 272/445 \text{ nm}$ .

Una vez optimizado el pretratamiento de las muestras se procedió al establecimiento de los parámetros cromatográficos para muestras de suero enriquecidas usando ambas columnas. Se calcularon los valores de resolución (R), factor de capacidad ( $k'$ ) y número de platos teóricos (N) usando los tiempos de retención y la semianchura de pico ( $w_{1/2}$ ). De esta manera, el efecto de la presencia de la matriz del suero en la separación se podrá evaluar de forma real. Cada parámetro se determinó sobre cinco muestras independientes y los valores medios calculados aparecen resumidos en la **Tabla 4.2**.

Los valores de  $k'$  calculados oscilan entre 1.71 para XAN y 9.02 para 6HMPT usando columna Poroshell y entre 2.21 y 10.27 para Zorbax. Los valores de la resolución de cada pico con respecto al anterior compuesto eluido oscilan entre 1.36 y 8.04 en la columna Poroshell y valores ligeramente superiores 1.34 a 8.57 en la columna Zorbax. Es de destacar la mejor resolución obtenida con la columna Poroshell para los compuestos BIO-PT (1.36), con respecto al valor de 0.79 obtenido en la columna Zorbax.

Los estudios de precisión se realizaron con muestras preparadas e inyectadas en un mismo día (n=6) e inyectadas en varios días consecutivos (n=5) utilizando muestras de suero enriquecidas con una mezcla patrón de pteridinas conteniendo 4.2 ng·mL<sup>-1</sup> de XAN, 2.4 ng·mL<sup>-1</sup> de MON, 1.2 ng·mL<sup>-1</sup> de ISO, 3.5 ng·mL<sup>-1</sup> de PT y 3.0 ng·mL<sup>-1</sup> para las demás pteridinas en estudio. Los valores de desviación estándar relativa (RSD) estuvieron entre 0.72 y 5.3 % en los estudios en el mismo día y entre 1.2 y 12 % para los estudios entre cinco días diferentes.

**Tabla 4.2.** Parámetros cromatográficos para muestras de suero enriquecido con las pteridinas en estudio.

Analito	$t_R$ (min) ± SD	$W_{1/2}$ (min) ± SD	$k'$ ± SD	N ± SD	$R_s$ ± SD
<i>Columna de partícula de núcleo sólido Poroshell</i>					
<i><math>t_m = 1.34 \pm 0.01</math> min</i>					
XAN	3.63 ± 0.02	0.21 ± 0.02	1.71 ± 0.02	1609 ± 246	6.9 ± 0.3
NEO	4.23 ± 0.02	0.16 ± 0.01	2.17 ± 0.02	3682 ± 360	1.87 ± 0.07
MON	5.83 ± 0.03	0.21 ± 0.01	3.36 ± 0.03	4347 ± 476	4.9 ± 0.3
ISO	6.79 ± 0.05	0.20 ± 0.01	4.08 ± 0.05	6153 ± 214	2.74 ± 0.09
PT	10.50 ± 0.05	0.33 ± 0.01	6.85 ± 0.05	545 ± 184	8.0 ± 0.1
BIO	11.48 ± 0.05	0.36 ± 0.01	7.58 ± 0.05	5401 ± 435	1.64 ± 0.03
7BIO	12.32 ± 0.05	0.36 ± 0.01	8.21 ± 0.05	6435 ± 354	1.36 ± 0.04
6HMPT	13.40 ± 0.06	0.39 ± 0.01	9.02 ± 0.06	6523 ± 440	1.68 ± 0.04
<i>Columna de partícula porosa Zorbax Eclipse</i>					
<i><math>t_m = 0.68 \pm 0.01</math> min</i>					
XAN	2.19 ± 0.05	0.10 ± 0.01	2.21 ± 0.08	2597 ± 519	5.9 ± 0.7
NEO	2.634 ± 0.02	0.11 ± 0.01	2.86 ± 0.02	8111 ± 2343	2.4 ± 0.2
MON	3.70 ± 0.02	0.13 ± 0.01	4.42 ± 0.04	3961 ± 158	5.01 ± 0.09
ISO	4.06 ± 0.03	0.15 ± 0.01	4.96 ± 0.05	3854 ± 80	1.48 ± 0.05
PT	6.41 ± 0.05	0.16 ± 0.01	8.39 ± 0.09	8275 ± 297	8.6 ± 0.2
IO	6.64 ± 0.06	0.17 ± 0.01	8.7 ± 0.1	7950 ± 228	0.79 ± 0.03
7BIO	7.03 ± 0.06	0.16 ± 0.01	9.3 ± 0.1	10350 ± 1015	1.34 ± 0.04
6HMPT	7.69 ± 0.07	0.21 ± 0.01	10.3 ± 0.1	6836 ± 486	2.02 ± 0.08

*SD: desviación estándar (n= 5);  $t_R$ : tiempo de retención ;  $w_{1/2}$ : semianchura de pico;  $k'$ : factor de capacidad; N: número de platos teóricos;  $R_s$ : resolución (%);  $t_m$ : tiempo muerto*

#### 4.2.4. Efecto matriz

El efecto de la presencia de la matriz de suero se evaluó mediante la comparación de las regresiones obtenidas en presencia y en ausencia de suero, para cada una de las pteridinas en estudio. Para ello, se realizó un estudio estadístico por comparación de las pendientes de ambas regresiones mediante el test  $t$  y el test  $F$  usando el programa ACOC. De los estudios realizados se deduce que todas las pendientes obtenidas por adición patrón son estadísticamente no distinguibles de las obtenidas mediante patrón externo, excepto para MON para el cuál se observa un ligero efecto de supresión de señal. A continuación, tanto al método del patrón externo como el de adición patrón se aplicaron a la determinación de pteridinas en suero y se compararon los resultados obtenidos.

#### 4.2.5. Análisis de las muestras de suero

Se analizaron muestras de suero provenientes de voluntarios, enriquecidas y sin enriquecer en las condiciones cromatográficas optimizadas como se describe en el apartado 4.1.4, utilizando el método del patrón externo y de la adición patrón. En la **Tabla 4.3** se resumen los resultados obtenidos por ambas metodologías. Hay que destacar que no se detectó 7BIO en los sueros analizados, resultado esperable ya que esta pteridina solo aparece en los fluidos biológicos como biomarcador de patologías muy concretas como se ha explicado en la Introducción de esta parte de la Memoria. Los valores de probabilidad ( $p$  valor) indican que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos por patrón externo y por adición patrón al 95% de confianza para todas las pteridinas. También podemos observar los valores encontrados así como el intervalo de confianza calculado para los contenidos de las diferentes pteridinas  $\alpha=0.05$ .

**Tabla 4.3.** Determinación del contenido de pteridinas en muestras de suero mediante el método propuesto.

Analito	Adición patrón (n=5)		Patrón externo (n=10)		Valor <i>p</i>
	Contenido (ng mL <sup>-1</sup> )	Intervalo de confianza <sup>a</sup>	Contenido (ng mL <sup>-1</sup> )	Intervalo de confianza <sup>a</sup>	
XAN	3.69	± 1.8	3.27	± 0.40	0.36
NEO	1.35	± 0.24	1.16	± 0.11	0.06
MON	0.46	± 0.14	0.36	± 0.06	0.07
ISO	0.54	± 0.24	0.50	± 0.06	0.53
PT	0.84	± 0.55	0.81	± 0.08	0.81
BIO	2.10	± 0.51	1.85	± 0.09	0.06
7BIO	< LOD	-----	< LOD	----	---
6HMPT	0.23	± 0.11	0.15	± 0.06	0.21

<sup>a</sup> Calculado para  $\alpha = 0.05$ ; Valor de *p* calculado para la comparación de contenidos calculados por adición patrón y patrón externo.

Con objeto de evaluar los resultados obtenidos, estos se comparan con los encontrados en la bibliografía. Debido a la disparidad de unidades encontradas en las referencias bibliográficas, en la **Tabla 4.4** aparecen los contenidos expresados de dos maneras, tal y como aparecen en la referencia bibliográfica y en segundo lugar expresados como nmol·L<sup>-1</sup>. Hay que tener en cuenta que los datos referentes a mezclas complejas de pteridinas en suero son muy escasos, como se comentó en la Introducción de esta parte de la Memoria, ya que prácticamente existe solo un único trabajo que hace referencia a un número elevado de pteridinas, refiriéndose la mayoría de los datos encontrados al análisis de una única pteridina.

#### 4. Determinación de pteridinas en suero humano

**Tabla 4.4.** Contenidos de pteridinas en suero/plasma encontrados en la bibliografía y los obtenidos mediante el método propuesto.

Analito	Tipo de muestra	contenido (nmol·L <sup>-1</sup> )	Contenido (expresado como en la referencia)	Referencia
NEO	Voluntarios sanos (suero) Edad 1 - 18 19 - 75	3.5 – 13.5 2.6 – 8.7	idem	[3]
NEO	Niños sanos (suero)	2.87 - 14.78 Media: 5.47 ± 2.58 Cut off: 11	idem	[4]
NEO	Voluntarios sanos (suero) edad < 18 19-75	6.8 ± 3.6 5.3 ± 2.7	idem	[5]
NEO	Niños sanos (suero) Niños con gastroenteritis viral (suero)	2.88 - 14.8 <i>media: 4.73</i> 6.03 – 171 <i>media: 23.7</i>	idem	[6]
NEO	Adultos sanos (suero)	4.82	Idem	[7]
BIO <sub>total</sub> BH4	Adultos sanos (plasma)	23.5 ± 1.3 14.8 ± 1.6	Idem	[8]
NEO BIO <sub>total</sub>	Adultos sanos (suero, oxidación con I <sub>2</sub> /I <sup>-</sup> )	21.8 6.91	5.52 1.64	μg·L <sup>-1</sup> [9]
NEO XAN MON ISO BIO 6HMPT PT	Adultos sanos (plasma, oxidación aérea)	8.26 1.74 0.17 0.70 3.04 0.87 6.78	2092 312 42 126 720 168 1106	pg·mL <sup>-1</sup> [10]
NEO XAN MON ISO BIO 6HMPT PT 7BIO	Adultos sanos (suero, oxidación I <sub>2</sub> /I <sup>-</sup> )	4.98 19.43 1.61 2.90 8.30 0.98 5.08 <LOD	1.26 3.49 0.41 0.52 1.97 0.19 0.83 <LOD	ng·mL <sup>-1</sup> Método propuesto <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Valor medio calculado entre los obtenidos por el método de la adición patrón y del patrón externo

### 4.3. Conclusiones

En los trabajos revisados en la bibliografía, con frecuencia la pteridina que ha presentado mayor interés entre los investigadores ha sido el NEO. Con el método propuesto el valor medio obtenido para NEO ha sido de  $4.98 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , valor similar al publicado previamente para individuos sanos. Por otra parte, en la revisión realizada solamente una publicación analiza un número similar de pteridinas. El trabajo mencionado y propuesto por Andondonskaja-Renz y col. [10] realizó un pretratamiento de la muestra consistente en una oxidación aérea por lo cual los resultados obtenidos no pueden ser comparados con la oxidación química realizada en este trabajo. Además, la muestra analizada fue plasma y no suero, siendo difícil, por tanto, realizar una comparación entre los resultados obtenidos por ambos métodos.

Dada la escasez de datos referentes a la presencia de pteridinas en muestras de suero, el procedimiento desarrollado permite la cuantificación de nueve pteridinas consideradas esenciales en muestras de suero de individuos sanos. Utilizando para la separación cromatográfica una columna con partículas de núcleo sólido, se consigue una buena resolución entre PT y BIO, lo que permite la determinación de este último, dada la importancia que tiene en los procesos bioquímicos en el organismo.

Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas entre los contenidos calculados por adición patrón y por patrón externo. Este hecho posibilita la aplicación del patrón externo y facilita el análisis en caso de control rutinario en análisis clínico.

El método propuesto permite, por primera vez, llevar a cabo la determinación de ocho pteridinas en suero previa oxidación con  $\text{I}_2/\text{I}^-$  y limpieza mediante SPE, y obtener un patrón de reconocimiento de normalidad en los sueros de personas sanas.

#### 4.4. Bibliografía

- [1] G.L. Long, J.D. Winefordner, Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition, *Anal. Chem.* 55 (1983) 712A–724A.
- [2] T. Fukushima, J.C. Nixon, Analysis of reduced forms of biopterin in biological tissues and fluids, *Anal. Biochem.* 102 (1980) 176–188.
- [3] M.M. Müller, H.C. Curtius, M. Herold, C.H. Huber, Neopterin in clinical practice, *Clin. Chim. Acta.* 201 (1991) 1–16.
- [4] K. Plata-Nazar, G. Luczak, A. Borkowska, A. Delinska-Galinska, E. Kozielska, K. Marek, M. Korzon, Reference standard of serum neopterin concentration in healthy children, *Pteridines.* 18 (2007) 19–24.
- [5] C. Murr, A. Bergant, M. Widschwendter, K. Heim, H. Schröcksnadel, D. Fuchs, Neopterin is an independent prognostic variable in females with breast cancer, *Clin. Chem.* 45 (1999) 1998–2004.
- [6] K. Plata-Nazar, G. Luczak, M. Gora-Gebka, A. Liberek, B. Kaminska, Serum neopterin concentration in children with viral gastroenteritis, *Pteridines.* 21 (2010) 11–16.
- [7] E.R. Werner, D. Fuchs, A. Hausen, G. Reibnegger, H. Wachter, Simultaneous determination of neopterin and creatinine in serum with solid-phase extraction and on-line elution liquid chromatography., *Clin. Chem.* 33 (1987) 2028–2033.
- [8] D. Fekkes, A. Voskuilen-Kooijman, Quantitation of total biopterin and tetrahydrobiopterin in plasma, *Clin. Biochem.* 40 (2007) 411–413.
- [9] W.E. Slazyk, F.W. Spierto, Liquid-chromatographic measurement of biopterin and neopterin in serum and urine, *Clin. Chem.* 36 (1990) 1364–1368.
- [10] B. Anjdondonskaja-Renz, H.J. Zeitler, Separation of pteridines from blood cells and plasma by liquid chromatography, *Anal. Biochem.* 133 (1983) 68–78.







# PARTE II

Desarrollo de métodos para la  
determinación de folatos  
mediante HPLC y fluorescencia  
fotoinducida.

*“La satisfacción radica en el esfuerzo, no en el logro. El esfuerzo total es una victoria completa”*

*Mahatma Gandhi*



## **1. Introducción**

---

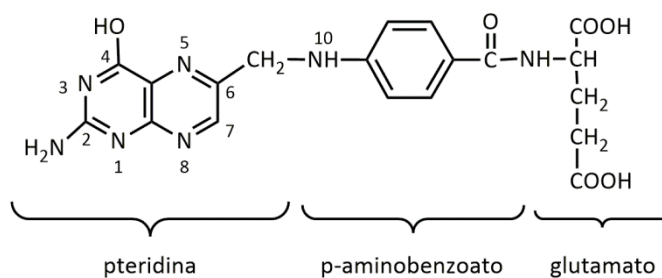


### 1.1. Estructura química de los folatos

El término folato se aplica de forma genérica a una familia de vitaminas hidrosolubles del grupo B que tienen estructuras y propiedades similares al ácido fólico. Incluye tanto los folatos naturales como al ácido fólico (ácido pteroilmonoglutámico), que es la forma sintética comúnmente utilizada para el enriquecimiento de alimentos o para la suplementación nutricional [1].

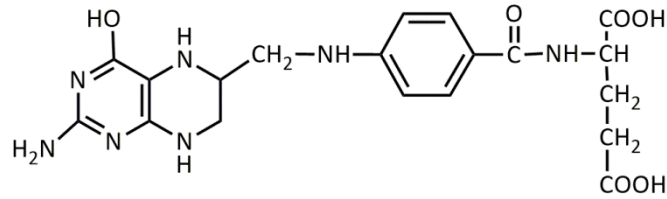
Los folatos son pteridinas conjugadas, fundamentalmente en su posición 6, con una unidad de ácido para-aminobenzoico (PABA), mediante un puente metilénico y este, a su vez, unido a una unidad de ácido glutámico mediante una unión peptídica. Las diferentes estructuras de los folatos difieren en las siguientes características:

- *Estado de oxidación del anillo pteridínico.* Cuando el anillo es el 2-amino-4-hidroxipterina, el folato derivado se denomina ácido fólico (AF) y su estructura se muestra en la **Figura 1.1**, donde se señalan las unidades estructurales de las que se compone.

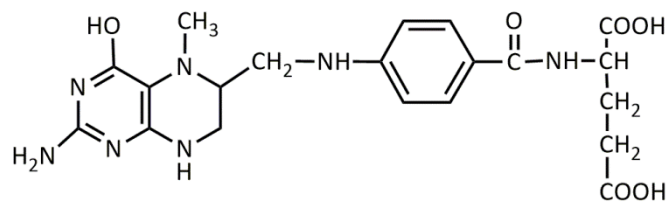


**Figura 1.1.** Estructura química del ácido fólico (AF).

Los folatos que presentan los anillos pteridínicos completamente reducidos se denominan tetrahydrofolatos y se suelen ver afectadas las posiciones 5, 6, 7 y 8. Los que están parcialmente reducidos se denominan dihydrofolatos siendo los más frecuentes los 7,8-dihidro derivados. En esta Memoria, además del AF, se estudiarán sus dos principales metabolitos, el ácido tetrahydrofólico (THF) y el ácido 5-metiltetrahydrofólico (5MTHF), los cuales son formas completamente reducidas y cuyas estructuras se muestran en la **Figura 1.2**.



ácido tetrahidrofólico (THF)



ácido 5-metil tetrahidrofólico (5MTHF)

**Figura 1.2.** Estructura química del ácido tetrahidrofólico (THF) y del ácido 5-metiltetrahidrofólico (5MTHF).

o *Naturaleza de los sustituyentes localizados en la posición N-5 y N-10 del anillo pteridínico.* Los sustituyentes más comunes suelen ser el hidrógeno (-H), grupo metilo (-CH<sub>3</sub>), grupo formil (-HCO), grupo formimino (-NHCH), grupo metenil (CH<sup>+</sup>) y el grupo metileno (-CH<sub>2</sub>)

o *Número de glutamatos unidos.* El L-glutamato puede estar conjugado en repetidas unidades a través de un  $\gamma$ -enlace con el grupo carbonilo. Estos glutamatos son denominados monoglutamatos, diglutamatos o triglutamatos dependiendo del número de residuos. Además se suele usar el término folato poliglutamato para hacer referencia a los folatos con más de una unidad de glutamato.



## 1.2. Características físico-químicas de los folatos

Como se ha comentado anteriormente, los folatos pueden considerarse como una pteridina conjugada, ya que contiene un anillo pteridínico sustituido en posición 6, sin embargo, al ser este sustituyente de gran volumen, los derivados presentan ciertas características físico-químicas que los hacen diferenciarse del resto de las pteridinas.

### 1.2.1. Solubilidad.

El AF, al igual que las pteridinas tiene una solubilidad muy limitada en agua ( $1.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), es ligeramente soluble en metanol, poco soluble en etanol o butanol e insoluble en acetona, cloroformo, éter y benceno [2]. Por ello, se estima que cerca de un 80 % de los folatos existentes en los alimentos están en forma poliglutámica.

### 1.2.2. Características ácido-base.

Las características ácido-base de los folatos son más complejas que las de las pteridinas. Según los datos bibliográficos [3,4], pueden presentar al menos cinco posibles formas en función de la acidez del medio.

En las **Figuras 1.3 y 1.4** se muestran los posibles equilibrios ácido-base en los que participan tanto el AF, como el THF, así como las constantes de acidez de cada equilibrio.

Como se puede observar, el AF presenta una forma no cargada en medios ligeramente ácidos, pH 3.5 - 4, sin embargo, en el caso del THF, todas las formas están cargadas y en el intervalo de pH antes indicado, parece posible la formación de una especie zwitteriónica. Esta diferencia será de importancia a la hora de considerar las posibles condiciones óptimas para la separación cromatográfica de estos compuestos. El 5MTHF tendrá un comportamiento similar al THF según los datos bibliográficos [4].

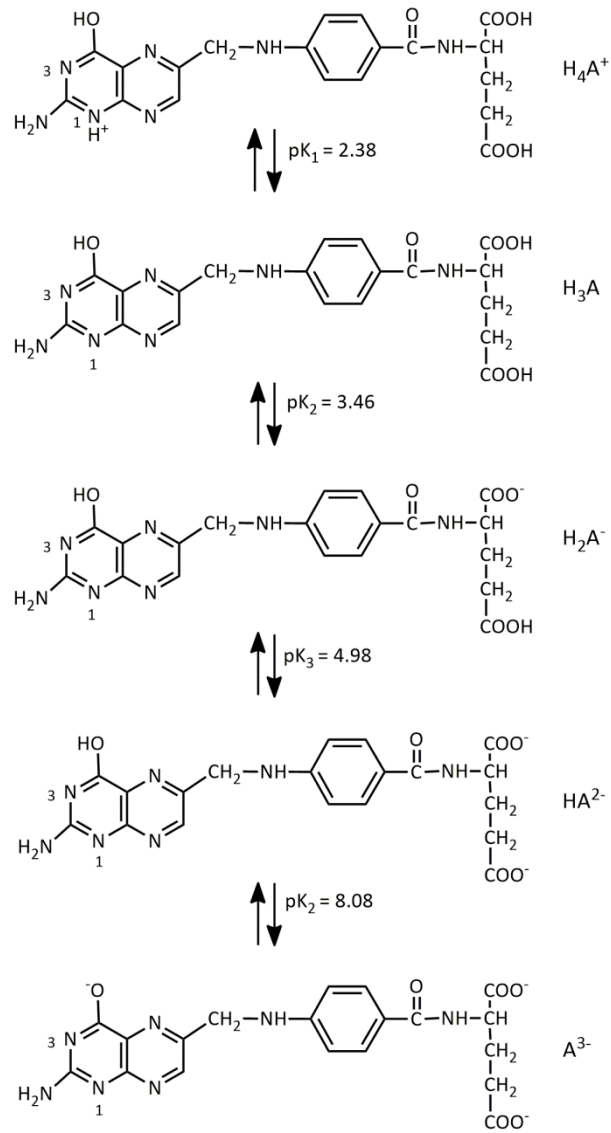


Figura 1.3. Equilibrios de disociación del AF.

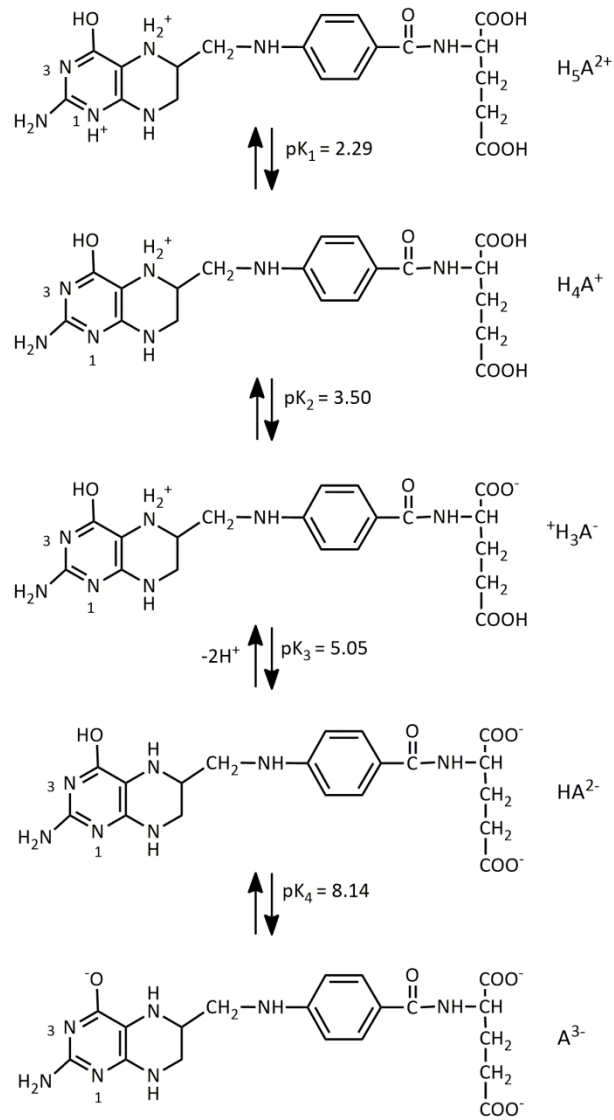


Figura 1.4. Equilibrios de disociación del THF.

### 1.2.3. Características espectrales

La compleja estructura de los folatos y la posibilidad de multitud de formas catiónicas, neutras y aniónicas en función del pH, generan sin embargo, espectros de fluorescencia relativamente simples, ya que solo afectan a sus propiedades fluorescentes aquellos equilibrios que repercuten en cambios estructurales que afecten a los anillos aromáticos condensados del grupo pirazino-pirimidínico.

El AF es débilmente fluorescente en todas las formas iónicas [5]. Aunque posee un anillo pteridínico, parece que existe un efecto de disminución del rendimiento cuántico de fluorescencia debido a la presencia de la cadena de para-aminobenceno-glutámico en posición 6. Los espectros de excitación y emisión son similares a los mostrados por el pterin. Hasta pH aproximadamente 6 se observan dos máximos de excitación a 275 y 325 nm y uno de emisión a 440 nm. A pH > 6 la intensidad de fluorescencia a 275 nm decae drásticamente y el máximo se desplaza hipsocrómicamente a 255 nm, manteniéndose constante a partir de pH 9. En todo el intervalo de pH, el máximo de emisión se encuentra situado a 445 nm, no observándose desplazamientos relevantes. La forma H<sub>3</sub>A parece ser la que presenta el mayor rendimiento cuántico de fluorescencia, disminuyendo éste cuando se protona en N1 o se desprotona en N3 [6].

Los espectros de emisión fluorescente del THF y del 5MTHF, por ser derivados tetrahidropteridínicos sufren un fuerte desplazamiento hipsocrómico situándose su máximo de emisión a 360 nm, siendo el 5MTHF el más sensible de los dos. En el caso de los tetrahidrofolatos las especies más fluorescentes parecen ser las <sup>+</sup>H<sub>3</sub>A<sup>-</sup> y HA<sup>2-</sup>, produciéndose la mayor pérdida de fluorescencia con la desprotonación de N1 y N3 al igual que en el caso del AF. Ambos metabolitos presentan una mayor fluorescencia que el AF.

### 1.2.4. Estabilidad de los folatos

Los folatos son muy sensibles a la luz, por lo tanto, su análisis se lleva a cabo la mayoría de las veces bajo luz reducida. Además, las formas reducidas son muy susceptibles a la oxidación por el oxígeno atmosférico [7]. La degradación de los folatos puede variar dependiendo de la acidez del medio y de la naturaleza del tampón utilizado, y también influye la adición de agentes reductores, la temperatura, la matriz en la que se encuentren presentes o el tipo de folato de que se trate [8]. Así, de los tres folatos que se estudian en esta Memoria, el AF es más estable que el 5MTHF, siendo el THF el menos estable. Con

objeto de aumentar la estabilidad de estos compuestos se ha propuesto el uso de diferentes sustancias tales como el ácido ascórbico o diversos tioles.

### 1.3. Folatos naturales en alimentos

En los alimentos, los folatos se encuentran mayoritariamente como derivados poliglutámicos y pueden presentarse en diversas formas con diferentes estados de oxidación y sustituyentes en el anillo pteridínico.

El AF, entendido como la forma monoglutámica, es la forma sintética que normalmente se incluye en los complementos alimentarios, sin embargo, en los medios naturales, por el contrario, aparece en cantidades no significativas y debida, principalmente a la oxidación de los folatos reducidos. La forma predominante en todos los alimentos es el 5MTHF. El THF también se encuentra presente en algunos alimentos pero a niveles más bajos, mientras que el 5-formil tetrahidrofólico prácticamente está ausente o se encuentra en niveles trazas.

La distribución de las distintas formas de folatos en los tejidos de las plantas depende de la especie y también del método de cosecha y tratamientos post cosecha que se apliquen [9], además en algunas frutas y hortalizas, el contenido de folatos puede variar con el proceso de maduración [10,11].

A pesar de que existen muchas publicaciones o diversas tablas de composición de alimentos que establecen el contenido de folatos, no existe uniformidad en los valores debido a que cada fuente utiliza un método de análisis o modos de expresión diferentes. Por lo que sería de gran importancia conseguir un consenso en el método de determinación de folatos, en el muestreo, en el protocolo y en la forma de expresar el resultado [12].

Los folatos están presentes en una gran variedad de alimentos, siendo las plantas la principal fuente de folatos en la nutrición humana. Los vegetales de hoja verde tienen un alto contenido en folatos, así productos frescos como el brócoli, espárragos o los guisantes verdes pueden contener hasta 100 µg de folatos/100 g y las espinacas frescas alrededor de 150 µg/100 g. Las patatas, zanahorias, tomates y pepinos son considerados como vegetales con un contenido moderado de folatos, entre un 10-30 µg/100 g. La mayoría de las frutas frescas contienen menos de 15 µg/100 g, aunque existen excepciones como, por ejemplo, las naranjas (24-35 µg/100 g) y otros cítricos o las fresas (18-63 µg/100 g). Por otro lado, los cereales contienen niveles de folatos que se consideran entre moderados y altos. La harina

de trigo tiene de 18-50  $\mu\text{g}/100\text{g}$  de folatos dependiendo de la extracción, ya que en el salvado y en el germen de trigo se encuentra un contenido en folatos de 260 y 330  $\mu\text{g}/100\text{g}$ , respectivamente. En el pan y otros cereales se describen contenidos que oscilan entre 20-50  $\mu\text{g}/100\text{g}$  [7,12].

Aunque las necesidades de folatos se podrían cubrir a partir de una dieta rica en todos estos alimentos, hay que tener en cuenta que para ello la estructura básica del folato debe permanecer estable. Sin embargo, hay factores como el calor (cocción), la oxidación y la luz ultravioleta (conservación) que son capaces de romper esta molécula e inactivarla. Por ello, se ha de tener en cuenta que aproximadamente un 50% del contenido inicial de los folatos presentes en los alimentos se pierden en los procesos de cocinado de los mismos [13], así el contenido de folatos en alimentos procesados y almacenados es considerablemente menor que en los alimentos frescos [14].

#### 1.4. Absorción y transporte de folatos

El proceso de síntesis de folatos en las plantas ya fue descrito en la Introducción de la Parte I y aquí se va a describir el proceso mediante el cual los folatos presentes en los alimentos son absorbidos por el organismo humano.

Como se ha comentado anteriormente, los seres humanos no pueden sintetizar folatos y los deben adquirir a través de la dieta. Además, aunque los folatos reducidos son sintetizados por plantas y por la mayoría de los microorganismos [15], el AF no se encuentra en la naturaleza, como se ha indicado anteriormente. Su existencia depende de la oxidación de folatos reducidos o de su síntesis comercial para el uso en suplementos y en alimentos enriquecidos [16].

Los folatos presentes en los alimentos se encuentran en su mayor parte (90 %) en forma de poliglutámica y asociados a proteínas. En el intestino, son liberados de las proteínas alimentarias por acción de las proteasas digestivas y posteriormente los poliglutamatos deben perder sus residuos glutámicos para poder ser absorbidos a nivel intestinal, así los poliglutamatos son hidrolizados mediante la enzima glutamato carboxipeptidasa II (GCPII) (folato hidrolasa) a monoglutamatos previamente a su absorción [17].

El resto de los folatos, que se encuentran como monoglutamatos, los cuales son las formas extracelulares, no necesitan ser hidrolizados.

Después de su hidrólisis, los derivados monoglutámicos correspondientes y el ácido fólico sintético son transportados dentro de las células intestinales, mediante transporte activo dependiente de pH.

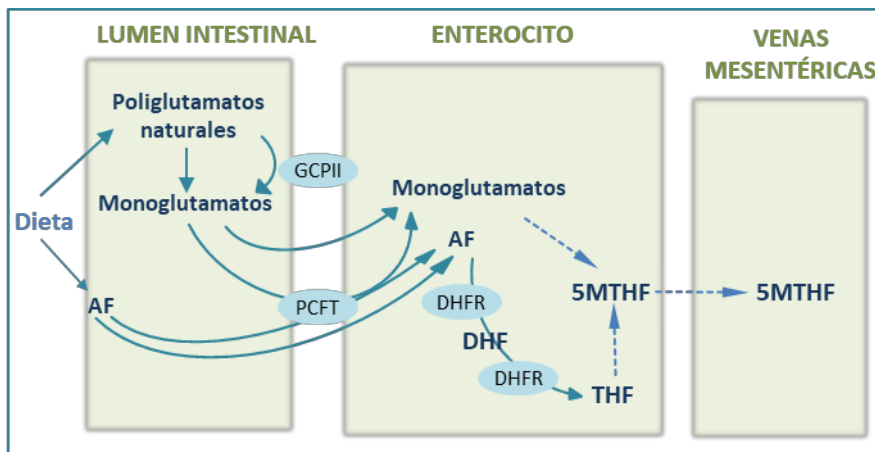
Una vez dentro de la célula, el AF es reducido a THF mediante una reacción enzimática catalizada en dos pasos sucesivos por la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR). En primer lugar lo convierte en dihidrofolato (DHF), para después transformar este en THF. Posteriormente, tanto éste como los monoglutamatos naturales son convertidos a 5MTHF antes del transporte al corriente sanguíneo [18].

Si la ingesta es muy alta, una parte de ellos no se metaboliza y llega a la circulación en su forma original. Esta conversión es un paso crítico, ya que frecuentemente se ve interrumpida por numerosos factores intrínsecos al individuo como son: la edad, el metabolismo y la genética.

Una vez en el corriente sanguíneo los monoglutamatos se dirigen al hígado donde una parte de ellos son de nuevo transformados en poliglutamatos para ser almacenados en él o en las células rojas de la sangre. Otra parte de los monoglutamatos llegan a la bilis donde pueden ser recirculados a otros tejidos, principalmente hacia tejidos de rápida división celular, como la médula ósea o la mucosa gastrointestinal, ya que necesitan del mismo para la síntesis de ADN.

La vida media de los folatos es de 100 días. No se conocen con exactitud los mecanismos de su eliminación. Se sabe que parte del 5MTHF es excretado por la bilis, mientras que algunos folatos intactos se eliminan por orina y materia fecal.

En la **Figura 1.5** se puede observar un esquema del proceso de absorción y transporte de los folatos.



**Figura 1.5.** Absorción y transporte de folatos.

GCP II: glutamato carboxipeptidasa II; PCFT: transportador de folatos acoplado a protones; DHFR: dihidrofolato reductasa



### 1.5. Biodisponibilidad

La biodisponibilidad se define como la fracción de folatos ingeridos que son absorbidos en el intestino delgado y que pueden ser usados por los procesos metabólicos o almacenados en el cuerpo [19].

Los folatos naturales son una mezcla de formas reducidas (siendo la forma predominante el 5MTHF) y están generalmente presentes como poliglutamatos con un número variable de residuos de glutamato. La forma sintética, AF, es un monoglutamato y se encuentra en la dieta solo en alimentos que han sido enriquecidos o en suplementos. Esta forma sintética, al ser una forma completamente oxidada, es estable y relativamente resistente a la destrucción. Sin embargo, los folatos naturales son lábiles y propensos a la ruptura oxidativa en el enlace C9-N10 [20].

Estas diferencias estructurales tienen un gran impacto en la biodisponibilidad de folatos. Se ha descrito que la biodisponibilidad de los folatos naturales es incompleta cuando se compara con la del AF. Sin embargo, los datos sobre la menor biodisponibilidad de los folatos naturales en comparación con el AF sintético presentan una gran variación, la cual va desde el 10 % al 98 % dependiendo del enfoque metodológico utilizado [21].

La biodisponibilidad de los folatos puede depender de diversos factores [22]:

- *Forma química del folato.* La biodisponibilidad de las formas reducidas de folatos (DHF, THF, 5MTHF, etc) puede diferir de las formas oxidadas (AF).
- *Unión a la cadena de glutamato.* Muchos estudios muestran que la biodisponibilidad de las formas poliglutámicas es menor a la de las formas monoglutámicas, aunque otros no muestran diferencias.
- *Cantidad de folatos.* Como se describió anteriormente la cantidad de folatos influye en el mecanismo de absorción; pero además, se ha observado que la respuesta relativa de la concentración de folatos en suero y eritrocitos, a bajas dosis de AF es más alta que a concentraciones mayores.
- *Matriz alimentaria.* La complejidad de la matriz del alimento o en general de la dieta afecta a la biodisponibilidad. Debido a como se encuentren unidos los folatos a la matriz del alimento, éstos pueden tener mayor o menor biodisponibilidad.
- *Efectos de modificadores.* La actividad de la enzima pteroilglutamato hidrolasa es dependiente del pH (pH óptimo 6.5-7.0) y puede ser inhibida por alimentos ácidos como

tomate o zumo de naranja. Además está descrito que esta enzima necesita cinc para su actividad, por tanto, la biodisponibilidad de los poliglutamatos ingeridos dependerá de la cantidad de cinc presente en la dieta. Otros modificadores pueden ser la fibra dietética o el alcohol que tienden a reducir la biodisponibilidad de los folatos.

- *Estatus de nutrientes en el organismo.* La deficiencia de folatos puede alterar el reparto de folatos entre los tejidos corporales, pero todavía no se ha aclarado si esto afecta a la biodisponibilidad de los folatos. También por ejemplo un déficit de vitamina B12 afecta la bioconversión de folatos en el organismo.

- *Factores genéticos.* Existen mutaciones genéticas que afectan a una o varias enzimas implicadas en la absorción de los folatos, como por ejemplo la GCPII o la metileno tetrahydrofolato reductasa.

- *Factores relacionados con el hospedador.* Se ha demostrado que la edad no tiene influencia en la biodisponibilidad. Sin embargo, la biodisponibilidad se ve afectada negativamente en el caso de desórdenes del tracto gastrointestinal. Por otro lado, los requerimientos de folatos incrementan en la fase previa a la concepción y durante la gestación.

Debido a que son muchos los factores que influyen en la biodisponibilidad de los folatos y a las dificultades de su evaluación, los datos de biodisponibilidad de folatos en alimentos son muy limitados. El conocimiento de datos exactos sobre la disponibilidad de los folatos obtenidos de fuentes de alimentos naturales es de gran interés, sobre todo en los países donde no existe una legislación sobre el enriquecimiento obligatorio de los alimentos con AF y que, por lo tanto, tienen una mayor dependencia de los folatos naturales para poder alcanzar los niveles requeridos.

## 1.6. Actividad e importancia de los folatos en la salud humana

Los folatos, además de otras actividades (vitamínicos etc.), son coenzimas en diversas reacciones enzimáticas de transferencia de grupos monocarbono necesarias para la síntesis de ácidos nucleicos y el metabolismo de algunos aminoácidos. Así, están implicados en la biosíntesis de purinas y pirimidinas, en el catabolismo de la histidina, en la síntesis de metionina o en la interconversión de serina y glicina [23].

Un aspecto menos conocido de los folatos es el hecho de que se pautan como agentes de rescate cuando se aplican terapias con ciertos antineoplásicos del grupo de los antimetabolitos. Así, por ejemplo se instaura una terapia con ácido folínico (ácido 5-formil-5,6,7,8-tetrahidrofólico) para contrarrestar los efectos tóxicos del metotrexato. Ambos, agente de rescate y antineoplásico presentan estructuras y propiedades químicas muy similares entre sí y con el AF, precursor del DNA y por tanto, también presente en muestras biológicas. En este campo, se ha extendido el uso de quimioterápicos en combinación con agentes de rescate [24].

### 1.6.1. Deficiencia de folatos

Como se dijo anteriormente los folatos son componentes esenciales en la dieta ya que el ser humano carece de la capacidad para sintetizarlo. El U.S. National Institutes of Health (NIH) sugiere que la cantidad diaria recomendada para adultos es de 400 µg, siendo menor para niños. Las mujeres embarazadas necesitan más folatos debido a la mayor velocidad metabólica, la mayor síntesis de ADN y la rápida división celular; por lo que se aconseja una ingesta de 600 µg. En las mujeres lactantes también se aconseja una ingesta mayor y se ha establecido en 500 µg [25].

El mantenimiento de niveles adecuados de folato durante el embarazo no solo es importante para la salud de la madre, sino también para el bebé porque una deficiencia de folatos se ha asociado con defectos del tubo neuronal, defectos cardiacos fetales, retraso del crecimiento, bajo peso al nacer, parto prematuro, etc. [26–29].

Además, una deficiencia de folatos y/o vitamina B<sub>12</sub> puede ser causa también de un tipo de anemia denominada anemia megaloblástica, que se caracteriza por un mayor tamaño de los glóbulos rojos debido a un defecto en la síntesis de ADN. En su ausencia, durante la formación de los glóbulos rojos se prolonga la fase de división celular dando como resultado eritroblastos de mayor tamaño [30,31].

También ciertos tipos de tumores se han relacionado con una deficiencia de folatos como, por ejemplo, el cáncer de colon [32,33] o el de mama [34]. Existen evidencias que indican que altos niveles de folatos están asociado a un menor riesgo de padecer cáncer colorrectal [35,36] o proteger contra cánceres en otros tejidos como mama y útero [37].

Otra de las consecuencias de la deficiencia de ácido fólico puede ser un aumento en los niveles de homocisteína en sangre por la incapacidad de la metionina sintasa de ejercer su acción. Este hecho se ha relacionado con diversas enfermedades cardiovasculares como la cardiopatía isquémica [38], enfermedades cerebrovasculares [39], la enfermedad vascular periférica y la enfermedad de la arteria coronaria [40]. Al aumentar la ingesta de AF, así como de folatos, disminuyen los niveles de homocisteína en plasma y por tanto el riesgo de enfermedades cardiovasculares [41].

Por último, en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer también se han encontrado niveles elevados de homocisteína en sangre y este aumento puede venir determinado por una deficiencia de vitamina B<sub>12</sub> o de folatos [42].

Debido a los hallazgos encontrados de los beneficios del aumento de los niveles de folatos en el organismo, en la actualidad el consumo de alimentos con un elevado contenido de folatos o de alimentos enriquecidos está aumentando. Además en 1998 la FDA comenzó, con carácter preventivo, un protocolo de adición de AF a ciertos alimentos. Esta iniciativa fue seguida por otros países como Canadá, Chile y Australia. Esta legislación establece la fortificación obligatoria y regulada a productos derivados de cereales y harinas. En España únicamente se enriquecen los alimentos de forma voluntaria.

Hay autores que señalan que el 5MTHF es tan eficaz como el AF para aumentar los niveles corporales de folatos. Estos datos surgen de mediciones en sangre y del estudio de indicadores funcionales tales como la homocisteinemia. Indican que se prefiere el suplemento con 5MTHF al suplemento con AF. Esta afirmación se justifica porque el 5MTHF tiene menor capacidad de enmascarar los síntomas de deficiencia de vitamina B<sub>12</sub>, y también por su menor interacción con fármacos inhibidores de la DHFR.

Es decir, que el 5MTHF tiene un potencial menor que el AF para enmascarar la carencia de vitamina B<sub>12</sub>. Por otro lado, está sujeto a un control celular mucho más estricto que el AF. Es por estas razones que los expertos señalan que debería considerarse el uso de 5MTHF en los tratamientos prolongados con folatos.

## 1.7. Análisis de folatos

El análisis de folatos es complejo debido a numerosas causas, como son: el bajo nivel de concentración en el que se encuentran presentes en las muestras, la fotolabilidad de estos derivados, la diversidad de formas en las que se encuentran presentes (monoglutamatos y poliglutamatos), la inestabilidad a factores físicos o químicos y la complejidad de la matriz en la que se encuentran (alimentos o fluidos biológicos).

En los últimos años han sido numerosas las revisiones publicadas sobre el análisis de folatos y a continuación se resumen los aspectos más relevantes de las diferentes metodologías propuestas [2,8,43,44].

### 1.7.1. Pretratamiento de la muestra

Para el pretratamiento de las muestras de alimentos y de fluidos biológicos no existe un método estándar, sino que la elección del método depende del tipo concreto de muestra y del posterior método de análisis. Sin embargo, generalmente el pretratamiento de la muestra involucra los siguientes pasos: extracción de folatos desde la matriz, incubación con las enzimas adecuadas, purificación y concentración.

#### 1.7.1.1. Extracción

En la mayoría de los métodos publicados sobre el análisis de folatos en alimentos, el proceso de extracción engloba, la molienda de la muestra, homogeneización en un tampón adecuado, seguido por calentamiento y centrifugación.

La molienda puede conducir a la de-glutamación parcial y el proceso de calentamiento permite liberar los folatos unidos a proteínas, sin embargo, hay que tener en cuenta que una temperatura elevada puede aumentar la degradación de los folatos. Para limitar esta degradación se ha recurrido a la adición al tampón de extracción de un agente antioxidante. Los dos antioxidantes más comúnmente utilizados han sido el ácido ascórbico y el 2-mercaptoetanol o generalmente una combinación de ambos [43].

Se han usado varios tipos de tampones como son: tampón fosfato, tampón acetato-amónico o tampón ácido 4-(2-hidroxietyl)piperazina-1-etanosulfónico/ácido 2-(ciclohexilamino) etanosulfónico (HEPES/CHES), a pH entre 4.5 y 7.5. Las condiciones de pH, temperatura y tiempo de calentamiento para esta extracción son muy variadas y han sido resumidas en diferentes revisiones como la publicada en 2005 por Arcot y col. [8].

Se ha demostrado que parámetros como la cantidad de muestra o de tampón, la concentración y el pH del tampón, la temperatura y el tiempo de calentamiento son factores que pueden afectar a la eficiencia de la extracción. En este sentido recientemente se ha publicado un artículo [45] en el que se analiza el efecto de los diferentes parámetros de extracción. Estudiaron dos tipos de tampones fosfato (a dos pH) con diferentes tiempos y temperaturas de extracción y analizaron el contenido de folatos en fruta y vegetales mediante un método HPLC. Encontraron los mayores contenidos de folatos cuando se utilizó tampón fosfato a pH 6.1 y se realiza la extracción a 100 °C durante 15 minutos y usando plasma de rata como fuente de conjugasa.

#### 1.7.1.2. Tratamiento enzimático

El tratamiento enzimático depende de la matriz de la muestra y el posterior método de detección.

Los folatos naturales están presentes en los alimentos, generalmente, en forma de poliglutamatos y se requiere el uso de  $\gamma$ -glutamylcarboxipeptidasa (folato conjugasa o folato hidrolasa) para su conversión en monoglutamatos. Para obtener las enzimas apropiadas se usan enzimas naturales procedentes de animales. Así, las mayores fuentes de folato conjugasa son el plasma o suero de rata, riñón de cerdo, páncreas de pollo y plasma humano [2] y la actividad de estas conjugasas difiere en su pH óptimo y en el modo de acción. Cuando se trata de muestras enriquecidas, no siempre es necesaria la adición de esta enzima [46], aunque evidentemente el proceso debe ser simulado de forma global y mejor cuanto más próximas sean a la realidad las condiciones estudiadas.

Ya desde 1980 se había propuesto que el uso de la folato conjugasa como única enzima, en ocasiones no era eficaz para liberar todo el contenido de folatos presentes en las matrices alimentarias. Posteriormente, en 1990, Martin y col. [47] publicaron un método para la extracción de folatos donde además del tratamiento tradicional con folato conjugasa, se usó proteasa y  $\alpha$ -amilasa. A este procedimiento se le denomina tratamiento trienzimático y se propone como un procedimiento más completo para la recuperación de los folatos presentes en las muestras de alimentos. La proteasa permite la liberación de los folatos unidos a proteínas, mientras que la  $\alpha$ -amilasa proporciona la liberación desde los polisacáridos. Se ha publicado una revisión [48] donde se resumen una variedad de procedimientos para el tratamiento trienzimático y recomienda uno concreto como el más óptimo.

Sin embargo, parece ser que el número y tipo de enzimas usadas en la extracción está en gran parte determinada por la naturaleza y composición de alimentos. Por ejemplo, no es justificable el uso de  $\alpha$ -amilasa en carne o de proteasa en alimentos ricos en almidón. Así este tri-tratamiento es aconsejable en ciertos tipos de alimentos debido a la complejidad de su composición aunque no parece ser tan necesario en otros.

En diversas publicaciones posteriores se han llevado a cabo estudios comparativos sobre los beneficios de la utilización del tratamiento enzimático único con conjugasa y el triple enzimático, en diferentes tipos de alimentos. Así, por ejemplo se ha confirmado la efectividad del método trienzimático frente al tradicional en comida rápida [49]. También ambos métodos enzimáticos fueron comparados en el análisis de folatos en espinacas, en pan enriquecido y en cereales de desayuno, concluyendo que solo en el caso del pan enriquecido se obtiene un incremento significativo en los contenidos calculados cuando se emplea el triple tratamiento [50].

Por otro lado, también se han encontrado estudios que muestran que no hay diferencias significativas en el contenido de folatos en extractos de vegetales [51] y cereales [52] tratados con el método trienzima y con el método que solo emplea conjugasa. Van Daele y col. [53] analizaron el perfil de folatos en patatas y estudiaron diferentes procedimientos de extracción, llegando a la conclusión que el procedimiento trienzima no mejora las recuperaciones de folatos de la matriz pero los extractos resultantes son más fáciles de manipular.

### 1.7.1.2. Purificación

Por último, suele ser necesaria una purificación de los extractos antes de su análisis cromatográfico. Se han propuesto varias técnicas para la purificación y concentración de folatos, como son la microextracción en fase sólida (SPME) [54] o la microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) [55], pero principalmente se han utilizado columnas de afinidad basadas en interacciones proteínas-folatos y la extracción en fase sólida (SPE). Las columnas de afinidad basadas en interacciones proteínas-folatos han sido ampliamente utilizadas [56], sin embargo, no están disponibles comercialmente lo que hace que esta técnica de purificación sea más cara y requiera un elevado tiempo para la preparación del ligando de afinidad. Por ello la SPE resulta ser el método más común para la purificación de extractos alimentarios [57]. Los adsorbentes más utilizados son de intercambio aniónico

fuerte (SAX) [45,58–60], aunque también se han descrito algunas aplicaciones con rellenos tipo fenilo, ciclohexilo [57,61] y C18 [62,63].

### **1.7.2. Métodos de detección/determinación de folatos**

Clásicamente los ensayos microbiológicos han sido los métodos más utilizados para determinar la composición en folatos en los alimentos. Además, a pesar de ser el primer método empleado, aún hoy se sigue utilizando frecuentemente como método oficial. Ha sido revisado por la Association Official of Analytical Chemist (AOAC) [64] y por la American Association of Cereal Chemist (AACC) [65]. Estos métodos se basan en el crecimiento de varios microorganismos debido a la presencia de folatos. El microorganismo de ensayo más utilizado ha sido *Lactobacillus casei* sub sp. *rhamnosus* porque responde a casi todas las formas naturales de folato presente en la dieta [44].

También se han utilizado otras técnicas, como diversas técnicas electroanalíticas, tanto para la determinación del contenido total de folatos como de un solo analito. Recientemente se ha publicado una revisión sobre la aplicación de dichas técnicas [66].

Sin embargo, habitualmente para diferenciar y cuantificar folatos individuales, se requieren técnicas de separación como la electroforesis capilar (CE) o la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Se han propuesto varios métodos usando CE para la determinación de folatos en alimentos empleando diversos tipos de detectores, tales como detector de diodos (DAD) [67,68], detector de fluorescencia inducida por láser (LIF) [69], detector quimiluminiscente (CLDs) [70] y detector de espectrometría masas (MS) [71].

La técnica que más se ha empleado en la determinación de folatos individuales ha sido HPLC y son numerosos los métodos que se han propuesto empleando distintos tipos de detectores y distintas condiciones cromatográficas. Entre estos métodos, la detección UV ha sido la más común [72–75]. Sin embargo, este modo de detección no es suficientemente sensible para detectar folatos naturales debido a que los niveles de algunas de las formas están muy por debajo de los límites de detección. La detección electroquímica [76–78] o quimiluminiscente [79] también se ha propuesto para determinar estos compuestos, pero ninguno de estos métodos es universal para detectar todos los folatos naturales.

Por otro lado, la espectrometría de masas (MS) es una técnica sensible y universal para todos los folatos y se han propuesto métodos que utilizan esta detección tanto para el



análisis de folatos en alimentos [46,59,60,62,63,80–82], como en fluidos biológicos [83–87], y en ambas matrices [88] pero posee la desventaja de que no siempre es accesible por los laboratorios de rutina.

Finalmente, el detector fluorescente (FLD) no ha sido muy utilizado para la determinación de los folatos debido fundamentalmente a que solo algunas formas reducidas como THF y 5MTHF presentan fluorescencia nativa con un rendimiento cuántico de fluorescencia elevado. Así, recientemente se han publicado métodos que emplean este detector para el análisis de estos dos analitos en hortalizas [89], frutas y vegetales frescos [45].

Como ya se comentó anteriormente, el AF es débilmente fluorescente, pero se han propuesto diferentes procedimientos para generar derivados intensamente fluorescentes, como conversión de todas las formas del folato en ácido para-amino benzoico (PABA) [90], o en 5MTHF [91], mediante reacciones de oxidación con permanganato [92] o derivatización online mediante un reactor precolumna [93].

Es conocido que la acción de la radiación UV sobre las disoluciones de AF produce un aumento en la intensidad de fluorescencia de las mismas ya que algunos de los productos generados por dicha fotólisis son intensamente fluorescentes. Esta fotorreacción ha sido usada por varios autores para la determinación fluorimétrica de AF [94–96]. Concretamente en nuestro grupo de investigación se ha optimizado un sistema continuo para llevar a cabo la fotooxidación de AF y su principal metabolito y determinarlo en suero humano [95] y de AF, 5MTHF y THF en suero humano mediante el tratamiento quimiométrico de las matrices de excitación-emisión convencionales obtenidas mediante un espectrofluorimetro de registro rápido [96]. También, se ha desarrollado un método cromatográfico que emplea un reactor fotoquímico situado entre el detector DAD y el fluorescencia para la determinación de AF y 5MTHF en alimentos [97].

Así, con objeto de explotar la elevada sensibilidad y selectividad proporcionada por las técnicas fluorimétricas, en esta parte de la Tesis Doctoral se ha abordado el estudio de la generación de señales fluorescentes a partir de los folatos y su utilización en sistemas de HPLC.

A modo de resumen en la **Tabla 1.1** se muestran las características de algunos de los métodos cromatográficos desarrollados en los últimos años para la determinación de folatos en alimentos empleando detectores DAD y fluorescente principalmente, así como algunos de los más recientes en los que se utiliza detección de masas.

**Tabla 1.1.** Métodos para la determinación de folatos en alimentos.

Analitos/ Muestra	Tratamiento muestra	Características método cromatográfico	Ref.
THF, 5MTHF, 5FTHF Vegetales de hojas	<p><u>Extracción:</u> tampón fosfato 0.1 M, pH 6 conteniendo 1% ác. ascórbico, 0.1% mercaptoetanol.</p> <p><u>Tratamiento enzimático:</u> conjugasa (plasma de rata)</p> <p><u>Purificación:</u> columna de intercambio iónico</p>	<p><u>Fase estacionaria:</u> Shim Pack 100 RP18 (150x4.6 mm, 4.6 μm)</p> <p><u>Fase móvil:</u> tampón fosfato 30 mM, pH 2.3 (eluyente A) y ACN (eluyente B). Modo gradiente</p> <p><u>Detección:</u> FLD (<math>\lambda_{ex}/\lambda_{em}</math>=290/360 nm)</p>	[89]
FA, 5MTHF Cereales fortificados, leche entera en polvo, huevo entero	<p><u>Extracción:</u> tampón fosfato 0.1 M, pH 7.2, conteniendo 1% ác. Ascórbico. Calentar a 100 °C, 15 min</p> <p><u>Tratamiento trienzimático:</u> α-amilasa, proteasa y conjugasa (suero de rata)</p> <p><u>Purificación:</u> SPE (C18)</p>	<p><u>Fase estacionaria:</u> Agilent Zorbax SB-C18 (150x2.1 mm, 3.5 μm)</p> <p><u>Fase móvil:</u> 0.1% ac. fórmico em agua (eluyente A) y ACN (eluyente B). Modo gradiente</p> <p><u>Detección:</u> MS/MS</p>	[63]
AF, 5MTHF, 5FTHF, 10FTHF, 5,10-MTHF Harina de trigo, yema de huevo y zumo de naranja	<p><u>Extracción:</u> tampón fosfato 0.1 M, pH 6 conteniendo 1% ác. ascórbico, .1% mercaptoetanol, pH 6.8</p> <p>IP-DLLME: Disolvente de extracción: 1-octanol</p> <p>Disolvente dispersivo: etanol</p>	<p><u>Fase estacionaria:</u> ODS (250x4 mm, 5 μm)</p> <p><u>Fase móvil:</u> 90% (tampón fosfato, pH 2.3) y 10% (ACN). Modo isocrático.</p> <p><u>Detección:</u> DAD (<math>\lambda</math>=280 nm)</p>	[55]
AF, 5MTHF, THF, 5FTHF, 5,10-CH <sup>+</sup> THF Tomate	<p><u>Extracción:</u> tampón fosfato 50 mM, conteniendo 1% ác. ascórbico, 0.5% mercaptoetanol y 1 mM cloruro de calcio, pH 4.5. Calentar a 100 °C, 10 min</p> <p><u>Tratamiento trienzimático:</u> α-amilasa, proteasa y conjugasa (plasma de rata)</p> <p>Filtración</p>	<p><u>Fase estacionaria:</u> LUNA C18 (250x4.6 mm, 5 μm)</p> <p><u>Fase móvil:</u> 0.1% ac. fórmico em agua (eluyente A) y ACN (eluyente B). Modo gradiente</p> <p><u>Detección:</u> DAD (<math>\lambda</math>=280 nm)</p>	[81]

Analitos/ Muestra	Tratamiento muestra	Características método cromatográfico	Ref.
AF, THF, 5MTHF, 10FTHF, 5FTHF, ac. pteróico Espinaca	<u>Extracción:</u> acetato de amonio 50 mM, pH 6 conteniendo 1% ác. ascórbico, 10 mM mercaptoetanol Calentar a 40 °C	<u>Fase estacionaria:</u> C18 (100x2 mm, 5 µm) <u>Fase móvil:</u> 85% (100 mM tampón fosfato, pH 2) y 15% (ACN). Modo isocrático. <u>Detección:</u> DAD (λ=190-400 nm)	[75]
AF, 5MTHF, THF, 5FTHF, 10FTHF, 10FDHF Fresa, grosella, judía, guisante, coliflor, brócoli y espinaca	<u>Extracción:</u> tampón fosfato 0.1 M, conteniendo 1% ác. ascórbico, 0.1% mercapto- etanol, pH 6.1 Calentar a 100 °C, 7 min <u>Tratamiento enzimático:</u> α-amilasa y conjugasa (plasma de rata) <u>Purificación:</u> SPE (SAX)	<u>Fase estacionaria:</u> phenomenex synergi C18 (250x4.6 mm, 4 µm) <u>Fase móvil:</u> 85% (100 mM tampón fosfato, pH 2) y 15% (ACN). Modo isocrático. <u>Detección:</u> DAD (λ=290 nm), FLD (λ <sub>ex</sub> /λ <sub>em</sub> =290/360 nm)	[45]
AF, 5MTHF, THF, 5FTHF, 10FTHF, 5,10-CH <sup>+</sup> THF 10FAF Lechuga, espinaca, pak-choi, hojas de arroz	<u>Extracción:</u> tampón fosfato 50mM, conteniendo 1% ác. ascórbico, 0.1% 2,3- dimercapto-1-propanol, pH 6.7. Calentar a 100 °C, 12 min <u>Tratamiento trienzimático:</u> α-amilasa, proteasa y conjugasa (páncrea de pollo) <u>Purificación:</u> SPE (SAX)	<u>Fase estacionaria:</u> ACQUITY UPLC BEH C18 (50x2.1 mm, 1.7 µm) <u>Fase móvil:</u> 0.1% ac. fórmico em agua (eluyente A) y 0.1% ac. fórmico en ACN (eluyente B). Modo gradiente <u>Detección:</u> MS/MS	[60]
AF, 5MTHF, THF, 5FTHF, 10FTHF Quinoa, amaranto, alforón	<u>Extracción:</u> tampón bicarbonato amónico 0.5 mM, conteniendo 1% ác. ascórbico, 0.5% DTT, pH 7.2. Calentar a 100 °C, 10 min <u>Tratamiento trienzimático:</u> α-amilasa, proteasa y conjugasa (plasma de rata)	<u>Fase estacionaria:</u> HSS T3 (150x2.1 mm, 1.8 µm) <u>Fase móvil:</u> 0.1% ac. fórmico em agua (eluyente A) y 0.1% ac. fórmico en ACN (eluyente B). Modo gradiente <u>Detección:</u> MS/MS	[82]

5FTHF: ácido 5-formiltetrahidrofólico; 10FTHF: ácido 10-formiltetrahidrofólico; 10FDHF: ácido 10-formildihidrofólico; 5, 10-MTHF: ácido 5, 10-metilentetrahidrofólico; 10FAF: ácido 10-formil fólico; 5,10-CH<sup>+</sup>THF: ácido 5,10-meteniltetrahidrofólico; IP-DLLME: microextracción dispersiva líquido-líquido basado en pares iónicos.

Como se puede observar, la mayoría de los métodos propuestos se basan en cromatografía en fase inversa y las fases móviles están compuestas principalmente por tampones fosfato y una pequeña proporción de ACN, o por ácido fórmico en agua y una pequeña proporción de ACN cuando se emplea detector de MS.

### 1.8. Fluorescencia fotoinducida

La fluorescencia molecular es una potente técnica de análisis debido a su elevada sensibilidad y notable selectividad. En términos generales, las determinaciones fluorimétricas son más selectivas que las basadas en la absorción de luz, puesto que la mayor parte de las moléculas excitadas por absorción se desactivan a través de diferentes procesos no radiantes. Son muchos los compuestos que presentan una nula o muy débil fluorescencia, como es el caso del AF que hemos comentado ya anteriormente. En estos casos la utilización de técnicas fluorimétricas es inviable.

A veces, la radiación UV produce fotólisis o reorganización estructural del analito, originando cambios en su fluorescencia nativa o incluso, originando fotoproductos que pueden ser fluorescentes aunque los productos iniciales de la reacción no lo fueran. Por otra parte, también se puede observar aumento de fluorescencia o disminución cuando los productos iniciales ya eran fluorescentes. Este fenómeno ha dado lugar al desarrollo de reacciones fotoquímicas para aumentar la sensibilidad y selectividad y posibilitar la detección fluorimétrica.

Cuando se observa un aumento del rendimiento cuántico de fluorescencia, la medida de esta señal generada conlleva, por tanto, un aumento de sensibilidad, lo que permite la detección indirecta de compuestos inicialmente débilmente fluorescentes o no fluorescentes. La medida de estas propiedades ha dado lugar a las denominadas técnicas de Fluorescencia Foto Inducida (PIF).

El número de reacciones inducidas fotoquímicamente en las que pueden producirse variaciones de fluorescencia es amplio. Sin embargo, para que una reacción fotoquímica sea útil tiene que reunir una serie de requisitos como que el analito sea absorbente en el UV y presente una longitud de onda de máxima absorción significativamente diferente del fotoproducto formado. Además el proceso de fotoconversión tiene que ser muy eficiente, que los fotoproductos presenten un rendimiento cuántico de fluorescencia superior a los analitos de partida y que sean estables térmica y químicamente, al menos el tiempo suficiente para realizar las medidas.

Desde el punto de vista analítico, la formación de especies intensamente fluorescentes es la consecuencia más importante de estas fotorreacciones y se emplean como vías de foto derivatización alternativas a las derivatizaciones químicas. En el caso del análisis de folatos esta posibilidad se estudiará con objeto de aumentar la sensibilidad de su análisis.

Los métodos basados en PIF son útiles y presentan ciertas ventajas frente a la utilización de reactivos químicos para llevar a cabo procesos de derivatización. Por ejemplo, no se produce dilución de los analitos por adición del reactivo químico y generalmente las fotorreacciones transcurren con elevada velocidad a temperatura ambiente.

Además esta técnica es fácil de desarrollar, no requiere equipamiento caro y puede ser aplicada tanto en estado estacionario [98,99], como a sistemas dinámicos tales como FIA [95] o HPLC [100].

En cuanto a la instrumentación, los sistemas PIF más clásicos se basan en la utilización de una fuente de radiación UV externa de elevada intensidad situada generalmente en una cámara protegida de la luz externa. Una vez encendida y estabilizada la fuente UV, la muestra se coloca en un vial de cuarzo a una distancia fija con respecto a la lámpara y se irradia durante un periodo de tiempo controlado manteniendo constante la agitación magnética. A este sistema de radiación externa se le denominará también a lo largo de esta Memoria sistema de irradiación off-line.

En la actualidad un modo de trabajar muy utilizado es el acoplamiento a sistemas dinámicos, lo que permite irradiar la muestra de forma continua mientras que circula a través de un sistema dinámico, es lo que se denominará en esta Memoria irradiación on-line.

El acoplamiento a sistemas de HPLC se puede llevar a cabo de diversas maneras pudiéndose diseñar la utilización de uno o varios detectores o elegir la opción pre- o post-columna. En la opción pre-columna, la irradiación se llevaría a cabo antes de la separación cromatográfica produciéndose, por tanto, la separación y la detección de los fotoproductos. Por otro lado, en la opción post-columna, la separación será de los analitos originales y la detección de los fotoproductos. En el caso de la utilización de más de un detector, el fotoreactor se puede ubicar antes o entre los diferentes detectores dependiendo de las características de los analitos eluidos y los fotoproductos generados.

Con respecto a los reactores fotoquímicos, existen pocos instrumentos que se comercializan y generalmente son los propios investigadores los que se han construido sus dispositivos. En general estos dispositivos consisten en lámparas de media o alta presión, tales como lámparas de mercurio, de xenón o xenón-mercurio; con un capilar enrollado. Inicialmente se usaron capilares de cuarzo, pero debido a las dificultades que presentaban como su extrema fragilidad, la dificultad de manejo o su precio elevado, se propuso el empleo de capilares de politetrafluoroetileno (PTFE) y en 1983 Lang y col. [101] diseñaron el

primer fotorreactor con capilares de este material. Debido a la excelente transmisión de la luz por debajo de 300 nm del PTFE, su bajo precio y la disponibilidad en un amplio rango de diámetros internos, lo ha convertido en un excelente material para la construcción de los reactores fotoquímicos.

### 1.9. La fotoquímica de los folatos

Desde la mitad del siglo XX ya se propuso la conversión del AF, no fluorescente, en otro compuesto intensamente fluorescente mediante la acción de la radiación y por otra parte se informó de que la luz solar provocaba la pérdida de una amina a partir de dicho ácido [102].

Existen diversas publicaciones referentes a estudios fotoquímicos sobre los posibles mecanismos de formación de los fotoproductos o su naturaleza, pero hay que hacer notar que ésta va a depender fuertemente del tiempo de exposición a la radiación UV y de la potencia de dicha fuente, además del medio químico empleado en el ensayo.

Ya en 1949, Lowry y col. propusieron que cuando el AF es irradiado en medio ligeramente ácido, tenía lugar la formación de derivados pteridínicos y la pérdida de la cadena para-amino benzoil-glutámico. Entre los derivados pteridínicos parecen formarse la 6-formilpteridina (PT6F), ácido pterin 6-carboxílico (PT6C) y el pterin (PT) [103].

Más recientemente, Akhtar y col. [104] identificaron el p-aminobenzoil-L-glutámico y el ácido pterin-6-carboxílico (PT6C) como fotoproductos del AF en disolución acuosa y propusieron un mecanismo de degradación bajo condiciones ácidas y alcalinas. Otros estudios han identificado los mismos productos finales, pero además han identificado un producto intermedio, el 6-formilpterin (PT6F) que a tiempos de irradiación más altos es degradado a PT6C [105,106]. Se han realizado estudios de la fotólisis del AF tanto con espectroscopía de fluorescencia [5], como con HPLC [105]. Sin embargo, no se han encontrado estudios sobre la identificación de los fotoproductos formados cuando THF y 5MTHF son irradiados con luz UV.

En esta Memoria se aborda el estudio global de los procesos que tienen lugar cuando se irradian AF, THF y 5MTHF con objeto de aplicar la técnica PIF al análisis de estos compuestos en condiciones de irradiación dinámica acoplada a HPLC.

### 1.10. Bibliografía

- [1] R. Iyer, S.K. Tomar, Folate: A functional food constituent, *J. Food Sci.* 74 (2009).
- [2] S. Yin, Y. Yang, Y. Li, C. Sun, Analysis of natural and synthetic folates in pharmaceuticals and foods: A review, *Anal. Methods.* 10 (2018) 9–21.
- [3] R.G. Kallen, W.P. Jencks, The dissociation constants of tetrahydrofolic acid, *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 5845–5850.
- [4] Z. Szakács, B. Noszál, Determination of dissociation constants of folic acid, methotrexate, and other photolabile pteridines by pressure-assisted capillary electrophoresis, *Electrophoresis.* 27 (2006) 3399–3409.
- [5] A. Tyagi, A. Penzkofer, Fluorescence spectroscopic behaviour of folic acid, *Chem. Phys.* 367 (2010) 83–92. 9.10.026.
- [6] A.M. Jiménez Girón, Tesis Doctoral, Aplicaciones analíticas de métodos basados en luminiscencia molecular en combinación con metodologías dinámicas, 2007.
- [7] G. Ros Berruezo, M.J. Periago Castón, M.D. Iniesta López, Folatos: funcionalidad y salud, *Cienc. En La Front. Cienc. y Technol. La UACJ.* VI (2008) 11–40.
- [8] J. Arcot, A. Shrestha, Folate: Methods of analysis, *Trends Food Sci. Technol.* 16 (2005) 253–266.
- [9] J. Scott, F. Rébeillé, J. Fletcher, Folic acid and folates: The feasibility for nutritional enhancement in plant foods, *J. Sci. Food Agric.* 80 (2000) 795–824.
- [10] F. Rébeillé, S. Ravel, S. Jabrin, R. Douce, S. Storozhenko, D. van der Straeten, Folates in plants: biosynthesis, distribution, and enhancement., *Physiol. Plant.* 126 (2006) 330–342.
- [11] P. Upadhyaya, K. Tyagi, S. Sarma, V. Tamboli, Y. Sreelakshmi, R. Sharma, Natural variation in folate levels among tomato (*Solanum lycopersicum*) accessions, *Food Chem.* 217 (2017) 610–619.
- [12] A.B. Olivares, M.J. Bernal, G. Ros, C. Martínez, M.J. Periago, Calidad de los datos del contenido en ácido fólico en vegetales recogidos en varias tablas de composición de alimentos españolas, y nuevos datos sobre su contenido en folatos, *Nutr. Hosp.* 21 (2006) 97–108.
- [13] A.I. González González, M. García Carballo, Ácido fólico y defectos del tubo neural en



- Atención Primaria, Medifam. 13 (2003) 305–310.
- [14] C. Witthöft, M. Hefni, Folic acid and Folate: Physiology and Health Effects, *Encycl. Food Heal.* 1 (2016) 724–730.
- [15] G.J.C. Basset, E.P. Quinlivan, J.F. Gregory III, A.D. Hanson, Folate Synthesis and Metabolism in Plants and Prospects For Biofortification, *Crop Sci. Soc. Am.* 45 (2005) 449–453.
- [16] E.P. Quinlivan, A.D. Hanson, J.F. Gregory, The analysis of folate and its metabolic precursors in biological samples, *Anal. Biochem.* 348 (2006) 163–184.
- [17] M. Visentin, N. Diop-Bove, R. Zhao, I.D. Goldman, The intestinal Absorption of Folate, *Annu. Rev. Physiol.* 76 (2014) 251–274.
- [18] M. Laanpere, S. Altmäe, A. Stavreus-Evers, T.K. Nilsson, A. Yngve, A. Salumets, Folate-mediated one-carbon metabolism and its effect on female fertility and pregnancy viability, *Nutr. Rev.* 68 (2010) 99–113.
- [19] A. Melse-Boonstra, C.E. West, M.B. Katan, F.J. Kok, P. Verhoef, Bioavailability of heptaglutamyl relative to monoglutamyl folic acid in healthy adults, *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (2004) 424–429.
- [20] H. McNulty, K. Pentieva, Folate Bioavailability, in: L.B. Bailey (Ed.), *Folate Heal. Dis.*, Second, Taylor and Francis Group, 2010: pp. 25–48.
- [21] H. McNulty, K. Pentieva, Folate bioavailability, *Proc. Nutr. Soc.* 63 (2004) 529–536.
- [22] I.A. Brouwer, M. van Dusseldorp, C.E. West, R.P.M. Steegers-Theunissen, Bioavailability and bioefficacy of folate and folic acid in man, *Nutr. Res. Rev.* 14 (2001) 267–293.
- [23] M. Lucock, Folic acid: Nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes, *Mol. Genet. Metab.* 71 (2000) 121–138.
- [24] M.J. Rodríguez Gómez, Estudio, identificación y separación de algunos compuestos antineoplásicos, metabolitos y compuestos co-administrados, Universidad de Extremadura, 2004.
- [25] National Institutes of Health, Folate Recommended Intakes, (2018). <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Folate-HealthProfessional/#h2>.
- [26] L.B. Bailey, P.J. Stover, H. McNulty, M.F. Fenech, J.F.G. Iii, J.L. Mills, C.M. Pfeiffer, Z.

- Fazili, M. Zhang, P.M. Ueland, A.M. Molloy, M. a Caudill, B. Shane, R.J. Berry, R.L. Bailey, D.B. Hausman, Biomarkers of Nutrition for Development— Folate Review, *J. Nutr.* 145 (2015) 1636S–1680S.
- [27] E.H. Reynolds, Benefits and risks of folic acid to the nervous system. [Review], *J. Neurol.* 72 (2002) 567–571.
- [28] S.M. Kerr, S.E. Parker, A.A. Mitchell, S.C. Tinker, M.M. Werler, Periconceptional maternal fever, folic acid intake, and the risk for neural tube defects, *Ann. Epidemiol.* 27 (2017) 777–782.
- [29] H. Refsum, A.D. Smith, Folic Acid for the Prevention of Neural Tube Defects, *JAMA Pediatr.* 171 (2017) 710–711.
- [30] D. a Bender, Megaloblastic anaemia in vitamin B12 deficiency., *Br. J. Nutr.* 89 (2003) 439–441.
- [31] P. Ventura, R. Panini, S. Tremosini, G. Salvioli, A role for homocysteine increase in haemolysis of megaloblastic anaemias due to vitamin B 12 and folate deficiency: Results from an in vitro experience, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1739 (2004) 33–42.
- [32] C. La Vecchia, E. Negri, C. Pelucchi, S. Franceschi, Dietary folate and colorectal cancer, *Int. J. Cancer.* 102 (2002) 545–547.
- [33] Y.-I. Kim, Nutritional “omics” technologies for elucidating the role (s) of bioactive food components in colon cancer prevention, *J. Nutr.* 135 (2005) 2703–2709.
- [34] S.M. Zhang, W.C. Willett, J. Selhub, D.J. Hunter, E.L. Giovannucci, M.D. Holmes, G.A. Colditz, S.E. Hankinson, Plasma Folate , Vitamin B 6 , Vitamin B 12 , Homocysteine , and Risk of Breast Cancer, 95 (2003) 373–380.
- [35] E.J.M. Konings, R.A. Goldbohm, H.A.M. Brants, W.H.M. Saris, P.A. van den Brandt, Intake of dietary folate vitamers and risk of colorectal carcinoma, *Cancer.* 95 (2002) 1421–1433.
- [36] M.E. Martínez, E. Giovannucci, R. Jiang, S.M. Henning, E.T. Jacobs, P. Thompson, S.A. Smith-Warner, D.S. Alberts, Folate fortification, plasma folate, homocysteine and colorectal adenoma recurrence, *Int. J. Cancer.* 119 (2006) 1440–1446.
- [37] M.L. McCullough, E.L. Giovannucci, Diet and cancer prevention, *Oncogene.* 23 (2004)

6349–6364.

- [38] A.F. Remacha, J.C. Souto, E. Rámilia, G. Perea, M.P. Sarda, J. Fontcuberta, Enhanced risk of thrombotic disease in patients with acquired vitamin B12 and/or folate deficiency: Role of hyperhomocysteinemia, *Ann. Hematol.* 81 (2002) 616–621.
- [39] J. Selhub, P.F. Jacques, A.G. Bostom, R.B. D’Agostino, P.W.F. Wilson, A.J. Belanger, D.H. O’Leary, P. a Wolf, E.J. Schaefer, I.H. Rosenberg, Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis., *N. Engl. J. Med.* 332 (1995) 286–291.
- [40] K. Robinson, K. Arheart, H. Refsum, L. Brattström, P. Ueland, P. Rubba, R. Palma-reis, R. Meleady, J. Witteman, I. Graham, K. Robinson, K. Arheart, H. Refsum, L. Brattstro, Low Circulating Folate and Vitamin B 6 Concentrations Risk Factors for Stroke , Peripheral Vascular Disease , and Coronary, *Circulation.* 97 (1998) 437–443.
- [41] L.J. Riddell, A. Chisholm, S. Williams, J.I. Mann, Dietary strategies for lowering homocysteine concentrations, *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (2000) 1448–1454.
- [42] S. Seshadri, A. Beiser, J. Selhub, P.F. Jacques, I.H. Rosenberg, R.B. D’Agostino, P.W.F. Wilson, P. a Wolf, Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer’s disease., *N. Engl. J. Med.* 346 (2002) 476–483.
- [43] N. Delchier, A.L. Herbig, M. Rychlik, C.M.G.C. Renard, Foliates in Fruits and Vegetables: Contents, Processing, and Stability, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15 (2016) 506–528.
- [44] R.K. Saini, S.H. Nile, Y.S. Keum, Foliates: Chemistry, analysis, occurrence, biofortification and bioavailability, *Food Res. Int.* 89 (2016) 1–13.
- [45] M. Czarnowska-Kujawska, E. Gujska, J. Michalak, Testing of different extraction procedures for folate HPLC determination in fresh fruits and vegetables, *J. Food Compos. Anal.* 57 (2017) 64–72.
- [46] M. V. Chandra-Hioe, M.P. Bucknall, J. Arcot, Evaluating folate extraction from infant milk formulae and adult nutritionals: Enzymatic digestion versus enzyme-free heat treatment, *Food Chem.* 234 (2017) 365–371.
- [47] J.I. Martin, W.O. Landen Jr, A.G. Soliman, R.R. Eitenmiller, Application of a tri-enzyme extraction for total folate determination in foods., *J. - Assoc. Off. Anal. Chem.* 73 (1990) 805–808.

- [48] T.H. Hyun, T. Tamura, Trienzyme extraction in combination with microbiologic assay in food folate analysis: an updated review., *Exp. Biol. Med.* 230 (2005) 444–54.
- [49] K.E. Johnston, P.A. Lofgren, T. Tamura, Folate concentrations of fast foods measured by trienzyme extraction method, *Food Res. Int.* 35 (2002) 565–569.
- [50] A.K. Shrestha, J. Arcot, J. Paterson, Folate assay of foods by traditional and tri-enzyme treatments using cryoprotected *Lactobacillus casei*, *Food Chem.* 71 (2000) 545–552.
- [51] Y. Iwatani, J. Arcot, A.K. Shrestha, Determination of folate contents in some Australian vegetables, *J. Food Compos. Anal.* 16 (2003) 37–48.
- [52] J. Arcot, A.K. Shrestha, U. Gusanov, Enzyme protein binding assay for determining folic acid in fortified cereal foods and stability of folic acid under different extraction conditions, *Food Control.* 13 (2002) 245–252.
- [53] J. Van Daele, D. Blancquaert, F. Kiekens, D. Van Der Straeten, W.E. Lambert, C.P. Stove, Folate Profiling in Potato (*Solanum tuberosum* ) Tubers by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 3092–3100.
- [54] B.B. Prasad, M.P. Tiwari, R. Madhuri, P.S. Sharma, Development of a highly sensitive and selective hyphenated technique (molecularly imprinted micro-solid phase extraction fiber-molecularly imprinted polymer fiber sensor) for ultratrace analysis of folic acid, *Anal. Chim. Acta.* 662 (2010) 14–22.
- [55] Y. Nojavan, M. Kamankesh, F. Shahraz, M. Hashemi, A. Mohammadi, Ion pair-based dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography as a new method for determining five folate derivatives in foodstuffs, *Talanta.* 137 (2015) 31–37.
- [56] R.K. Saini, P. Manoj, N.P. Shetty, K. Srinivasan, P. Giridhar, Relative bioavailability of folate from the traditional food plant *Moringa oleifera* L. as evaluated in a rat model, *J. Food Sci. Technol.* 53 (2016) 511–520.
- [57] C. Nilsson, M. Johansson, E. Yazynina, L. Strålsjö, J. Jastrebova, Solid-phase extraction for HPLC analysis of dietary folates, *Eur. Food Res. Technol.* 219 (2004) 199–204.
- [58] J. Jastrebova, C. Witthöft, A. Grahn, U. Svensson, M. Jägerstad, HPLC determination of folates in raw and processed beetroots, *Food Chem.* 80 (2003) 579–588.

- 
- [59] K. Meisser-Redeuil, S. Bénet, C. Gimenez, E. Campos-Giménez, M. Nelson, Determination of folate in infant formula and adult/pediatric nutritional formula by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: First action 2013.13, *J. AOAC Int.* 97 (2014) 1121–1126.
- [60] M.J.I. Shohag, Q. Yang, Y. Wei, J. Zhang, F.Z. Khan, M. Rychlik, Z. He, X. Yang, A rapid method for sensitive profiling of folates from plant leaf by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem quadrupole mass spectrometer, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1040 (2017) 169–179.
- [61] P. Stokes, K. Webb, Analysis of some folate monoglutamates by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. I, *J. Chromatogr. A.* 864 (1999) 59–67.
- [62] R.J. Pawlosky, E. Hertrampf, V.P. Flanagan, P.M. Thomas, Mass spectral determinations of the folic acid content of fortified breads from Chile, *J. Food Compos. Anal.* 16 (2003) 281–286.
- [63] J.E. Camara, M.S. Lowenthal, K.W. Phinney, Determination of fortified and endogenous folates in food-based Standard Reference Materials by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 4561–4568.
- [64] J.W. DeVries, J.I. Rader, P.M. Keagy, C.A. Hudson, G. Angyal, J. Arcot, M. Castelli, N. Doreanu, C. Hudson, P. Lawrence, J. Martin, R. Peace, L. Rosner, H.S. Strandler, J. Szpylka, H. van den Berg, C. Wo, C. Wurz, Microbial assay tri-enzyme procedure for total folates in cereal foods: Collaborative study, *J AOAC Int.* 88 (2005) 5–15.
- [65] J. Devries, P.M. Keagy, C.A. Hudson, J. Rader, AACC collaborative study of a method for determining total folate in cereal products - Microbiological assay using trienzyme extraction (AACC method 86-47), *Cereal Foods World.* 46 (2001) 216–219.
- [66] S. Akbar, A. Anwar, Q. Kanwal, Electrochemical determination of folic acid: A short review, *Anal. Biochem.* 510 (2016) 98–105.
- [67] D.C. da Silva, J. V. Visentainer, N.E. de Souza, C.C. Oliveira, Micellar Electrokinetic Chromatography Method for Determination of the Ten Water-Soluble Vitamins in Food Supplements, *Food Anal. Methods.* 6 (2013) 1592–1606. doi:10.1007/s12161-013-9576-x.
- [68] U.D. Uysal, E.M. Oncu-Kaya, M. Tunçel, Determination of Folic Acid by CE in Various

- Cultivated Variety of Lentils, *Chromatographia*. 71 (2010) 653–658.
- [69] D. Zhao, M. Lu, Z. Cai, Separation and determination of B vitamins and essential amino acids in health drinks by CE-LIF with simultaneous derivatization, *Electrophoresis*. 33 (2012) 2424–2432.
- [70] S. Zhao, H. Yuan, C. Xie, D. Xiao, Determination of folic acid by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection, *J. Chromatogr. A*. 1107 (2006) 290–293.
- [71] K. Maráková, J.P. Šanský, E. Havránek, P.M. Š, Simultaneous analysis of vitamins b in pharmaceuticals and dietary supplements by capillary electrophoresis hyphenated with triple quadrupole mass spectrometry, *Pharmazie*. 69 (2014) 663–668.
- [72] E.S. Osseyi, R.L. Wehling, J. a Albrecht, Liquid chromatographic method for determining added folic acid in fortified cereal products., *J. Chromatogr. A*. 826 (1998) 235–40.
- [73] E. Deconinck, S. Crevits, P. Baten, P. Courselle, J. De Beer, A validated ultra high pressure liquid chromatographic method for qualification and quantification of folic acid in pharmaceutical preparations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 (2011) 995–1000. doi:10.1016/j.jpba.2010.11.036.
- [74] J.E. Young, M.T. Matyska, J.J. Pesek, Liquid chromatography/mass spectrometry compatible approaches for the quantitation of folic acid in fortified juices and cereals using aqueous normal phase conditions, *J. Chromatogr. A*. 1218 (2011) 2121–2126.
- [75] E. Prado de Paiva Azevedo, C.A. De Azevedo Filho, B.S. Santos, L. Trajano da Silva, A.E. Cavalcante Fai, Proposition for Mechanism of Separation of Foliates by HPLC-DAD : Practical Application in New Zealand Spinach ( *Tetragonia expansa* ), *Food Anal. Methods*. 9 (2016) 1321–1332.
- [76] H. Shin, M. Shimoda, E. Kokue, Identification of 5 , 10-methylenetetrahydrofolate in rat bile, *J. Chromatogr. B*. 661 (1994) 237–244.
- [77] P.J. Bagley, J. Selhub, Analysis of folate form distribution by affinity followed by reversed- phase chromatography with electrochemical detection, *Clin. Chem*. 46 (2000) 404–411.
- [78] P.A. Ramos-Parra, R. Urrea-López, R.I. Díaz de la Garza, Folate analysis in complex food matrices: Use of a recombinant Arabidopsis  $\gamma$ -glutamyl hydrolase for folate

- deglutamylation, *Food Res. Int.* 54 (2013) 177–185.
- [79] Z. Song, X. Zhou, Chemiluminescence flow sensor for folic acid with immobilized reagents, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 57 (2001) 2567–2574.
- [80] A. Freisleben, P. Schieberle, M. Rychlik, Specific and sensitive quantification of folate vitamers in foods by stable isotope dilution assays using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 149–156.
- [81] K. Tyagi, P. Upadhyaya, S. Sarma, V. Tamboli, Y. Sreelakshmi, R. Sharma, High performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry for profiling and quantitative analysis of folate monoglutamates in tomato, *Food Chem.* 179 (2015) 76–84.
- [82] C. Motta, I. Delgado, A.S. Matos, G.B. Gonzales, D. Torres, M. Santos, M. V. Chandra-Hioe, J. Arcot, I. Castanheira, Foliates in quinoa (*Chenopodium quinoa*), amaranth (*Amaranthus* sp.) and buckwheat (*Fagopyrum esculentum*): Influence of cooking and malting, *J. Food Compos. Anal.* 64 (2017) 181–187.
- [83] S.D. Garbis, A. Melse-Boonstra, C.E. West, R.B. van Breemen, Determination of folates in human plasma using hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5358–5364.
- [84] B.C. Nelson, J.J. Dalluge, S.A. Margolis, Preliminary application of liquid chromatography-electrospray-ionization mass spectrometry to the detection of 5-methyltetrahydrofolic acid monoglutamate in human plasma, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 765 (2001) 141–150.
- [85] D.J. Hart, P.M. Finglas, C.A. Wolfe, F. Mellon, A.J.A. Wright, S. Southon, Determination of 5-methyltetrahydrofolate (<sup>13</sup>C-labeled and unlabeled) in human plasma and urine by combined liquid chromatography mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 305 (2002) 206–213.
- [86] F. Kiekens, J. Van Daele, D. Blancquaert, D. Van Der Straeten, W.E. Lambert, C.P. Stove, A validated ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the selective analysis of free and total folate in plasma and red blood cells, *J. Chromatogr. A.* 1398 (2015) 20–28.
- [87] R.M. Kok, D.E.C. Smith, J.R. Dainty, J.T. Van Den Akker, P.M. Finglas, Y.M. Smulders, C.

- Jakobs, K. De Meer, 5-Methyltetrahydrofolic acid and folic acid measured in plasma with liquid chromatography tandem mass spectrometry: Applications to folate absorption and metabolism, *Anal. Biochem.* 326 (2004) 129–138.
- [88] M. Rychlik, M. Netzel, I. Pfannebecker, T. Frank, Application of stable isotope dilution assays based on liquid chromatography – tandem mass spectrometry for the assessment of folate bioavailability, *J. Chromatogr. B.* 792 (2003) 167–176.
- [89] C. Mattos Della Lucía, E. Rodrigues da Silva, S. Machado Rocha Ribeiro, H.M. Pinheiro-Sant’Ana, otimização de método para análise de folatos em hortaliças folhosas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência, *Quim. Nov.* 34 (2011) 335–340.
- [90] G.F. Zhang, K.E. Maudens, S. Storozhenko, K.A. Mortier, D. Van Der Straeten, W.E. Lambert, Determination of Total Folate in Plant Material by Chemical Conversion into para-Aminobenzoic Acid Followed by High Performance Liquid Chromatography Combined with On-Line Postcolumn Derivatization and Fluorescence Detection, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 7872–7878.
- [91] S. Ndaw, M. Bergaentzlé, D. Aoudé-Werner, S. Lahély, C. Hasselmann, Determination of folates in foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after precolumn conversion to 5-methyltetrahydrofolates, *J. Chromatogr. A.* 928 (2001) 77–90.
- [92] N. Ichinose, T. Tsuneyoshi, M. Kato, T. Suzuki, S. Ikeda, Fluorescent high-performance liquid chromatography of folic acid and its derivatives using permanganate as a fluorogenic reagent, *Fresenius. J. Anal. Chem.* 346 (1993) 841–846.
- [93] S. Emara, T. Masujima, W. Zarad, M. Kamal, R. Ei-Bagary, Online pre-column derivatization with chromatographic separation to determine folic acid, *J. Chromatogr. Sci.* 51 (2013) 544–551.
- [94] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, J.L.M. Santos, E.A.G. Zagatto, Photochemical-fluorimetric determination of folic acid in a multicommutated flow system, *Anal. Chim. Acta.* 351 (1997) 223–228.
- [95] A. Jiménez Girón, I. Durán Merás, A. Muñoz De La Peña, A. Espinosa Mansilla, F. Cañada Cañada, A.C. Olivieri, Photoinduced fluorimetric determination of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid in serum using the kinetic evolution of the emission spectra accomplished with multivariate second-order calibration methods, *Anal.*



- Bioanal. Chem. 391 (2008) 827–835.
- [96] A. Jiménez Girón, I. Durán-Merás, A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña, F. Cañada Cañada, A.C. Olivieri, On line photochemically induced excitation-emission-kinetic four-way data. Analytical application for the determination of folic acid and its two main metabolites in serum by U-PLS and N-PLS/residual trilinearization (RTL) calibration, *Anal. Chim. Acta.* 622 (2008) 94–103.
- [97] R.F. Doherty, G.R. Beecher, A method for the analysis of natural and synthetic folate in foods, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 354–361.
- [98] A. Colyt, J. Aaron, Photochemical-Spectrofluorimetric Method for the Determination of Several Aromatic Insecticides, *Analyst.* 119 (1994) 1205–1209.
- [99] A. Espinosa-Mansilla, A.M. de la Peña, F. Cañada-Cañada, A.M. de Llanos, LC determination of biopterin reduced forms by UV-photogeneration of biopterin and fluorimetric detection, *Talanta.* 77 (2008) 844–851.
- [100] F. Cañada-Cañada, A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña, A. Mancha de Llanos, Determination of marker pteridins and biopterin reduced forms, tetrahydrobiopterin and dihydrobiopterin, in human urine, using a post-column photoinduced fluorescence liquid chromatographic derivatization method, *Anal. Chim. Acta.* 648 (2009) 113–122.
- [101] E.S.P.B. V, J.R. Lang, J.T. Stewart, I.L. Honigberg, An air-segmentation post-column reactor compatible with a high-performance liquid chromatographic ( HPLC ) system and useful for the fluorometric detection of reserpine , an important antihypertensive agent , was recently developed '. The reactor employed, *J. Chromatogr. A.* 264 (1983) 144–148.
- [102] E.L.R. Stokstad, D. Fordham, A. De Grunigen, The inactivation of pteroylglutamic acid (liver *Lactobacillus casei* factor) by light, *J. Biol. Chem.* 167 (1947) 877–878.
- [103] O.H. Lowry, O.A. Bessey, J. Crawford, Photolytic and enzymatic transformations of pteroylglutamic acid, *J. Biol. Chem.* 180 (1949) 389–398.
- [104] M. Jamil Akhtar, M. Atallah Khan, I. Ahmad, Identification of photoproducts of folic acid and its degradation pathways in aqueous solution, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 579–588.
- [105] A.H. Thomas, G. Suárez, F.M. Cabrerizo, R. Martino, A.L. Capparelli, Study of the

photolysis of folic acid and 6-formylpterin in acid aqueous solutions, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 135 (2000) 147–154.

- [106] M.K. Off, A.E. Steindal, A.C. Porojnicu, A. Juzeniene, A. Vorobey, A. Johnsson, J. Moan, Ultraviolet photodegradation of folic acid, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 80 (2005) 47–55.

## **2. Estudios de fotoirradiación de folatos. Efecto de la radiación UV en sus propiedades fluorescentes.**

---



Como se ha expuesto en la Introducción de esta Parte II, el ácido fólico (AF) presenta un muy bajo rendimiento cuántico de fluorescencia, mientras que sus formas reducidas, tales como el ácido tetrahidrofólico (THF) y el metabolito 5-metiltetrahidrofólico (5MTHF) son notablemente más fluorescentes, sin embargo, al no ser aromáticos en el anillo pirazínico, ya que se encuentran en su forma reducida, la longitud de onda de emisión sufre un fuerte efecto hipsocrómico situándose por debajo de 400 nm.

Estudios anteriores han puesto de manifiesto que la irradiación mediante radiación UV modifica las propiedades fluorescentes del AF y de sus metabolitos. Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido identificar los posibles productos de dicha fotoirradiación, y establecer las condiciones óptimas para obtener el máximo rendimiento en la formación de los fotoproductos. Posteriormente, utilizaremos esta información para optimizar la separación y determinación de estos tres folatos mediante HPLC utilizando un sistema de fotoirradiación en línea y posibilitando así la detección fluorimétrica.

Hay que tener en cuenta que la naturaleza de los fotoproductos formados puede depender en gran medida del tipo de lámpara utilizada y de las condiciones químicas del medio de reacción.

### 2.1. Material y métodos

#### 2.1.1. Preparación de patrones

Se prepararon disoluciones patrón de ácido pterin-6-carboxílico (PT6C), 6-formilpterin (PT6F) y pterin (PT) de concentraciones comprendidas entre 15 y 30  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y de AF, THF y 5MTHF (20-40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) mediante pesada exacta de cada compuesto puro, disolución en agua ultrapura ligeramente alcalinizada, posterior neutralización con ácido clorhídrico y finalmente dilución con agua hasta el volumen final. Para evitar la degradación oxidativa, las muestras se prepararon bajo luz reducida. Una vez preparadas estas disoluciones se guardaron divididas en pequeñas alícuotas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  y en la oscuridad.

Las disoluciones de trabajo se prepararon justo antes de su uso mediante dilución de las disoluciones patrón con la fase móvil utilizada en los ensayos de HPLC.

### 2.1.2. Sistema cromatográfico

Para la separación e identificación de los fotoproductos obtenidos mediante irradiación off-line se usó un cromatógrafo de líquidos cuyas características se describen en el Anexo 2. El equipo está acoplado a dos detectores en serie, un detector de diodos UV-visible (DAD) y un detector fluorescente de barrido rápido (FSFD)

Se empleó una columna Poroshell 120 de 150 mm x 3 mm y espesor de relleno 2.7  $\mu\text{m}$ , cuya temperatura se fijó a 10 °C. El volumen de inyección fue 10  $\mu\text{L}$ . La elución se realizó en modo isocrático usando una fase móvil compuesta por acetonitrilo (ACN) y ácido fórmico 2 mM (pH 5), 3:97, v:v, con una velocidad de flujo de 0.3  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Los componentes de la fase móvil se filtraron a través de un filtro de nylon de 0.22  $\mu\text{m}$  y se desgasificaron mediante ultrasonidos antes de su uso.

En el detector de masas de simple cuadrupolo se llevaron a cabo estudios mediante análisis por inyección en flujo operando en modo SCAN (100-500 m/z) y utilizando ionización mediante electrospray en modo positivo. Las variables instrumentales optimizadas fueron: voltaje del capilar 4000 V, voltaje del fragmentador 100 V, presión del nebulizador 40 psi, temperatura del gas 300 °C y flujo del gas 10  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . El control del sistema cromatográfico, la recogida y la interpretación de los datos se realizaron mediante el paquete informático Chemstation.

Para el cálculo de las masas exactas y análisis de confirmación se utilizó un espectrómetro de masas de alta resolución de Cuadrupolo-Tiempo de vuelo (Q-TOF), usando también ionización mediante electrospray en modo positivo.

## 2.2. Resultados y discusión

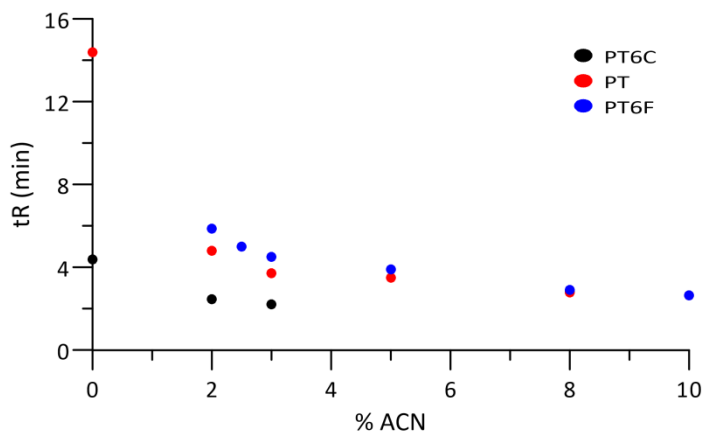
### 2.2.1. Estudio de la separación cromatográfica del ácido pterin-6-carboxílico, 6-formilpterin y pterin

Según datos bibliográficos, la fotoirradiación del AF puede generar ácido pterin-6-carboxílico (PT6C), 6-formilpterin (PT6F) y pterin (PT) [1,2]. Por ello y como paso previo, se ha procedido a la optimización de un método cromatográfico para la separación y determinación de estas tres pteridinas, con objeto de poder realizar un seguimiento cromatográfico de la posible formación de dichos compuestos durante los procesos de irradiación de los folatos en estudio.

Para la optimización de la fase móvil, como condiciones iniciales se utilizó una fase móvil formada por formiato amónico 2 mM (pH 6) en presencia de diferentes porcentajes de ACN y una velocidad de flujo de  $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Así, se inyectaron disoluciones patrón de las tres pteridinas individualmente, PT6C y PT ( $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y PT6F ( $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y se registraron los cromatogramas a longitud de onda de excitación ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) 272 nm y longitud de onda de emisión ( $\lambda_{\text{em}}$ ) 445 nm. Para estos estudios preliminares la temperatura de la columna se fijó a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

El contenido de ACN se varió entre 0 y el 50 %, observándose que para contenidos superiores al 7 % los tres compuestos no se retienen en la columna apareciendo con el frente. Para porcentajes inferiores al 6 %, el orden de elución es  $\text{PT6F} > \text{PT} > \text{PT6C}$ .

En la **Figura 2.1** se ha representado la variación del tiempo de retención en función del % de ACN. Como podemos observar solo se obtiene una separación apreciable con porcentajes de ACN en la fase móvil comprendidos entre 2-3%, sin embargo, en ausencia de ACN, los compuestos PT6F y PT son fuertemente retenidos.



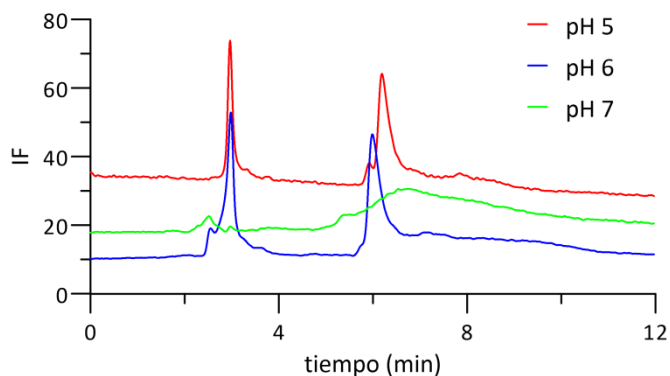
**Figura 2.1.** Variación de los tiempos de retención en función del contenido de ACN en la fase móvil a pH=6.0

A la vista de estos resultados, se procedió a inyectar una mezcla de estos tres analitos utilizando un 2% de ACN pero no se obtuvo la resolución mínima necesaria entre el pico del PT y PT6F, ya que este último aparece notablemente ensanchado.

Posteriormente, con objeto de aumentar la resolución, se ensayaron diferentes gradientes modificando el contenido de ACN una vez eluido el PT6C, con objeto de aumentar el poder desplazante de la fase móvil. Sin embargo, el pico correspondiente al PT6F aparecía deformado en todos los ensayos realizados.

Debido a que una elución en gradiente no mejora la resolución de los analitos, se probó la modificación del pH y la temperatura de la columna. En primer lugar y teniendo en cuenta los conocimientos previos sobre la drástica influencia que tiene el pH de la fase móvil sobre la retención de las pteridinas, se modificó el pH sólo entre 5 y 7. Las fases móviles de pH 6 y 7 contenían 2 mM de formiato amónico y el pH fue ajustado con hidróxido amónico y la de pH 5 se preparó con ácido fórmico 2 mM y ajustando el pH con hidróxido sódico. Estas experiencias se realizaron en modo isocrático con un 2 % de ACN, ya que este contenido fue el que nos proporcionó los valores de  $k'$  más adecuados en los estudios anteriores. En la **Figura 2.2** se representan los cromatogramas obtenidos utilizando fases móviles con diferentes valores de pH.

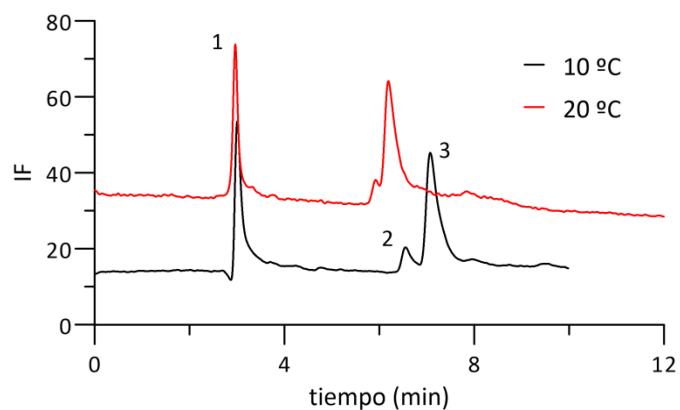




**Figura 2.2.** Cromatogramas obtenidos con fases móviles de diferentes pH. Modo isocrático con 2 % de ACN. Mezcla patrón de PT6C y PT ( $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y PT6F ( $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

A pH 7 no se observan picos cromatográficos definidos; a pH 6 se observan picos definidos para los dos primeros compuestos, sin embargo, el PT6F queda retenido y mal definido. Por último, a pH 5 los picos aparecen mejor definidos y se observa que el PT6F coeluye con el segundo pico correspondiente al PT, a tiempos ligeramente inferiores a éste. Teniendo en cuenta que a pH inferiores estos derivados presentan escasa fluorescencia se decidió utilizar para posteriores estudios la fase móvil a pH=5.0.

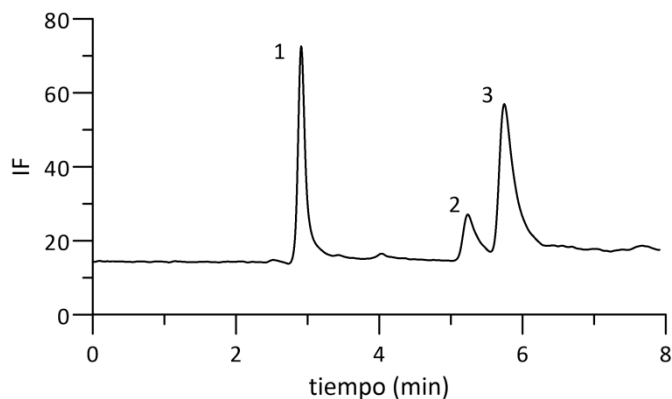
A continuación, con objeto de mejorar la separación, se estudió la influencia de la temperatura de la columna. En la **Figura 2.3** se muestran los cromatogramas de una disolución patrón mezcla de los tres analitos utilizando como fase móvil ácido fórmico 2 mM (pH 5) y ACN (98:2) y fijando la temperatura de la columna a 20 y a 10 °C, observándose como a ésta última temperatura los picos de PT y PT6F aparecen relativamente separados debido a una mayor retención del PT, que conlleva la inversión de la elución y, por tanto, el nuevo orden de elución pasa a ser: PT6C, PT6F y PT.



**Figura 2.3.** Cromatogramas obtenidos a diferentes temperaturas de la columna. Modo isocrático con 2% de acetonitrilo y pH =5, mezcla patrón de PT6C (1) y PT (3) ( $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y de PT6F (2) ( $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

Finalmente, para disminuir los tiempos de retención se aumentó ligeramente el porcentaje de ACN de la fase móvil hasta el 3% y como se puede observar en la **Figura 2.4** los tres analitos aparecen bien resueltos en aproximadamente 6.5 minutos. Aunque la resolución de los dos últimos picos no es muy elevada, se considera suficiente para poder llevar a cabo los estudios de seguimiento de la reacción fotoquímica.

Por lo tanto, la fase móvil optimizada para la separación de los tres posibles fotoproductos del AF y la que se utilizará en los sucesivos estudios de fotoirradiación estará constituida por ácido fórmico 2 mM a pH 5 con un 3 % de ACN en modo isocrático, con una velocidad de flujo de  $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , manteniendo constante la temperatura de la columna a  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ .

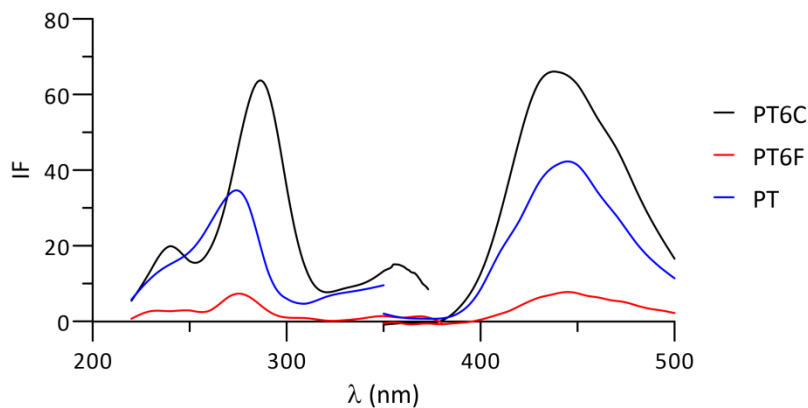


**Figura 2.4.** Cromatograma mezcla patrón de PT6C (1) y PT (3) ( $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y PT6F (2) ( $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) en las condiciones optimizadas: 3 % ACN y 97 % ácido fórmico (2mM, pH= 5). Temperatura de la columna  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.2. Establecimiento de las características espectrales

Una vez optimizada la fase móvil para la separación de las tres pteridinas se procedió a registrar los espectros dinámicos de excitación y emisión en el máximo de los picos cromatográficos, con el objetivo de seleccionar las longitudes de ondas más adecuadas para el registro de los cromatogramas posteriores. Para ello se inyectó, en las condiciones optimizadas, una mezcla de PT6C, PT y PT6F enrasada con la propia fase móvil (pH 5) y se trabajó en modo multiemisión para registrar los espectros de emisión, y una vez seleccionada una longitud de onda de emisión de compromiso para los tres analitos se registró el espectro de excitación trabajando en modo multi-excitación. Los espectros de las tres pteridinas se muestran en la **Figura 2.5**.

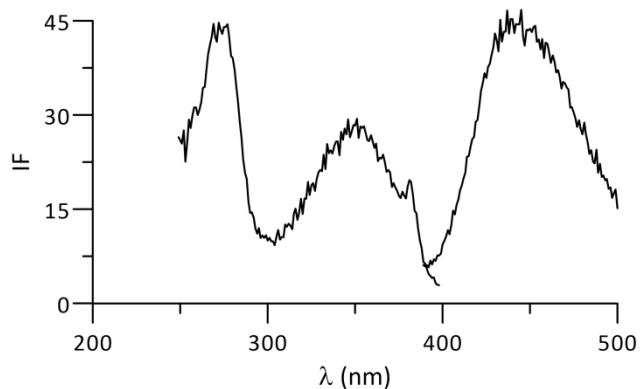
El espectro del PT6C presenta dos máximos de excitación a 280 y 350 nm y un máximo de emisión a 440 nm. El PT presenta los máximos de excitación a 270 y 350 nm y un máximo de emisión a 445 nm y por último para el PT6F los máximos de excitación están situados a 275 y 360 nm y el de emisión a 445 nm. Además, en estos espectros podemos observar que el PT6F presenta un rendimiento cuántico de fluorescencia mucho menor que las otras dos pteridinas. Para posteriores estudios se seleccionaron  $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$  para PT6C y PT6F y  $\lambda_{\text{ex}} = 270 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$  para PT.



**Figura 2.5.** Espectros dinámicos de excitación y emisión de PT6C, PT6F y PT.

### 2.2.3. Comportamiento fotoquímico del AF

Inicialmente se registraron los espectros de excitación y emisión de una disolución acuosa de AF ( $3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) conteniendo 3 % ACN/ 97 % ácido fórmico 2 mM y se establecieron los máximos de excitación y emisión para este analito en las condiciones de elución, **Figura 2.6.**



**Figura 2.6.** Espectros de excitación y emisión de AF ( $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) a pH 5.

Voltaje fotomultiplicador 700 V; rendijas = 5/5 nm; velocidad de barrido =  $10 \text{ nm}\cdot\text{seg}^{-1}$ .

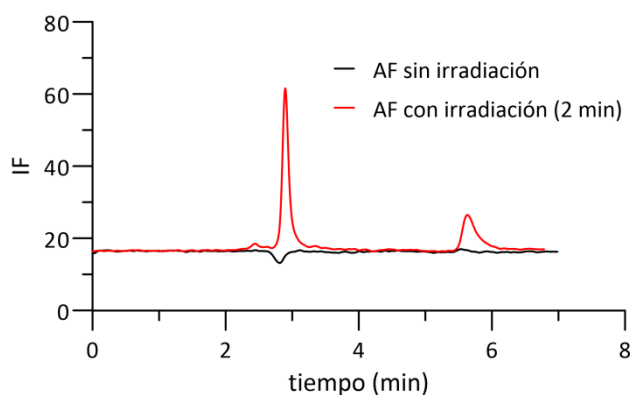
El AF presenta escaso rendimiento cuántico de fluorescencia mostrando dos máximos de excitación situados a 277 y 350 nm y un único máximo de emisión a 440 nm. Dichos

espectros son similares a los mostrados por las pteridinas estudiadas. Así, para el seguimiento cromatográfico en los posteriores estudios se seleccionó  $\lambda_{em} = 440$  nm y se trabajó en modo multiexcitación registrando los cromatogramas a  $\lambda_{ex} = 270, 280$  y  $360$  nm.

### 2.2.3.1. Asignación estructural de los fotoproductos fluorescentes formados

Los estudios previos de irradiación se realizaron en modo off-line utilizando una lámpara UV de Hg de alta presión de acuerdo al esquema mostrado en el Anexo 2. Una vez irradiadas las muestras durante periodos de tiempo controlados, alicuotas de  $10 \mu\text{L}$  de las mismas se inyectaron en el equipo cromatográfico y se obtuvieron los cromatogramas en las condiciones indicadas anteriormente.

Se preparó una muestra de AF ( $30 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y se inyectó en el cromatografo sin irradiar e irradiada durante dos minutos. Los cromatogramas obtenidos se presentan en la **Figura 2.7** donde se observa que la disolución de AF sin irradiar no presenta ningún pico cromatográfico a este nivel de concentraciones, sin embargo, la misma disolución irradiada durante 2 minutos presenta dos picos con tiempos de retención de 2.9 y 5.8 minutos, respectivamente.

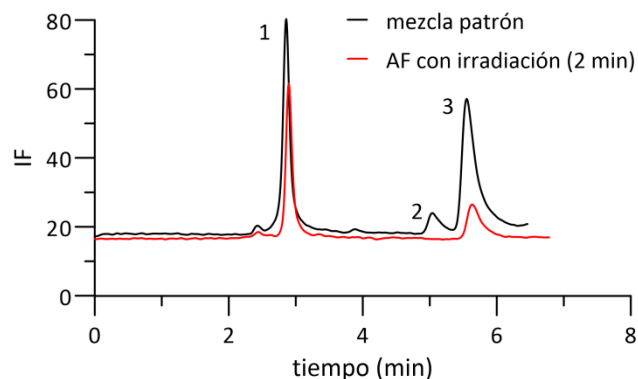


**Figura 2.7.** Cromatogramas de AF ( $30 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) sin irradiar e irradiado durante 2 min.

$$\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280/440 \text{ nm.}$$

Si se compara el cromatograma obtenido de la disolución de AF irradiada y el de una mezcla patrón de las tres posibles pteridinas, **Figura 2.8**, se observa que los tiempos de retención de los dos fotoproductos del AF coinciden con los tiempos de retención de los patrones PT6C y PT y, además, los espectros de los picos son similares, por lo que podemos

asumir que los fotoproductos fluorescentes que se forman son estas dos pteridinas. No se observa señal asignable al PT6F.

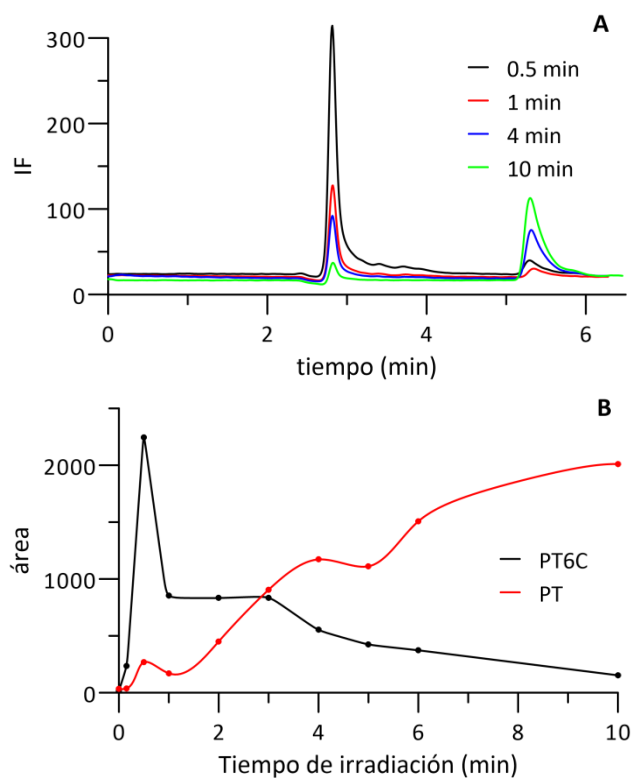


**Figura 2.8.** Cromatogramas de AF ( $30 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) irradiado 2 min y de una disolución patrón de PT6C (pico 1) y PT (pico 3) ( $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y de PT6F (pico 2) ( $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 280/440 \text{ nm}$ .

### 2.2.3.2. Influencia del tiempo de irradiación en las características fluorescentes del AF

Una vez asignados los posibles fotoproductos fluorescentes se procedió a estudiar la influencia del tiempo de irradiación. Para ello se preparó una disolución de  $30 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de AF y alícuotas de 5 mL se irradiaron durante diferentes tiempos. Los cromatogramas obtenidos a diferentes tiempos de irradiación se han representado en la **Figura 2.9 A**. En todos los casos se observan solo dos picos, asignables a PT6C (pico 1) y PT (pico 3).

Al representar las áreas de cada uno de los picos en función del tiempo de irradiación, **Figura 2.9 B**, se observa que para tiempos de irradiación inferiores al minuto, la concentración del PT6C aumenta rápidamente y con tiempos superiores el área del pico comienza a decrecer hasta ser insignificante para tiempos de irradiación superiores a 10 minutos. Por otro lado, la formación del PT empieza a ser notable a partir de un minuto de irradiación y su concentración aumenta progresivamente coincidiendo con el decrecimiento de la formación del PT6C. Esto indica que, inicialmente está más favorecida la formación de PT6C y cuando el tiempo de irradiación aumenta este compuesto es degradado probablemente por fotólisis de la cadena en el carbono 6, formándose PT, como se describe en la bibliografía [3]. Para ninguno de los tiempos de irradiación ensayados se observa la formación de PT6F.



**Figura 2.9.** Influencia del tiempo de irradiación en la formación de los fotoproductos a partir del AF.

A) Cromatogramas a diferentes tiempos de irradiación a  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 280/440$  nm.

B) Variación del área de los picos 1 y 3 con el tiempo de irradiación.

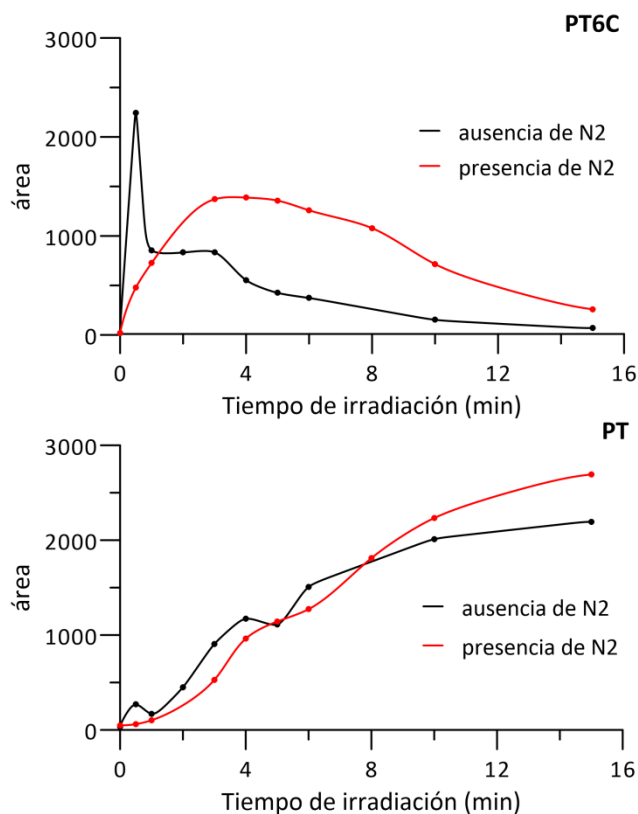
$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 280/440$  nm para PT6C (pico 1) y  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 270/440$  nm para PT (pico 2).

### 2.2.3.3. Influencia de la presencia de corriente de nitrógeno

La cinética de las reacciones fotoquímicas puede variar dependiendo del medio en que se lleve a cabo la irradiación. Así, la presencia o ausencia de oxígeno es un factor de gran importancia en la formación de fotoproductos que involucran oxidaciones. Se ha descrito que cuando la irradiación de estos compuestos se lleva a cabo en ausencia de oxígeno la cinética de formación de los productos es más lenta.

En nuestro caso, abordamos el estudio anterior tratando las muestras previas a su irradiación con una corriente de nitrógeno que se mantuvo también durante el proceso de

irradiación. En la **Figura 2.10** se representan las señales del PT6C y del PT respectivamente frente al tiempo de irradiación en ausencia y en presencia de N<sub>2</sub>, o lo que es lo mismo en presencia o ausencia de O<sub>2</sub>.



**Figura 2.10.** Variación de la señal de fluorescencia con la irradiación en presencia y ausencia de nitrógeno para PT6C ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280/440$  nm) y para PT ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 270/440$  nm).

Se puede observar que aparentemente se forman los mismos picos pero en el caso del PT6C la señal obtenida a tiempos cortos es mucho menor y la cinética de formación y de descomposición es más lenta en presencia de N<sub>2</sub>. En el caso del PT, sigue un comportamiento similar tanto en presencia como en ausencia de nitrógeno.



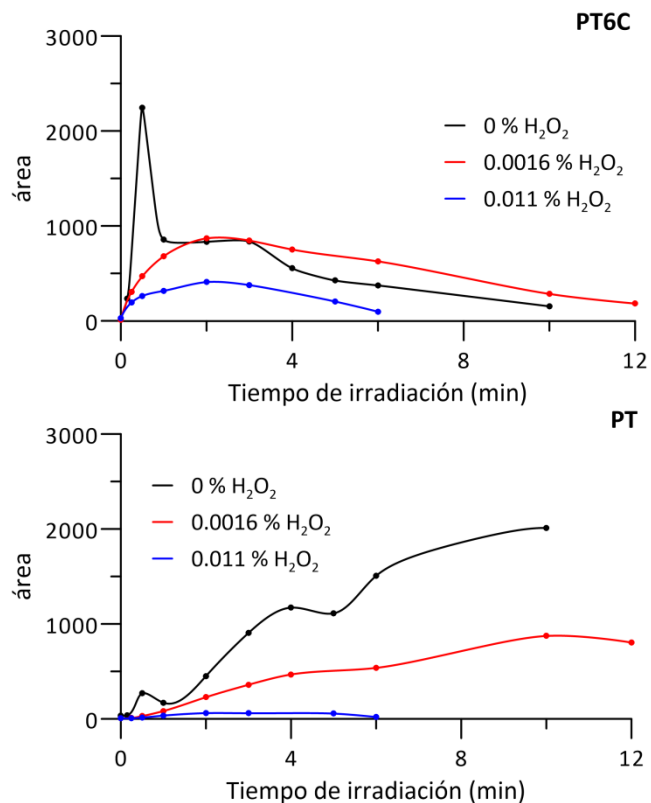
#### 2.2.3.4. Influencia de la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Con frecuencia las fotorreacciones de compuestos similares tienen lugar a través de mecanismos radicalarios, en los cuáles sustancias tales como los peróxidos presentan influencias notables. Por ello, se llevó a cabo el estudio de la irradiación de AF (30 ng·mL<sup>-1</sup>) en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con objeto de estudiar la formación de los fotoproductos en este medio, así como su cinética.

En estudios anteriores [4], utilizando fluorescencia molecular, se ha demostrado que contenidos bajos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.01 - 0.05 %) afectan a la velocidad de estas reacciones. Se eligió inicialmente un porcentaje de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> del 0.011% y se comparó el cromatograma de una mezcla patrón de los tres posibles fotoproductos y el cromatograma de la disolución de AF irradiado en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, comprobándose que los fotoproductos formados son los mismos que en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A continuación, se varió el porcentaje de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre 0 y 0.011%. En la **Figura 2.11** se muestra la variación del área de los picos correspondientes a PT6C y PT en función del tiempo de irradiación. Se observa como la formación de ambos fotoproductos se ve desfavorecida a medida que aumenta el porcentaje de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Además, la descomposición del PT6C comienza a tiempos de irradiación próximos a los 4 minutos, independientemente del porcentaje de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

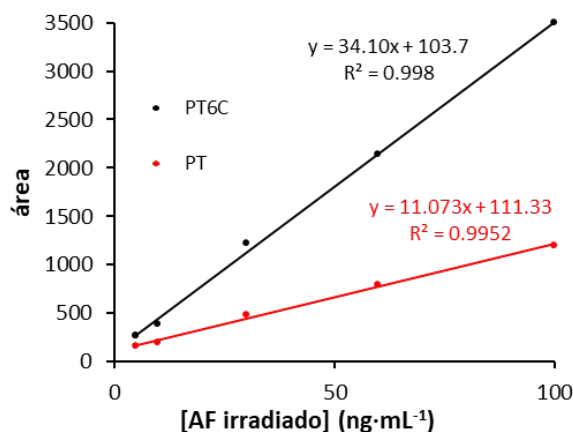
En el caso del PT, en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se observa que este fotoproducto tiende a descomponerse a tiempos de irradiación más cortos a medida que aumenta el porcentaje de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figura 2.11.** Influencia del tiempo de irradiación en la señal de fluorescencia a diferentes porcentajes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para PT6C ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280/440$  nm) y PT ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 270/440$  nm).

**2.2.3.5. Influencia de la concentración del AF**

También se estudió como le afecta la irradiación a disoluciones de distinta concentración de AF, para ello se fijó un tiempo de irradiación de compromiso de 3 minutos y se midieron las áreas de los picos generados. La representación gráfica del área de los picos de los fotoproductos fluorescentes frente a la concentración de AF se muestra en la **Figura 2.12.**



**Figura 2.12.** Representación de las áreas de los picos 1 (PT6C) y 3 (PT) en función de la concentración de AF irradiada. PT6C ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280/440$  nm) y PT ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 270/440$  nm).

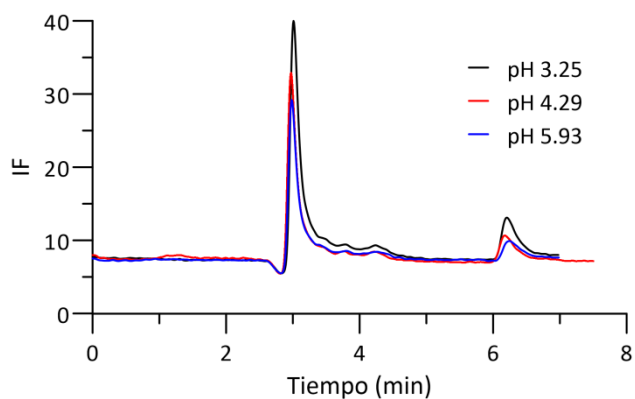
Como se observa, se obtiene una relación lineal entre las áreas de los picos para ambos fotoproductos y la concentración inicial de AF. Una vez que se establezca el sistema semiautomático de irradiación on-line se procederá a un estudio exhaustivo de los parámetros de la regresión lineal para la señal de fluorescencia obtenida y la concentración inicial de AF.

Por lo tanto, en principio podemos aceptar que las señales de fluorescencia generadas por la irradiación responden proporcionalmente a la concentración inicial de AF y, por lo tanto, puede ser un modo adecuado de generar fluorescencia a partir del AF y emplear estas señales para la determinación cuantitativa de AF.

#### 2.2.3.6. Estudio de la influencia de la acidez del medio en el proceso de irradiación

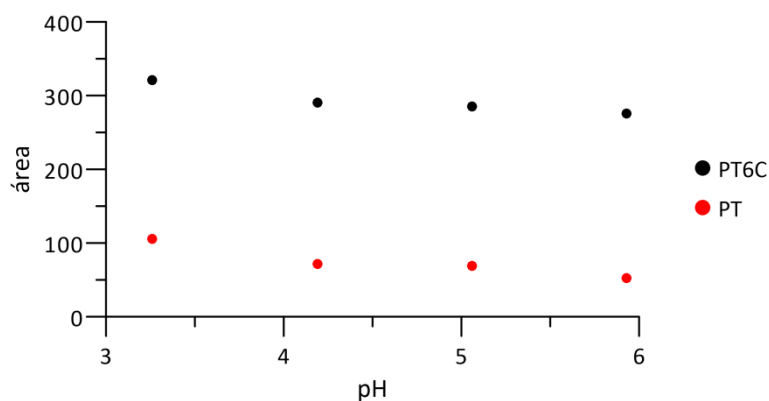
Por último, con vistas a que previsiblemente la separación del AF y sus metabolitos (que es nuestro objetivo final) tuviera que realizarse a pH menores, y con objeto de compatibilizar la naturaleza del medio de fotorreacción con la composición de la fase móvil, se procedió a ensayar varios medios de diferente acidez. Para ello se prepararon disoluciones de AF de  $200 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  a partir de su disolución madre, y se enrasaron con ácido fórmico 2 mM ajustando con NaOH a diferentes valores de pH comprendidos entre 3 y 6. Estas disoluciones se irradiaron durante 3 minutos y posteriormente se diluyeron 10 veces con la fase móvil previamente optimizada de pH 5, para así inyectar una alícuota conteniendo  $20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Los picos observados en todos los casos son los mismos que para los estudios anteriores: PT6C y PT, como se puede observar en la **Figura 2.13**. No se observa la aparición de ningún otro fotoproducto adicional a los ya descritos.



**Figura 2.13.** Cromatograma obtenido para disoluciones de AF de 20 ng·mL irradiadas durante 3 minutos a diferentes valores de pH.  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 280 \text{ nm}/440 \text{ nm}$ .

En cuanto al área de los dos picos se produce un ligero aumento para los medios más ácidos,  $\text{pH} < 3.5$ , como se puede observar en la **Figura 2.14**.



**Figura 2.14.** Influencia del pH en el área de los picos 1 y 3. PT6C ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 280/440 \text{ nm}$ ) y PT ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 270/440 \text{ nm}$ ).

### 2.2.3.7. Estudios mediante espectrometría de masas de los fotoproductos del AF

Para confirmar los resultados anteriores y obtener más información sobre otros posibles fotoproductos no fluorescentes, se registraron los espectros de masas de disoluciones de AF sometidas a diferentes tiempos de irradiación, mediante análisis de inyección en flujo en un detector de masas de simple cuadrupolo y posteriormente mediante un espectrómetro de masas de alta resolución (HRMS). En la **Tabla 2.1** se muestran las principales señales  $m/z$  encontradas a los diferentes tiempos de irradiación, la masa calculada y el compuesto asignado a dicha señal. En la **Figura 2.15** se muestra la estructura asignada como más probable así como un esquema de la ruta de fotodescomposición del AF.

Tanto en las muestras no irradiadas, como en las irradiadas durante un periodo de tiempo corto, la señal  $m/z$  más abundante fue la correspondiente a 464.1 (compuesto I), el cual corresponde al aducto de sodio del ácido fólico  $[M+Na]^+$ . Además, como se puede observar, se encontró un ion con una  $m/z$  de 295.1  $[M]^+$ , el cual representa la pérdida de la unidad de glutamato (compuesto II). Es importante remarcar que este compuesto estaba presente también en las disoluciones recién preparadas de AF.

Cuando el tiempo de irradiación aumentó a 6 minutos se identificaron nuevos picos:  $m/z$  120.1, que corresponde a la pérdida tanto de la unidad de pteridina como de glutamato, resultando en el ácido p-aminobenzóico (PABA) (compuesto III). Además en el mismo espectro se encontró un ion  $[M+H]^+$  de  $m/z$  192.0 y otra señal de  $m/z$  214.0 correspondiente a su aducto de sodio  $[M+Na]^+$ , las cuales fueron asignadas al PT6F (compuesto IV). Por último se encontró otro nuevo fotoproducto con  $m/z$  289, que representa el aducto de sodio de la pérdida de la unidad de pteridina en la molécula de AF, dando lugar al ácido p-aminobenzoil-L-glutámico (pABGA) ( $C_{12}H_{14}N_2O_5$ ) (compuesto V).

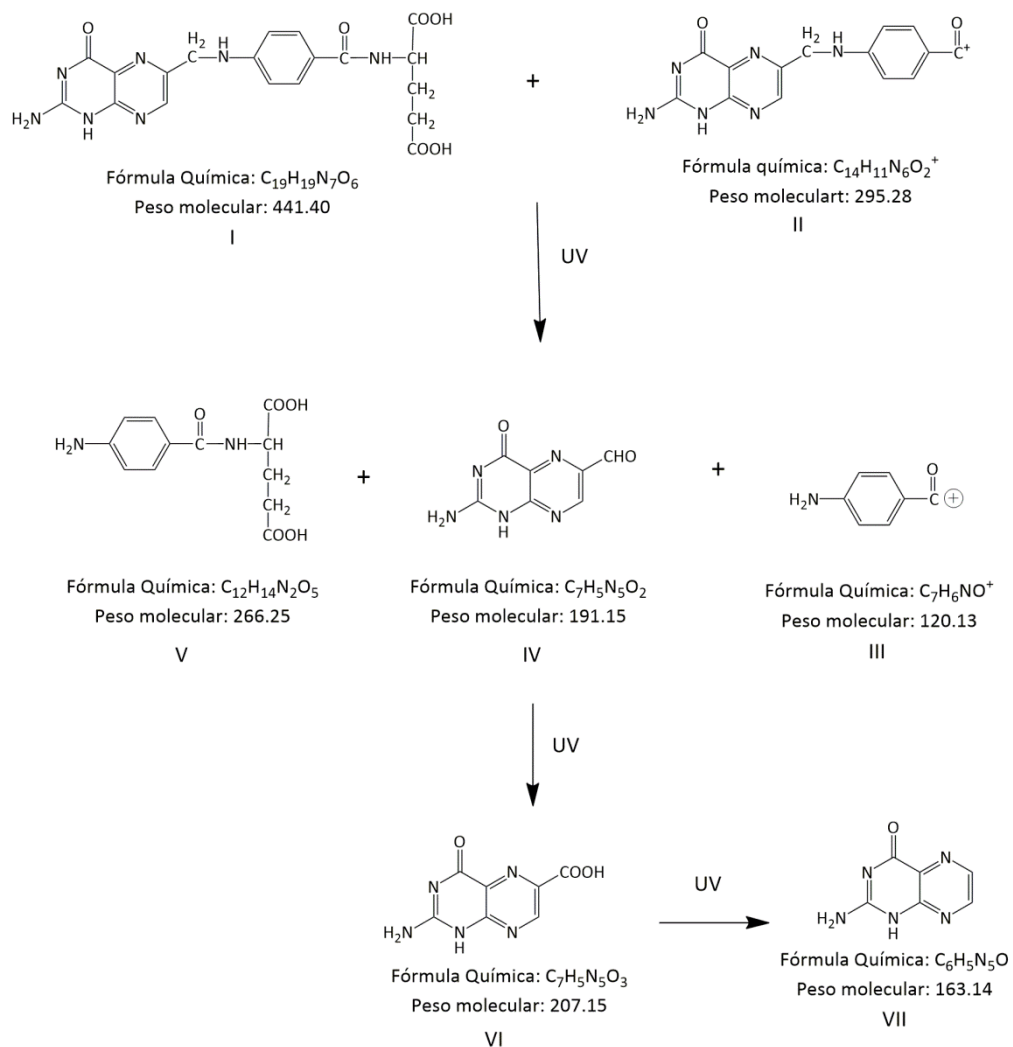
Para tiempos de irradiación mayores, los picos de  $m/z$  correspondientes al AF (compuesto II) y al PT6F (compuesto IV) desaparecen y se observa la formación de dos nuevos fotoproductos. Así, se observa el ion  $[M+H]^+$  de  $m/z$  208.0, su aducto de sodio  $[M+Na]^+$  de  $m/z$  230.0 y su aducto disodio  $[M+2Na]^+$  de 252.0 debido a la formación de PT6C (compuesto VI) a partir del PT6F como se describe en la bibliografía [1]. Además se observan las señales del ión  $[M+H]^+$  de  $m/z$  164.0 y su aducto  $[M+Na]^+$  de  $m/z$  186.0 debido a la generación de PT (compuesto VII).

Estos resultados están en concordancia con estudios previos en los cuales se expone que los principales fotoproductos del AF son PABA, pABGA, PT6F y PT6C [2,5–7].

**Tabla 2.1.** Datos de espectrometría de masas para el AF a diferentes tiempos de irradiación.

Tiempo de irradiación	m/z (MS)	m/z (HRMS)	Fórmula empírica ión molecular	Masa calculada ( $\Delta$ ppm)	ion	Compuesto
0'-30''	295.1	295.0949	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	295.0935 (1.87)	[M] <sup>+</sup>	II
	442.2	442.1483	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	442.1475 (1.79)	[M+H] <sup>+</sup>	I
	464.1	464.1299	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> NaO <sub>6</sub>	464.1295 (0.97)	[M+Na] <sup>+</sup>	I
	486.0	486.1122	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> N <sub>7</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	486.1114 (1.66)	[M+2Na] <sup>+</sup>	I
6'	120.1	120.0450	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> NO	120.0449 (0.51)	[M] <sup>+</sup>	III
	192.0	192.0517	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	192.0521 (2.34)	[M+H] <sup>+</sup>	IV
	214.0	214.0346	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub> NaO <sub>2</sub>	214.0341 (2.36)	[M+Na] <sup>+</sup>	IV
	289.0	289.0800	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>5</sub>	289.0800 (0.14)	[M+Na] <sup>+</sup>	V
	295.1	295.0931	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	295.0943 (4.23)	[M] <sup>+</sup>	II
	442.2	442.1428	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	442.1475 (10.8)	[M+H] <sup>+</sup>	I
	464.1	464.1286	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> NaO <sub>6</sub>	464.1294 (1.83)	[M+Na] <sup>+</sup>	I
	486.0	486.1099	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> N <sub>7</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	486.1114 (3.07)	[M+2Na] <sup>+</sup>	I
20'	120.1	120.0450	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> NO	120.0449 (0.51)	[M] <sup>+</sup>	III
	164.0	164.0570	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>5</sub> O	164.0572 (1.43)	[M+H] <sup>+</sup>	VII
	186.1	186.0393	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub> NaO	186.0392 (0.65)	[M+Na] <sup>+</sup>	VII
	208.0	208.0464	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	208.0471 (3.19)	[M+H] <sup>+</sup>	VI
	230.0	230.0289	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub> NaO <sub>3</sub>	230.0290 (0.47)	[M+Na] <sup>+</sup>	VI
	252.0	252.0107	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> N <sub>5</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	252.0109 (1.00)	[M+2Na] <sup>+</sup>	VI
	289.0	289.0800	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>5</sub>	289.0800 (0.14)	[M+Na] <sup>+</sup>	V
	459.2	459.1534	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>	459.1502 (6.86)	[M+H+H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	I

## 2. Folatos: estudios de fotoirradiación

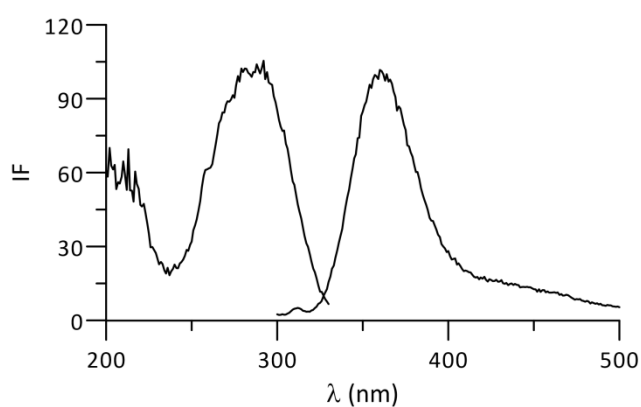


**Figura 2.15.** Esquema de la ruta de fotodescomposición del AF basada en los datos de espectrometría de masas.

A continuación y aplicando una sistemática similar se llevaron a cabo estudios de fotoirradiación del THF y del 5MTHF.

#### 2.2.4. Comportamiento fotoquímico del THF

Con respecto al comportamiento fotoquímico del THF no se han encontrado datos en la bibliografía. Para estudiar su comportamiento, en primer lugar, se registraron los espectros de excitación y emisión de disoluciones acuosas del THF a pH 5, con objeto de establecer las características espectrales del THF en la fase móvil empleada en el seguimiento cromatográfico de la irradiación. En la **Figura 2.16** se puede observar que el THF posee un máximo de excitación a 292 nm y un máximo de emisión a 360 nm, característico de las pteridinas en su forma reducida.



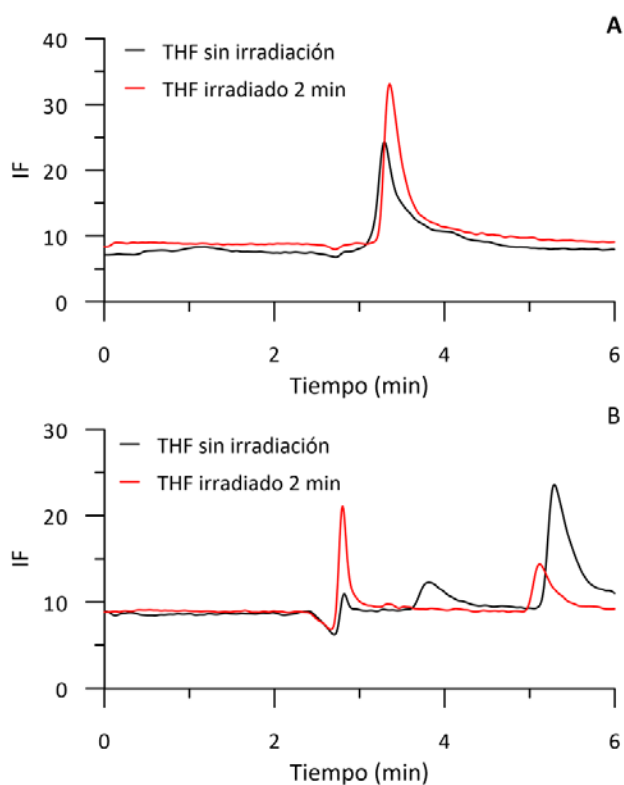
**Figura 2.16.** Espectro de excitación y emisión de THF ( $3.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) a pH=5. Voltaje fotomultiplicador 700 V; rendijas = 5/5 nm; Velocidad de barrido =  $10 \text{ nm}\cdot\text{seg}^{-1}$ .

Para el seguimiento cromatográfico del proceso de fotoirradiación se seleccionó una  $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$  y modo multiemisión a  $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$  y  $440 \text{ nm}$ , longitudes de onda correspondientes al THF y a las posibles pteridinas formadas como fotoproductos.



### 2.2.4.1. Asignación de los fotoproductos fluorescentes

Para este estudio se prepararon disoluciones de  $30 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de THF en ácido fórmico 2 mM (pH 5)/ACN (97:3, v:v) y se inyectaron en el cromatógrafo sin irradiar e irradiadas durante 2 minutos. Los cromatogramas obtenidos se presentan en la **Figura 2.17** a las dos longitudes de onda de emisión seleccionadas, excitando a 280 nm.

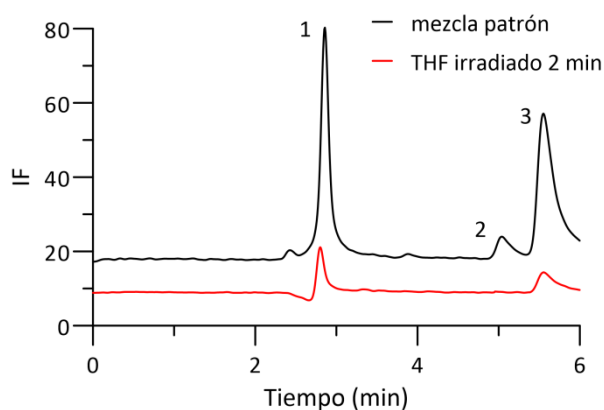


**Figura 2.17.** Cromatograma de THF  $30 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  sin irradiar e irradiado durante 2 min.  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 280/360 \text{ nm}$  (A) y  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 280/440 \text{ nm}$  (B).

Como se puede observar en el cromatograma obtenido, a partir de la disolución sin irradiar a 360 nm (**Figura 2.17 A**) aparece un pico situado a 3.2 minutos, correspondiente al THF, de escasa intensidad de fluorescencia. Por otro lado, a 440 nm se observan tres picos, a 2.8, 3.9 y 5.1 minutos, que nos muestra que, como se podría predecir, y debido a la tendencia a la oxidación del THF, aparecen productos de degradación ya desde la preparación de las muestras. Estos productos de degradación presentan características espectrales y tiempo de retención compatibles con las estructuras pteridínicas consideradas.

Se irradió esta misma disolución un tiempo de 2 minutos y se observó que a 360 nm aparece un mismo pico de mayor intensidad y ligeramente desplazado hacia tiempos mayores, correspondiente a un compuesto al cuál denominaremos THF\*. A 440 nm se puede observar que solo aparecen dos picos, el correspondiente a 2.8 minutos, cuya área aumenta considerablemente y el pico a 5.1 minutos cuya área disminuye y no se aprecia el pico que aparecía a 3.9 minutos en la disolución recién preparada.

Se procedió a comparar los cromatogramas anteriores con los de los patrones pteridínicos en las mismas condiciones. Los resultados parecen corroborar la presencia de PT6C (pico 1) y PT (pico 3).



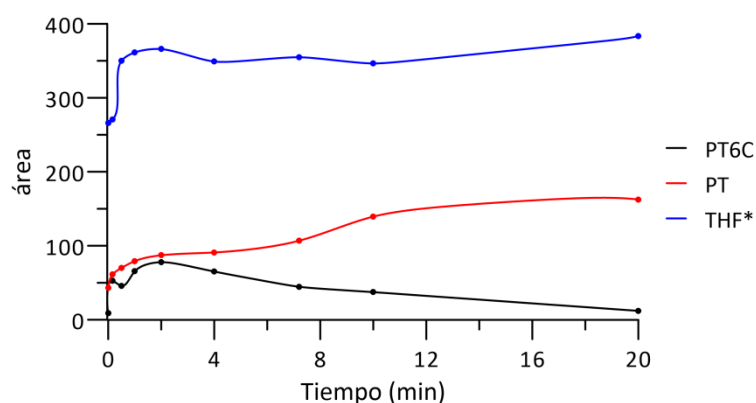
**Figura 2.18.** Cromatograma de una disolución de THF ( $30 \text{ ng mL}^{-1}$ ) irradiada durante 2 min y de un patrón conteniendo de PT, PT6F y PT6C ( $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 280/440 \text{ nm}$ .

1: PT6C, 2: PT6F, 3: PT

### 2.2.4.2. Influencia del tiempo de irradiación en el THF

Se procedió a estudiar la influencia del tiempo de irradiación en el perfil de los cromatogramas obtenidos a partir de una disolución de THF de  $30 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  enrasada con fase móvil a pH 5. Para ello se inyectaron alícuotas de 5 mL irradiadas durante diferentes tiempos. Para todos los tiempos de retención se observaron los mismos picos cromatográficos.

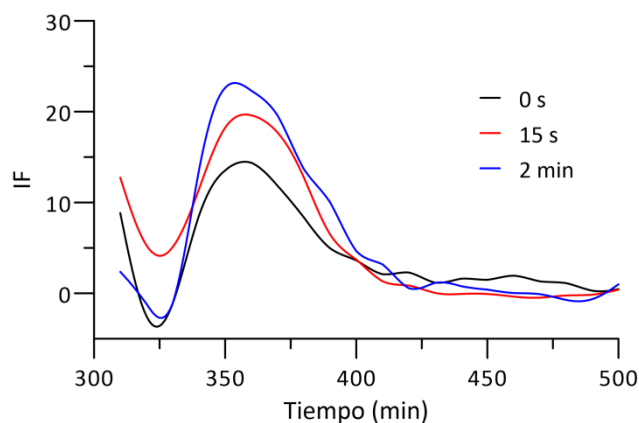
Cuando se representan las áreas de los picos obtenidos frente al tiempo de irradiación obtenemos la **Figura 2.19**:



**Figura 2.19.** Variación de la señal de fluorescencia del THF\* y otros fotoproductos con el tiempo de irradiación.

$\lambda_{\text{ex}} 280 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} 360 \text{ nm}$  (THF\*),  $\lambda_{\text{exc}} 280 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} 440 \text{ nm}$  (PT6C) y  $\lambda_{\text{exc}} 270 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} 440 \text{ nm}$  (PT6C).

Se observa que la fluorescencia del pico correspondiente al THF\* aumenta ligeramente con el tiempo de irradiación durante un periodo de 1 minuto y permanece prácticamente constante para tiempos de irradiación superiores. Además, cuando se comparan los espectros de este pico a diferentes tiempos se observa que los espectros son similares (**Figura 2.20**). Esto parece indicar que el principal fotoproducto generado es un producto de características estructurales muy similares al THF.



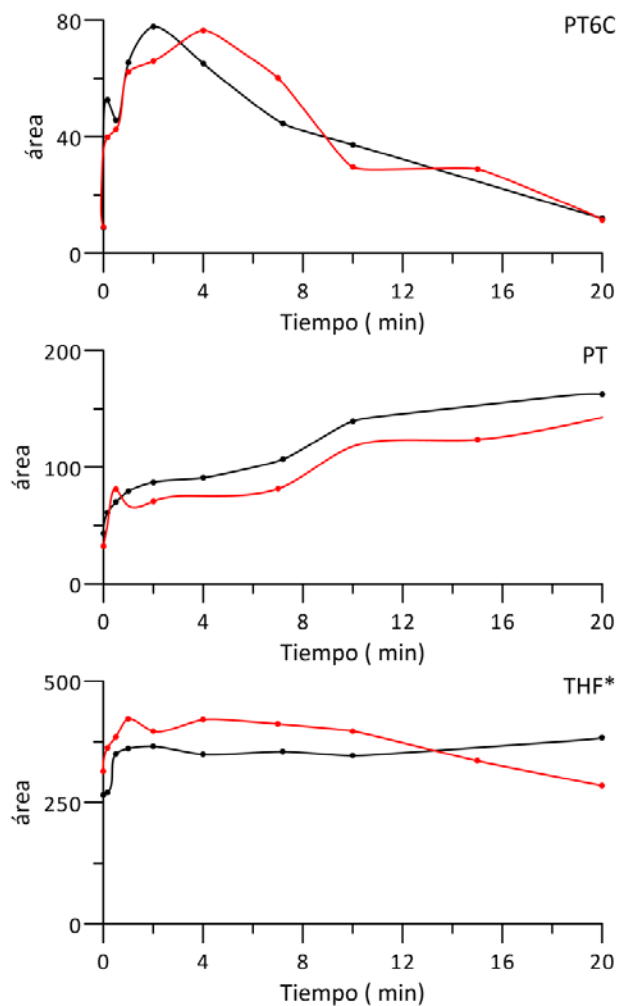
**Figura 2.20.** Espectros del pico obtenido a  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$  280 / 360 nm a diferentes tiempos de irradiación.

Se podría pensar, que de forma similar a lo que ocurre en el AF, dicho producto se genera por fotólisis de la cadena de p-aminobenzoilglutámico. Está descrito que la presencia dicha cadena produce un quenching de fluorescencia y es la responsable del bajo rendimiento cuántico en el caso de las pteridinas conjugadas en comparación con las no conjugadas.

En el caso de los fotoproductos pteridínicos formados se observa que el pico correspondiente al PT aumenta al aumentar el tiempo de irradiación y que el del PT6C aumenta cuando es irradiado hasta que alcanza su área máxima a los 2 minutos de irradiación para después ir desapareciendo a medida que aumenta el tiempo de irradiación.

#### 2.2.4.3. Influencia de la radiación UV en presencia de $N_2$

Al igual que en el caso del AF se estudió el comportamiento de la irradiación sobre el THF en presencia de  $N_2$  haciendo pasar por una disolución similar a la empleada en el estudio anterior una corriente de  $N_2$  de forma continuada durante la irradiación. En la **Figura 2.21** se representan las señales correspondientes al pico del THF\* y de los fotoproductos pteridínicos cuando el THF es irradiado en presencia y en ausencia de nitrógeno. Para este compuesto, la irradiación en ausencia de  $O_2$  no tiene un efecto notable. Se observa una cinética más lenta en la formación del PT6C.

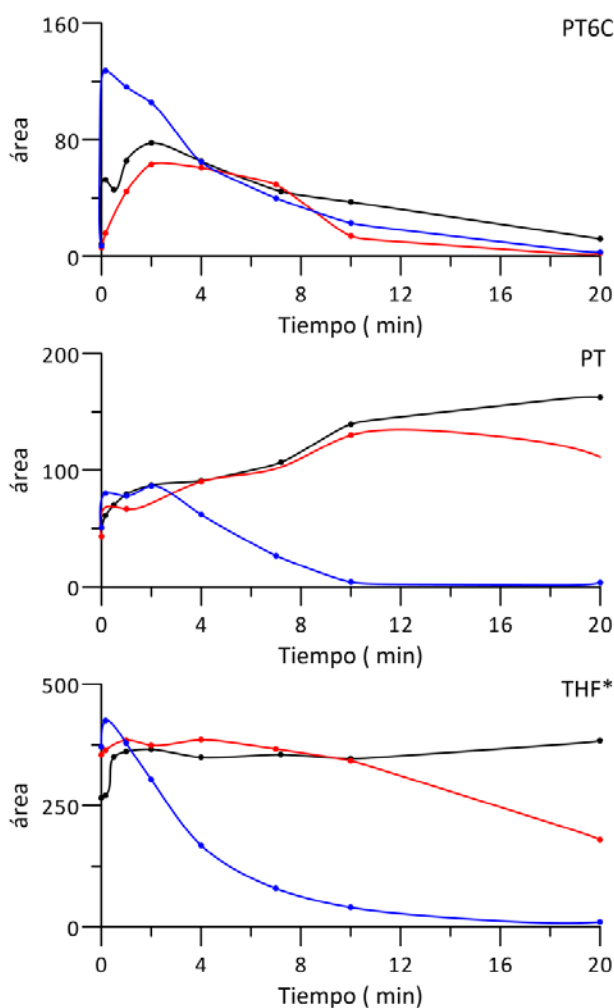


**Figura 2.21.** Variación de la señal de fluorescencia del THF ( $30 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) en función del tiempo de irradiación en presencia (rojo) y ausencia (negro) de corriente de  $\text{N}_2$ . THF\* ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 280/360 \text{ nm}$ ), PT6C ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 280/440 \text{ nm}$ ) y PT ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 270/440 \text{ nm}$ ).

#### 2.2.4.4. Influencia de la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la fotoirradiación del THF

Se estudió el efecto de la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> añadiendo a las disoluciones de THF un 0.0016 % y un 0.011 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, al igual que se realizó para el AF

En la **Figura 2.22** se representa el área de los picos correspondientes a THF\*, PT6C y PT, en función del tiempo de irradiación y para las diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figura 2.22.** Influencia del tiempo de irradiación en la señal de fluorescencia en presencia de diferentes porcentajes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

THF\* ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280/360$  nm), PT6C ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280/440$  nm) y PT ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 270/440$  nm).  
 0 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (negro), 0.0016 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (rojo), 0.011 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (azul).

Cuando se comparan los cromatogramas obtenidos para muestras irradiadas en presencia y ausencia de peróxido, se observan diferencias significativas en la descomposición de los fotoproductos formados. En el caso del THF\*, el pico aumenta inicialmente para decaer rápidamente para 0.011% de peróxido. Un comportamiento similar se observa en el caso del PT6C ya que para tiempos muy cortos de irradiación la presencia de peróxido favorece su formación pero la señal decae bruscamente al aumentar el tiempo de irradiación. Para el PT también se favorece claramente la cinética de descomposición.

Podemos concluir que la presencia de trazas de peróxido inicialmente favorece la formación de las especies oxidadas tales como PT6C, pero incrementan notablemente la velocidad de descomposición de las mismas, previsiblemente por fotólisis.

### **2.2.4.5. Estudio de la influencia de la acidez del medio en la irradiación del THF**

Se prepararon disoluciones de  $300 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de THF a partir de la disolución madre de éste y se enrasaron con ácido fórmico 2 mM. El pH se ajustó a pH 3.26, 4.22 y 6.40 con NaOH. Estas disoluciones se irradiaron durante 3 minutos y posteriormente se diluyeron alícuotas 1/10 con la fase móvil de pH=5.

Los cromatogramas obtenidos a estos tres valores de pH son similares, en todos se observan los mismos picos: a 360 nm se observa el pico del THF\* y a 440 nm se observan los picos de los fotoproductos PT6C y PT. Es de destacar el incremento de señal obtenido a pH 4.22, tanto para PT6C como para PT.

#### 2.2.4.6. Estudios de espectrometría de masas de los fotoproductos del THF

Al igual que en el caso del AF, también se obtuvieron los espectros de masas de una disolución sin irradiar y de disoluciones irradiadas durante diferentes periodos de tiempo. Además, también se registraron espectros de masas de disoluciones a las que se les pasó una corriente de nitrógeno durante su preparación e irradiación. Las principales señales  $m/z$  obtenidas tanto en presencia como en ausencia de  $N_2$ , así como la asignación estructural realizada se muestran en la **Tabla 2.2**. Además, en la **Figura 2.23** se propone una posible ruta de fotodescomposición del THF compatible con los resultados obtenidos.

El THF es muy sensible a la oxidación del aire y como se puede observar en la **Tabla 2.2**, no se puso asignar ninguna señal correspondiente al ion molecular en la disolución no irradiada y preparada en presencia de aire, lo cual indica la inestabilidad de esta disolución. Sin embargo, se encontraron señales del ion  $[M+H]^+$  de  $m/z$  166.1 y de un posible aducto con sodio de  $m/z$  188.1. Los valores de  $m/z$  nos indican la formación de un anillo pteridínico que podría ser el 7,8-dihidropterin (compuesto IX). Además se observó una  $m/z$  de 289.1, como en el caso del AF, correspondiente al aducto de sodio del compuesto V. Cuando se irradia esta disolución, se observa que estos compuestos no desaparecen y que se forma un nuevo compuesto de  $m/z$  120.1, que corresponde con el compuesto III que ha sido asignado a PABA.

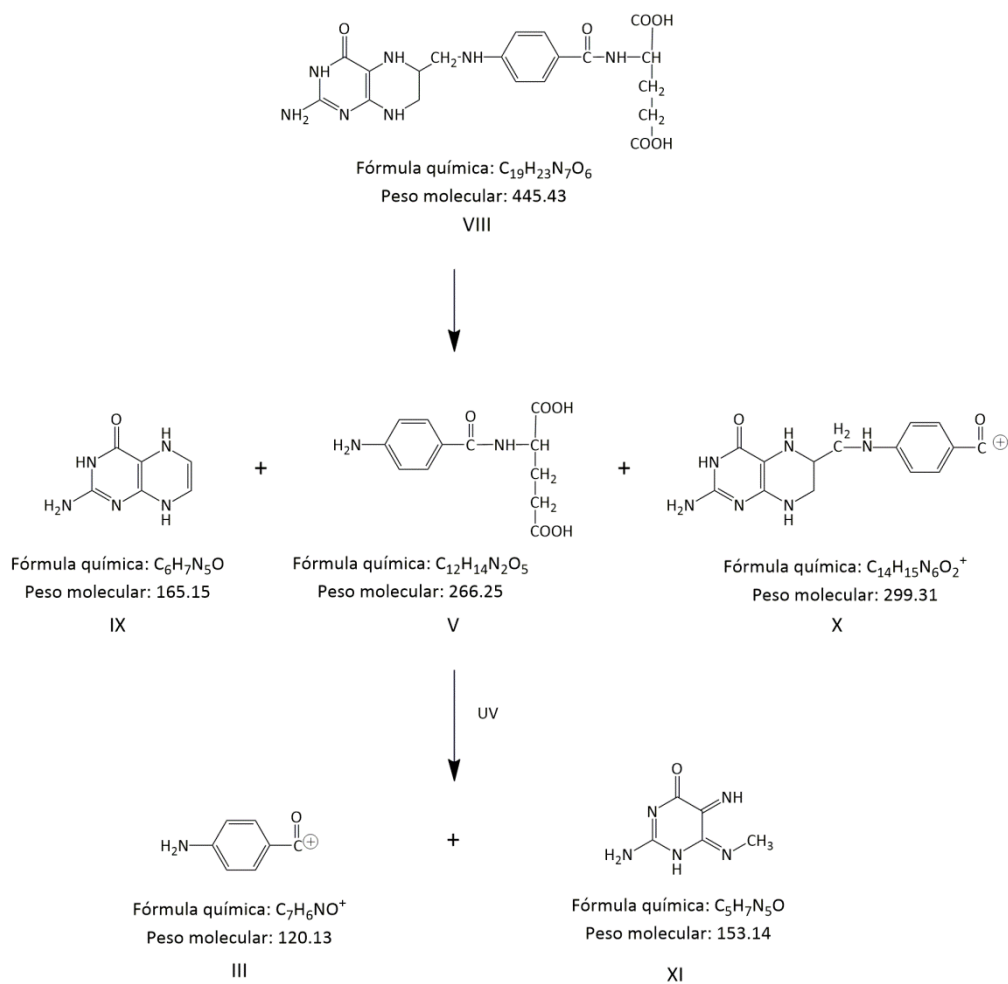
Sin embargo, cuando las disoluciones fueron preparadas en presencia de una corriente de nitrógeno e inmediatamente analizadas se observaron señales de  $m/z$  446.2 y  $m/z$  468.1 del ion  $[M+H]^+$  y  $[M+Na]^+$  respectivamente, que pertenecen al THF (compuesto VIII). Esto indica que en ausencia de aire, las disoluciones de THF son más estables. En el espectro de esta disolución también se encontró una  $m/z$  de 299.1  $[M]^+$  (compuesto X) que representa la pérdida de la unidad de glutamato, de forma similar al compuesto II en el caso del AF. Además, también se encontraron señales de los iones con  $m/z$  166.1, 188.1 y 289.1 de igual manera que en el espectro de la disolución en presencia de oxígeno.

Para tiempos de irradiación elevados, las señales del THF (compuesto VIII) y del compuesto X desaparecen y aparecen dos nuevos compuestos: un ion  $[M]^+$  con  $m/z$  120.1 (compuesto III) y un ión  $[M+H]^+$  con  $m/z$  154.1, que es consistente con la estructura del compuesto XI cuya estructura se muestra en la **Figura 2.23**.



**Tabla 2.2.** Datos de espectrometría de masas para el THF a diferentes tiempos de irradiación.

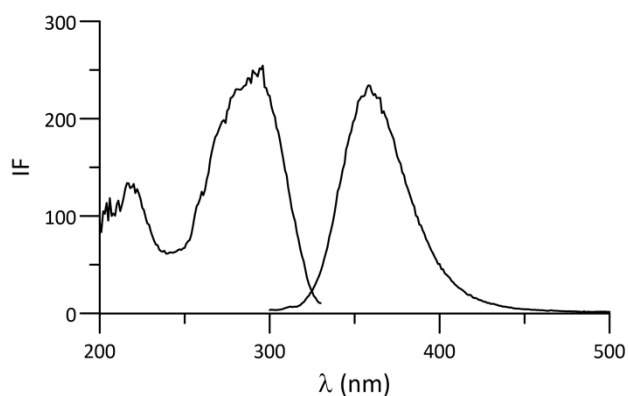
Tiempo de irradiación	Sin N <sub>2</sub>	Con N <sub>2</sub>	m/z (HRMS)	Fórmula empírica ion molecular	Masa calculada (Δ ppm)	ion	compuesto
	m/z (MS)						
0-30''	166.1	166.1	166.0725	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>5</sub> O	166.0729 (2.31)	[M+H] <sup>+</sup>	IX
	188.1	188.1	188.0543	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N <sub>5</sub> NaO	188.0548 (2.81)	[M+Na] <sup>+</sup>	IX
	289.0	289.1	289.0800	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>5</sub>	289.0800 (0.14)	[M+Na] <sup>+</sup>	V
		299.1	299.1363	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	299.1256	[M] <sup>+</sup>	X
		446.2	446.1786	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	446.1788 (0.46)	[M+H] <sup>+</sup>	VIII
		468.1	468.1603	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>7</sub> NaO <sub>6</sub>	468.1608 (0.96)	[M+Na] <sup>+</sup>	VIII
6'		120.1	120.0449	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> NO	120.0449 (0.32)	[M] <sup>+</sup>	III
		154.1	154.0730	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> N <sub>5</sub> O	154.0729 (0.75)	[M+H] <sup>+</sup>	XI
	166.1	166.1	166.0726	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>5</sub> O	166.0729 (2.31)	[M+H] <sup>+</sup>	IX
	289.1	289.1	289.0795	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>5</sub>	289.0800 (1.87)	[M+Na] <sup>+</sup>	V
20'		120.1	120.0449	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> NO	120.0449 (0.32)	[M] <sup>+</sup>	III
		154.1	154.0730	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> N <sub>5</sub> O	154.0729 (0.75)	[M+H] <sup>+</sup>	XI
	166.1	166.1	166.0726	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>5</sub> O	166.0729 (2.31)	[M+H] <sup>+</sup>	IX
	289.1	289.1	289.0795	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>5</sub>	289.0800 (1.87)	[M+Na] <sup>+</sup>	V



**Figura 2.23.** Esquema de la ruta de fotodescomposición del THF basada en los datos obtenidos de espectrometría de masas.

### 2.2.5. Comportamiento fotoquímico del 5MTHF

Se registraron los espectros de excitación y emisión de una disolución acuosa de 5MTHF a pH=5 (**Figura 2.24**) pudiéndose observar que presenta un máximo de excitación a 294 nm y uno de emisión a 360 nm, longitud de onda esta última mucho más baja que la de 440 nm observada en el AF. Este hecho es debido al estado reducido del anillo pirazínico condensado. Sin embargo, presenta un rendimiento cuántico de fluorescencia notablemente superior al THF, lo cual parece indicar el papel fundamental que juegan los sustituyentes (sustituyente metilo en posición N5 en este caso), en las características fluorescentes de estos compuestos.

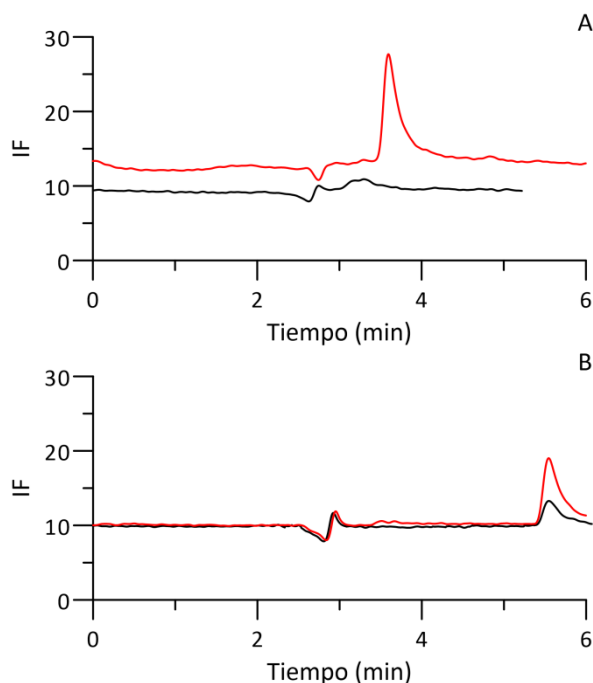


**Figura 2.24.** Espectros de excitación y emisión de 5MTHF ( $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) a pH 5. Voltaje fotomultiplicador 600 V; rendijas = 5/5 nm; velocidad de barrido =  $10 \text{ nm}\cdot\text{seg}^{-1}$ .

Por lo tanto, y considerando que se pudieran formar fotoproductos tipo pteridinas como en los folatos previamente estudiados, se seleccionó trabajar en modo multiemisión a  $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 360$  y  $440 \text{ nm}$ , correspondientes al 5MTHF y a los posibles compuestos pteridínicos que se pudieran formar.

### 2.2.5.1. Influencia de la radiación ultravioleta en la fluorescencia del 5MTHF

Se prepararon muestras conteniendo  $300 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de 5MTHF a partir de la disolución madre, enrasando con la fase móvil a pH 5 y se inyectaron en el cromatógrafo alícuotas de la misma sin irradiar e irradiadas durante 2 minutos. Los cromatogramas obtenidos se muestran en la **Figura 2.25**.



**Figura 2.25.** Cromatogramas de una disolución de 5MTHF ( $300 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) sin irradiar (negro) e irradiado durante 2 min (rojo);  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 280/360 \text{ nm}$  (A) y  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 280/440 \text{ nm}$  (B).

Cuando la señal se cromatográfica se monitoriza a 360 nm (excitando a 280 nm), en la muestra sin irradiar no se observa ninguna señal apreciable. Sin embargo, en el cromatograma correspondiente a la disolución de 5MTHF irradiada durante 2 minutos aparece un pico a  $t_R$  3.8 minutos.

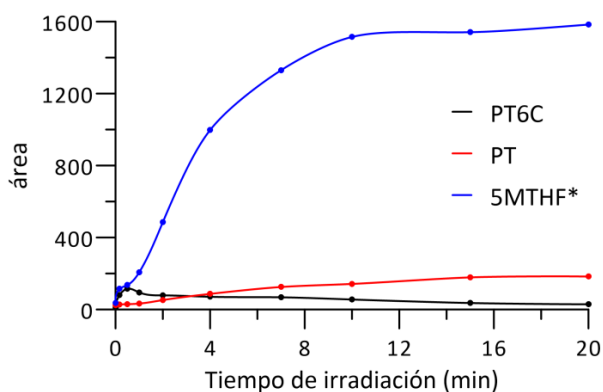
Esto nos indica la formación de un nuevo compuesto a partir del 5MTHF que aparece prácticamente al mismo tiempo y de naturaleza no aromática en el segundo anillo condensado, al cual denominaremos 5MTHF\*. La discusión sobre la naturaleza del mismo se expondrá más adelante.

Además, a 440 nm observamos que aparecen un pico de baja intensidad en la disolución sin irradiar a 2.9 minutos y un segundo a 5.8 min. Cuando se irradia 2 minutos se observa una mayor intensidad del segundo pico (**Figura 2.25B**). Al comparar el cromatograma de una disolución patrón mezcla de los posibles fotoproductos y el cromatograma a la longitud de onda de emisión de 440 nm de la disolución de 5MTHF irradiada se pueden asignar los fotoproductos fluorescentes pteridínicos formados al PT6C y al PT, igual que en los folatos anteriores.

En cuanto a la influencia del tiempo de irradiación en las áreas de los picos de los fotoproductos originados, como se puede observar en la **Figura 2.26**, el área del PT6C aumenta ligeramente hasta tiempos de irradiación de 30 segundos. Para tiempos superiores el área comienza a disminuir lentamente llegando de nuevo casi al valor inicial cuando la disolución es irradiada 20 minutos. Para el PT el área aumenta a medida que aumenta el tiempo de irradiación hasta los 15 minutos, a partir del cual permanece prácticamente constante.

En la **Figura 2.26** se representa el área de este pico, frente al tiempo de irradiación y se observa que la intensidad de fluorescencia de éste aumenta drásticamente a medida que aumenta el tiempo de irradiación hasta el minuto 10, a partir del cual permanece prácticamente constante.

Teniendo en cuenta las señales obtenidas podemos afirmar que en caso del 5MTHF el producto mayoritariamente formado es el 5MTHF\* apareciendo los derivados pteridínicos como compuestos minoritarios.

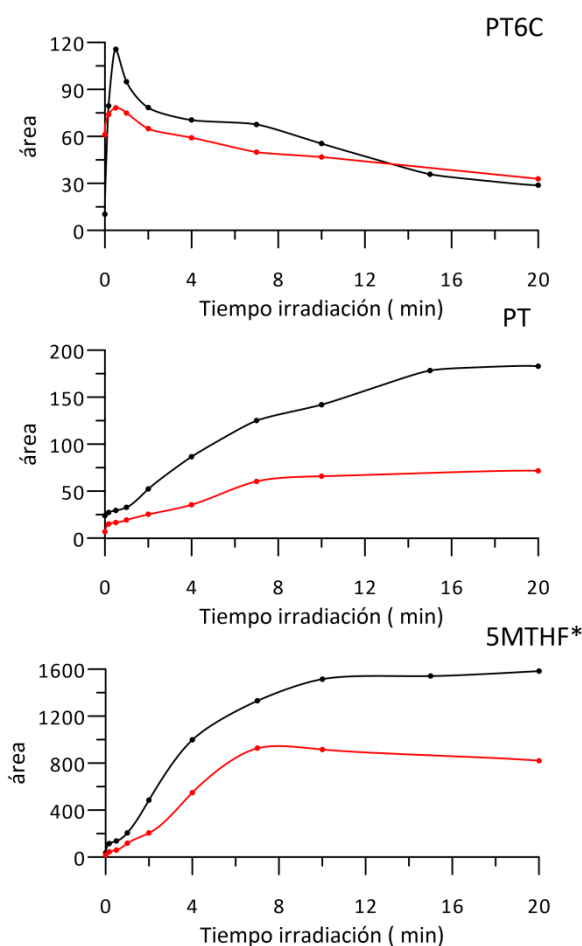


**Figura 2.26.** Variación de la señal de fluorescencia de los fotoproductos del 5MTHF con el tiempo de irradiación.

5MTHF\* ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280/360$  nm), PT6C y PT ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280/440$  nm).

### 2.2.5.2. Influencia de la presencia de nitrógeno

Al hacer pasar por la disolución de 5MTHF una corriente de nitrógeno durante el proceso de irradiación e irradiar durante diferentes tiempos se observó que los cromatogramas tenían la misma forma y aparecían los mismos fotoproductos, luego la irradiación en ausencia de oxígeno no influye en la naturaleza de los fotoproductos formados. Como se muestra en la **Figura 2.27**, en los tres fotoproductos la tendencia que se observa en ausencia y en presencia de nitrógeno es similar, pero que en presencia de oxígeno los fotoproductos se forman en menor proporción sobre todo el PT6C y el 5MTHF\*.



**Figura 2.27.** Variación de la señal de fluorescencia del 5MTHF de 300 ng·mL<sup>-1</sup> con el tiempo de irradiación en ausencia de N<sub>2</sub> (negro) y en presencia de N<sub>2</sub> (rojo). 5MTHF\*( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280/360$  nm), PT6C y PT ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280/440$  nm).

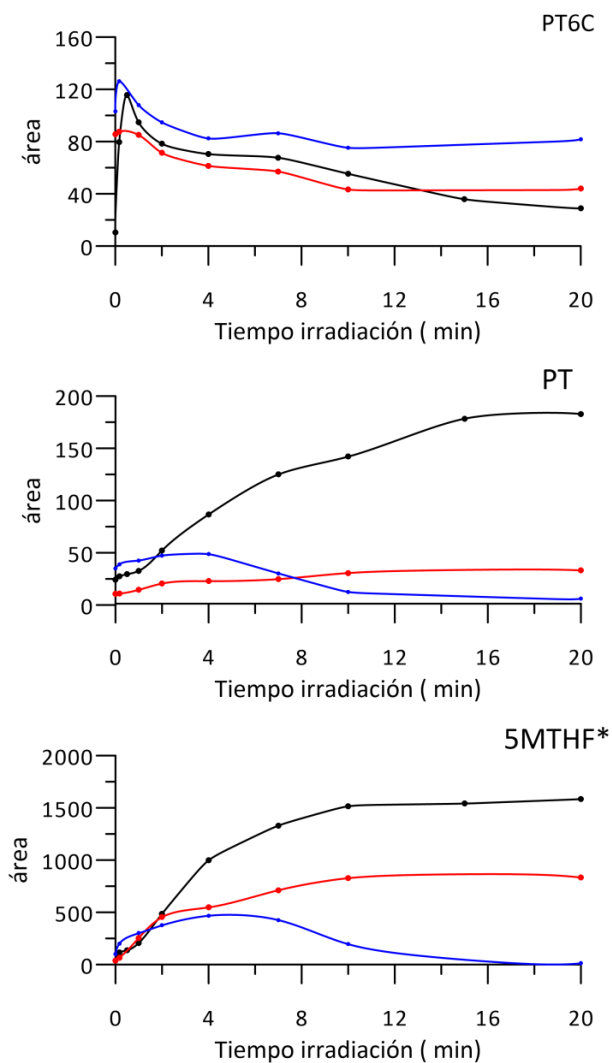
### 2.2.5.3. Influencia de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Para evaluar la influencia de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se lleva a cabo el mismo estudio que con los compuestos anteriores y se observa que los cromatogramas de las tres disoluciones a un mismo tiempo de irradiación son semejantes, luego la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no modifica la naturaleza de los fotoproductos formados aunque las cinéticas de las reacciones si se ven afectadas, como se puede observar en la **Figura 2.28**, donde se representa el área de los picos de los fotoproductos generados frente al tiempo de irradiación para disoluciones con diferentes porcentajes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Para el 5MTHF\*, en el caso de que esté ausente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o que esté presente en una concentración muy baja (0.0016%) la señal de este fotoproducto aumenta con el tiempo de irradiación hasta los diez minutos de irradiación aproximadamente, para después permanecer prácticamente constante, siendo el aumento de la señal mucho mayor en la disolución preparada en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Por otro lado, cuando la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente en la disolución es mayor (0.011%), la señal del 5MTHF\* aumenta hasta los 7 minutos de irradiación, aproximadamente para después disminuir hasta ser prácticamente inapreciable a partir de los 20 minutos de irradiación, debido a su descomposición.

En el caso del PT6C se observa prácticamente el mismo comportamiento que para el caso del THF, siendo la tendencia de la señal de fluorescencia similar para las tres disoluciones. Por último, para el PT el aumento de la concentración de peróxido desfavorece claramente su existencia.



**Figura 2.28.** Influencia del tiempo de irradiación del 5MTHF en la señal de fluorescencia de los fotoproductos en presencia de diferentes porcentajes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 5MTHF\* ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280/360$  nm), PT6C y PT ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280/440$  nm). 0 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (negro), 0.0016 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (rojo), 0.011 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (azul).



#### 2.2.5.4. Estudio de la influencia del pH en la irradiación del 5MTHF

Con el objetivo de estudiar si la acidez del medio afecta al proceso de irradiación del 5MTHF se prepararon disoluciones con diferentes valores de pH: 3.19, 4.07, 5.07 y 6.19. Estas disoluciones se irradiaron durante 3 minutos y posteriormente se diluyeron diez veces con la propia fase. En los cuatro casos los fotoproductos formados son los mismos. Se puede concluir que el 5MTHF\* ve favorecida su formación en medios ligeramente ácidos, pH 4.07 mientras que los fotoproductos pteridínicos presentan una mayor intensidad a valores superiores aproximadamente a pH 6.

#### 2.2.5.5. Estudios de espectrometría de masas de los fotoproductos del 5MTHF

Para confirmar la naturaleza de los fotoproductos fluorescentes e identificar hasta donde sea posible los fotoproductos no fluorescentes se registraron los espectros de masas de disoluciones de 5MTHF irradiadas durante diferentes tiempos como en los casos anteriores.

En la **Tabla 2.3** se muestran las principales señales m/z observadas a los distintos tiempos de irradiación, así como la fórmula empírica asignada al ion. Además en la **Figura 2.30** se puede observar un esquema de la ruta que proponemos del proceso de fotodescomposición del 5MTHF a partir de los datos obtenidos.

Se observa que en las muestras no irradiadas, el ion  $[M+H]^+$  con m/z 460.2 fue el más abundante, el cual corresponde al 5MTHF (compuesto XII). También se detectó su aducto de sodio  $[M+Na]^+$  con m/z 482.2. Además en estas disoluciones no irradiadas o irradiadas durante un período de tiempo muy corto también se encontraron otros dos iones: un  $[M+H]^+$  con m/z 301.1, que se asignó al compuesto XIII y un  $[M]^+$  con m/z 313.1 que corresponde al compuesto que ha perdido la unidad de glutamato (compuesto XIV).

Cuando la disolución de 5MTHF se irradia durante más tiempo, los compuestos XII y XIV desaparecen y se forman nuevos compuestos. Así, se observan señales m/z de 474.2 y 496.1 correspondientes a un ion  $[M+H]^+$  y su aducto de sodio que se ha identificado como el compuesto XVI y una señal de m/z 120.1 que ya había sido asignada anteriormente al compuesto III. Se observa que la abundancia de ambos compuestos aumenta con el tiempo de irradiación, así teniendo en cuenta esto y la estructura asignada el compuesto XVI este compuesto podría ser el responsable de la señal de fluorescencia a 280/360 nm, sin cambios en la longitud de onda cuando la disolución es irradiada.

Además a tiempos de irradiación intermedio se forma otro ion con  $m/z$  180.1 que se ha asignado al compuesto XV, pero que desaparece cuando el tiempo de irradiación aumenta.

Por último, para tiempos de irradiación mayores de 20 minutos aparece el aducto de sodio del compuesto V ( $m/z$  289.1).

El compuesto XIII sería el que hemos denominado anteriormente 5MTHF\*, siendo esta estructura compatible con los tiempos de retención a los que aparece, muy próximos a los del propio 5MTHF y con características espectrales fluorescentes muy similares aunque con un rendimiento cuántico mucho mayor. La inclusión del OH- en posición 4a y del doble enlace pirazínico contribuyen a este aumento. Esta estructura también estaría en consonancia con la propuesta para la degradación de las vitaminas en alimentos por Scott y col [8]. Estos autores establecen la formación del 4(a)hidroxi-5-metildihidrofolato, en nuestro caso se incluye además un doble enlace pirazínico (6-7) como consecuencia de la irradiación proponiéndose por tanto la formación del 4(a)hidroxi-5-metilfolato.

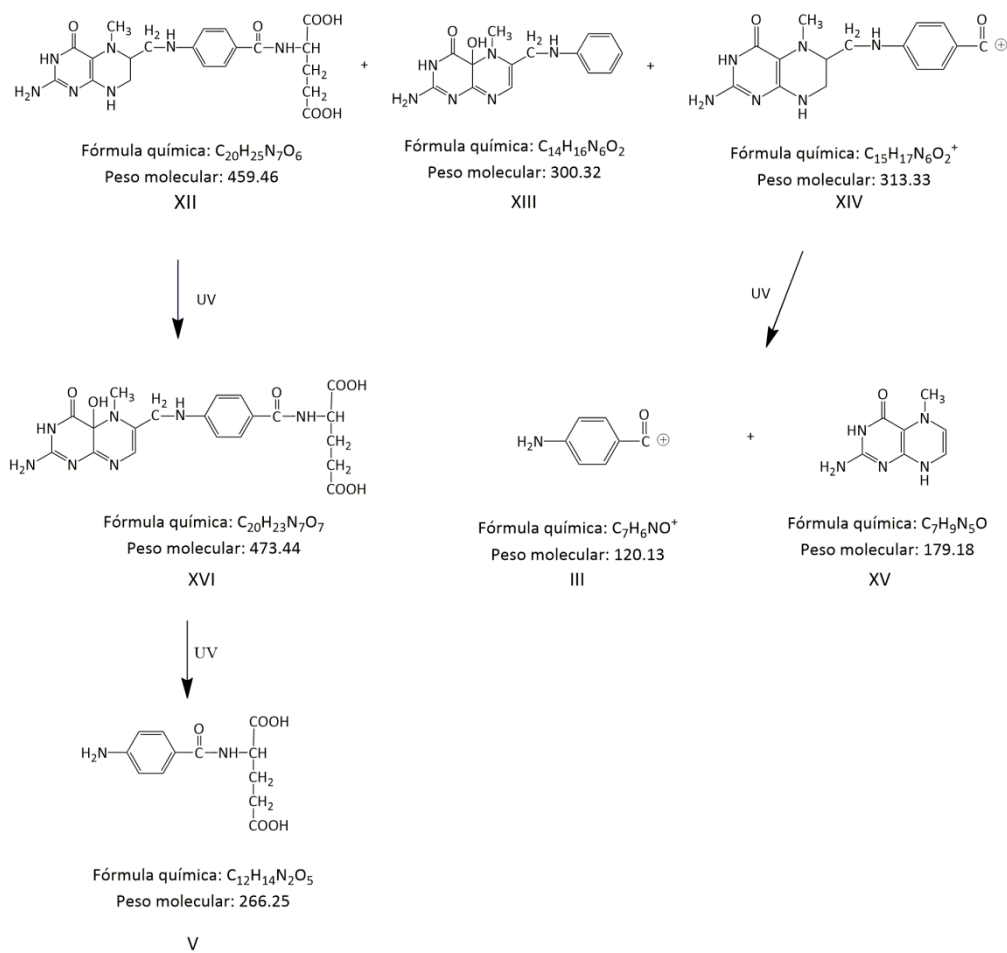
Por otra parte hay que destacar que mediante MS no se han podido asignar señales a las posibles pteridinas formadas, tales como pterin-6-carboxílico o pterin, previamente asignados cromatográficamente con FLD ya que, como vimos en dichos estudios sus contenidos son muy bajos en comparación con el 5MTHF\* y pueden no ser detectables.

2. Folatos: estudios de fotoirradiación

**Tabla 2.3.** Datos de espectrometría de masas para el 5MTHF a diferentes tiempos de irradiación.

Tiempo de irradiación	m/z (MS)	m/z (HRMS)	Fórmula empírica ion molecular	Masa calculada ( $\Delta$ ppm)	ion	compuesto
0-30''	301.1	301.1411	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	301.1412 (0.11)	[M+H] <sup>+</sup>	XIII
	313.1	313.0997	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	313.1413 (0.96)	[M] <sup>+</sup>	XIV
	460.2	460.1949	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	460.1944 (0.93)	[M+H] <sup>+</sup>	XII
	482.2	482.1764	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> N <sub>7</sub> NaO <sub>6</sub>	482.1764 (0.003)	[M+Na] <sup>+</sup>	XII
6'	120.1	120.0458	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> NO	120.0449 (0.51)	[M] <sup>+</sup>	III
	180.1	180.0882	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>5</sub> O	180.0885 (1.43)	[M+H] <sup>+</sup>	XV
	301.1	301.1411	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	301.1412 (0.65)	[M+H] <sup>+</sup>	XIII
	474.2	474.1733	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>	474.1737 (0.88)	[M+H] <sup>+</sup>	XVI
	496.1	496.1548	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> N <sub>7</sub> NaO <sub>7</sub>	208.0471 (3.19)	[M+Na] <sup>+</sup>	XVI
20'	120.1	120.0458	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> NO	120.0449 (7.17)	[M+H] <sup>+</sup>	III
	289.1	289.0831	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>5</sub>	289.0800 (0.14)	[M+Na] <sup>+</sup>	V
	301.1	301.1411	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	186.0392 (0.65)	[M+H] <sup>+</sup>	XIII
	474.2	474.1733	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>	474.1737 (0.88)	[M+H] <sup>+</sup>	XVI
	496.1	496.1548	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> N <sub>7</sub> NaO <sub>7</sub>	208.0471 (3.19)	[M+H] <sup>+</sup>	XVI

Parte II



**Figura 2.30.** Esquema de la ruta de fotodescomposición del 5MTHF basada en los datos de HPLC-MS.

### 2.3. Conclusiones

De los tres folatos estudiados, el 5MTHF es el que presenta mayor rendimiento cuántico de fluorescencia seguido por THF, siendo el AF prácticamente no fluorescente en medio ligeramente ácido (pH 4-6).

Durante el proceso de fotoirradiación, el AF da lugar a dos productos fluorescentes el PT6C que se descompone dando lugar a la formación de PT. Para tiempos de irradiación intermedios ambos compuestos coexisten emitiendo a  $\lambda = 440$  nm.

Los folatos reducidos, THF y 5MTHF, emiten inicialmente a 360 nm y al ser irradiados generan mayoritariamente THF\* y 5MTHF\*, compuestos ambos muy parecidos estructuralmente a sus compuestos padres, con espectros de fluorescencia y tiempos de retención también muy similares a los de partida. Además, se forman dos compuestos pteridínicos PT6C y PT, siendo este último el predominante para tiempos elevados de irradiación y ambos emiten a 440 nm.

La presencia de corriente continua de nitrógeno desfavorece la formación del 5MTHF\* y no afecta notablemente a la del THF\*; por otra parte la presencia de peróxido de hidrógeno en bajas concentraciones favorece la formación de los fotoproductos pero solo a tiempos de irradiación muy cortos (15-30 ") y a tiempos superiores favorece su rápida desaparición. El pH óptimo para la irradiación se sitúa entre 4 y 6 en todos los casos.

El estudio exhaustivo mediante espectrometría de masas ha permitido proponer la existencia de diversos compuestos generados durante el proceso de irradiación. De todos los fotoproductos generados unos presentan características fluorescentes y otros no.

Para posteriores estudios focalizaremos nuestra atención en la obtención de fluorescencia fotoinducida mediante un fotorreactor post-columna en línea.

#### 2.4. Bibliografía

- [1] A.H. Thomas, G. Suárez, F.M. Cabrerizo, R. Martino, A.L. Capparelli, Study of the photolysis of folic acid and 6-formylpterin in acid aqueous solutions, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 135 (2000) 147–154.
- [2] M.K. Off, A.E. Steindal, A.C. Porojnicu, A. Juzeniene, A. Vorobey, A. Johnsson, J. Moan, Ultraviolet photodegradation of folic acid, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 80 (2005) 47–55.
- [3] G. Suárez, F.M. Cabrerizo, C. Lorente, A.H. Thomas, A.L. Capparelli, Study of the photolysis of 6-carboxypterin in acid and alkaline aqueous solutions, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 132 (2000) 53–57.
- [4] A. Jiménez Girón, I. Durán-Merás, A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña, F. Cañada Cañada, A.C. Olivieri, On line photochemically induced excitation-emission-kinetic four-way data. Analytical application for the determination of folic acid and its two main metabolites in serum by U-PLS and N-PLS/residual trilinearization (RTL) calibration, *Anal. Chim. Acta.* 622 (2008) 94–103.
- [5] M.M. Araújo, E. Marchioni, M. Zhao, F. Kuntz, T. Di Pascoli, A.L.C.H. Villavicencio, M. Bergaentzle, LC/MS/MS identification of some folic acid degradation products after E-beam irradiation, *Radiat. Phys. Chem.* 81 (2012) 1166–1169.
- [6] M. Jamil Akhtar, M. Ataullah Khan, I. Ahmad, Identification of photoproducts of folic acid and its degradation pathways in aqueous solution, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 579–588.
- [7] A. Juzeniene, M. Grigalavicius, L.W. Ma, M. Juraleviciute, Folic acid and its photoproducts, 6-formylpterin and pterin-6-carboxylic acid, as generators of reactive oxygen species in skin cells during UVA exposure, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 155 (2016) 116–121.
- [8] J. Scott, F. Rébeillé, J. Fletcher, Folic acid and folates: The feasibility for nutritional enhancement in plant foods, *J. Sci. Food Agric.* 80 (2000) 795–824.

### **3. Análisis de ácido fólico y sus metabolitos en diversas matrices mediante HPLC con detección fluorimétrica y foto-derivatización post-columna en línea**

---





Una vez establecido el comportamiento fotoquímico del ácido fólico (AF) y sus dos principales metabolitos, el ácido tetrahidrofólico (THF) y el 5-metiltetrahidrofólico (5MTHF), se procedió a optimizar un método cromatográfico para la determinación de estos tres compuestos. Para ello, se diseñó un sistema con un fotorreactor acoplado en línea un detector fluorimétrico de registro rápido (FSFD) y un fotorreactor acoplado en línea, con objeto de convertir los folatos en sus derivados fluorescentes, logrando así la sensibilidad adecuada.

El método propuesto se aplicó al análisis de folatos en diversas matrices: cereales, matrices vegetales (tomate y espinacas) y se ensayó en el análisis de muestras de suero humano liofilizado, con objeto de establecer un método útil para diversos tipos de muestras.

#### **3.1. Material y métodos**

##### **3.1.1. Preparación de patrones**

Se prepararon disoluciones patrón de cada folato conteniendo concentraciones comprendidas entre 20-40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  mediante pesada exacta de cada compuesto, disolución en agua ultrapura previamente alcalinizada y posterior neutralización con ácido clorhídrico diluido. Estas disoluciones se prepararon bajo luz reducida y con objeto de preservar su estabilidad fotoquímica se guardaron en pequeñas alícuotas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  y en la oscuridad.

Las disoluciones de trabajo se prepararon por dilución de las disoluciones patrón de los tres analitos justo antes de su uso mediante dilución con la fase móvil.

##### **3.1.2. Instrumentación**

Se empleó un cromatógrafo de líquidos cuyas características se detallan en el Anexo 2, utilizando un detector DAD y otro de fluorescencia de registro rápido (FSFD) en línea. Además entre el detector DAD y el FSFD se situó un reactor fotoquímico consistente en una lámpara de Xenón alrededor de la cual está enrollado un tubo de teflón que permite el paso continuo del fluido. Información más detallada de este sistema se muestra en el Anexo 2, así como un esquema del mismo.

La columna analítica empleada fue una Poroshell 120 EC C18, de 4.6 x 50 mm y 2.7  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, cuya temperatura se fijó a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se inyectaron 5  $\mu\text{L}$  de muestra en el sistema y la temperatura del inyector automático se fijó a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

La elución de los analitos se llevó a cabo en modo isocrático con una fase móvil que consistió en ácido fórmico 2 mM en (pH 4) y ACN, 94:6 (v:v). Estas disoluciones se filtraron previamente a su uso mediante filtros de nylon de 0.22  $\mu\text{m}$  y se desgasificaron en ultrasonido. Se optimizó un gradiente de flujo que durante los primeros 4 minutos fue de 0.4  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , cambiando rápidamente a 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , valor de flujo que se mantuvo durante los siguientes dos minutos y al minuto 6 se volvió a las condiciones iniciales, 0.4  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

El detector fluorescente se programó en modo multiemisión, excitando a 272 nm y cada cromatograma se monitorizó a dos longitudes de onda de emisión ( $\lambda_{\text{em}}$ ), 360 nm para la dererminación de THF y 5MTHF y 440 nm para la determinación del AF.

Para el control del instrumento, la adquisición y el tratamiento de datos se utilizó el paquete informático CHEMSTATION.

Las curvas de calibración y las figuras de mérito se realizaron mediante el programa ACOC (Anexo 2).

### 3.1.3. Preparación de las muestras

Las muestras analizadas han sido vegetales (espinacas y tomates), cereales y suero humano liofilizado. Las muestras de espinacas congeladas y de tomates frescos fueron obtenidas en un supermercado local y almacenadas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Los cereales de desayuno se compraron en un supermercado y se guardaron a temperatura ambiente,  $20\text{-}22\text{ }^{\circ}\text{C}$  en su paquete original hasta su análisis. El suero analizado fue un suero sintético en forma de liofilizado y reconstituido en agua ultrapura.

El proceso de extracción de las muestras es una etapa ligeramente diferente según se trate de una matriz alimentaria o muestras de suero. Sin embargo en ambos casos se empleó un tampón de extracción denominado HEPES/CHES a pH= 7.85, que consiste en ácido 4-(2-hidroxietil) piperacina-1-etanosulfónico (HEPES) 50 mM y ácido 2-(ciclohexilamino) etanosulfónico (CHES) 50 mM, con 2% (p/v) de ácido ascórbico y de 2-mercaptoetanol 10 mM.

Las muestras de espinacas y tomates se liofilizaron y se molieron previamente a la extracción de los folatos, mientras que las muestras de cereales solamente se sometieron al proceso de molido para obtener la muestra en forma de polvo fino y homogéneo. Posteriormente, 1 g de la muestra molida se mezcló con 20 mL del tampón de extracción en un tubo de centrífuga de 50 mL. Las muestras se agitaron vigorosamente, se calentaron en

un baño de agua hirviendo durante 10 minutos y se enfriaron en hielo inmediatamente. Para la de-conjugación enzimática se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de plasma de rata (liofilizado reconstituido en tampón de extracción) y la mezcla se incubó durante 3 horas en una estufa a 37 °C. Los extractos incubados se calentaron en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos para inactivar la enzima, se enfriaron en hielo y se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  y posteriormente se purificó.

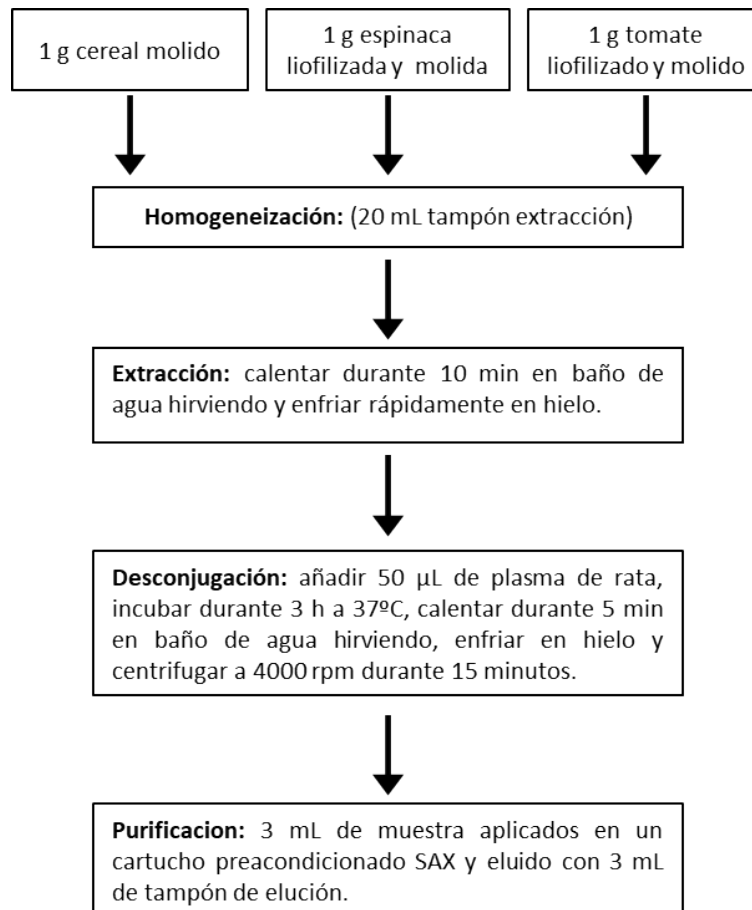
En las muestras de suero, la desproteínización y extracción se realizó siguiendo el procedimiento propuesto por Hart y col. [1], en el que se introdujeron ligeras modificaciones. A 500  $\mu\text{L}$  de suero se añadieron 1.5 mL del tampón de extracción y se calentó durante 10 minutos en agua hirviendo para precipitar las proteínas. Después de ser enfriada en hielo, la muestra se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos. Se separó el sobrenadante y sobre el precipitado se añadieron 1.5 mL adicionales del tampón de extracción, se agitó vigorosamente mediante un Vortex y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Ambos sobrenadantes se combinaron, se filtraron a través de un filtro de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  y posteriormente se purificó.

El proceso de purificación de los extractos fue similar en todos los tipos de muestras y se realizó mediante extracción en fase sólida (SPE) utilizando adsorbentes de intercambio aniónico fuerte (SAX). Se usó un sistema de vacío para la elución a presión reducida. El procedimiento seguido fue el descrito por Jastrebova et al [2] con ligeras modificaciones. Alícuotas de 3 mL de los extractos obtenidos para las diferentes matrices se pasan a través del cartucho SAX, previamente acondicionado con 5 mL de metanol y 5 mL de agua destilada. Posteriormente, para eliminar los compuestos coextraídos desde la matriz, se lavó el cartucho con 3 mL de agua destilada. Finalmente, los analitos se eluyeron lentamente con 3 mL de tampón de elución (0.1 M de acetato de sodio conteniendo 10% (p/v) de cloruro de sodio, 1% (p/v) de ácido ascórbico y 0.1% (v/v) de 2-mercaptoetanol) para los cereales, espinacas y tomate y con solo 1.5 mL en el caso del suero con el objetivo de preconcentrar la muestra.

Hay que remarcar que todos los experimentos se realizaron bajo condiciones de luz reducida para minimizar la posible degradación de los folatos.

Para calcular la concentración de cada folato en la muestra se usó el método de adición patrón, para lo cual se analizaron muestras enriquecidas con cada analito a cuatro niveles de concentraciones entre 100 y 800  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  y se seleccionó como señal analítica el

área de pico obtenida a  $\lambda_{ex/em} = 280/360$  nm para THF y 5MTHF y a  $\lambda_{ex/em} = 280/440$  nm para AF. Un esquema de la preparación de las muestras alimentarias, incluyendo la extracción, el tratamiento enzimático y la purificación se resume en la **Figura 3.1**.



**Figura 3.1.** Esquema general del procedimiento de pretratamiento de las muestras alimentarias para la determinación de folatos.

#### **3.1.4. Efecto matriz**

El estudio del efecto matriz se realizó comparando las pendientes de las curvas de calibrado preparadas en agua ultrapura y en los extractos de cada una de las matrices analizadas (concentraciones entre 200 y 800 ng·mL<sup>-1</sup>), usando el test de la *t* de Student al 95 % de confianza y empleando el programa ACOC.

## 3.2. Resultados y discusión

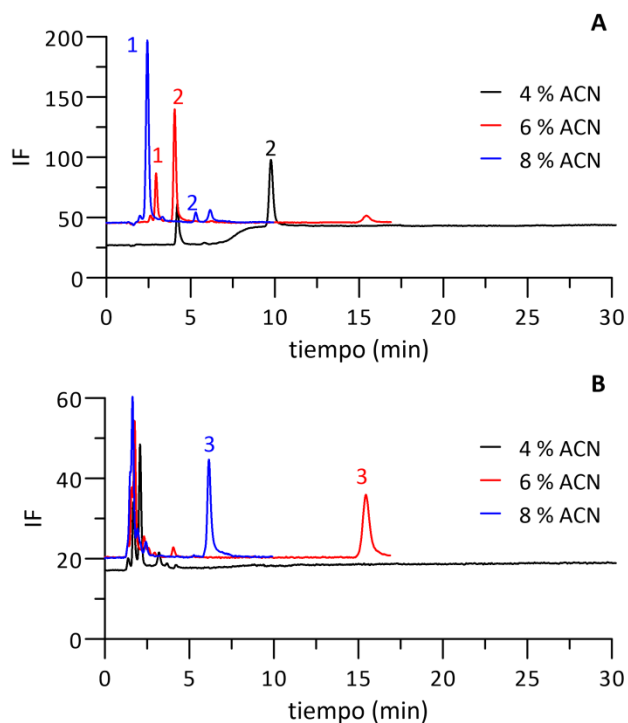
### 3.2.1. Optimización de las condiciones cromatográficas

El objetivo de este estudio es desarrollar un método cromatográfico con fotoderivatización post-columna on-line, donde los folatos que se eluyen de la columna en su forma original, son fotométricamente detectados y después son fototransformados en un fotorreactor situado entre los detectores de DAD y el FSFD. Finalmente los fotoproductos fluorescentes son detectados en el FSFD debido al incremento de la sensibilidad y selectividad de la detección fluorimétrica.

La mayoría de los métodos cromatográficos propuestos anteriormente para el análisis de estos analitos usan fase inversa y llevan a cabo la elución en modo gradiente, como se comentó en la Introducción de esta parte de la Memoria. En estos métodos las fases móviles son normalmente mezclas de disoluciones de ácidos diluidos con pequeñas proporciones de disolventes orgánicos, siendo los componentes más comunes el ácido acético o el ácido fórmico y metanol o acetonitrilo (ACN).

En la reacción de fotoderivatización post-columna es muy importante la composición de la fase móvil, ya que esta participa en el proceso de separación, pero también influye en la foto-reacción y en la detección. En los ensayos previos realizados se comprobó que la fotorreacción postcolumna se desarrolla mejor en medio ácido. Se eligió ácido fórmico debido a su baja señal de fluorescencia cuando se encuentra en presencia de disolventes como los ensayados. En cuanto al disolvente orgánico se comprobó que tanto la velocidad de las fotorreacciones como la señal fluorescente obtenida, eran similares para un mismo porcentaje de metanol o ACN en la fase móvil. Finalmente, se eligió ACN debido a su mayor poder de elución.

Debido a que los folatos muestran un elevado intervalo de valores de polaridad, la proporción de ACN en la fase móvil es un parámetro crítico en la separación cromatográfica de dichos compuestos. Por ello, se estudió la influencia del porcentaje de ACN en la fase móvil en presencia de ácido fórmico 2 mM (pH 3.1) manteniendo la velocidad de flujo constante a  $0.6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . El porcentaje de ACN se varió entre el 4 y 8%, y los cromatogramas obtenidos a 360 y 440 nm se muestran en la **Figura 3.2**.



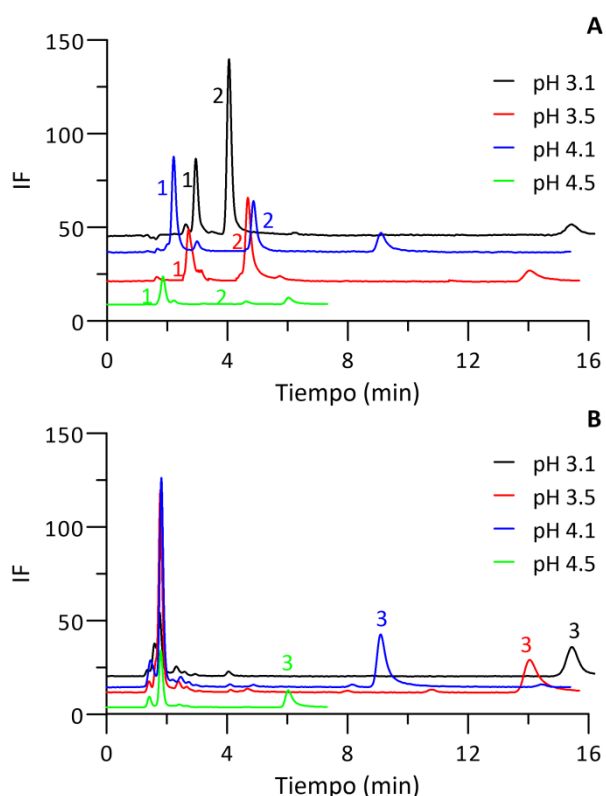
**Figura 3.2.** Influencia del % ACN en la separación cromatográfica de una mezcla de THF\* (1), MTHF\* (2) y AF\* (3).  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280/360$  nm (A) y  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280/440$  nm (B).

\* Representa los correspondientes fotoproductos generados.

Se observa que pequeñas variaciones en el contenido de ACN produce cambios considerables en los tiempos de retención, sobre todo en los analitos menos polares. Como era de esperar, sus tiempos de retención aumentan a medida que el porcentaje de ACN disminuye. El mayor porcentaje de ACN ensayado (8%) produce una elución muy rápida de los fotoproductos del THF (THF\*) eluyendo con el frente, por el contrario, para el menor porcentaje ensayado (4%), los fotoproductos del AF (AF\*) eluyen a un tiempo superior a 30 minutos. Por lo tanto, se decidió fijar un porcentaje intermedio (6%), donde se obtuvo resolución a línea base en menos de 5 minutos para el THF\* y el 5MTHF (5MTHF\*), mientras que el AF\* eluye a los 15 minutos.

Como consecuencia, se estudió la posibilidad de aplicar una elución en gradiente con el objetivo de disminuir el tiempo de retención del AF. Con ninguno de los gradientes ensayados se obtuvieron buenos resultados por lo que se llevó a cabo un estudio de la

influencia del pH para intentar conseguir mejores condiciones en la separación cromatográfica. El efecto del pH se estudió entre pH 3 y 4.5 mediante el uso de diferentes fases móviles compuestas por ácido fórmico 2 mM (variando el pH con hidróxido de sodio) y 6% de ACN, en modo isocrático. En la **Figura 3.3** se muestran los cromatogramas obtenidos, para los diferentes valores de pH.

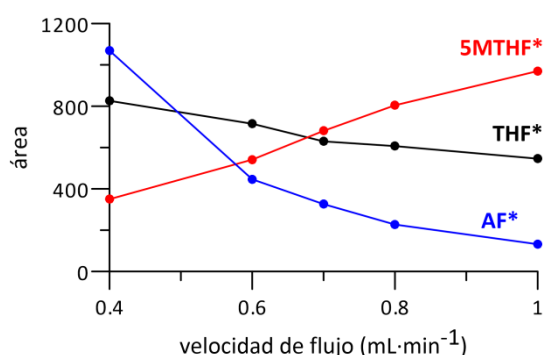


**Figura 3.3.** Cromatogramas obtenidos para una mezcla de THF\* (1), MTHF\* (2) y AF\* (3) usando como fase móvil ácido fórmico 2mM a diferentes pH (94%) y ACN (6%).  
 $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280/360$  nm (A) y  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280/440$  nm (B).

Se puede observar cómo, en general, los tiempos de retención disminuyen a medida que el pH de la fase móvil aumenta, sin embargo, para valores de pH superiores a 4.3 la fluorescencia de los fotoproductos disminuye considerablemente, por lo que se seleccionó como valor de compromiso un pH = 4.1. En esta condiciones todos los compuestos eluyen en menos de 10 minutos con una adecuada resolución.



En los procesos de fotoderivatización, el tiempo de irradiación es un parámetro fundamental y además, al ser un proceso que se lleva a cabo en continuo, ese tiempo está intrínsecamente relacionado y controlado por el flujo empleado en el sistema cromatográfico, para una longitud de reactor concreta. Se decidió mantener fija la longitud del fotorreactor y para conseguir la máxima señal de fluorescencia se optimizó la velocidad de flujo. Se registraron cromatogramas de una disolución patrón mezcla de los tres analitos, a distintas velocidades de flujo comprendidas entre 0.2 y 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. En la **Figura 3.4** se representa el área de los picos obtenidos para los tres analitos en función de la velocidad de flujo.



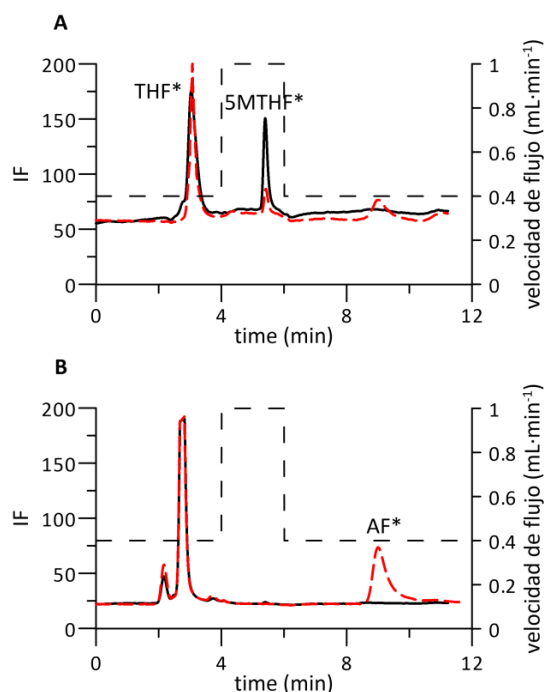
**Figura 3.4.** Influencia de la velocidad de flujo en las áreas de pico obtenida a  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280/360$  nm para 5MTHF\* y THF\* y  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280/440$  nm para AF\*

Como se puede observar, la señal de fluorescencia del THF\* y del AF\* decrece a medida que la velocidad de flujo aumenta, siendo ese descenso más significativo para AF\*, es decir, al disminuir el tiempo de irradiación, disminuye la formación de fotoproductos fluorescentes. Sin embargo, la señal de fluorescencia de 5MTHF\* aumenta a medida que aumenta la velocidad de flujo, es decir, el proceso global de formación de fotoproductos está desfavorecido frente a los procesos de descomposición, cuando la exposición a la radiación es elevada y por tanto la fluorescencia global disminuye.

Debido a este diferente de comportamiento entre los analitos, se decidió establecer un gradiente de flujo de manera que cada compuesto sea eluido a la velocidad de flujo más favorable, lo cual permite establecer un tiempo de irradiación diferente para cada compuesto. Así se fijó una elución que comenzó con una velocidad de flujo de 0.4 mL·min<sup>-1</sup> durante 4 minutos, después se incrementó rápidamente a 1.0 mL·min<sup>-1</sup> durante 2 minutos

(para eluir el 5MTHF) y finalmente se disminuye de nuevo rápidamente a  $0.4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  para favorecer la formación de los fotoproductos del AF.

Teniendo en cuenta estos estudios previos, finalmente se seleccionan como condiciones óptimas para la elución y determinación de los fotoproductos una fase móvil constituida por ácido fórmico 2 mM (pH 4) y ACN (94:6), utilizando un gradiente de flujo. En estas condiciones los tres folatos en estudio eluyen en un tiempo menor de 12 minutos. Los cromatogramas de una mezcla patrón eluida bajo las condiciones optimizadas, tanto con el fotorreactor apagado como encendido, excitando a 280 nm y monitorizando la emisión a 360 y 440 nm se presentan en la **Figura 3.5**.



**Figura 3.5.** Cromatogramas de una mezcla patrón de  $300 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de THF, 5MTHF y AF sin irradiación (línea negra) y con irradiación on-line (línea discontinua roja) a  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=280/360 \text{ nm}$  (A) y  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=280/440 \text{ nm}$  (B). También se muestra el gradiente de la velocidad de flujo empleado (---).

Se observa como aumenta considerablemente la señal del pico del AF\* con respecto a la de la muestra sin irradiar (AF) y la señal del THF se ve poco afectada por la irradiación. Por otro lado, la señal del 5MTHF disminuye cuando se aplica la irradiación en línea, sin embargo, debido a la elevada fluorescencia de este folato, la señal remanente tras la irradiación permite alcanzar límites de detección adecuados y similares a los obtenidos para el AF tras la irradiación.

#### 3.2.2. Validación del método: parámetros analíticos

La validación del método se llevó a cabo en términos de linealidad, precisión, límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ).

La linealidad se evaluó mediante la preparación de patrones de calibración por triplicado con concentraciones comprendidas entre 50 y 1000 ng·mL<sup>-1</sup> de AF y de 100 a 1000 ng·mL<sup>-1</sup> para THF y 5MTHF. Cada patrón se inyectó en el sistema cromatográfico y se eluyó bajo las condiciones optimizadas. Para cada analito se construyó una curva de calibrado representando el área de pico obtenida frente a la concentración del patrón. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 3.1**. Como se puede observar los coeficientes de determinación ( $r^2$ ) son en todos los casos mayores de 0.99.

Los LOD se calcularon de acuerdo con el criterio de Long y Winefordner [3] y los valores obtenidos están en el intervalo entre 7.5 ng·mL<sup>-1</sup> para AF y 22.9 ng·mL<sup>-1</sup> para el 5MTHF. El LOQ se definió con 10/3 veces el LOD y los valores obtenidos estuvieron en el rango entre 24.6 y 75.6 ng·mL<sup>-1</sup> para AF y 5MTHF, respectivamente, como se puede observar en la **Tabla 3.1**. La sensibilidad analítica se calculó como el cociente entre el error estándar de la regresión y la pendiente de la curva de calibrado, expresado en unidades de concentración [4].

La precisión se calculó para muestras conteniendo 200 ng·mL<sup>-1</sup> de cada folato y se expresó como porcentaje de la desviación estándar relativa (% RSD) para ensayos de la repetitividad intradía (n=5). Los valores de RSD obtenidos fueron menores del 5.3 %, lo cual indica la buena repetitividad del método propuesto.

**Tabla 3.1.** Parámetros analíticos y estadísticos para la determinación cromatográfica de AF y sus metabolitos THF y MTHF con fotoderivatización post-columna.

	THF	5MTHF	AF
Intervalo lineal (ng mL <sup>-1</sup> )	100-1000	100-1000	50-1000
Ecuación de regresión (SD)	5.7(0.1)x + 201(29)	5.5(0.1)x + 122(42)	3.7(0.1)x + 92(9)
Coefficiente de determinación (r <sup>2</sup> )	0.9998	0.9995	0.9999
Linealidad (%)	99.2	98.7	99.6
LOD (ng·mL <sup>-1</sup> )	15.3	22.9	7.47
LOQ (ng·mL <sup>-1</sup> )	50.4	75.6	24.6
γ <sup>-1</sup> (ng·mL <sup>-1</sup> )	6.48	9.70	10.75
RSD (%)	1.28	1.36	5.28

SD: desviación estándar (n=15); LOD: límite de detección de acuerdo al criterio de Long y Winefordner; LOQ: límite de cuantificación (LOD/3) x 10); γ<sup>-1</sup>: sensibilidad analítica; RSD: desviación estándar relativa (n=5).

### 3.2.3. Optimización del método de extracción en fase sólida

En ensayos previos con muestras de vegetales se comprobó que hay compuestos endógenos presentes en los extractos de las muestras que son co-extraídos con los folatos y como consecuencia no era posible la inyección directa de las muestras alimentarias. Los compuestos coextraídos afectan fundamentalmente a la señal del 5MTHF. Por esta razón se requiere un paso de limpieza previo al análisis. Como se comentó en la Introducción de esta parte, la mayoría de los métodos propuestos usan columnas de intercambio iónico o extracción en fase sólida (SPE) como método de limpieza de las muestras. En este trabajo se empleó SPE para purificar las muestras y se probaron diferentes tipos de rellenos: rellenos no polares como C8, C18 e ISOLUTE ENV+, y otros rellenos basados en intercambio aniónico como SAX y MAX.

La retención de los folatos (que son ácidos carboxílicos) es diferentes en los rellenos de fase inversa y en los de intercambio aniónico, así en los de fase inversa (C8, C18 e ISOLUTE), los folatos se retienen en su forma neutra debido a interacciones hidrofóbicas, mientras que en los de intercambio aniónico (SAX y MAX) la retención es debida a interacciones iónicas.

El primer lugar el procedimiento de extracción se ensayó con disoluciones patrón de  $300 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de cada folato.

En el caso de los cartuchos no polares, estos se acondicionan con 5 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0.03 M, posteriormente se pasó la muestra a través de los cartuchos y se lavó con 5 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0.03 M. La elución se llevó a cabo con acetato sódico 0.1 M conteniendo 10 % (v/v) de ACN, 1% (p/v) de ácido ascórbico y 0.1 % (v/v) de 2-mercaptoetanol. El ácido ascórbico y el 2-mercaptoetanol se añadieron para evitar la oxidación de los folatos. Los resultados mostraron que los folatos se retienen fuertemente en los cartuchos C8 y C18, y parcialmente en los cartuchos ISOLUTE ENV+. También se comprobó que cuando los cartuchos se lavaban con  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , tenía lugar una elución parcial de los folatos.

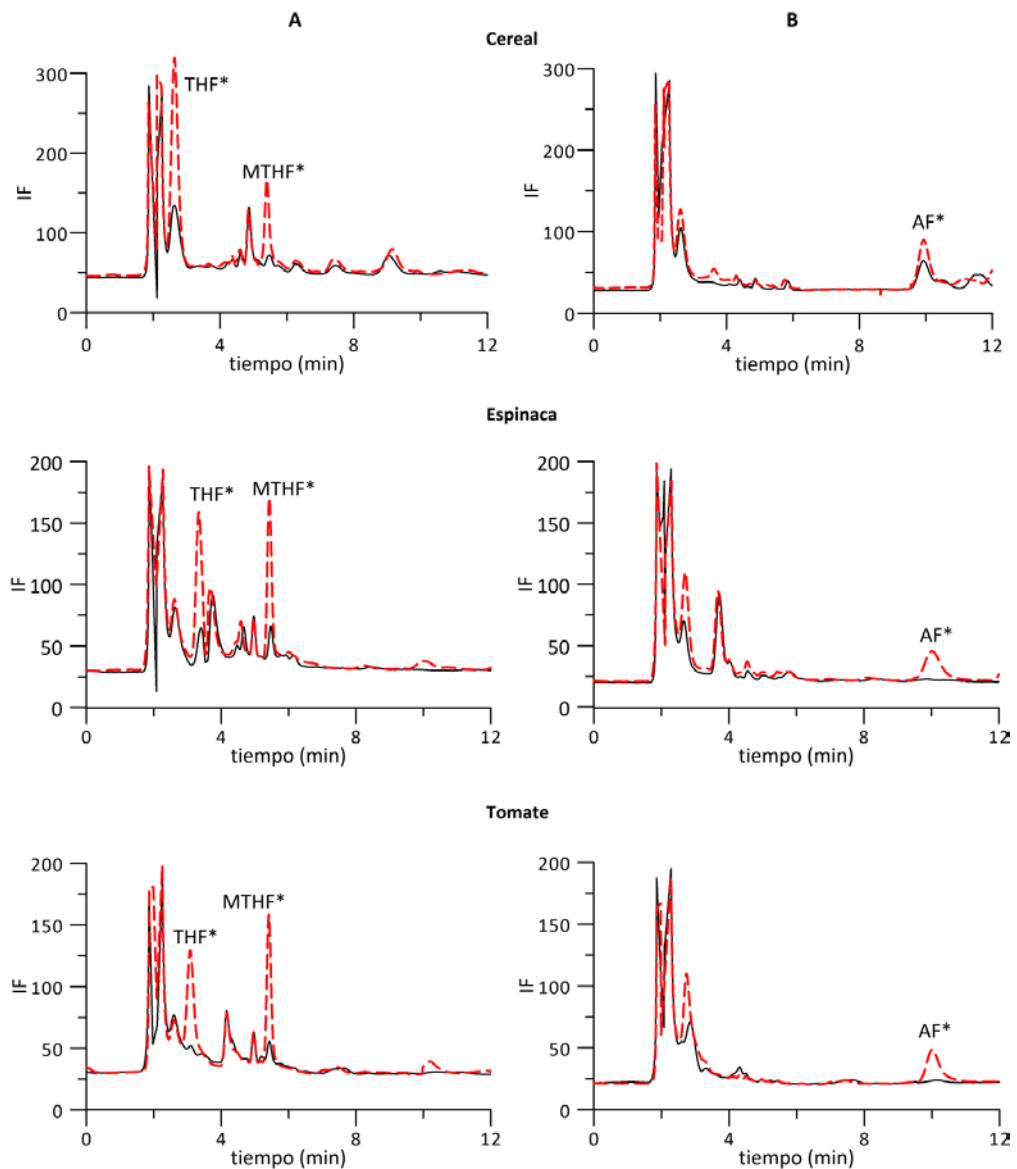
En cuanto a los cartuchos de intercambio aniónico, en primer lugar se acondicionan con metanol y agua, y una vez pasada la muestra se lavaron con agua. En este caso la elución se llevó a cabo con acetato sódico 0.1 M conteniendo 10 % (p/v) de cloruro de sodio, 1 % (p/v) de ácido ascórbico y 0.1 % (v/v) de 2-mercaptoetanol, debido a que proporcionó buenos resultados en estudios previos. En estos cartuchos los folatos se quedaron fuertemente retenidos y no se eluyen durante el proceso de lavado. Con respecto a la recuperación, los cartuchos MAX no proporcionaron una recuperación completa de los folatos, mientras que con los cartuchos SAX los folatos eluyen con recuperaciones comprendidas entre el 94 y el 102 %, por ello fueron estos últimos los adsorbentes seleccionados para el proceso de limpieza de los extractos de las muestras.

#### **3.2.4. Análisis de AF, THF y 5MTHF en vegetales, cereales y en suero humano liofilizado**

Para evaluar la aplicabilidad del método desarrollado, se procedió a analizar el contenido de AF, THF y 5MTHF en diferentes matrices alimentarias, en concreto en cereales enriquecidos, espinacas congeladas y tomate; y en muestras de suero humano liofilizado.

Antes de llevar a cabo la cuantificación de estos compuestos se evaluó el efecto matriz después de la extracción y limpieza a través del cartucho, para ver que método de calibración es el adecuado en cada caso. Para ello se siguió el procedimiento descrito en el apartado 3.1.4. Los resultados mostraron un efecto de matriz para la mayoría de los compuestos y en la mayoría de las muestras. Únicamente no hubo diferencias significativas entre las pendientes ( $p > 0.05$ ) para el análisis de AF en muestras de cereales y suero y para THF en las muestras de espinaca y suero. Con el objetivo de proponer un método general para todos los compuestos y todas las muestras, se aplicó el método de adición patrón en todos los casos.

En el caso de las muestras alimentarias, cada muestra se analizó por triplicado siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.1.3 y en la **Figura 3.6** se muestra un ejemplo de los cromatogramas obtenidos para muestras no contaminadas y contaminadas de cereales, espinacas y tomates.



**Figura 3.6.** Cromatogramas de muestras de cereal, espinaca y tomate sometidas al procedimiento de extracción y limpieza tanto sin contaminar (línea continua negra) como contaminado con  $200 \text{ ng mL}^{-1}$  de AF, THF y 5MTHF (línea discontinua roja).

Los resultados obtenidos para cada folato, dados como el valor medio de las tres replicas independientes y la desviación estándar relativa (SD) se resumen en la **Tabla 3.2**.

**Tabla 3.2.** Parámetros de la recta de adición patrón, recuperaciones y contenido de folatos en las muestras de alimentos analizadas por el método propuesto.

Muestra	Analito	Puesto (ng·mL <sup>-1</sup> )	Encontrado (ng·mL <sup>-1</sup> )	Rec (%)	Parámetros adición patrón				Cantidad en la muestra µg/100 g ± SD
					b (SD)	a (SD)	r <sup>2</sup>	LOD/LOQ (ng·mL <sup>-1</sup> )	
Cereal	THF	200.2	205.4	103	4.3 (0.3)	562.6 (46.2)	0.9980	34/112	164±53
		400.4	422.8	106					
		800.8	788.9	99					
	5MTHF	100.1	104.5	104	4.4 (0.1)	105.8 (31.6)	0.9991	22/71	< LOQ
		200.2	185.6	93					
		400.4	395.9	99					
	AF	800.8	806.1	101	3.2 (0.1)	863.2 (44.0)	0.9968	48/160	331±82
		200.2	193.6	97					
		400.4	372.7	93					
Espinaca	THF	800.8	814.2	102	5.6 (0.1)	414.5 (15.1)	0.9999	8/27	18.4±2.4
		99.95	99.03	99					
		199.8	203.7	102					
		399.6	394.1	99					
	5MTHF	799.2	801.1	100	4.9 (0.1)	237.9 (16.9)	0.9998	10/34	12.1±3.0
		99.97	102.9	103					
		199.9	196.6	98					
		399.9	406.5	102					
	AF	799.8	796.9	99	3.1 (0.1)	71.1 (18.2)	0.9994	17/58	< LOQ
		99.94	89.42	89					
		199.8	205.7	103					
		399.7	408.3	102					
Tomate	THF	799.5	795.1	99	6.1 (0.1)	512.7 (22.5)	0.9998	11/37	14.6±0.1
		99.9	96.59	97					
		199.8	193.6	97					
		399.6	403.4	101					
	5MTHF	799.2	799.2	100	4.9 (0.1)	160.1 (20.8)	0.9997	13/42	< LOQ
		100	98.15	98					
		200	200.8	100					
		399.9	409.3	102					
	AF	799.8	795.1	99	3.3 (0.1)	84.8 (17.7)	0.9995	16/53	< LOQ
		99.9	99.42	99					
		199.9	209.9	105					
		399.8	390.2	98					
		799.5	801.8	100					

b: pendiente expresada como mL·ng<sup>-1</sup>; a: ordenada; LOD: límite de detección según el criterio de Long  
LOQ: límite de cuantificación (LOD/3)×10. <sup>a</sup> Cantidades expresadas en µg de folato / 100 g de peso seco  
para cereal y peso fresco para espinaca y tomate.



Como se observa, los tres folatos han sido detectados en todas las muestras de alimentos. Se obtuvieron recuperaciones satisfactorias a todos los niveles de enriquecimiento y se encontraron concentraciones menores al LOQ para el 5MTHF en las muestras de cereales y de tomate, y para el AF en espinacas y en tomate.

Como se esperaba, el AF es el folato que se encuentra en mayor proporción en las muestras de cereales, debido a que las muestras de cereales analizadas estaban enriquecidas con AF sintético. En las muestras de espinaca y tomate el folato que se encontró en mayor concentración ha sido el THF.

No hay muchos datos referentes a los niveles de estos analitos en productos similares, lo cual dificulta la comparación de los datos obtenidos. Algunos de los métodos propuestos previamente para la determinación de algunos de estos analitos en diferentes muestras junto con el método propuesto se resumen en la **Tabla 3.3**.

Por otro lado, en las muestras de suero no se pudo detectar ninguno de los analitos y para probar la viabilidad del método propuesto en este tipo de muestras se contaminaron muestras de suero con 200 y 370 ng·mL<sup>-1</sup> (cantidades más altas que las que contienen normalmente las muestras de suero) previo al proceso de extracción y purificación. Se calcularon las recuperaciones y se encontraron valores satisfactorios. Para el THF el valor medio de las recuperaciones que se encontró fue 89 %, 99 % para el 5MTHF y 114 % para el AF. Para la cuantificación en las muestras de suero sería necesaria una preconcentración mayor de las muestras para poder aplicar el método descrito.

Cuando se hace una revisión bibliográfica de los métodos publicados en la literatura para la determinación de folatos en muestras de suero se encuentra que la mayoría de los métodos usan detección de espectrometría de masas [8,11], mientras que no se ha encontrado ningún artículo que use HPLC-FSFD, siendo un campo abierto a la investigación.

Como se puede observar en la **Tabla 3.3**, las cantidades de folatos encontradas en suero en métodos previamente publicados son muy bajas, menores que el LOD del método propuesto. Además las muestras analizadas en estos trabajos pertenecían a personas que han sido sujetas a suplementación con AF, lo cual hace que aumente el contenido de folatos en los fluidos biológicos. No aparece ningún trabajo donde se incluyan los tres folatos en estudio.

**Tabla 3.3.** Comparación entre algunos de los métodos publicados en la bibliografía para el análisis de folatos en muestras alimentarias y fluidos biológicos y el método propuesto.

Analito	Muestra	Preparación muestra	Método	Concentración encontrada	Ref.
5MTHF AF	Zumo de naranja Harina refinada Espinaca congelada Leche desnatada	Tampón de extracción: HEPES/CHES Tratamiento trienzimático Purificación SPE con SAX	HPLC-FLD	<i>Espinacas congeladas</i> 5MTHF: 126 ± 15 µg/100g LOD: 1 µg/100g AF: nd LOD: 0.5 µg/100g	[5]
5MTHF AF	Cereal Chocolate Hamburguesa Sandwich pollo Nuggets de pollo	Tampón de extracción: Tris-HCl Tratamiento trienzimático Purificación mediante columna de afinidad	HPLC-DAD	<i>Cereales de desayuno:</i> AF: valores entre 299.3 ± 35.9 and 1281.5 ± 98.4 µg/100g 5MTHF: valores entre 2.2 ± 0.1 y 37.5 ± 2.2 µg/100g  <i>Kellogg's corn flakes</i> 5MTHF: 37.5 ± 2.2 µg/100g AF: 492.1 ± 10.4 µg/100g	[6]
5MTHF	Tomate	Tampón de extracción: HEPES/CHES Desconjugación enzimática: riñón de cerdo Purificación SPE con SAX	HPLC-FLD	<i>Tomate</i> 5MTHF: valores entre 4.1 ± 0.2 and 35.3 ± 2.4 µg/100g LOD: 2.67 ng·mL <sup>-1</sup> THF: nd LOD: 2.34 ng·mL <sup>-1</sup>	[7]
Metotrexate Ácido folínico AF	Suero humano	Metanol	HPLC-MS	<i>Suero humano</i> AF: valores entre 0.015 y 0.156 µg/mL LOD: 0.0032 µg/mL LOQ: 0.01 µg/mL	[8]
THF 5MTHF 5FTHF	Repollo Hojas de brocoli Brócoli espinaca mostaza	Desconjugación enzimática: Plasma de rata Purificación SPE con SAX	HPLC-FLD	<i>Espinaca</i> THF: 25 ± 21 µg/100g LOD: 2 ng·mL <sup>-1</sup> 5MTHF: 43 ± 26 µg/100g LOD: 2 ng·mL <sup>-1</sup>	[9]

### 3. Análisis folatos en diversas matrices

5MTHF	Cereal Queso Leche Brócoli Harina Pan Pasta	Tampón de extracción: HEPES/CHES Tratamiento trienzimático Purificación SPE con SAX	HPLC-FLD	<i>Cereales</i> 5MTHF: values between 4.10 ± 2.31 and 10.89 ± 2.19 µg/100g  <i>Kellogg's Special K</i> 5MTHF: 5.70 ± 1.70 µg/100g LOD: 0.625 ng·mL <sup>-1</sup>	[10]
5MTHF AF	Plasma humano	Metanol conteniendo 10mg/mL of 2- mercaptoetanol y 0.025% (v/v) hidróxido de amonio	HPLC- MS/MS)	<i>Plasma humano</i> 5MTHF LOD: 5.05 ng·mL <sup>-1</sup> AF LOD: 0.249 ng·mL <sup>-1</sup>	[11]
THF 5MTHF AF	Cereales de desayuno Espinaca Tomate	Tampón extracción: HEPES/CHES Desconjugación enzimática: Plasma de rata Purificación SPE con SAX	HPLC-FLD	<i>Cereal Kellogg's Special K</i> THF: 164 ± 53 µg/100g 5MTHF: (30 ± 10) µg/100g AF: 331 ± 82 µg/100g <i>Espinaca</i> THF: 18.4 ± 2.4 µg/100g 5MTHF: 12.1 ± 3.0 µg/100g AF: (5.6 ± 4.8) µg/100g <i>Tomate</i> THF: 14.6 ± 0.1 µg/100g 5MTHF: (5.7 ± 2.5)µg/100g AF: (4.5 ± 3.15) µg/100g  LOD THF: 15.3 ng·mL <sup>-1</sup> LOD 5MTHF: 22.9 ng·mL <sup>-1</sup> LOD AF: 7.47 ng·mL <sup>-1</sup>	Este traba -jo

Para las muestras alimentarias, en general, se puede decir que los valores obtenidos son comparables a los encontrados en la bibliografía teniendo en cuenta, como se dijo en la Introducción, que los datos existentes presentan bastante controversia. Más específicamente, en cereales el 5MTHF y el AF están en el intervalo de los valores publicados por otros autores [6,10]. Además, la concentración de AF está en concordancia con los valores mostrados en el embalaje de los cereales de desayuno (334 µg/100 g). Sin embargo, no se encontraron datos en la bibliografía referentes al contenido de THF en cereales.

En las muestras de espinaca, la concentración de THF está de acuerdo a los valores previamente publicados por otros autores, sin embargo, la concentración de 5MTHF encontrada en este capítulo es ligeramente menor a las descritas en estudios previos.

Los niveles de AF de las espinacas analizadas fueron detectables aunque menores del LOQ, sin embargo, este analito no fue detectado en otros métodos previamente publicados [5,9]. Con respecto a las muestras de tomate, la presencia de 5MTHF ha sido publicada solo en un estudio previo [7] y las concentraciones encontradas en el método propuesto están en concordancia con las de esa publicación.

Finalmente cabe destacar la reducción de los tiempos de retención en el método propuesto en comparación con los de la bibliografía. Esta nueva metodología permite la separación de los folatos en menos de 12 minutos sin usar cantidades significativas de disolventes orgánicos.

### **3.3. Conclusiones**

Considerando las conclusiones previamente obtenidas en el capítulo anterior sobre el considerable aumento de la intensidad de fluorescencia del AF cuando este es irradiado con luz UV, se ha optimizado un método de HPLC-FSFD con fotoderivatización post columna on-line para la determinación del AF, THF y 5MTHF.

La reacción fotoquímica permite el análisis fluorimétrico del AF, que de otro modo no podría determinarse mediante este detector debido a su bajo rendimiento cuántico de fluorescencia. El uso de una columna empaquetada con partículas de núcleo sólido mejora el análisis en términos de eficiencia de la separación y disminuye los tiempos de análisis. Además el gradiente de flujo empleado permite aplicar el tiempo de irradiación óptimo para cada compuesto, logrando así aumentar la sensibilidad de la detección.

El método propuesto se aplicó a muestras de vegetales y los resultados obtenidos estaban de acuerdo con datos previamente publicados. Además el método se aplicó a muestras de suero pero la sensibilidad no fue suficiente para este tipo de muestra. Se encontró efecto matriz para algunos de los analitos en algunas de las matrices, por ello la cuantificación se llevó a cabo usando el método de calibración de adición patrón para todas las muestras analizadas.


**3.4. Bibliografía**

- [1] D.J. Hart, P.M. Finglas, C.A. Wolfe, F. Mellon, A.J.A. Wright, S. Southon, Determination of 5-methyltetrahydrofolate ( $^{13}\text{C}$ -labeled and unlabeled) in human plasma and urine by combined liquid chromatography mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 305 (2002) 206–213.
- [2] J. Jastrebova, C. Witthöft, A. Grahn, U. Svensson, M. Jägerstad, HPLC determination of folates in raw and processed beetroots, *Food Chem.* 80 (2003) 579–588.
- [3] G.L. Long, J.D. Winefordner, Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition, *Anal. Chem.* 55 (1983) 712A–724A.
- [4] L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, C. Jiménez Linares, M. Román Ceba, Estimation of Performance Characteristics of an Analytical Method Using the Data Set Of The Calibration Experiment, *Anal. Lett.* 26 (1993) 1243–1258.
- [5] R.F. Doherty, G.R. Beecher, A method for the analysis of natural and synthetic folate in foods, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 354–361.
- [6] R. Póo-Prieto, D.B. Haytowitz, J.M. Holden, G. Rogers, S.F. Choumenkovitch, P.F. Jacques, J. Selhub, Use of the affinity/HPLC method for quantitative estimation of folic acid in enriched cereal-grain products., *J. Nutr.* 136 (2006) 3079–3083.
- [7] M.D. Iniesta, D. Pérez-Conesa, J. García-Alonso, G. Ros, M.J. Periago, Folate Content in Tomato (*Lycopersicon esculentum*). Influence of Cultivar, Ripeness, Year of Harvest, and Pasteurization and Storage Temperatures, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 4739–4745.
- [8] P. Koufopantelis, S. Georgakakou, M. Kazanis, C. Giaginis, A. Margeli, S. Papargiri, I. Panderi, Direct injection liquid chromatography/positive ion electrospray ionization mass spectrometric quantification of methotrexate, folinic acid, folic acid and ondansetron in human serum, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 3850–3856.
- [9] C. Mattos Della Lucía, E. Rodrigues da Silva, S. Machado Rocha Ribeiro, H.M. Pinheiro-Sant'Ana, otimização de método para análise de folatos em hortaliças folhosas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência, *Quim. Nov.* 34 (2011) 335–340.
- [10] Y. Amornkul, D. Jw, K. Pg, 5-Methyltetrahydrofolate Content of Cereal-Based

Processed Foods, *J. Hum. Nutr. Food Sci.* 1 (2013) 1–5.

- [11] X.-H. Zheng, L.-Y. Jiang, L.-T. Zhao, Q.-Y. Zhang, L. Ding, Simultaneous quantitation of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid in human plasma by HPLC–MS/MS and its application to a pharmacokinetic study, *J. Pharm. Anal.* 5 (2015) 269–275.

# PARTE III



**Análisis de marcadores del riesgo  
a la exposición de hidrocarburos  
aromáticos policíclicos**

*“Para empezar un gran proyecto hace falta  
valentía, para terminarlo perseverancia”*

*Anónimo*





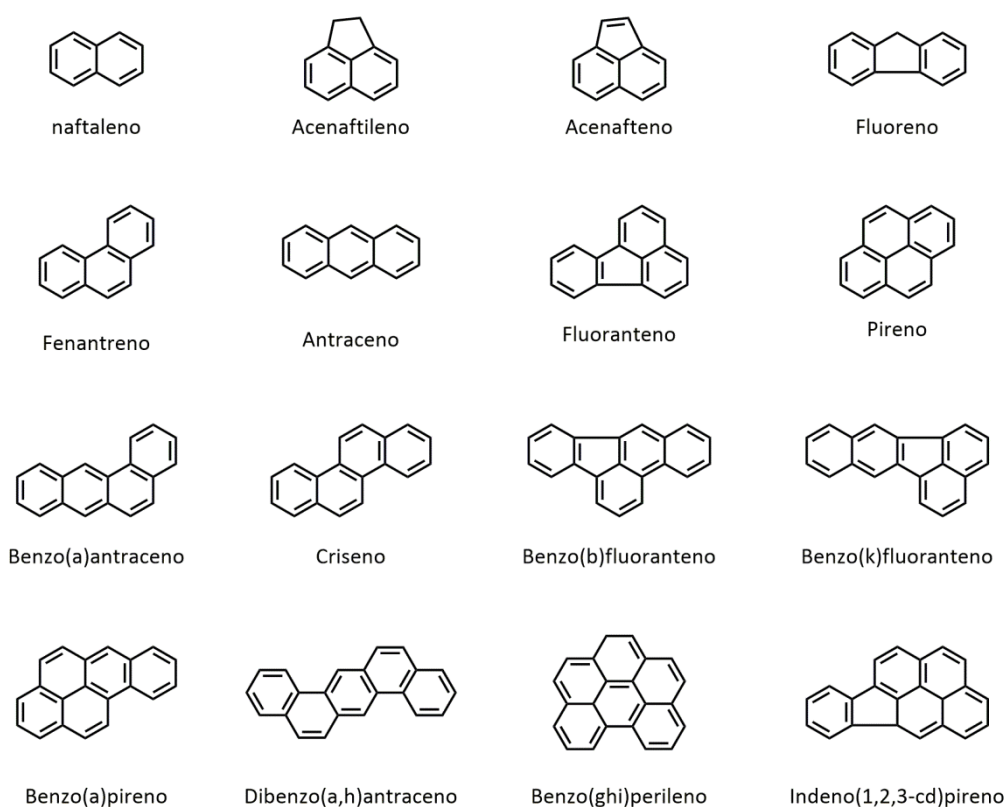
## **1. Introducción**

---



### 1.1. Estructura química de los hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, polycyclic aromatic hydrocarbons) constituyen una familia de compuestos formados por diversas unidades de anillos bencénicos condensados, aunque algunos contienen también anillos de cinco carbonos (como el acenaftileno o el fluoranteno). Entre los más simples se encuentra el naftaleno (dos anillos bencénicos) y entre los más complejos el coroneno (siete anillos bencénicos). La mayoría de estos compuestos contienen solamente C e H en estructuras polinucleares de tipo aromático [1]. Debido a su singular estructura, se suelen clasificar y estudiar de forma diferenciada de otros hidrocarburos. En la **Figura 1.1** se muestra las estructuras de los 16 PAHs considerados como prioritarios por la U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA).



**Figura 1.1.** Estructuras químicas de algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos.

### 1.2. Características físico-químicas de los hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los PAHs se encuentran habitualmente en estado sólido, confiriéndoles su estructura de anillos aromáticos conjugados una particular resistencia a agentes químicos y a otro tipo de ataques. Presentan gran resistencia a la degradación natural. La biodegradación disminuye drásticamente a medida que aumenta el número de anillos aromáticos.

En general son poco volátiles y su volatilidad disminuye a medida que aumenta el número de anillos. Poseen altos puntos de fusión y ebullición y baja presión de vapor. Son compuestos poco solubles en agua y presentan elevada solubilidad en disolventes orgánicos no polares. La solubilidad en agua decrece al ir aumentando el peso molecular y el tamaño de la molécula, con el consiguiente aumento del carácter lipofílico [2].

Debido a sus propiedades, son contaminantes orgánicos y con capacidad acumulativa en los tejidos animales y especialmente en las capas lipídicas, hecho que se define como bioacumulación. Además, se pueden concentrar en las partículas sólidas de suelos y sedimentos dando lugar a contaminación persistente en el medio ambiente.

La **Tabla 1.1** incluye algunas de las propiedades físico-químicas que caracterizan a los PAHs más estudiados [3].

**Tabla 1.1.** Resumen de las propiedades físico-químicas de los PAHs más ampliamente estudiados.

PHA	Masa molecular (g/mol)	Punto de Fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Solubilidad en agua (mg·L <sup>-1</sup> )
Naftaleno	128.2	80.5	218.0	31.8
Acenaftileno	152.2	92.0	270.0	16.1
Acenafteno	154.2	96.2	277.5	3.80
Fluoreno	166.2	116	295.0	1.90
Fenantreno	178.2	101	339.0	4.57
Antraceno	178.2	216	340.0	0.045
Pireno	202.3	156	360.0	0.132
Fluoranteno	202.3	111	375.0	0.260
Benzo(a)antraceno	228.3	160	435.0	0.011
Criseno	228.3	255	407.0	-
Benzo(a)pireno	252.3	175	495.0	0.0038
Benzo(g,h,i)perileno	276.3	278	-	0.00026

### 1.3. Fuentes de hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los PAHs se forman principalmente debido a la combustión incompleta de los hidrocarburos a temperaturas elevadas (superiores a 500 °C) y con oxígeno insuficiente. Las cantidades formadas dependen de la temperatura y de la materia orgánica implicada. En estas reacciones también se forman alquil sustituidos y cuanto mayor es la temperatura menor sustitución presentan los PAHs formados.

También se pueden formar a partir de los combustibles fósiles por reacción a temperaturas menores a 200 °C pero a alta presión, formándose fundamentalmente PAHs alquil sustituidos [4]. Otra posibilidad es la biosíntesis directa mediante microorganismos y plantas, aunque esta vía es claramente minoritaria frente a las anteriores.

Su presencia en el medio ambiente puede deberse a diversas fuentes, tanto naturales como antropogénicas, siendo estas últimas las causantes de las mayores emisiones de estos contaminantes [2]. Entre las fuentes naturales se pueden destacar las filtraciones naturales de fuel fósil, los incendios forestales fortuitos, la actividad volcánica y la deposición atmosférica de contaminantes [5].

Dentro de las fuentes antropogénicas, derivadas de la actividad humana, se pueden considerar cuatro categorías principales: fuentes domésticas, móviles, industriales y agrícolas [5]. Las fuentes domésticas están predominantemente asociadas a la quema de carbón, petróleo, gas, basura u otro tipo de sustancias como tabaco. Las fuentes móviles son aquellas asociadas a emisiones de vehículos, aviones, etc, siendo el transporte terrestre una de las fuentes más importantes. Las fuentes industriales más importantes son debidas a la producción primaria de aluminio, producción de coque como parte de la producción de hierro y acero, incineración de residuos, fabricación de cementos, petroquímicas, fabricación de neumáticos de caucho, etc. Las fuentes agrícolas, tales como la quema de biomasa a cielo abierto, que es una práctica tradicional muy común, así como la preparación de campos antes de una nueva cosecha y la quema de desechos agrícolas, constituyen una fuente importante de emisiones de PAHs al medio ambiente.

#### 1.4. Toxicidad y riesgo a la exposición

Como consecuencia de lo anteriormente expuesto, los PAHs son contaminantes presentes en el medio ambiente de forma continuada en el tiempo. Su amplia distribución se debe en gran medida a que debido a sus propiedades físico-químicas pueden ser transportados a largas distancias desde el punto de emisión sin sufrir degradación significativa y contaminar incluso áreas remotas. Una vez liberados al medio ambiente, pueden repartirse entre el aire, el agua, el suelo o los sedimentos y sufrir transformaciones químicas y fotoquímicas, que los conviertan en otros productos más o menos inertes que los iniciales [6].

La principales vías de exposición a los PAHs en la población general son: inhalación del aire ambiente e interior, ingestión de alimentos que contengan PAHs, o contacto con la piel [4,7].

Debido a su presencia en todos los compartimentos medioambientales, su elevada biodisponibilidad y su toxicidad para los seres vivos hace que se requiera un control continuado en los diferentes tipos de muestras medioambientales existentes.

Los efectos de los PAHs en la salud humana dependerán principalmente del grado de exposición, la concentración de PAHs durante la exposición, la toxicidad de los PAHs y la ruta de exposición. Muchos otros factores también pueden afectar al impacto que tienen sobre la salud, como son el estado de salud previo o la edad [1].

Se han descrito algunos efectos de la exposición a los PAHs a corto y largo plazo como, por ejemplo, irritación en la piel y en los ojos o inflamación en la exposición a corto plazo o disminución de la función inmune, cataratas, daño en el riñón e hígado o problemas respiratorios en la exposición a largo plazo [1].

Sin embargo, la principal característica que presentan estos compuestos sobre la salud, es su capacidad para inducir el desarrollo de tumores en los organismos expuestos. Diversas organizaciones, como The World Health Organization (WHO) [8], the International Agency for Research on Cancer (IARC) [9], the European Food Safety Authority (EFSA) [10] y the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) [11], han informado de las propiedades carcinogénicas, mutagénicas y bioacumulativas de los PAHs. Así, los PAHs se han clasificado como carcinogénicos (benzo(a)pireno), posiblemente carcinogénicos (benzo(a)antraceno, benzo(b)fluorantreno, benzo(k)fluorantreno, criseno, indeno[1,2,3-cd]pireno y naftaleno) y no clasificables (antraceno, benzo[g,h,i]perileno, fluoranteno, fluoreno, fenantreno y

pireno). El efecto más significativo sobre la salud que cabe esperar debido a la exposición de PAHs es un aumento del riesgo de padecer cáncer de pulmón [7].

Además, aunque los PAHs no metabolizados pueden tener efectos tóxicos, una de las principales preocupaciones es la capacidad de sus metabolitos reactivos como los epóxidos y dihidrodioles para unirse a proteínas celulares y ADN. Así, el objetivo de la metabolización es aumentar su polaridad para obtener sustancias hidrofílicas y acelerar su excreción; sin embargo, aunque este mecanismo produce desintoxicación, algunos PAHs se metabolizan a sustancias cancerígenas o mutagénicas. Además, algunos ensayos con animales han demostrado que algunos PAHs pueden actuar como disruptores endocrinos alterando los procesos reproductivos [12].

#### **1.5. Biomarcadores de exposición a los hidrocarburos aromáticos policíclicos**

Los PAHs son lípidos solubles y se absorben en los mamíferos a través del tracto gastrointestinal o a través de los pulmones y se distribuyen mediante el corriente sanguíneo a varios tejidos o se acumulan en los tejidos adiposos, debido a su carácter no polar. Los PAHs se metabolizan en los sistemas biológicos a una mezcla compleja de quininas, fenoles, dihidrodioles, trioles y troleos [13]. El metabolismo a través de la citocromo P450 conduce a metabolitos hidroxilados (OHPAHs) que son excretados en las heces, orina o leche. Aunque las principales vías de eliminación de los OHPAHs son a través de fluidos biológicos como la orina, su transferencia a la leche materna también tiene lugar [14]. La leche de origen animal puede producirse ya contaminada a través del animal de producción con lo cual previsiblemente se podrían encontrar OHPAHs, o bien se podría contaminar directamente a través de una fuente secundaria de contaminación pudiendo, por tanto, coexistir con los PAHs padres. Debido a esto, la determinación de los metabolitos mencionados anteriormente en leche de vaca o leche materna tiene una gran importancia, debido a su correlación con la contaminación ambiental o interior [15].

En la última década, se han propuesto diferentes moléculas provenientes del metabolismo de los PAHs en humanos y en otros organismos superiores, como biomarcadores del riesgo a la exposición de estos compuestos. Se ha pretendido establecer el riesgo de exposición cuantificando su presencia en diferentes fluidos biológicos. Los metabolitos (BIOPAHs) son fundamentalmente mono- y dihidroxi- derivados de los PAHs contaminantes originales.

El 1-hidroxipireno (1-OHPy) y el 3-hidroxibenzo(a)pireno (3-OHB[a]Py) se han utilizado ampliamente como los biomarcadores más representativos de la exposición global a los PAHs [13,16,17]. Por ejemplo, Chahin y col. [18] han utilizado el 1-OHPy para analizar el riesgo a la exposición en rumiantes. Estos autores realizaron un estudio estadístico comparativo entre los valores de 1-OHPy encontrados en leche con los valores de PAHs que habían ingerido los rumiantes y concluyeron que el 1-OHPy parece ser un biomarcador incluso para niveles bajos de exposición. También se ha publicado una revisión donde se proporciona una visión general de los estudios que usan 1-OHPy como biomarcador de la exposición ambiental y ocupacional a los PAHs y proponen, que debido a su presencia en mezclas de PAHs puede no ser solo un indicador de la entrada de Py en el cuerpo, sino también un indicador directo de la presencia de todos los PAHs [19].

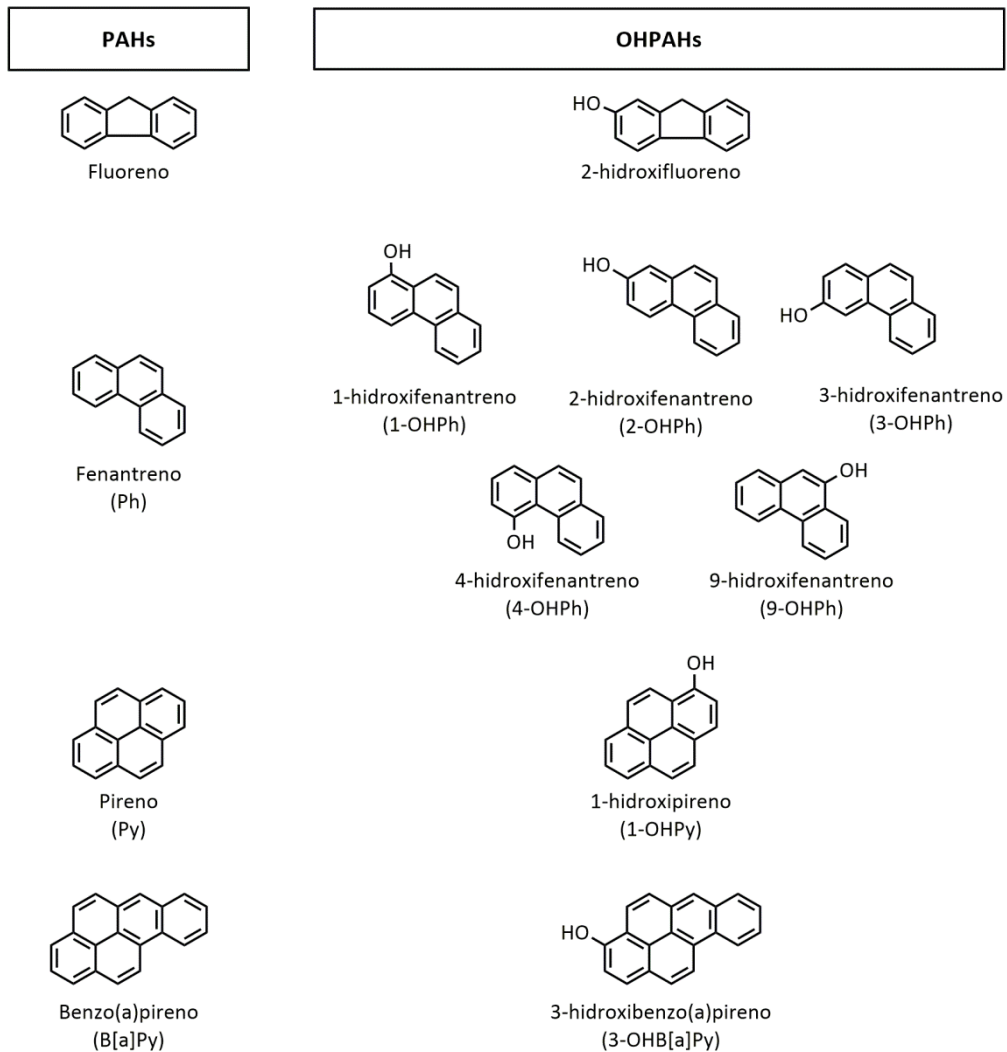
Con respecto al 3-OHB[a]Py, aunque durante décadas se ha usado la concentración de su compuesto padre como indicador para evaluar la exposición externa a PAHs industriales, más recientemente algunos investigadores han propuesto el uso de la presencia de este metabolito en orina como una posibilidad para evaluar rigurosamente el riesgo a la exposición. Leroyer y col. publicaron en 2010 un estudio en el que evaluaron la utilidad del 3-OHB[a]Py y del 1-OHPy como biomarcadores de la exposición a los PAHs y concluyeron que ninguno de los dos eran biomarcadores inequívocos y que sería interesante investigar otros OHPAHs.

En los últimos años, otros OHPAHs han ganado importancia como biomarcadores de la exposición a PAHs, tales como los hidroxiderivados del naftaleno o del fenantreno (Ph) [20]. En un estudio reciente se recomienda que no se evalúe el contenido total de los PAHs exclusivamente mediante el biomonitorio del 1-OHPy, sino que se utilicen además las concentraciones urinarias de otros 2- y 3-OHPAHs [21].

Los derivados hidroxilados del fenantreno (OHPhs), objeto de estudio en esta Tesis Doctoral, han sido propuestos como biomarcadores confiables y sensibles para el biomonitorio de la exposición a PAHs [22]. Onyemauwa y col. han realizado un estudio donde analizaron 16 OHPAHs en orina y encontraron que los niveles del 2- y 3-OHPh fueron entre 25-50 veces más abundantes que los del 1-OHPy y recomiendan que se debe explotar el uso de estos derivados como biomarcadores de la exposición a los PAHs a corto plazo [20]. Concretamente han sido propuestos como principales marcadores de la exposición al Ph, el 1-hidroxifenantreno (1-OHPh), 2-hidroxifenantreno (2-OHPh), 3-hidroxifenantreno (3-OHPh), 4-hidroxifenantreno (4-OHPh) y 9-hidroxifenantreno (9-OHPh) [23].



En la **Figura 1.2** se muestran las estructuras químicas del Ph y sus metabolitos. También se incluyen otros PAHs y sus correspondientes metabolitos que han sido mencionados en esta Introducción.



**Figura 1.2.** Estructuras de algunos PAHs y sus correspondientes metabolitos.

### 1.6. Análisis de metabolitos de los hidrocarburos aromáticos policíclicos

Muchos han sido los trabajos publicados en los que se determinan OHPAHs en orina, sin embargo, son escasos los datos bibliográficos sobre el análisis de estos compuestos en muestras de leche.

Para su análisis en muestras de orina, la cromatografía de gases ha sido ampliamente utilizada para la separación de los OHPAHs antes de su cuantificación por espectrometría de masas de (MS) [14,24–27], sin embargo, esta técnica requiere una preparación de la muestra que involucra derivatización para convertirlos en compuestos volátiles y posterior evaporación del disolvente, lo cual requiere elevados tiempos de análisis. Por otro lado, la mayoría de los métodos publicados recientemente para el análisis de estos compuestos en orina emplean la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para la separación y tándem MS (MS/MS) para la cuantificación [28–30].

Como ya se ha comentado en varias ocasiones a lo largo de esta Memoria de Tesis, la espectrometría de masas es una técnica que no siempre puede estar disponible en todos los laboratorios de análisis debido a su elevado coste. Así, debido a las propiedades fluorescentes de estos compuestos y a la mayor accesibilidad del detector fluorescente (FLD), este podría constituir una alternativa para la determinación de estos compuestos. Este detector ha sido usado para el análisis de 1-OHPy y los OHPH [31] y de 3-OHB[a]Py en orina de fumadores y no fumadores [32], o de 1-OHPy y 3-OHB[a]Py en orina de trabajadores de la industria metalúrgica [33], entre otros. O más recientemente para la determinación de varios metabolitos en orina humana como son el metabolito del 2-hidroxifluoreno (2-OHF), varios hidroxifenantrenos (1 + 9-, 2 + 3- y 4-OHPH), el 1-OHPy y el 3-OHB[a]Py [34].

Los estudios referentes a la determinación de estos compuestos en muestras de leche se han enfocado en el análisis de los PAHs más abundantes de acuerdo con la lista EPA [35–41]. Sin embargo, a diferencia del análisis en las muestras de orina, no son muchos los trabajos que se encuentran en la bibliografía acerca del análisis de los metabolitos en muestras de leche de origen animal tales como vaca y cabra, y los datos en leche materna humana son prácticamente inexistentes.

Para el análisis de estos compuestos en leche se han usado varias técnicas. La cromatografía de gases con detección de masas ha sido propuesto para analizar estos compuestos en muestras de leche, pero como en el caso de las muestras de orina es necesario un paso previo de derivatización [14,42–44]. El método propuesto por Grova y col.

fue el primero en determinar estos metabolitos en leche [14]. Analizaron los cinco OHPH junto con el Ph en leche de cabra de animales que habían sido tratados previamente con dosis orales de Ph. El método propuesto incluía hidrólisis enzimática, para romper los enlaces de los metabolitos con las proteínas de la leche, extracción líquido-líquido y purificación mediante extracción en fase sólida (SPE), siendo el 3-OHPH el metabolito mayoritario. A partir de sus resultados sugieren que los métodos usuales para la detección de los PAHs, basados en la detección de los compuestos nativos, no son representativos de la contaminación real de las matrices biológicas. También revelan que los OHPAHs encontrados en la leche se encuentran en sus formas conjugadas, por lo cual, un paso de hidrólisis enzimática es totalmente necesario.

La electroforesis capilar de zona (CZE) con detector de diodos (DAD) también se ha utilizado para la determinación de 2-OHF, 1-hidroxinaftaleno, 2-hidroxinaftaleno, 3-OHPH y 9-OHPH en leche bovina enriquecida con esos analitos [45].

En cuanto a la técnica de HPLC, que es la empleada a lo largo de esta Tesis Doctoral, varios han sido los métodos publicados en los que se emplea la detección fluorimétrica. Chahin y col. [18] han propuesto un método para la determinación de 1-OHPy en leche de cabras a las que se le había suministrado una ingesta diaria de diferentes cantidades de PAHs durante siete días y se halló una adecuada relación entre la dosis de pireno y la concentración de 1-OHPy encontrada en la leche. Rey Salgueiro y col. [13] han propuesto otro método mediante HPLC-FLD para el análisis de 1-OHPy y 3-OHBOHB[a]Py, junto con once PAHs, en leches infantiles y en leche en polvo, además de en cereales. En este trabajo se describen bajos valores de recuperación para el 3-OHB[a]Py incluso bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. La potencial oxidación de los OHPAHs se considera debida a la degradación durante el pretratamiento de las muestras. Este aspecto aún hoy en día no está superado, y es una limitación en el análisis del 3-OHB[a]Py, sin embargo otros OHPAHs no son tan sensibles a estos procesos de degradación. Más tarde Guiavarc'h y col. [46] también usaron detección fluorescente para analizar 1-OHPy en leche de cabras que habían sido administradas oralmente con Py, Ph y B[a]Py, encontrándose que su concentración fue proporcional a la cantidad ingerida de Py.

Aunque la detección fluorimétrica ha sido la más usada también se ha usado la detección MS o MS/MS. Rey-Salgueiro y col. [13] utilizaron esta técnica como análisis confirmatorio de los resultados obtenidos mediante HPLC-FLD.

En la **Tabla 1.2** se resumen las principales características, tanto del tratamiento de la muestra como del método cromatográfico para aquellos procedimientos en los que se emplea la técnica de HPLC para el análisis de OHPAHs en muestras de leche. Se puede observar que todos los pretratamientos de las muestras incluyen una desconjugación enzimática con  $\beta$ -glucuronidasa y sulfatasa, seguida de una extracción líquido-líquido con algún disolvente orgánico y algún paso de purificación generalmente mediante SPE.

**Tabla 1.2.** Métodos mediante HPLC para la determinación de OHPAH en leche.

Analitos/ muestra	Tratamiento muestra	Características método cromatográfico	Ref.
1-OHPy, 6-OHcriseno  Leche de cabra	<u>Desconjugación enzimática:</u> $\beta$ -glucuronidasa y sulfatasa, pH 5.2 e incubación a 37 °C, 16 h.  <u>Extracción:</u> ciclohexano y acetato de etilo  <u>Purificación:</u> SPE (columna Envi-Chrom P)	<u>Fase estacionaria:</u> C18 (250x4.6 mm, 5 $\mu$ m)  <u>Fase móvil:</u> 4 mg/L ác. ascórbico (eluyente A) y metanol (eluyente B). Modo gradiente  <u>Detección:</u> FLD ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ =346/400 nm)	[18]
1-OHPy, 3-OHB[a]Py, y otros PAHS  Leche infantil  Leche en polvo	<u>Extracción:</u> ACN : acetato de etilo (70:30) con 0.8 g/L ter-butil hidroquinona  <u>Desconjugación enzimática:</u> $\beta$ -glucuronidasa/arilsulfatasa, pH 5.5 e incubación a 37 °C, 2 h.  <u>Purificación:</u> SPE (cartuchos C18)	<u>Fase estacionaria:</u> Supelcosil LC-PAH (250x4.6 mm, 5 $\mu$ m)  <u>Fase móvil:</u> ACN (eluyente A) y agua (eluyente B) Modo gradiente (50:50 inicial)  <u>Detección:</u> FLD ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ =346/389 y 308/432 nm)  MS/MS: ESI modo negativo, presión N2: 5psi, voltaje capilar 3500 V, temperatura capilar: 320 °C	[13]
1-OHPy 6-OHcriseno  Leche de cabra	<u>Desconjugación enzimática:</u> $\beta$ -glucuronidasa y sulfatasa, pH 5.2 e incubación a 37 °C, 16 h.  <u>Extracción:</u> ciclohexano y acetato de etilo  <u>Purificación:</u> SPE, extracción líquido/líquido	<u>Fase estacionaria:</u> C18 (250 x 4.6 mm, 5 $\mu$ m)  <u>Fase móvil:</u> 4 mg·L <sup>-1</sup> ác. ascórbico (eluyente A) y metanol (eluyente B). Modo gradiente (55:45 inicial)  <u>Detección:</u> FLD ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ =346/400 nm)	[46]

Como se ha indicado, no hay muchos estudios sobre la determinación de los OHPAHs en muestras de leche y como se puede observar en la **Tabla 1.2**, pocos son los métodos propuestos en los que se emplea HPLC y en ninguno de ellos se analiza leche materna. Además la principal desventaja de las metodologías propuestas son los largos tiempos de elución y que en ninguno de los casos se han analizado todos los metabolitos del Ph.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que estos compuestos son isómeros entre sí y en algunos de los casos no pueden cuantificarse separadamente. Así, en varios de los métodos para la determinación de estos compuestos en muestras de orina, los cuales han sido comentados anteriormente, no fue posible la completa resolución cromatográfica y los metabolitos 2+9-OHPH [31] ó 2+3- y 1+9-OHPH [34] se determinaron conjuntamente. Este mismo problema se presentó en el caso de utilizar MS/MS como sistema de detección donde los metabolitos 2- y 3-OHPH eluyen en un solo pico [29]. De los trabajos encontrados en la bibliografía, solo el propuesto por Grova y col. [14] consigue la resolución completa de los cinco metabolitos del fenantreno mediante GC-MS, siendo necesario un proceso de derivatización de los extractos previo a su análisis cromatográfico.

Con objeto de resolver esta falta de resolución, se abordará en esta Memoria la aplicación técnicas quimiométricas de resolución aplicadas a señales cromatográficas, con objeto de analizar los cinco isómeros del Ph. En el siguiente apartado de esta Introducción se expondrán las características de dichas técnicas quimiométricas.

### 1.7. Análisis multivariante como herramienta analítica

Se denominan *señales univariantes* a aquellas señales analíticas que se miden en un determinado método instrumental, en función de una única variable controlada, normalmente la concentración. Así, la *calibración univariante* es aquella que se basa en la construcción de una relación entre dos variables,  $x$  e  $y$ , de manera que  $y$  (variable dependiente) se emplea para predecir  $x$  (variable independiente). Su empleo es limitado ya que no pueden aplicarse en el caso de muestras que contengan, junto con el analito de interés, otros componentes que contribuyen a la señal de forma no constante, o en el caso de la resolución de mezclas de compuestos con perfiles espectrales muy parecidos entre sí, salvo que en este caso se recurra al empleo de técnicas separativas acopladas al sistema de detección adecuado.

Para muestras de composición compleja, aunque se utilicen técnicas cromatográficas no siempre se logra una separación total entre los analitos de interés. El enfoque tradicional de este problema ha sido variar los parámetros cromatográficos experimentales, efectuar pretratamientos a las muestras y combinar sistemas de detección para aumentar la capacidad de resolución y la selectividad. Sin embargo, si la complejidad de la muestra es alta puede ser que en ningún caso se consiga una adecuada resolución. En estos casos, el análisis multivariante puede ser de gran utilidad para aumentar la selectividad por medios matemáticos [47]. La idea central de las metodologías de calibración multivariante es compensar la falta de selectividad total en las señales analizadas con algoritmos matemáticos, los cuales extraen aquella porción de la señal que puede emplearse para predecir la concentración de uno o varios analitos en una muestra. Esta posibilidad se traduce en que el tratamiento previo de la muestra se reduce al mínimo, lo que, a su vez, desemboca en tiempos de análisis más cortos, y/o en la posibilidad de emplear el modo isocrático, con la ventaja añadida de ahorrar disolventes tóxicos.

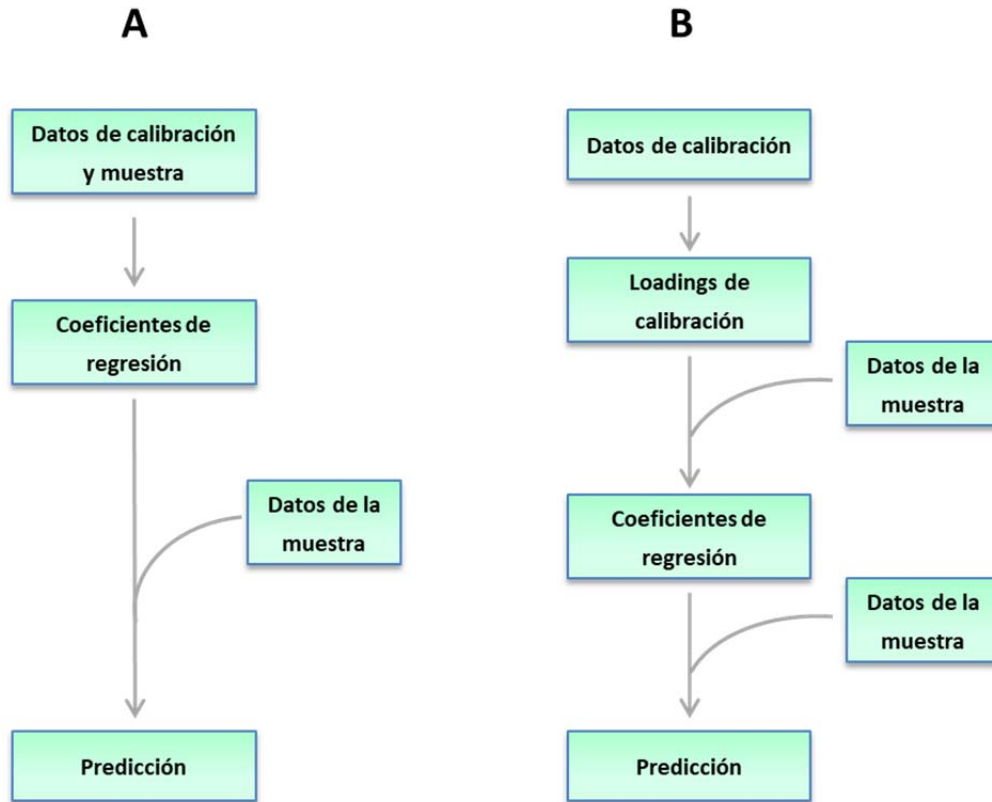
#### 1.7.1. Calibración multivariante de segundo orden

Una buena alternativa para solucionar el problema que genera la presencia de interferencias no modeladas en la etapa de calibración o de coelución de analitos, es la utilización de datos con una estructura dimensional mayor, datos de segundo orden [48,49] que aportarán métodos más robustos frente a la presencia de interferencias y a los efectos de matriz, permitiendo conocer la contribución fundamental de cada analito individual a la señal medida.

Los datos de segundo orden se pueden obtener de diferentes maneras, pero en esta Memoria se obtendrán utilizando como sistema de detección del cromatógrafo de líquidos un detector de fluorescencia de barrido rápido (FSFD) que permite obtener espectros de emisión a lo largo del proceso de elución. Los datos de segundo orden así obtenidos para una sola muestra conforman una matriz que se puede visualizar como una superficie bidimensional, donde los ejes  $x$  e  $y$  corresponden a tiempos de retención y longitudes de onda de emisión respectivamente, y el eje  $z$  a la señal de fluorescencia. Cuando los datos de segundo orden para un grupo de muestras se compilan en una única matriz, el resultado es una matriz tridireccional, por lo que a estos datos también se les denomina datos de tres vías.

Los algoritmos de calibración multivariante más usados para tratar datos cromatográficos de segundo orden se basan en la obtención y almacenamiento de las señales correspondientes a un grupo de muestras patrón, compuestas por mezclas de los componentes a determinar, posterior optimización del modelo de cálculo mediante el uso de las variables apropiadas que afectan al sistema y finalmente predicción de las muestras problema de concentración desconocida.

La capacidad para modelar interferencias de la muestra que no están incluidas en la calibración se denomina “ventaja de segundo orden” [50], la cual es aprovechada por los distintos métodos de calibración multivariante de dos maneras distintas, representadas esquemáticamente en la **Figura 1.3**.



**Figura 1.3.** Dos maneras básicas de obtener la ventaja de segundo orden: A) combinando los datos de calibración con los de la muestra antes de calcular los coeficientes de regresión, B) estimando los loadings a partir de los datos de calibración, y luego calculando los coeficientes de regresión, una vez que la muestra ha sido incorporada.

La primera opción es que los datos de una muestra desconocida determinan (conjuntamente con los datos de calibración) los coeficientes de regresión que llevan a cabo la predicción (**Figura 1.3 A**), mientras que, en la segunda opción, se obtienen en primer lugar los vectores directores o *loadings* utilizando los datos de calibrado, y luego, en un paso posterior, con la adición de la muestra desconocida, se obtienen los coeficientes de regresión específicos de cada muestra (**Figura 1.3 B**). Ambas maneras implican la participación de la muestra problema en parte del proceso de calibración.



Los algoritmos más utilizados para procesar los datos cromatográficos de segundo orden se pueden clasificar en tres grupos:

○ En un primer grupo se pueden incluir aquellos algoritmos que necesitan que se cumpla la condición de trilinealidad, que implica que los tiempos de retención no varíen de una muestra a otra. Estos algoritmos son: Análisis Factorial Paralelo (PARAFAC) [48]; diferentes versiones de descomposición trilineal alternada (ATLD) [51], tales como Descomposición Trilineal Alternada Autoponderada (SWATLD) [52] y ATLD penalizada (APTL) [53]; Métodos Generalizados de Anulación de Rango, GRAM (generalized rank annihilation method) [50]; Descomposición Trilineal Directa, DTLD (Direct Trilinear Decomposition) [54]; y mínimos cuadrados bilineales combinado con bilinealización de los residuos (BLLS/RBL) [55,56]. Todos estos métodos suponen un modelo matemático intrínseco en que los perfiles de todos los componentes son iguales en todas las muestras, y por lo tanto, requieren que: (1) los perfiles de tiempo de retención sean constantes de muestra a muestra, (2) los cromatogramas se alineen apropiadamente antes del procesamiento de datos. De todos ellos, el más utilizado es PARAFAC ya que ha demostrado una gran eficiencia y robustez en la utilización de mínimos cuadrados alternados para la descomposición de la matriz de datos.

○ En un segundo grupo se incluirían aquellos algoritmos que son capaces de trabajar con datos no trilineales, entre los que se encuentran: Resolución Multivariable de Curvas-Mínimos Cuadrados Alternos, (Multivariate Curve Resolution - Alternating Least Square, MCR-ALS) [57] y PARAFAC2. Este último es una variante de PARAFAC que permite una variación en los perfiles de una muestra a otra, en una de las dimensiones de los datos.

○ Otros métodos de calibración de segundo orden potencialmente útiles son los métodos de regresión de mínimos cuadrados parciales tanto concatenados (U-PLS) [58] como multidimensionales (N-PLS) [59]. Estos algoritmos presentan la capacidad de modelar datos que no son estrictamente trilineales incorporando una estructura latente flexible en la regresión de los datos.

En esta memoria se han empleado varios de los algoritmos de segundo orden: MCR-ALS, U-PLS y N-PLS. El algoritmo MCR-ALS incorpora la ventaja de segundo orden y sigue el procedimiento esquematizado en la **Figura 1.3 A**, sin embargo, tanto N-PLS como U-PLS, siguen el esquema de la **Figura 1.3 B** y deben acoplarse a un proceso denominado "bilinealización residual" (RBL, *Residual Bilinearization*) [60] que les proporciona esta ventaja para datos de segundo orden [61].

Estos algoritmos se describen de forma simplificada a continuación:

- **MCR-ALS**

Este algoritmo se basa en construir una matriz aumentada, colocando todas las matrices del set de calibración, así como las de las muestras problemas adyacentes entre sí a lo largo de la dimensión de tiempo. Esta disposición permite efectuar calibrados con datos que no sean estrictamente trilineales, es decir, el perfil correspondiente al tiempo de retención puede variar ligeramente de una muestra a otra, sin que esto afecte al calibrado.

En el caso de no existir pérdida de trilinealidad en el modo temporal, y que además este modo presente mayor grado de selectividad que el modo espectral, es posible crear una matriz aumentada en el modo espectral situando igualmente las matrices apiladas en columnas para poder cuantificar, lo que implica la trasposición previa de las mismas para situar las longitudes de onda en filas y los tiempos en columnas.

Posteriormente, la descomposición bilineal de la matriz aumentada se realiza de acuerdo a la siguiente expresión:

$$D = C \times S + E$$

donde las filas de **D** contienen los espectros de emisión de los diferentes analitos, las columnas de **C** los perfiles temporales, las columnas de **S** sus espectros relacionados y **E** es una matriz de residuos no ajustados por el modelo.

La descomposición de **D** se logra a través de la minimización del módulo de **E** por mínimos cuadrados alternantes (ALS). Se trata de un proceso cíclico que se repite hasta alcanzar una convergencia, imponiendo ciertas restricciones adecuadas al sistema en estudio durante el proceso de ALS.

En la **Figura 1.4** se resume gráficamente un análisis de datos cromatográficos de segundo orden aplicando MCR-ALS. Se crea una matriz aumentada con los datos de matriz para un conjunto de muestras, colocadas una junto a la otra en la dimensión de tiempo (solo se muestran tres muestras representativas). La descomposición de MCR-ALS conduce a los perfiles espectrales y tiempos de retención de todos los componentes de la muestra. Estos últimos perfiles describen el comportamiento de retención en todas las muestras. El área debajo de cada pico define el valor de *score*, que es proporcional a la concentración del componente.

En comparación con PARAFAC, MCR-ALS necesita estimaciones iniciales de perfiles espectrales o temporales, mientras que PARAFAC suele inicializarse automáticamente. Sin

embargo, las estimaciones iniciales para MCR-ALS se pueden calcular de manera eficiente mediante una variedad de métodos, como el cálculo de las llamadas variables más puras [62], o mediante el análisis de factores evolutivos (EFA) [63], que es particularmente útil para datos cromatográficos. Lo más importante de este algoritmo es que no requiere la sincronización de los tiempos de los cromatogramas, que en la práctica puede constituir una ventaja algorítmica significativa.

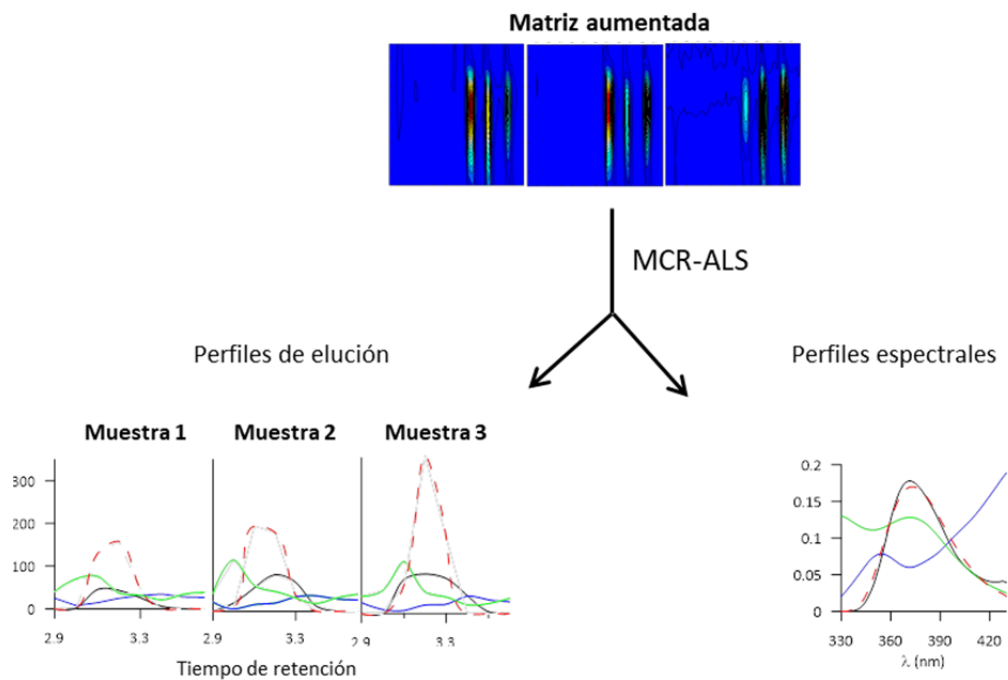


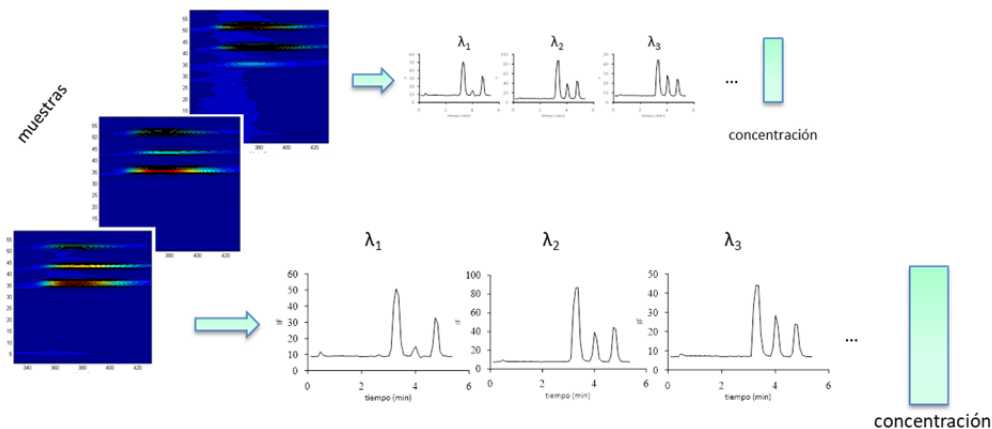
Figura 1.4. Representación gráfica algoritmo MCR-ALS.

- **U-PLS**

Otra alternativa para trabajar con datos de segundo orden es reorganizarlos en vectores (una dimensión) y aplicar algoritmos de primer orden. Ello se consigue desdoblando (*unfolding*) la información original de la matriz de datos de dos dimensiones. La información de la concentración, se emplea inicialmente en el paso de calibración, en el que no se incluye la muestra desconocida [58].

Así, en el tratamiento de datos de segundo orden, aparece el concepto de *unfolding*, que puede ser traducido como desdoblamiento o simplemente reorganización. Consiste en

la organización de un conjunto de datos multivariantes en una matriz, es decir, se trata de ir concatenando matrices de diferentes niveles, como se muestra en la **Figura 1.5**.



**Figura 1.5.** Representación gráfica del concepto de unfolding.

El proceso de *unfolding* se lleva a cabo principalmente por necesidades computacionales, ya que la forma matricial es la forma más sencilla de introducir datos en un ordenador. El objetivo final del desdoblamiento se logra cuando se consigue ignorar la estructura multivariante de los datos, y se tratan como un conjunto de datos de primer orden.

Las  $I$  matrices de datos de segundo orden de la calibración (de tamaño  $J \times K$ , donde  $J$  y  $K$  son el número de datos en cada una de las dos dimensiones) son primero vectorizadas mediante el proceso de desdoblamiento (*unfolded*) en vectores de tamaño  $JK \times 1$ . A continuación, el modelo U-PLS se calibra con estos datos y con el vector  $\mathbf{y}$  ( $I \times 1$ , donde  $I$  es el número de muestras de calibración) de las concentraciones de calibración. Esto nos proporciona un conjunto de vectores directores (*loadings*)  $\mathbf{P}$  y vectores directores ponderados (*weight loadings*)  $\mathbf{W}$  (ambos de tamaño  $JK \times A$ , donde  $A$  es el número de factores necesarios para modelar la matriz de calibración), así como también los coeficientes de regresión  $\mathbf{b}$  (de tamaño  $A \times 1$ ). La cantidad de vector loading que le corresponde a cada espectro individual en la calibración se le llama escalar (*score*). El parámetro  $A$  puede seleccionarse por técnicas tales como validación cruzada y aplicando el criterio de Haaland y Thomas [64].

Si en las muestras de validación no aparece ningún componente no calibrado,  $\mathbf{b}$  podría ser empleado para estimar la concentración del analito.

- **N-PLS**

Al igual que ocurría en U-PLS, cuando éste método se aplica a datos de segundo orden, la información referente a la concentración de los analitos se introduce en la etapa de calibración sin incluir los datos de la muestra desconocida. Las matrices de datos de las  $I$  muestras de calibración, junto con el vector de concentraciones  $\mathbf{y}$  (de tamaño  $I \times 1$ ) se emplean para obtener las matrices de loadings  $\mathbf{W}^j$  y  $\mathbf{W}^k$  (de tamaños  $J \times A$  y  $K \times A$ , siendo  $A$  el número de factores), así como los coeficientes de regresión  $\mathbf{b}$  (de tamaño  $A \times 1$ ) [65].

Comparado con el algoritmo PARAFAC, ambos modelos aprovechan la mayor información espectral y, por tanto, la mayor capacidad diferenciadora de los datos de segundo orden. Sin embargo, presentan características distintas que les confieren diferentes capacidades de resolución y, por tanto, diversos campos de actuación.

N-PLS utiliza señales de tres vías o más, y construye la matriz de calibración mediante mezclas de componentes puros como patrones. Tiene la ventaja frente a PARAFAC de, potencialmente, poder modelar no linealidades y ser más rápido en la construcción del modelo. Sin embargo, cuando se aplica a la resolución de componentes en presencia de un fondo que presenta amplia señal y gran variabilidad, por ejemplo, fluidos biológicos en diversos individuos, la única posibilidad es incorporar, a la matriz de calibrado, numerosas muestras de suero u orina, si se dispone de ellas, en ausencia de los analitos de interés. Esta forma de actuación tiene la limitación de que nunca realmente se está disponiendo del fondo, o interferencia, real, que incluso en algunos casos no se puede disponer de ella y que el número de muestras fondo necesario para poder aproximarnos a una modelación de dicha interferencia es enorme, en muchos casos 50 o más. Por tanto, N-PLS previsiblemente podrá ser aplicado favorablemente cuando el fondo sea conocido y constante. Este hecho puede ocurrir, por ejemplo, cuando se pretende su aplicación al análisis de rutina de productos manufacturados de composición previsible y compleja. En estos casos, la optimización de un modelo con la elevada capacidad de resolución y la rapidez de predicción de N-PLS, puede generar procedimientos competitivos incluso con HPLC, de forma similar a como lo hace PLS para sistemas más simples.

Otra ventaja de N-PLS frente a PARAFAC es la incorporación de las variables dependientes en la descomposición de las variables independientes, lo que podría

estabilizar el modelo predictivo [59]. Además, los modelos trilineales serán potencialmente menos vulnerables al ruido debido a que, para realizar la descomposición, se emplea la información en todos los órdenes.

Tanto U-PLS como N-PLS carecen de la ventaja de segundo orden, por lo que es necesario combinar estos algoritmos con la rutina RBL para modelar la presencia de las potenciales interferencias causadas por componentes no esperados en la muestra, y poder cuantificar de manera exacta el o los analitos de interés [60,61].

En las últimas décadas la combinación de la cromatografía de líquidos con algoritmos de calibración multivariante ha suscitado un gran interés, y este hecho se refleja en el gran número de trabajos y revisiones publicadas en la última década. Así por ejemplo en un capítulo de libro publicado recientemente se han revisado las aplicaciones de la calibración de segundo orden a los datos cromatográficos, con detector DAD o FSD [66], también en una revisión reciente se muestran a modo de tabla un resumen de los métodos en los que se emplea la cromatografía de líquidos junto con modelos quimiométricos de segundo orden [67]. No son muchos los trabajos donde se emplea el detector FSD para generar datos cromatográficos de segundo orden. Así, por ejemplo se han comparado varios algoritmos de calibración multivariante para el análisis de cuatro fluoroquinolonas en orina empleando este detector [68], se ha aplicado MCR-ALS para resolver la co-elución de fluoreno, pireno y benzo[b]fluoranteno con algunas interferencias en muestras de pimentón ahumado [69] y también se ha usado este algoritmo para la cuantificación de seis hormonas en agua y sedimentos [70], y para la determinación de pteridinas marcadoras en orina [71].

**1.8. Bibliografía**

- [1] H.I. Abdel-Shafy, M.S.M. Mansour, A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation, *Egypt. J. Pet.* 25 (2016) 107–123.
- [2] A.K. Haritash, C.P. Kaushik, Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review, *J. Hazard. Mater.* 169 (2009) 1–15.
- [3] R. Dabestani, I.N. Ivanov, A compilation of physical, spectroscopic and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Photochem. Photobiol.* 70 (1999) 10–34.
- [4] G. Purcaro, S. Moret, L.S. Conte, Overview on polycyclic aromatic hydrocarbons: Occurrence, legislation and innovative determination in foods, *Talanta.* 105 (2013) 292–305.
- [5] K. Ravindra, R. Sokhi, R. Van Grieken, Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation, *Atmos. Environ.* 42 (2008) 2895–2921.
- [6] K. Srogi, Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review, *Environ. Chem. Lett.* 5 (2007) 169–195.
- [7] K.-H. Kim, S.A. Jahan, E. Kabir, R.J.C. Brown, A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects, *Environ. Int.* 60 (2013) 71–80.
- [8] WHO Regional Office for Europe, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), in: *Air Qual. Guidel.*, København Ø, Denmark, 2000: p. Chapter 5.9.
- [9] International Agency for Research on Cancer (IARC), *IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk to humans*, Lyon, France, 1987.
- [10] European Food Safety Authority (EFSA), Polycyclic aromatic hydrocarbons in food scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain, *EFSA J.* 724 (2008) 1–114.
- [11] U.S. Environmental Protection Agency, Polycyclic organic matter (POM), (n.d.). [https://www3.epa.gov/airtoxics/hlthef/polycycl.html#N\\_1\\_%0A](https://www3.epa.gov/airtoxics/hlthef/polycycl.html#N_1_%0A) (accessed May 6, 2018).
- [12] K. Hayakawa, Atmospheric pollution and its countermeasure in east Asia from the

- viewpoint of polycyclic aromatic hydrocarbons, *J. Heal. Sci.* 55 (2009) 870–878. doi:10.1248/jhs.55.870.
- [13] L. Rey-Salgueiro, E. Martínez-Carballo, M.S. García-Falcón, C. González-Barreiro, J. Simal-Gándara, Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites in infant foods, *Food Chem.* 115 (2009) 814–819.
- [14] N. Grova, F. Monteau, B. Le Bizec, C. Feidt, F. Andre, G. Rychen, Determination of phenanthrene and hydroxyphenanthrenes in various biological matrices at trace levels using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 29 (2005) 175–181.
- [15] J. Pulkrabova, M. Stupak, A. Svarcova, P. Rossner, A. Rossnerova, A. Ambroz, R. Sram, J. Hajslova, Relationship between atmospheric pollution in the residential area and concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human breast milk, *Sci. Total Environ.* 562 (2016) 640–647.
- [16] F.J. Jongeneelen, Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Ann. Occup. Hyg.* 45 (2001) 3–13.
- [17] H.A. Jeng, C.H. Pan, W.Y. Lin, M.T. Wu, S. Taylor, G.P. Chang-Chien, G. Zhou, N. Diawara, Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons from coke oven emissions and reproductive toxicity in nonsmoking workers, *J. Hazard. Mater.* 244–245 (2013) 436–443.
- [18] A. Chahin, Y.P. Guiavarc'h, M.A. Dziurla, H. Toussaint, C. Feidt, G. Rychen, 1-Hydroxypyrene in milk and urine as a bioindicator of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure of ruminants, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 1780–1786.
- [19] Å.M. Hansen, L. Mathiesen, M. Pedersen, L.E. Knudsen, Urinary 1-hydroxypyrene (1-HP) in environmental and occupational studies-A review, *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 211 (2008) 471–503.
- [20] F. Onyemauwa, S.M. Rappaport, J.R. Sobus, D. Gajdošová, R. Wu, S. Waidyanatha, Using liquid chromatography–tandem mass spectrometry to quantify monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine, *J. Chromatogr. B.* 877 (2009) 1117–1125.
- [21] M. Oliveira, K. Slezakova, C. Delerue-Matos, M. do Carmo Pereira, S. Morais,



- Assessment of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in preschool children: Levels and impact of preschool indoor air on excretion of main urinary monohydroxyl metabolites, *J. Hazard. Mater.* 322 (2017) 357–369.
- [22] H. Hemat, J. Wittsiepe, M. Wilhelm, J. Müller, T. Göen, High levels of 1-hydroxypyrene and hydroxyphenanthrenes in urine of children and adults from Afghanistan, *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 22 (2012) 46–51.
- [23] K. Polanska, W. Hanke, G. Dettbarn, W. Sobala, J. Gromadzinska, P. Magnus, A. Seidel, The determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in the urine of non-smoking Polish pregnant women, *Sci. Total Environ.* 487 (2014) 102–109.
- [24] Z. Li, L.C. Romanoff, D. a Trinidad, N. Hussain, R.S. Jones, E.N. Porter, D.G. Patterson, A. Sjodin, Measurement of urinary monohydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons using automated liquid-liquid extraction and gas chromatography/isotope dilution high-resolution mass spectrometry, *Anal Chem.* 78 (2006) 5744–5751.
- [25] L. Campo, F. Rossella, S. Fustinoni, Development of a gas chromatography/mass spectrometry method to quantify several urinary monohydroxy metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in occupationally exposed subjects, *J. Chromatogr. B.* 875 (2008) 531–540.
- [26] Z. Li, L.C. Romanoff, D.A. Trinidad, E.N. Pittman, D. Hilton, K. Hubbard, H. Carmichael, J. Parker, A.M. Calafat, A. Sjödin, Quantification of 21 metabolites of methyl-naphthalenes and polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 3119–3129.
- [27] O. Motorykin, J. Schrlau, Y. Jia, B. Harper, S. Harris, A. Harding, D. Stone, M. Kile, D. Sudakin, S.L. Massey Simonich, Determination of parent and hydroxy PAHs in personal PM<sub>2.5</sub> and urine samples collected during Native American fish smoking activities, *Sci. Total Environ.* 505 (2015) 694–703.
- [28] D. Lankova, K. Urbancova, R.J. Sram, J. Hajslova, J. Pulkrabova, A novel strategy for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbon monohydroxylated metabolites in urine using ultra-high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 2515–2525.
- [29] Y. Wang, L. Meng, E.N. Pittman, A. Etheredge, K. Hubbard, D.A. Trinidad, K. Kato, X. Ye, A.M. Calafat, Quantification of urinary mono-hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons by on-line solid phase extraction-high performance

- liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 931–937.
- [30] K. Urbancova, D. Lankova, P. Rossner, A. Rossnerova, V. Svecova, M. Tomaniova, M. Veleminsky, R.J. Sram, J. Hajslova, J. Pulkrabova, Evaluation of 11 polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in urine of Czech mothers and newborns, *Sci. Total Environ.* 577 (2017) 212–219.
- [31] Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, Determinación simultánea de 1-hidroxipireno, 1-,2+9-, 3-, 4 hidroxifenantreno en orina. Método de hidrólisis enzimática y detección fluorescente / cromatografía, in: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (Ed.), Colección INHT, Métodos Toma Muestra y Análisis, Spain, 2012.
- [32] D. Barbeau, A. Maître, M. Marques, Highly sensitive routine method for urinary 3-hydroxybenzo[a]pyrene quantitation using liquid chromatography-fluorescence detection and automated off-line solid phase extraction, *Analyst.* 136 (2011) 1183–1191.
- [33] D. Barbeau, R. Persoons, M. Marques, C. Hervé, G. Laffitte-Rigaud, A. Maitre, Relevance of urinary 3-hydroxybenzo(a)pyrene and 1-hydroxypyrene to assess exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in metallurgy workers, *Ann. Occup. Hyg.* 58 (2014) 579–590.
- [34] Á. Luque-Uría, A. Espinosa-Mansilla, I. Durán-Merás, HPLC-fast scanning fluorimetric detection determination of risk exposure to polycyclic aromatics hydrocarbons biomarkers in human urine, *Bioanalysis.* 9 (2017) 265–278.
- [35] L. Zanieri, P. Galvan, L. Checchini, A. Cincinelli, L. Lepri, G.P. Donzelli, M. Del Bubba, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human milk from Italian women: Influence of cigarette smoking and residential area, *Chemosphere.* 67 (2007) 1265–1274.
- [36] S.R. Kim, R.U. Halden, T.J. Buckley, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Human Milk of Nonsmoking U.S. Women, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 2663–2667.
- [37] C. Naccari, M. Cristani, F. Giofrè, M. Ferrante, L. Siracusa, D. Trombetta, PAHs concentration in heat-treated milk samples, *Food Res. Int.* 44 (2011) 716–724.
- [38] I. Çok, B. Mazmanci, M.A. Mazmanci, C. Turgut, B. Henkelmann, K.W. Schramm,

- Analysis of human milk to assess exposure to PAHs, PCBs and organochlorine pesticides in the vicinity Mediterranean city Mersin, Turkey, *Environ. Int.* 40 (2012) 63–69.
- [39] O.P. Luzardo, N. Ruiz-Suárez, M. Almeida-González, L.A. Henríquez-Hernández, M.Z. Luis D. Boada, Multi-residue method for the determination of 57 Persistent Organic Pollutants in human milk and colostrum using a QuEChERS-based extraction procedure, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 9523–9536.
- [40] S. Santonicola, A. De Felice, L. Cobellis, N. Passariello, A. Peluso, N. Murru, M.C. Ferrante, R. Mercogliano, Comparative study on the occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in breast milk and infant formula and risk assessment, *Chemosphere.* 175 (2017) 383–390.
- [41] L. Wang, A. Liu, Y. Zhao, X. Mu, T. Huang, H. Gao, J. Ma, The levels of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human milk and exposure risk to breastfed infants in petrochemical industrialized Lanzhou Valley, Northwest China, *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2018) 1–13.
- [42] S. Lutz, C. Feidt, F. Monteau, G. Rychen, B. Le Bizec, S. Jurjanz, Effect of exposure to soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbons on milk contaminations of parent compounds and their monohydroxylated metabolites, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 263–268.
- [43] D. Lapole, G. Rychen, N. Grova, F. Monteau, B. Le Bizec, C. Feidt, Milk and urine excretion of polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites after a single oral administration in ruminants, *J. Dairy Sci.* 90 (2007) 2624–2629.
- [44] A. Costera, C. Feidt, M.A. Dziurla, F. Monteau, B. Le Bizec, G. Rychen, Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from soil and hay matrices in lactating goats, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 5352–5357.
- [45] G. Knobel, A.D. Campiglia, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in milk by a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction and capillary electrophoresis, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 2291–2298.
- [46] Y.P. Guiavarc'h, A. Chahin, M.A. Dziurla, F.T. Yen, C. Jondreville, G. Rychen, EROD activity in peripheral blood lymphocytes and 1-hydroxypyrene in urine and milk as biomarkers of PAH exposure in dairy ruminants, *Environ. Toxicol. Chem.* 30 (2011) 1346–1353.

- [47] K.S. Booksh, B.R. Kowalski, Theory of Analytical Chemistry, *Anal. Chem.* 66 (1994) 782–791.
- [48] R. Bro, PARAFAC. Tutorial and applications, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 38 (1997) 149–171.
- [49] N.M. Faber, R. Bro, P.K. Hopke, Recent developments in CANDECOMP/PARAFAC algorithms: A critical review, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 65 (2003) 119–137.
- [50] E. Sánchez, B.R. Kowalski, Generalized Rank Annihilation Factor Analysis, *Anal. Chem.* 58 (1986) 496–499.
- [51] H.L. Wu, M. Shibukawa, K. Oguma, An alternating trilinear decomposition algorithm with application to calibration of HPLC-DAD for simultaneous determination of overlapped chlorinated aromatic hydrocarbons, *J. Chemom.* 12 (1998) 1–26.
- [52] Z.P. Chen, H.L. Wu, J.H. Jiang, Y. Li, R.Q. Yu, A novel trilinear decomposition algorithm for second-order linear calibration, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 52 (2000) 75–86.
- [53] A.L. Xia, H.L. Wu, D.M. Fang, Y.J. Ding, L.Q. Hu, R.Q. Yu, Alternating penalty trilinear decomposition algorithm for second-order calibration with application to interference-free analysis of excitation-emission matrix fluorescence data, *J. Chemom.* 19 (2005) 65–76.
- [54] E. Sanchez, B.R. Kowalski, Tensorial Resolution: a direct trilinear decomposition, *J. Chemom.* 4 (1990) 29–45.
- [55] M. Linder, R. Sundberg, Second-order calibration: bilinear least squares regression and a simple alternative, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 42 (1998) 159–178.
- [56] M. Linder, R. Sundberg, Precision of prediction in second-order calibration, with focus on bilinear regression methods, *J. Chemom.* 16 (2002) 12–27.
- [57] R. Tauler, M. Maeder, A. De Juan, Multiset data analysis: extended multivariate curve resolution., in: S. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemom.*, Elsevier: Oxford, U.K., 2009: pp. 473–506.
- [58] S. Wold, P. Geladi, K.I.M. Esbensen, J. Ohman, Multi-way principal components and pls-analysis\*, *J. Chemom.* 1 (1987) 41–56.
- [59] R. Bro, Multiway calibration. Multilinear PLS, *J. Chemom.* 10 (1996) 47–61.
- [60] J. Öhman, P. Geladi, S. Wold, Residual bilinearization. Part 1: Theory and algorithms,

- J. Chemom. 4 (1990) 79–90.
- [61] A.C. Olivieri, On a versatile second-order multivariate calibration method based on partial least-squares and residual bilinearization: Second-order advantage and precision properties, *J. Chemom.* 19 (2005) 253–265.
- [62] W. Windig, J. Guilment, Interactive self-modeling mixture analysis, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1425–1432. doi:10.1021/ac00014a016.
- [63] M.C. Antunes, J.E. J. Simão, A.C. Duarte, R. Tauler, Multivariate curve resolution of overlapping voltammetric peaks: quantitative analysis of binary and quaternary metal mixtures, *Analyst.* 127 (2002) 809–817.
- [64] D.M. Haaland, E. V. Thomas, Partial Least-Squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1193–1202.
- [65] R. Bro, Multi-way analysis in the food industry, Doctoral Thesis, University of Amsterdam, Netherlands, 1998.
- [66] A.C. Olivieri, P.L. Pisano, A. Muñoz de la Peña, H.C. Goicoechea, Data analysis, in: *Liq. Chromatogr. Fundam. Instrum.*, 2017: pp. 551–531.
- [67] G.M. Escandar, A.C. Olivieri, A road map for multi-way calibration models, *Analyst.* 142 (2017) 2862–2873.
- [68] F. Cañada-Cañada, J.A. Arancibia, G.M. Escandar, G.A. Ibañez, A. Espinosa Mansilla, A. Muñoz de la Peña, A.C. Olivieri, Second-order multivariate calibration procedures applied to high-performance liquid chromatography coupled to fast-scanning fluorescence detection for the determination of fluoroquinolones, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 4868–4876.
- [69] O. Monago-Maraña, R.L. Pérez, G.M. Escandar, A. Muñoz De La Peña, T. Galeano-Díaz, Combination of liquid chromatography with Multivariate Curve Resolution-Alternating Least-Squares (MCR-ALS) in the quantitation of polycyclic aromatic hydrocarbons present in paprika samples, *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) 8254–8262.
- [70] R.L. Pérez, G.M. Escandar, Multivariate calibration-assisted high-performance liquid chromatography with dual UV and fluorimetric detection for the analysis of natural and synthetic sex hormones in environmental waters and sediments, *Environ. Pollut.* 209 (2016) 114–122.

- [71] A. Mancha De Llanos, M.M. De Zan, M.J. Culzoni, A. Espinosa-Mansilla, F. Cañada-Cañada, A. Muñoz De La Peña, H.C. Goicoechea, Determination of marker pteridines in urine by HPLC with fluorimetric detection and second-order multivariate calibration using MCR-ALS, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 2123–2135.

## **2. Determinación de los metabolitos del fenantreno en leche materna y en leche de vaca mediante combinación de datos cromatográficos de segundo orden y calibración multivariante**

---





Como se ha indicado, los métodos propuestos solo permiten el análisis de uno o dos metabolitos del fenantreno (OHPs). Sin embargo, no se han encontrado métodos para la determinación simultánea de los cinco hidroxil metabolitos más representativos del fenantreno (OHPs), en un solo registro cromatográfico y usando detección fluorimétrica. Además, teniendo en cuenta que estos analitos muestran señales cromatográficas solapadas y tienen perfiles espectrales idénticos, se pretende combinar la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detección fluorimétrica de registro rápido (FSFD) con la calibración multivariante de segundo orden para lograr el análisis individual separado de los cinco OHPs en muestras de leche materna y en leche de vaca.

### 2.1. Material y métodos

#### 2.1.1. Preparación de patrones

Se prepararon disoluciones patrón de 2-hidroxifenantreno (2-OHP), 3-hidroxifenantreno (3-OHP) y 9-hidroxifenantreno (9-OHP), de concentración  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  mediante pesada exacta de cada patrón sólido y dilución con acetonitrilo (ACN). Estas disoluciones se guardaron en la oscuridad a  $-4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Por otro lado, las disoluciones de 1-hidroxifenantreno (1-OHP) y 4-hidroxifenantreno (4-OHP) de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , se adquirieron comercialmente.

Las disoluciones de trabajo se prepararon por dilución de las disoluciones patrón de los cinco analitos con ACN.

#### 2.1.2. Instrumentación.

Los estudios cromatográficos se llevaron a cabo en un cromatógrafo de líquidos equipado con un desgasificador, bomba cuaternaria, horno de columna, muestreador automático termostatzado a  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ , detector FSFD y el paquete informático CHEMSTATION para el control del instrumento, análisis y tratamiento de datos.

Se usó una columna analítica Tracel Excel ODS-B de tamaño  $100 \times 2.1 \text{ mm}$  y  $3 \mu\text{m}$  de espesor de partícula, cuya temperatura se fijó a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

La fase móvil consistió en una mezcla de ACN y agua en proporción 45:55 y la elución se llevó a cabo en modo isocrático con una velocidad de flujo de  $0.4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . El volumen de inyección fue de  $5 \mu\text{L}$ .

Las matrices de datos se obtuvieron del sistema cromatográfico con detector FSD, usando modo multiemisión y registrando los espectros en el rango de longitudes de onda ( $\lambda$ ) desde 330 nm a 430 nm, cada 1 nm y para tiempos de elución entre 0 y 5.5 minutos cada 5.4 segundos, fijando la  $\lambda$  de excitación a 250 nm. Por lo tanto, el tamaño de la matriz de datos fue 59x101 (tiempo de elución x  $\lambda$  emisión). Estas matrices se guardaron en formato ASCII y se transfirieron al ordenador para su posterior análisis.

El análisis de los datos de segundo orden se realizó usando el programa Matlab y la interface gráfica MVC2 cuyos detalles se muestran en el ANEXO 2.

### **2.1.3. Muestras de calibración y validación para el análisis quimiométrico de segundo orden**

Se construyó un set de calibración de treinta y cuatro muestras, veintisiete de ellas correspondientes a un diseño central compuesto en los rangos de concentración 0-10 ng·mL<sup>-1</sup> para 1-, 2-, 3- y 4-OHP y entre 0-52 ng·mL<sup>-1</sup> para el 9-OHP. Además, también se incluyeron dos blancos de ACN y cinco muestras adicionales que solo contenían uno de los analitos. Las concentraciones de cada uno de los analitos en cada una de las muestras de calibración se muestran en la **Tabla 2.1**.

También se preparó un set de doce muestras de validación mediante un diseño aleatorio, las cuales contenían concentraciones de los OHPs en el rango de las muestras de calibración.

Todas las muestras se prepararon tomando los correspondientes volúmenes de la disolución patrón de cada analito y diluyendo hasta 10.0 mL con ACN.

2. Determinación metabolitos fenantreno en leche

**Tabla 2.1.** Concentraciones del set de calibración ( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) empleadas para la cuantificación de 2-OHPH, 3-OHPH, 1-OHPH, 9-OHPH y 4-OHPH.

Sample	2-OHPH	3-OHPH	1-OHPH	9-OHPH	4-OHPH
1	5.5	5.5	0.6	27.5	5.5
2	5.5	5.5	10.5	27.5	5.5
3	5.5	5.5	5.5	2.8	5.5
4	5.5	5.5	5.5	52.3	5.5
5	5.5	5.5	5.5	27.5	0.6
6	10.4	5.5	5.5	27.5	10.5
7	5.5	0.6	5.5	27.5	5.5
8	5.5	10.5	5.5	27.5	5.5
9	1.0	1.0	1.0	5.0	9.9
10	1.0	1.0	9.9	5.0	9.9
11	1.0	1.0	1.0	49.6	1.0
12	1.0	1.0	9.9	49.6	1.0
13	9.8	1.0	1.0	5.0	9.9
14	9.8	1.0	9.9	5.0	1.0
15	9.8	1.0	1.0	49.6	9.9
16	9.8	1.0	9.9	49.6	1.0
17	1.0	10.0	1.0	5.0	9.9
18	1.0	10.0	9.9	5.0	9.9
19	1.0	10.0	1.0	49.6	1.0
20	1.0	10.0	9.9	49.6	1.0
21	9.8	10.0	1.0	5.0	9.9
22	9.8	10.0	9.9	5.0	1.0
23	9.8	10.0	1.0	49.6	9.9
24	9.8	10.0	9.9	49.6	1.0
25	5.5	5.5	5.5	27.5	5.5
26	5.5	5.5	5.5	27.5	5.5
27	5.5	5.5	5.5	27.5	5.5
28	0	0.0	3.0	0.0	0.0
29	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0
30	0	3.0	0.0	0.0	0.0
31	0	0.0	0.0	0.0	3.0
32	0	0.0	0.0	15.0	0.0
33	0	0.0	0.0	0.0	0.0
34	0	0.0	0.0	0.0	0.0

#### **2.1.4. Preparación de las muestras**

Se analizaron muestras de leche de vaca entera y semidesnatada, las cuales se compraron en un supermercado local y leche materna que se obtuvo de voluntarias sanas y no expuestas ocupacionalmente a hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs).

Se contaminaron alícuotas de 1 mL de leche añadiendo los volúmenes necesarios de la disolución de trabajo de OHPs y se mantuvieron en la oscuridad durante 24 horas, a temperatura ambiente para simular muestras realmente contaminadas.

Posteriormente, el pH de la muestra se ajustó a 5 con HCl 0.3 M y se añadieron 3  $\mu$ L de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa/aryl sulfatasa. La hidrólisis de los conjugados de glucurónido y sulfato de los hidroximetabolitos se llevó a cabo incubando la mezcla a 37 °C durante 20 horas. Después de la hidrólisis, se añadieron 300  $\mu$ L de ACN a las muestras y se agitaron mediante un vortex y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transvasó a otro tubo eppendorf. Con la fase sólida se repitió el proceso de extracción y el sobrenadante se juntó con el obtenido de la primera extracción. Finalmente, los sobrenadantes, se diluyeron a 1.6 mL con ACN y se filtraron a través de filtros de PTFE de 0.22  $\mu$ m, para por último ser inyectados en el sistema cromatográfico.

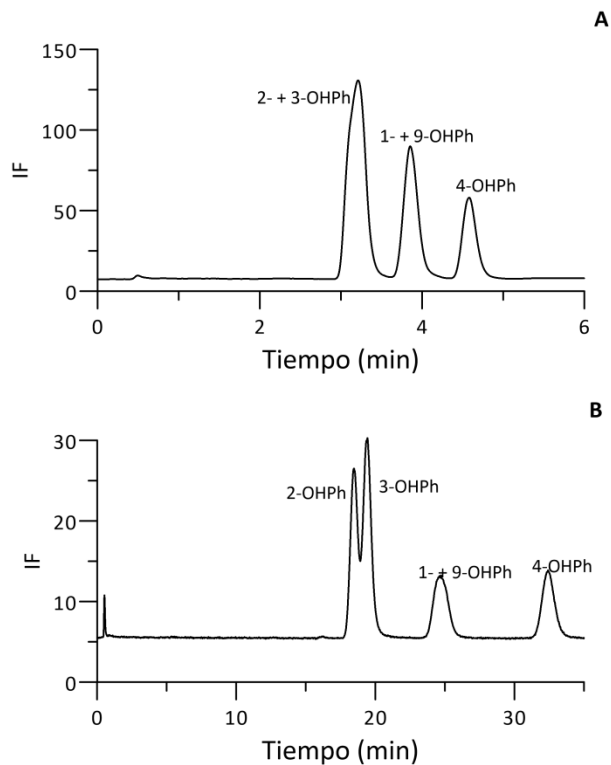
## 2.2. Resultados y discusión

### 2.2.1. Optimización de las condiciones cromatográficas

Como se ha descrito en la Introducción, la única diferencia estructural entre los analitos es la posición del grupo –OH y, para lograr una adecuada separación de estos isómeros, es esencial la selección del disolvente y la composición de la fase móvil.

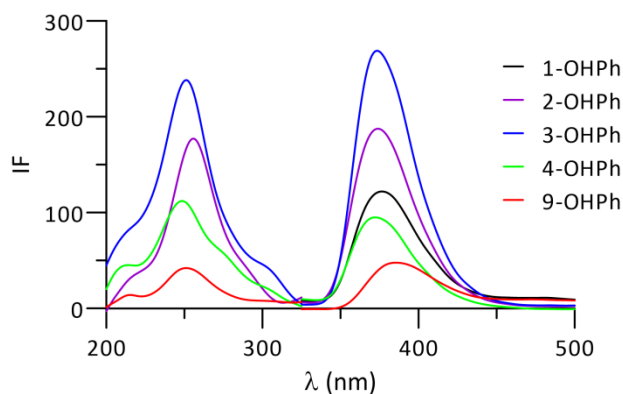
Para la optimización de las condiciones cromatográficas para la elución de los analitos se utilizó una disolución de trabajo que contenía 1-OHPH, 2-OHPH, 3-OHPH y 4-OHPH en concentración 5.5 ng mL<sup>-1</sup> y 9-OHPH en concentración 52.5 ng mL<sup>-1</sup>.

Con el objetivo de lograr una adecuada separación de los metabolitos, se probaron diferentes composiciones de fases móviles ACN:H<sub>2</sub>O, con porcentajes de agua comprendidos entre 45 y 70 %. No fue posible utilizar porcentajes superiores de agua debido a la limitada solubilidad de los analitos. Se comprobó que a medida que disminuía el porcentaje de fase acuosa, disminuían también los tiempos de retención. Así, con un porcentaje de agua del 45%, la elución de los analitos tenía lugar en dos minutos, eluyendo todos en un solo pico. Al aumentar el porcentaje de agua, se obtuvo una mejor resolución, así con un 70% se logra una mejor separación, pero no completa, entre los picos de los isómeros 2- y 3-OHPH; sin embargo, el 1-OHPH y el 9-OHPH siguen coeluyendo en un mismo pico y el 4-OHPH aumentó su tiempo de retención a más de 30 minutos, como se puede observar en la **Figura 2.1**.



**Figura 2.1.** Cromatogramas de una disolución patrón de los cinco analitos eluidos con una fase móvil compuesta por ACN:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (45:55, v:v) (A) y ACN:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (70:30, v:v) (B).

Dado que modificando la composición de la fase móvil no se consiguió una buena resolución entre los picos, se estudió la posibilidad de la cuantificación individual de los analitos usando diferentes longitudes de onda de excitación y/o emisión. En la **Figura 2.2** se muestran los espectros de excitación (a  $\lambda_{em} = 375$  nm) y de emisión (a  $\lambda_{ex} = 250$  nm) de los cinco OHPs estudiados obtenidos en los picos de los cromatogramas de cada uno de los patrones individuales de cada metabolito.



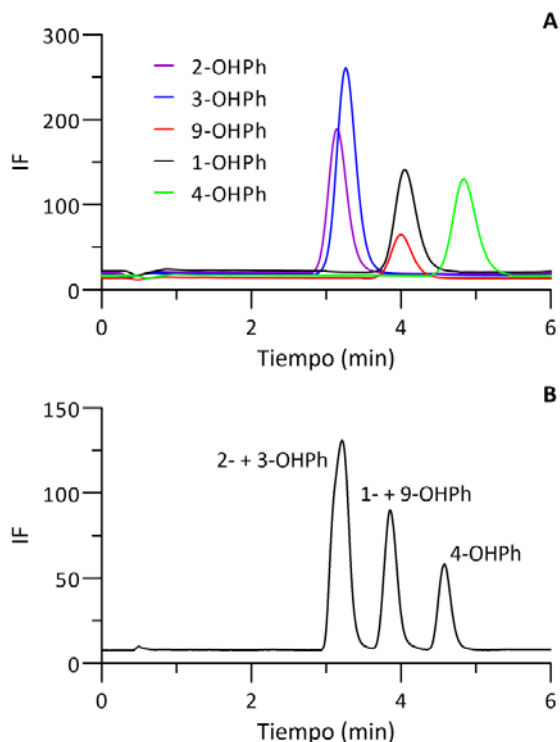
**Figura 2.2.** Espectros de excitación y emisión on-line de los cinco OHPs.

Como se puede observar, los perfiles espectrales, tanto de excitación como de emisión de todos ellos son muy similares. Las longitudes de onda del máximo de excitación son 256 nm para 2-OHP, 251 nm para 3-OHP, 255 nm para el 1-OHP, 251 nm para el 9-OHP y 248 nm para el 4-OHP. Por su parte las longitudes de onda del máximo de emisión fueron 374 y 373 nm para el 2-OHP y el 3-OHP, respectivamente, 376 nm y 386 nm para el 1-OHP y el 9-OHP y 372 nm para el 4-OHP.

Así, las diferencias entre las longitudes de onda de excitación y emisión para el 2-OHP y el 3-OHP fueron 5 y 1 nm, respectivamente, y para el 1-OHP y el 9-OHP fueron 4 y 10 nm, respectivamente. Debido a que los máximos de los compuestos que coeluyen están muy cerca, no fue posible usar diferentes longitudes de onda de excitación y emisión para mejorar la selectividad.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, se seleccionó la fase móvil que proporcionó la mejor relación entre el tiempo de elución y la forma del pico. De este modo, la fase móvil seleccionada fue ACN:H<sub>2</sub>O en proporción 45:55, con una velocidad de flujo de 0.4 mL·min<sup>-1</sup> y en modo isocrático. En estas condiciones, como se puede observar en la **Figura 2.3** todos los analitos eluyen en aproximadamente 5 minutos, pero no se logró la resolución completa de todos los analitos y solo se observan tres picos. En el primer pico cromatográfico coeluyen los analitos 2- y 3-OHP, en el segundo pico coeluyen los metabolitos 1- y 9-OHP y el tercer pico corresponde al 4-OHP.

En la **Figura 2.3 A** se muestran los cromatogramas individuales de los cinco analitos, y en la **Figura 2.3 B** se muestra un cromatograma de una mezcla de todos los analitos, eluidos con la fase móvil optimizada.



**Figura 2.3.** Cromatogramas individuales de cada uno de los analitos (A) y cromatograma correspondiente a una mezcla patrón (B), usando en ambos casos una fase móvil ACN:H<sub>2</sub>O (45:55, v:v).  $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 250/375$  nm.

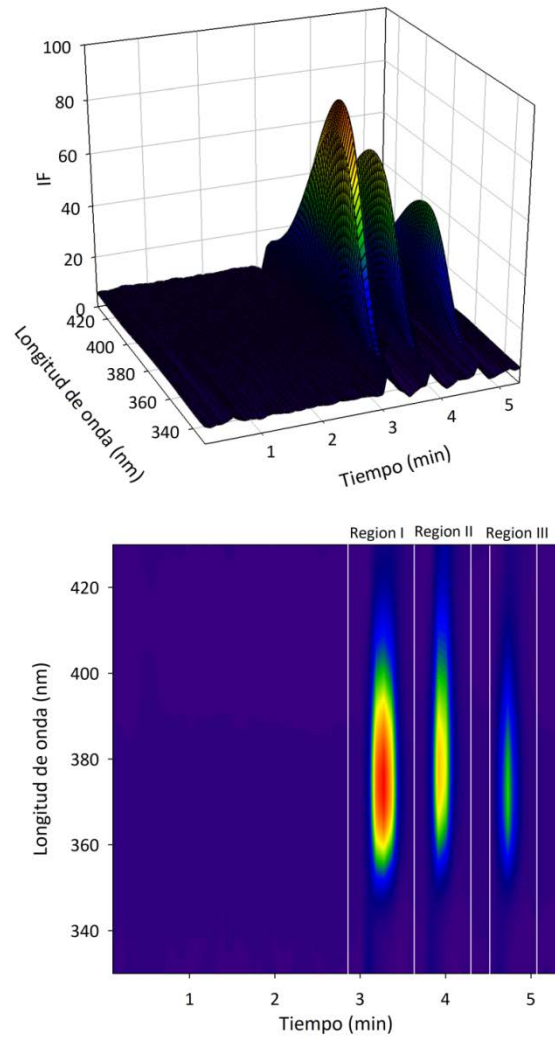
Dada la imposibilidad de analizar los cinco metabolitos mediante calibración univariante, el análisis se realizó mediante calibración de segundo orden basada en las matrices de datos tiempo de elución-longitud de onda de emisión, obtenidas excitando todos los analitos a una longitud de onda de compromiso de 250 nm. Con respecto al 4-OHPh, aunque este metabolito no presenta interferencias de los otros analitos y podría ser cuantificado mediante calibración univariante, sin embargo, también fue analizado mediante calibración multivariante debido a que hay que tener en cuenta la posible presencia de componentes inesperados en la matriz de la muestra y que pueden solapar con este pico.



### 2.2.2. Registro de los datos de segundo orden

Para cada muestra se registraron 101 espectros de emisión excitando a 250 nm entre 330 y 430 nm, con un intervalo de 1 nm y entre 0 y 5.5 minutos en intervalos de 5.4 segundos. En la **Figura 2.4** se muestra un cromatograma tridimensional y su mapa de contorno para la muestra de validación número 8.

Para simplificar, los datos cromatográficos de segundo orden se dividieron en tres regiones de acuerdo al eje de tiempo de elución: la región I comprende entre 2.9 y 3.6 minutos e incluye al 2-OHPH y el 3-OHPH; la región II, entre 3.6 y 4.3 minutos e incluye al 1-OHPH y 9-OHPH y, por último, la región III, que incluye al 4-OHPH se encuentra entre 4.5 y 5.1 min.



**Figura 2.4.** Cromatogramas tridimensionales de la muestra de validación número 8 y su mapa de contorno de dos dimensiones con las regiones seleccionadas.

### 2.2.3. Set de muestras de calibración

Con objeto de lograr la cuantificación individual de todos los analitos que coeluyen se aplicaron varios algoritmos de calibración multivariante para ver cuál de ellos proporciona mejores resultados. Así se aplicaron los algoritmos de mínimos cuadrados parciales concatenados (U-PLS) y mínimos cuadrados parciales multidimensionales (N-PLS), con y sin RBL, dependiendo de la presencia o ausencia de interferencias en la muestra, y Resolución Multivariable de Curvas-Mínimos Cuadrados Alternos (MCR-ALS).

Los algoritmos U-PLS y N-PLS fueron ya descritos en la Introducción de esta parte de la Memoria. Cuando hay componentes no esperados en la muestra, se aplica el procedimiento RBL. Así, para un cierto número de componentes principales, la misión del RBL es la minimización del error residual a un nivel compatible con el grado de ruido presente en las señales medidas [1–3].

En el análisis mediante MCR-ALS, como se comentó en la Introducción, se crea una matriz de datos aumentada a partir de las matrices de calibración y validación. La resolución se logra utilizando una inicialización con parámetros lo más cerca posible de los resultados finales [4–6].

En primer lugar, con estos algoritmos se procesó la matriz de calibración, que fue preparada siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.1.3 y se seleccionó el número de componentes óptimos en cada caso. Posteriormente, la capacidad predictiva de los diferentes algoritmos se evaluó mediante muestras de validación.

#### 2.2.3.1. Análisis U-PLS y N-PLS

El número óptimo de constituyentes de la muestra o variables latentes se evaluó para cada una de las regiones de forma separada, para ello se empleó la validación cruzada y el criterio de Haaland y Thomas [7]. Por lo tanto, el número óptimo de factores se calculó mediante la razón  $F(A) = PRESS(A < A^*) / PRESS(A)$ , donde  $PRESS = \sum (y_{i,act} - y_{i,pred})^2$ ,  $A$  es un número prueba de factores y  $A^*$  corresponde al mínimo  $PRESS$ , y seleccionando el número óptimo de factores que conduce a una probabilidad de menos del 75% para que  $F > 1$ . En la región I, para 2- y 3-OHPH, el número de factores óptimo fue seis. Cuando se analizó la región II, el número de factores óptimo para el 1- y el 9-OHPH fue cinco. Por último para el 4-OHPH, el número de factores fue cuatro.

#### 2.2.3.2. Análisis mediante MCR-ALS

El número óptimo de componentes en cada matriz aumentada se estimó mediante análisis de componentes principales (PCA) y se aplicó el algoritmo en cada región. Para cada una de las regiones se construyó una matriz aumentada en la dirección del tiempo de elución al agregar cada muestra desconocida a las 34 muestras de calibración.

Durante el ajuste de ALS, se aplicaron las siguientes restricciones: no negatividad en ambos modos (datos espectrales de emisión y tiempo de elución) y unimodalidad en el modo de tiempo de elución solo para las señales correspondientes a los analitos y no a las señales del fondo.

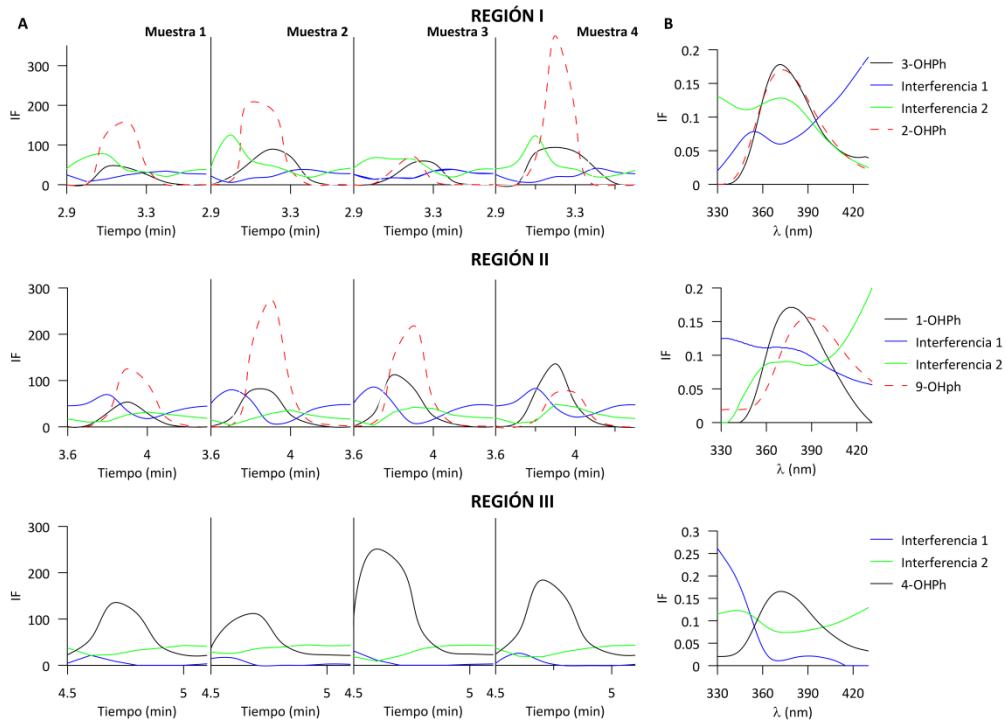
El número de factores óptimo fue cuatro en la región I y II y tres factores en la región III. En la **Figura 2.5** se muestran los perfiles temporales y los perfiles espectrales de cada región, para las cuatro primeras muestras de validación. Cuando se compararon los perfiles de los espectros de emisión con los espectros puros de los analitos, se confirmó que los perfiles espectrales recuperados están de acuerdo con los espectros de los analitos puros.

Tanto para este algoritmo como para los anteriores, el número de factores óptimos es mayor que el número de analitos en cada región. Este hecho podría explicarse mediante tres razones principales: las diferencias que existen entre las magnitudes de las señales de los OHPs, la baja concentración analizada y la necesidad de modelar la dispersión residual. La intensidad de la señal del 9-OHP es un 70 % menor que la del 1-OHP y ambos presentan una gran similitud en los espectros de excitación y emisión. Por otro lado, la concentración de los metabolitos son tan bajas que sus señales relativas son del mismo nivel que otras contribuciones del fondo. Todos estos aspectos influyen en que el número de componentes necesarios fuera mayor que el número de analitos. Además, como ya se comentó anteriormente los metabolitos muestran una gran similitud en los espectros de excitación y emisión, siendo la diferencia entre los máximos de emisión del 2-OHP y el 3-OHP es de solo 1 nm, mientras que para el 1-OHP y el 9-OHP la diferencia en el máximo de emisión es de 10 nm, pero sus tiempos de elución son prácticamente similares. Además estos dos últimos analitos, los cuales coeluyen en el pico 2, muestran gran diferencia en la intensidad de fluorescencia.

Todos estos factores pueden contribuir a un aumento del número de componentes para los distintos algoritmos, permitiendo que los componentes adicionales resuelvan la interacción entre los analitos. Esto está de acuerdo con resultados previos sobre la

## 2. Determinación metabolitos fenantreno en leche

determinación de PAHs mediante EEMs y usando diferentes algoritmos de calibración multivariante de segundo orden [8].



**Figura 2.5.** Perfiles de elución y espectros de emisión recuperados mediante el análisis MCR-ALS para cada región y para las cuatro primeras muestras de validación.

### 2.2.4. Comparación de los resultados de validación

Para comparar el poder de resolución de los tres algoritmos en términos de capacidad predictiva, se compararon las concentraciones puestas y las predichas por los modelos en el análisis de las doce muestras de validación. En la **Tabla 2.2** se resumen dichas concentraciones, además de los valores medio de las recuperaciones.

**Tabla 2.2.** Concentraciones predichas para las muestras de validación usando U-PLS, N-PLS y MCR-ALS.

Región	Análito (ng · mL <sup>-1</sup> )	Muestras de validación												% Recuperación media (±SD) <sup>a</sup>	RMSEP <sup>b</sup>	REP <sup>c</sup>	
		Método	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11				12
<b>Región I</b>	2OHPh	Puesto	<b>3.0</b>	<b>3.5</b>	<b>1.0</b>	<b>8.0</b>	<b>4.0</b>	<b>2.0</b>	<b>7.0</b>	<b>4.5</b>	<b>5.0</b>	<b>9.0</b>	<b>1.5</b>	<b>6.0</b>			
		UPLS	3.2	3.4	1.1	5.1	5.1	1.7	7.6	4.1	5.1	8.9	1.8	5.8	102 (20)	0.97	22.00
		NPLS	3.2	3.4	1.1	5.1	5.1	1.7	7.4	4.1	5.1	8.8	1.8	5.8	102 (20)	0.96	21.87
		MCR-ALS	1.4	2.6	0.4	3.7	4.9	2.3	7.3	4.1	5.4	11.1	3.7	5.4	126 (67)	1.72	39.58
<b>Región II</b>	3OHPh	Puesto	<b>1.0</b>	<b>3.0</b>	<b>2.0</b>	<b>2.5</b>	<b>6.0</b>	<b>4.0</b>	<b>5.5</b>	<b>3.5</b>	<b>5.0</b>	<b>9.0</b>	<b>7.0</b>	<b>4.5</b>			
		UPLS	1.0	3.2	2.1	2.8	6.0	4.3	6.5	4.6	5.3	9.8	7.1	4.2	95 (8)	0.45	9.59
		NPLS	0.9	3.2	2.1	2.9	6.2	4.3	6.7	4.6	5.3	9.9	7.1	4.2	94 (9)	0.52	10.94
		MCR-ALS	1.1	3.2	1.3	4.0	6.0	3.5	7.3	4.2	5.9	10.7	5.7	4.9	97 (24)	0.92	19.07
<b>Región III</b>	1OHPh	Actual	<b>1.0</b>	<b>1.5</b>	<b>2.0</b>	<b>3.0</b>	<b>4.0</b>	<b>5.0</b>	<b>6.0</b>	<b>7.0</b>	<b>8.0</b>	<b>9.0</b>	<b>3.5</b>	<b>4.5</b>			
		UPLS	1.0	1.6	2.3	2.9	4.7	4.9	6.8	7.1	8.3	10.1	3.5	4.4	105 (8)	0.50	10.33
		NPLS	0.9	1.5	2.3	2.8	4.7	4.8	6.9	7.6	8.2	10.4	3.5	4.4	105 (9)	0.61	12.65
		MCR-ALS	1.0	1.5	2.1	2.9	4.2	4.8	6.1	7.4	8.3	10.4	3.5	4.5	102 (5)	0.45	9.61
<b>Región III</b>	9OHPh	Actual	<b>24.9</b>	<b>45.0</b>	<b>40.1</b>	<b>15.0</b>	<b>27.5</b>	<b>20.0</b>	<b>5.0</b>	<b>17.5</b>	<b>30.0</b>	<b>32.5</b>	<b>15.0</b>	<b>35.0</b>			
		UPLS	25.0	45.3	38.4	17.0	27.5	20.3	6.2	20.8	29.2	32.1	15.60	31.3	104 (10)	1.76	6.83
		NPLS	25.1	45.2	38.4	17.2	27.7	20.5	6.1	21.0	29.1	31.9	15.72	31.3	104 (10)	1.82	7.06
		MCR-ALS	24.6	45.5	38.4	16.8	28.3	20.0	5.9	17.0	29.8	32.6	15.63	31.2	99 (8)	1.33	5.22
<b>Región III</b>	4OHPh	Actual	<b>2.0</b>	<b>1.5</b>	<b>4</b>	<b>2.5</b>	<b>1.0</b>	<b>5.5</b>	<b>9.0</b>	<b>4.5</b>	<b>6.0</b>	<b>6.5</b>	<b>3.0</b>	<b>3.5</b>			
		UPLS	2.0	1.5	3.5	2.7	1.0	5.7	7.8	4.7	6.4	7.1	3.2	3.7	98 (9)	0.48	11.62
		NPLS	2.1	1.5	3.4	2.7	1.1	5.7	7.6	4.7	6.5	7.0	3.3	3.7	98 (10)	0.52	12.67
		MCR-ALS	1.9	1.3	3.7	2.6	1.1	5.6	8.8	4.6	6.2	6.8	2.9	3.4	101 (5)	0.16	3.98

<sup>a</sup> Recuperación media y su desviación estándar; <sup>b</sup> RMSE, error cuadrático de la media (root mean square error); <sup>c</sup> REP, error relativo de la predicción en %.

## 2. Determinación metabolitos fenantreno en leche

---

Como se puede observar, en la región I, los valores de recuperación obtenidos mediante U-PLS y N-PLS fueron del 102 % para el 2-OHPH y del 94-95% para el 3-OHPH, mientras que mediante MCR-ALS los valores de recuperación fueron de 126% para el 2-OHPH y 97% para el 3-OHPH.

En la región II, las recuperaciones para el 1-OHPH y el 9-OHPH fueron similares para todos los algoritmos, con un valor medio de 104 % para el 1-OHPH y 102 % para el 9-OHPH. Por último, en la región III, los valores de recuperación obtenidos para el 4-OHPH estuvieron entre el 98 % para U-PLS y N-PLS y 101 % para MCR-ALS.

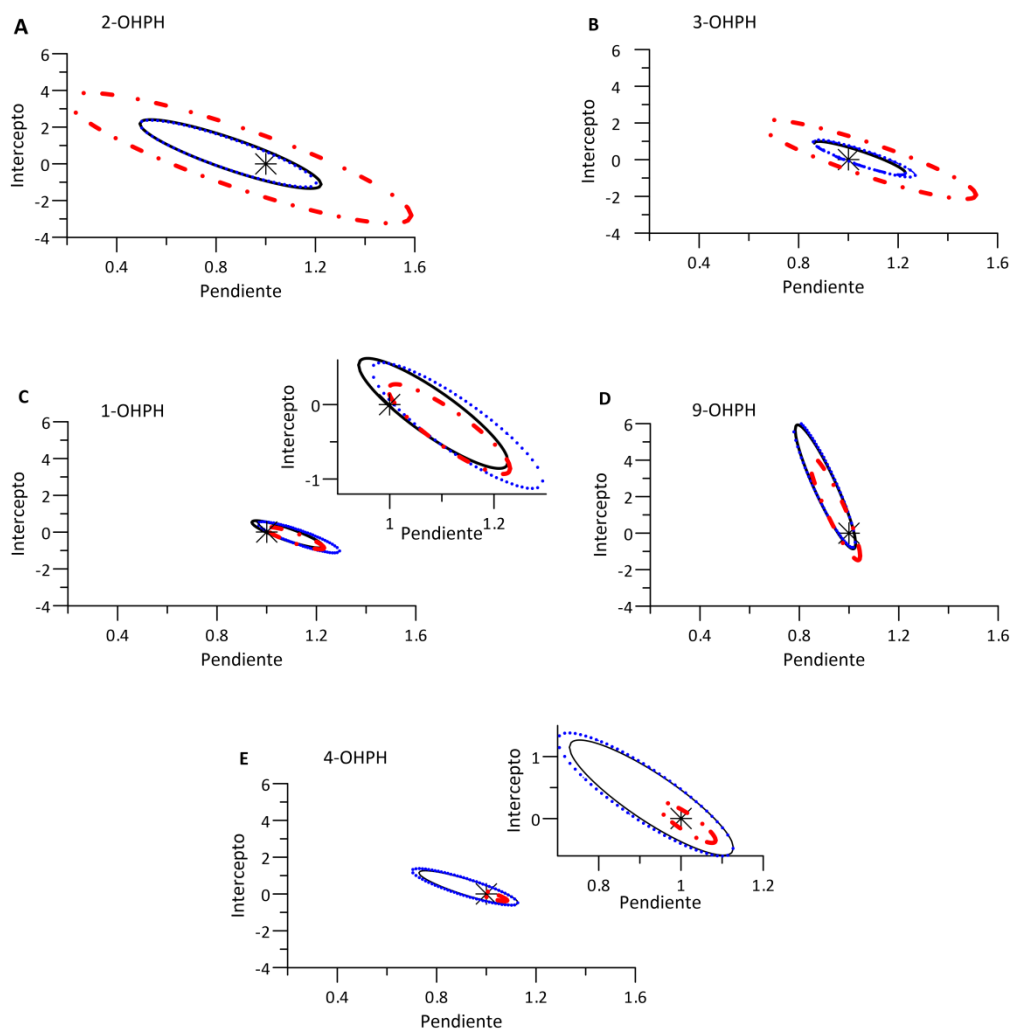
Para evaluar la pendiente y el intercepto correspondiente a la regresión lineal de la concentración puesta vs la concentración encontrada, se realizó un test de la elipse (EJCR, elliptical joint confidence región) al 95 % de confianza [8] para cada hidroximetabolito. En la región I, para el 2- y el 3-OHPH, todas las elipses incluyen el punto teórico (1, 0), como se muestran en la **Figura 2.6 A** y **Figura 2.6 B**. Además, se puede observar que las elipses para U-PLS y N-PLS son significativamente menores que la correspondiente al modelo MCR-ALS, lo que sugiere una mayor precisión para los primeros algoritmos. También se puede apreciar que los tamaños de las elipses son muy similares para U-PLS y N-PLS, confirmando que los resultados obtenidos por ambos métodos son muy similares.

En la Región II, el análisis EJCR para el 1- y el 9-OHPH muestra que el tamaño de las elipses es muy similar con todos los algoritmos y para ambos metabolitos, confirmando que se obtienen resultados equivalentes usando los tres algoritmos en esta región. Además todas las elipses incluyen el punto teórico (1, 0), como se observa en la **Figura 2.6 C** y **Figura 2.6 D**. Por último, para la región III, donde eluye el 4-OHPH, las elipses de todos los algoritmos incluyen el punto (1, 0) y el tamaño de las elipses de U-PLS y N-PLS son mayores que la elipse obtenida con el modelo MCR-ALS, como puede observarse en la **Figura 2.6 E**.

Los parámetros estadísticos, el error cuadrático de la media (root mean square error) (RMSE) o el error relativo de la predicción en % (relative error prediction) (REP), obtenidos con cada uno de los algoritmos, se resumen en la **Tabla 2.2**. Se puede observar que el 9-OHPH presenta mayores valores de las figuras de mérito debido a su baja intensidad de fluorescencia en comparación con otros analitos. En general, con los tres algoritmos todos los parámetros obtenidos son buenos, indicando que la metodología propuesta puede ser útil para la simultánea determinación de los cinco OHPHs.

La posibilidad de la identificación individual de 1-, 2-, 3-, 4- y 9-OHPH mediante HPLC es una gran innovación para el análisis de los metabolitos del fenantreno. En ninguno de los

métodos previamente propuestos mediante HPLC es posible la cuantificación del 9-OHP, o porque no se incluye en el análisis [9] o porque coeluye con el 1-OHP [10] y no se puede cuantificar separadamente.



**Figura 2.6.** Elipses para el 95% de confianza de las pendientes e interceptos de la regresión para los cinco analitos y los tres modelos estudiados. El punto teórico (intercepto = 0; pendiente= 1) se marca en la figura mediante un asterisco negro.

U-PLS/RBL (línea negra sólida), N-PLS/RBL (línea azul discontinua), MCR-ALS (línea roja discontinua).



### 2.2.5. Análisis de muestras de leche

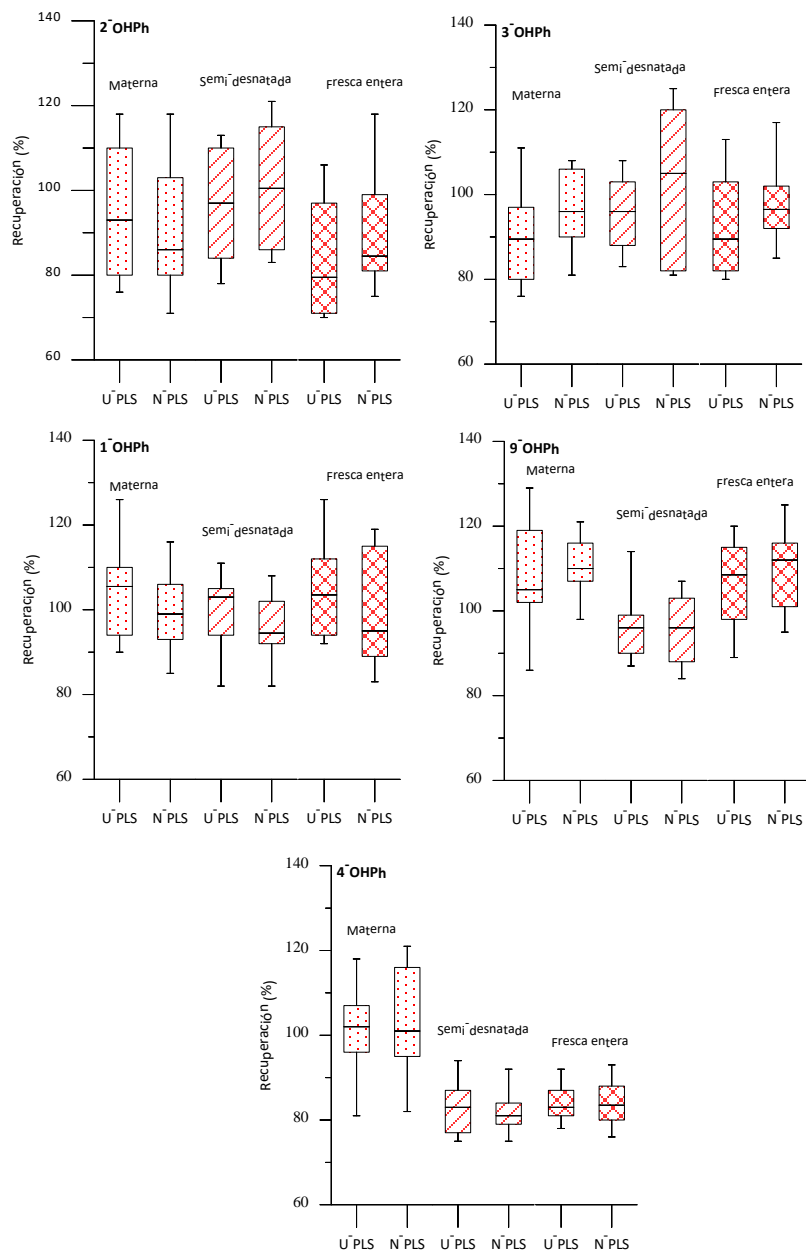
Con el objetivo de aplicar el procedimiento optimizado al análisis de muestras reales, se analizaron diferentes tipos de leche. Estas muestras fueron leche de vaca semidesnatada, leche de vaca entera fresca y leche materna. La composición de la leche de vaca y materna difiere en su contenido de carbohidratos, proteínas y grasa, así, el contenido de proteínas en la leche entera de vaca es más del doble que en la leche materna. Además, también varía el tipo de proteínas encontradas, siendo la razón lactosuero/caseína 60:40 para la leche materna y 20:80 para la leche de vaca entera. En cuanto al porcentaje de grasa, este es similar para ambos tipos de leche, pero la leche de vaca contiene más ácido grasos saturados, mientras que la leche materna contiene más ácidos grasos insaturados.

Para realizar el análisis de las muestras de leche, se contaminaron todas las muestras con los cinco analitos y se llevaron a cabo estudios de recuperación. Para ello se contaminó 1 mL de cada muestra de leche con los diferentes OHPs a cinco niveles de concentración comprendida entre 0.7 y 6.2 ng·mL<sup>-1</sup> para 1-, 2-, 3- y 4-OHP y entre 2.8 y 24.8 ng·mL<sup>-1</sup> para el 9-OHP. Se analizaron dos réplicas de cada muestra de leche siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.1.4. Hay que remarcar que no se pudieron utilizar filtros de nylon porque los analitos se retienen en esta membrana, y por ello se usaron filtros PTFE de 0.22 µm en todos los casos.

Una vez obtenidos los datos de segundo orden de las muestras, se aplicaron los algoritmos U-PLS/RBL, N-PLS/RBL and MCR-ALS. Los resultados obtenidos mediante el algoritmo MCR-ALS son aceptables solamente para el 1-OHP, mientras que las predicciones de U-PLS/RBL y N-PLS/RBL fueron buenas para todos los analitos, en todas las muestras de leche y para todos los niveles. En la **Figura 2.7** se representan las recuperaciones obtenidas con estos dos últimos algoritmos, donde se resumen los resultados para cada OHP en cada muestra analizada mediante un diagrama de cajas y bigotes. La línea central representa la media y la más baja y la más alta representan los percentiles 25 y 75.

Las recuperaciones estuvieron entre el 80 y el 120 % y la mayor dispersión de los datos se encontró para el 2- y el 3-OHP. Para el 1- y el 9-OHP no se encontraron diferencias significativas entre los tres tipos de leches analizadas. En cuanto al 4-OHP, la precisión de las recuperaciones obtenidas fue muy buena.

Hay que resaltar que para la leche materna, donde no existen datos previos sobre el análisis de estos analitos, se obtuvieron muy buenos resultados para todos los OHPs.



**Figura 2.7.** Diagramas de caja y bigotes para cada uno de los metabolitos en leche materna y en leche de vaca semidesnatada y fresca entera mediante U-PLS/RBL y N-PLS/RBL.

### 2.3. Conclusiones

En este estudio se han cuantificado por primera vez, y usando HPLC, los cinco hidroximetabolitos principales del fenantreno. Se compararon diferentes algoritmos quimiométricos de segundo orden para el análisis de los OHPs en matrices complejas como son la leche de vaca y la leche materna. En las muestras de validación todos los algoritmos proporcionaron resultados adecuados, sin embargo, en las muestras de leche los resultados obtenidos con MCR-ALS no fueron tan buenos como los obtenidos con los algoritmos PLS.

Este algoritmo es más sensible a la complejidad de la matriz que los algoritmos PLS y además hay que tener en cuenta la alta similitud espectral que presentan estos compuestos. Sin embargo, este algoritmo tiene la ventaja de ser capaz de recuperar la información espectral de los analitos.

Los buenos resultados obtenidos con U-PLS y N-PLS, una vez combinados con RBL, se pueden justificar por el uso de variables latentes que son suficientemente flexibles para salvar el problema de la alta similitud espectral y las escasas variaciones en los tiempos de retención.

Con estos dos algoritmos, los resultados analíticos para la leche materna y la leche de vaca, tanto semidesnatada como fresca fueron satisfactorios, teniendo en cuenta la complejidad de las muestras de leche y la propiedades espectroscópicas similares que presentan los metabolitos estudiados.

Por último hay que resaltar que la posibilidad de la cuantificación individual de los metabolitos 1-, 2-, 3-, 4- y 9-OHPH mediante HPLC es una gran innovación para el análisis de la exposición a los PAHs ya que no existían métodos previos que posibilitaran su cuantificación individual. Además, hay que resaltar que el método propuesto es altamente sensible, requiere pequeñas cantidades de muestra y se necesita un corto período de tiempo para su análisis cromatográfico, lo que minimiza el gasto de disolventes orgánicos.

## 2.4. Bibliografía

- [1] J. Öhman, P. Geladi, S. Wold, Residual bilinearization. Part 1: Theory and algorithms, *J. Chemom.* 4 (1990) 79–90.
- [2] A.C. Olivieri, On a versatile second-order multivariate calibration method based on partial least-squares and residual bilinearization: Second-order advantage and precision properties, *J. Chemom.* 19 (2005) 253–265.
- [3] J.A. Arancibia, A.C. Olivieri, D.B. Gil, A.E. Mansilla, I. Durán-Merás, A.M. De La Peña, Trilinear least-squares and unfolded-PLS coupled to residual trilinearization: New chemometric tools for the analysis of four-way instrumental data, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 80 (2006) 77–86.
- [4] V. Boeris, J.A. Arancibia, A.C. Olivieri, Determination of five pesticides in juice, fruit and vegetable samples by means of liquid chromatography combined with multivariate curve resolution, *Anal. Chim. Acta.* 814 (2014) 23–30.
- [5] R. Tauler, A. de Juan, *Data Handling in Science and Technology* 29:247-292, *Data Handl. Sci. Technol.* 29 (2015) 247–292.
- [6] A.C. Olivieri, G.M. Escandar, H.C. Goicoechea, A. Muñoz de la Peña, Chapter 8 - Unfolded and Multiway Partial Least-Squares with Residual Multilinearization: Applications, *Data Handl. Sci. Technol.* 29 (2015) 365–397.
- [7] D.M. Haaland, E. V. Thomas, Partial Least-Squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1193–1202.
- [8] A.G. González, M.A. Herrador, A.G. Asuero, Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays, *Talanta.* 48 (1999) 729–736.
- [9] Y. Wang, L. Meng, E.N. Pittman, A. Etheredge, K. Hubbard, D.A. Trinidad, K. Kato, X. Ye, A.M. Calafat, Quantification of urinary mono-hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons by on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 931–937.
- [10] T. Chetiyakornkul, A. Toriba, T. Kameda, N. Tang, K. Hayakawa, Simultaneous determination of urinary hydroxylated metabolites of naphthalene, fluorene, phenanthrene, fluoranthene and pyrene as multiple biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 712–718.

## **CONCLUSIONES**

---



---

El trabajo de investigación llevado a cabo en esta Tesis Doctoral, nos ha permitido obtener las siguientes conclusiones:

1. Se ha desarrollado un método mediante cromatografía de líquidos de alta resolución que utiliza por primera vez un detector de masas de simple cuadrupolo y fuente de ionización por electrospray para el análisis de pteridinas en muestras de orina. Se determinan once pteridinas en su estado de oxidación natural de excreción, resolviendo entre otras las parejas de isómeros NEO-MON y XAN-ISO en un tiempo de 16 minutos.
2. Los resultados obtenidos han demostrado que las formas pteridínicas predominantes en la orina de adultos sanos son las dihidropteridinas. Los valores de las relaciones NEO/CREA y NEO<sub>T</sub>/BIO<sub>T</sub> en muestras de orina no oxidadas de voluntarios sanos, son similares a los encontrados en la literatura. Se confirma que la relación NEO/CREA es menor que los valores publicados para orinas de personas con alguna patología.
3. Un nuevo método de cromatografía de líquidos con detector de masas ha permitido el análisis de pteridinas en tomates, siendo necesario un tratamiento previa de las muestras mediante extracción con metanol y limpieza mediante SPE. Se han detectado solamente cuatro de las once pteridinas ensayadas, NEO, NH<sub>2</sub>, 6HMPT y PT6C, siendo NH<sub>2</sub> el más abundante. Este método puede constituir una alternativa útil para el seguimiento de los estudios de biofortificación de folatos, pudiendo ser modificado fácilmente para analizar otros vegetales con el mismo objetivo.
4. Mediante cromatografía de líquida con detector fluorescente de registro rápido se ha desarrollado un método para el análisis de pteridinas, con la sensibilidad adecuada para su análisis en suero humano. La separación se lleva a cabo mediante una columna con partículas de núcleo sólido, la cual logra proporcionar la adecuada resolución de nueve pteridinas en 15 minutos.
5. En este caso, es necesario un pretratamiento de la muestra de suero que incluye tres pasos: precipitación ácida, oxidación I<sub>2</sub>/I<sup>-</sup> y limpieza mediante SPE. Las pteridinas se determinan en su forma oxidada. Por primera vez, se ha conseguido analizar simultáneamente nueve pteridinas en muestras de suero y establecer un patrón de referencia para el contenido de pteridinas en suero de personas sanas.
6. Los estudios fotoquímicos de folatos han reflejado que el ácido fólico y sus metabolitos, el ácido tetrahidrofólico y el 5-metiltetrahidrofólico, se ven afectados por la irradiación UV. Se comprueba que la intensidad de fluorescencia del ácido fólico se ve incrementada

## Conclusiones

---

considerablemente cuando es irradiado con luz UV. La presencia de peróxido de hidrógeno acelera la formación de los fotoproductos fluorescentes.

7. El seguimiento cromatográfico de estos procesos de irradiación ha permitido la identificación de los principales fotoproductos fluorescentes formados, mediante comparación de los tiempos de retención y de los espectros fluorescentes en los picos. Para el ácido fólico, el principal fotoproducto a tiempos cortos de irradiación es el pterin-6-carboxílico, y el pterin para tiempos elevados. THF y 5MTHF sufren menores cambios estructurales debido a que su principal ruta de fotodescomposición es la pérdida de la cadena de glutamato.
8. Un estudio pormenorizado mediante espectrometría de masas de los diferentes procesos de irradiación ha permitido establecer rutas complejas de formación de fotoproductos que aparecen descritos en la Memoria, donde se aprecia la generación tanto de productos fluorescentes y como de otros que no los son.
9. El comportamiento fotoquímico de los folatos ha permitido el desarrollo de un método cromatográfico para determinar ácido fólico y sus dos principales metabolitos, mediante fotoderivatización on-line postcolumna con detección fluorimétrica; permitiendo así la determinación fluorimétrica del ácido fólico con elevada sensibilidad. Los tiempos de elución con respecto a los descritos previamente para estos analitos se reducen drásticamente.
10. El método propuesto se ha aplicado al análisis de muestras de tomate, espinacas y cereales de desayuno enriquecidos. Se aplica un pretratamiento compuesto por tres etapas: extracción, de-conjugación enzimática y purificación mediante cartuchos de intercambio aniónico. Los resultados han permitido la determinación de los tres folatos en todas las muestras y la obtención recuperaciones satisfactorias para varios niveles de enriquecimiento. En el caso de las muestras de suero no se ha logrado la sensibilidad suficiente para su análisis en muestras de suero sin enriquecer.
11. La combinación de matrices tiempo de elución-longitud de onda de emisión con calibración multivariante, utilizando diversos algoritmos como son MCR-ALS, U-PLS/RBL y N-PLS/RBL ha permitido, por primera vez, mediante HPLC el análisis simultáneo e individual de los cinco isómeros metabolitos del fenantreno. Se emplea un modo isocrático y un corto tiempo de elución inferior a 5.5 minutos. Esta separación no puede ser solventada cromatográficamente por tratamientos univariante de los datos.



12. La evaluación de la capacidad predictiva de los diferentes algoritmos de segundo orden, MCR-ALS, U-PLS/RBL y N-PLS/RBL, ha mostrado resultados satisfactorios para todas las muestras de validación. Las muestras de leche (leche semidesnatada, leche fresca entera y leche materna) enriquecidas con estos analitos solamente han podido ser resueltas mediante U-PLS/RBL y N-PLS/RBL, obteniéndose en ambos casos valores adecuados de recuperaciones.



## **CONCLUSIONS**

---



## Conclusions

---

The research work carried out in this Doctoral Thesis, has allowed us to obtain the following conclusions:

1. A method has been developed by high-performance liquid chromatography using, for the first time, a single-quadrupole mass detector and an electrospray ionization source for the analysis of pteridines in urine samples. Eleven pteridines are determined in their natural oxidation state of excretion, resolving, among others, the isomers NEO-MON and XAN-ISO in 16 minutes.
2. The results obtained have shown that the predominant pteridine forms in healthy adults urine are dihydropteridines. The values of the NEO/CREA and NEO<sub>T</sub>/BIO<sub>T</sub> ratios in non-oxidized urine samples of healthy volunteers are similar to those found in the literature. It is confirmed that the NEO/CREA relationship is lower than the values published for urine of people with some pathology.
3. A new method of liquid chromatography with mass detector has allowed the analysis of pteridines in tomatoes, requiring prior treatment of the samples by extraction with methanol and cleaning by SPE. Only four of the eleven pteridines tested were detected, NEO, NH<sub>2</sub>, 6HMPT and PT6C, with NH<sub>2</sub> being the most abundant. This method can be a useful alternative for monitoring the studies of folate biofortification, and can easily be modified to analyze other plants with the same objective.
4. A method with the appropriate sensitivity for the analysis of pteridines in human serum has been developed by liquid chromatography with fast scanning fluorescent detector. The separation is carried out by means of a column with solid core particles, which provides the adequate resolution of nine pteridines in 15 minutes.
5. In this method, a serum sample pretreatment is necessary. It includes three steps: acid precipitation, I<sub>2</sub>/I<sup>-</sup> oxidation and purification by SPE. Pteridines are determined in their oxidized form. For the first time, the simultaneous analysis of nine pteridines in serum samples and the establishment a reference pattern for the pteridine content in serum of healthy people has been possible.
6. Photochemical studies of folates have shown that folic acid and its metabolites, tetrahydrofolic acid and 5-methyltetrahydrofolic, are affected by UV irradiation. It is found that the fluorescence intensity of folic acid is considerably increased when it is irradiated with UV light, Presence of hydrogen peroxide accelerates the fluorescent photoproducts formation.

7. The chromatographic monitoring of these irradiation processes has allowed the identification of the main fluorescent photoproducts formed, by comparing the retention times and the fluorescent spectra. The main photoproduct of folic acid at short irradiation times is pterin-6-carboxylic acid, and pterin for high times. THF and 5MTHF undergo minor structural changes because their main route of photodecomposition is the loss of the glutamate chain.
8. A detailed study by mass spectrometry of the different irradiation processes has allowed to establish complex pathways for the formation of photoproducts. They are described in this Report, where the generation of both fluorescent and other non-fluorescent products is appreciated.
9. The photochemical behavior of folates has allowed the development of a chromatographic method to determine folic acid and its two main metabolites, by post-column photoderivatization with fluorometric detection. This method allows the fluorimetric determination of folic acid with high sensitivity. The elution times for these analytes are drastically reduced with respect to those previously described.
10. The proposed method has been applied to the analysis of tomato, spinach and breakfast cereals fortified with folates samples. The pretreatment consists of three steps: extraction, enzymatic de-conjugation and purification by anion exchange cartridges. The results have allowed the determination of the three folates in all the samples and obtaining satisfactory recoveries for several levels of enrichment. In the case of serum samples, sufficient sensitivity has not been achieved for analysis of unenriched serum samples.
11. The combination of elution time-emission wavelength matrices with multivariate calibration, using different algorithms such as MCR-ALS, U-PLS / RBL and N-PLS / RBL, has enabled, for the first time, the simultaneous and individual HPLC analysis of the five metabolites of phenanthrene. An isocratic mode and a short elution time of less than 5.5 minutes are used. This separation cannot be solved chromatographically by univariate treatments of the data.
12. The evaluation of the predictive capacity of the different second-order algorithms, MCR-ALS, U-PLS/RBL and N-PLS/RBL, has shown satisfactory results for all the validation samples. Samples of milk (semi-skimmed milk, whole milk and breast milk) fortified with these analytes could only be solved by U-PLS/RBL and N-PLS/RBL, obtaining in both cases adequate recovery values.

**ANEXOS**

---

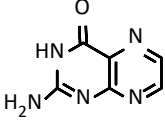

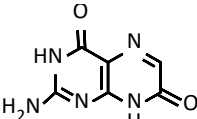
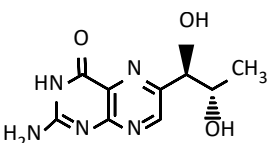
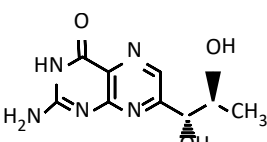
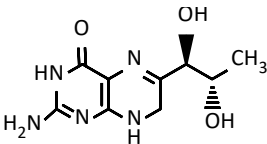
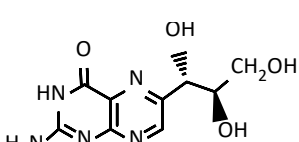
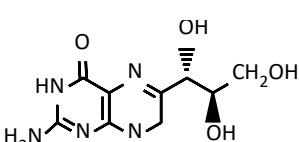




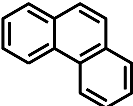
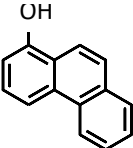
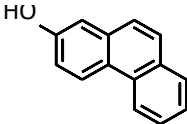
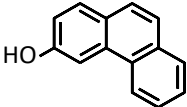
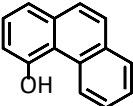
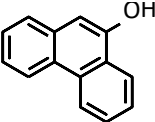
## **Anexo 1. Estructuras**

---



Nombre y acrónimo	Estructura química	Masa molecular (g/mol)
<b>COMPUESTOS PTERIDÍNICOS</b>		
Pterin (PT)		163
Xantopterin (XAN)		179
Isoxantopterin (ISO)		179
Biopterin (BIO)		237
7-Biopterin (7BIO)		237
7,8-Dihidrobiopterin (BH2)		239
Neopterin (NEO)		253
7,8-Dihidroneopterin (NH2)		255

Nombre y acrónimo	Estructura química	Masa molecular (g/mol)
Monapterin (MON)		253
Ácido pterin-6-carboxílico (PT6C)		207
6-hidroximetilpterin (6HMPT)		193
6-hidroximetil-7,8-dihidropterin (6HMDHPT)		195
6-metilpterin (6MPT)		193
FOLATOS		
Ácido fólico (AF)		441
Ácido tetrahidrofólico (THF)		445
Ácido 5-metiltetrahidrofólico (5MTHF)		459

Nombre y acrónimo	Estructura química	Masa molecular (g/mol)
<b>FENANTRENO Y METABOLITOS</b>		
Fenantreno (Ph)		178
1-hidroxifenantreno (1-OHPh)		194
2-hidroxifenantreno (2-OHPh)		194
3-hidroxifenantreno (3-OHPh)		194
4-hidroxifenantreno (4-OHPh)		194
9-hidroxifenantreno (9-OHPh)		194



## **Anexo 2. Materiales, instrumentos y programas informáticos**

---





**MATERIALES**

Patrones utilizados:

- Neopterin (NEO), 6-biopterin (BIO), 7-biopterin, ácido pterin-6-carboxílico (PT6C), pterin (PT), monapterin (MON), isoxanthopterin (ISO), xanthopterin (XAN), 6-hydroxymethylpterin (6HMPT), 6-metilpterin (6MPT), 6,7-dihidroneopterin (NH2), 6,7-dihidrobiopterin (BH2) del 98% de pureza suministradas por SchircksLaboratory (Jona, Switzarland).
- Ácido fólico (AF) suministrado por Sigma (Sigma - Aldrich Química, Madrid).
- Ácido tetrahidrofólico (THF) y ácido 5-metiltetrahidrofólico (5MTHF) suministrados por SchircksLaboratory (Jona, Switzarland).
- 2-Hidroxifenantreno (2-OHPh), 3-hidroxifenantreno (3-OHPh) y 9-hidroxifenantreno (9-OHPh), como solidos de alta pureza obtenidos de LGC-Dr Ehrenstorfer GmbH (LGC Standards, SLU, Barcelona).
- Disoluciones individuales de 1-hidroxifenantreno (1-OHPh) y 4-hidroxifenantreno (4-OHPh) de concentración  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  en acetonitrilo suministradas por LGC-Dr Ehrenstorfer GmbH (LGC Standards, SLU, Barcelona).
- Creatinina (CREA), suministrada por Sigma (Sigma - Aldrich Química, Madrid).

Y otros reactivos y disolventes:

- Acetato de sodio, suministrado Sigma (Sigma - Aldrich Química, Madrid).
- Acetonitrilo (ACN), grado HPLC, suministrado por Merck (Madrid, Spain) y Panreac (Barcelona)
- Ácido 2- (ciclohexilamino)etanosulfónico (CHES) de Sigma (Sigma - Aldrich Química, Madrid).
- Ácido 4-(2-hidroxietil)piperacina-1-etanosulfónico (HEPES) de Sigma (Sigma - Aldrich Química, Madrid).
- Ácido ascórbico, suministrado por Sigma (Sigma - Aldrich Química, Madrid).
- Ácido clorhídrico (HCl), suministrado por Panreac (Barcelona, Spain) y Scharlau (Barcelona).

## Anexo 2

---

- Ácido fórmico suministrado por Sigma (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid).
- Ácido fosfórico suministrado por Scharlau (Barcelona) y Panreac (Barcelona).
- Ácido pícrico suministrado por Sigma (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid).
- Ácido tricloroacético (TCA) suministrado por Panreac (Barcelona).
- Agua ultrapura obtenida de un sistema Milli-Q (Waters Millipore, Milford, USA).
- Cloruro de sodio de Sigma (Sigma - Aldrich Química, Madrid).
- Ditiotreitól (DTT) suministrado por Sigma (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid).
- Dodecil sulfato de sodio (SDS) suministrado por Sigma (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid).
- Formiato amónico suministrado por Sigma (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid).
- $\beta$ -glucuronidasa (30 U/mL)/aryl sulfatasa (60 U/mL) de *Helix pomatia*, suministradas por Merck (Barcelona).
- Hidróxido sódico (NaOH) suministrado por Sigma (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid).
- Ioduro potásico e yodo se adquirieron a Sigma (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid).
- Mercaptoetanol de Sigma (Sigma - Aldrich Química, Madrid).
- Metanol (MEOH), grado HPLC, fue suministrado por Panreac (Barcelona, Spain) y Scharlau(Barcelona).
- Plasma de rata liofilizado de Sigma (Sigma - Aldrich Química, Madrid).
- Peróxido de hidrógeno de Sigma (Sigma - Aldrich Química, Madrid).
- Suero sintético en forma de liofilizado de Sigma (Sigma - Aldrich Química, Madrid).

También se han empleado los siguientes materiales:

- Cartuchos de extracción en fase sólida ISOLUTE ENV+ que consiste en una resina no polar basada en un copolímero de poliestireno hidroxilado y divinilbenceno.
- Cartuchos de extracción en fase sólida Sep-Pak Waters Accell Plus QMA SAX de 360 mg de sorbente por cartucho, de tamaño de partícula 37-55  $\mu$ m) que contiene relleno de sílica, hidrofílico y de fuerte intercambio aniónico con gran tamaño de poro (300 Å).

- Cartuchos de extracción en fase sólida Sep-Pak Waters C8 de 400 mg de sorbente por cartucho y tamaño de partícula 37-55  $\mu\text{m}$ .
- Cartuchos de extracción en fase sólida Sep-Pak Waters C18 de 360 mg, de tamaño de partícula 55-105  $\mu\text{m}$ .
- Cartuchos de extracción en fase sólida Sep-Pak Waters OASIS MAX 3 cc de 60 mg de sorbente por cartucho, de tamaño de partícula 30  $\mu\text{m}$ ) que contiene un sorbente polimérico en modo mixto que permite una mayor selectividad y sensibilidad para extraer compuesto ácidos con grupos de intercambio de aniones.
- Filtros de membrana de nylon de 0.22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.
- Filtros de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0.22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.

## **INSTRUMENTACIÓN**

Para el desarrollo de la parte experimental que se describe en esta memoria se han utilizado los siguientes instrumentos o dispositivos:

- Cromatógrafo de líquidos Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), compuesto por desgasificador de disolventes 1100, bomba cuaternaria 1100, muestreador automático 1290 Infinity con termostato y horno para la columna 1200.

En función del método se emplearon los distintos detectores:

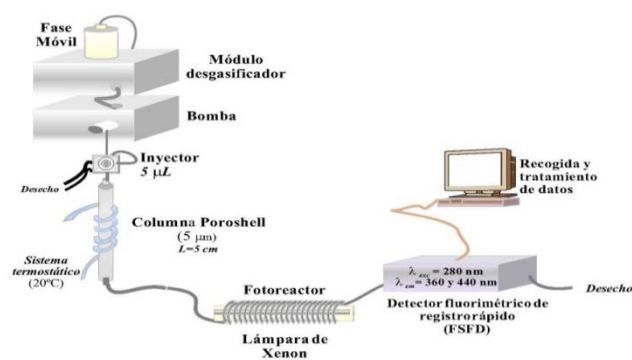
- Detector UV-visible en serie de diodos (DAD) Agilent Technologies 1100.
- Detector fluorescente de barrido rápido (FLD) Agilent Technologies 1100.
- Detector de espectrometría de masas de simple cuadrupolo Agilent Technologies 6120 con fuente de ionización por electrospray (ESI). Este detector consta de nitrógeno como gas nebulizador.

También en el caso necesario se acopló a este equipo cromatográfico un fotorreactor postcolumna (Aura industries, Nueva York, USA) que está formado por un tubo de PTFE de 4m x 0.3 mm de diámetro interno y 1.6 mm de diámetro externo, enrollado alrededor de una lámpara de xenón de 10 W.

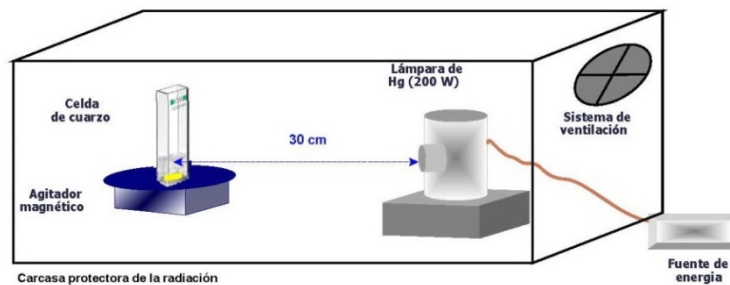
En La Figura 1 se muestra un esquema del sistema cromatográfico con el detector en línea.

- Cromatógrafo de líquidos Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), compuesto por desgasificador de disolventes, bomba cuaternaria, válvula de inyección manual de seis vías (Rheodyne) y horno para la columna. Este cromatógrafo tiene acoplado en serie un detector UV-Visible de diodo array y un detector fluorescente de registro rápido.
- En función del método se emplearon las siguientes columnas cromatográficas:
  - Columna analítica Zorbax Eclipse XDB-C18 de 250 mm × 4.6 mm y 5 µm de tamaño de partícula (Agilent Technologies).
  - Columna analítica Zorbax Eclipse XDB-C18 de 150 mm × 4.6 mm y 5.6 µm de tamaño de partícula (Agilent Technologies).
  - Columna analítica Poroshell 120 de 150 mm × 3 mm y 2.7 µm de tamaño de partícula (Agilent Technologies).
  - Columna analítica Poroshell 120 EC C8 de 50 mm × 4.6 mm y 2.7 µm de tamaño de partícula (Agilent Technologies).
- Sistema de irradiación off-line. Lámpara de Hg de alta presión 200 W HBO, con una fuente de energía Oriel modelo 8500 (Spectra-Physics, Newport, USA). El sistema de irradiación incluye una caja ventilada, lámpara de Hg y celdas de cuarzo (3 mL). La celda se coloca en un dispositivo agitado magnéticamente a 30 cm de la lámpara. Un esquema de este sistema se muestra en la Figura 2.
- Espectrómetro de masas de alta resolución Agilent Technologies QTOF 520, con fuente de ionización de electrospray (ESI).
- Espectrómetro Varian, modelo Cary 50 Bio equipado con lámpara de Xenon.
- pH-Metro CrisonMicroPH 501 (Barcelona, España) con electrodo combinado de vidrio-calomelanos saturado (Ag/AgCl).
- Balanza analítica *Scaltec* 2001, con una sensibilidad de ± 0.1 mg.
- Sistema de obtención de agua ultrapura, Milli-Q, módulos RIOs/elix y Milli Q (Waters Millipore, Milford, MA, USA).
- Vortex OVAN, modeloVibramix-R (Lovango S.L.).
- Baño de ultrasonidos P. SELECTA.

- Centrífuga P.SELECTA Angular 6, modelo 540.
- Baño termostático Selecta, modelo Frigiterm.
- Liofilizador Telstar Lyo Quest



**Figura 1.** Esquema del sistema HPLC con derivatización química post-columna.



**Figura 2.** Esquema del sistema de irradiación off-line.

### PROGRAMAS INFORMÁTICOS

- HP ChemStation para LC/MSD (Rev. B.04.01., Agilent Technologies, Alemania).
- OpenLAB Lc ChemStarion Software (Version A.01.04)
- MATLAB Versión R2010 y R2016 (Microsoft Corporation, Washington, EEUU).
- ACOC, programa informático realizado en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Extremadura, escrito bajo el entorno de programación Matlab 5.3, [1].
- MVC2, programa realizado por A.C. Olivieri y col. Universidad Nacional de Rosario, Argentina. Es una interface gráfica integrada en MATLAB para realizar calibración multivariante de segundo orden que permite emplear diversos algoritmos quimiométricos [2]. Este software se puede descargar libremente desde la página web [www.iquir-conicet.gov.ar/descargas/mvc2.rar](http://www.iquir-conicet.gov.ar/descargas/mvc2.rar).
- Grapher Versión 8.0.278 (Golden Software Inc., Colorado. USA).
- Sigma Plot, v. 11.0, Systat Software, Inc.
- THE UNSCRAMBLER Version 6.11 (Camo, Noruega).
- Chem BioDraw Ultra 12.0.

### REFERENCIAS

- [1] A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña, D. Gonzalez-Gomez, A. Muñoz de la Peña, D. Gonzalez-Gomez, Using univariate linear regression calibration software in the MATLAB environment . Application to chemistry laboratory practices, Chem. Educ. 10 (2005) 337–345.
- [2] A.C. Olivieri, H.L. Wu, R.Q. Yu, MVC2: A MATLAB graphical interface toolbox for second-order multivariate calibration, Chemom. Intell. Lab. Syst. 96 (2009) 246–251.

## **Anexo 3. Artículos publicados**

---







## A simple HPLC-ESI-MS method for the direct determination of ten pteridinic biomarkers in human urine

A. Jiménez Girón\*, E. Martín-Tornero, M.C. Hurtado Sánchez, I. Durán Merás, A. Espinosa Mansilla

Department of Analytical Chemistry, University of Extremadura, Avda. Elvas s/n, 06006 Badajoz, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 July 2012

Received in revised form

24 September 2012

Accepted 27 September 2012

Available online 5 October 2012

#### Keywords:

Pteridines

Liquid chromatography

Mass spectrometry

Matrix effect

Urine

### ABSTRACT

Pteridines are important biomarkers metabolites related to several biochemical pathways such as activation of the cell-mediated immune system, biosynthesis of neurotransmitters, etc. The level of pteridinic compounds in urine is considered as an important clinic criterion. In this work, a new liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method is proposed to determine several pteridinic biomarkers in urine samples using 6-methylpterin as internal standard (I.S.). Matrix effect was evaluated and several dilutions of urine were tested in order to study the evolution of signal suppression. Sample preparation was limited to 10-fold dilution of the filtered urine followed by injection onto a reversed-phase column. The signal was recorded in selected ion monitoring mode. The lowest limit of detection was found for pterin (values ranged from 1.70 to 3.88 ng mL<sup>-1</sup>) whereas the highest limit was for xanthopterin (values ranged from 10.5 to 49.9 ng mL<sup>-1</sup>) for healthy volunteers between 17 and 51 years old.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

While the clinical symptoms of a disease are endpoints in themselves, they are not suitable, in many cases, for early detection and, therefore, prevention of disease. Currently, using first level biomarkers may be proven to relate directly to functional changes, and ultimately disease [1].

Non-conjugated folates (pteridines) belong to a heterocyclic family formed by a bicyclic pyrimidine-pyrazine moiety that occurs in a wide range of living systems and participates in relevant biological functions [2]. Pteridines exist in different oxidation states and as consequence they are divided into two classes: oxidized or aromatic pteridines, such as biopterin (BIO), neopterin (NEO) between others, and reduced pteridines, dihydropteridines and tetrahydropteridines, which are the ones mostly excreted in biological fluids [3]. Within the latter group, 7,8-dihydropteridines and 5,6,7,8-tetrahydropteridines are the most important derivatives because of their biological activity, i.e. 7,8-dihydroneopterin (NH2) is excreted during the oxidative burst of stimulated macrophages. 7,8-dihydrobiopterin (BH2) and 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (BH4) participate in the metabolism of aminoacids and play a vital role in various biochemical pathways [4].

Pteridines and its derivatives are important cofactors in the process of cell metabolism. The urinary excretion of these compounds increases as a result of several disorders such as viral infection and different types of cancer [5,6]. Hence, the level of these compounds in urine, plasma and cerebrospinal fluid is established as an important clinical criterion. Although NEO has been classically considered as the most important pteridine as cancer marker, ratios of other pteridines are also used in clinical laboratories for cancer and precancer screening. Significant increase in the urinary excretion of xanthopterin (XAN), NEO and pterin (PT) [1], as well as significant decrease in isoxanthopterin (ISO) and NEO/BIO increment, was found in cancer patients [6]. It was reported that the mean NEO/BIO ratio for healthy individuals is 1.27 and for cancer patients is 2.59 [6] using CE analysis. On the other hand, an increase in the pterin-6-carboxylic acid (PT6C) excretion and a reduction in ISO were also reported by the same authors.

An increase of the NEO amount was also observed in children infected with mononucleosis [7]. NEO concentration was also found to be correlated with decline Alzheimer's disease patients [8].

It is known that alterations on the metabolic mechanism of BH4 give rise to different diseases, named hyperphenylalaninaemia (HPAs). The differential diagnostic of these HPAs is important to establish the adequate therapeutic protocol and is based on the measurement of pteridines and other metabolites excretion. Hence, the classical phenylketonuria produces increments in the urinary levels of NEO and BIO while the BH4 deficit produces a

\* Corresponding author. Tel.: +34 666293986; fax: +34 924274244.

E-mail addresses: [anamjg@unex.es](mailto:anamjg@unex.es), [ajimenezgiron@gmail.com](mailto:ajimenezgiron@gmail.com), [anamjg@hotmail.com](mailto:anamjg@hotmail.com) (A. Jiménez Girón).

decrease in the NEO and BIO levels [9–11]. Thus, NEO/BIO ratio is also used as a diagnostic criterion.

The quantitative determination of pteridines is complicated because of their low concentration in body fluids, low solubility, their photosensitivity and their occurrence in three forms (tetrahydro-, dihydro-, and completely oxidized form). Traditionally, analysis of pteridines required their oxidation into their highly fluorescent aromatic forms. Under acidic conditions iodine treatment gives near complete (90–100%) conversion of dihydro- and tetrahydropteridines to their fully oxidized forms. However, under basic oxidation conditions [12], tetrahydropteridines are converted to 2-amino-4-hydroxypteridine (pterin) due to cleavage of the 6-side chain, whereas dihydropteridines are converted to their respective oxidized pterines. Hence, BH<sub>4</sub> have been determined by differential methods, with the loss of security that this type of analysis involves [13].

In the recent bibliography, HPLC separation accomplished with fluorimetric detection is widely applied in order to obtain adequate detection limits in biological fluids analysis [7,14–16]. Although liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) is a technique widely applied in the analysis of biological fluids, it has been rarely used in the pteridinic markers analysis. Hydroxymethylpterin was analyzed in several samples by comparing its retention time, mass, and fragmentation pattern with that of a known standard [17]. Stea and coworkers report a method for the derivatization and GC-MS analysis of 6-hydroxymethylpterin [18]. NEO and BIO have been determined in rats and human plasma, cell extracts and tissue homogenates by LC-MS/MS using a QTRAP triple quadrupole mass spectrometer [19]. Recently, it has been reported the evaluation of hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in the analysis of polar pteridines using MS detection, but it has not been implemented to any real sample [20]. As far as we know, this is the first contribution on which a HPLC-ESI-MS method has been developed to determine several pteridinic biomarkers (chemical structures are shown in Fig. 1) in human urine in the oxidation level they are excreted. Sample preparation was limited to 10-fold dilution of the urine into the internal standard solution followed by injection. The method has been validated in terms of linearity, limits of detection and quantification and repeatability, and it has been applied to the analysis of urine from seven healthy adults. The amount of pteridines was reported as a ratio of pteridine to creatinine in order to assure that the pteridine levels represent the physiological concentration. Moreover, NEO/BIO ratios were calculated. Thus this method allows easy determination without prior stages of sample treatment.

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

Creatinine (CREA), ditioneitol (DTT), NEO, BIO, PT6C, PT, monapterin (MON), ISO, XAN, 6-hydroxymethylpterin (6HMPT) and NH<sub>2</sub> were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid). BH<sub>2</sub> and 6-methylpterin (6MPT) were from Schircks Laboratories (Jona, Switzerland). Picric acid and sodium dodecyl sulfate (SDS) were from (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid). Phosphoric acid and methanol were purchased from Scharlau (Scharlau, Barcelona). Formic acid and ammonium formate were from Sigma (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid). Acetonitrile (HPLC grade) was purchased from Merck (Madrid, Spain). Ultrapure water was obtained using a Milli-Q system (Waters Millipore, Milford, MA, USA).

### 2.2. Sample preparation

#### 2.2.1. Standard preparation

Stock standard solutions (15 µg mL<sup>-1</sup>) were prepared by exact weighting of each pteridine and hydropteridine, dissolution with alkalized ultrapure grade water and later neutralization with hydrochloric acid. BH<sub>2</sub> and NH<sub>2</sub> standard solutions also contain 0.1% DTT to minimize the spontaneous oxidation of the reduced species due to environmental oxygen [7]. Exposure to direct sunlight was avoided. Pteridine standard solutions were stored at –18 °C in the dark and they were stable for at least 5 days. NH<sub>2</sub> and BH<sub>2</sub> stock standard solutions were prepared daily. CREA standard solution (1.0 mg mL<sup>-1</sup>) was prepared in ultrapure water and stored at 4 °C.

A standard working mixture solution containing 1.5 µg mL<sup>-1</sup> of each pteridine was prepared by dilution of the stock standard solutions with ultrapure water. A standard working mixture solution containing both hydropteridines, NH<sub>2</sub> and BH<sub>2</sub>, (1.5 µg mL<sup>-1</sup>) was prepared by dilution with ultrapure water containing 0.1% DTT. Other solutions were prepared via serial dilutions (and always containing 0.1% DTT) and used in the generation of the calibration curves.

#### 2.2.2. Urine samples

The first morning urine samples from seven healthy adults (5 women and 2 men; age range 17–51 years) were collected and stored, either in the refrigerator (4 °C) or freezer (–18 °C), depending on the time from collection to analysis. Prior to analysis, the samples were removed from cold storage and brought to room temperature. Urine samples were collected from volunteers that kindly consented to do the analysis.

Three milliliters of urine were filtered through 0.2 µm membrane nylon filters. 100 µL of filtered urine were pipette into an auto-sampler vial containing 20 µL of the 1.25 µg mL<sup>-1</sup> internal standard solution, 0.1% DTT, variable volumes of the standard working mixtures of pteridines and dihydropteridines (1.5 µg mL<sup>-1</sup>) and diluted to 1 mL with ultrapure water. Each analysis was realized in triplicate.

### 2.3. Instrumentation and software

The chromatographic studies were performed on an Agilent Model 1100 LC instrument (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), equipped with degasser, quaternary pump, column oven, autosampler Agilent 1290 infinity thermostated at 5 °C and the CHEMSTATION software package to control the instrument, data acquisition and data analysis. The analytical column employed was a Zorbax Eclipse XDB-C18, 250 mm × 4.6 mm and 5 µm particle size (Agilent Technologies). The column temperature was set at 22 °C. The mobile phases were high-purity water with 0.1% formic acid and 2% acetonitrile (A) and acetonitrile with 0.1% formic acid (B). The gradient program was as follows: 100% A in 8 min and then constant for another 4 min. A 10 min of post-run time back to the initial mobile phase composition was used after each analysis. Mobile phases were filtered through a 0.22 µm membrane nylon filter and degassed by ultrasonication before use. The flow rate was set constant at 0.6 mL min<sup>-1</sup> and the injection volume was 20 µL.

Detection was performed with a mass spectrometer Agilent Technologies single quadrupole 6120 equipped with an electrospray interface operated in the positive ionization mode. Nitrogen was used as the nebulizer gas. Optimization of the compounds was performed by flow injection analysis injecting individual standard solutions directly into the source. Initially, both positive

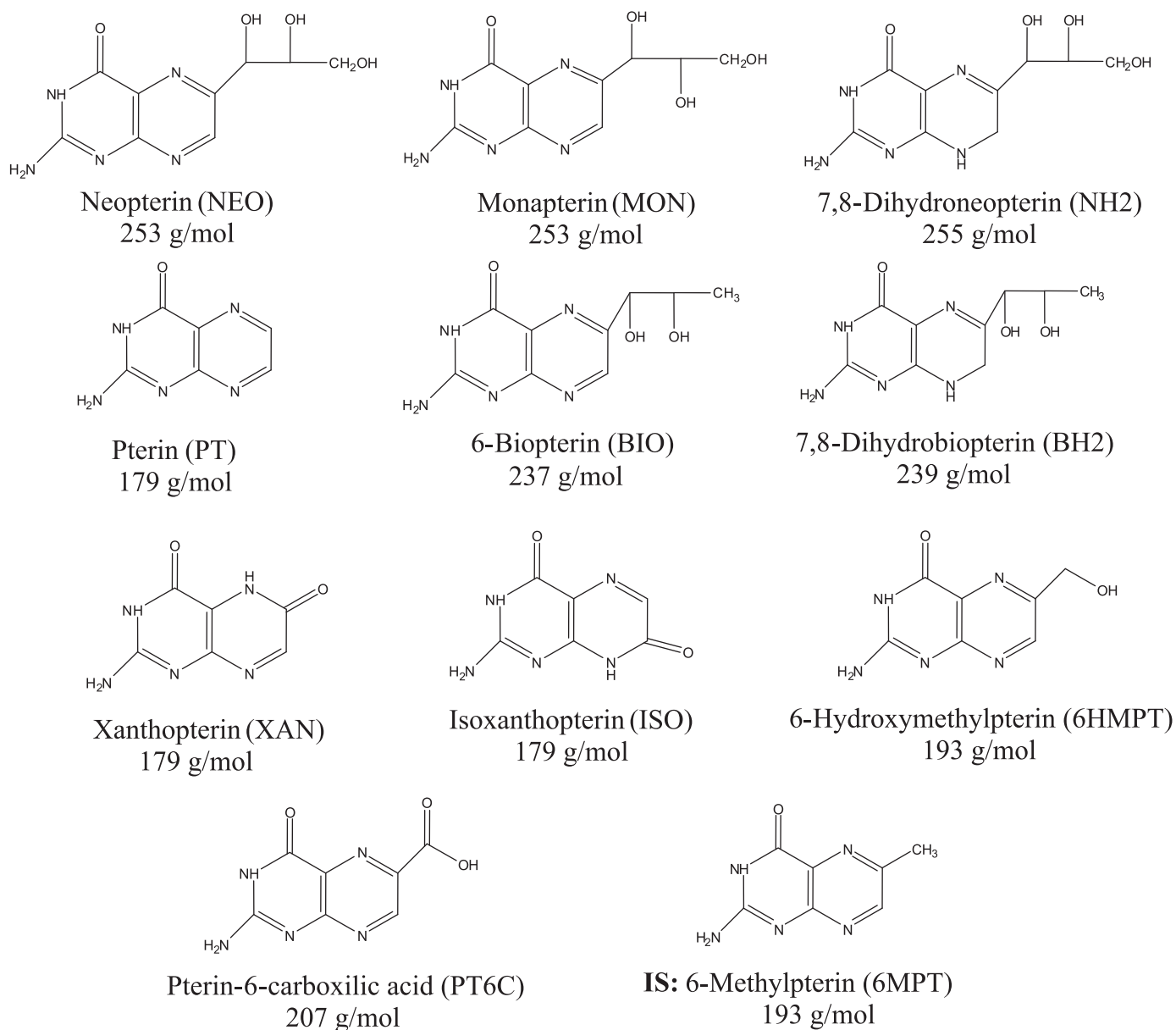


Fig. 1. Structures and molecular masses of pteridinic markers studied.

and negative ionization modes were investigated and positive polarity was preferred due to its higher sensitivity. Single ion monitoring (SIM) was selected as operation mode using the target ion  $[M+H]^+$  for all studied compounds.

Varian spectrophotometer, model Cary 50 Bio, equipped with a Xenon lamp was used for the acquisition of the photometric measurements and kinetic data used in the creatinine determination.

Calibration curves and analytical figures of merit were performed by means of the ACOC program, developed in our research group, in MatLab code [21].

#### 2.4. Matrix effect

For each compound, the slopes obtained in the calibration with matrix-matched standards were compared with those obtained with solvent-based standards, calculating urine/water slope ratios at different urine dilution levels. Specifically, five different calibration curves were prepared for each compound, one in solvent, and four in urine using dilution factors of 5, 10, 20 and 50. Each calibration curve comprised five concentration points in triplicate

within the range of 20–200 ng mL<sup>-1</sup> for all pteridines except XAN, for which the range 40–400 ng mL<sup>-1</sup> was employed due to its lower sensitivity.

For the I.S., the matrix effect was evaluated by comparing the peak areas of 6MPT at the concentration level selected for the study (25 ng mL<sup>-1</sup>) in urine at different dilutions (5, 10, 20 and 50) and in water. For each urine dilution, 10 identical spiked samples with the I.S. were prepared and the average peak area was used for calculation.

#### 2.5. Method validation

For quantification purposes, five matrix-matched standards of concentrations between 0 and 100 ng mL<sup>-1</sup> were prepared by spiking the urine samples with appropriate volumes of working standard solutions (corresponding to a concentration range of 0–1.0 µg mL<sup>-1</sup> referred to undiluted urine). For XAN, concentration ranged up to 400 ng mL<sup>-1</sup> due to its lower sensitivity (corresponding to a concentration ranged up to 4.0 µg mL<sup>-1</sup> in undiluted urine). Three independent experiments were carried

out for each concentration level. Pteridine/I.S. peak area ratios of the extracted ion chromatograms (EICs) were used for quantification purposes in order to improve the precision of quantitative analysis.

The limit of detection (LOD) was calculated according to the Long & Winefordner criterion [22]. Limit of quantification (LOQ) of the method was defined as 10/3 times LOD. Precision was assessed as the percentage relative standard deviation (% RSD) of both repeatability within-day ( $n=6$ ) and between-day ( $n=5$ ) for all compounds in a pool of 10-fold diluted urine spiked with a pteridine standard mixture at a concentration range within the calibration range.

## 2.6. Determination of creatinine

CREA was determined in urine samples with a kinetic-photometric method based on the Jaffe reaction [23]. It was treated with an alkaline picrate solution to yield a bright orange-red complex which was determined photometrically at 510 nm. The formation rate of the complex measured through the increase of absorbance in a prefixed interval of time was proportional to the concentration of CREA in the sample [24–26].

The reagent used to determine CREA in urine consisted on 25 mM of picric acid prepared in 300 mM phosphate buffer (pH 12.1) and  $2 \text{ g L}^{-1}$  SDS (to avoid protein precipitation). To conduct the kinetic-photometric method, 2 mL of picric acid solution was transferred to the photometric cell which was thermostated at 37 °C. Then, 200  $\mu\text{L}$  of 10-fold diluted urine was added and then, the evolution of the absorbance with time at 510 nm was scanned during 2 minutes. The reaction rate was measured as the tangent in the linear part of the kinetic curve between 0.3 and 1.5 min. Each sample was assayed in triplicate.

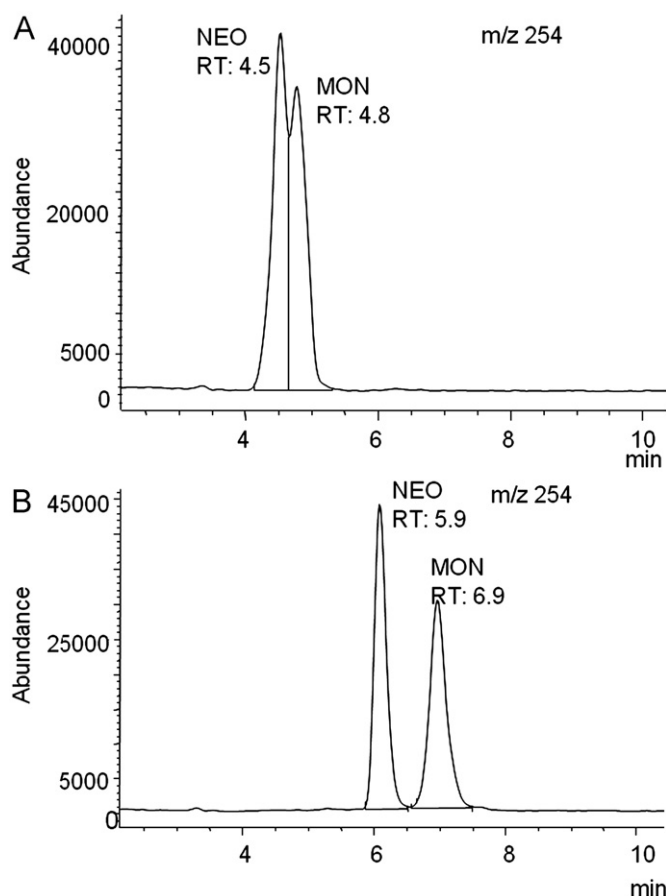
## 3. Results and discussion

### 3.1. Method development

#### 3.1.1. Optimization of the LC separation

A pteridines mixture in urine 10-fold diluted was employed to realize the optimization of the LC separation method. During this study, acetonitrile and methanol were evaluated as organic modifiers of the mobile phase, as well as the volatile additives formic acid and ammonium formate. The best chromatographic peak shapes and signal-to-noise (S/N) ratios of the analytes were obtained by the use of water/acetonitrile mixture with 0.1% formic acid.

A gradient elution was necessary because of the wide capacity factor's range of the pteridines in study. Firstly, the initial percentage of acetonitrile in the mobile phase A was evaluated in order to optimize the separation of the early eluting pteridines. In Fig. 2, the separation of the isomers NEO and MON at different water/acetonitrile percentage is shown. As it can be observed, an initial percentage of acetonitrile of 5% results in strong overlapping of both isomers preventing its quantification. However, when the mobile phase contained 2% of acetonitrile, both peaks are well resolved. Therefore, an initial water (with 0.1% of formic acid)/acetonitrile ratio of 98/2 (v/v) (mobile phase A) was selected as adequate to resolve the most polar pteridines. Then, different elution gradients, using increasing percentages of acetonitrile with 0.1% formic acid (mobile phase B), were tested in order to resolve the less polar pteridines and to achieve the separation of PT6C from an unknown interference with the same  $m/z$ , which was the more restricting parameter to shorten the chromatographic time. Finally, the gradient that provided the best separation and the greater baseline stability was as follows: 100% of



**Fig. 2.** Chromatograms obtained from isomers NEO and MON mixture using water with 0.1% formic acid and 5% acetonitrile (A) and water with 0.1% formic acid and 2% acetonitrile (B) in isocratic mode.

mobile phase A during 8 min followed by a linear gradient to 80% A in 8 min and then constant for another 4 min. A 10 min of post-run time back to the initial mobile phase composition was used after each analysis. Fig. 3 shows the total ion chromatogram (TIC) (including the gradient mode optimized) and the EICs obtained from the analysis of a pteridines mixture in urine 10-fold diluted. As it can be observed, good resolution was achieved for both isomeric pteridines NEO-MON and XAN-ISO with the same  $m/z$ .

#### 3.1.2. MS optimization

Flow injection analysis (FIA) of individual standard solutions at a concentration of  $300 \text{ ng mL}^{-1}$  was performed to optimize the main instrumental parameters (fragmentor and capillary voltage, nebulizer pressure, nitrogen flow rate and temperature) in ESI positive mode. Fragmentor voltage was optimized in the first place and mass spectra obtained in the full scan mode at different fragmentor voltages were investigated. Both positive and negative ionization modes were investigated in order to obtain the highest sensitivity for the analytes. The voltage value was studied in the range of 50 V–325 V. The results showed that the base peak (the highest ion peak in the mass spectrum, which can be selected as the target ions of the analytes) in the mass spectra was the protonated molecular ion,  $[M+H]^+$ . Fragmentor voltages of 150 V and higher led to extensive fragmentation even of the reference masses. The relative intensities of the protonated molecular ion of PT, 6HMPT and PT6C increased up to 75 V and decreased for higher voltages. However, the rest of analytes showed the highest abundance of the base peak with a fragmentor voltage of 100 V.

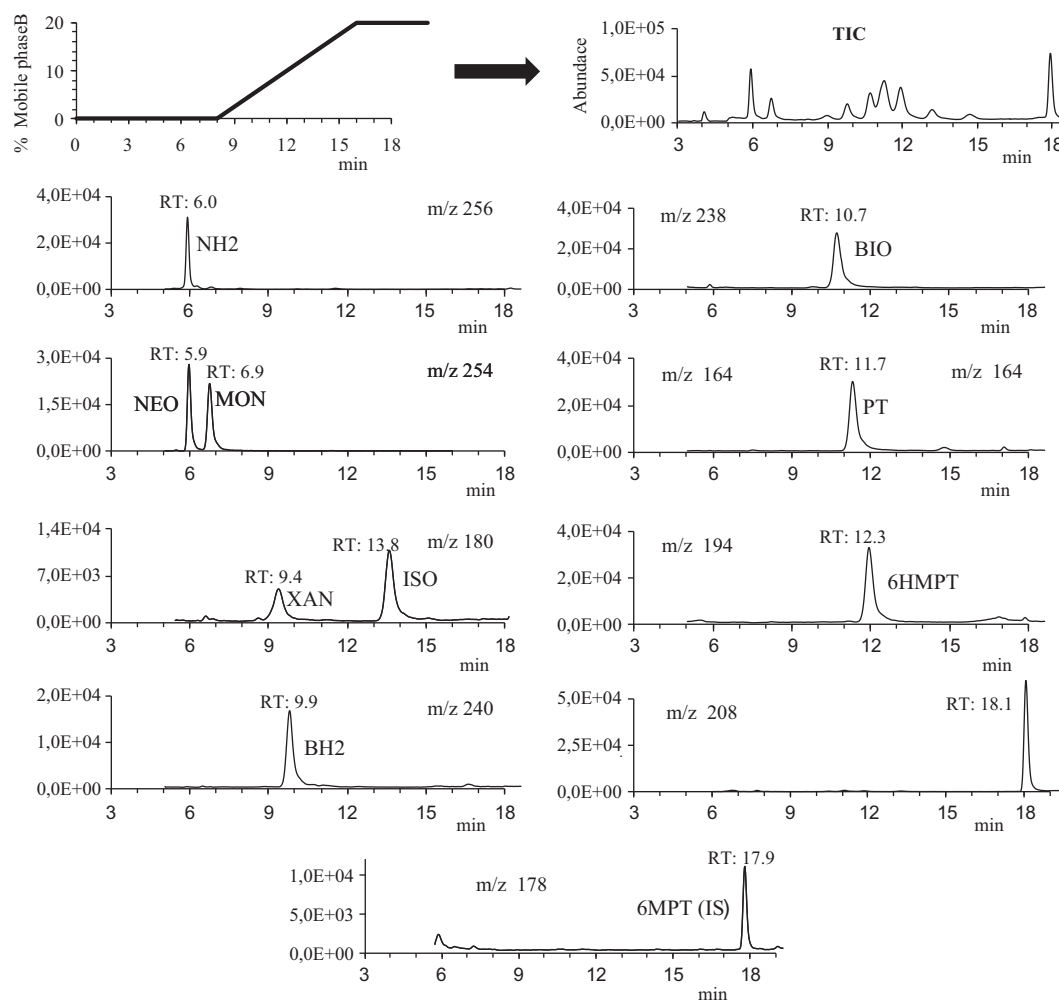


Fig. 3. TIC and EICs obtained from the analysis of pteridines and hydropteridines mixture in urine (10-fold diluted) with the optimized separation method.

A compromise value of 100 V was chosen for further experiments. The other instrumental parameters: drying gas flow rate, nebulizer pressure, capillary voltage and gas temperature, were evaluated in the SIM mode and optimized to obtain the highest intensity of the protonated molecular ion. Finally and in terms of sensitivity, the instrumental variables were set as follows: nebulizer pressure: 40 psig; drying gas: 10 L/min; gas temperature: 300 °C; capillary voltage: 4000 V; fragmentor voltage: 100 V.

### 3.2. Matrix effect

One significant drawback, especially when using electrospray ionization, is that the presence of matrix components may affect the ionization of the target analytes producing an ion formation suppression effect [27]. In these cases, the precision and accuracy of the method should be assessed using biofluids from different sources (subjects) [28]. To evaluate the extension of this effect, a pool of urine from different individuals at different dilution factors (5, 10, 20 and 50) was spiked with the standard mixture of pteridines at five different levels in triplicate and analyzed. A comparison between the slopes of calibration curves in water and in presence of urine for each analyte, was accomplished by applying the *F* and *t* statistical tests [29]. The *F*-test does not indicate significant differences, but the *t*-test shows  $t_{cal} > t_{tab}$  for all analytes at the 95% confidence level, indicating that the calibration slopes were not comparable and matrix effect was present. The results obtained for the different dilutions are

Table 1

Retention times and matrix effects in the analysis of pteridines in urine at different dilution factors.

Compound	$t_R$ (min)	Calibration curve in water			% Matrix effect <sup>a</sup>			
		Slope $\pm$ SD (mL ng <sup>-1</sup> )	$S_{y/x}$ <sup>b</sup>	$R^2$	Dilution factor			
					5	10	20	50
NEO	5.9	0.0261 $\pm$ 0.0008	0.0811	0.994	-65	-44	-40	-15
NH2	6.0	0.0179 $\pm$ 0.0006	0.0657	0.992	-57	-40	-35	-5
MON	6.9	0.0230 $\pm$ 0.0007	0.0730	0.994	-79	-33	-28	-14
XAN	9.4	0.0170 $\pm$ 0.0003	0.0742	0.992	-67	-44	nd	nd
BH2	9.9	0.0173 $\pm$ 0.0006	0.0600	0.993	-44	-31	-14	6
BIO	10.7	0.0269 $\pm$ 0.0009	0.0913	0.993	-63	-23	-14	-12
PT	11.7	0.0320 $\pm$ 0.0010	0.103	0.994	-79	-15	-10	-2
6HMPT	12.3	0.0235 $\pm$ 0.0008	0.0820	0.993	-66	-14	-10	-4
ISO	13.8	0.0118 $\pm$ 0.0005	0.0492	0.990	-76	-22	-13	-3
PT6C	18.1	0.0472 $\pm$ 0.0018	0.177	0.993	-71	-20	-15	-8

Note: nd = not detected; each calibration curve comprises five concentration levels in triplicate (20–200 ng mL<sup>-1</sup> for all pteridines except XAN: 40–400 ng mL<sup>-1</sup>).

<sup>a</sup> % Matrix effect = 100  $\times$  (urine/water slope ratio) – 100.

<sup>b</sup>  $S_{y/x}$  = Standard error of the estimate.

summarized in Table 1. Signal suppression was observed for all analytes in all urine samples evaluated. Although a softer matrix effect was found when 20-fold dilution of urine and higher



**Table 2**  
Analytical parameters for the analysis of pteridines in presence of urine (dilution factor: 10) by the HPLC-ESI-MS proposed method.

		Woman (51) <sup>a</sup>	Man (51) <sup>a</sup>	Man (50) <sup>a</sup>	Woman (33) <sup>a</sup>	Woman (32) <sup>a</sup>	Woman (22) <sup>a</sup>	Woman (17) <sup>a</sup>
NEO	Slope ( $\times 10^2$ ) (mL ng <sup>-1</sup> )	1.38 ± 0.04	1.95 ± 0.07	2.14 ± 0.07	1.38 ± 0.03	2.20 ± 0.03	1.87 ± 0.03	1.48 ± 0.04
	Intercept ( $\times 10^2$ )	40.9 ± 2.2	66.0 ± 3.3	45.0 ± 2.9	45.1 ± 1.5	36.6 ± 1.8	67.8 ± 1.6	70.8 ± 2.1
	Sy/x <sup>b</sup>	0.0537	0.0813	0.0698	0.0395	0.0492	0.0431	0.0491
	LOD <sup>c</sup> /LOQ <sup>d</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )	6.89/22.9	7.75/25.8	5.74/19.1	5.03/16.7	3.06/10.2	4.24/14.1	7.92/26.4
NH2	Slope ( $\times 10^2$ ) (mL ng <sup>-1</sup> )	1.56 ± 0.04	1.33 ± 0.05	2.00 ± 0.08	1.81 ± 0.05	2.45 ± 0.08	1.45 ± 0.06	1.21 ± 0.05
	Intercept ( $\times 10^2$ )	242.2 ± 2.0	238.1 ± 2.6	246.9 ± 3.6	395.9 ± 2.6	183.1 ± 6.2	268.6 ± 2.8	244.8 ± 0.4
	Sy/x <sup>b</sup>	0.0544	0.0677	0.0695	0.0710	0.1261	0.0700	0.0739
	LOD <sup>c</sup> /LOQ <sup>d</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )	14.5/48.3	24.5/81.6	19.0/63.3	22.4/74.6	14.1/46.9	27.3/90.9	33.1/110
MON	Slope ( $\times 10^2$ ) (mL ng <sup>-1</sup> )	1.10 ± 0.04	1.84 ± 0.05	1.78 ± 0.05	9.40 ± 0.02	1.79 ± 0.03	1.63 ± 0.03	1.35 ± 0.05
	Intercept ( $\times 10^2$ )							
	Sy/x <sup>b</sup>	0.0434	0.0607	0.0511	0.0247	0.0313	0.0329	0.0635
	LOD <sup>c</sup> /LOQ <sup>d</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )	6.22/20.7	4.72/15.7	4.15/13.8	3.70/12.3	2.88/9.6	2.91/9.7	6.28/20.9
XAN	Slope ( $\times 10^2$ ) (mL ng <sup>-1</sup> )	2.16 ± 0.08	1.09 ± 0.03	2.19 ± 0.13	1.38 ± 0.06	1.91 ± 0.08	1.68 ± 0.02	1.60 ± 0.06
	Intercept ( $\times 10^2$ )							
	Sy/x <sup>b</sup>	0.1581	0.0662	0.3999	0.1184	0.1485	0.0405	0.1823
	LOD <sup>c</sup> /LOQ <sup>d</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )	32.3/108	24.9/82.9	49.9/166	37.7/125	34.0/113	10.5/35.0	31.2/104
BH2	Slope ( $\times 10^2$ ) (mL ng <sup>-1</sup> )	2.61 ± 0.11	2.00 ± 0.07	2.07 ± 0.06	3.18 ± 0.15	4.00 ± 0.16	1.84 ± 0.05	1.95 ± 0.09
	Intercept ( $\times 10^2$ )	280.1 ± 5.8	101.8 ± 1.9	97.2 ± 3.1	589.8 ± 7.6	338.1 ± 14.4	171.2 ± 1.8	645.7 ± 6.1
	Sy/x <sup>b</sup>	0.1605	0.0344	0.0787	0.2071	0.2915	0.0424	0.0915
	LOD <sup>c</sup> /LOQ <sup>d</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )	20.9/69.6	7.37/21.4	9.75/32.5	31.3/104.2	20.03/66.7	9.05/30.1	55.5/184.8
BIO	Slope ( $\times 10^2$ ) (mL ng <sup>-1</sup> )	2.03 ± 0.04	2.92 ± 0.11	2.44 ± 0.08	1.69 ± 0.07	2.56 ± 0.04	2.26 ± 0.07	1.91 ± 0.06
	Intercept ( $\times 10^2$ )	29.1 ± 1.9	80.9 ± 4.5	21.6 ± 3.4	42.3 ± 3.3	27.9 ± 2.1	35.8 ± 2.6	61.1 ± 2.9
	Sy/x <sup>b</sup>	0.0469	0.1084	0.0674	0.0804	0.0439	0.0698	0.0747
	LOD <sup>c</sup> /LOQ <sup>d</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )	3.42/11.4	7.2/24.0	4.87/16.2	7.16/23.8	2.48/8.26	4.64/15.5	6.95/23.1
PT	Slope ( $\times 10^2$ ) (mL ng <sup>-1</sup> )	1.95 ± 0.03	3.70 ± 0.08	2.43 ± 0.09	1.69 ± 0.05	3.49 ± 0.04	3.18 ± 0.04	2.12 ± 0.05
	Intercept ( $\times 10^2$ )	35.6 ± 2.0		25.3 ± 1.1	18.9 ± 2.3		26.6 ± 2.0	30.8 ± 1.8
	Sy/x <sup>b</sup>	0.0245	0.0867	0.0212	0.0630	0.0387	0.0559	0.0430
	LOD <sup>c</sup> /LOQ <sup>d</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )	3.88/12.9	3.49/11.6	2.34/7.79	2.63/8.76	1.70/5.66	2.20/7.33	3.13/10.4
6HMPT	Slope ( $\times 10^2$ ) (mL ng <sup>-1</sup> )	1.91 ± 0.05	1.83 ± 0.04	2.45 ± 0.09	1.79 ± 0.06	2.49 ± 0.06	2.15 ± 0.07	1.42 ± 0.06
	Intercept ( $\times 10^2$ )							
	Sy/x <sup>b</sup>	0.0648	0.0413	0.0928	0.0614	0.0674	0.0816	0.0593
	LOD <sup>c</sup> /LOQ <sup>d</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )	5.23/17.4	3.31/11.0	5.46/18.2	4.94/16.5	3.82/12.7	5.49/18.3	6.59/21.9
ISO	Slope ( $\times 10^2$ ) (mL ng <sup>-1</sup> )	1.89 ± 0.05	1.19 ± 0.03	1.01 ± 0.02	1.83 ± 0.04	1.55 ± 0.03	1.01 ± 0.02	0.10 ± 0.02
	Intercept ( $\times 10^2$ )	5.78 ± 2.59		3.00 ± 0.92	10.4 ± 1.9		10.1 ± 0.8	15.1 ± 0.9
	Sy/x <sup>b</sup>	0.0662	0.0219	0.0183	0.0511	0.0376	0.0150	0.0243
	LOD <sup>c</sup> /LOQ <sup>d</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )	4.06/13.5	2.82/9.39	2.88/9.59	3.37/11.2	3.42/11.4	2.76/9.19	3.27/10.9
PT6C	Slope ( $\times 10^2$ ) (mL ng <sup>-1</sup> )	2.90 ± 0.06	1.16 ± 0.05	1.76 ± 0.04	2.99 ± 0.08	3.61 ± 0.04	3.47 ± 0.05	3.27 ± 0.05
	Intercept ( $\times 10^2$ )							
	Sy/x <sup>b</sup>	0.0799	0.0481	0.0330	0.0395	0.0537	0.0521	0.0449
	LOD <sup>c</sup> /LOQ <sup>d</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )	3.94/13.1	4.20/14.0	2.85/9.50	4.13/13.8	2.19/7.29	2.32/7.73	1.68/5.59

Note: Calibration range: 10–100 ng mL<sup>-1</sup> for all pteridines except XAN (150–400 ng mL<sup>-1</sup>). Blank urines were also included in the calibration. Intercept values of the calibration curve equal or below zero are shaded.

<sup>a</sup> Age.

<sup>b</sup> Standard error of the estimate.

<sup>c</sup> Limit of detection according to the Long & Winefordner criterion ( $k=3$ ) [24].

<sup>d</sup> LOQ = (10/3) LOD.

was employed, detectability of XAN was not assured in the studied range (40–400 ng mL<sup>-1</sup>). When a dilution factor of 5 was evaluated, a strong matrix effect was found for all compounds ( $\geq 44\%$ ). Therefore, a compromise dilution factor of 10 was selected in order to obtain the softest possible matrix effect assuring the detectability of all compounds at values reported in literature [6,11].

For the I.S., at the concentration level optimized for the method (25 ng mL<sup>-1</sup>), a signal suppression of 10% was found for the selected dilution factor ( $n=10$ ).

In general, the influence of the matrix effect is higher for the less retained analytes probably due to their coelution with polar compounds of urine.

### 3.3. Method validation

The method validation was carried out in terms of linearity, precision and accuracy, limits of detection (LOD) and

quantification (LOQ). Calibration curves were prepared by spiking seven urine samples at five different concentrations in triplicate, in the range 0–100 ng mL<sup>-1</sup> for all pteridines except XAN which was in the range 0–400 ng mL<sup>-1</sup> due to its lower sensitivity (see Section 2.2.2.). After optimization of the MS parameters, MS response of the I.S. (6MPT) was firstly tested using 10–100 ng mL<sup>-1</sup> solutions, as for the rest of the analytes. Considering the MS response, a final concentration of I.S. of 25 ng mL<sup>-1</sup> was considered to provide an optimum I.S. response and pteridine/I.S. peak area ratios of the EICs were used for quantification purposes.

Good linearity ( $R^2 \geq 0.99$ ) was observed for all pteridines in all samples. Results of the least squares regression analysis and detection and quantification limits for all urine samples are summarized in Table 2. The lowest limit of detection was found for PT (between 1.70 and 3.88 ng mL<sup>-1</sup>), while the highest limit was for XAN (between 10.5 and 49.9 ng mL<sup>-1</sup>) indicating a wide range of sensitivity between the different analytes in the studied urine samples. These limits are higher than those obtained by

HPLC with fluorescence detection [7,16,30]. Nevertheless, the omission of a previous oxidation step, plus the possibility of determining dihydropteridines and pteridines in the same run, makes MS an interesting alternative to fluorescence detection.

The precision study was made by using external and internal standard methodology. As expected, repeatability improved when the internal standard was employed. Results obtained are shown in Table 3. Intra-day ( $n=6$ ) and inter-day ( $n=5$ ) precision study was realized for a standard mixture of pteridines in presence of diluted urine (1:10) at a concentration level included in the calibration range. The relative standard deviations (% RSD) ranged from 1.9 to 9.2% in the intra-day injections and from 2.8 to 17% in the inter-day precision study, when I.S. was used.

**Table 3**  
Precision of the HPLC-ESI-MS proposed method.

Compound	Repeatability			
	Intra-day ( $n=6$ )		Inter-day ( $n=5$ )	
	RSD <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	RSD <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)
NEO	4.6	2.7	12	2.8
NH2	10.5	9.2	26	17
MON	3.4	3.3	12	5.4
XAN	6.7	5.0	13	5.3
BH2	6.4	4.8	20	11
BIO	3.3	2.3	11	4.7
PT	3.7	2.5	17	12
6HMPT	2.9	2.5	9.5	9.1
ISO	5.0	1.9	7.3	4.6
PT6C	4.1	2.7	12	9.5
6MPT (I.S.)	2.8	–	11	–

<sup>a</sup> Calculated using the pteridine peak areas of the EICs.

<sup>b</sup> Calculated using the pteridine/I.S. peak area ratios of the EICs.

The worst RSD values were those obtained for hydropteridines, NH2 and BH2, in the inter-day assay. This behavior is probably due to the aerial oxidation of the reduced forms. A significant improvement in inter-day assay RSD values is observed for NEO when I.S. is used. These results demonstrate the precision of the developed method and the potential of the proposed approach for quantitative purposes.

### 3.4. Application to urine samples

The proposed method was applied to the analysis of seven urine samples. In this study CREA has been included because urinary CREA has to be used to normalize the ratio of excretion of the studied biomarkers. The CREA of urine samples was analyzed spectrophotometrically by applying the modified Jaffe method (see Section 2.6.). Pteridines/CREA and NEO/BIO ratio values were calculated employing the average value ( $n=3$ ) obtained for pteridines and CREA in each urine sample. Results obtained are shown in Table 4. In all un-oxidized adult urines, the quantifiable pteridines were NH2, NEO and BH2. BIO was quantified in all samples except one, while PT was detected in all samples except two. ISO was quantified only in two urine samples corresponding to the youngest volunteers. XAN, MON, 6HMPT and PT6C were not detected in the optimized conditions. In all cases, dihydropteridinic forms were found in higher concentration than their oxidized forms.

Values concerning the content of pteridines in urine can be found in literature, primarily for NEO, BIO and NEO/BIO ratio, for healthy people and for different pathological cases. Data presented in this manuscript have been obtained from urine samples without prior pretreatment. Hence, the analysis of the hydropteridines and the oxidized pteridines separately is possible and the values of NEO and BIO given correspond to the naturally excreted

**Table 4**  
Marker pteridines/creatinine and neopterin/biopterin ratios calculated in healthy human urine samples by the proposed HPLC-ESI-MS method.

	Ratio values <sup>a</sup>									
	NEO/CREA	NH2/CREA	NEO <sub>T</sub> /CREA	BH2/CREA	BIO/CREA	BIO <sub>T</sub> /CREA	PT/CREA	ISO/CREA	NEO/BIO <sub>T</sub>	NEO <sub>T</sub> /BIO <sub>T</sub>
Woman (51) <sup>b</sup>	0.111	0.576	0.687	0.424	0.058	0.482	0.106	< LOD	0.230	1.425
Man (51) <sup>b</sup>	0.074	0.389	0.462	0.118	0.065	0.183	< LOD	< LOD	0.404	2.525
Man (50) <sup>b</sup>	0.161	0.939	1.100	0.381	< LOQ	—	0.124	< LOD	—	—
Woman (33) <sup>b</sup>	0.215	1.426	1.641	1.286	0.174	1.460	0.121	< LOD	0.147	1.124
Woman (32) <sup>b</sup>	0.123	0.550	0.673	0.663	0.086	0.749	< LOD	< LOD	0.164	0.899
Woman (22) <sup>b</sup>	0.232	1.164	1.396	0.625	0.107	0.732	0.082	0.089	0.317	1.907
Woman (17) <sup>b</sup>	0.117	0.490	0.607	0.860	0.084	0.944	0.055	0.052	0.124	0.643

Note: NEO<sub>T</sub> = NEO+NH2; BIO<sub>T</sub> = BIO+BH2.

<sup>a</sup> Calculated with the average value ( $n=3$ ) obtained for pteridine and creatinine in each urine sample and expressed as mmol pteridine/mol CREA.

<sup>b</sup> Age.

**Table 5**  
Values of NEO/CREA and NEO/BIO ratios in urine samples (mmol pteridine/mol CREA) reported in literature.

	NEO/CREA	NEO <sub>T</sub> /CREA	NEO/BIO <sub>T</sub>	NEO <sub>T</sub> /BIO <sub>T</sub>	Treatment of urine	Ref.
<b>Pathological children urines (&lt; 10 years old)</b>	0.29–1.08	—	0.32–0.83	—	Unoxidized urine	[7]
	0.06–1.05	—	—	—		[31]
<b>Pathological adult urines (&gt; 25 years old)</b>	—	0.21	—	2.59	Pre-oxidation with I <sub>2</sub> /I <sup>-</sup>	[6]
<b>Healthy children urines (&lt; 10 years old)</b>	0.21	—	0.12	—	Un-oxidized urine	[7]
	—	0.39	—	0.86	Pre-oxidation with I <sub>2</sub> /I <sup>-</sup>	[16]
	—	0.46	—	0.57	Pre-oxidation with KMnO <sub>4</sub>	
<b>Healthy adult urines (&gt; 25 years old)</b>	0.094	—	0.12	—	Un-oxidized urine	[7]
	—	0.20	—	0.98	Pre-oxidation with I <sub>2</sub> /I <sup>-</sup>	[16]
	—	0.21	—	0.45	Pre-oxidation with KMnO <sub>4</sub>	
	—	0.12	—	1.27	Pre-oxidation with I <sub>2</sub> /I <sup>-</sup>	[6]
<b>Healthy adult urines (&lt; 25 years old)</b>	0.17	1.00	0.22	1.28	Un-oxidized urine	Proposed method
<b>Healthy adult urines (&gt; 25 years old)</b>	0.14	0.91	0.24	1.49		

compounds in their oxidized forms. However, urine can be previously oxidized and then, the total pteridines content (hydropteridines plus pteridines) is determined and the values of  $NEO_T$  ( $NH_2 + NEO$ ) and  $BIO_T$  ( $BH_2 + BIO$ ) are reported. These events generate some confusion when consulting data concerning the content of pteridines in biological fluids.

Pteridine/CREA ratios (expressed as mmol pteridine/mol CREA) in underivatized and derivatized urine, reported in literature are summarized in Table 5. In the direct analysis of urine samples, the values of  $NEO_T/CREA$  ratios were 0.094 and 0.21 for healthy adults and children respectively [7]; 0.29–1.08 [7] and 0.063–1.05 [31] for pathological children;  $NEO_T/BIO_T$  ratio values of 0.12 for healthy adults and children and 0.32–0.83 for pathological children were also reported [7].

Different reagents have been investigated for the oxidation of urine samples and the reported pteridine levels vary slightly. Thus,  $NEO_T/CREA$  ratios of 0.12 and 0.21 and,  $NEO_T/BIO_T$  ratios of 1.27 and 2.59 for healthy volunteers and cancer patients, respectively, were reported using CE-LIF, previous oxidation with  $I_2/I^-$  [6].

$NEO_T/CREA$  ratios of 0.20 and 0.39 for healthy adults and children for preoxidation using iodine/iodine, and 0.21 and 0.46 for healthy adults and children using permanganate were described using HPLC [16].  $NEO_T/BIO_T$  ratios of 0.98 and 0.86 for healthy adults and children were obtained when iodine/iodine pre-oxidation was employed and 0.45 and 0.57 for healthy adults and children when permanganate was used [16].

Results summarized in Table 5 show mean values of the proposed method of 0.14 and 0.17 for  $NEO_T/CREA$  ratio; 0.91 and 1.0 for  $NEO_T/BIO_T$  ratio; 0.24 and 0.22 for  $NEO_T/BIO_T$  ratio and 1.49 and 1.28 for  $NEO_T/BIO_T$  ratio, for healthy adults younger and older than 25 years old, respectively. These values are comparable to those reported in literature taking into account the aged and sex diversity.

#### 4. Conclusions

The determination of pteridines (disease markers) has become highly important to establish their variation in pathological states. The proposed method allows the simultaneous determination of marker pteridines in urine samples through a chromatographic system with MS detection. MS instrumental parameters were optimized and with the aim of minimizing sample handling, standard addition calibration method was applied to diluted urine samples without a previous sample pretreatment step. The results obtained in the present work indicate that dihydropteridines are the predominant forms in untreated urine of healthy adults.  $NEO_T/CREA$  ratios, in un-oxidized urines of healthy volunteers, are similar to those found in literature and lower than values reported in pathological urine samples. Although  $NEO_T/CREA$  ratio calculated by the proposed method is higher than those found by pre-oxidation of urines,  $NEO_T/BIO_T$  ratios are similar to bibliographic data. The main advantages of this method are its simplicity, the use of cheap disposable reagents and materials and the small volume of organic solvent consumed, being the protocol straightforward and environmentally friendly.

#### Acknowledgments

Financial support from the MICINN of Spain (Project CTQ2011–25392) and from Junta de Extremadura and European FEDER

Funds (Consolidation Project of Research Group FQM003, Exp.:GR10033) are acknowledged. AJG acknowledges financial support from Junta de Extremadura (ayudas para la reincorporación de doctores al Sistema de Ciencia, Tecnología e Innovación de Extremadura, expediente REI09011). Authors thank Laura López Pajares for her technical collaboration.

#### References

- [1] S. Gamagedara, S. Gibbons, Y. Ma, Clin. Chimica. Acta 412 (2011) 120–128.
- [2] M.M. Müller, H.C. Curtius, M. Herold, C.H. Huber, Clin. Chim. Acta 201 (1991) 1–16.
- [3] H. Wachter, D. Fuchs, A. Hausen, G. Reibnegger, E.R. Werner, Adv. Clin. Chem. 27 (1989) 81–141.
- [4] M. Lucock, Z. Yates, K. Hall, R. Leeming, G. Rylance, A. MacDonald, A. Green, Mol. Gen. Metab. 76 (2002) 305–312.
- [5] B. Stea, R.M. Halpern, B.C. Halpern, R.A. Smith, Clin. Chim. Acta 113 (1981) 231–242.
- [6] F. Han, B.H. Huynh, H. Shi, Y. Ma, Anal. Chem. 71 (1999) 1265–1269.
- [7] F. Cañada-Cañada, A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña, A. Mancha de Llanos, Anal. Chim. Acta 648 (2009) 113–122.
- [8] I. Blasco, G. Knaus, E. Weiss, G. Kemmler, C. Winkler, G. Falkesammer, A. Griesmacher, R. Wurzman, J. Marksteiner, D. Fuchs, J. Psychiatr. Res. 41 (2007) 694–701.
- [9] M. Martínez-Pardo, A. Bélanger-Quintana, M.J. García Muñoz, L. Desviat, B. Pérez, M. Ugarte, in: P. Sanjurjo, M.L. Couce, G. Pintos, A. Ribes, B. Merinero (Eds.), Protocolo De Diagnóstico, Tratamiento Y Seguimiento De Las Hiperfenilalaninurias, Mead-Johnson a Bristol Mayers Squibb S.A. Company, Madrid, 2007, pp. 71–107.
- [10] N. Blau, M.E. Blaskovics, Hyperphenylalaninemia, in: Nenad Blau, Marinus Duran, E. Milan, Blaskovics (Eds.), Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases, 1a ed., Chapman & Hall Medical, 1996, pp. 65–78.
- [11] M. Martínez-Prado, A. Bélanger-Quintana, M.J. García Muñoz, L. Desviat, B. Pérez, M. Ugarte, Protocolo de Diagnóstico, Tratamiento y Seguimiento de las Hiperfenilalaninurias, Unidad de Enfermedades Metabólicas del Servicio de Pediatría del Hospital Ramón y Cajal y del CEDEM Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" CSIC, Madrid, 2008.
- [12] T. Fukushima, J.C. Nixon, Anal. Biochem. 102 (1980) 176–188.
- [13] B. Fiege, D. Ballhausen, L. Kierat, W. Leimbacher, D. Goriouniv, B. Schircks, B. Thöny, N. Blau, Mol. Genet Metab. 81 (2004) 45–51.
- [14] S. Trehan, J.M. Noronha, J. Clin. Biochem. Nutr. 14 (1993) 195–203.
- [15] J. Tomandl, J. Tallova, M. Tomandlova, V. Palyza, J. Sep. Sci. 26 (2003) 674–678.
- [16] A. Mancha de Llanos, A. Espinosa-Mansilla, F. Cañada-Cañada, A. Muñoz de la Peña, J. Sep. Sci. 34 (2011) 1283–1292.
- [17] R. Diaz de la Garza, E.P. Quinlivan, S.M.J. Klaus, G.J.C. Basset, J.F. Gregory, A.D. Hanson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (2004) 13720–13725.
- [18] B. Stea, P.S. Backlund, P.B. Berkeley, A.K. Cho, B.C. Halpern, R.M. Halpern, R.A. Smith, Cancer Res. 38 (1978) 2378–2384.
- [19] H. Schmidt, I. Tegeder, G. Geisslinger, Nat. Protoc. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.298>. 2006.
- [20] L. Nováková, I. Kaufmannova, R. Jánková, J. Sep. Sci. 33 (2010) 765–772.
- [21] A. Espinosa Mansilla, A. Muñoz de la Peña, D. González Gómez, Chem. Educ. 10 (2005) 1–9.
- [22] G.L. Long, J.D. Winefordner, Anal. Chem. 55 (1983) 712–724.
- [23] M.Z. Jaffe, Z. Physiol. Chem. 10 (1886) 391–400.
- [24] H. Bartels, M. Böhner, Clin. Chim. Acta 32 (1971) 81–85.
- [25] K. Larsen, Clin. Chim. Acta 41 (1972) 209–217.
- [26] D. Heinegaard, G. Tindstrom, Clin. Chim. Acta 43 (1973) 305–310.
- [27] R. King, R. Bonfiglio, C. Fernandez-Metzler, C. Miller-Stein, T. Olah, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 11 (2000) 942–950.
- [28] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Anal. Chem. 75 (2003) 3019–3030.
- [29] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, Elsevier, Amsterdam, 1997.
- [30] I. Duran Meras, A. Espinosa-Mansilla, M.J. Rodríguez Gómez, Anal. Biochem. 46 (2005) 201–209.
- [31] A. Mancha de Llanos, M.M. De Zan, M.J. Culzoni, A. Espinosa Mansilla, F. Cañada Cañada, A. Muñoz de la Peña, H.C. Goicoechea, Anal. Bioanal. Chem. 399 (2011) 2123–2135.





# HPLC determination of serum pteridine pattern as biomarkers



E. Martín Tornero, I. Durán Merás, A. Espinosa-Mansilla\*

Department of Analytical Chemistry, University of Extremadura, Avd. de Elvas, s/n, 06006 Badajoz, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 23 January 2014

Received in revised form

8 April 2014

Accepted 15 April 2014

Available online 29 April 2014

### Keywords:

Pteridines

HPLC

Fluorescence detection

Fused core reverse column

Human serum

## ABSTRACT

Pteridinic derivatives are important biomolecules considered as biomarkers for several diseases, especially in cancer and infectious pathologies. A new fluorimetric-HPLC method for the analysis of nine pteridines in human serum has been reported. Two analytical columns composed by C18 porous and fused core particles were assayed and the results compared. Fused core particle column allows us adequate separation, in only one run and in 15 min. Acid precipitation step of the proteins and clean-up process with an Isolute ENV+ (hydroxylated polystyrene-divinylbenzene copolymer) cartridge of the serum samples have been optimized. Analytes were determined by fluorimetric detection, exciting at 272 nm and measuring the fluorescence emission at 410 nm for isoxanthopterin, at 465 nm for xanthopterin, and at 445 nm for the analysis of the other pteridines. Detection limits between 0.07 and 0.61 ng mL<sup>-1</sup> were calculated according to Clayton criterium. Intraday precision varied from 1.2 to 5.3 and interday precision between 1.2 and 7.4, both expressed as RSD (%). External standard and standard addition calibrations were compared in the analysis of serum samples. The pteridine amounts in serum (expressed as ng mL<sup>-1</sup> ± confidence interval) were 3.69 ± 1.78; 1.35 ± 0.24; 0.46 ± 0.14; 0.54 ± 0.24; 0.84 ± 0.55; 2.10 ± 0.51 and 0.23 ± 0.11 for XAN, NEO, MON, ISO, BIO and 6HMPT, respectively, using the external standard method. Comparable results were obtained by the standard addition method. It is noticeable that 7BIO was not detected in the healthy serum samples analyzed.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Pteridines are metabolites formed by a bicyclic pyrimidine-pyrazine moiety that occurs in a wide range of living systems and participate in relevant biological functions. Neopterin and its derivatives are synthesized *in vivo* from guanosine triphosphate (GTP) during the biosynthesis of 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (BH4), a co-factor of aromatic hydroxylation. BH4 represents the electron donor in the hydroxylation of phenylalanine to tyrosine in the liver and of tyrosine to L-dopa and tryptophan [1].

Also, it has been reported that the participation of neopterin in response to cytokines released by T-lymphocytes and natural killer cells makes this pteridine an indicator of activation of cell-mediated immunity including release by infections associated with activation of T-lymphocytes and natural killer cells, malignancies, autoimmune diseases, rejection of transplanted organs, and atherosclerosis [1,2]. Not only neopterin, but other pteridines occur everywhere in proliferating cells of different organisms; they

seem to hold key positions in the metabolism of these cells [3], and there are evidences that alterations in the normal amounts of these metabolites in biologic fluids can be a consequence of several disorders. In this sense, Kaufman, in 1963 [4] informed of the importance of several pteridines in the cell metabolism of higher mammals, and it has been reported that the stimulation of T-lymphocytes in viral infections and malignant disorders causes elevation of neopterin levels in serum and urine.

Despite the diversity of pteridines with wide implications in diverse biochemistry routes of interest, the two of that have aroused the greatest interest among researchers are neopterin (NEO) and 6-biopterin (BIO) in both oxidized and reduced forms. These pteridines are analyzed in the urine of all newborns for the screening of BH4 deficiencies. Other pteridinic derivatives normally present in plasma, urine and other bodily fluids, such as xanthopterin (XAN), isoxanthopterin (ISO), pterin (PT), pterin-6-carboxylic acid (Pt6C), and 6,7-dimethylpterin also show changes in its normal concentrations in some disease states and, all of them have diagnostic value [5,6].

Hence, increased concentrations of NEO in human serum and urine have been found during allograft rejection episodes and in various malignant disorders, autoimmune diseases and viral infections, including HIV type1 [7–11]. On the other hand, a recently published study on 105 healthy children using ELISA methods established an average reference to NEO in serum of

Abbreviations: BH4, 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; BH2, 7,8-dihydrobiopterin; BIO, 6-biopterin; 7BIO, 7-biopterin; 6HMPT, 6-hydroxymethylpterin; ISO, isoxanthopterin; MON, monapterin; NEO, neopterin; PT, pterin; Pt6C, pterin-6-carboxylic acid; XAN, xanthopterin

\* Corresponding author. Tel.: +34 92 428 9376; fax: +34 92 427 4244.

E-mail address: [nuncy@unex.es](mailto:nuncy@unex.es) (A. Espinosa-Mansilla).

5.47–2.58 nmol/L and estimated as a cutoff value of 11 nmol/L [12]. In the mentioned paper the authors reported that the serum NEO concentration is lower than cutoff value in healthy children after neonatal period and it is independent of children's age or gender. The cutoff value can be compared with the amount of NEO values in different disorders and could be used as a diagnosis tool.

Also, increased NEO concentration in serum was observed in children with viral gastroenteritis. When a cut off of 11.0 nmol L<sup>-1</sup> neopterin was applied, comparison yields 86.6% sensitivity and 94.3% specificity for the diagnosis of viral gastroenteritis in pediatric patients [13].

Higher levels of BIO were found in autistic children in comparison with a control group [14]. Changes in the levels of xanthopterin (XAN), BIO, pterin (PT) and 6-hydroxymethylpterin (6HMPT) were found in some cancer patients [15,16]. 7-biopterin (7BIO) is excreted by patients with carbinolaminatedehydratase deficiency, using 7BIO for the differential phenylketonury diagnostic [17]. An increase in pterin-6-carboxylic acid (PT6C) and a decrease in ISO were also reported in cancer patients [18].

In this way it is proposed that the diagnostic and course of the remission of some diseases under different combination drug therapies could be determined by analyzing marker compounds in the serum or urine samples [19]. Hence, the determination of these pteridines in biological fluids seems to be of clinical relevance and it is important to establish a rapid, cheap and easy method for their determination.

For individual analysis of a selected pteridine, the ELISA method [12] has been widely used, but to analyze several pteridines HPLC techniques must be used. Although HPLC with fluorimetric detection has traditionally been the technique proposed for these analyses [20], recently and for the first time a HPLC–MS method has been proposed as a technique for the analysis of ten pteridines in the same oxidation level that they are excreted in urine [21]. Later, a HPLC–MS/MS method has also been proposed for the analysis of six pteridines in urine [22]. Also, the EC–LIF technique has been reported as an alternative technique for urinary pteridine analysis [23].

The importance of the analysis of pteridines in urine samples is well known [24,25], but the determination of these markers in serum samples is a scarce topic of research. In the bibliography, the determination of only one or two pteridines in serum or plasma with HPLC fluorimetric detection [26,27] has been described. However, sparing data are referred to for the analysis of all pteridines present in the serum samples. It was found in only a paper that determines seven pteridines in blood cell and plasma using aerial oxidation and HPLC but it spends a lot of time on each run. In the mentioned paper the last pteridine elutes in about 40 min [28]. No data about the application of EC in the analysis of pteridine mixtures in serum samples have been reported.

The direct HPLC determination of pteridines in serum is difficult compared with urine assays due, among other reasons, to the lower amounts of these compounds in a more complex matrix as serum. In this sense, the high protein contents, and the high number of potentially interfering compounds, also make the determination of these compounds [29] difficult. To eliminate the proteins present in the serum samples, the most useful method is to remove serum proteins by acid precipitation, but the potential risk of removing unknown amounts of pteridines together with the proteins has been reported [29]. However, other investigators have compared the results obtained with acid-deproteinized serum by HPLC with fluorimetric detection and serum without deproteinization with the ELISA test and similar results have been found [30,31]. To determine the total content of pteridines, the sample must be oxidized in order to convert the reduced pteridines (non-fluorescent) in oxidized forms (fluorescent). Biopterin analysis is difficult because the generation of the

fully oxidized form depends strongly on the oxidation conditions. Different oxidation methods have been reported to convert BH4 in its oxidized form; air oxidation [28], I<sub>2</sub>/I<sup>-</sup> alkaline or acid oxidation [26], and strong potassium permanganate oxidation [32]. The most widely used method of oxidizing the biological fluids sample is by adding I<sub>2</sub>/I<sup>-</sup> solution in an alkaline medium. In the mentioned conditions 7,8-dihydrobiopterin (BH2) and 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (BH4) give rise to biopterin (BIO) [33] but the yield of BIO generated from BH4 also depends on the oxidation time and temperature. The strong dependence of the NEO/BIO ratio value, as a function of the oxidation period using I<sub>2</sub>/I<sup>-</sup> alkaline, has been previously reported [34]. Moreover, to reduce the presence of interfering compounds a lot of purification methods have been proposed by using different cartridges such as exchange columns [26,35]. Recently, a review with notable information about the pretreatment and determination of pteridines in biological samples has been published [36].

In the present paper an HPLC method has been developed using fluorimetric detection in order to obtain a significant serum pteridine pattern. Eight pteridines can be analyzed in a total time per run of 15 min. Two analytical columns composed of porous particular and fused core C18 particles were assayed and the results compared. Serum samples from volunteers aged between 25 and 50 years and without diagnosed pathologies were used to apply the proposed method.

## 2. Materials and method

### 2.1. Instrumentation

The chromatographic studies were performed on an Agilent Model 1260 Infinity LC high performance liquid chromatograph (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), equipped with an online degasser (G1379A), quaternary pump (G1311A), manual six-way injection valve (Rheodyne), column oven compartment (G1316A), UV-visible diode array detector (G1315B) and rapid scan fluorescence spectrophotometer detector (G1321A). The OpenLAB LC ChemStation software (Version A.01.04) was used for controlling the instrument, data acquisition and data analysis. The chromatographic studies and analytical separation were carried out on a Zorbax-Eclipse XDB C18 (150 mm × 4.6 mm, 5.6 μm) and Poroshell 120 (150 mm × 3 mm, 2.7 μm) analytical columns. The columns were purchased from Agilent. The column temperature was set at 22 °C. The mobile phase was 2 mmol L<sup>-1</sup> ammonium formate pH 7.1 in isocratic mode followed by a cleaning step with 100% ACN during 3 min. A 10 min of post-run time back to the initial mobile phase composition was used after each analysis. Mobile phases were filtered through a 0.22 μm membrane nylon filter and degassed by ultrasonication before use. The flow rate was set at 1.7 mL min<sup>-1</sup> for Eclipse column and 0.4 mL min<sup>-1</sup> for Poroshell column. The injection volume was 20 μL for Zorbax-Eclipse column and 10 μL for Poroshell column. As a consequence of the different excitation and emission wavelengths of the pteridines, fluorescence detector was programmed in multiemission mode, and each chromatogram was recorded simultaneously measuring the emission at 410, 445 and 465 nm, exciting in all cases at 272 nm.

A CrisonMicropH 501 pHmeter (Barcelona, Spain) equipped with a combined glass/saturated calomel electrode was used for pH measurements.

Calibration curves and analytical figures of merit were performed by means of the ACOC program, developed in our research group, in MatLab code [37].

### 2.2. Chemicals and reagents

Pterin-6-carboxylic acid (PT6C), xanthopterin (XAN), neopterin (NEO), monapterin (MON), isoxanthopterin (ISO), pterin (PT),

6-biopterin (BIO), 7-biopterin (7BIO) and 6-hydroxymethylpterin (6HMPT) were from Schircks Laboratory (Jona, Switzerland). HPLC-grade acetonitrile (ACN), HPLC-grade methanol (MEOH), hydrochloric acid and trichloroacetic acid were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Potassium iodide, iodine, formic acid and sodium hydroxide (NaOH) were from Sigma (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid, Spain). Ammonium formate buffers were prepared by dissolving ammonium formate from Sigma in ultrapure water and fixing the pH with ammonia (Panreac). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q system (Waters Millipore, Milford, MA, USA).

Stock standard working mixture solution of the nine pteridines (15–30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) were prepared separately by exact weighting of each pteridine and dissolution in alkaline medium with ultrapure water and later neutralization with hydrochloric acid. These solutions were stored at  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  in the dark, using individual vials containing aliquots of the stock standard solution or serum sample. Each aliquot was thawed only once and they were stable for at least 3 weeks. A standard working mixture solution was daily prepared by suitable dilution of the stock analyte solutions with ultrapure water.

A pool of serum samples from twenty healthy volunteers (25–50 years old and 80% women and 20% men) obtained from members of the Research Group ANAYCO, UEx, was analyzed.

### 2.3. Calibration procedure

Calibration curves were performed with pteridine standard mixtures at five concentration levels as described in Table 1. Linearity was evaluated in ultrapure water in the range 0.2–7.0  $\text{ng mL}^{-1}$ . The standards were prepared with an appropriate volume of stock standard solution of each pteridine and made up to the mark with the mobile phase. Three replicates of each concentration level were analyzed and, all of them have been previously filtered through 0.22  $\mu\text{m}$  nylon filter. Calibration curves were built by plotting the peak area versus the standard concentration. The fluorescence excitation wavelength was 272 nm for all the analytes, and the emission wavelength was 410 nm for ISO, 465 nm for XAN and 445 nm for the other pteridines.

**Table 1**  
Analytical calibration parameters.

Analyte	$t_R \pm \text{SD}^a$ (min)	Linear range ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	Slope $\pm \text{SD}^a$	Determination coefficient, $R^2$	Linearity (%)	LOD <sup>b</sup> ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	LOQ <sup>c</sup> ( $\text{ng mL}^{-1}$ )
Porous Zorbax Eclipse column							
PT6C	1.26 ( $\pm 0.01$ )	1.0–6.0	24.2 ( $\pm 0.4$ )	0.9974	98	0.31	1.03
XAN	2.09 ( $\pm 0.04$ )	2.0–12.0	21.9 ( $\pm 0.3$ )	0.9988	99	0.47	1.57
NEO	2.59 ( $\pm 0.01$ )	1.0–6.0	35.3 ( $\pm 0.6$ )	0.9973	98	0.32	1.07
MON	3.67 ( $\pm 0.02$ )	1.0–6.0	44.6 ( $\pm 0.6$ )	0.9986	99	0.23	0.77
ISO	4.48 ( $\pm 0.08$ )	1.5–8.5	39.6 ( $\pm 0.6$ )	0.9901	97	0.88	2.93
PT	6.76 ( $\pm 0.05$ )	2.0–12.0	54.7 ( $\pm 0.7$ )	0.9989	99	0.43	1.43
BIO	7.07 ( $\pm 0.05$ )	1.0–6.0	30.4 ( $\pm 0.7$ )	0.9961	98	0.38	1.27
7BIO	7.65 ( $\pm 0.05$ )	1.0–6.0	20.2 ( $\pm 0.5$ )	0.9964	98	0.34	1.13
6HMPT	8.66 ( $\pm 0.06$ )	1.0–6.0	20.9 ( $\pm 0.5$ )	0.9948	97	0.44	1.47
Fused core Poroshell column							
PT6C	3.07 ( $\pm 0.02$ )	0.5–5.0	117.9 ( $\pm 1.1$ )	0.9994	99	0.076	0.25
XAN	3.84 ( $\pm 0.10$ )	0.7–7.0	61.8 ( $\pm 2.0$ )	0.9921	97	0.37	1.23
NEO	4.31 ( $\pm 0.05$ )	0.5–5.0	138.7 ( $\pm 0.8$ )	0.9989	99	0.065	0.21
MON	5.98 ( $\pm 0.08$ )	0.4–4.0	181.5 ( $\pm 1.2$ )	0.9996	99	0.044	0.15
ISO	7.34 ( $\pm 0.22$ )	0.2–3.0	447.3 ( $\pm 7.8$ )	0.9951	98	0.059	0.15
PT	10.75 ( $\pm 0.17$ )	0.6–6.0	76.6 ( $\pm 1.0$ )	0.9986	99	0.13	0.43
BIO	11.74 ( $\pm 0.20$ )	0.5–5.0	99.8 ( $\pm 1.7$ )	0.9977	98	0.14	0.47
7BIO	12.56 ( $\pm 0.22$ )	0.5–5.0	88.9 ( $\pm 0.8$ )	0.9991	99	0.076	0.25
6HMPT	13.70 ( $\pm 0.23$ )	0.5–5.0	152.7 ( $\pm 2.0$ )	0.9987	99	0.11	0.36

<sup>a</sup> Standard deviation, SD ( $n=15$ ).

<sup>b</sup> Limit of detection, LOD according to Long and Winefordner criterion [38];  $\alpha=\beta=0.05$ .

<sup>c</sup> Limit of quantification, LOQ.

Analytical signal: peak area obtained at  $\lambda_{\text{ex}}=272\text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}}=410, 465$  and  $445\text{ nm}$  for ISO, XAN and all other pteridines, respectively; concentration expressed as  $\text{ng mL}^{-1}$ .

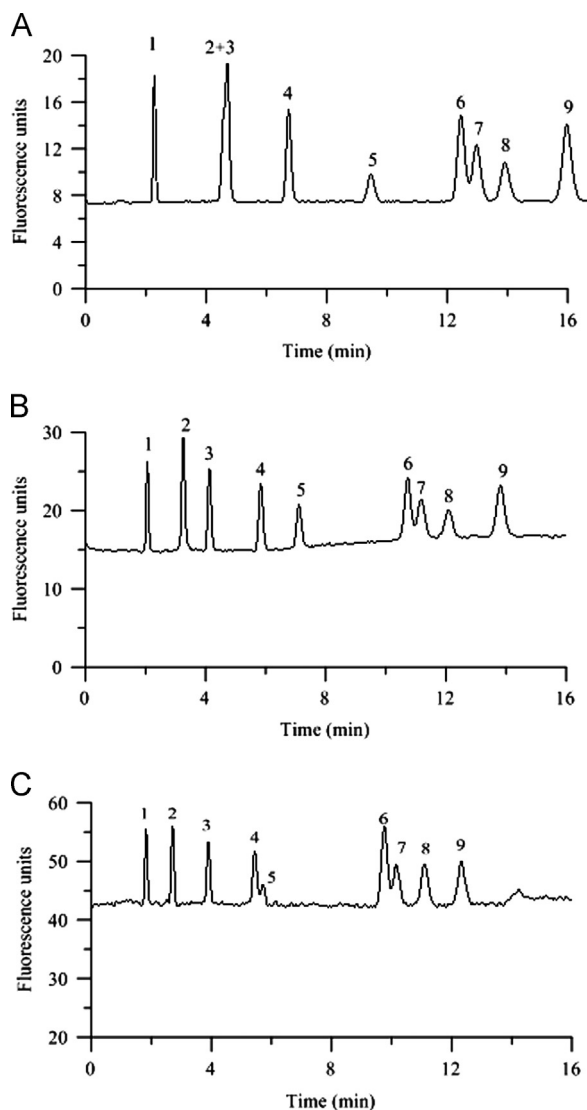
### 2.4. Analysis of pteridines in serum samples

An aliquot of 3 mL of fresh frozen sample serum was thawed and centrifuged at 3000 rpm for 30 min and filtered through 0.22  $\mu\text{m}$  nylon filters. Then, 0.75 mL of 3 mol  $\text{L}^{-1}$  trichloroacetic acid reagent and 0.40 mL of iodine solution (2%/4%  $\text{I}_2/\text{I}^-$ ) were added, and the solution was mixed thoroughly and incubated for 1.0 h at room temperature in darkness. After this, the sample was centrifuged at 3000 rpm (825g) for 30 min. 3.0 mL of the supernatant liquid, neutralized with sodium hydroxide, was passed through an ISOLUTE ENV+ (hydroxylated polystyrene–divinylbenzene copolymer) cartridge, previously conditioned with 5 mL of methanol and 5 mL of ultrapure water. The elution of the retained pteridines was carried out with 3.0 mL of acetonitrile:water, 80:20 (v:v). Finally, 1.0 mL of the eluate was evaporated to dryness with a stream of  $\text{N}_2$  at room temperature, and the residue was re-dissolved with 0.5 mL of mobile phase. Spiked serum samples at four different concentration levels: 0.0–4.2  $\text{ng mL}^{-1}$  for XAN; 0.0–1.2  $\text{ng mL}^{-1}$  for ISO and 0.0–3.0  $\text{ng mL}^{-1}$  for the rest of the analytes were analyzed with a solid-core Poroshell column. The external calibration and standard addition methods were used to calculate the concentrations of each pteridine in serum samples, and peak areas were selected as analytical signal.

## 3. Results and discussions

### 3.1. Optimization of LC separation and comparison of columns separation efficiency

With the aim to perform a simple, reliable and robust method for the efficient separation and determination of the nine pteridinic compounds in the serum samples, two reversed phase columns with different size and surface particles were tested. The columns used were: Zorbax-Eclipse XDB C18 (150 mm  $\times$  4.6 mm, 5.6  $\mu\text{m}$ ) and Poroshell 120 (150 mm  $\times$  3 mm, 2.7  $\mu\text{m}$ ). Some important parameters that influence the chromatographic

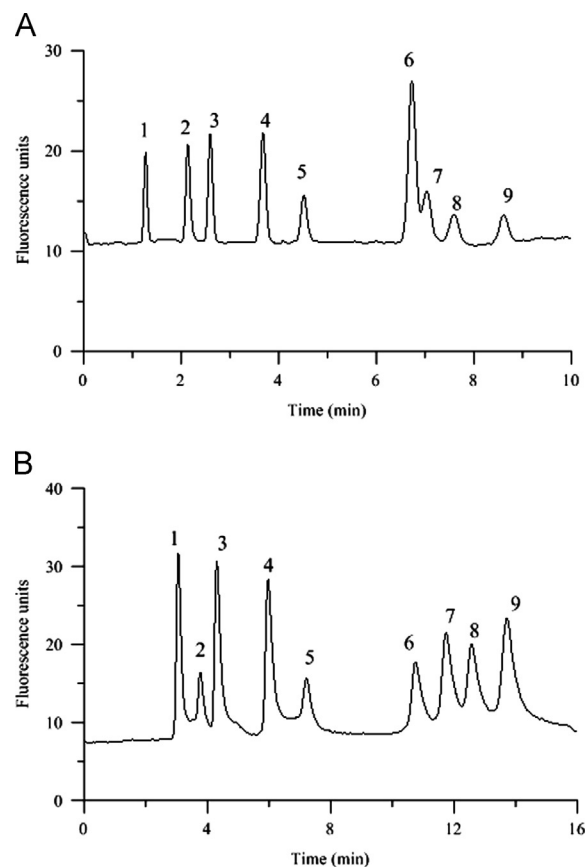


**Fig. 1.** Influence of the mobile phase acidity in the chromatographic separation of pteridines. pH 6.5 (A), pH 7.1(B) and pH 7.5 (C). (1) PT6C; (2) XAN; (3) NEO; (4) MON; (5) ISO; (6) PT; (7) BIO; (8) 7-BIO; and (9) 6HMPT. Conditions: Zorbax Eclipse column, flow: 1.0 mL min<sup>-1</sup>,  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ =272 nm/445 nm.

separation, such as the mobile phase composition or the flow rate, were assayed with each column.

The pH of the mobile phase has been widely studied because it is a fundamental variable in pteridinic separation. Several mobile phases composed of mixtures of aqueous solutions of formic acid and ammonium formate buffers at different pH values, were tested in both the selected columns. Retention times and resolution values were strongly affected by the acidity of the mobile phase. In both columns, an increase in the pH of the mobile phase gives rise to a diminishing of the retention time.

In Fig. 1 the chromatograms obtained with the column Zorbax-Eclipse at three pH values are plotted. At pH 6.5, XAN and NEO peaks appear overlapped, but when pH increases, the capacity factor for XAN decreases and this fact allows us an adequate resolution between these analytes at higher pH values. On the other hand, ISO is drastically affected by the pH and at pH 7.5 an overlap peak with MON can be observed. pH 7.1 provides adequate resolution of the most polar pteridines but a poor resolution between PT and BIO was observed. With this column, the flow rate was also optimized and 1.7 mL min<sup>-1</sup> was the flow rate fixed for the next studies.



**Fig. 2.** Chromatograms at pH 7.1 obtained using: Zorbax Eclipse porous C18 column (flow rate: 1.7 mL min<sup>-1</sup>) (A) and Poroshell fused core column (flow rate: 0.4 mL min<sup>-1</sup>) (B). (1) PT6C; (2) XAN; (3) NEO; (4) MON; (5) ISO; (6) PT; (7) BIO; (8) 7-BIO; and (9) 6HMPT, Conditions:  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ =272 nm/445 nm.

The influence of pH was also carried out with a Poroshell 120 column, and similar behavior of the pteridines was confirmed. It is important to emphasize that in this case and using a mobile phase of pH 7.1, the resolution between PT and BIO was improved. The optimized flow rate for this column was 0.4 mL min<sup>-1</sup>.

Thus, a mobile phase composed of 2 mM ammonium formate solution at pH 7.1 was selected as optimum, and the elution was in isocratic mode with both columns.

Representative chromatograms obtained in the optimized condition with both columns are shown in Fig. 2. As can be seen, the resolution for PT and BIO was improved using a fused-core Poroshell C18 column.

### 3.2. Analytical characteristics of the HPLC–FSLD method for standard samples

The linearity of the method was performed by preparing standard mixtures with different concentrations depending on the column used. For the porous C18 column, the concentrations ranged between 2.0 and 12.0 ng mL<sup>-1</sup> for XAN and PT, between 1.5 and 8.5 ng mL<sup>-1</sup> for ISO, and between 1.0 and 6.0 ng mL<sup>-1</sup> for the rest of the pteridines. As regards the Poroshell column, the linear range was from 0.7 to 7.0 ng mL<sup>-1</sup> for XAN, from 0.4 to 4.0 ng mL<sup>-1</sup> for MON, from 0.2 to 2.0 ng mL<sup>-1</sup> for ISO, from 0.6 to 6.0 ng mL<sup>-1</sup> for PT and from 0.5 to 5.0 for the other five pteridines. Emission wavelengths of 410 nm for ISO, 465 nm for XAN and 445 nm for the other pteridines were used. In all cases, the excitation wavelength was maintained at 272 nm. The standard mixtures were injected by triplicate.



The statistical calibration parameters obtained with both columns are shown in Table 1. Limits of detection (LODs) and quantification (LOQs) were calculated according to Long et al. [38]. Good linearity ( $R^2 \geq 0.99$ ) was observed for all pteridines in both columns. Limits of detection are similar for all the compounds but as can be observed, better LODs were obtained using Poroshell column for the majority of the pteridines. These LODs were between  $0.23 \text{ ng mL}^{-1}$  for MON and  $0.88 \text{ ng mL}^{-1}$  for ISO in porous C18 column, and between  $0.07 \text{ ng mL}^{-1}$  for MON and  $0.61 \text{ ng mL}^{-1}$  for XAN in the case of Poroshell column.

### 3.3. Application to serum samples

Taking into account the low levels of the pteridines in the serum samples, we opted to use the Poroshell column to analyze this type of samples as the LODs found with this column are more favorable. Another aspect that we considered for using this column was that this column allows a separation to baseline of BIO, and taking into account the importance of this pteridine as biomarker analysis, we prefer this column although the run time was slightly higher.

Serum samples were prepared as described in Section 2.4. The first stage consists of the precipitation of the proteins with trichloroacetic acid and the oxidation of the non-fluorescent dihydropteridines and tetrahydropteridines to generate fluorescent pteridines. In our case, we carried out this stage using  $\text{I}_2/\text{I}^-$  as oxidative reagent, following the previous procedures [33]. In general, this treatment proved to be efficient if the analysis was carried out using the porous particle C18 column using particles of  $5.6 \mu\text{m}$ . However, this treatment was not sufficient when the separation was carried out with a superficially porous microparticulate column packing; probably due to the strongly retained compounds of the serum with the subsequent blockage of the superficial particles which affect the efficiency of the column.

Exhaustive cleaning-up stages to carry out the determination of pteridines in the serum are necessary due to the complexity of the serum matrix. Thus, a clean-up stage of the oxidized serum samples with solid phase extraction was considered as a solution to this problem. In this sense, better results were obtained when ISOLUTE ENV+ (hydroxylated polystyrene-divinylbenzene copolymer) cartridges were used. Several elution mixtures composed of methanol–water and acetonitrile–water in the range of 20–80% to 100% of organic solvent, were assayed. Appropriate recovery values were obtained for 80–20 to 50–50, v/v using acetonitrile as organic solvent and, for lower amounts of acetonitrile, the recovery values notably decrease. An 80–20 (v/v) acetonitrile–water was finally selected as adequate composition for the elution of the pteridines retained in the cartridge. In these conditions, the recovery values were between 99 and 80% (3.4 to 8.6% as RSD).

Chromatograms of a fortified serum sample, once oxidation and clean-up procedure have been carried out, at  $\lambda_{\text{ex}}$  272 nm and emission at 410, 445 and 465 nm are shown in Fig. 3. A high increment in the ISO peak (5) at 410 nm and the XAN peak (2) at 465 nm can be observed, so these wavelengths were used for the determination of these pteridines in the serum samples.

In Fig. 4, the chromatograms obtained for an unspiked and spiked serum samples using a fused-core Poroshell column are shown. We can observe that in the optimized conditions and in the presence of the serum, all the analytes, except PT6C, can be measured. PT6C is eluted with the solvent front jointly with other compounds, and this gives rise to an undefined signal.

Once the pretreatment of the serum samples has been optimized, chromatographic parameters such as column resolution ( $R$ ), capacity factor ( $k'$ ) and theoretical plate number ( $N$ ) were calculated using retention times and middle width of the peaks of a spiked serum sample with the objective of evaluating these parameters in the presence of the components serum. These

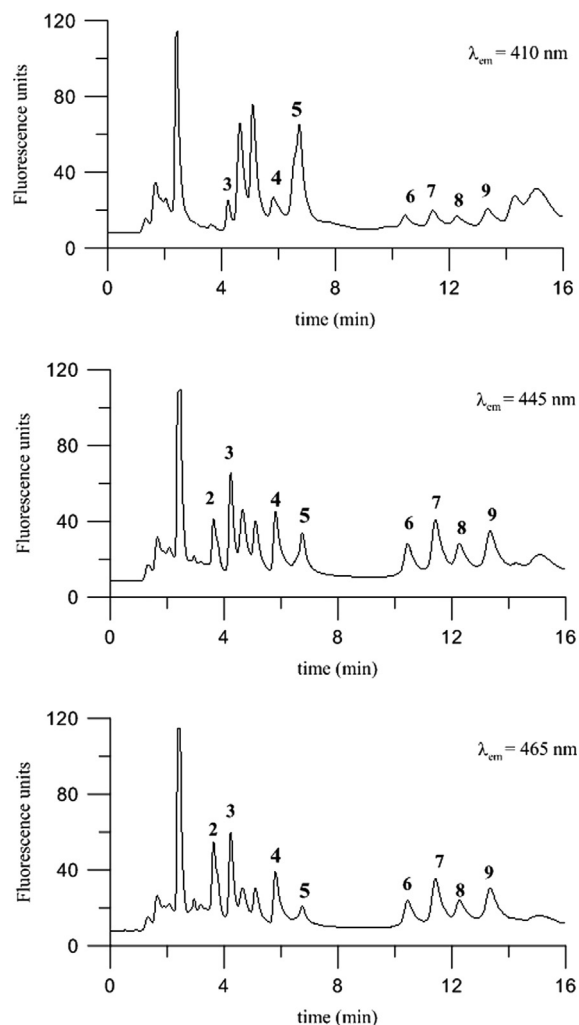


Fig. 3. Chromatograms of a fortified serum at  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=272 \text{ nm}/410 \text{ nm}$  (A),  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=272 \text{ nm}/445 \text{ nm}$  (B) and  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=272 \text{ nm}/465 \text{ nm}$ . Conditions: Poroshell column, flow rate:  $0.4 \text{ mL min}^{-1}$ .

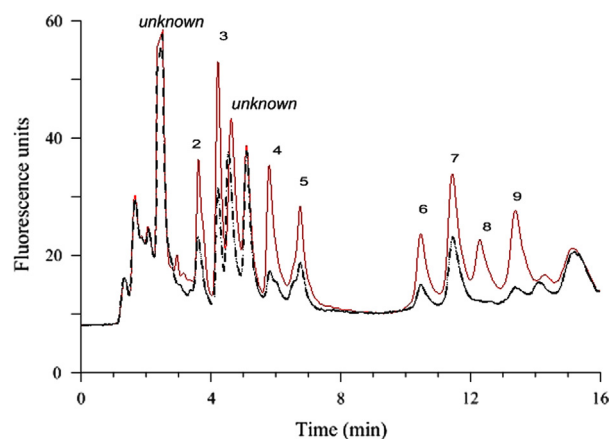


Fig. 4. Chromatograms of an oxidized serum sample (black dashed line) and a fortified oxidized serum sample (red solid line). Amount added in fortification serum:  $3 \text{ ng mL}^{-1}$  of PT6C, NEO, BIO, 7-BIO and 6HMPT;  $4.2 \text{ ng mL}^{-1}$  of XAN;  $2.4 \text{ ng mL}^{-1}$  of MON;  $1.2 \text{ ng mL}^{-1}$  of ISO and  $3.5 \text{ ng mL}^{-1}$  of PT. Conditions: Poroshell column, flow rate:  $0.4 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=272 \text{ nm}/445 \text{ nm}$ . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

values are summarized in Table 2, and it can be observed that  $k'$  values between 1.71 (for XAN, the pteridine less retained) and 9.02 (for 6HMPT the last eluted) have been obtained. Resolution values

**Table 2**  
Chromatographic parameters for a spiked serum sample, using fused-core Poroshell and Zorbax Eclipse columns.

	$t_R$ (min) $\pm$ SD	$w_{1/2}$ (min) $\pm$ SD	$k'$ $\pm$ SD	$N \pm$ SD	$R_s \pm$ SD
Fused core Poroshell column					
$t_m = 1.34 \pm 0.01$ min					
XAN	3.63 $\pm$ 0.02	0.21 $\pm$ 0.02	1.71 $\pm$ 0.02	1609 $\pm$ 246	6.97 $\pm$ 0.33
NEO	4.23 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.01	2.17 $\pm$ 0.02	3682 $\pm$ 360	1.87 $\pm$ 0.07
MON	5.83 $\pm$ 0.03	0.21 $\pm$ 0.01	3.36 $\pm$ 0.03	4347 $\pm$ 476	4.99 $\pm$ 0.28
ISO	6.79 $\pm$ 0.05	0.20 $\pm$ 0.01	4.08 $\pm$ 0.05	6153 $\pm$ 214	2.74 $\pm$ 0.09
PT	10.50 $\pm$ 0.05	0.33 $\pm$ 0.01	6.85 $\pm$ 0.05	545 $\pm$ 184	8.04 $\pm$ 0.11
BIO	11.48 $\pm$ 0.05	0.36 $\pm$ 0.01	7.58 $\pm$ 0.05	5401 $\pm$ 435	1.64 $\pm$ 0.03
7BIO	12.32 $\pm$ 0.05	0.36 $\pm$ 0.01	8.21 $\pm$ 0.05	6435 $\pm$ 354	1.36 $\pm$ 0.04
6HMPT	13.40 $\pm$ 0.06	0.39 $\pm$ 0.01	9.02 $\pm$ 0.06	6523 $\pm$ 440	1.68 $\pm$ 0.04
	$t_R$ (min) $\pm$ SD	$w_{1/2}$ (min) $\pm$ SD	$k'$ $\pm$ SD	$N \pm$ SD	$R_s \pm$ SD
Zorbax Eclipse Column					
$t_m = 0.68 \pm 0.01$ min					
XAN	2.19 $\pm$ 0.05	0.10 $\pm$ 0.01	2.21 $\pm$ 0.079	2597 $\pm$ 519	5.87 $\pm$ 0.68
NEO	2.634 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.01	2.86 $\pm$ 0.02	8111 $\pm$ 2343	2.42 $\pm$ 0.24
MON	3.70 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.01	4.42 $\pm$ 0.04	3961 $\pm$ 158	5.01 $\pm$ 0.09
ISO	4.06 $\pm$ 0.03	0.15 $\pm$ 0.01	4.96 $\pm$ 0.05	3854 $\pm$ 80	1.48 $\pm$ 0.05
PT	6.41 $\pm$ 0.05	0.16 $\pm$ 0.01	8.39 $\pm$ 0.09	8275 $\pm$ 297	8.57 $\pm$ 0.16
BIO	6.64 $\pm$ 0.06	0.17 $\pm$ 0.01	8.73 $\pm$ 0.10	7950 $\pm$ 228	0.79 $\pm$ 0.03
7BIO	7.03 $\pm$ 0.06	0.16 $\pm$ 0.01	9.30 $\pm$ 0.12	10,350 $\pm$ 1015	1.34 $\pm$ 0.04
6HMPT	7.69 $\pm$ 0.07	0.21 $\pm$ 0.01	10.27 $\pm$ 0.12	6836 $\pm$ 486	2.02 $\pm$ 0.08

SD: Standard deviation ( $n=5$ );  $t_R$ : retention time;  $w_{1/2}$ : middle width peak;  $k'$ : capacity factor;  $N$ : Theoretical plates numbers;  $R_s$ : resolution value

have been calculated with respect to the previous peak eluted and values between 1.36 and 8.04 were obtained. With respect to the efficacy of the column, the poorest efficacy was obtained for XAN and the best for 6HMPT.

Precision of the chromatography separation has been evaluated by injection serum samples spiked with a standard mixture of pteridines containing 4.2 ng mL<sup>-1</sup> of XAN; 2.4 ng mL<sup>-1</sup> of MON; 1.2 ng mL<sup>-1</sup> of ISO, 3.5 ng mL<sup>-1</sup> of PT and 3.0 ng mL<sup>-1</sup> of the other pteridines concentration level included in the calibration range. Repeatability was evaluated analyzing the spiked serum samples, on the same day (intraday precision,  $n=6$ ) and on consecutive days (interday precision,  $n=5$ ). Intraday and interday precision, expressed as relative standard deviation (RSD) are between 0.72 and 5.3%, and between 1.2 and 12%, respectively.

### 3.4. Matrix effect

It is important to study the influence of the components present in the biological fluids, because the possible co-elution of these compounds may be the cause of the matrix effects. For this reason, and with the objective of evaluating the extension of this effect, a comparison of the slopes between external calibration curve in ultrapure water and standard addition curve from a serum sample was carried out by applying the  $t$  and  $F$  statistical tests with ACOC program, at 95% of confidence level. Statistical tests indicate that the calibration slopes for all pteridines, except for MON, were comparable. For MON, a sparing matrix suppression effect was observed.

Both external standard and standard addition methods were applied in the analysis of volunteer serum samples.

### 3.5. Serum samples analysis

Unfortified and fortified serum samples of healthy persons were analyzed using external standard and standard addition methods. The serum samples were treated as indicated in Section 2.4, and the obtained results for each pteridine and for both calibrations are summarized in Table 3. It is noticeable that 7BIO was not detected in any of the serum samples analyzed.  $P$  values were calculated and no statistical difference was found for 95% ( $P > 0.05$ ). Confidence interval for each pteridine was also included.

**Table 3**

Amounts of pteridines in the serum sample using the proposed HPLC method fused-core Poroshell column.

Analyte	Standard addition ( $n=5$ )		External standard ( $n=10$ )		$P$ value <sup>b</sup>
	Amount (ng mL <sup>-1</sup> )	Confidence interval <sup>a</sup>	Amount (ng mL <sup>-1</sup> )	Confidence interval <sup>a</sup>	
XAN	3.69	$\pm$ 1.78	3.27	$\pm$ 0.40	0.360
NEO	1.35	$\pm$ 0.24	1.16	$\pm$ 0.11	0.060
MON	0.46	$\pm$ 0.14	0.36	$\pm$ 0.064	0.074
ISO	0.54	$\pm$ 0.24	0.50	$\pm$ 0.057	0.528
PT	0.84	$\pm$ 0.55	0.81	$\pm$ 0.079	0.812
BIO	2.10	$\pm$ 0.51	1.85	$\pm$ 0.086	0.063
7-BIO	< LOD	–	< LOD	–	–
6HMPT	0.23	$\pm$ 0.11	0.15	$\pm$ 0.057	0.213

<sup>a</sup> Calculated for  $\alpha=0.05$ ;

<sup>b</sup>  $P$  value for comparison between standard addition and external standard amounts. No statistical difference at 95% confidence level was found ( $P > 0.05$ ).

The found results were compared with the data previously reported in the bibliography (Table 4). Because of the disparity of bibliographic units, in the mentioned table the reported contents are expressed in nmol L<sup>-1</sup> for comparison, and in the original units of the reference. As it can be observed, the data about the levels of pteridines in the serum are very scarce. NEO is the pteridine that has aroused the greatest interest among researchers, and the amount found by us was 4.98 nmol L<sup>-1</sup> and this value can be considered as similar to the one previously reported in healthy volunteers. On the other hand, in only one paper [28] a similar number of pteridines to the one we determined in this proposed method have been analyzed. The differences found in the Andondonskaja-renz and Zeitler method could be attributed to the treatment of the sample because an aerial oxidation process was only applied. In addition, the samples analyzed were plasma, not serum.

## 4. Conclusions

The separation and determination of pteridines in serum samples has been optimized using a chromatographic system coupled with sensitive and fast scanning fluorescence detection. Two columns

**Table 4**  
Amount of pteridines in serum/plasma samples by the proposed method and bibliographic data.

Analyte	Sample	Amounts (nmol L <sup>-1</sup> )	Amount (expressed as in Reference)	Reference
NEO	Healthy volunteers (serum) Age 1–18 19–75	3.5–13.5 2.6–8.7	Idem	[1]
NEO	Healthy children (serum)	2.87–14.78 Mean: 5.47 ± 2.58 Cut off: 11	Idem	[12]
NEO	Healthy volunteers (serum) Age < 18 19–75	6.8 ± 3.6 5.3 ± 2.7	Idem	[11]
NEO	Healthy children (serum)	2.88–14.8 Mean: 4.73	Idem	[13]
	Viral gastroenteritis Children (serum)	6.03–171 Mean: 23.7		
NEO	Healthy adults (serum)	4.82	Idem	[29]
BIO <sub>total</sub> BH4	Healthy adults (plasma)	23.5 ± 1.3 14.8 ± 1.6	Idem	[26]
NEO	Healthy adults (serum, I <sub>2</sub> /I <sup>-</sup> oxidation)	21.8	5.52 µg L <sup>-1</sup>	[27]
BIO <sub>total</sub>		6.91	1.64	
NEO	Healthy adults (plasma, aerial oxidation)	8.26	2092	[28]
XAN		1.74	312	
MON		0.17	42	
ISO		0.70	126 pg mL <sup>-1</sup>	
BIO		3.04	720	
6HMPT		0.87	168	
PT		6.78	1106	
NEO	Healthy adults (serum, I <sub>2</sub> /I <sup>-</sup> oxidation)	4.98	1.26	Proposed method <sup>a</sup>
XAN		19.43	3.49	
MON		1.61	0.41	
ISO		2.90	0.52 ng mL <sup>-1</sup>	
BIO		8.30	1.97	
6HMPT		0.98	0.19	
PT		5.08	0.83	
7BIO		< LOD	< LOD	

<sup>a</sup> Mean value calculated between those obtained by the external standard and standard addition methods.

were assayed and, due to the better resolution obtained between PT and BIO peaks and, considering the notable importance as marker of BIO in the biological fluids, the Poroshell column was selected. On the other hand, not significant differences were found by external standard and standard additions procedures in the levels of the pteridines in the serum samples analyzed. This allows us the analysis of all pteridines using the external standard method in only one run. The proposed methods permit us to carry out, for the first time, the determination of eight pteridines present in the serum, previously oxidized by the established I<sub>2</sub>/I<sup>-</sup> method, and to obtain the pattern of these pteridines in the serum samples of healthy persons. In general, the levels found for each pteridine are not very different from those reported for other researches.

## Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge funding from Gobierno de Extremadura and European Feder Funds (Consolidation Project of Research Group FQM003, Project GR10033).

## References

- [1] M.M. Müller, H.C. Curtius, M. Herold, C.H. Huber, *Clin. Chim. Acta* 201 (1991) 1–16.
- [2] C. Huber, J.R. Batchelor, D. Fuchs, A. Hausen, A. Lang, D. Niederwieser, G. Reibnegger, P. Swetly, J. Troppmair, H. Wachter, *J. Exp. Med.* 160 (1984) 310–316.
- [3] P. Koslinski, R. Bujak, E. Dagir, M.J. Markuszewski, *Electrophoresis* 32 (2011) 2044–2054.
- [4] S. Kaufman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50 (1963) 1085–1090.
- [5] M. Goldberg, F. Gassner, M. Merckenschlager, *Pteridines* 1 (1989) 29–35.
- [6] B. Stea, R.M. Halpern, B.C. Halpern, R.A. Smith, *Clin. Chem. Acta* 113 (1981) 231–242.
- [7] D. Fuchs, A. Hausen, G. Reibnegger, E.R. Werner, M.P. Dietrich, H. Wachter, *Immunol. Today* 9 (1988) 150–155.
- [8] D. Fuchs, G. Weiss, G. Reibnegger, H. Wachter, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 29 (1992) 307–341.
- [9] J.L. Fahey, J.M.G. Taylor, R. Detels, B. Hofmann, R. Melmed, P. Nishanian, J.V. Giorgi, *N. Engl. J. Med.* 322 (1990) 166–172.
- [10] G. Reibnegger, D. Fuchs, L.C. Fuiith, A. Hausen, E.R. Werner, G. Werner-Felmayer, H. Wachter, *Cancer Detect. Prev.* 15 (1991) 483–490.
- [11] C. Murr, A. Bergant, M. Widschwendter, K. Heim, H. Schrocksnadel, D. Fuchs, *Clin. Chem.* 45 (1999) 1998–2004.
- [12] K. Plata-Nazar, G. Luczak, A. Borkowska, A. Delinska-Galiska, E. Kozielska, K. Marek, M. Korzon, *Pteridines* 18 (2013) 19–24.
- [13] K. Plata-Nazar, G. Luczak, M. Gora-Gebka, A. Liberek, B. Kaminska, *Pteridines* 21 (2013) 11–16.
- [14] S. Messahel, A.E. Pheasant, H. Pall, J. Ahmed-Choudhury, R.S. Sungum-Paliwal, P. Vostanis, *Neurosci. Lett.* 241 (1998) 17–20.
- [15] A.M. Albrecht, J.L. Biedler, H. Baker, O. Frank, S.H. Hutner, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 19 (1978) 377–380.
- [16] B. Stea, P.S. Backlund, P.B. Berkey, A.K. Cho, B.C. Halpern, R.M. Halpern, R. A. Smith, *Cancer Res.* 38 (1978) 2378–2384.
- [17] M. Martínez-Pardo, A. Bélanger-Quintana, M.J. García Muñoz, L. Desviat, B. Pérez, M. Ugarte, *Protocolo de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las hiperfenilalaninurias. Unidad de Enfermedades metabólicas del servicio de Pediatría del Hospital Ramón y Cajal del CEDEM Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" CSIC, Madrid, 2008.*
- [18] F.T. Han, B.H. Huynh, H.L. Shi, B.C. Lin, Y. Ma, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1265–1269.
- [19] S. Trehan, K.R. Nao, P.A. Shetty, J.M. Noronha, *Cancer* 50 (1982) 114–117.

- [20] A. Mancha de Llanos, A. Espinosa-Mansilla, F. Cañada-Cañada, A. Muñoz de la Peña, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1283–1292.
- [21] A. Jiménez Girón, E. Martín-Tornero, M.C. Hurtado Sánchez, I. Durán Merás, A. Espinosa-Mansilla, *Talanta* 101 (2012) 465–472.
- [22] C. Burton, H. Shi, Y. Ma, *Anal. Chem.* 85 (2013) 11137–11145.
- [23] S.E. Gibbons, I. Stayton, Y. Ma, *Electrophoresis* 30 (2009) 3591–3597.
- [24] S. Gamagedara, S. Gibbons, Y. Ma, *Clin. Chim. Acta* 412 (2011) 120–128.
- [25] Y. Ma, C. Burton, *Biomark. Med.* 7 (2013) 1–3.
- [26] D. Fekkes, A. Voskuilen-Kooijman, *Clin. Biochem.* 40 (2007) 411–413.
- [27] W.E. Slazyk, F.W. Splerto, *Clin. Chem.* 37 (1990) 1364–1368.
- [28] B. Andondonskaja-Renz, H.J. Zeitler, *Anal. Biochem.* 133 (1983) 68–78.
- [29] E.R. Werner, D. Fuchs, A. Hausen, G. Reibnerger, H. Wachter, *Clin. Chem.* 33/11 (1987) 2016–2033.
- [30] S. Ogiwara, K. Kiuchi, T. Nagatsu, R. Teradaira, I. Nagatsu, K. Fujita, T. Sugimoto, *Clin. Chem.* 38 (1992) 1954–1958.
- [31] N. Turgan, S. Habif, Z. Parildar, D. Özmen, I. Mutaf, D. Erdener, O. Bayindir, *Clin. Biochem.* 34 (2001) 271–275.
- [32] I. Durán-Merás, A. Espinosa-Mansilla, M.J. Rodríguez Gómez, *Anal. Biochem.* 346 (2005) 201–209.
- [33] T. Fukusima, J.C. Nixon, *Anal. Biochem.* 102 (1980) 176–188.
- [34] A. Espinosa-Mansilla, I. Durán Merás, F. Salinas, *Chromatography* 53 (2001) 510–514.
- [35] E.R. Werner, A. Bichler, G. Daxenblchier, D. Fuch, L.C. Fuith, A. Huasen, H. Hetzel, *Clin. Chem.* 33 (1987) 62–66.
- [36] H. Tornsikova, P. Tomsik, P. Solich, L. Novakova, *Bioanalysis* 5 (2013) 2307–2326.
- [37] A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña, D. González Gómez, *Chem. Educ.* 10 (2005) 337–345.
- [38] G. Long, J.D. Winefordner, *Anal. Chem.* 55 (1983) 712A–724A.



## PAPER

CrossMark  
click for updatesCite this: *Anal. Methods*, 2016, 8, 6404

## Development of an HPLC-MS method for the determination of natural pteridines in tomato samples

Elisabet Martín-Tornero,<sup>\*a</sup> David González Gómez,<sup>b</sup> Isabel Durán-Merás<sup>a</sup> and Anunciación Espinosa-Mansilla<sup>a</sup>

In plants, reduced pteridines are folate biosynthesis intermediates, and the presence of these analytes in biofortification processes is considered crucial. A simple liquid chromatography-mass spectrometry (LC-ESI-MS) method has been optimized for the determination of natural pteridines in tomato samples. A solid phase extraction (SPE) step using ISOLUTE ENV cartridges has been employed for cleaning up the samples. Eleven pteridines have been assayed but only four of them have been detected and quantified in tomatoes. The stability of the pteridines and hydropteridines in tomato extracts has been studied. Validation parameters have been evaluated and good linearity ( $R^2 > 0.99$  in all cases) and precision (interday relative standard deviation values were lower than 10%) were obtained. The amounts (as  $\mu\text{g}$  per g of fresh sample) found of each pteridine were 0.019, 0.44, 0.043 and 0.087 for neopterin, 7,8-dihydroneopterin, 6-hydroxymethylpterin and pterin-6-carboxylic acid, respectively.

Received 27th May 2016  
Accepted 1st August 2016

DOI: 10.1039/c6ay01519k

www.rsc.org/methods

## 1. Introduction

Folates are involved in many critical pathways as a one-carbon source, including DNA, RNA, and protein methylation, as well as DNA synthesis.<sup>1,2</sup> Folate deficiency has been associated with an increased risk of several diseases and disorders such as megaloblastic anemia, spina bifida and anencephaly,<sup>3,4</sup> with neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease,<sup>5</sup> a high risk of cardiovascular diseases<sup>6</sup> and various types of cancer.<sup>7</sup> Recently, a review about the effect of folates on health has been published.<sup>8</sup>

Unlike plants, humans and other mammals are not able to synthesize folates, and this deficiency must be supplemented through the diet, and plant foodstuffs are the main source of folates.<sup>9,10</sup> However, in some cases, the amount of folates in vegetables is not enough to achieve the minimum daily requirements,<sup>11</sup> and different mechanisms have been proposed to increase the folate intake such as: adding synthetic folic acid to basic food (fortification); taking folic acid tablets (supplementation); or through a promising alternative, increasing the content of folates in plants by genetic engineering or biofortification.<sup>12–16</sup>

Several potential strategies to enhance folate synthesis and its accumulation in plants through biofortification have been

described. One of these options is the over-expression of the enzymes that are limiting steps in tetrahydrofolate biosynthesis.<sup>9</sup> Other procedures to induce genetic modifications in plants, based on increasing the pteridine synthesis, which are intermediates in biosynthesis of folate, have been recently reported.<sup>8,17–19</sup> Pteridines are bicyclic compounds made up of a pyrimidine and a pyrazine ring, that occur in a wide range of living systems, including plants, where significant quantities of these analytes have been found. Chemically, folate molecules are composed of a pterin, a *p*-aminobenzoic acid (PABA) and a glutamate chain. In plants, pteridines are synthesized in the cytosol, PABA in the chloroplast and folates in the plant mitochondria, according to the pathways of Fig. 1.

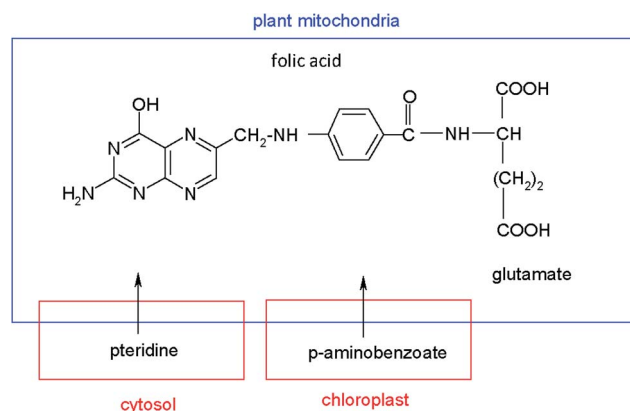


Fig. 1 Schematic pathway of folate biosynthesis in plants.

<sup>a</sup>Department of Analytical Chemistry and Research Institute on Water, Climate Change and Sustainability (IACYS), University of Extremadura, Badajoz, 06006, Spain. E-mail: elisabetmt@unex.es; iduran@unex.es; nuncy@unex.es; Tel: +34924289376

<sup>b</sup>Department of Didactic of Experimental Sciences, University of Extremadura, 10003, Cáceres, Spain. E-mail: dggomez@unex.es

A relevant research study<sup>20</sup> shows the possibility of increasing the amount of pteridines in tomatoes by genetic engineering. In the mentioned paper, authors indicate that pteridine synthesis capacity drops in ripe tomato fruit, and this decline can be modified by the specific overexpression of GTP cyclohydrolase I, the first enzyme of pteridine synthesis. Although the levels of folate were significantly increased by the above modifications, the levels of PABA and pteridines are still high, which implies that other substances that inhibit the synthesis of folate exist in transgenic vegetables. Therefore, considering the future implementation of folate biofortification in plant-based foods, we should take into account the accumulation of these intermediates, and therefore it is relevant to establish methods for their analysis.<sup>11</sup>

Research studies about the content of pteridines in vegetable samples are very scarce. The lack of data of pteridine levels in plants contrasts with the abundant information about the presence of these compounds in animals and bacteria. The occurrence and quantification of unconjugated pteridines in food resources, such as beans, bananas and spinach, has been reported, and characteristic pteridine patterns were observed in each product.<sup>21</sup> Another study has shown that plants contain small amounts of 7,8-dihydroneopterin (NH<sub>2</sub>) and 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin (6HMDHPT) (detected as their oxidized forms), neopterin (NEO) and 6-hydroxymethylpterin (6HMPT).<sup>22</sup> Crude leaves extracted from transgenic crop lines were analyzed by HPLC, and the total pteridinic compounds were expressed as NEO.<sup>14</sup> These authors indicate that the levels of pteridines in crude extracts of non-transgenic plants are very low, but the concentration increases up to 1100-fold in transgenic plants.

It has been described that the pteridines, NEO, monapterin (MON) and 6HMPT, as well as their potentially reduced forms and unknown pteridine glycosides, are accumulated in tomatoes.<sup>8</sup> Díaz de la Garza *et al.*<sup>20</sup> proposed a fluorimetric HPLC method for the analysis of pteridines and PABA in biofortified tomatoes. This method is based on taking representative segments of tomatoes and performing a pretreatment of the samples, using liquid-liquid extraction followed by acid I<sub>2</sub>/I<sup>-</sup> pre-oxidation, in order to transform the reduced forms into the fluorescent oxidized pteridines. A scatter plot of the total pteridine level *versus* folate content shows that the maximal folate concentration in plants was found at pteridine levels of about 25 nmol g<sup>-1</sup> of fresh weight. Higher pteridine concentrations do not increase folate levels. A total pteridine content up to about 60 nmol g<sup>-1</sup> was reported in transgenic tomatoes. Later, and using the mentioned pre-oxidation step, pteridines were analyzed in biofortified tomatoes, and the total pteridine amount was expressed as 6HMPT, but the amounts of each individual pteridine were not reported.<sup>19</sup> Also, in this paper the authors indicated that the pericarp of velvet bean (a medicinal legume) contains 470 nmol g<sup>-1</sup> fresh weight of total pteridine, which is 25 times higher than the pteridine content of transgenic tomatoes. Rodrigues *et al.* analyzed NEO, MON, 6HMPT and pterin-6-carboxylic acid (PT6C) in spinach, beets and tomatoes. The pteridine content in wild tomato cultivars, raw spinach and raw red beets was on the order of 1 nmol g<sup>-1</sup>.<sup>23</sup>

In all the above-proposed methods, fluorimetric detection has been used, and therefore, a pre-oxidation step of the sample to generate the fluorescent forms from non-fluorescent hydropteridines was necessary. MS detection allows the analysis of the pteridines in their oxidation state and the pre-oxidation step is avoided. This methodology has been explored in biological samples, such as urine or serum.<sup>24</sup>

HPLC hyphenated with mass spectrometry is the most widely applied methodology in the analysis of folates, because it allows qualitative and quantitative information of folate derivatives in a variety of foods and, recently, in tomatoes.<sup>25</sup> However, the determination of pteridinic precursors in vegetables using LC-MS methods has been sparingly carried out. LC-MS/MS has been applied to determine pteridines in potatoes and in *Arabidopsis thaliana*.<sup>26</sup> Recently, a relevant paper about the degradation of pteridines in plants during sample preparation using UHPLC-MS/MS has been published.<sup>27</sup> In the above mentioned paper the authors report that dihydropterins are subjected to interconversion, on column, in source and auto oxidation, and they are degraded into non-pterin products during boiling. Later, Burton *et al.*<sup>28</sup> established the pterinomic workflow for 15 pteridin derivatives in urine using HPLC-MS/MS revealing that previous oxidative steps were inefficient. The elimination of the preoxidation step in the analysis of pteridinic derivatives was previously recommended by Cañada *et al.*<sup>29</sup> It is remarkable that Burton *et al.* showed that 7,8-dihydroxanthopterin exhibited negligible in-source oxidation to xanthopterin. However data about the potential oxidation of dihydroneopterin (NH<sub>2</sub>) are not reported in this paper.

Therefore, the aim of this work was to develop a simple liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method, potentially useful for the determination of natural pteridines present in different types of samples and, particularly, detecting and determining those that exist in tomato samples. A non-oxidation step is applied and we are able to determine each pteridinic compound in its natural oxidation state. Due to the controversy about the hydropteridine stability using MS detection, a study about the stability of the pteridinic reduced forms in tomato samples has also been developed in this study. Research has been focused on those pteridinic derivatives present in tomatoes such as dihydroneopterin and a soft SPE treatment has been carried out to prevent the natural oxidation state of pteridinic compounds.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemical reagents and solutions

NH<sub>2</sub>, NEO, 6HMPT, MON, PT6C, 6HMDHPT, biopterin (BIO), pterin (PT), isoxanthopterin (ISO), xanthopterin (XAN), and 7,8-dihydrobiopterin (BH<sub>2</sub>) were obtained from Schircks Laboratory (Jona, Switzerland). Dithiothreitol (DTT) and formic acid were from Sigma (Sigma-Aldrich S.A., Madrid, Spain). HPLC-grade acetonitrile (ACN) was purchased from Merck (Madrid, Spain). Methanol and hydrochloric acid were from Scharlau (Scharlau, Barcelona). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q system (Waters Millipore, Milford, MA, USA).

Stock standard solutions of pteridines (15–30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) were prepared by exact weighing of each solid pteridine, dissolution in ultrapure water by adding of 0.010 M sodium hydroxide up to pH near 10.5, and neutralization with 0.010 M hydrochloric acid. BH2 and NH2 standard solutions were prepared daily in the same way as standard solutions of pteridines, but containing 0.1% DTT to minimize the spontaneous oxidation due to environmental oxygen.<sup>29</sup> Exposure to direct sunlight was avoided. Pteridine standard solutions were stored at  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  and they were stable for at least 3 weeks.

A standard working mixture solution containing 1.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of each pteridine and hydropteridine was prepared by dilution of the stock standard solutions with ultrapure water. Other solutions were prepared *via* serial dilutions and they were used in the generation of the calibration curves.

## 2.2. Instrumentation

The chromatographic studies were performed on an Agilent 1100 LC High Performance Liquid Chromatograph (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), equipped with an online degasser, quaternary pump, autosampler Agilent 1290 infinity thermostated at  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and an oven column compartment. The ChemStation software (Agilent ChemStation for LC-MS system, Rev.B.04.01) was used for controlling the instrument, data acquisition and data analysis. Chromatographic separation was achieved on an analytical column Zorbax Eclipse XDB-C18, 250–4.6 mm and 5  $\mu\text{m}$  particle size (Agilent Technologies). The column temperature was set at  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Gradient mode was applied. The flow rate was set at  $0.6\text{ mL min}^{-1}$  and the injection volume was 20  $\mu\text{L}$ .

Detection was performed with an Agilent Technologies single quadrupole mass spectrometer, model 6120, equipped with an electro-spray interface (ESI) operated in the positive ionization mode. Nitrogen was used as the nebulizer gas. Mass spectrometer values of capillary voltage, nebulizer pressure, nitrogen flow rate and temperature were adjusted to 4000 V, 40 psi,  $10\text{ mL min}^{-1}$  and  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectively. A fragmentor voltage of 100 V was selected, since it provided the best sensitivity with reference compounds. Single ion monitoring (SIM) was selected as operation mode using the target ion  $[\text{M} + \text{H}]^{+}$  for all the studied compounds.

Calibration curves and analytical figures of merit were performed by means of the ACOC program, developed by our research group, in MatLab code.<sup>30</sup>

## 2.3. Extraction of tomato samples

Red ripe stage tomatoes were bought in local supermarkets. On the day of purchase and after washing, tomatoes were finely triturated and frozen in liquid nitrogen prior to lyophilization. The lyophilized tomatoes were stored at  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  until needed. About one gram of lyophilized tomatoes was exactly weighed, and pteridines were extracted two times, with 10 mL each time, of the methanolic/water pH 12 (1/1, v/v) mixture alkalinized with sodium hydroxide. In each extraction, the sample was sonicated for 15 minutes, and centrifuged at 3000 r.p.m. (10 minutes). The supernatants were recombined, neutralized, filtered, and

diluted to 25 mL with ultrapure water. The tomato extract was stable for at least 10 days.

## 2.4. Purification of tomato extracts

Purification of samples was carried out by solid phase extraction (SPE). Aliquots of 3.0 mL of the tomato extracts were passed through an ISOLUTEENV+ (hydroxylated polystyrene–divinylbenzene copolymer) cartridge, previously conditioned with 5 mL of methanol and 5 mL of ultrapure water. The elution of the retained pteridines was carried out with 3.0 mL of acetonitrile : water, 80 : 20 (v/v). Finally, 1.0 mL of the eluate was evaporated to dryness by a nitrogen stream, and the residue was re-dissolved with 1.0 mL of ultrapure water and filtered through a 0.2  $\mu\text{m}$  PTFE filter for LC-MS analysis.

## 2.5. Quantification of pteridines present in tomato samples

The standard addition method was used to calculate the concentrations of each pteridine in tomato samples. Spiked lyophilized tomato samples, at five different concentration levels for each pteridine in the range between 30 and 200  $\text{ng mL}^{-1}$ , were prepared. Each sample was prepared by adding 800  $\mu\text{L}$  of the tomato extract (or 200  $\mu\text{L}$  in the case of the determination of NH2), into a vial containing variable volumes of pteridine and hydropteridine standard working mixtures, and diluting to 1 mL with ultrapure water. Peak areas of the Extracted Ion Chromatogram (EIC) were used for the quantification of all the assayed species.

## 2.6. Sensitivity, precision and accuracy

Limits of detection (LODs) were calculated according to the Long and Winefordner criterion<sup>31</sup> ( $k = 3$ ), and limits of quantification (LOQs) as  $(\text{LOD}/3) \times 10$ , using spiked tomato samples at five concentration levels (by triplicate). The accuracy of the proposed method was calculated for tomato samples spiked at five concentration levels between 30 and 200  $\text{ng mL}^{-1}$  in triplicate. Intraday ( $n = 6$ ) and interday ( $n = 5$ ) precision assays were carried out in samples containing NH2, NEO, 6HMPT and PT6C at the LOQ amount, and expressed as the relative standard deviation (RSD).

# 3. Results and discussion

## 3.1. Optimization of MS variables

The optimization of MS parameters and LC separation conditions was based on previous experiments developed by our research group for the determination of pteridines in biological fluids.<sup>24</sup>

Flow injection analysis (FIA) of each pteridine standard solution was performed with the aim to optimize fragmentor voltage (FV), capillary voltage (CV), nebulizer pressure (NP), nitrogen flow rate and temperature, in ESI positive and negative modes, in order to obtain the highest sensitivity. Three FV values of 50, 75 and 100 V, in negative mode, and two FV values of 75 and 100 V, in positive mode, were assayed. Two CV values of 4000 and 4500 V were tested in both modes. The best results were obtained with 100 and 4500 V for FV and CV respectively in

negative mode, and with 100 V for FV and 4000 or 4500 V for CV, in positive mode. The results show that the protonated molecular ion  $[M + H]^+$  can be selected as the target ion of the analytes due to the presence of easily protonated amino groups in the molecules. Also, the electrospray in positive mode is more stable than in negative mode. The instrumental variables were optimized to obtain the highest sensitivity of the  $[M + H]^+$  ion, using the SIM mode with FV and CV at 100 and 4500 V, respectively.

NP was varied between 10 and 55 psi and the abundance remains constant for psi values higher than 30. The best signal/noise ratio was obtained for a gain value of 15. The nitrogen flow rate and temperature do not significantly affect the abundance and 10 mL min<sup>-1</sup> and 300 °C were selected for later studies.

### 3.2. Optimization of the LC separation

Once MS parameters were established, chromatographic conditions were optimized in order to attain an adequate elution of the target compounds and a short analysis time. The mobile phase composition was evaluated considering the different polarities of the pteridines analyzed, and the identical molecular-ions for NEO and MON, and for XAN and ISO. The presence of very low amounts of organic solvents such as methanol or ACN, in the mobile phase, generates a drastic diminishing of the capacity factor of the more polar compounds. However, a notable amount of organic solvent is necessary to elute the less polar compounds. On the other hand, a slightly acidic medium is necessary to avoid the formation of charged pteridines that are poorly retained. These facts indicate the necessity of applying a gradient mode for the elution of the pteridinic compounds and, in this sense, various analytical gradients were evaluated with different formic acid solutions, and ACN or methanol as organic phases. The better resolution and the higher ion abundance were obtained with mixtures of 0.1% formic acid containing 2% of ACN (solution A), and pure ACN containing 2% of formic acid (solution B). The optimized gradient was: 100% of eluent A during the first 8 min, increasing the percentage of eluent B up to 20% (in 8 min, 2.5% min<sup>-1</sup>). These conditions were maintained for 4 min and, finally, the eluent B content was decreased to the initial conditions (0% B), and the column was re-equilibrated for 10 min. The flow rate was set constant at 0.6 mL min<sup>-1</sup>, the injection volume was 20 µL, and the column temperature was kept at 22 °C. Fig. 2 shows the EICs obtained from a stock standard mixture of the 11 pteridines under these optimized conditions. Moreover in Table 1, the retention times for each pteridine and the *m/z* relation for the  $[M + H]^+$  ions, in a standard solution containing the eleven pteridinic and hydropteridinic derivatives, are summarized. In the mentioned table, resolution values in the EIC chromatogram obtained for those compounds with identical molecular-ions, such as NEO-MON and XAN-ISO, are shown.

### 3.3. SPE cleanup process in tomato samples

When MS detection is used in the analysis of complex matrix samples, such as vegetables, a cleanup step prior to chromatographic separation is usually recommended. The cleanup step

is intended to protect the chromatographic column, and minimize the matrix effect. SPE is the selected methodology in most of the food bibliographic data due to its easy use, speed and variety of adsorbents. In our case, tomato samples were cleaned by SPE, using the ISOLUTEENV (200 mg) cartridge with the hydroxylated polystyrene-divinylbenzene copolymer as the sorbent. In the first place, the cartridge was conditioned with 5 mL of 100% methanol and then flushed with 5 mL of ultrapure water. The extraction procedure was assayed with 3.0 mL of the extracts of tomatoes spiked with pteridines between 150 and 300 µg mL<sup>-1</sup>. With the object of verifying if the pteridines were retained in the cartridge, the eluate was injected into the chromatographic system. The absence of any signal at the same retention time of the selected compounds indicates that pteridines have been retained. The elution of pteridines was tested with different solvents, such as ACN, methanol, and different mixtures of the organic solvents in ultrapure water, 80/20, 50/50 and 20/80 (v/v, organic solvent : ultrapure water), in order to achieve the maximum recovery. A pneumatic manifold allowed us to elute simultaneously twenty four tomato samples using a precise and repetitive flow of eluent. The best recovery values were obtained using between 1.5 and 3 mL of acetonitrile-water 80 : 20, v/v. The repeatability of the SPE extraction procedure was checked with nine independent extracts, and the average recovery values ranged between 80% for XAN and ISO and 118% for BH2. Similar recovery values were obtained when the elution was performed with 1.5 mL or 3 mL of the elution mixture.

### 3.4. Application to the analysis of pteridines in tomato samples

In the first place and with the object of focusing the research on compounds that are present in tomatoes, an unspiked aliquot of the tomato extract and a spiked sample with a standard mixture of pteridines was injected into the chromatographic system. The extracted-ion chromatograms (EICs) obtained in SIM mode are shown in Fig. 3. Only four pteridines were detected in the tomato samples: NEO, NH2, 6HMPT and PT6C but, due to bibliographic data that indicate the presence of MON in tomatoes,<sup>19</sup> this pteridine was also investigated in later studies. From this point, the studies were centered in these five pteridines and hydropteridines.

### 3.5. Stability of the pteridines in the tomato extract

Due to the known instability of the aqueous solutions of hydropteridines, aliquots of the same tomato extract, spiked with NEO, NH2, 6HMPT and PT6C, were analyzed for 20 days, to establish the stability of the extracted tomato solution. The average value of the relative abundance of three injections for the selected pteridines during 20 days is represented in Fig. 4a, which shows that for NEO, 6HMPT and PT6C, it remains constant for the first ten days, and decreases after that. NH2 is the pteridine presenting minor stability, remaining unchanged only for 7 days, and their relative abundance decreases a third of its initial value after 20 days. A week was fixed as the maximum time for analysis after preparation of the tomato sample.

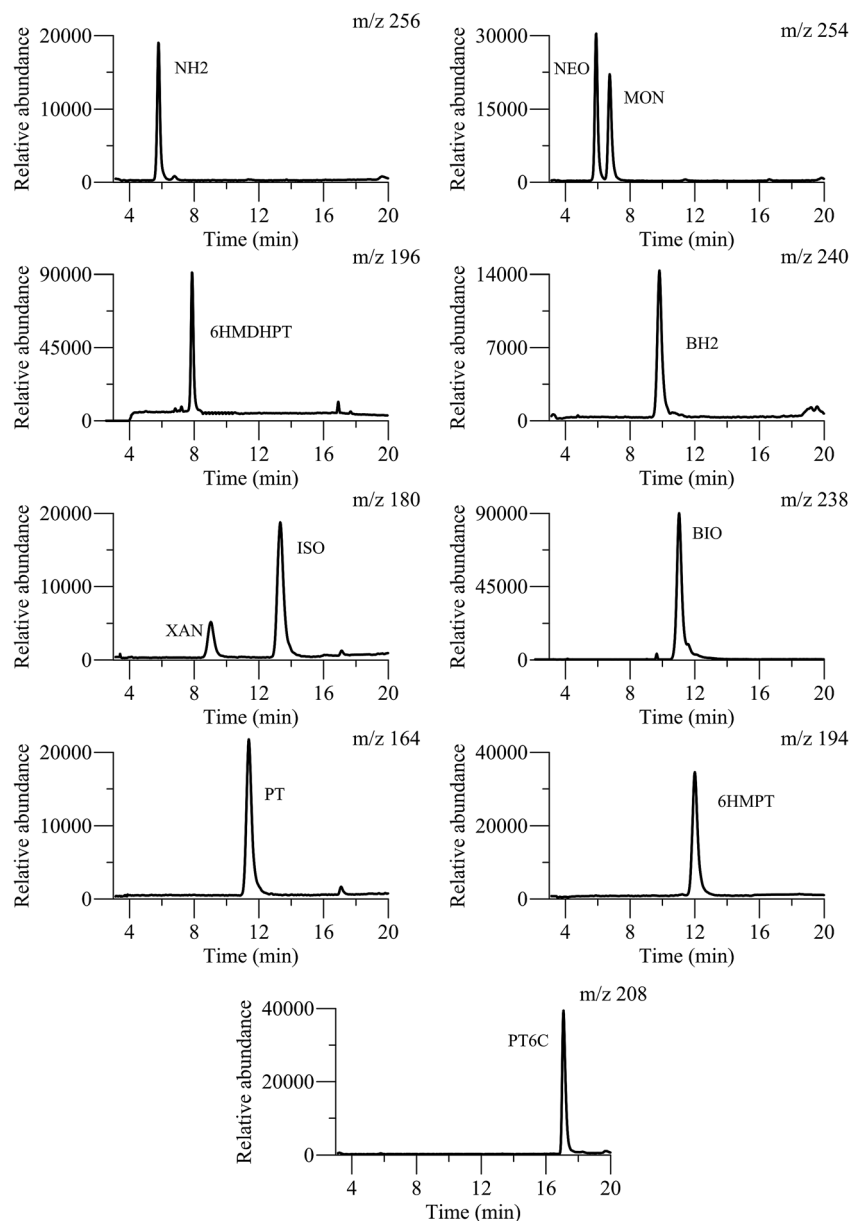


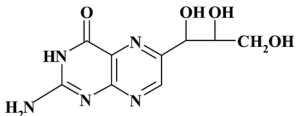
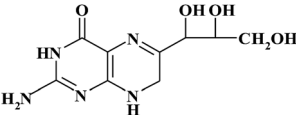
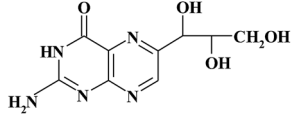
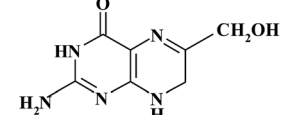
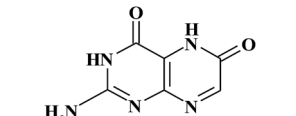
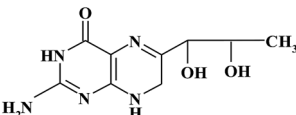
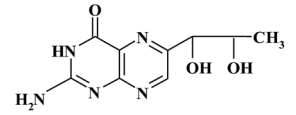
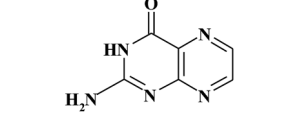
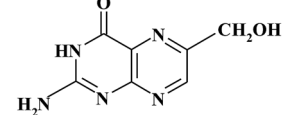
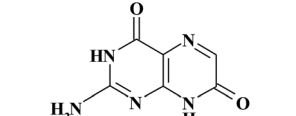
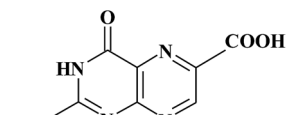
Fig. 2 EICs obtained from the analysis of a standard pteridine mixture with the optimized separation method.

Furthermore, and in order to test if the target compounds undergo degradation and/or interconversion processes, tomato extracts were individually spiked with each pteridine and subjected to the SPE clean-up step. For each solution, the signals in the MS detector were simultaneously monitored for the  $m/z$  of all ions. This study has also been done with standard solutions. We have seen no evidence of degradation of the pteridines when they are treated with this procedure. As hydropterines are more unstable and easily oxidizable, an exhaustive study was carried out with NH<sub>2</sub>. In the first place, and with a standard solution of NH<sub>2</sub>, subjected to the SPE clean step, EICs at  $m/z$  values of 256 and 254, corresponding to NH<sub>2</sub> and NEO (oxidized pteridine) respectively, were obtained. Fig. 4b shows both chromatograms, where it can be appreciated a very small signal corresponding to NEO, practically negligible compared with the signal from NH<sub>2</sub>

indicating that the oxidation is minimal. In the second place, we have studied the tomato sample. For this, we have compared the extracted ion chromatograms, for  $m/z$  values of 256 and 254, obtained from spiked tomato samples at two different levels, 100 ng mL<sup>-1</sup> and 200 ng mL<sup>-1</sup> of NH<sub>2</sub>. In Fig. 4c, it can be observed that the NH<sub>2</sub> signal (at  $m/z$  256) increases when the amount of NH<sub>2</sub> increases, as expected. However, the signal corresponding to NEO ( $m/z$  254) remains constant. This allows us to confirm that in this matrix, and with the sample treatment proposed, in the presence of organic solvent and at room temperature, NH<sub>2</sub> is stable. These data are contradictory with the results reported by Van Daele and co-workers.<sup>27</sup> However, results similar to ours have been recently described by Burton *et al.*,<sup>28</sup> who found negligible in-source oxidation of 7,8-dihydroxanthopterin to xanthopterin.



Table 1 Separation characteristics of pteridines in LC-ESI-MS using gradient elution mode<sup>a</sup>

Pteridinic derivative	Chemical structure	$t_R$ (min)	$m/z$ $[M + H]^+$	Resolution EICs mode
NEO		5.90	254	
NH2		6.00	256	
MON		6.86	254	
6HMDHPT		8.00	196	$R_{MON/NEO} = 2.98$
XAN		9.40	180	
BH2		9.90	240	
BIO		10.72	238	
PT		11.73	164	
6HMPT		12.28	194	
ISO		13.76	180	$R_{ISO/XAN} = 10.48$
PT6C		18.12	208	

<sup>a</sup> Fragmentor voltage: 100 V, capillary voltage: 4500 V, nebulizer pressure: 30 psi, temperature: 300 °C.

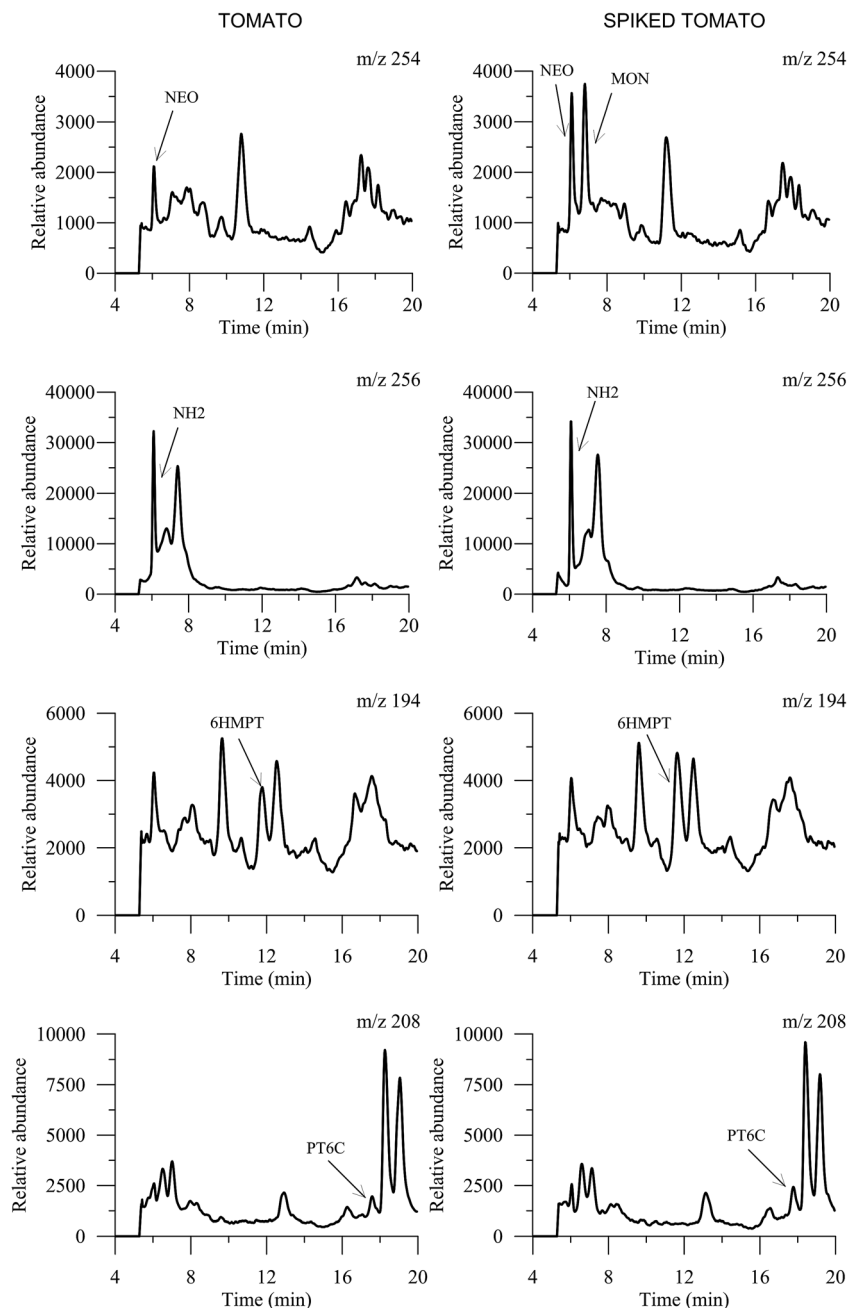


Fig. 3 EICs of an unspiked tomato sample and a spiked tomato sample.

### 3.6. Study of the matrix effect

Before performing the calibration and quantification of the pteridines, the influence of the matrix over the HPLC-ESI-MS method was evaluated. For this, a comparison of the slopes between external calibration curves in ultrapure water, and standard addition curves with tomato extracts spiked with NH<sub>2</sub>, NEO, MON, 6HMPT and PT6C, at five different concentrations in the range 0–200 ng mL<sup>-1</sup>, in triplicate, was carried out.

The matrix effect was studied with extracts of tomatoes before and after the SPE cleanup. In both cases, for each pteridine, the regression plot was obtained and the comparison between the slopes of external calibration and standard

addition was accomplished applying the *F* and *t* statistical tests at the 95% confidence level.<sup>32</sup> The matrix effect, expressed as percentage, was calculated as: % matrix effect = 100 × (tomato/water slope ratio) – 100.

When the non-SPE clean up extracts were analyzed, statistical differences are observed between both external standard and standard addition calibration slopes. This fact indicates a matrix effect for the analysis of all pteridines exhibiting an absolute value in the range 29.5–69.2%. For most of the pteridines, a matrix suppression effect was observed, although for 6HMPT an ion enhancement effect was observed. When SPE clean up treatment was used, a softer matrix effect was observed

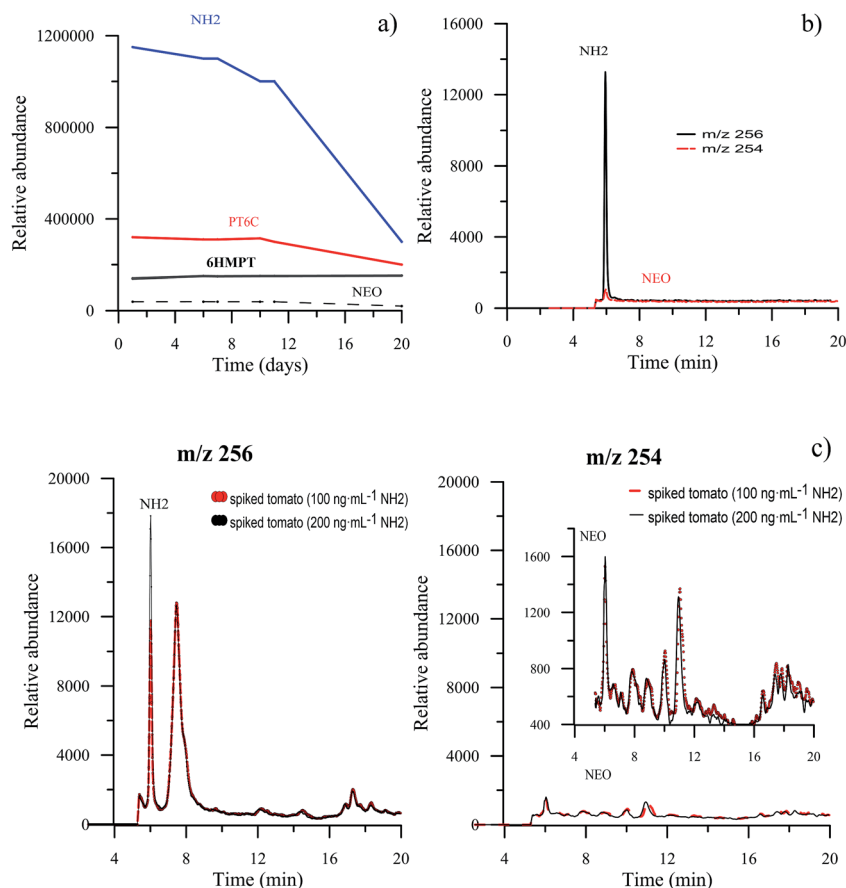


Fig. 4 (a) Stability of the pteridines detected in tomatoes. (b) Extracted ion chromatograms of a standard solution of NH<sub>2</sub> at 256 and 254 *m/z* values. (c) Extracted ion chromatograms of tomato extracts spiked with NH<sub>2</sub> at 100 and 200 ng mL<sup>-1</sup>.

with absolute values between 6.3 and 50.4%, particularly for NH<sub>2</sub>, NEO and PT6C, however for MON the results were not improved. Then, the standard addition methodology, previous SPE cleanup, was recommended for analyzing pteridines in tomato samples.

### 3.7. Validation of the method

Linearity has been established in cleaned SPE lyophilized tomato extracts, in the range LOQ–300 ng mL<sup>-1</sup>. Different linearity ranges were obtained depending on the compound and statistical parameters were calculated. Good linearity was observed for the five pteridines, and determination coefficients ( $R^2$ ) were higher than 0.99 for all analytes. The results of the least squares regression analysis for the standard calibrations and detection and quantification limits are summarized in Table 2. LODs ranged between 8 and 12 ng mL<sup>-1</sup>. The lowest limit of detection was found for NEO (8 ng mL<sup>-1</sup>) and very similar LOD values were obtained for MON, NH<sub>2</sub> and PT6C. LOQs ranged from 27 to 41 ng mL<sup>-1</sup>. To evaluate the repeatability (intraday precision,  $n = 6$ ) of the method, RSDs were evaluated with solutions of SPE clean tomato extracts containing 27 ng mL<sup>-1</sup> of NEO, 40 ng mL<sup>-1</sup> of MON, 41 ng mL<sup>-1</sup> of NH<sub>2</sub>, 35.0 ng mL<sup>-1</sup> of 6HMPT, and 40.7 ng mL<sup>-1</sup> of PT6C. Interday precision (reproducibility) was analyzed over 5 consecutive days at the same concentration levels. Intraday

precision ranged from 1.1% for NEO and 6HMPT up to 4.1% for NH<sub>2</sub>, and interday precision values are lower than 9.6% for all analytes, which indicates the good repeatability of the proposed method.

### 3.8. Analysis of tomato samples

Finally, the proposed LC-ESI-MS method was applied to the analysis of tomato samples. The standard addition methodology was employed and the tomato extracts were spiked at five concentration levels, for each pteridine, in the range between 30 and 200 ng mL<sup>-1</sup>. Samples were prepared in triplicate, and the results are shown in Table 3 as mean values and recoveries. Accuracy was evaluated through the calculation of percent recoveries for each pteridine and, in all cases, satisfactory values between 83 and 117% were obtained. The amounts of pteridines obtained from lyophilized tomatoes are also shown in Table 3. For the oxidized pteridines, the concentrations found are 0.075 nmol g<sup>-1</sup> of NEO, 0.22 nmol g<sup>-1</sup> of 6HMPT, and 0.42 nmol g<sup>-1</sup> of PT6C. And for the hydropteridine NH<sub>2</sub>, 1.72 nmol g<sup>-1</sup> was found. These results are in accordance with those previously reported by Rodrigues *et al.* These authors, in a previous paper, have quantified several pteridines in wild-type tomatoes using HPLC-fluorimetric detection.<sup>23</sup> The reported pteridine content was on the order of 1 nmol g<sup>-1</sup>, but in this procedure NH<sub>2</sub> was



Table 2 Statistical regression parameters for cleaned tomato samples

Parameters	NEO	MON	NH2	6HMPT	PT6C
Slope $\pm$ Sb <sup>a</sup>	690 $\pm$ 17	1341 $\pm$ 44	617 $\pm$ 2	2708 $\pm$ 83	520 $\pm$ 18
Intercept $\pm$ Sa <sup>b</sup>	6331 $\pm$ 1856	1182 $\pm$ 535	33 990 $\pm$ 223	56 853 $\pm$ 9260	22 113 $\pm$ 1971
R <sup>2</sup>	0.9948	0.9935	0.9903	0.9906	0.9886
Linearity <sup>c</sup> (%)	98	97	98	97	98
LOD <sup>d</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )	8.1	12.0	12.3	10.5	12.2
LOQ <sup>e</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )	27.0	40.0	41.0	35.0	40.7

<sup>a</sup> Sb: slope standard deviation. <sup>b</sup> Sa: intercept standard deviation ( $n = 15$ ). <sup>c</sup>  $\alpha = \beta = 0.05$ . <sup>d</sup> LOD, limit of detection according to the Long-Winefordner criterium ( $k = 3$ ). <sup>e</sup> LOQ, limit of quantification:  $LD \times 10/3$ .

Table 3 Recovery values for spiked tomato samples

Analytes	Added (ng mL <sup>-1</sup> )	Found <sup>a</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )	Recovery <sup>a</sup> (%)	Amount <sup>b</sup> ( $\mu$ g pteridine per g of lyophilized tomatoes $\pm$ confidence interval)	Amount <sup>b</sup> ( $\mu$ g pteridine per g of fresh tomatoes $\pm$ confidence interval)
NEO	0	<LOQ	—	0.29 $\pm$ 0.10	0.019 $\pm$ 0.006
	29.92	37.98	83		
	49.37	57.07	89		
	89.76	102.87	100		
	149.60	157.59	97		
	198.97	209.19	99		
NH2	0	54.53	—	6.90 $\pm$ 1.15	0.44 $\pm$ 0.11
	29.72	83.45	97		
	49.60	106.89	106		
	99.20	149.57	96		
	148.80	211.75	106		
	198.40	245.86	96		
MON	0	<LOD	—	<LOD	—
	30.00	<LOQ	—		
	49.50	90.60	112		
	90.00	137.70	114		
	150.00	191.26	104		
	199.50	242.18	104		
6HMPT	0	<LOQ	—	0.68 $\pm$ 0.19	0.043 $\pm$ 0.012
	30.08	49.48	82		
	49.63	65.11	82		
	90.27	115.06	100		
	150.40	169.39	96		
	200.03	222.35	99		
PT6C	0	42.02	—	1.33 $\pm$ 0.34	0.087 $\pm$ 0.011
	30.16	77.23	117		
	49.76	96.26	109		
	90.48	144.35	113		
	150.08	192.10	100		

<sup>a</sup> Mean value for three individual replicates for each added amount. <sup>b</sup>  $\alpha = 0.05$ .

not detected due to the previous oxidation step, necessary in the HPLC-fluorimetric method.

Taking into account the lyophilized process applied, and the average water content ( $93.5 \pm 2.0\%$ ) of the assayed tomato samples, the concentrations of the pteridines have also been expressed as  $\mu$ g pteridine per g of fresh tomatoes, and  $0.019 \pm 0.006$ ;  $0.44 \pm 0.11$ ;  $0.043 \pm 0.012$  and  $0.087 \pm 0.011$  for NEO, NH2, 6HMPT and PT6C, respectively were obtained. The obtained results indicate that NH2 is the most abundant compound and NEO is the compound in a smaller concentration. MON was not detected under the assayed conditions.

## 4. Conclusions

Therefore, a new analytical HPLC-ESI-MS method has been developed to determine precursors of folates in tomatoes as an alternative to fluorimetric detection that does not allow the determination of hydropteridine compounds or HPLC-MS/MS because not everyone has this technology available.

The proposed method allows a simple determination of the natural forms of pteridines in tomatoes by LC-ESI-MS. On the other hand, the use of a simple quadrupole analyzer eases its use as an easy and robust detector in routine analysis. With the

object to keep the natural composition of the reduced pteridines in the tomato samples, preoxidation steps and boiling processes are avoided. Under the proposed conditions, the oxidation of the dihydroneopterin in tomatoes is negligible. This method could be useful for monitoring pteridine formation in biofortification studies to provide overproduction of folates in tomatoes, and it could be easily modified with similar aims to analyze other vegetables.

## Abbreviations

ACN	Acetonitrile
BH2	7,8-Dihydrobiopterin
BIO	Biopterin
CV	Capillary voltage
DTT	Dithiothreitol
EICs	Extracted ion chromatograms
ESI	Electro-spray interface
FIA	Flow injection analysis
FV	Fragmentor voltage
ISO	Isoxanthopterin
6HMDHP	6-Hydroxymethyl-7,8-dihydropterin
6HMPT	6-Hydroxymethylpterin
LC-ESI-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
LOD	Limits of detection
LOQ	Limits of quantification
MON	Monapterin
NEO	Neopterin
NH2	7,8-Dihydroneopterin
PABA	<i>p</i> -Aminobenzoic acid
PT	Pterin
PT6C	Pterin-6-carboxylic acid
RSD	Relative standard deviation
SIM	Single ion monitoring
SPE	Solid phase extraction step
TIC	Total ion chromatogram
XAN	Xanthopterin

## Acknowledgements

The authors are grateful to the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (Project CTQ2014-52309-P) and the Junta de Extremadura (GR15090-Research Group FQM003), both co-financed by the European FEDER funds, for financially supporting this work. E. Martín-Tornero thanks Ministerio de Economía y Competitividad of Spain and European social funds for a FPI grant with reference BES-2015-075407 (Order ECC/1402/2013, de 22 of July, modified by the order ECC/1820/2014, of 26 of September, and by the order ECC/2483/2014, of 23 of December; BOE no. 140 of 12/06/15).

## References

- 1 R. J. Cook, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2001, **392**, 226–232.
- 2 P. J. Stover, in *Folate in Health and Disease*, ed. L. B. Bailey, CRC Press, Taylor & Francis Group, Gainesville, FL, USA, 2nd edn, 2009, pp. 49–74.
- 3 J. I. Rader and B. O. Schneemann, *Pediatrics*, 2006, **117**, 1394–1399.
- 4 P. De Wals, F. Tairou, M. I. Van Allen, S. Uh, R. B. Lowry, B. Sibbald, J. A. Evans, M. C. Van den Hof, P. Zimmer, M. Crowley, B. Fernandez, N. S. Lee and T. Niyonsenga, *N. Engl. J. Med.*, 2007, **357**, 135–142.
- 5 S. Seshadri, A. Beiser, J. Selhub, P. F. Jacques, I. H. Rosenberg, R. B. P. D'Agostino, W. F. Wilson and P. A. Wolf, *N. Engl. J. Med.*, 2002, **346**, 476–483.
- 6 O. Stanger, *Cell. Mol. Biol.*, 2004, **50**, 953–988.
- 7 S. W. Choi and S. Friso, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2005, **43**, 1151–1157.
- 8 D. Blancquaert, S. Storozhenko, K. Loizeau, H. De Steur, V. De Brouwer, J. Viaene, S. Ravanel, F. Rebeille, W. Lambert and D. Van Der Straeten, *Crit. Rev. Plant Sci.*, 2010, **29**, 14–35.
- 9 J. Scott, F. Rébeillé and J. Fletcher, *J. Sci. Food Agric.*, 2000, **80**, 795–824.
- 10 E. J. Konings, H. H. Roomans, E. Dorant, R. A. Goldbohm, W. H. Saris and P. A. Van den Brandt, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2001, **73**, 765–776.
- 11 D. DellaPenna, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, **104**, 3675–3676.
- 12 D. DellaPenna, *Science*, 1999, **285**, 375–379.
- 13 E. Bouis, *J. Nutr.*, 2002, **132**, 491–494.
- 14 T. Hossain, I. Rosenberg, J. Selhub, G. Kishore, R. Beachy and K. Schubert, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, **101**, 5158–5163.
- 15 A. D. Hanson and J. F. Gregory III, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2011, **62**, 105–125.
- 16 D. Blancquaert, H. De Steur, X. Gellynck and D. Van Der Straeten, *J. Exp. Bot.*, 2014, **65**, 895–906.
- 17 G. J. Basset, E. P. Quinlivan, S. Ravanel, F. Rébeillé, B. P. Nichols, K. Shinozaki, M. Seki, L. C. Adams-Phillips, J. J. Giovannoni, J. F. Gregory III and A. D. Hanson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, **101**, 1496–1501.
- 18 G. J. Basset, R. Ravanel, E. P. Quinlivan, R. White, J. J. Giovannoni, F. Rébeillé, B. P. Nichols, K. Shinozaki, M. Seki, J. F. Gregory III and A. D. Hanson, *Plant J.*, 2004, **40**, 453–461.
- 19 R. I. Díaz de la Garza, J. F. Gregory III and A. D. Hanson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, **104**, 4218–4222.
- 20 R. Díaz de la Garza, E. P. Quinlivan, S. M. Klaus, G. J. Basset, J. F. Gregory III and A. D. Hanson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, **101**, 13720–13725.
- 21 M. Kohashi, K. Tomita and K. Iwai, *Agric. Biol. Chem.*, 1980, **44**, 2089–2094.
- 22 A. Goyer, V. Illarionova, S. Roje, M. Fischer, A. Bacher and A. D. Hanson, *Plant Physiol.*, 2004, **135**, 103–111.
- 23 V. Rodrigues da Silva, E. P. Quinlivan, A. D. Hanson and J. F. Gregory, *FASEB J.*, 2007, **21**, A346.
- 24 A. Jiménez, E. Martín-Tornero, M. C. Hurtado Sánchez, I. Durán Merás and A. Espinosa-Mansilla, *Talanta*, 2012, **101**, 465–472.

- 25 K. Tyagi, P. Upadhyaya, S. Sarma, V. Tamboli, Y. Sreelakshmi and R. Sharma, *Food Chem.*, 2015, **179**, 76–84.
- 26 D. Blancquaert, S. Storzhenko, J. Van Daele, C. P. Stove, R. G. Visser, W. E. Lambert and D. Van der Straeten, *J. Exp. Bot.*, 2013, **64**, 3899–3909.
- 27 J. Van Daele, D. Blancquaert, F. Kiekens, D. Van der Straeten, W. E. Lambert and C. P. Stove, *Food Chem.*, 2016, **194**, 1189–1198.
- 28 C. Burton, H. Shi and Y. Ma, *Anal. Chim. Acta*, 2016, **927**, 72–81.
- 29 F. Cañada-Cañada, A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña and A. Mancha de Llanos, *Anal. Chim. Acta*, 2009, **648**, 113–122.
- 30 A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña and D. González Gómez, *Chem. Educ.*, 2005, **10**, 337–346.
- 31 G. L. Long and J. D. Winefordner, *Anal. Chem.*, 1983, **55**, 712A–724A.
- 32 D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. De Jong, P. J. Lewi and J. Smeyers-Verbeke, in *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Elsevier, Amsterdam, 1997, vol. 20.





# High-performance liquid chromatography with fast-scanning fluorescence detection and post-column on-line photoderivatization for the analysis of folic acid and its metabolites in vegetables



Elísabet Martín Tornero, Anunciación Espinosa-Mansilla, Isabel Durán Merás \*

Department of Analytical Chemistry and Research Institute on Water, Climate Change and Sustainability (IACYS), University of Extremadura, Badajoz 06006, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 21 December 2016  
Received in revised form 21 March 2017  
Accepted 25 March 2017  
Available online 28 March 2017

### Keywords:

Photochemistry  
Folates  
High performance liquid chromatography  
Fluorescence detection  
Mass spectrometry

## ABSTRACT

The photochemical behavior of folic acid and its metabolites, tetrahydrofolic and 5-methyltetrahydrofolic acids has been followed by high performance liquid chromatography, coupled with a fast scanning fluorimetric detector (HPLC-FSFD). The main photoproducts generated were characterized through accurate mass measurement using liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS). The effect on photogeneration processes of irradiation time, and the hydrogen peroxide concentration, in presence and in absence of N<sub>2</sub> stream, was also studied. A chromatographic method with post-column on-line photoderivatization has been developed for the analysis of folic, tetrahydrofolic and 5-methyltetrahydrofolic acids. Linearity ranges from 50 to 1000 ng·mL<sup>-1</sup> for folic acid, and from 100 to 1000 ng·mL<sup>-1</sup> for tetrahydrofolic and 5-methyltetrahydrofolic acids have been established. Detection limits of 7.5 ng·mL<sup>-1</sup>, 15.3 ng·mL<sup>-1</sup> and 22.9 ng·mL<sup>-1</sup> were calculated for folic acid, tetrahydrofolic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid respectively. The method has been satisfactorily applied to cereals, spinach and tomato analysis. Serum samples analysis was also tested.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The term folates refer to a water-soluble compound which belong to group B of vitamins. They are composed of three chemical components: pteridine ring, *p*-aminobenzoic acid (PABA) and a glutamate chain, with a variable number of glutamate moieties. Folates act as a coenzyme substrate in many reactions of the metabolism of amino acids and nucleotides, so they play an important role in nucleic acid synthesis, repair and methylation [1]. Folic acid (FA) itself does not have biological activity but it is a precursor of tetrahydrofolic acid (THF) which is the mayor metabolically activate metabolite. Tetrahydrofolic acid (THF) and 5-methyltetrahydrofolic acid (MTHF) are the main forms presents in plant food, whereas MTHF is the major circulating form in human fluids.

Folate deficiency leads to anaemia as well as to an increase of the risk of cardiovascular disease, certain cancers, dementia and neural tube defects [2–5]. Folates are essential micronutrients, but human being cannot synthesize them, so they have to be obtained through diet. Typical folate sources are leafy green vegetables, pulses, liver, citrus fruits, nuts, and some berries. Native folate content in food is usually low. Improving the natural folate level in food through biotechnology and bio-engineering is an effective alternative strategy to increase dietary folate intake [6,7]. FA is the oxidized form used for food fortification and

supplements, because of its relatively greater stability compared to dietary folates found in food. Therefore, knowing the folates content in food plants and biological sample is important.

Several methods for food folate analysis are currently in use [8]. Traditionally, food folate composition is derived from a microbiological assay, based on the growth of various microorganisms and measured by turbidity [9]. These methods give a measure of total folate content. In order to differentiate and quantify individual folate forms, high performance liquid chromatography (HPLC) methods are used [10]. Among these methods, UV seems to be the most common detection system. However, this detection mode is not sensitive enough to detect all natural folates, because the levels of some forms remain far below the detection limit [11]. Electrochemical [12,13] or chemiluminescence detection [14] were also proposed, but none of these methods is universal to detect all forms of naturally occurring folates. Mass spectrometry is a sensitive and universal detector for all folates [15–22]. However, this technique is not always accessible in routine laboratories.

Fluorescence has been not frequently used for the determination of folates due to only some reduced forms, such as THF and MTHF, exhibit native fluorescence. FA itself is not fluorescent, but different procedures to form suitable fluorescent derivatives, such as conversion of all forms of folate into PABA [23], conversion into MTHF [24] or a fluorogenic reaction with permanganate [25], have been proposed.

It is also known that the action of UV-irradiation on FA solutions produces an increase in the fluorescence intensity, due to the fact that its

\* Corresponding author.

E-mail address: [iduran@unex.es](mailto:iduran@unex.es) (I. Durán Merás).

photolysis product is fluorescent. This photoreaction has been used by several authors for the fluorimetric determination of FA [26,27]. Methods employing on-line photochemical reactor for photolytic conversion of the analytes have been also developed [28,29], with the advantage of being less complicated than post-column chemical derivatization.

The nature of the folate photoproducts has been also studied. Some studies proposed that *p*-aminobenzoyl-L-glutamic acid and 6-formylpterin (PT6F) are the main photoproducts of FA. At higher irradiation times, PT6F was degraded to pterin-6-carboxylic acid (PT6C) [30, 31]. FA photolysis has been followed by fluorescence spectroscopy [31, 32] and HPLC [30]. But as far as we know there are not studies about the identification of the photoproducts formed when THF and MTHF are UV-irradiated. It is necessary taking into account that the generated photoproducts depend on the irradiation time, nature of the irradiation source and the chemical conditions used.

In most of published method about food analysis, folate extraction involves grinding of sample and homogenization of the ground food in a suitable buffer followed by heating and centrifugation [8]. Various types of buffers such as, phosphate-ascorbate buffer, acetate-ascorbate buffer, HEPES/CHES buffer containing ascorbic acid and 2-mercaptoethanol (in order to prevent the oxidative loss of labile reduced folates) have been used in folate extraction.

Most natural folates occur in polyglutamate forms and the conversion in monoglutamate requires the use of  $\gamma$ -glutamylcarboxypeptidase (conjugase or folate hydrolase). During the last decade, the use of a tri-enzyme method has been developed. This method includes the use of protease and amylase in combination with traditional folate conjugase treatment following heat extraction [10,33]. However, there are studies that show no significant differences in folate content of vegetable extracts and cereals treated with tri-enzyme and only conjugase method [34,35].

Due to the matrix effect, purification of the extracts prior to HPLC analysis is necessary. There are two purification methods applied to folate analysis: affinity columns based on folate binding protein, and solid-phase extraction (SPE) with strong anion exchange bonded to silica, or phenyl bonded to silica. Affinity columns containing folate-binding protein are not commercially available and this purification technique is more expensive and time consuming compared with SPE. Solid-phase extraction (SPE) is the most common method for purification of food extracts prior to HPLC analysis of folates [36]. Most of previous studies used strong anion-exchange (SAX) cartridges for purification of food extracts containing folates [37,38]. Other sorbents have been sparingly studied for folates analysis; only a few applications with phenyl, cyclohexyl and C18 bonded sorbents have been published regarding SPE purification of food extracts prior to HPLC analysis of folates [15,16,36]. For this, we have studied the possibility of employing other type of SPE cartridges to analyze folates in food and in biological samples.

The aim of the present work is focused in two ways: first to investigate the photochemical behavior of THF and MTHF under different irradiation conditions; second to develop a rapid, robust and simple high-performance liquid chromatography, with post-column on-line photo-derivatization and fast scanning fluorimetric detection (HPLC-FSFD) for the quantification of THF, MTHF and FA. Variables such as mobile phase composition, pH and flow rate were studied and optimized. The proposed analytical method was tested in food and serum samples, previous SPE sample clean-up.

## 2. Experimental

### 2.1. Instrumentation

The chromatographic studies were performed using an Agilent Model 1100 LC instrument (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), equipped with a degasser, quaternary pump, column oven, autosampler

Agilent 1290 infinity, UV-visible diode-array detector (DAD) and a fluorescence detector (FSFD). The ChemStation software was used for controlling the instrument, data acquisition, and data interpretation.

#### 2.1.1. Photochemical behavior of THF and MTHF

Photoproducts separation and identification were carried out on a Poroshell 120 (150 mm  $\times$  3 mm, 2.7  $\mu$ m) analytical column (Agilent Technologies). The column was operated at 10 °C, using an isocratic mobile phase composed by acetonitrile (ACN) and 2 mM formic acid (pH 5) (3:97, v:v). Flow rate was remained constant at 0.3 mL/min and the injection volume was 10  $\mu$ L. Moreover, flow injection analysis with a mass spectrometer Agilent Technologies single quadrupole 6120 operated in SCAN mode (100/500 *m/z*) using positive electrospray ionization (ESI) was used for MS. The instrumental variables were: nebulizer pressure: 40 psi; drying gas: 10 L  $\cdot$  min<sup>-1</sup>; gas temperature: 300 °C; capillary voltage: 4000 V; fragmentor voltage: 100 V [39]. Confirmation analysis was performed using a high resolution mass spectrometer (HRMS) Agilent Technologies QTOF 520 operated in SCAN mode (100/500 *m/z*), using positive electrospray ionization (ESI).

#### 2.1.2. Quantification of FA, THF and MTHF

A Poroshell 120 EC C8 (50  $\times$  4.6 mm, 2.7  $\mu$ m) column (Agilent Technologies) was used for folates separation and quantification. Column temperature was set at 20 °C. A post-column photoreactor (Aura industries, Nueva York, USA) consisting of a PTFE tube (4 m  $\times$  0.3 mm I.D.  $\times$  1.6 mm E.D.) coiled around a 10 W xenon lamp was placed between the UV-Vis diode array detector and the fluorescence detector. The components of the mobile phase were 2 mM formic acid (pH 4) and ACN 6:94, (v:v). A flow rate gradient was applied in order to get the highest signal. The elution started with a flow rate of 0.4 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup> during 4 min, and it was increased immediately to 1.0 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>. This flow rate was kept constant during 2 min. After that, it was returned to 0.4 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup> and then remained constant during 6 min. The injection volume was 5  $\mu$ L. Fluorescence detector was programmed in multiemission mode; each chromatogram was recorded simultaneously measuring the emission at  $\lambda_{em}$  = 360 and 440 nm, exciting in all cases at  $\lambda_{ex}$  = 280 nm.

An Osram 200 W HBO high-pressure mercury lamp with an Oriel model 8500 power supply (spectra-Physics-Newport, USA), was used for the off-line irradiation of folate solutions.

Calibration curves and analytical figures of merit were performed by means of the ACOC program [40], in MATLAB code.

### 2.2. Materials, chemicals, buffers and solutions

FA, PT6C, PT6F and pterin (PT) were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich Química, S.A., Madrid). THF and MTHF were from Schircks Laboratory (Jona, Switzerland). All pteridines stock standard solutions (15–30  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) and folates (20–40  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>), were prepared by exact weighting of each analyte, dissolution with ultrapure water slightly alkalized, neutralization with hydrochloric acid and then diluting with ultrapure water to the final volume. These solutions were stored at –18 °C in the dark. Pteridines solutions are stable for at least 3 weeks. Standard working solutions were prepared at the time of use by dilution of the stock solutions with mobile phase. Folate standard solutions were prepared under subdued light, to avoid the oxidative degradation.

Ascorbic acid, sodium acetate, sodium chloride, 2-(cyclohexylamino)ethanesulfonic acid (CHES), 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) were purchased from Sigma-Aldrich. Acetonitrile HPLC grade was obtained from Merck (Madrid, Spain). Formic acid, mercaptoethanol, and hydrogen peroxide, of analytical quality were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q system (Waters Millipore, Milford, MA, USA).



Mobile phase was filtered through a 0.22 µm membrane nylon filter (Teknokroma, Barcelona, Spain) and degassed by ultrasonication before use.

Fresh tomato and fresh spinach were purchased from local market and stored at  $-18^{\circ}\text{C}$ . Breakfast cereals were obtained from super-markets and were stored at  $20\text{--}22^{\circ}\text{C}$  in the original packages until their analysis. Serum sample was a synthetic lyophilized serum from Sigma, which was reconstituted with ultrapure water.

The extraction buffer (HEPES/CHES) was 50 mM 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) and 50 mM 2-(cyclohexylamino)ethanesulfonic acid (CHES), containing 2% (w/v) of ascorbic acid and 10 mM mercaptoethanol, pH 7.85. Lyophilized rat plasm, used like source of folate conjugase were from Sigma, it was reconstituted in extraction buffer and stored in aliquots at  $-18^{\circ}\text{C}$  in the dark.

Solid phase extraction (SPE) elution buffer was 0.1 M sodium acetate containing 10% (w/v) sodium chloride, 1% (w/v) ascorbic acid, and 0.1% (v/v) 2-mercaptoethanol.

Sep-Pak Waters Accell Plus QMA SAX cartridges (360 mg sorbent per cartridge, 37–55 µm Particle Size) containing a silica-based, hydrophilic, strong anion-exchanger with large pore size (300 Å), were employed for sample purification.

### 2.3. Analysis of THF, 5MTHF and FA in food and in biological samples

#### 2.3.1. Food samples

Cereals were ground, and fresh tomato and fresh spinach were lyophilized and ground. One gram of the milled samples was mixed with 20 mL of extraction buffer in a 50 mL centrifuge tube. After mixing with a vortex mixer, all the tubes were placed in a boiling water bath for 10 min and then they were rapidly cooled in an ice-bath. The samples were finally subjected to enzymatic deconjugation as follows: 50 µL of reconstituted rat plasm were added to the sample and the mixture was incubated for 3 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . To inactivate the enzyme, the samples were boiled for 5 min, cooled on ice and centrifuged at 4000 rpm for 15 min. The supernatant were filtered through 0.45 µm nylon filter and purified.

#### 2.3.2. Biological samples

Serum sample desproteinization and extraction were based on Hart et al. method [21]. 500 µL of reconstituted synthetic serum were transferred into a 10 mL centrifuge tube and 1.5 mL extraction buffer were added. Samples were placed in a boiling water bath for 10 min for protein precipitation and cooled over ice. Samples were shaken and then centrifuged at 3000 rpm for 15 min. The supernatant was removed and a further 15 mL extraction buffer was added to the pellet. The tube was thoroughly mixed and the sample was re-centrifuged. Both supernatants were combined, filtered through 0.45 µm nylon filter and purified.

#### 2.3.3. Purification of extracts

Samples extracts purification was realized by solid-phase extraction (SPE) on strong anion exchange (SAX) cartridge as described by Jastrebova et al. [37]. Aliquots of 3 mL of the sample extracts were applied on SAX cartridges preconditioned with methanol ( $2 \times 2.5$  mL) and water ( $2 \times 2.5$  mL). The cartridges were washed with water (3 mL) to remove matrix interfering components. The retained folates were slowly eluted with the elution buffer, using 3 mL for food samples and 1.5 mL for serum in order to preconcentrate the sample. All the experiment was carried out under subdued light to minimize degradation of folates.

The standard addition method was used to calculate the concentration of each folate in the samples. Thus, spiked samples of each folate compound at four different concentration levels ranged between 100 and  $800\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  were analysed, and peak areas ( $\lambda_{\text{ex}}/\text{em} = 280/360$  nm for THF and MTHF and  $\lambda_{\text{ex}}/\text{em} = 280/440$  nm for FA) were selected as analytical signal.

A schematic sample preparation including extraction, enzyme treatment and purification is outlined in Fig. 1.

### 2.4. Matrix effect

Matrix-effect was studied by comparison between calibration curves prepared in ultrapure water and in the matrix extracts (matrix-matched standards, concentrations ranging from 200 to  $800\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Each calibration curve comprised five concentration points in triplicate. The matrix-effect were calculated by comparison of the slopes of the calibration curves for each compound using a *t*-test, at 95% confidence level, and employing the ACOC program [40].

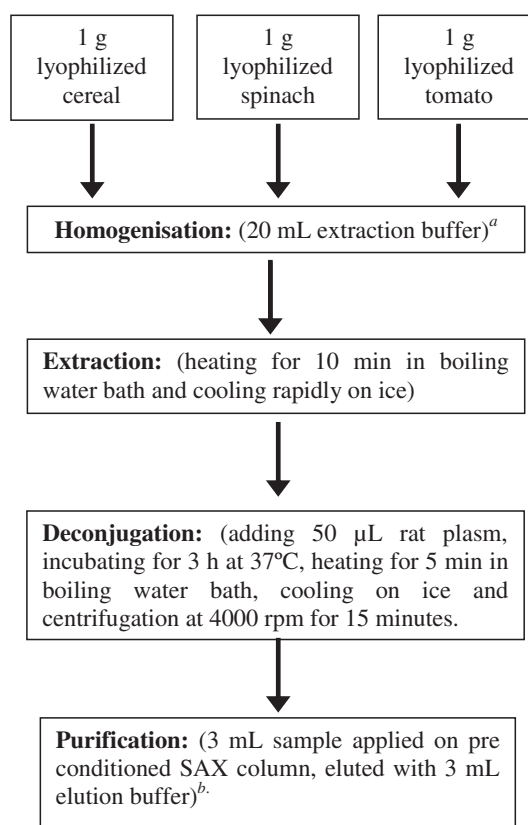
## 3. Result and discussion

### 3.1. Photoproducts identification

As previously reported, FA is not fluorescent, but emits fluorescence upon UV irradiation. On the other hand, THF and MTHF are natively fluorescent, and when they are irradiated, remarkable fluorescence changes have been observed.

In the bibliography, the more abundant data are referred to FA. It has been described that during UV exposure, FA is converted firstly into 6-formylpterin that rapidly it is oxidized to pterin-6-carboxylic acid and then to pterin [30,31].

In order to study the respective photochemical processes and the identification of the fluorescence photoproducts, aliquots of non-irradiated and irradiated standard solutions of each folate under a high



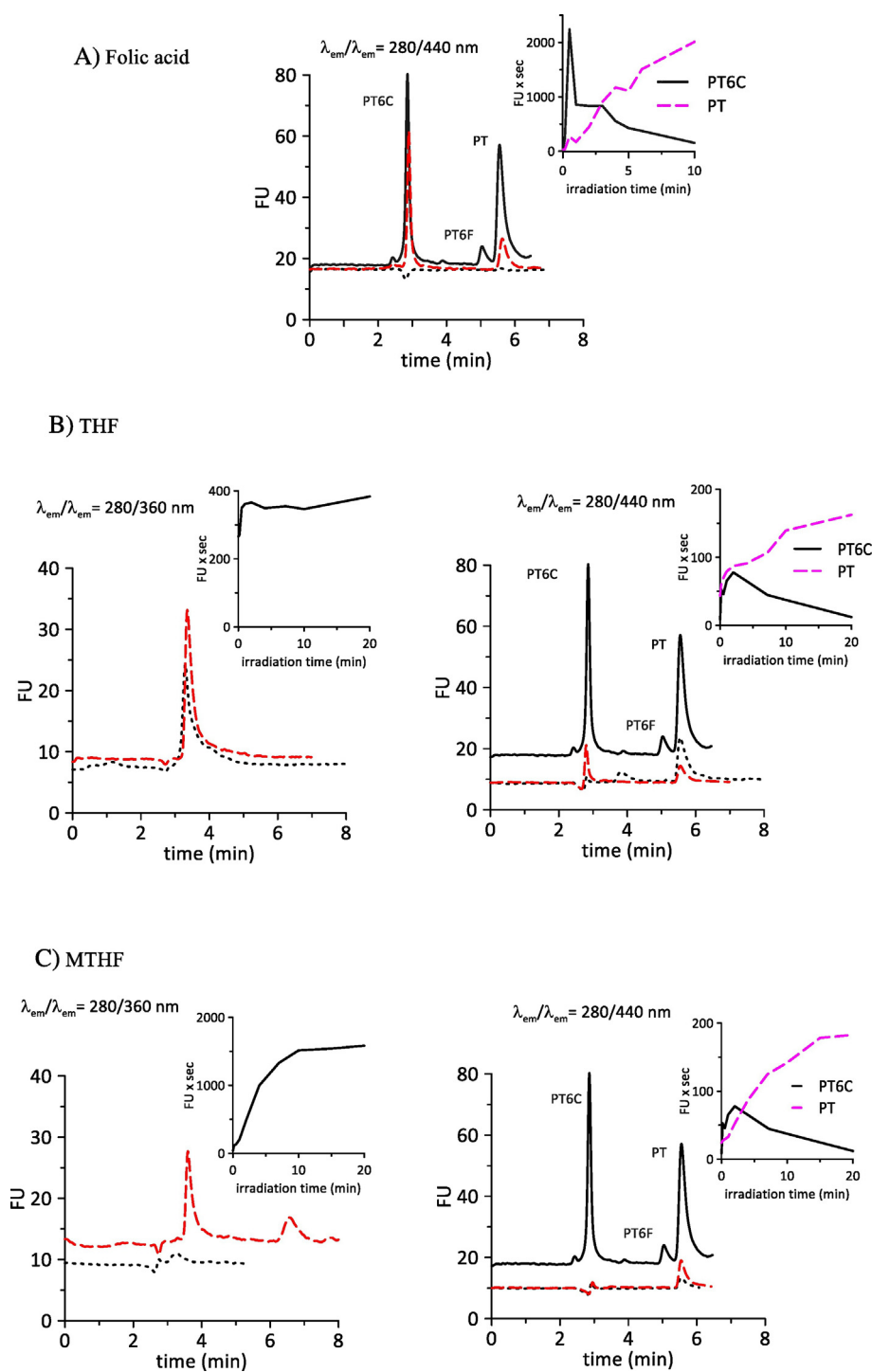
**Fig. 1.** General schematic flow chart showing the sample pretreatment procedure for the determination of folates in food: <sup>(a)</sup> Extraction buffer: 50 mM HEPES/CHES containing 2% (w/v) ascorbic acid and 10 mM mercaptoethanol, pH 7.85. <sup>(b)</sup> Elution buffer: 0.1 M sodium acetate containing 10% (w/v) sodium chloride, 1% (w/v) ascorbic acid and 0.15 (v/v) mercaptoethanol.

pressure mercury lamp, were injected into the chromatographic system. Previously mobile phase was optimized in order to separate the three possible fluorescent photoproducts. The eluate was monitored at  $\lambda_{em} = 360$  and  $440$  nm, exciting at  $\lambda_{ex} = 280$  nm. Photoproduct identification was carried out by comparison between pteridine standard solutions retention times and photoproducts retention times. In addition, a comparison between their fluorescence spectra was made. The influence of variables such as pH, irradiation time,  $H_2O_2$  concentration and the irradiation on presence of  $N_2$  stream has been studied.

A more extensive study of photoproduct identification was performed by LC-ESI/MS, and the confirmation of the molecular mass was performed using a high resolution mass QTOF spectrometer.

### 3.1.1. Photochemical behavior of FA

When solutions of FA are irradiated, different degradation products have been clearly observed in previous fluorimetric studies [41]. Chromatograms corresponding to standard solutions of FA, non-irradiated and UV irradiated during 2 min are shown in Fig. 2A. In non-irradiated



**Fig. 2.** Chromatograms of standard solutions of each folate without irradiation (black dashed line) and after of 2 min of irradiation (red dashed line): A) folic acid (FA), B) tetrahydrofolic acid (THF) and C) 5-methyltetrahydrofolic acid (MTHF). In addition, chromatograms of a standard mixture solution of PT6C, PT6F and PT (black solid line) has been included. Evolution of peak areas for the fluorescent photoproducts as a function of the irradiation time are also included in each case. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



sample (dashed line), fluorescent compounds were not detected, nevertheless in irradiated samples two peaks at 2.9 and 5.8 min were observed. For the identification of these peaks, a standard solution containing different pteridines such as PT6F, PT6C and PT has been injected in the system and the chromatogram is illustrated in Fig. 2A. The comparison with the retention times and with the fluorescence spectra of pure pteridine standards, allow us to confirm that, in these conditions, the fluorescence photoproducts are PT6C and PT. When, FA solution is irradiated, an increase of the fluorescence signal at  $\lambda_{em} = 445$  nm occurs, wavelengths corresponding with the pteridines emission maximums.

As can be observed in Fig. 2A, at first seconds of irradiation, concentration of PT6C quickly increased up to 1 min of irradiation but, it decreased for higher irradiation times and turns negligible for times higher than 10 min. The formation of PT begins to be noticeable from 1 min of irradiation, and its concentration increased progressively coinciding with the decreasing on the formation of PT6C. This indicates that initially is more important the formation of PT6C, and when irradiation times are higher than 3 min, this compound is probably degraded by photolysis of the chain in C6, and PT is then generated, as reported in the literature [42]. However, in our experimental conditions non formation of PT6F was observed.

No significant changes in the peaks of the photoproducts were observed in presence of  $N_2$  stream, but it has influence on the kinetic formation of PT6C. The reaction rate decreases especially during the first 3 min of irradiation. PT does not undergo any modification. On the other hand, when standard solutions of FA were irradiated in presence of traces of  $H_2O_2$ , decreased the formation of PT6C. In presence of higher amount of  $H_2O_2$  (0.011%), the formation of PT, by decarboxylation of PT6C, was also negligible.

With regard to the influence of the acidity, solutions containing  $200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  of FA in presence of formic acid 2 mM were prepared at different pH values, between 3 and 6, fixed by the addition of sodium hydroxide. These solutions were irradiated during different times ranging from 0 to 8 min, and the obtained results shown that peak areas decrease as pH increases.

In order to confirm these results and to obtain more information about another non fluorescence photoproducts, mass spectrum of non-irradiated and irradiated solutions was registered (*Supplementary data: m/z signal found at different irradiation time, the calculated mass and its assigned compound are included*).

In non-irradiated samples, as well as in irradiated samples during short times, the most abundant signal was  $m/z$  464.1 (compound I) corresponding to the FA sodium adduct  $[M + Na]^+$ . Moreover, an ion with a  $m/z$  295.1  $[M]^+$  was found representing the loss of the glutamate moiety (compound II). It is important to note that this compound was present in freshly prepared FA solution, Fig. 3A.

When the irradiation time increased at 6 min, some new peaks were identified:  $m/z$  120.1 which corresponds to the loss of both pteridine ring and glutamate moieties, resulting in *p*-aminobenzoic acid (PABA) (compound III). Moreover, in the same MS spectrum an  $[M + H]^+$  of  $m/z$  192.0 was found corresponding with PT6F (compound IV). It was also observed a peak at  $m/z$  214.0, due to sodium adduct  $[M + Na]^+$ . Finally, another new photoproduct was found with  $m/z$  289.0  $[M + Na]^+$ , representing the sodium adduct of the loss of the pteridine group moiety in FA molecule, arising the *p*-aminobenzoyl-L-glutamic acid (pABGA) (C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) (compound V).

When irradiation time was higher than 6 min,  $m/z$  peaks corresponding to FA, compound II and PT6F (compound IV) disappeared and two new photoproducts were founded: an  $[M + H]^+$  of  $m/z$  208.0, its sodium adduct  $[M + Na]^+$  of  $m/z$  230, and its disodium adduct  $[M + 2Na]^+$  of 252.0 due to the formation of PT6C (compound VI) from PT6F, as reported in literature [30]; and an  $[M + H]^+$  of  $m/z$  164.0 and an  $[M + Na]^+$  of  $m/z$  186.0 due to the generation of PT (compound VII).

These results are in concordance with previously studies which show that the main FA photoproducts are PABA, pABGA, PT6F and

PT6C [31,43–45]. The presence of sodium adducts is well known in mass spectrometry due to the current use of glass containers for solvents. In our case the presence of sodium adducts might be also due to the use of a NaOH solution to dissolve FA and metabolites in water.

### 3.1.2. Photochemical behavior of THF

With respect to the behavior of THF under UV irradiation, no data have been found in the bibliography. THF aqueous solutions also showed different chromatographic profiles depending on irradiation time. The photoproducts were fluorimetrically monitored at two emission wavelengths,  $\lambda_{em} = 360$  and 440 nm, exciting at  $\lambda_{ex} = 280$  nm. In non-irradiated samples, THF presents fluorescence at the two pairs of wavelengths. However, when THF solutions are irradiated, three fluorescent photoproducts were observed. Chromatograms corresponding to a non-irradiated standard solution of THF and its corresponding photoproducts are depicted in Fig. 2B. As shown, THF were detected at 280/360 nm in non-irradiated samples at 3.2 min (black dashed line). When the solution was irradiated during 120 s, the intensity of the peak at 360 nm increases, and two new peaks at 2.9 and 5.8 min were fluorimetrically observed at 280/440 nm. The increase of the fluorescence of the peak detected at 280/360 nm, without changes in its  $t_R$  or in its spectrum shape, seem to indicate the formation of a photoproduct with similar structural characteristics that the original THF. On the other hand, the two fluorescent photoproducts detected at 280/440 nm have been assigned to the formation of PT6C and PT based on the comparison with standards. Retention time ( $t_R$ ) and fluorescence spectra were both compared.

The highest intensity for the peak detected at 360 nm, was reached for irradiation times around 60 s, and it remains constant for higher irradiation times. The effect of the irradiation in presence of  $N_2$  stream or in presence of traces of  $H_2O_2$  was practically negligible on the formation of this photoproduct.

With respect to the peaks identified as PT6C and PT, the effect of variables such as irradiation time, irradiation in presence of  $N_2$  stream, presence of  $H_2O_2$  and the acidity of the medium, was the same that previously described for the FA photoproducts.

For the study about the photoproducts formation when THF solutions are irradiated, mass spectrum of non-irradiated and of irradiated solutions of THF was register. Also, solutions prepared bubbling nitrogen gas through the solutions, were analysed. The main  $m/z$  peaks founded are shown in Supplementary Data.

Fig. 3B shows the THF photooxidation paths in function of the irradiation time. This compound is very sensible to the air oxidation, and in non-irradiated THF solutions and in presence of oxygen, the molecular ions corresponding with THF was not found indicating the instability of the THF solution. However, an  $[M + H]^+$  of  $m/z$  166.1 and its sodium adduct,  $m/z$  188.1, were found. These  $m/z$  ratios indicate us that the formation of the pteridinic ring, and its molecular weight indicate that this compound could be 7,8-dihydropterin (compound IX). Moreover, like in FA irradiated solutions, an  $m/z$  289.1  $[M + Na]^+$  (compound V) was also found. When this solution was irradiated, these compounds did not disappear and a new peak with  $m/z$  120.1 was found, corresponding with PABA (compound III).

On the other hand, non-irradiated THF solutions were prepared in presence of  $N_2$  stream, and immediately analysed. In these solutions a  $[M + H]^+$  of  $m/z$  446.2 and a  $[M + Na]^+$  of  $m/z$  468.1 were observed. These ions corresponding with THF (compound VIII), indicating that in absence of oxygen the THF solutions are more stable. An ion with  $m/z$  299.1  $[M]^+$  was also found in this solution (compound X), which represents the loss of the glutamate moiety, like as the compound II in FA. In addition, the ions with  $m/z$  166.1, 188.1 and 289.1 were also observed in this mass spectrum, as in oxygen presence solutions.

When irradiation time increased,  $m/z$  peaks of THF (compound VIII) and of the compound X disappeared, and two new peaks were observed: an ion  $[M]^+$  with  $m/z$  120.1 (compound III) and an ion  $[M$

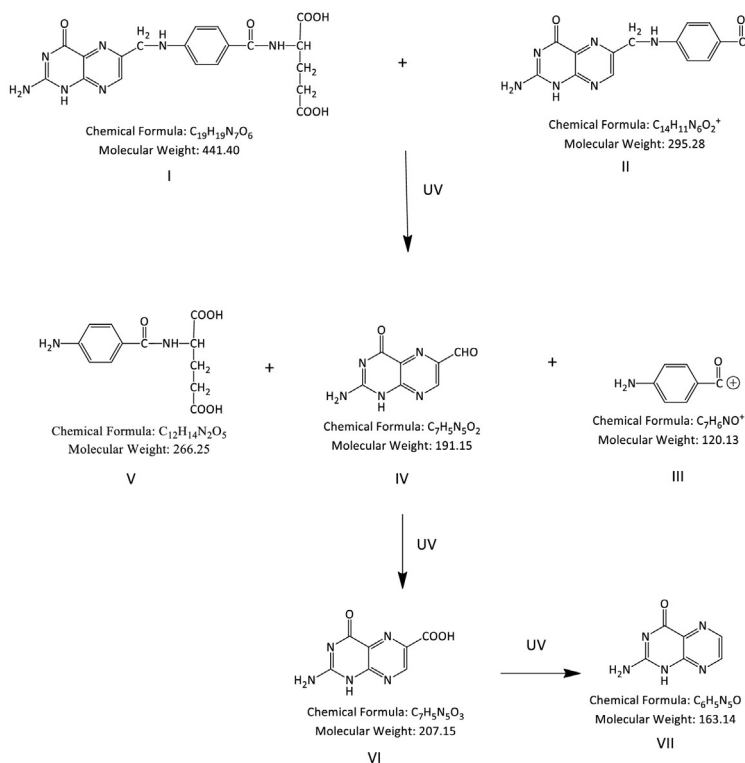
+ H] + with  $m/z$  154.1, which is consisted with the structure of compound XI.

### 3.1.3. Photochemical behavior of MTHF

Standard solutions of MTHF were irradiated under UV-light and similar results to those obtained with THF solutions have been observed.

Chromatograms of non-irradiated and irradiated solutions, measuring simultaneously the emission at 360 and 440 nm, exciting at 280 nm, are summarized in Fig. 2C. Non-irradiated solutions exhibit only one peak at 3.2 min and at  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280/360$  nm. When the standard solutions were irradiated during 120 s, the fluorescence intensity of this peak increases considerably, and two new peaks, at  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} =$

#### A) Folic acid



#### B) TetrahydroFolic acid

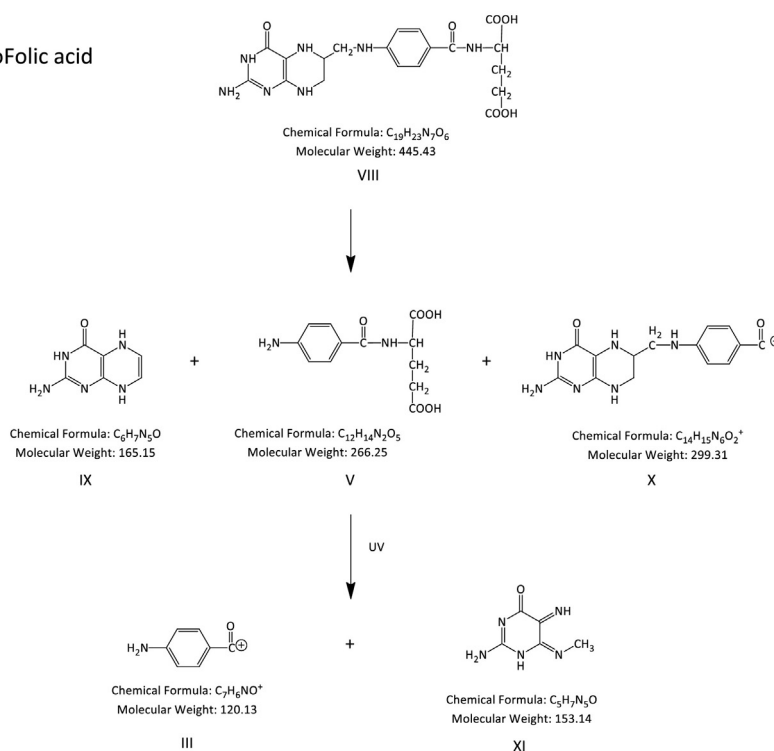


Fig. 3. Schematic AF, THF and MTHF photo-degradation pathway based in the mass-spectrometric data.

## C) 5-Methyltetrahydrofolic acid

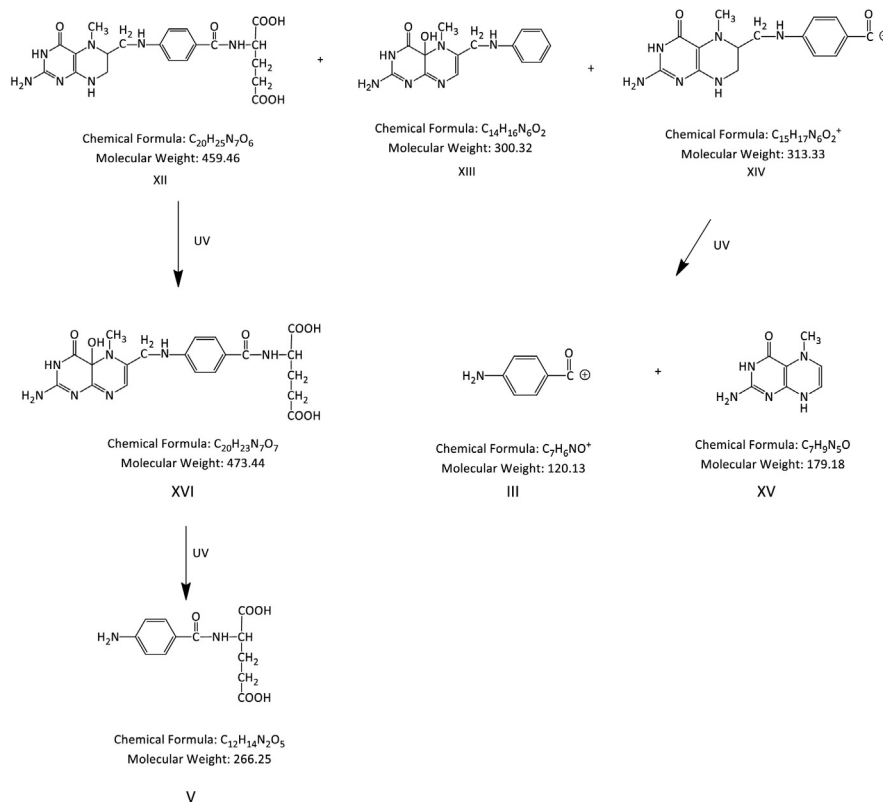


Fig. 3 (continued).

280/440 nm, can be observed with retention times of 2.8 and 4.7 min respectively. These two peaks are due to the formation of PT6C and PT, respectively.

The fluorescence intensity of the peak detected at  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280/360$  nm increases according increases the irradiation time, up to 10 min, and then remains constant for higher irradiation times. The formation of PT6C only takes place with short irradiation times, and the photo-degradation of this pteridine began to be observed for irradiation time higher than 30 s. However, the peak area of PT increased with the irradiation time, up to 15 min.

No changes in the chromatographic profiles of MTHF solutions irradiated in  $N_2$  stream were observed. Only a decreasing of the fluorescence intensity of the photoproducts was observed. However, in presence of traces of  $H_2O_2$ , a decrease in the rate of the photoproducts formation was observed. For  $H_2O_2$  concentrations of  $1.1 \times 10^{-2}\%$  and 10 min of irradiation time, the formation of the photoproducts was negligible.

As in the previous studies, mass spectrums of irradiated and non-irradiated solutions were registered in order to identify the photoproducts (Supplementary Data).

In non-irradiated samples, the ion  $[M + H]^+$  with  $m/z$  460.2 was the most abundant, which correspond to MTHF (compound XII), also its sodium adduct  $[M + Na]^+$  with  $m/z$  482.2 was detected Fig. 3C. Moreover, in these solutions other two ions were found: a  $[M + H]^+$  with  $m/z$  301.1, which was assigned to compound XIII, and an  $[M]^+$  with  $m/z$  313.1, which represent the loss of the glutamate moiety (compound XIV). When MTHF solutions were irradiated, compounds XII and XIV disappeared, and new compounds were formed and identified by MS. An ion  $[M + H]^+$  with  $m/z$  474.2, and its sodium adducts with  $m/z$  496.1, identified as compound XVI, and the compound III ( $m/z$

120.1) are observed, and their abundance increase with the irradiation time. Another ion with  $m/z$  180.1, assigned to compound XV, is formed at intermediate irradiation times, but it disappeared as irradiation time increases. For irradiation times higher than 20 min, the sodium adduct of compound V ( $m/z$  289.1) was found. Compound XVI is the only one photoproduct that shows an increase in the fluorescence signal, without changes in wavelengths. This compound could be the responsible of the fluorescence signal at 280/360 nm (Fig. 3C).

### 3.2. Folate quantification in food

#### 3.2.1. Optimization of chromatographic conditions

Once the photoinduced spectrofluorimetric behavior of FA, THF and MTHF was investigated, a chromatographic method with on-line post-column photoderivatization has been developed. Foliates are eluted in their original state, photometrically detected and then they are photo-transformed in a photoreactor located between DAD and FSFD detectors. The fluorescent photoproducts are detected in FSFD in order to increase the sensibility and selectivity in the detection.

Most of the previously proposed chromatographic methods for the analysis of these analytes are reverse phase, with UV detection and carry the elution out by a gradient mode. In these methods the mobile phases are usually mixtures of diluted acid solutions and organic solvents. Acetic or formic acids, and methanol or ACN, are the most common component of the mobile phases, respectively. In the on-line post-column derivatization reaction is highly important the composition of the mobile phase not only for the separation, but for the detection. Thus, some previous assays were carried out by online fluorescence spectroscopy. It was proven that the post-column photoreaction goes better in acidic media. In addition, a minor photoinduced

fluorescent signal was obtained in presence of any other acid, especially the organic ones. Finally formic acid was chosen.

Regarding to the organic solvent of the mobile phase, it was proven that the rate of the photoreactions and the maximum photoinduced signal were similar in presence of different percentages of methanol or ACN. Finally ACN was chosen, mainly because of its lower viscosity, higher elution strength and lower UV absorptivity.

The eluate was fluorimetrically monitored in multiemission mode at  $\lambda_{em} = 360$  and  $440$  nm, exciting at  $\lambda_{ex} = 280$  nm. The influence of ACN in the mobile phase was studied in presence of formic acid  $2$  mM (pH 3.1) at a flow rate of  $0.6$  mL·min<sup>-1</sup>. Due to folates show a wide range of polarity values, the percentage of ACN in the mobile phase is a critical parameter. The behavior of THF and MTHF photoproducts were similar for the different percentages of ACN assayed, between 4 and 8%, v:v. Their retention times increased as the percentage of ACN decreased, and with a 6% of ACN resolution a baseline was obtained in least of 5 min for both photoproducts. In these conditions, FA, the least polar compound, elutes at 15 min.

The effect of the pH on the retention times of the folates, as well as in the sensitivity of the photoproducts, was studied between 3 and 4.5. A mobile phase composed by  $2$  mM formic acid in water (varying the pH with sodium hydroxide) and 6% of ACN, in isocratic mode was used. In general, retention time decreased as the pH of the mobile phase increased. At pH values higher than 4.3, the fluorescence of the photoproducts decreases considerably. Finally, a pH 4.1 was selected as optimum.

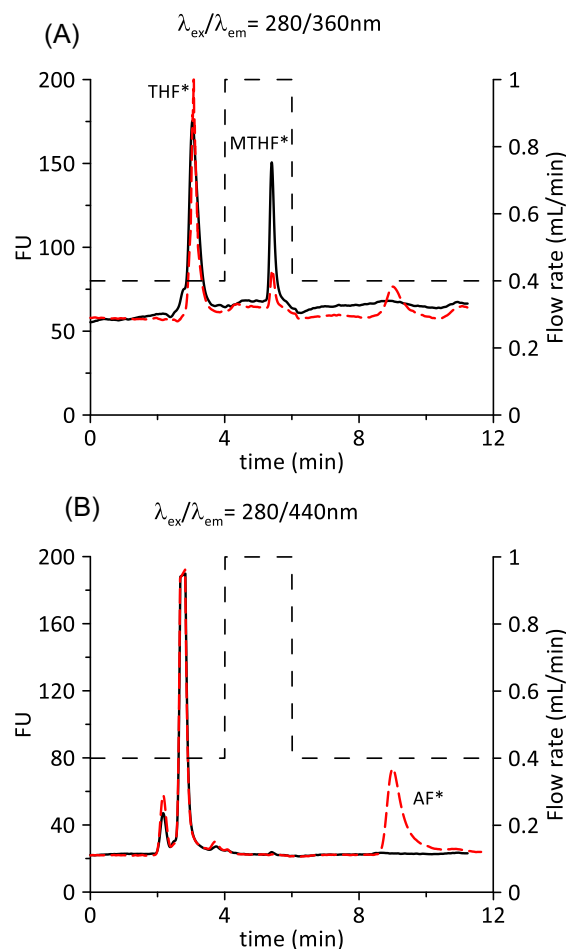
Furthermore, as previously observed, fluorescence signals depend on the irradiation time. In an on-line system, it is defined by the length of the photochemical reactor and by the flow rate. In order to get the maximum fluorescence signal, the flow rate was optimized. It was studied between  $0.2$  and  $1.0$  mL·min<sup>-1</sup>. Fluorescence intensity of THF photoproducts (THF\*) and FA photoproducts (FA\*) decreased as the flow rate increased, being this decrease more significant for FA\*. However, the fluorescence signal of the MTHF photoproducts (MTHF\*) increased slightly with the flow rate. Due of this different behavior, a flow rate gradient was used. Elution started with a flow rate of  $0.4$  mL·min<sup>-1</sup> during 4 min, then it was quickly increased to  $1.0$  mL·min<sup>-1</sup> during 2 min and finally it was returned quickly to  $0.4$  mL·min<sup>-1</sup>. In these conditions, the three folates selected for this study were eluted in a time lower than 12 min, as can be seen in Fig. 4.

### 3.2.2. Method validation: analytical parameters

The method validation was carried out in terms of the linearity, precision, LOD, and LOQ. Linearity was assessed preparing calibration standards by triplicate, with concentrations from  $50$  to  $1000$  ng·mL<sup>-1</sup> of FA, and from  $100$  to  $1000$  ng·mL<sup>-1</sup> of THF and MTHF. Each standard was introduced in the chromatographic system and eluted under optimized conditions. Calibration curves for each of the three analytes, were built by plotting the obtained area for the photo-transformed analytes as a function of the standard concentrations. The results obtained are summarized in Table 1.

Determination coefficients ( $r^2$ ) were higher than 0.99 for all compounds. Limits of detection (LOD) were calculated according to the Long and Winefordner criterion [46]. Limits of quantification (LOQ) of the method were defined as 10/3 times LOD. LODs ranged between  $7.5$  ng·mL<sup>-1</sup> for AF and  $22.9$  ng·mL<sup>-1</sup> for MTHF, and LOQs ranged from  $24.6$  to  $75.6$  ng·mL<sup>-1</sup> for AF and MTHF, respectively. The analytical sensitivity values calculated as the quotient of the standard error of the regression and the slope of calibration curve, expressed in concentration units [47], are summarized in Table 1.

Precision was assessed as the percentage relative standard deviation (%RSD) of intraday repeatability ( $n = 5$ ) employing standard solutions containing  $200$  ng·mL<sup>-1</sup> of each folate. As can be seen, RSD values are lower than 5.3%, which indicates the good repeatability of the proposed method.



**Fig. 4.** Chromatograms of a mixture standard of  $300$  ng mL<sup>-1</sup> of THF, MTHF and FA without irradiation (black solid line) and with online irradiation (red dashed line) at: A)  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280$  nm/ $360$  nm and B)  $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280$  nm/ $440$  nm. Flow rate gradient employed has been also shown. \*represent the total of the fluorescent photoproducts from each parent analyte. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

### 3.2.3. Optimization of solid-phase extraction method

The direct injection of the food samples and of serum sample was not possible because some interferences co-eluted with MTHF. For this reason, a clean-up step of the samples, previous to the analysis, was required. In most cases solid-phase extraction methods are used to clean up the extracts before LC analysis. In this paper several SPE sorbents

**Table 1**

Analytical and statistical parameters for the on-line photoderivatization chromatographic determination of folates.

	THF	MTHF	FA
Linear range (ng mL <sup>-1</sup> )	100–1000	100–1000	50–1000
Regression eq. (SD) <sup>a</sup>	$5.7(0.1)x + 201(29)$	$5.5(0.1)x + 122(42)$	$3.7(0.1)x + 92(9)$
Determination coefficient, $r^2$	0.9998	0.9995	0.9999
Linearity (%)	99.2	98.7	99.6
LOD (ng mL <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	15.3	22.9	7.47
LOQ (ng mL <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	50.4	75.6	24.6
Intraday repeatability (RSD %) <sup>d</sup>	1.28	1.36	5.28

<sup>a</sup> SD: standard deviation ( $n = 15$ ).

<sup>b</sup> LOD: limit of detection according to Long criterion [46].

<sup>c</sup> LOQ: limit of quantification ( $LOD/3$ ) $\times 10$ .

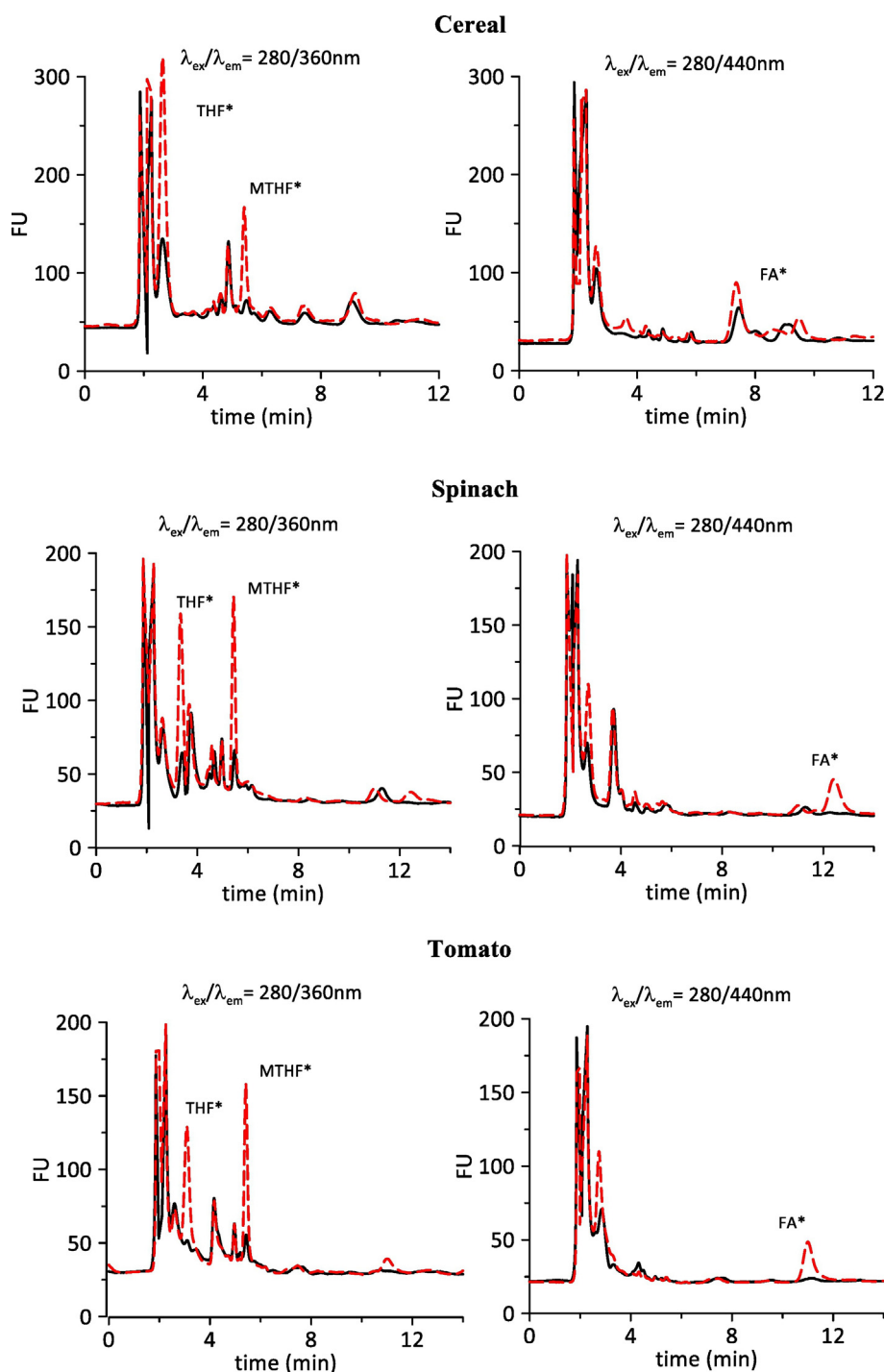
<sup>d</sup> RSD: relative standard deviation ( $n = 5$ ),  $200$  ng mL<sup>-1</sup> of each analyte.

and different cartridges were investigated: non-polar sorbents such as C8, C18 and ISOLUTE ENV+, and anion-exchange sorbents such as SAX and MAX.

Firstly, extraction procedures were assayed with a standard solution of  $300 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  of each folate. The retention behavior of folates, which are carboxylic acid, differs in reversed-phased and anion-exchange sorbent. On non-polar reversed-phased sorbents (ISOLUTE, C8 and C18) folates are retained in their neutral form due to hydrophobic interactions. The non-polar cartridges were previously conditioned with 5 mL of  $0.03 \text{ M H}_3\text{PO}_4$ . The samples were passed through the cartridges, and washing with 5 mL of  $0.03 \text{ M H}_3\text{PO}_4$ . The elution was carried out with

$0.1 \text{ M}$  sodium acetate containing  $10\% \text{ (v/v)}$  ACN,  $1\% \text{ (w/v)}$  ascorbic acid, and  $0.1\% \text{ (v/v)}$  2-mercaptoethanol. The results obtained showed that folates are strong retained in C8 and C18 cartridges, and partially retained in ISOLUTE+ cartridges. Also, when the cartridges were washed with  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , a partial elution of the folates takes place.

The extraction with anion-exchange sorbents (SAX and MAX), where the retention is due to ionic interactions, was also studied. These cartridges were preconditioned with methanol and water, and washed with water after the sample was applied. The elution of folates was carried out with  $0.1 \text{ M}$  sodium acetate containing  $10\% \text{ (w/v)}$  sodium chloride,  $1\% \text{ (w/v)}$  ascorbic acid, and  $0.1\% \text{ (v/v)}$  2-mercaptoethanol,



**Fig. 5.** Chromatograms of extracted and purified unspiked samples of cereal, spinach and tomato (black solid line) and the same samples spiked with  $200 \text{ ng mL}^{-1}$  of standard solutions of THF, MTHF and FA (red dashed line). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



because it provided good recoveries in previous studies. On the other hand, the losses of folates were negligible during washing steps in anion-exchange sorbent. MAX cartridges proved to give a not complete recovery of pure standard, while folates were successfully eluted (recoveries between 94% and 102%) from strong anion-exchange (SAX).

### 3.2.4. Analysis of FA, THF, and MTHF in food

To evaluate the applicability of the developed method, FA, MTHF and THF were analysed in different food matrices such as fortified cereals, frozen spinach and tomato. Before carry out the quantification of the compounds, the influence of the matrix sample was evaluated. Standard addition calibration curves for each folate in the samples were established and calibration slopes were compared with the corresponding slopes of the external calibration plots of each analyte. This comparison was carried out with two-way analysis of variance (ANOVA) with  $\alpha = 0.05$  and by ACOC program [40]. The results showed that matrix suppression effect was observed for all compounds in most of the samples. Only no statistically significant difference ( $p > 0.05$ ) was found in the analysis of FA in cereal and serum samples, and THF in spinach and serum sample. In order to propose a generalized method for all compounds, a standard addition calibration was applied in all cases.

Each sample was analysed in triplicate, following the methodology explained in Section 2.3. Fig. 5 shows an example of chromatograms obtained from unspiked and spiked cereal, spinach and tomato. The results obtained for each folate are summarized in Table 2, as mean values and standard deviations (SD). The three folates were detectable in all the samples, and satisfactory recoveries were obtained at different fortification levels. Concentrations lower than LOQ were found for MTHF in

cereal, for FA in spinach and tomato, and for MTHF in tomato. As expected FA is the folate with the highest concentration in cereal samples, due to the fortification of the cereal with synthetic FA. A lower concentration was found in spinach and tomato. On the other hand, THF was found to be the main folate, in both, spinach and tomato.

There are not many chromatographic data about the THF, MTHF and FA levels in similar products that allow a direct comparison with the data obtained in this paper. In Table 3, a comparison with previously proposed methods for the determination of the target analytes in different samples is presented. In general, the obtained values are comparable to those reported in literature, taking into account that the existing data of folate are quite controversial. These differences are explained by the variation in folate content in foods of different origins. Variables such as, the climate, the growing area of the crop or the growth stage of the crop at harvest, among others, may produce a remarkable influence in the folate levels [48].

More specifically, in cereal, MTHF and FA are in the range of the values reported by other authors [49,50]. Moreover, FA concentration is in concordance with the values showed in the breakfast cereal information (334  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ). No data were available in the literature for THF content in cereal sample.

The concentration of THF in spinach is in concordance with published values. However, MTHF concentrations reported in this paper are slightly lower than those reported in previous studies. FA level in the analysed spinach, was in a small amount; however in previously reported methods, this analyte was not detected [29,51].

The presence of MTHF in tomato, has been only reported in one study [52], and the concentration found in the present method is in accordance with this publication.

**Table 2**  
Standard addition parameters, recoveries and folate content in some food samples by the HPLC-FLD proposed method.

Sample	Analyte	Actual ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	Found ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	Rec (%)	Standard addition parameters				Amount in sample <sup>a</sup> ( $\mu\text{g}/100\text{ g} \pm \text{SD}$ )
					Slope (SD)	Intercept (SD)	$r^2$	LOD/LOQ ( $\text{ng mL}^{-1}$ )	
Cereal	THF	200.2	205.4	102.6	4.3 (0.3)	562.6 (46.2)	0.9980	34/112	164 $\pm$ 53
		400.4	422.8	105.6					
		800.8	788.9	98.5					
	MTHF	100.1	104.5	104.4	4.4 (0.1)	105.8 (31.6)	0.9991	22/71	<LOQ
		200.2	185.6	92.73					
		400.4	395.9	98.97					
	FA	200.2	193.6	96.70	3.2 (0.1)	863.2 (44.0)	0.9968	48/160	331 $\pm$ 82
		400.4	372.7	93.09					
		800.8	814.2	101.7					
Spinach	THF	99.95	99.03	99.13	5.6 (0.1)	414.5 (15.1)	0.9999	8/27	18.4 $\pm$ 2.4
		199.8	203.7	101.9					
		399.6	394.1	98.61					
	MTHF	799.2	801.1	100.2	4.9 (0.1)	237.9 (16.9)	0.9998	10/34	12.1 $\pm$ 3.0
		99.97	102.9	102.9					
		199.9	196.6	98.34					
	FA	399.9	406.5	101.6	3.1 (0.1)	71.1 (18.2)	0.9994	17/58	<LOQ
		799.8	796.9	99.58					
		99.94	89.42	89.45					
Tomato	THF	199.8	205.7	102.9	6.1 (0.1)	512.7 (22.5)	0.9998	11/37	14.6 $\pm$ 0.1
		399.6	403.4	100.9					
		799.2	799.2	100.0					
	5MTHF	100	98.15	98.15	4.9 (0.1)	160.1 (20.8)	0.9997	13/42	<LOQ
		200	200.8	100.4					
		399.9	409.3	102.3					
	FA	799.8	795.1	99.42	3.3 (0.1)	84.8 (17.7)	0.9995	16/53	<LOQ
		99.9	99.42	99.5					
		199.9	209.9	105.0					
		399.8	390.2	97.60					
		799.5	801.8	100.3					

<sup>a</sup> Quantities expressed in  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  dry weight for cereal and fresh weight for spinach and tomato. LOD: limit of detection according to Long criterion [46]; LOQ: limit of quantification ( $\text{LOD}/3 \times 10$ ).

In Table 3 also is shown the reduction of the elution times in the proposed method, in comparison with the elution times reported in the literature. This new methodology allows the folate separation in <12 min, without using significant amounts of organic solvents, working at the same time under the green chemistry principles.

### 3.2.5. Analysis of THF, 5MTHF and AF in serum samples

The determination of matrix effect for serum samples was studied in the same way that previously described. Results obtained showed that

matrix suppression effect was observed for MTHF, however for FA and THF no statistically significant difference ( $p > 0.05$ ) was found. As a consequence, in this matrix, a standard addition calibration was also applied. In serum samples none of the analytes could be detected. In order to test the accuracy of the method for this type of samples, serum sample was spiked with 200 and 370  $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$  (higher quantities that serum sample usually contain) prior the extraction and purification process. Recoveries were calculated and satisfactory values have been found: for THF mean recovery was 89%, 99% for MTHF and 114% for FA.

**Table 3**

Comparison between selected methods reported and the proposed method for the analysis of folates in food and in biological samples.

Analytes	Sample	Sample preparation	Method	Founded concentration	Ref.
MTHF FA	Orange juice Refined flour Frozen spinach Nonfat dried milk	Extraction buffer: HEPES/CHES Tri-enzyme treatment SPE purification with SAX	HPLC-FLD. Photolysis system Column: Adsorbosphere C18 HS (150 × 4.6 mm, 3 $\mu\text{m}$ ) Mobile phase (1 mL $\text{min}^{-1}$ ): phosphate buffer pH 2.2 (eluent A), acetonitrile (eluent B). Gradient mode: 5 min, 1% B; 5–25 min, 20% B; 25–30 min, 40% B; equilibration for 5 min	Frozen spinach MTHF: 126 ± 15 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ LOD: 1 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ AF: nd LOD: 0.5 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$	[29]
MTHF FA	Cereal Chocolate Hamburguer Chicken sandwich Chichen nuggets...	Extraction buffer: Tris-HCl Tri-enzyme treatment Purification by affinity column	HPLC-DAD ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ) HPLC-FLD ( $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$ ) Column: ODS-Hypersil (250 × 4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$ ) Mobile phase (1 mL $\text{min}^{-1}$ ): 28 mmol/L dibasic potassium phosphate and 60 mmol/L phosphoric acid in water (eluent A), 28 mmol/L dibasic potassium phosphate and 60 mmol/L phosphoric acid in 200 mL/L acetonitrile and 800 mL/L water (eluent B). Gradient mode: 3 min, 0% B; 3–13 min, 30% B; 13–30 min, 55% B; 30–45 min, 57% B equilibration for 5 min	Breakfast cereals: AF: values between 299.3 ± 35.9 and 1281.5 ± 98.4 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ 5MTHF: values between 2.2 ± 0.1 and 37.5 ± 2.2 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$  Kellogg's corn flakes 5MTHF: 37.5 ± 2.2 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ AF: 492.1 ± 10.4 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$	[49]
MTHF	Tomato	Extraction buffer: HEPES/CHES Enzymatic deconjugation: Hog kidney conjugase SPE purification with SAX	HPLC-FLD ( $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$ ) Column: LiChrosphere 100 RP18 (5 $\mu\text{m}$ ) Mobile phase (0.9 mL $\text{min}^{-1}$ ): phosphate buffer pH 2.2 (eluent A), acetonitrile (eluent B). Gradient mode: 6 min, 6% B; 6–24 min, 25% B; 25–30 min, 6%B.	Tomato 5MTHF: values between 4.1 ± 0.2 and 35.3 ± 2.4 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ LOD: 2.67 $\text{ng mL}^{-1}$ THF: nd LOD: 2.34 $\text{ng mL}^{-1}$	[52]
Methotrexate Folinic acid FA	Human serum	Methanol	HPLC-MS Column: Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 × 2.1 mm, 3.5 $\mu\text{m}$ ) Mobile phase (0.15 mL $\text{min}^{-1}$ ): 25% acetonitrile in water containing 0.1% (v/v) formic acid Isocratic mode: 100% A.	Human serum AF: values between 0.015 and 0.156 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LOD: 0.0032 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LOQ: 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$	[53]
THF MTHF 5FTHF	Cabbage Broccoli leaves Broccoli florets Spinach Mustard	Enzymatic deconjugation: Rat plasma SPE purification with SAX	HPLC-FLD ( $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$ ) Column: Shim Pack 100 RP18 (150 × 4.6 mm, 4.6 $\mu\text{m}$ ) Mobile phase (0.7 mL $\text{min}^{-1}$ ): phosphate buffer pH 2.3 (eluent A), acetonitrile (eluent B). Gradient mode: 6 min, 6% B; 6–25 min, 25% B; 25–27 min, 25% B; equilibration for 15 min	Spinach THF: 25 ± 21 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ LOD: 2 $\text{ng mL}^{-1}$ 5MTHF: 43 ± 26 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ LOD: 2 $\text{ng mL}^{-1}$	[51]
MTHF	Cereal Cheese Milk Broccoli Flour Bread Pasta Cereal	Extraction buffer: HEPES/CHES Tri-enzyme treatment SPE purification with SAX	HPLC-FLD ( $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em}} = 356 \text{ nm}$ ) Column: Genesis C18 (250 × 4.6 mm, 4 $\mu\text{m}$ ) Mobile phase (1.0 mL $\text{min}^{-1}$ ): 33 mM phosphoric acid pH 2.3 (eluent A), acetonitrile (eluent B). Isocratic mode: 6% B and 94% A. (18–21 min)	Cereal 5MTHF: values between 4.10 ± 2.31 and 10.89 ± 2.19 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$  Kellogg's Special K 5MTHF: 5.70 ± 1.70 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$	[50]
MTHF FA	Human plasma	Methanol containing 10 mg/mL of 2-mercaptoethanol and 0.025% (v/v) ammonium hydroxide	HPLC-MS/MS) Column: Hedera ODS-2 (150 × 2.1 mm, 5 $\mu\text{m}$ ) Mobile phase (0.4 mL $\text{min}^{-1}$ ): acetonitrile (eluent A), 1 mM ammonium acetate buffer containing 0.6% formic acid (eluent B). Gradient mode: 0–0.8 min, 89% B; 1.0–2.0 min, 30% B; 2.2–5 min, 10% B; 5.2–10.0 min, 89% B.	Human plasma 5MTHF LOD: 5.05 $\text{ng mL}^{-1}$ AF: LOD: 0.249 $\text{ng mL}^{-1}$	[54]
THF MTHF FA	Breakfast cereal Spinach Tomato	Extraction buffer: HEPES/CHES Enzymatic deconjugation: Rat plasma SPE purification with SAX	HPLC-FLD ( $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ , $\lambda_{\text{em}} = 360$ and 440 nm) Column: Poroshell 120 EC C18 (50 × 4.6 mm, 2.7 $\mu\text{m}$ ) Mobile phase (1.0 mL $\text{min}^{-1}$ ): 2 mM formic acid pH 4 (eluent A), acetonitrile (eluent B). Isocratic mode: 6% B and 94% A. Flow rate gradient: 4 min, 0.4 mL/min; 2 min, 1.0 mL/min; 6 min 0.4 mL/min	Cereal Kellogg's Special K THF: 164 ± 53 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ 5MTHF: (30 ± 10) $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ AF: 331 ± 82 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ Spinach THF: 18.4 ± 2.4 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ 5MTHF: 12.1 ± 3.0 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ AF: (5.6 ± 4.8) $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ Tomato THF: 14.6 ± 0.1 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ 5MTHF: (5.7 ± 2.5) $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ AF: (4.5 ± 3.15) $\mu\text{g}/100 \text{ g}$	This work

Most of published methods about folate determination in serum samples use mass spectrometry detection [53,54], and any article by HPLC-FLD has been found in the literature.

As can be observed in Table 3, published folate amount in serum are very small, so they are lower than LOD in the proposed method. Moreover, samples in these published methods have been obtained from persons who have been subjected to FA supplementation which increase folate content.

#### 4. Conclusions

When FA is irradiated with intense UV-irradiation during short times (lower than 2 min), pterin-6-carboxylic acid is the main fluorescent photoproduct, but at higher irradiation times, pterin was detected as the main photoproduct. The most abundant photoproducts from THF and MTHF do not involve modifications in the spectral fluorescent characteristics of the original folates. The loss of the glutamate chain, is the principal way of decomposition, giving rise to the formation of fluorescence photoproducts with very similar chemical structures to the parent folates. It is remarkable the formation of the OH-derivative in 4a position (compound XVI) from MTHF, and the increment in the fluorescence quantum yield observed.

As consequence of the photochemical behavior of the folates, a flow-gradient-LC method with on-line post-column photoderivatization, has been proposed for the analysis of FA and its two principal metabolites, THF and MTHF. The photochemical reactions allow the fluorimetric analysis of FA, that has a low native fluorescence quantum yield, and allow the jointly quantification of FA and its main metabolites. The use of a separation column, packed with core-shell particles, improves the analysis in terms of separation efficiency and decreases the analysis time. The flow gradient allows to apply the optimum irradiation time for each compound.

The analysis of the three folates in vegetables has been carried out and encouraging results have been obtained. In addition, the proposed method has been tested in serum samples but the sensitivity is insufficient for this type of sample. Matrix effect was found in the chromatographic analysis and the quantification should be carried out by using the standard addition calibration.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (Project CTQ2014-52309-P) and the Junta de Extremadura (GR15090-Research Group FQM003), both co-financed by European FEDER funds, for financially supporting this work. E. Martín-Tornero thanks to Ministerio de Economía y Competitividad of Spain and European social funds for a FPI grant with reference BES-2015-075407 (Order ECC/1402/2013, de 22 of July, modified by the order ECC/1820/2014, of 26 of September, and by the order ECC/2483/2014, of 23 of December; BOE n° 140 of 12/06/15).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2017.03.044>.

#### References

- [1] P.J. Stover, Polymorphisms in 1-carbon metabolism, epigenetics and folate-related pathologies, *J. Nutrigenet. Nutrigenomics* 4 (2012) 293–305.
- [2] C. La Vecchia, E. Negri, C. Pelucchi, S. Franceschi, Dietary folate and colorectal cancer, *Int. J. Cancer* 102 (2002) 545–547.
- [3] S.C. Larsson, A. Wolk, Wine consumption and epithelial ovarian cancer, *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 13 (2004) 1823–1824.
- [4] S.M. Zhang, W.C. Willett, J. Selhub, D.J. Hunter, E.L. Giovannucci, M.D. Holmes, G.A. Colditz, S.E. Hankinson, Plasma folate, vitamin B 6, vitamin B 12, homocysteine, and risk of breast cancer, *J. Natl. Cancer Inst.* 95 (2003) 373–380.
- [5] S. Seshadri, A. Beiser, J. Selhub, P.F. Jacques, I.H. Rosenberg, R.B. D'Agostino, P.W.F. Wilson, P.A. Wolf, Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease, *N. Engl. J. Med.* 346 (2002) 476–483.
- [6] F. Castorena-Torres, P.A. Ramos-Parra, R.V. Hernández-Méndez, A. Vargas-García, G. García-Rivas, R.I. Díaz de la Garza, Natural folates from biofortified tomato and synthetic 5-methyl-tetrahydrofolate display equivalent bioavailability in a murine model, *Plant Foods Hum. Nutr.* 69 (2014) 57–64.
- [7] Y. Liu, C.J. Walkey, T.J. Green, H.J.J. Van Vuuren, D.D. Kitts, Enhancing the natural folate level in wine using bioengineering and stabilization strategies, *Food Chem.* 194 (2016) 26–31.
- [8] J. Arcot, A. Shrestha, Folate: methods of analysis, *Trends Food Sci. Technol.* 16 (2005) 253–266.
- [9] T. Tamura, Determination of food folate, *J. Nutr. Biochem.* 9 (1998) 285–293.
- [10] T.H. Hyun, T. Tamura, Trienzyme extraction in combination with microbiologic assay in food folate analysis: an updated review, *Exp. Biol. Med.* 230 (2005) 444–454.
- [11] E.S. Osseyi, R.L. Wehling, J.A. Albrecht, Liquid chromatographic method for determining added folic acid in fortified cereal products, *J. Chromatogr. A* 826 (1998) 235–240.
- [12] H. Shin, M. Shimoda, E. Kokue, Identification of 5,10-methylenetetrahydrofolate in rat bile, *J. Chromatogr. B* 661 (1994) 237–244.
- [13] P.J. Bagley, J. Selhub, Analysis of folate form distribution by affinity followed by reversed-phase chromatography with electrochemical detection, *Clin. Chem.* 46 (2000) 404–411.
- [14] Z. Song, X. Zhou, Chemiluminescence flow sensor for folic acid with immobilized reagents, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 57 (2001) 2567–2574.
- [15] P. Stokes, K. Webb, Analysis of some folate monoglutamates by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 864 (1999) 59–67.
- [16] R.J. Pawlosky, V.P. Flanagan, A quantitative stable-isotope LC-MS method for the determination of folic acid in fortified foods, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 1282–1286.
- [17] M. Rychlik, M. Netzel, I. Pfannebecker, T. Frank, Application of stable isotope dilution assays based on liquid chromatography - tandem mass spectrometry for the assessment of folate bioavailability, *J. Chromatogr. B* 792 (2003) 167–176.
- [18] R.J. Pawlosky, E. Hertrampf, V.P. Flanagan, P.M. Thomas, Mass spectral determinations of the folic acid content of fortified breads from Chile, *J. Food Compos. Anal.* 16 (2003) 281–286.
- [19] B.C. Nelson, J.J. Dalluge, S.A. Margolis, Preliminary application of liquid chromatography-electrospray-ionization mass spectrometry to the detection of 5-methyltetrahydrofolic acid monoglutamate in human plasma, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 765 (2001) 141–150.
- [20] S.D. Garbis, A. Melse-Boonstra, C.E. West, R.B. van Breemen, Determination of folates in human plasma using hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5358–5364.
- [21] D.J. Hart, P.M. Finglas, C.A. Wolfe, F. Mellon, A.J.A. Wright, S. Southon, Determination of 5-methyltetrahydrofolate (13C-labeled and unlabeled) in human plasma and urine by combined liquid chromatography mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 305 (2002) 206–213.
- [22] A. Freisleben, P. Schieberle, M. Rychlik, Specific and sensitive quantification of folate vitamers in foods by stable isotope dilution assays using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 149–156.
- [23] G.F. Zhang, K.E. Maudens, S. Storozhenko, K.A. Mortier, D. Van Der Straeten, W.E. Lambert, Determination of total folate in plant material by chemical conversion into para-aminobenzoic acid followed by high performance liquid chromatography combined with on-line postcolumn derivatization and fluorescence detection, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 7872–7878.
- [24] S. Ndaw, M. Bergaentzle, D. Aoude-Werner, S. Lahély, C. Hasselmann, Determination of folates in foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after precolumn conversion to 5-methyltetrahydrofolates, *J. Chromatogr. A* 928 (2001) 77–90.
- [25] N. Ichinose, T. Tsuneyoshi, M. Kato, T. Suzuki, S. Ikeda, Fluorescent high-performance liquid chromatography of folic acid and its derivatives using permanganate as a fluorogenic reagent, *Fresenius J. Anal. Chem.* 346 (1993) 841–846.
- [26] R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, B.F. Reis, J.L.M. Santos, E.A.G. Zagatto, Photochemical-fluorimetric determination of folic acid in a multicommutated flow system, *Anal. Chim. Acta* 351 (1997) 223–228.
- [27] A. Jiménez Girón, I. Durán Merás, A. Muñoz De La Peña, A. Espinosa Mansilla, F. Cañada Cañada, A.C. Olivieri, Photoinduced fluorimetric determination of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid in serum using the kinetic evolution of the emission spectra accomplished with multivariate second-order calibration methods, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 827–835.
- [28] A.H.M.T. Scholten, P.L.M. Welling, U.A.T. Brinkman, R.W. Frei, Use of PTFE coils in post-column photochemical reactors for liquid chromatography-A, method for the analysis of natural and synthetic folate in foods, application to pharmaceuticals, *J. Chromatogr.* 199 (1980) 239–248.
- [29] R.F. Doherty, G.R. Beecher, A method for the analysis of natural and synthetic folate in foods, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 354–361.
- [30] A.H. Thomas, G. Suárez, F.M. Cabrerizo, R. Martino, A.L. Capparelli, Study of the photolysis of folic acid and 6-formylpterin in acid aqueous solutions, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 135 (2000) 147–154.
- [31] M.K. Off, A.E. Steindal, A.C. Porojnicu, A. Juzeniene, A. Vorobey, A. Johnsson, J. Moan, Ultraviolet photodegradation of folic acid, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 80 (2005) 47–55.
- [32] A. Tyagi, A. Penzkofer, Fluorescence spectroscopic behaviour of folic acid, *Chem. Phys.* 367 (2010) 83–92.



- [33] A. Lebidzińska, M. Dbrowsja, P. Szefer, M. Marszall, High performance liquid chromatography method for the determination of folic acid in fortified food products, *Toxicol. Mech. Methods* 18 (2008) 463–467.
- [34] J. Arcot, A.K. Shrestha, U. Gusanov, Enzyme protein binding assay for determining folic acid in fortified cereal foods and stability of folic acid under different extraction conditions, *Food Control* 13 (2002) 245–252.
- [35] Y. Iwatani, J. Arcot, A.K. Shrestha, Determination of folate contents in some Australian vegetables, *J. Food Compos. Anal.* 16 (2003) 37–48.
- [36] C. Nilsson, M. Johansson, E. Yazynina, L. Strålsjö, J. Jastrebova, Solid-phase extraction for HPLC analysis of dietary folates, *Eur. Food Res. Technol.* 219 (2004) 199–204.
- [37] J. Jastrebova, C. Witthöft, A. Grahn, U. Svensson, M. Jägerstad, HPLC determination of folates in raw and processed beetroots, *Food Chem.* 80 (2003) 579–588.
- [38] E.S. Osseyi, R.L. Wehling, J.A. Albrecht, HPLC determination of stability and distribution of added folic acid and some endogenous folates during breadmaking, *Cereal Chem.* 78 (2001) 375–378.
- [39] A. Jiménez Girón, E. Martín-Tornero, M.C. Hurtado Sánchez, I. Durán Merás, A. Espinosa Mansilla, A simple HPLC-ESI-MS method for the direct determination of ten pteridinic biomarkers in human urine, *Talanta* 101 (2012) 465–472.
- [40] A. Espinosa Mansilla, A. Muñoz De La Peña, D. González Gómez, Using univariate linear regression calibration software in the MATLAB environment. Application to chemistry laboratory practices, *Chem. Educ.* 5 (2005) 337–345.
- [41] A. Jiménez Girón, I. Durán-Merás, A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña, F. Cañada Cañada, A.C. Olivieri, On line photochemically induced excitation-emission-kinetic four-way data: analytical application for the determination of folic acid and its two main metabolites in serum by U-PLs and N-PLs/residual trilinearization (RTL) calibration, *Anal. Chim. Acta* 622 (2008) 94–103.
- [42] G. Suárez, F.M. Cabrerizo, C. Lorente, A.H. Thomas, A.L. Capparelli, Study of the photolysis of 6-carboxypterin in acid and alkaline aqueous solutions, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 132 (2000) 53–57.
- [43] M.M. Araújo, E. Marchioni, M. Zhao, F. Kuntz, T. Di Pascoli, A.L.C.H. Villavicencio, M. Bergaentzle, LC/MS/MS identification of some folic acid degradation products after E-beam irradiation, *Radiat. Phys. Chem.* 81 (2012) 1166–1169.
- [44] M. Jamil Akhtar, M. Ataulh Khan, I. Ahmad, Identification of photoproducts of folic acid and its degradation pathways in aqueous solution, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 579–588.
- [45] A. Juzeniene, M. Grigalavicius, L.W. Ma, M. Juraleviciute, Folic acid and its photoproducts, 6-formylpterin and pterin-6-carboxylic acid, as generators of reactive oxygen species in skin cells during UVA exposure, *J. Photochem. Photobiol. B* 155 (2016) 116–121.
- [46] G.L. Long, J.D. Winefordner, Limit of detection, *Anal. Chem.* 55 (1983) A712–A724.
- [47] L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, C. Jiménez Linares, M. Román Ceiba, Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment, *Anal. Lett.* 26 (1993) 1243–1258.
- [48] C. Witthöft, M. Hefni, Folic acid and folates: physiology and health effects, *Encycl. Food Heal* 2016, pp. 724–730.
- [49] R. Póo-Prieto, D.B. Haytowitz, J.M. Holden, G. Rogers, S.F. Choumenkovitch, P.F. Jacques, J. Selhub, Use of the affinity/HPLC method for quantitative estimation of folic acid in enriched cereal-grain products, *J. Nutr.* 136 (2006) 3079–3083.
- [50] Y. Amornkul, J.W. DeVries, P.G. Krishnan, 5-Methyltetrahydrofolate content of cereal-based processed foods, *J. Hum. Nutr. Food Sci.* 1 (2013) 1–5.
- [51] C. Mattos Della Lucía, E. Rodrigues da Silva, S. Machado Rocha Ribeiro, H.M. Pinheiro-Sant'Ana, Optimization of method to analyze folate in leafy vegetables by high performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Quim Nova* 34 (2011) 335–340.
- [52] M.D. Iniesta, D. Pérez-Conesa, J. García-Alonso, G. Ros, M.J. Periago, Folate content in tomato (*Lycopersicon esculentum*). Influence of cultivar, ripeness, year of harvest, and pasteurization and storage temperatures, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 4739–4745.
- [53] P. Koufopantelis, S. Georgakakou, M. Kazanis, C. Giaginis, A. Margeli, S. Papargiri, I. Panderi, Direct injection liquid chromatography/positive ion electrospray ionization mass spectrometric quantification of methotrexate, folic acid, folic acid and ondansetron in human serum, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 3850–3856.
- [54] X.H. Zheng, L.Y. Jiang, L.T. Zhao, Q.Y. Zhang, L. Ding, Simultaneous quantitation of folic acid and 5-methyltetrahydrofolic acid in human plasma by HPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study, *J. Pharm. Anal.* 5 (2015) 269–275.

## Supplementary data: Mass spectrometry data at different irradiation time

Folic acid (AF)						
Irradiation time	m/z (MS)	m/z (HRMS)	Empirical Formula molecular ion	Calculated Mass ( $\Delta$ ppm)	ion	compound
0'-30''	295.1	295.0949	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	295.0935 (1.87)	[M] <sup>+</sup>	II
	442.2	442.1483	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	442.1475 (1.79)	[M+H] <sup>+</sup>	I
	464.1	464.1299	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> NaO <sub>6</sub>	464.1295 (0.97)	[M+Na] <sup>+</sup>	I
	486.0	486.1122	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> N <sub>7</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	486.1114 (1.66)	[M+2Na] <sup>+</sup>	I
6'	120.1	120.0450	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> NO	120.0449 (0.51)	[M] <sup>+</sup>	III
	192.0	192.0517	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	192.0521 (2.34)	[M+H] <sup>+</sup>	IV
	214.0	214.0346	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub> NaO <sub>2</sub>	214.0341 (2.36)	[M+Na] <sup>+</sup>	IV
	289.0	289.0800	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>5</sub>	289.0800 (0.14)	[M+Na] <sup>+</sup>	V
	295.1	295.0931	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	295.0943 (4.23)	[M] <sup>+</sup>	II
	442.2	442.1428	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	442.1475 (10.8)	[M+H] <sup>+</sup>	I
	464.1	464.1286	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> N <sub>7</sub> NaO <sub>6</sub>	464.1294 (1.83)	[M+Na] <sup>+</sup>	I
	486.0	486.1099	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> N <sub>7</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	486.1114 (3.07)	[M+2Na] <sup>+</sup>	I
20'	120.1	120.0450	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> NO	120.0449 (0.51)	[M] <sup>+</sup>	III
	164.0	164.0570	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>5</sub> O	164.0572 (1.43)	[M+H] <sup>+</sup>	VII
	186.1	186.0393	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub> NaO	186.0392 (0.65)	[M+Na] <sup>+</sup>	VII
	208.0	208.0464	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	208.0471 (3.19)	[M+H] <sup>+</sup>	VI
	230.0	230.0289	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub> NaO <sub>3</sub>	230.0290 (0.47)	[M+Na] <sup>+</sup>	VI
	252.0	252.0107	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> N <sub>5</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	252.0109 (1.00)	[M+2Na] <sup>+</sup>	VI
	289.0	289.0800	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>5</sub>	289.0800 (0.14)	[M+Na] <sup>+</sup>	V
	459.2	459.1534	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>	459.1502 (6.86)	[M+H+H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	I

Tetrahydrofolic acid (THF)							
Irradiation time	In presence of air	In presence of N <sub>2</sub>	m/z (HRMS)	Empirical formula molecular ion	Calculated Mass (Δ ppm)	ion	compound
	m/z (MS)						
0-30''	166.1	166.1	166.0725	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>5</sub> O	166.0729 (2.31)	[M+H] <sup>+</sup>	IX
	188.1	188.1	188.0543	C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N <sub>5</sub> NaO	188.0548 (2.81)	[M+Na] <sup>+</sup>	IX
	289.0	289.1	289.0800	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>5</sub>	289.0800 (0.14)	[M+Na] <sup>+</sup>	V
		299.1	299.1363	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	299.1256 (35.6)	[M] <sup>+</sup>	X
		446.2	446.1786	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	446.1788 (0.46)	[M+H] <sup>+</sup>	VIII
		468.1	468.1603	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>7</sub> NaO <sub>6</sub>	468.1608 (0.96)	[M+Na] <sup>+</sup>	VIII
6'		120.1	120.0449	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> NO	120.0449 (0.32)	[M] <sup>+</sup>	III
		154.1	154.0730	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> N <sub>5</sub> O	154.0729 (0.75)	[M+H] <sup>+</sup>	XI
	166.1	166.1	166.0726	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>5</sub> O	166.0729 (2.31)	[M+H] <sup>+</sup>	IX
	289.1	289.1	289.0795	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>5</sub>	289.0800 (1.87)	[M+Na] <sup>+</sup>	V
20'		120.1	120.0449	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> NO	120.0449 (0.32)	[M] <sup>+</sup>	III
		154.1	154.0730	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> N <sub>5</sub> O	154.0729 (0.75)	[M+H] <sup>+</sup>	XI
	166.1	166.1	166.0726	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>5</sub> O	166.0729 (2.31)	[M+H] <sup>+</sup>	IX
	289.1	289.1	289.0795	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>5</sub>	289.0800 (1.87)	[M+Na] <sup>+</sup>	V

## 5-Methyltetrahydrofolic acid (MTHF)

Irradiation time	m/z (MS)	m/z (HRMS)	Empirical Formula molecular ion	Calculated Mass ( $\Delta$ ppm)	ion	compound
0-30''	301.1	301.1411	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	301.1412 (0.11)	[M+H] <sup>+</sup>	XIII
	313.1	313.0997	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	313.1413 (0.96)	[M] <sup>+</sup>	XIV
	460.2	460.1949	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	460.1944 (0.93)	[M+H] <sup>+</sup>	XII
	482.2	482.1764	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> N <sub>7</sub> NaO <sub>6</sub>	482.1764 (0.003)	[M+Na] <sup>+</sup>	XII
6'	120.1	120.0458	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> NO	120.0449 (0.51)	[M] <sup>+</sup>	III
	180.1	180.0882	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>5</sub> O	180.0885 (1.43)	[M+H] <sup>+</sup>	XV
	301.1	301.1411	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	301.1412 (0.65)	[M+H] <sup>+</sup>	XIII
	474.2	474.1733	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>	474.1737 (0.88)	[M+H] <sup>+</sup>	XVI
	496.1	496.1548	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> N <sub>7</sub> NaO <sub>7</sub>	208.0471 (3.19)	[M+Na] <sup>+</sup>	XVI
20'	120.1	120.0458	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> NO	120.0449 (7.17)	[M+H] <sup>+</sup>	III
	289.1	289.0831	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>5</sub>	289.0800 (0.14)	[M+Na] <sup>+</sup>	V
	301.1	301.1411	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	186.0392 (0.65)	[M+H] <sup>+</sup>	XIII
	474.2	474.1733	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>	474.1737 (0.88)	[M+H] <sup>+</sup>	XVI
	496.1	496.1548	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> N <sub>7</sub> NaO <sub>7</sub>	208.0471 (3.19)	[M+H] <sup>+</sup>	XVI



# Phenanthrene metabolites determination in human breast and cow milk by combining elution time-emission fluorescence data with multiway calibration

Elísabet Martín Tornero<sup>a,b</sup>, Anunciación Espinosa-Mansilla<sup>a,b</sup>, Arsenio Muñoz de la Peña<sup>a,b</sup>, Isabel Durán Merás<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, University of Extremadura, 06006 Badajoz, Spain

<sup>b</sup> Research Institute on Water, Climate Change and Sustainability (IACYS), University of Extremadura, 06006 Badajoz, Spain

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Phenanthrene metabolites  
Elution time-emission fluorescence matrices  
Multiway calibration  
Human breast milk  
Cow milk

## ABSTRACT

Phenanthrene is the most released polycyclic aromatic hydrocarbon into the environment by anthropogenic action. Because of the absorption and biotransformation pathways, this compound is metabolized and the most abundant metabolites are hydroxylated derivatives, such as 1-, 2-, 3-, 4- and 9-hydroxyphenanthrene, which are excreted through biological fluids, included mammals milk. For the resolution and quantitation of co-eluted analytes, elution time-emission fluorescence matrices were analysed with different second-order calibration algorithms: n-way and unfolded partial least squares, both coupled with residual bilinearization (N-PLS/RBL and U-PLS/RBL), and multivariate curve resolution-alternative least squares (MCR-ALS). Once optimized the chromatographic parameters, in isocratic mode, the elution time was of 5.5 min. The second-order data were obtained exciting at 250 nm, with an emission range from 330 to 430 nm, each 1 nm, and elution time from 0 to 5.5 min each 5.4 s. The ranges for the second-order multivariate methods in validation samples were from 1.0 to 9.0 ng mL<sup>-1</sup> for 1-, 2-, 3- and 4-hydroxyphenanthrene, and from 5.0 to 45.0 ng mL<sup>-1</sup> for 9-hydroxyphenanthrene. Root mean square errors of prediction between 0.45 and 1.82 ng mL<sup>-1</sup> (relative errors of prediction 7–22%) were obtained. The optimized procedures were applied in the analysis of human breast milk and in whole and semi-skimmed commercial cow milk. N-PLS/RBL and U-PLS/RBL algorithms show satisfactory results for the five metabolites with recoveries ranging between 82% and 115%.

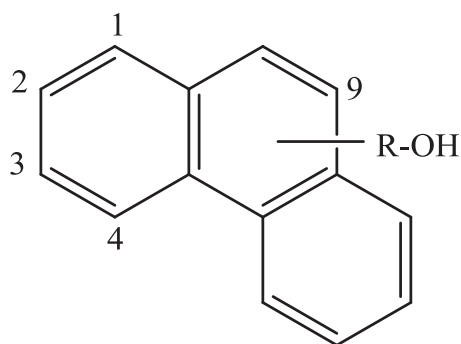
## 1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are environmental pollutants generated by the incomplete combustion of organic materials. Moreover, although they are not chemically synthesized for industrial purposes, they are used as intermediaries in pharmaceuticals, agricultural products and other chemical industries [1]. Human exposure to combustion products, containing mixtures of PAHs, has long been associated with cancer occurrence [2]. PAHs are lipid soluble and would be absorbed from the gastrointestinal tract of mammals, transferred through lungs and distributed in tissues and/or accumulated in adipose tissues. The metabolism, via the cytochrome P450-mediated mixed function oxidase system with oxidation or hydroxylation, yield hydroxylated metabolites that are excreted in feces, urine or milk [3]. The metabolites of PAHs are used as biomarkers to assess exposure to PAHs [4]. Until now, 1-hydroxypyrene (1OHPy) and 3-hydroxybenzo[a]pyrene (3OHBaP) have been proposed to be the most representative

biomarkers of global exposure to PAHs [5–7]. However, in a recent study, it is recommended that total body burden of PAHs should not be assessed exclusively by 1OHPy biomonitoring. The study is concluding that, as detected in biological fluids, the hydroxy-PAHs derivatives are also representative of contamination of biological matrices [8].

The US Environmental Protection Agency [9] has established a list of priority pollutants including 16 PAHs, being phenanthrene (Ph) one of them. The hydroxymetabolites of phenanthrene (OHPs), appear to be particularly useful for PAHs biomonitoring and, specifically, 1-, 2-, 3-, 4- and 9-hydroxyphenanthrene (1-OHP, 2-OHP, 3-OHP, 4-OHP and 9-OHP). These OHPs (Fig. 1) have been proposed as the main markers of exposure to phenanthrene [10,11]. Of the phenanthrene metabolites, 1- and (2+3)-OHPs appear to be particularly useful for biomonitoring studies and, in urine samples, represent more than 50% of the total OHPAHs measured [12]. Recently, a HPLC method for the simultaneous analysis of 2-hydroxyfluorene (2-OHF), various hydroxyphenanthrene metabolites, (1+9)-, (2+3)-, and 4-OHP, 1-

\* Corresponding author at: Department of Analytical Chemistry, University of Extremadura, 06006 Badajoz, Spain.  
E-mail address: [iduran@unex.es](mailto:iduran@unex.es) (I. Durán Merás).



1-Hydroxyphenanthrene (1-OHPh)

2-Hydroxyphenanthrene (2-OHPh)

3-Hydroxyphenanthrene (3-OHPh)

4-Hydroxyphenanthrene (4-OHPh)

9-Hydroxyphenanthrene (9-OHPh)

Fig. 1. Chemical structures for hydroxyphenanthrene (OHPh) metabolites.

hydroxypyrene (1-OHPy) and 3-hydroxybenzo[a]pyrene (3-OHB[a]Py) in human urine, has been proposed [13].

Although the principal elimination routes of OHPAHs are through biological fluids, their transference to mammals' milk is also taken place. Because of this, the determination of the above-mentioned metabolites in cow and breast milk has a great significance, due to their correlation with environmental or indoor contamination.

Several techniques are available for the analysis of OHPHs in milk samples, mainly liquid chromatographic methods with fluorescence detection [7,14,15]. Moreover, gas chromatographic-mass detection methods, with previous chemical derivation, have been also proposed to detect and analyse Ph and OHPHs [16–18]. In one of these methods [16], 1-, 2-, 3-, 4-, and 9-OHPH were analysed in milk of lactating goats, among other matrices. The proposed method includes enzymatic hydrolysis, liquid-liquid extraction, and Envi-Chrom P SPE column purification. Capillary electrophoresis has been also used to analyse some OHPAHs in milk, including 3OHPH and 9OHPH [19].

The main disadvantages of the reported methodologies are the relatively long chromatographic elution times, and the incomplete chromatographic separation between phenanthrene metabolites, in most cases. Grova et al. [16] achieved a complete resolution of the five metabolites by GC-MS but, after the pretreatment of the samples for the protein precipitation and analytes isolation, it is necessary a derivatization of the extracts previous to the chromatographic analysis. As indicated, studies about the determination of OHPHs in milk samples from mammals are scarce, but studies in breast milk are even more limited, being focused on analysing the most abundant PAHs according to the United States Environmental Protection Agency (US EPA) list [20–24]. Although food consumption is the major route of human exposition, no exhaustive information on infants exposure via breastfeeding is available actually [25]. In addition, in some regions where the high concentration of atmospheric PAHs was assessed, mothers are also exposed via inhalation of polluted air [25]. However, procedures for the analysis of PAH metabolites in breast milk have not been described to date.

According to the revised literature, HPLC proposed methods allow the analysis of only one or two metabolites of Ph. Methods for the simultaneous determination of the five OHPHs, in only one chromatographic run and using fluorimetric detection, have not been reported.

Taking into account that these analytes show overlapped chromatographic signals and practically identical fluorescence profiles, the use of multivariate calibration approaches opens a possibility for the quantification of all of them. In this sense, the combination of chromatographic data with spectroscopic techniques, such as HPLC with UV–vis diode-array detection (DAD) or fast-scanning luminescence detection (FSLD), is able to yield spectral-time second-order data, and second-order multivariate calibration can be performed when full selectivity in the chromatographic separation is not achieved. Applications of second-order calibration to chromatographic data, with diode array (DAD) and/or fast scanning fluorescence detection (FSLD), have been recently revised [26]. Data about the use of FSLD for generating second-order-chromatographic data are very scarce. Different second-order multivariate calibration algorithms, applied to LC data with fluorimetric detection, have been compared for the analysis of four fluoroquinolones in urine [27]. Multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS) was applied to resolve the co-elution of fluorene, pyrene and benzo[b]fluoroanthene with some interferences in smoked paprika samples [28]. MCR-ALS has been also proposed for the quantification of sex hormones in water and sediments [29], and for the determination of marker pteridines in urine samples [30].

The aim of the present paper is focussed in two ways: first, to investigate the combination between three-way multivariate calibration approaches and HPLC data in combination with a fast-scanning spectrofluorometer as detector, for the simultaneous determination of hydroxyphenanthrene metabolites; second, application of the optimized methodology for the analysis of 1-OHPH, 2-OHPH, 3-OHPH, 4-OHPH and 9-OHPH in breast and cow milk samples. The second-order data, based on elution time-emission measurements, were processed with several multi-way algorithms, such as N-PLS/RBL, U-PLS/RBL and MCR-ALS.

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

2-, 3-, and 9-hydroxyphenanthrene (2-, 3-, 9-OHPH) pure solids and individual solutions of 1-, and 4-hydroxyphenanthrene (1-OHPH, 4-OHPH), at  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  in acetonitrile, were obtained from LGC-Dr Ehrenstorfer GmbH (LGC Standards, SLU, Barcelona). Individual stock standard solutions of solid analytes were prepared in acetonitrile at concentrations of  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  and stored at  $-4^\circ\text{C}$  in darkness. Working solutions were prepared by dilution of the appropriate aliquots with acetonitrile. Acetonitrile (ACN), HPLC-grade, was purchased from Panreac (Barcelona, Spain).  $\beta$ -glucuronidase (30 U/mL)/aryl sulphatase (60 U/mL), from *Helix pomatia* aqueous solution, was provided by Merck (Barcelona, Spain).

Ultrapure water provided by a Milli-Q purification system (Millipore S.A.S., Molsheim, France) was used. Solvents and samples, used to perform the chromatographic technique, were filtered through 0.22  $\mu\text{m}$  hydrophobic fluoropore filters (PTFE) before each injection.

### 2.2. Instrumentation and software

The chromatographic studies were carried out on an Agilent 1100 High Performance Liquid Chromatograph equipped with degasser, quaternary pump, column oven, autosampler Agilent 1290 infinity thermostated at  $5^\circ\text{C}$ , fast scanning fluorescence detector (FSLD) and the ChemStation software to control de instrument, data acquisition and data analysis. The analytical column used was a Tracel Excel ODS-B column ( $2.1 \times 100 \text{ mm}$ ;  $3 \mu\text{m}$ , Teknokroma Analítica, Spain). The column temperature was set at  $20^\circ\text{C}$ . The mobile phase consisted in a mixture of acetonitrile and water (45:55, v/v) in isocratic mode. The flow rate was  $0.4 \text{ mL min}^{-1}$  and the injection volume was  $5 \mu\text{L}$ .

Data matrices were collected in the chromatographic system with a FSLD, in multiemission mode, using a wavelength emission range from 330 to 430 nm, each 1 nm, and elution times from 0 to 5.5 min, every

5.4 s, setting the excitation wavelength at 250 nm. Hence, the size of each data matrix was  $59 \times 101$  (elution time  $\times$  emission wavelength). These matrices were saved in ASCII format and transferred to a PC for posterior analysis.

Second order data analysis was performed using MatLab R2008a, version 7.6 (The Mathworks, Natick, MA). Moreover, a graphical interface was used: MVC2 (MultiVariate Calibration for second-order) routine, an integrated MATLAB toolbox for second-order calibration, developed by Olivieri et al. [31]. The software can be freely downloaded from the webpage [www.iquir-conicet.gov.ar/descargas/mvc2.rar](http://www.iquir-conicet.gov.ar/descargas/mvc2.rar).

### 2.3. Calibration and validation samples for second-order chemometric analysis

The experimental procedure for the three-way analysis was developed with a calibration set of 34 samples. Twenty-seven of these samples correspond with a central composite design, in the concentration ranges between 0 and  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ , for 1-, 2-, 3- and 4-OHPh and, between 0 and  $52 \text{ ng mL}^{-1}$ , for 9-OHPh. The concentration levels were selected according with the linear range of each analyte, with the object of obtaining a good linearity of each compound. Two acetonitrile blanks and five additional samples with only one analyte were also included, Table 1. The corresponding volumes of the standard solutions of each analyte, prepared in acetonitrile, were transferred into 10.0 mL calibrated flasks, and acetonitrile was added to the mark. Besides, a validation set of twelve samples, containing the OHPHs in the concentration range of the calibration set, was prepared in the same way, but employing different concentrations following a random design.

In all cases, aliquots of 5  $\mu\text{L}$  of each standard solution were injected

**Table 1**

Calibration samples provided by a central composite design (samples 1–27), and blanks and individual samples added (samples 28–34).

Sample	2-OHPh <sup>a</sup>	3-OHPh <sup>a</sup>	1-OHPh	9-OHPh <sup>a</sup>	4-OHPh <sup>a</sup>
1	5.5	5.5	0.6	27.5	5.5
2	5.5	5.5	10.5	27.5	5.5
3	5.5	5.5	5.5	2.8	5.5
4	5.5	5.5	5.5	52.3	5.5
5	5.5	5.5	5.5	27.5	0.6
6	10.4	5.5	5.5	27.5	10.5
7	5.5	0.6	5.5	27.5	5.5
8	5.5	10.5	5.5	27.5	5.5
9	1.0	1.0	1.0	5.0	9.9
10	1.0	1.0	9.9	5.0	9.9
11	1.0	1.0	1.0	49.6	1.0
12	1.0	1.0	9.9	49.6	1.0
13	9.8	1.0	1.0	5.0	9.9
14	9.8	1.0	9.9	5.0	1.0
15	9.8	1.0	1.0	49.6	9.9
16	9.8	1.0	9.9	49.6	1.0
17	1.0	10.0	1.0	5.0	9.9
18	1.0	10.0	9.9	5.0	9.9
19	1.0	10.0	1.0	49.6	1.0
20	1.0	10.0	9.9	49.6	1.0
21	9.8	10.0	1.0	5.0	9.9
22	9.8	10.0	9.9	5.0	1.0
23	9.8	10.0	1.0	49.6	9.9
24	9.8	10.0	9.9	49.6	1.0
25	5.5	5.5	5.5	27.5	5.5
26	5.5	5.5	5.5	27.5	5.5
27	5.5	5.5	5.5	27.5	5.5
28	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0
29	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0
30	0.0	3.0	0.0	0.0	0.0
31	0.0	0.0	0.0	0.0	3.0
32	0.0	0.0	0.0	15.0	0.0
33	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
34	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

<sup>a</sup> All concentration are given in  $\text{ng mL}^{-1}$ .

into the chromatographic system and eluted and monitored as previously described.

### 2.4. Milk samples

Whole and semi-skimmed cow milk samples were obtained from local super-markets. Breast milk samples were obtained from healthy volunteers, non-occupationally exposed to PAHs. Aliquots of 1 mL of milk were fortified adding aliquots of the OHPHs stock standard solutions and equilibrated in darkness for 24 h at room temperature. After, the sample pH was adjusted to 5 with HCl 0.3 M, and 3  $\mu\text{L}$  of  $\beta$ -glucuronidase enzyme was added. The hydrolysis of the glucuronide and sulphate conjugates of hydroxymetabolites was carried out incubating the mixture at  $37^\circ\text{C}$  for 20 h. After hydrolysis, 300  $\mu\text{L}$  of acetonitrile was added and the sample was vortex shaken and centrifuged at 5000 rpm for 10 min. The upper acetonitrile phase was removed and transferred to a clean 2 mL polypropylene tube. With the solid phase, the extraction process was repeated and the supernatant acetonitrile phase was combined with those of the first extraction. The extracts were diluted to 1.0 mL with acetonitrile, and filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  PTFE filter. Finally, aliquots of 5  $\mu\text{L}$  were injected in the chromatographic system.

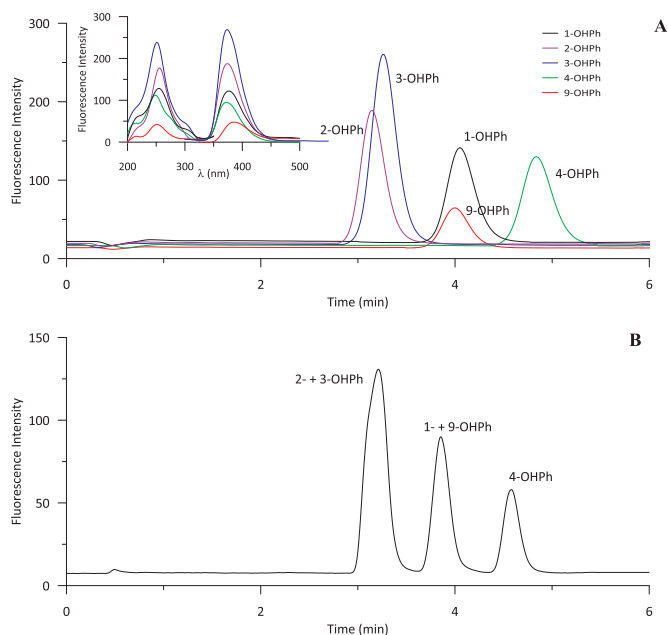
## 3. Results and discussion

The optimization of chromatographic conditions for the elution of the analytes was carried out with a working solution containing  $5.5 \text{ ng mL}^{-1}$  of 1-OHPh, 2-OHPh, 3-OHPh and 4-OHPh, and  $52.5 \text{ ng mL}^{-1}$  of 9-OHPh, in acetonitrile. As shown in Fig. 1, the only structural difference between the target analytes is the position of the -OH group and, for an adequate separation of these isomers, the selection of the solvents and composition of the mobile phase is essential. With the objective of achieving an adequate separation of the metabolites, different mobile phase compositions, ACN:H<sub>2</sub>O, with water percentages between 45% and 70%, were tested. A higher percentage of water is not possible due to the poor solubility of the analytes. With a mobile phase ACN:H<sub>2</sub>O 55:45, v:v, the elution of the analytes takes place in two minutes and all of them eluted in only one peak. Better resolutions were obtained as water percentage increases, although a complete resolution for the five metabolites was not achieved with any of the mobile phases assayed. Fig. 2A shows the individual chromatograms of the five analytes, eluted in isocratic mode with ACN: water (45:55, v:v). It can be observed that some of the analytes are overlapping in the elution mode when using this mobile phase. Using a mobile phase ACN:H<sub>2</sub>O (30:70, v:v), a better resolution was achieved between the peaks of 2- and 3-OHPh isomers, but their resolution was not complete. Nevertheless, 1- and 9-OHPh metabolites remain co-eluting and 4-OHPh increased its retention time until more than 30 min.

Other possibility explored to intent the individual quantification of the analytes was the use of different excitation and/or emission wavelengths. Fig. 2A (insert graph) shows the on-line excitation ( $\lambda_{\text{em}} = 375 \text{ nm}$ ) and emission ( $\lambda_{\text{ex}} = 250 \text{ nm}$ ) spectra of the five OHPHs studied, obtained by injecting pure standard solutions of each metabolite. The excitation and emission spectral profiles are very similar for all of them. The maximum excitation wavelengths are 256 nm for 2-OHPh, 251 nm for 3-OHPh, 255 nm for 1-OHPh, 251 nm for 9-OHPh and 248 nm for 4-OHPh. The maximum emission wavelengths are 374 nm for 2-OHPh, 373 nm for 3-OHPh, 376 nm for 1-OHPh, 386 nm for 9-OHPh and 372 nm for 4-OHPh. For 2- and 3-OHPh metabolites, the differences between excitation and emission wavelengths are 5 and 1 nm, respectively, and, for 1- and 9-OHPh metabolites, the differences are 4 and 10 nm, respectively. Their maxima are so close that it is not possible to use different excitation and/or emission wavelengths to improve their quantification.

Taking into account these considerations, the mobile phase was selected to provide the best relation between running time and peak





**Fig. 2.** A) Chromatograms and online fluorescence excitation and emission spectra (insert graph) of individual standards of 1-, 2-, 3-, 4- and 9-OHPH, mobile phase ACN:H<sub>2</sub>O 45:55; B) Chromatogram of a standard mixture containing 1-, 2-, 3-, 4- and 9-OHPH, mobile phase ACN:H<sub>2</sub>O 45:55, v-v,  $\lambda_{\text{ex}} = 250$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 375$  nm, flow rate =  $0.4 \text{ mL min}^{-1}$ .

shapes. An isocratic mobile phase composed by acetonitrile and ultra-pure water (45:55, v/v) and a flow rate of  $0.4 \text{ mL min}^{-1}$  were selected. Under these conditions and, as can be seen in Fig. 2B, the complete resolution of the five OHPHs was not achieved and only three peaks were obtained. In peak 1, 2- and 3-OHPH co-eluted, in peak 2, 1- and 9-OHPH co-eluted and, in peak 3, 4-OHPH metabolite is eluting. The total elution time is about five minutes. Given the impossibility of analysing the 1-, 2-, 3- and 9-OHPH metabolites by univariate calibration, the resolution was attempted using second-order calibration based on elution time-emission data, obtained by exciting all analytes at a compromise fixed wavelength of 250 nm. With respect to 4-OHPH, this metabolite does not present interference from the others and it could be accurately quantified by univariate calibration. However, taking into account that unexpected sample components may be appearing in real samples and may overlap with this peak, 4-OHPH was also analysed by multivariate calibration.

### 3.1. Three-way data recording

For each sample, 101 emission spectra, exciting at 250 nm, were obtained between 330 and 430 nm, with a data interval of 1 nm, and times from 0 to 5.5 min, at time intervals of 5.4 s. Fig. 3 shows a three dimensional chromatogram, and its contour plot for the validation sample number 8.

For sake of simplicity, second-order chromatographic data were splitted up in three different regions, according to the elution time axis: region I, between 2.9 and 3.6 min, region II, between 3.6 and 4.3 min and, region III, between 4.5 and 5.1 min. The first region includes 2-OHPH and 3-OHPH, the second region, 1-OHPH and 9-OHPH, and the third region includes 4-OHPH.

### 3.2. Calibration set samples

Several second-order multivariate calibration algorithms were applied: U-PLS and N-PLS, with or without RBL, depending on the presence or absence of sample interference, and MCR-ALS. These algorithms were chosen as representatives of second-order calibration

methods, being MCR-ALS usually the method of choice for HPLC second-order data. Unfolded and N-way partial least squares (U-PLS and N-PLS) are already described in the literature [32]. When unexpected constituents occur, the residual bilinearization (RBL) procedure is used. For a certain number of principal components, the mission of RBL is the minimization of the residual error to a level compatible with the degree of noise present in the measured signals [33–35]. In multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS), an augmented data matrix is created from the data test matrices and the calibration data matrices [36]. The resolution is accomplished using an initialization with parameters as close as possible to the final results [37–39].

For this purpose, calibration samples were prepared following a central composite design, plus additional samples with each analyte at its mean calibration concentration and two acetonitrile blanks, Table 1. With all algorithms, in first place, the calibration samples were processed and the optimum number of components for each one was obtained. The predictive capability of each algorithm was evaluated with the validation samples.

#### 3.2.1. UPLS and NPLS analysis

The optimum number of sample constituents or latent variables must be assessed in each time region. Cross-validation and the Haaland and Thomas criterion were employed [40]. Hence, the optimum number of factors was estimated by calculating the ratios  $F(A) = \text{PRESS}(A < A^*) / \text{PRESS}(A)$ , where  $\text{PRESS} = \sum (y_{i,\text{act}} - y_{i,\text{pred}})^2$ ,  $A$  is a trial number of factors and  $A^*$  corresponds to the minimum  $\text{PRESS}$ , and selecting the number of factors leading to a probability of less than 75% that  $F > 1$ . In region I, for 2- and 3-OHPH, the optimum number of factor was six. When region II was analysed, the optimum number of factors for 1- and 9-OHPH was five. Lastly, for 4-OHPH, the number of factors was four. Twelve validation samples were analysed with both algorithms and the specific details on the validation samples are provided later.

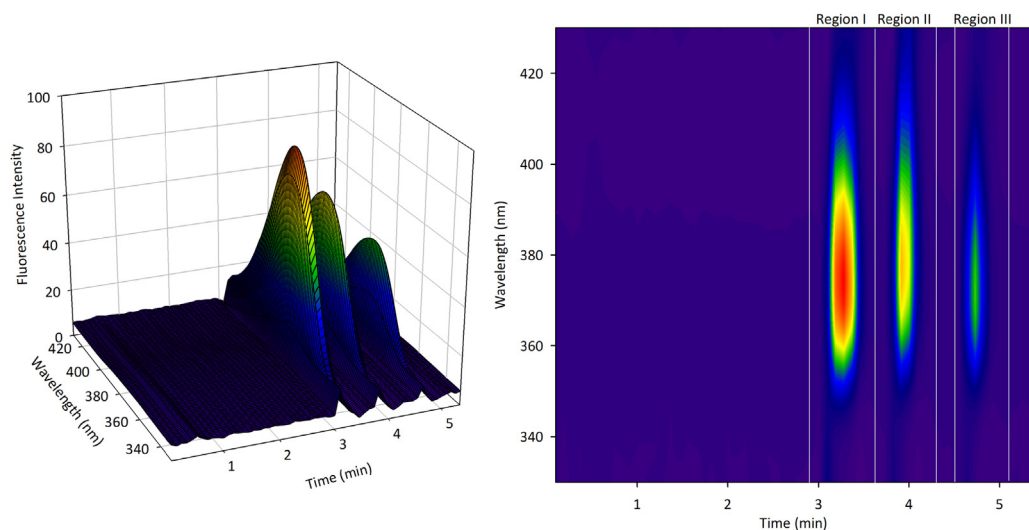
#### 3.2.2. MCR-ALS

The number of components in each augmented matrix was estimated by principal component analysis (PCA), and the algorithm was applied in each elution time region. A super-augmented data matrix in the elution time direction was built for each time region, by appending each unknown sample to the thirty-four calibration standard samples. During the ALS fitting, the following constraints were applied: non-negativity in both modes (emission spectral data and elution time), and unimodality in the elution time mode only to the signals corresponding to the analytes and not to the background signals.

In elution time regions I and II, the number of factors was 4, and in region III, 3 factors. Fig. 4 shows the temporal profiles and the emission spectral profiles for each region, obtained by this algorithm when analysing the first four validation samples. A comparison of the emission spectral profiles with the pure spectra allows us to confirm that the retrieved spectral profiles are in agreement with the spectra of pure analytes.

For all algorithms, the number of factors is higher than the number of analytes in each region. Three could be the main reasons to explain the high number of factors: the significant differences that exist among the OHPHs signal magnitudes; the low concentrations analysed; and the need to modelling residual scattering. The signal intensity of 9-OHPH is 70% lower than that of 1-OHPH, and both present a total similarity in the excitation/emission spectra. On the other hand, the metabolite concentrations are so low that its relative signals are of the same level of other background contributions. These aspects are influencing in that more factors than the number of analytes were needed. Also, the metabolites show a great similarity in excitation and emission spectra. The difference between the emission maxima of 2-OHPH and 3-OHPH is only of 1 nm. With respect to 1-OHPH and 9-OHPH, the difference in the emission maxima is of 10 nm, but their elution times are practically





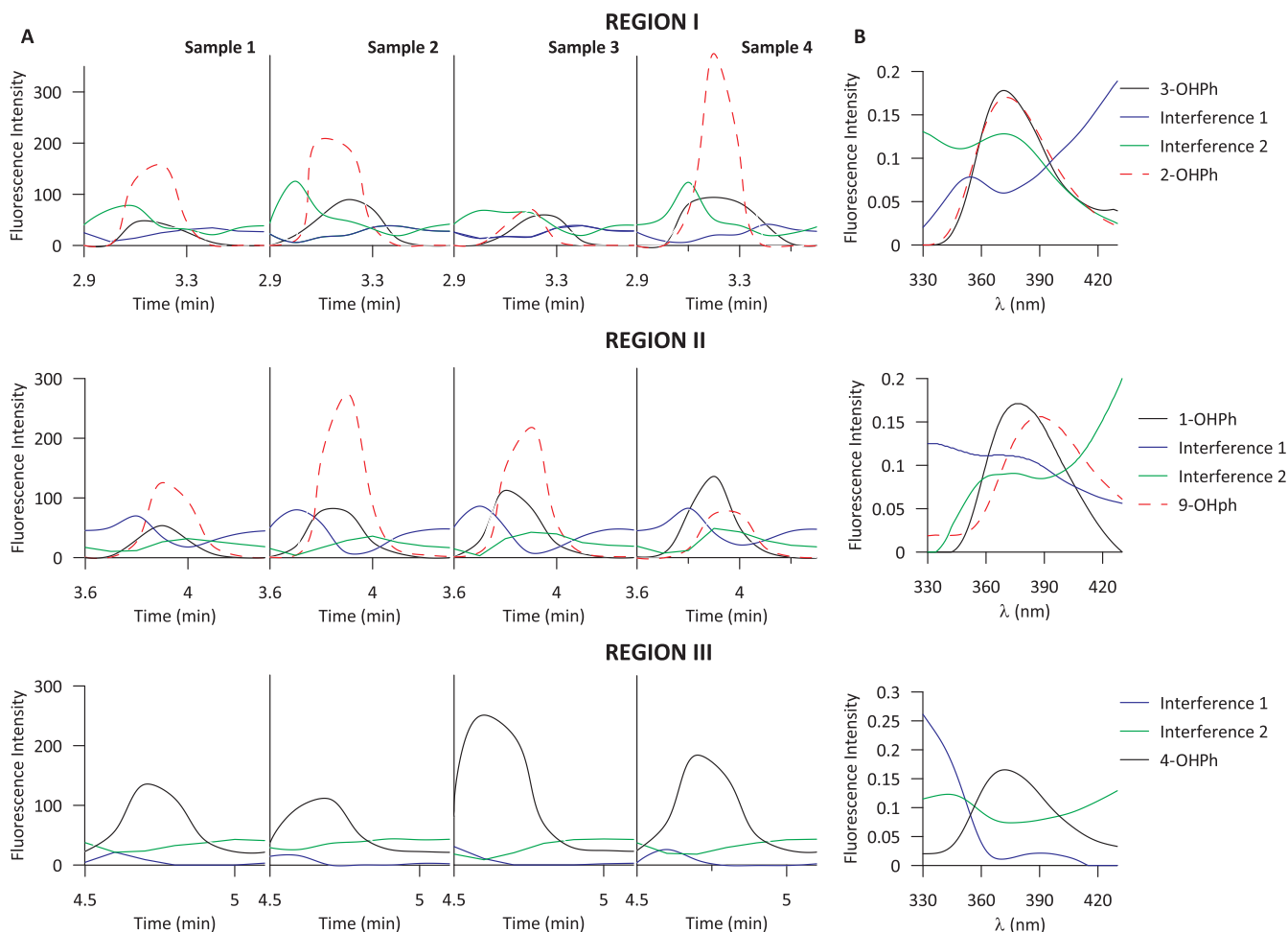
**Fig. 3.** A) Three-dimensional fluorescence emission-elution time matrix of validation sample 8; B) contour plot of validation sample 8, and the time regions used for the analysis in the elution time mode: Region I from 2.9 to 3.6 min; Region II from 3.6 to 4.3 min and Region III from 4.5 to 5.1 min,  $\lambda_{\text{ex}} = 250$  nm, emission wavelength range from 330 to 430 nm each 1 nm; elution time from 0 to 5.5 min each 5.4 s.

similar. In addition, 1- and 9-OHPH, which co-eluted in peak 2, show great differences in fluorescence intensities. All these factors contribute to an increase of the number of components for the different algorithms, allowing the additional components to resolve the interactions between the analytes. This is in accordance with previous results about the determination of PAHs through EEMs and by using different second-order multivariate calibration algorithms [41].

### 3.3. Quantitative validation results comparison

In order to compare the performance of the three algorithms in terms of predictive ability, the nominal and predicted concentration results obtained in the analysis of the twelve validation samples are summarized in Table 2.

As can be observed, in elution time region I, the recovery values



**Fig. 4.** A) Elution profiles retrieved by MCR-ALS analysis for each region and for calibration samples 1–4. B) Emission spectra retrieved by MCR-ALS analysis for each region.

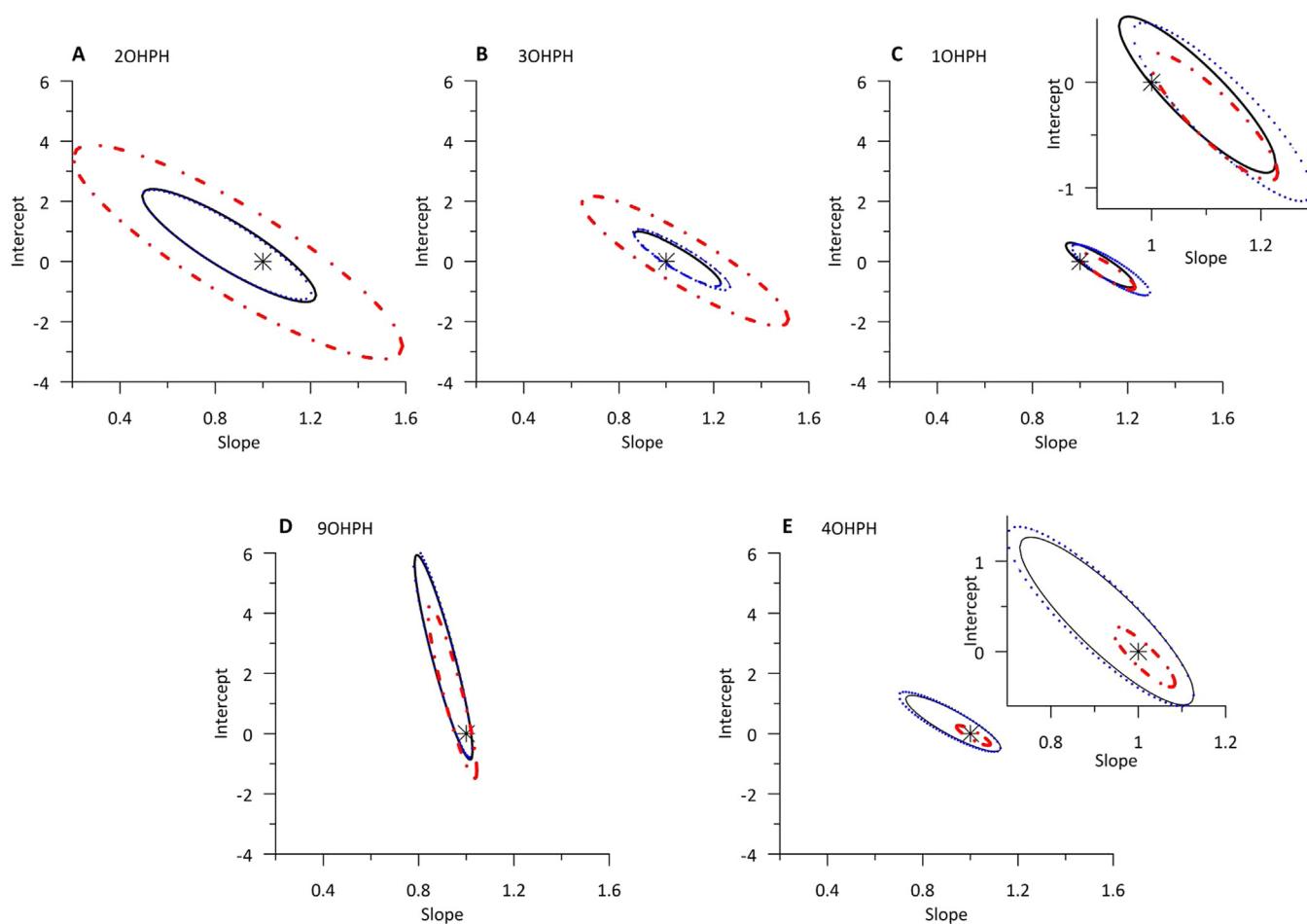
**Table 2**  
Predicted concentration and statistical values for 1-, 2-, 3-, 9-, and 4-OHP in validation samples using UPLS, NPLS and MCR-ALS.

Analyte (ng mL <sup>-1</sup> )	Method	Validation samples												% Mean Recovery ( ± SD) <sup>a</sup>	RMSEP <sup>b</sup>	REP <sup>c</sup>		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12					
<b>Region I</b> 2OHPH	Actual	3.0	3.5	1.0	8.0	4.0	2.0	7.0	4.5	5.0	9.0	1.5	6.0					
	UPLS	3.2	3.4	1.1	5.1	5.1	1.7	7.6	4.1	5.1	8.9	1.8	5.8	102 (20)		0.97	22.00	
	NPLS	3.2	3.4	1.1	5.1	5.1	1.7	7.4	4.1	5.1	8.8	1.8	5.8	102 (20)		0.96	21.87	
	MCR-ALS	1.4	2.6	0.4	3.7	4.9	2.3	7.3	4.1	5.4	11.1	3.7	5.4	126 (67)		1.72	39.58	
3OHPH	Actual	1.0	3.0	2.0	2.5	6.0	4.0	5.5	3.5	5.0	9.0	7.0	4.5					
	UPLS	1.0	3.2	2.1	2.8	6.0	4.3	6.5	4.6	5.3	9.8	7.1	4.2	95 (8)		0.45	9.59	
	NPLS	0.9	3.2	2.1	2.9	6.2	4.3	6.7	4.6	5.3	9.9	7.1	4.2	94 (9)		0.52	10.94	
	MCR-ALS	1.1	3.2	1.3	4.0	6.0	3.5	7.3	4.2	5.9	10.7	5.7	4.9	97 (24)		0.92	19.07	
<b>Region II</b> 1OHPH	Actual	1.0	1.5	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	3.5	4.5					
	UPLS	1.0	1.6	2.3	2.9	4.7	4.9	6.8	7.1	8.3	10.1	3.5	4.4	105 (8)		0.50	10.33	
	NPLS	0.9	1.5	2.3	2.8	4.7	4.8	6.9	7.6	8.2	10.4	3.5	4.4	105 (9)		0.61	12.65	
	MCR-ALS	1.0	1.5	2.1	2.9	4.2	4.8	6.1	7.4	8.3	10.4	3.5	4.5	102 (5)		0.45	9.61	
9OHPH	Actual	24.9	45.0	40.1	15.0	27.5	20.0	5.0	17.5	30.0	32.5	15.0	35.0					
	UPLS	25.0	45.3	38.4	17.0	27.5	20.3	6.2	20.8	29.2	32.1	15.60	31.3	104 (10)		1.76	6.83	
	NPLS	25.1	45.2	38.4	17.2	27.7	20.5	6.1	21.0	29.1	31.9	15.72	31.3	104 (10)		1.82	7.06	
	MCR-ALS	24.6	45.5	38.4	16.8	28.3	20.0	5.9	17.0	29.8	32.6	15.63	31.2	99 (8)		1.33	5.22	
<b>Region III</b> 4OHPH	Actual	2.0	1.5	4	2.5	1.0	5.5	9.0	4.5	6.0	6.5	3.0	3.5					
	UPLS	2.0	1.5	3.5	2.7	1.0	5.7	7.8	4.7	6.4	7.1	3.2	3.7	98 (9)		0.48	11.62	
	NPLS	2.1	1.5	3.4	2.7	1.1	5.7	7.6	4.7	6.5	7.0	3.3	3.7	98 (10)		0.52	12.67	
	MCR-ALS	1.9	1.3	3.7	2.6	1.1	5.6	8.8	4.6	6.2	6.8	2.9	3.4	101 (5)		0.16	3.98	

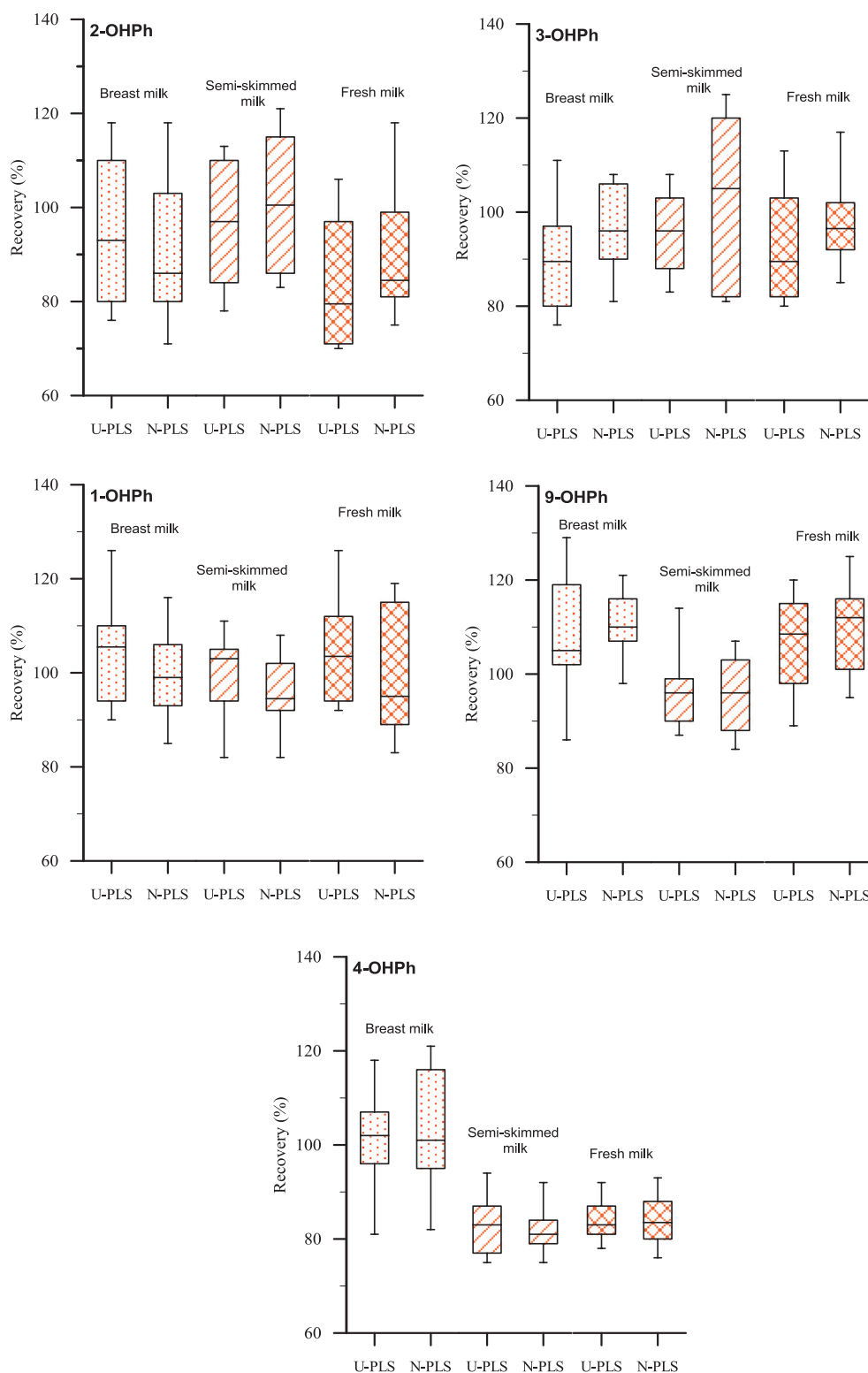
<sup>a</sup> Standard deviation.

<sup>b</sup> RMSEP, root mean square error of prediction, ng mL<sup>-1</sup>.

<sup>c</sup> REP, relative error prediction in %.



**Fig. 5.** Corresponding elliptical joint regions (at the 95% confidence level) for the slopes and intercepts of the regressions for the five analytes and the three algorithms. The theoretical point (intercept = 0; slope = 1) is marked in the figure by a black point. U-PLS/RBL (black solid line), N-PLS/RBL (blue dashed line), MCR-ALS (red dash-dotted line). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 6.** Box and whisker plots of the recoveries of: A) 2-OHPH; B) 3-OHPH; C) 1-OHPH; D) 9-OHPH; E) 4-OHPH in breast milk and in semi-skimmed and whole fresh cow milk by U-PLS/RBL and N-PLS/RBL.

obtained by U-PLS and N-PLS for 2-OHPH and 3-OHPH are 102% for both. By MCR-ALS, recovery values were 126% for 2-OHPH and 97% for 3-OHPH. In region II, the recoveries for 1- and 9-OHPH are very similar for all algorithms, with mean values of 104%, for 1-OHPH, and 102% for 9-OHPH. For last, in region III, the recovery values for 4-OHPH range from 98% for U-PLS and N-PLS to 101% for MCR-ALS.

Moreover, an elliptical joint confidence region (EJCR) (at 95%

confidence level) [42] was calculated to evaluate the slope and intercept, corresponding to the linear regression of predicted vs nominal concentration, for each hydroxymetabolite. In time region I, for 2- and 3-OHPH, all ellipses include the theoretical point (1, 0), Figs. 5A and 5B. In addition, the ellipses for U-PLS and N-PLS are significantly smaller than those corresponding to MCR-ALS, suggesting higher precision for the first algorithms. Also, as can be clearly appreciated, the sizes of the

ellipses are very similar for U-PLS and N-PLS for these two analytes, confirming that very similar results are obtained by both methods.

In the second time region, the EJCR analysis for 1- and 9-OHPH, Figs. 5C and 5D, shows that the ellipse sizes are similar with all the algorithms and for both metabolites, confirming the equivalent results obtained using the three algorithms in this region. All of them contain the ideal point (1, 0).

For time region III, where 4-OHPH eluted, the ellipses of all the algorithms, Fig. 5E, are similar, and all of them contain the theoretical point (1, 0), and the sizes of the ellipses of U-PLS and N-PLS results are bigger than the MCR-ALS ellipse.

The statistical parameters (root mean square error of prediction and relative error of prediction), obtained with each of the algorithms, are summarized in Table 2. It can be observed that 9-OHPH presents the higher figures of merits, due to its low fluorescence intensity in comparison with the other analytes. In general, with the three algorithms, all parameters are seen to be good, indicating that the present methodologies may be useful for a simultaneous determination of the five OHPHs of interest.

The possibility of individual quantification of 1-, 2-, 3-, 4- and 9-OHPH metabolites by HPLC, is a great innovation for the analysis of the phenanthrene metabolites. By HPLC, in none of the previously proposed methods it is possible the quantification of 9-OHPH, either it is not included [43] or it co-eluted with 1-OHPH and could not be quantified separately [44].

### 3.4. Milk samples

With the purpose of testing the applicability of the studied methods, different milk samples were analysed, including cow milks (semi-skimmed and whole fresh milk), and breast milk. The composition of breast milk and cow milk differs in the carbohydrate, protein and fat contents. Proteins content in whole cow milk is more than double than in breast milk, and the ratio lactoserum/casein is 60:40 in breast milk and 20:80 in whole cow milk. The fat percentage is similar in both milks, but cow's milk contains more saturated fat, while human milk contains more unsaturated fat.

In all cases, milk samples were spiked with the analytes and a recovery study was carried out. An aliquot of 1 mL of each milk sample was spiked with the different OHPHs in five levels, with concentrations ranging between 0.7 and 6.2 ng mL<sup>-1</sup> for 1-, 2-, 3- and 4-OHPH and between 2.8 and 24.8 ng mL<sup>-1</sup> for 9-OHPH. Two replicates of each milk sample were analysed following the methodology described in Section 3.4. It is remarkable that nylon filters cannot be used because the analytes were retained in the membrane, and hydrophobic fluorophore 0.22 µm PTFE filters were used in this case.

Once the second order matrices were obtained, U-PLS/RBL, N-PLS/RBL and MCR-ALS algorithms were applied. MCR-ALS results are acceptable for 1-OHPH, while N-PLS/RBL and U-PLS/RBL predictions were very good for all analytes, in all milk samples and for all levels. The recoveries obtained with the last two algorithms are represented in Fig. 6. The results (n = 10) for each hydroxymetabolite are summarized as a box and whisker plot for each milk sample analysed. The centre line represents the median and the lower and upper portions indicate the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentile. The recoveries are between 80% and 120% and the major data dispersion was found for 2- and 3-OHPH. For 1- and 9-OHPH not significant differences were found in the three milk types analysed. For 4-OHPH, the precision of the obtained recoveries was very good. For breast milk, where previous data about these analytes have not been found, the obtained results were very good for all the target metabolites.

## 4. Conclusions

For the first time, and using HPLC, the main five hydroxymetabolites of phenanthrene have been individually quantified. The

combination of elution time-emission fluorescence matrices with selected second-order algorithms, UPLS/RBL, NPLS/RBL and MCR-ALS, were tested and compared to analyse the hydroxyphenanthrene metabolites in complex matrices, such as breast and cow milk. In validation samples, the three algorithms give adequate results for all analytes. In milk samples, the results obtained with MCR-ALS are not as good as those obtained by PLS approaches. We must take into account that this algorithm is more sensitive to matrix complexity than the PLS approaches, but has the advantage of being able to recover the spectral information of analytes. The good results obtained with U-PLS and N-PLS, once combined with the RBL approach, can be justified by the use of latent variables for these algorithms, which are flexible enough to overcome the problem of the high degree of spectral similarity among several analytes. Analytical results in human breast, semi-skimmed and whole cow fresh milks are satisfactory, taking into account the complexity of the milk sample and the similar spectroscopic properties of the studied metabolites. For last, the possibility of individual quantification of 1-, 2-, 3-, 4- and 9-OHPH metabolites by HPLC, is a great innovation for the analysis of the phenanthrene metabolites in human fluids. Also, the proposed method is highly sensitive, with similar linearity ranges that those reported by GC-MS [16], the running time is only of 5.5 min and in isocratic mode, with a flow rate of 0.4 mL min<sup>-1</sup>, which minimizes the waste of organic solvents.

## Acknowledgements

Authors are grateful to the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (Project CTQ2017-82496-P) and to the Gobierno de Extremadura (GR180541-Research Group FQM003, and Project IB16058), both cofinanced by the Fondo Social Europeo, for financially supporting this work. Elisabet Martín-Tornero thanks to Ministerio de Economía y Competitividad of Spain and Fondo Social Europeo for a FPI grant with reference BES-2015-075407 (Order ECC/1402/2013, 22 of July).

## References

- [1] H.I. Abdel-Shafy, M.S.M. Mansour, A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation, *Egypt. J. Pet.* 25 (2016) 107–123.
- [2] K.-H. Kim, S.A. Jahan, E. Kabir, R.J.C. Brown, A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects, *Environ. Int.* 60 (2013) 71–80.
- [3] D. Lapole, G. Rychen, N. Grova, F. Monteau, B. Le Bizec, C. Feidt, Milk and urine excretion of polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites after a single oral administration in ruminants, *J. Dairy Sci.* 90 (2007) 2624–2629.
- [4] G.F. Aitio, A. Bernard, A. Fowler, B.A. Nordberg, Biological monitoring and biomarkers, in: L.T. Nordberg, G.F. Fowler, B.A. Nordberg, M. Friberg (Eds.), *Handb. Toxicol. Met.* 3rd edition, Academic Press, Burlington, 2007, pp. 65–78.
- [5] F.J. Jongeneelen, Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Ann. Occup. Hyg.* 45 (2001) 3–13.
- [6] H.A. Jeng, C.H. Pan, W.Y. Lin, M.T. Wu, S. Taylor, G.P. Chang-Chien, G. Zhou, N. Diawara, Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons from coke oven emissions and reproductive toxicity in nonsmoking workers, *J. Hazard. Mater.* 244–245 (2013) 436–443.
- [7] L. Rey-Salgueiro, E. Martínez-Carballo, M.S. García-Falcón, C. González-Barreiro, J. Simal-Gándara, Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites in infant foods, *Food Chem.* 115 (2009) 814–819.
- [8] M. Oliveira, K. Slezakova, C. Delerue-Matos, M. do Carmo Pereira, S. Morais, Assessment of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in preschool children: levels and impact of preschool indoor air on excretion of main urinary mono-hydroxyl metabolites, *J. Hazard. Mater.* 322 (2017) 357–369.
- [9] U.S. Environmental Protection Agency, Polycyclic Organic Matter (POM), (n.d.). <[https://www3.epa.gov/airtoxics/hlthef/polycycl.html#N\\_1\\_%0A](https://www3.epa.gov/airtoxics/hlthef/polycycl.html#N_1_%0A)> (Accessed 6 May 2018).
- [10] K. Polanska, W. Hanke, G. Dettbarn, W. Sobala, J. Gromadzinska, P. Magnus, A. Seidel, The determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in the urine of non-smoking Polish pregnant women, *Sci. Total Environ.* 487 (2014) 102–109.
- [11] H. Hemat, J. Wittsiepe, M. Wilhelm, J. Müller, T. Göen, High levels of 1-hydroxypyrene and hydroxyphenanthrenes in urine of children and adults from Afghanistan, *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 22 (2012) 46–51.
- [12] F. Onyemauiwa, S.M. Rappaport, J.R. Sobus, D. Gajdošová, R. Wu, S. Waidyanatha, Using liquid chromatography–tandem mass spectrometry to quantify

- monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 1117–1125.
- [13] Á. Luque-Uría, A. Espinosa-Mansilla, I. Durán-Merás, HPLC-fast scanning fluorimetric detection determination of risk exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons biomarkers in human urine, *Bioanalysis* 9 (2017) 265–278.
- [14] A. Chahin, Y.P. Guiavarc'h, M.A. Dziurla, H. Toussaint, C. Feidt, G. Rychen, 1-Hydroxypyrene in milk and urine as a bioindicator of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure of ruminants, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 1780–1786.
- [15] Y.P. Guiavarc'h, A. Chahin, M.A. Dziurla, F.T. Yen, C. Jondreville, G. Rychen, EROD activity in peripheral blood lymphocytes and 1-hydroxypyrene in urine and milk as biomarkers of PAH exposure in dairy ruminants, *Environ. Toxicol. Chem.* 30 (2011) 1346–1353.
- [16] N. Grova, F. Monteau, B. Le Bizec, C. Feidt, F. Andre, G. Rychen, Determination of phenanthrene and hydroxyphenanthrenes in various biological matrices at trace levels using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Anal. Toxicol.* 29 (2005) 175–181.
- [17] A. Costera, C. Feidt, M.A. Dziurla, F. Monteau, B. Le Bizec, G. Rychen, Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from soil and hay matrices in lactating goats, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 5352–5357.
- [18] S. Lutz, C. Feidt, F. Monteau, G. Rychen, B. Le Bizec, S. Jurjanz, Effect of exposure to soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbons on milk contaminations of parent compounds and their monohydroxylated metabolites, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 263–268.
- [19] G. Knobel, A.D. Campiglia, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in milk by a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction and capillary electrophoresis, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 2291–2298.
- [20] L. Zanieri, P. Galvan, L. Checchini, A. Cincinelli, L. Lepri, G.P. Donzelli, M. Del Bubba, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human milk from Italian women: influence of cigarette smoking and residential area, *Chemosphere* 67 (2007) 1265–1274.
- [21] S.R. Kim, R.U. Halden, T.J. Buckley, Polycyclic aromatic hydrocarbons in human milk of nonsmoking U.S. Women, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 2663–2667.
- [22] Y. Yu, X. Wang, B. Wang, S. Tao, W. Liu, X. Wang, J. Cao, B. Li, X. Lu, M.H. Wong, Polycyclic aromatic hydrocarbon residues in human milk, placenta, and umbilical cord blood in Beijing, China, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 10235–10242.
- [23] I. Çok, B. Mazmanci, M.A. Mazmanci, C. Turgut, B. Henkelmann, K.W. Schramm, Analysis of human milk to assess exposure to PAHs, PCBs and organochlorine pesticides in the vicinity Mediterranean city Mersin, Turkey, *Environ. Int.* 40 (2012) 63–69.
- [24] O.P. Luzardo, N. Ruiz-Suárez, M. Almeida-González, L.A. Henríquez-Hernández, M.Z. Luis, D. Boada, Multi-residue method for the determination of 57 persistent organic pollutants in human milk and colostrum using a QuEChERS-based extraction procedure, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 9523–9536.
- [25] J. Pulkrabova, M. Stupak, A. Svarcova, P. Rossner, A. Rossnerova, A. Ambroz, R. Sram, J. Hajslova, Relationship between atmospheric pollution in the residential area and concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human breast milk, *Sci. Total Environ.* 562 (2016) 640–647.
- [26] A.C. Olivieri, P.L. Pisano, A. Muñoz de la Peña, H.C. Goicoechea, Data analysis, in: S. Fanali, P.R. Haddad, C. Poole, M.L. Riekkola (Eds.), *Liquid Chromatography, Vol 1, Fundamentals and Instrumentation*, 2nd edition, Elsevier, Amsterdam (Netherlands), 2017, pp. 515–531.
- [27] F. Cañada-Cañada, J.A. Arancibia, G.M. Escandar, G.A. Ibañez, A. Espinosa Mansilla, A. Muñoz de la Peña, A.C. Olivieri, Second-order multivariate calibration procedures applied to high-performance liquid chromatography coupled to fast-scanning fluorescence detection for the determination of fluoroquinolones, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4868–4876.
- [28] O. Monago-Maraña, R.L. Pérez, G.M. Escandar, A. Muñoz De La Peña, T. Galeano-Díaz, Combination of liquid chromatography with multivariate curve resolution-alternating least-squares (MCR-ALS) in the quantitation of polycyclic aromatic hydrocarbons present in paprika samples, *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) 8254–8262.
- [29] R.L. Pérez, G.M. Escandar, Multivariate calibration-assisted high-performance liquid chromatography with dual UV and fluorimetric detection for the analysis of natural and synthetic sex hormones in environmental waters and sediments, *Environ. Pollut.* 209 (2016) 114–122.
- [30] A. Mancha De Llanos, M.M. De Zan, M.J. Culzoni, A. Espinosa-Mansilla, F. Cañada-Cañada, A. Muñoz De La Peña, H.C. Goicoechea, Determination of marker pteridines in urine by HPLC with fluorimetric detection and second-order multivariate calibration using MCR-ALS, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 2123–2135.
- [31] A.C. Olivieri, H.L. Wu, R.Q. Yu, MVC2: a MATLAB graphical interface toolbox for second-order multivariate calibration, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 96 (2009) 246–251.
- [32] S. Wold, P. Geladi, K.I.M. Esbensen, J. Ohman, Multi-way principal components and pls-analysis, *J. Chemom.* 1 (1987) 41–56.
- [33] J. Öhman, P. Geladi, S. Wold, Residual bilinearization. Part 1: theory and algorithms, *J. Chemom.* 4 (1990) 79–90.
- [34] A.C. Olivieri, On a versatile second-order multivariate calibration method based on partial least-squares and residual bilinearization: second-order advantage and precision properties, *J. Chemom.* 19 (2005) 253–265.
- [35] J.A. Arancibia, A.C. Olivieri, D.B. Gil, A.E. Mansilla, I. Durán-Merás, A.M. De La Peña, Trilinear least-squares and unfolded-PLS coupled to residual trilinearization: new chemometric tools for the analysis of four-way instrumental data, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 80 (2006) 77–86.
- [36] R. Tauler, M. Maeder, A. De Juan, Multiset data analysis: extended multivariate curve resolution, in: S. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemom. Elsevier, Oxford, U.K.*, 2009, pp. 473–506.
- [37] V. Boeris, J.A. Arancibia, A.C. Olivieri, Determination of five pesticides in juice, fruit and vegetable samples by means of liquid chromatography combined with multivariate curve resolution, *Anal. Chim. Acta* 814 (2014) 23–30.
- [38] R. Tauler, A. de Juan, data handling in science and technology, *Data Handl. Sci. Technol.* 29 (2015) 247–292.
- [39] A.C. Olivieri, G.M. Escandar, H.C. Goicoechea, A. Muñoz de la Peña, Chapter 8 - unfolded and multiway partial least-squares with residual multilinearity: applications, *Data Handl. Sci. Technol.* 29 (2015) 365–397.
- [40] D.M. Haaland, E.V. Thomas, Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1193–1202.
- [41] S. Elcoroaristizabal, A. De Juan, J. Antonio, N. Durana, L. Alonso, Chemometrics and intelligent laboratory systems comparison of second-order multivariate methods for screening and determination of PAHs by total fluorescence spectroscopy, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 132 (2014) 63–74.
- [42] A.G. González, M.A. Herrador, A.G. Asuero, Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays, *Talanta* 48 (1999) 729–736.
- [43] Y. Wang, L. Meng, E.N. Pittman, A. Etheredge, K. Hubbard, D.A. Trinidad, K. Kato, X. Ye, A.M. Calafat, Quantification of urinary mono-hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons by on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 931–937.
- [44] T. Chetiyankornkul, A. Toriba, T. Kameda, N. Tang, K. Hayakawa, Simultaneous determination of urinary hydroxylated metabolites of naphthalene, fluorene, phenanthrene, fluoranthene and pyrene as multiple biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 712–718.