



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de nuevas metodologías analíticas para la
determinación de quimioterápicos, biomarcadores y
compuestos de interés medioambiental**

Departamento de Química Analítica

Memoria presentada para optar al Grado de
Doctor en Química con Mención Internacional

María del Carmen Hurtado Sánchez

2015



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de nuevas metodologías analíticas para la
determinación de quimioterápicos, biomarcadores y
compuestos de interés medioambiental**

María del Carmen Hurtado Sánchez

Departamento de Química Analítica

Conformidad de los directores:

Dra. D^a Isabel Durán Martín-Merás

Catedrática de Universidad

Facultad de Ciencias

Universidad de Extremadura

Dra. D^a María Isabel Rodríguez Cáceres

Titular de Universidad

Facultad de Ciencias

Universidad de Extremadura

2015



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

Campus Universitario
Avda. de Elvas, s/n
06006-BADAJOS
Teléfono 924 289 300 y 924 289 375
FAX 924 274 244
E-mail: quiana@unex.es

ARSENIO MUÑOZ DE LA PEÑA CASTRILLO, Catedrático y Director del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura

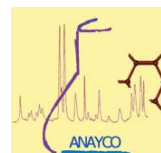
INFORMA

Que el trabajo que se presenta en esta TESIS DOCTORAL, con el título **“DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE QUIMIOTERÁPICOS, BIOMARCADORES Y COMPUESTOS DE INTERÉS MEDIOAMBIENTAL”**, ha sido realizado bajo la dirección de las Dras. D^ª **Isabel Durán Martín-Merás** y D^ª **María Isabel Rodríguez Cáceres**, en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura, y reúne todos los requisitos para poder optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas con Mención Internacional.

Badajoz, a 23 de octubre de 2014.

Agradecimientos

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada con la ayuda de una beca predoctoral, concedida por el Gobierno de Extremadura (DOE 04/01/2011) con la cofinanciación del Fondo Social Europeo (FSE), y con la financiación del Gobierno de Extremadura para la consolidación del Grupo de Investigación FQM003 “Análisis y Control de Residuos en Alimentos, Fluidos Biológicos y Medio Ambiente (ANAYCO)” (Proyecto GR10033).



ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	5
PARTE I.	
Desarrollo de metodología analítica para la determinación de compuestos quimioterápicos en muestras biológicas.....	9
I.1. Introducción.....	11
I.1.1. Cáncer: definición, incidencia y prevalencia.....	13
I.1.1.1. Cáncer colorrectal y su tratamiento mediante quimioterapia.....	15
<i>Ensayos clínicos.....</i>	<i>16</i>
<i>Fármacos quimioterápicos empleados en el tratamiento del cáncer colorrectal.....</i>	<i>18</i>
<i>Líneas de tratamiento para el cáncer de colon metastático.....</i>	<i>23</i>
I.1.2. Antecedentes bibliográficos para la determinación de los agentes quimioterápicos empleados en el tratamiento del CCR.....	26
I.1.3. Descripción de las técnicas analíticas empleadas en esta parte de la Memoria.....	29
I.1.3.1. Calibración multivariante.....	29
<i>Calibración multivariante de primer orden.....</i>	<i>31</i>
<i>Calibración multivariante de segundo orden.....</i>	<i>32</i>
<i>Metodología de trabajo en calibración multivariante.....</i>	<i>37</i>
I.1.3.2. Electroforesis capilar.....	41
Bibliografía.....	45
I.2. Análisis de CPT-11 y SN-38 en muestras de suero y orina mediante calibración multivariante de primer orden.....	57

I.2.1. Introducción al artículo científico 1.....	59
Bibliografía.....	61
I.2.2. Artículo científico 1.....	63
I.2.3. Discusión del artículo científico 1.....	79
I.3. Evaluación de métodos de calibración multivariante de segundo orden en la determinación de CPT-11 y talidomida en muestras de orina.....	83
I.3.1. Introducción al artículo científico 2.....	85
Bibliografía.....	88
I.3.2. Artículo científico 2.....	89
I.3.3. Discusión del artículo científico 2.....	111
I.4. Determinación de compuestos quimioterápicos en orina mediante electroforesis capilar con detección UV-Visible y fluorescente en serie.....	117
I.4.1. Introducción al artículo científico 3.....	119
Bibliografía.....	122
I.4.2. Artículo científico 3.....	123
I.4.3. Discusión del artículo científico 3.....	151
 PARTE II.	
Análisis de marcadores del estrés oxidativo en muestras biológicas y alimentos.....	157
II.1. Introducción.....	159
II.1.1. Reacción de Maillard.....	161
II.1.2. Antecedentes bibliográficos para el análisis de compuestos α -dicarbonílicos.....	168
II.1.2.1. Derivatización de los compuestos α -dicarbonílicos.....	168
II.1.2.1. Presencia de compuestos α -dicarbonílicos en muestras biológicas.....	172

II.1.2.2. Presencia de compuestos α -dicarbonílicos en alimentos.....	174
II.1.3. Descripción de las técnicas analíticas empleadas en esta parte de la Memoria.....	175
II.1.3.1. Nuevas aportaciones en el campo de la cromatografía líquida: UHPLC.....	176
<i>Teoría cinética. Ecuación de van Deemter</i>	176
<i>Columnas empaquetadas con partículas de tamaño inferior a 2 μm (Sub-2 μm)</i>	180
<i>Columnas empaquetadas con partículas de núcleo sólido (core-shell)</i>	180
<i>Columnas monolíticas</i>	182
Bibliografía.....	183
II.2. Determinación de compuestos α -dicarbonílicos en orina mediante HPLC con detección fluorescente, previa derivatización a compuestos pteridínicos.....	193
II.2.1. Introducción al artículo científico 4.....	195
Bibliografía.....	197
II.2.2. Artículo científico 4	199
II.2.3. Discusión del artículo científico 4.....	223
II.3. Estudio de derivados lumazínicos de compuestos α -dicarbonílicos en diferentes columnas cromatográficas. Análisis de dichos compuestos en muestras de vino.....	231
II.3.1. Introducción al artículo científico 5.....	233
Bibliografía.....	236
II.3.2. Artículo científico 5	237
II.3.3. Discusión del artículo científico 5.....	265

PARTE III.

Determinación de contaminantes en aguas superficiales.....	271
III.1. Introducción.....	273
III.1.1. Contaminación medioambiental.....	275
III.1.1.1. Plaguicidas.....	275
<i>Tendencias actuales para la determinación de plaguicidas en agua.....</i>	<i>279</i>
III.1.1.2. Contaminantes emergentes.....	282
<i>Tendencias actuales para la determinación de contaminantes emergentes.....</i>	<i>284</i>
III.1.2. Descripción de las técnicas analíticas empleadas en esta parte de la Memoria.....	285
III.1.2.1. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).....	285
<i>Acoplamiento de la cromatografía líquida de ultra eficacia a la espectrometría de masas (UHPLC-MS).....</i>	<i>285</i>
<i>Espectrometría de masas: fuentes de ionización.....</i>	<i>286</i>
<i>Espectrometría de masas: analizadores.....</i>	<i>291</i>
<i>Estudio del efecto matriz.....</i>	<i>295</i>
Bibliografía.....	298
III.2. Análisis de pesticidas en aguas superficiales mediante cromatografía de líquidos de ultra eficacia acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo.....	309
III.2.1. Introducción al artículo científico 6.....	311
Bibliografía.....	315
III.2.2. Artículo científico 6.....	319
III.2.3. Discusión del artículo científico 6.....	349

III.3. Análisis de carbamazepina, ofloxacina y piroxicam mediante fluorescencia fotoinducida en combinación con algoritmos quimiométricos de segundo orden.....	355
III.3.1. Introducción al artículo científico 7.....	357
Bibliografía.....	361
III.3.2. Artículo científico 7.....	363
III.3.3. Discusión del artículo científico 7.....	399
CONCLUSIONES.....	403
CONCLUSIONS.....	409

Abreviaturas y Acrónimos

AGEs	productos finales de la glicación avanzada (<i>advanced glycation end-products</i>)
ANOVA	análisis de la varianza (<i>analysis of variance</i>)
APCI	interfase de ionización química a presión atmosférica (<i>atmospheric pressure chemical ionization interface</i>)
APLI	interfase de ionización por láser a presión atmosférica (<i>atmospheric pressure laser ionization interface</i>)
APPI	interfase de fotoionización a presión atmosférica (<i>atmospheric pressure photoionization interface</i>)
BGE	electrolito de separación (<i>background electrolyte</i>)
BLLS	mínimos cuadrados bilineales (<i>bilinear least-squares</i>)
CANDECOMP	descomposición canónica (<i>canonical decomposition</i>)
CBZ	carbamazepina (<i>carbamazepine</i>)
CE	electroforesis capilar (<i>capillary electrophoresis</i>)
CEC	electrocromatografía capilar (<i>capillary electrochromatography</i>)
CG	cromatografía de gases (<i>gas chromatography</i>)
CORCONDIA	diagnóstico de la consistencia del modelo (<i>core consistency diagnostic</i>)
CPT	camptotecina (<i>camptothecin</i>)
CPT-11	irinotecan (<i>irinotecan</i>)
CRC	cáncer colorrectal (<i>colorectal cancer</i>)
CREA	creatinina (<i>creatinine</i>)
CZE	electroforesis capilar de zona (<i>capillary zone electrophoresis</i>)
DAD	detector de diodos en serie (<i>diode array detector</i>)
DDP	5,6-diamino-2,4-dihidroxipirimidina (<i>5,6-diamino-2,4-dihydroxypyrimidine</i>)
DIA	diacetilo o 2,3-butanodiona (<i>diacetyl or 2,3-butanedione</i>)
3-DG	3-desoxiglucosona (<i>3-deoxyglucosone</i>)
DICLO	diclofenaco (<i>diclofenac</i>)
DLLME	microextracción líquido-líquido dispersiva (<i>dispersive liquid-liquid microextraction</i>)
DPD	enzima dihidropirimidina deshidrogenasa (<i>dihydropyrimidine dehydrogenase enzyme</i>)

EEMs	matrices de excitación y emisión (<i>excitation-emission matrices</i>)
EEPIFMs	matrices de excitación y emisión mediante fluorescencia fotoinducida (<i>excitation-emission photoinduced fluorescence matrices</i>)
EJCR	región elíptica de confianza (<i>elliptical joint confidence region</i>)
EOF	flujo electroosmótico (<i>electroosmotic flow</i>)
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (<i>Environmental Protection Agency</i>)
ESI	ionización por electrospray (<i>electrospray ionization</i>)
FD	detector de fluorescencia (<i>fluorescence detector</i>)
FDA	Agencia de Alimentos y Medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
FdUMP	5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato (<i>5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate</i>)
FLU	ácido flufenámico (<i>flufenamic acid</i>)
5-FU	5-fluorouracilo (<i>5-fluorouracil</i>)
5-FUTP	5-fluorouridina-5'-trifosfato (<i>5'-fluorouridine-5'-triphosphate</i>)
Gly	glioxal o etano-1,2-diona (<i>glyoxal or ethane-1,2-dione</i>)
GS	D-glucosona o 2-ceto-D-glucosa (<i>D-glucosone or 2-keto-D-glucose</i>)
HETP	altura equivalente a un plato teórico (<i>height equivalent to a theoretical plate</i>)
HLB	balance hidrofílico lipofílico (<i>hydrophilic lipophilic balance</i>)
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
IBU	ibuprofeno (<i>ibuprofen</i>)
k'	factor de capacidad (<i>capacity factor</i>)
LC	cromatografía líquida (<i>liquid chromatography</i>)
LLE	extracción líquido-líquido (<i>liquid-liquid extraction</i>)
LOD	límite de detección (<i>limit of detection</i>)
LOQ	límite de cuantificación (<i>limit of quantification</i>)
LPME	microextracción en fase líquida (<i>liquid phase microextraction</i>)
LV	leucovorin o ácido folínico (<i>leucovorin or folinic acid</i>)

MCR-ALS	resolución multivariada de curvas por mínimos cuadrados alternantes (<i>multivariate curve resolution alternating least-squares</i>)
B-ME	β-mercaptoetanol (<i>β-mercaptoethanol</i>)
MEKC	cromatografía electrocinética micelar (<i>micellar electrokinetic chromatography</i>)
MGly	metilglioxal o 2-oxopropanal (<i>methylglyoxal or 2-oxopropanal</i>)
MRM	monitorización de reacciones múltiples (<i>multiple reaction monitoring</i>)
MS	espectrometría de masas (<i>mass spectrometry</i>)
MS/MS	analizador de masas en tándem (<i>tandem mass spectrometry</i>)
MVC1	calibración multivariante de primer orden (<i>first-order multivariate calibration</i>)
MVC2	calibración multivariante de segundo orden (<i>second-order multivariate calibration</i>)
N	número de platos teóricos (<i>theoretical plate number</i>)
N-PLS	mínimos cuadrado parciales multidimensionales (<i>multiway-partial least squares</i>)
OFL	ofloxacina (<i>ofloxacin</i>)
OMS	Organización Mundial de la Salud (<i>World Health Organization</i>)
PARAFAC	análisis paralelo de factores (<i>parallel factor analysis</i>)
PCA	análisis de componentes principales (<i>principal component analysis</i>)
2,3-Pen	2,3-pentanodiona (<i>2,3-pentanedione</i>)
PhGly	fenilglioxal (<i>phenylglyoxal</i>)
PIF	fluorescencia fotoinducida (<i>photo-induced fluorescence</i>)
PLS	mínimos cuadrado parciales (<i>partial least squares</i>)
PPCPs	fármacos y productos de cuidado personal (<i>pharmaceuticals and personal care products</i>)
PRESS	suma de los cuadrados de los errores de la predicción (<i>prediction residual error sum of squares</i>)
PS-DVB	poliestireno-divinilbenceno (<i>polystyrene-divinylbenzene</i>)
PVP-DVB	polivinil-pirrolidona-divinilbenceno (<i>polyvinyl-pyrrolidone-divinylbenzene</i>)
PX	piroxicam (<i>piroxicam</i>)
QqQ	analizador de triple cuádrupolo (<i>triple quadrupole</i>)
QTOF	analizador cuádrupolo-tiempo de vuelo (<i>quadrupole-time of flight</i>)

R	resolución (<i>resolution</i>)
RBL	bilinealización residual (<i>residual bilinearization</i>)
REP	error relativo de la predicción (<i>relative error of prediction</i>)
RF	función de respuesta (<i>response function</i>)
RMSEP	raíz cuadrada de la media de los errores de predicción al cuadrado (<i>root mean square error of prediction</i>)
RSD	desviación estándar relativa (<i>relative standard deviation</i>)
SAL	ácido salicílico (<i>salicylic acid</i>)
SBSE	extracción por sorción en barra agitadora (<i>stir bar sorptive extraction</i>)
SD	desviación estándar (<i>standard deviation</i>)
SDS	docedil sulfato sódico (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SN-38	7-etil-10-hidroxicamptotecina (<i>7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin</i>)
SPE	extracción en fase sólida (<i>solid phase extraction</i>)
SPME	microextracción en fase sólida (<i>solid phase microextraction</i>)
SRM	monitorización de la reacción seleccionada (<i>selected reaction monitoring</i>)
SS-LLE	extracción líquido-líquido con soporte sólido (<i>solid-supported liquid-liquid extraction</i>)
TF	tegafur (<i>tegafur</i>)
THL	talidomida (<i>thalidomide</i>)
TOF	tiempo de vuelo (<i>time of flight</i>)
TRI	2,4,5-triamino-6-hidroxipirimidina (<i>2,4,5-triamino-6-hydroxypyrimidine</i>)
TS	enzima timidilato sintasa (<i>thymidylate synthase enzyme</i>)
UHPLC	cromatografía líquida de ultra eficacia (<i>ultra-high pressure liquid chromatography</i>)
U-PLS	mínimos cuadrados parciales concatenados (<i>unfolded-partial least squares</i>)
UV	detector ultravioleta (<i>ultraviolet detector</i>)

RESUMEN

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral, estructurada en tres bloques, es desarrollar nuevos métodos de análisis para la determinación de compuestos de elevado interés social dentro de los campos bioanalítico y medioambiental.

El primer bloque está enfocado en el desarrollo de métodos de análisis sencillos, rápidos y sensibles, que sean alternativos a los métodos cromatográficos que usualmente se emplean para la determinación de compuestos utilizados en diferentes terapias oncológicas, así como de sus principales metabolitos. Los agentes quimioterápicos en los cuales se ha centrado esta investigación son derivados de la camptotecina y del uracilo, los cuales se emplean de manera conjunta en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, principalmente el cáncer de colon. Además, en uno de los estudios realizados se ha incluido el leucovorin, ya que es uno de los compuestos más utilizados como agente coadyuvante. Las diferentes estrategias analíticas empleadas se han basado en la aplicación de algoritmos quimiométricos de primer y segundo orden en combinación con señales fluorescentes, así como en el empleo de técnicas separativas como la electroforesis capilar con detección UV-Visible y fluorescente en serie. Los métodos desarrollados han sido satisfactoriamente validados mediante su aplicación en muestras biológicas, concretamente orina y suero. Además, se ha evaluado la capacidad resolutive de los algoritmos quimiométricos de segundo orden más utilizados (PARAFAC, N-PLS/RBL y U-PLS/RBL).

En la segunda parte se ha llevado a cabo el estudio de un grupo de compuestos α -dicarbonílicos relacionados con la calidad de determinados alimentos, así como con enfermedades crónicas y con el estrés oxidativo, ya que interactúan con proteínas y ácidos nucleicos debido a su alta reactividad, alterando su función. Se han desarrollado métodos cromatográficos con detección fluorescente que nos han permitido analizar dichos compuestos en fluidos biológicos, concretamente en muestras de orina, y en bebidas como el vino. Dado que estos compuestos carecen de fluorescencia nativa, ha sido necesaria la optimización de reacciones de derivatización previa al análisis cromatográfico, garantizando así una alta sensibilidad de los métodos analíticos desarrollados. Para ello, se han utilizado dos reactivos derivatizantes: 5,6-diamino-2,4-dihidroxipirimidina (DDP) y 2,4,5-triaminopirimidina-6-hidroxi (TRI). Además, se han

evaluado las prestaciones de varias columnas cromatográficas C18, de diferente tamaño de partícula, en la separación de los derivados formados a partir del DDP.

Finalmente, el tercer bloque se ha centrado en el desarrollo de nuevas metodologías analíticas destinadas al control medioambiental, abordándose la determinación de plaguicidas y contaminantes emergentes, los cuales se caracterizan por los efectos tóxicos que generan sobre los seres vivos y el medio ambiente, y cuyo estudio se encuentra entre las líneas de investigación prioritarias de organismos dedicados a la protección de la salud pública y el medio ambiente, tales como la Organización Mundial de la Salud y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, entre otros. En primer lugar, se ha abordado el desarrollo de un método de análisis multiresiduo para la determinación de 37 herbicidas ampliamente empleados en la agricultura, el cual está basado en una preconcentración mediante extracción en fase sólida en modo *on line* (SPE on-line) previo al análisis con cromatografía líquida de ultra eficacia acoplada a detección con espectrometría de masas de tipo triple cuadrupolo (UPLC-ESI-MS/MS). De este modo se ha logrado un método sensible, rápido y sobre todo automatizable, el cual se aplicó al análisis de muestras de agua superficiales atendiendo a la legislación actual.

Por otra parte, respecto al estudio de contaminantes emergentes, en esta Memoria se ha desarrollado un método para la determinación en muestras de agua de algunos de los fármacos más utilizados y que debido a sus vías de eliminación se llegan a acumular en aguas residuales. Los analitos que se han estudiado han sido la carbamazepina, la ofloxacina y el piroxicam. En este caso, previamente se ha optimizado la formación de productos fluorescentes utilizando radiación UV. Como señal analítica se han utilizado datos de segundo orden, concretamente matrices de excitación-emisión, que han sido procesados con el algoritmo de calibración multivariante U-PLS/RBL.

SUMMARY

The main aim of this Doctoral Thesis, divided into three parts, is to develop new analytical methods for the determination of compounds with special social interest in the environmental and bioanalytical fields.

The first part is focused on the development of simple, fast and sensitive analytical methods to determine chemotherapeutic compounds and their metabolites, and to propose alternatives to the chromatographic methods commonly employed to this end. Camptothecin-derivatives and uracil-derivatives compounds are employed in the treatment of several kind of cancer, with special attention on colorectal cancer. We have also analyzed leucovorin, which is a drug used as adjuvant agent. The different analytical strategies employed have been based in the application of first-order and second-order chemometric algorithms in combination with fluorescence signals, as well as in the employment of capillary electrophoresis coupled with both UV-Visible and fluorescence detectors in serie. The proposed analytical methods have been successfully validated by analyzing biological samples such as urine and serum. Moreover, the capacity of resolution of the most commonly employed second-order chemometric algorithms (PARAFAC, N-PLS/RBL and U-PLS/RBL) have been also evaluated.

The second part of this work is focused on the studio of several α -dicarbonyl compounds, which are related with food quality and whit several chronic diseases and oxidative stress, by their interaction with nucleic acids and proteins. New chromatographic methods based on fluorimetric detection have been developed to determine these compounds in biological fluids (urine) and alcoholic beverages (wine). α -Dicarbonyl compounds do not have native fluorescence. For this reason, derivatization reactions carried out previous the chromatographic determination have been optimized, in order to ensure the formation of highly fluorescence derivatives. The reactives 5,6-diamino-2,4-dihydroxypyrimidine (DDP) and 2,4,5-triamino-6-hydroxypyrimidine (TRI) have been employed to this end. In addition, several C18 columns packed with particles of different sizes have been evaluated in the chromatographic resolution of the lumazinic derivatives formed in the reaction between α -dicarbonyl compounds and DDP.

Finally, the third part of this Thesis is focused on the development of novel analytical methodology for environmental monitoring, with special attention to pesticides and emerging pollutants, which present toxic effects to living beings and the environment. The analysis of these kind of compounds are consider as a priority for the World Health Organization (WHO) and Environmental Protection Agency (EPA). In first place, an on-line solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry (UPLC-ESI-MS/MS) method to determine 37 herbicides, commonly employed in the agriculture, have been developed. This method, which provides high sensitivity in the determination of the target compounds, and is also fast and easily automatable, has been applied to the analysis of surface water samples in accordance with the current legislation. On the other hand, regarding with the determination of emerging pollutant in water, carbamazepine, ofloxacin and piroxicam, which are present in this matrix because their elimination routes, have been also analyzed. The proposed analytical method involves photochemically induced fluorescence matrix data combined with the U-PLS/RBL second-order chemometric analysis.

PARTE I

**Desarrollo de Metodología Analítica para la Determinación
de Compuestos Quimioterápicos en Muestras Biológicas**

I.1. Introducción

I.1.1. Cáncer: definición, incidencia y prevalencia

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define cáncer como “término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de «tumores malignos» o «neoplasias malignas». Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis.

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad. En la mayor parte de los países desarrollados es la segunda causa principal de muerte después de las enfermedades cardiovasculares. Además, el número total de casos aumenta cada año en todo el mundo.

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, *International Agency for Research on Cancer*), que es el organismo especializado para el cáncer de la OMS, y dentro del proyecto GLOBOCAN, publica cada varios años un informe basado en los datos de 184 países, que recoge datos estadísticos sobre incidencia, prevalencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer [1].

En terminología clínica, se entiende por incidencia el número de casos nuevos de una enfermedad en un periodo de tiempo determinado, generalmente un año, en relación a un número determinado de habitantes en una población. Respecto a la mortalidad, ésta se define como el número de fallecimientos en un determinado periodo de tiempo, mientras que la prevalencia hace referencia al número de pacientes en una determinada población, independientemente del momento en el que fueron diagnosticados, por lo tanto este factor depende de la aparición de la enfermedad (incidencia) y de la letalidad de la misma.

Según los datos publicados en el último informe (correspondientes al año 2012) el cáncer de pulmón es el de mayor incidencia (13%), y el que causa una mayor mortalidad entre la población, teniendo en cuenta los datos correspondientes a ambos sexos. Por otra parte, el cáncer de mama es aquel que presenta una mayor prevalencia a 5 años (19,2%).

De los datos registrados en nuestro país se destaca que el cáncer que presenta una prevalencia más alta a 5 años es el cáncer de mama (17,9%), mientras que el que produce una mayor mortalidad es el cáncer de pulmón (20,6%). Sin embargo, el tipo de cáncer con mayor incidencia en hombres y mujeres es el cáncer de colon o cáncer colorrectal (15%), tal como se muestra en la Figura I.1.

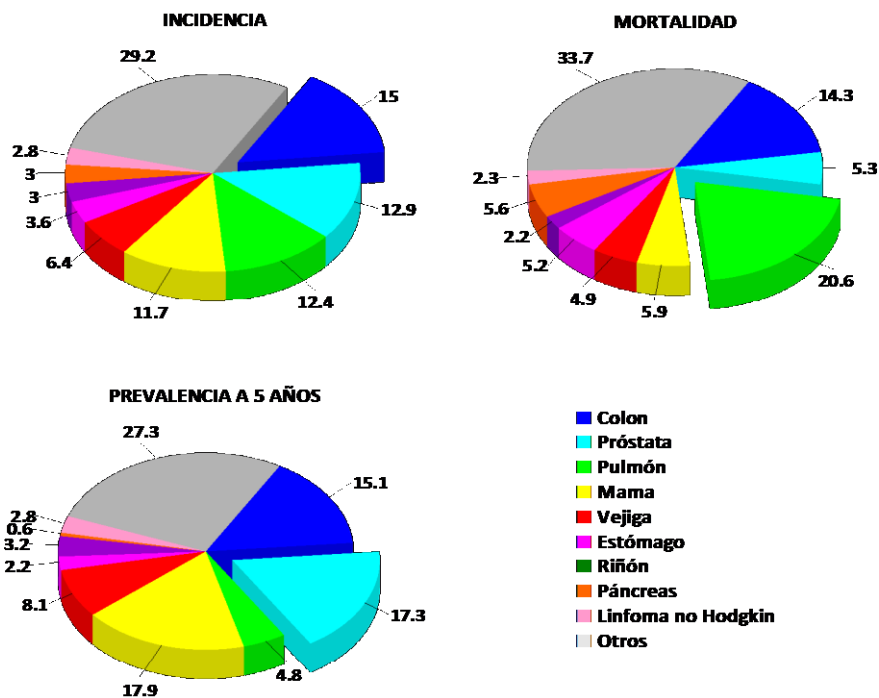


Figura I.1. Porcentajes de incidencia, mortalidad y prevalencia a 5 años en hombres y mujeres, para los principales tipos de cáncer, correspondientes a los datos registrados en España durante el año 2012.

Según los datos del mismo informe, a nivel mundial, el cáncer colorrectal es el tercer tipo más común de cáncer en los hombres (746000 casos, 10% del total) después del cáncer de próstata y el de pulmón, y el segundo en mujeres (614000 casos, 9,2% del total) tras el cáncer de mama. Casi el 55% de los casos se dan en los países más desarrollados, existiendo una amplia variación geográfica en cuanto a la incidencia, no solo entre diferentes países, sino también en áreas dentro de un mismo

país. En cuanto a la mortalidad, ésta es relativamente baja, registrándose 694000 muertes en 2012 (8,5% del total) con una mayor mortalidad (52%) en los países menos desarrollados, lo que refleja una menor supervivencia en estas regiones. Las mayores tasas de mortalidad para ambos sexos se registraron en Europa Central y Oriental (20 por cada 100000 hombres, 12 por cada 100000 mujeres) y la más baja en África Occidental (4 y 3 por cada 100000 hombres y mujeres, respectivamente).

1.1.1.1. Cáncer colorrectal y su tratamiento mediante quimioterapia

El cáncer de origen colorrectal (CRC, *ColoRectal Cancer*) es el tumor digestivo más frecuente. Se origina cuando las células normales de las paredes del colon o del recto cambian y crecen sin control, y forman una masa llamada tumor, el cual puede ser benigno (no canceroso) o maligno (canceroso). En la mayoría de los casos, el CRC comienza como un pólipo, es decir, un crecimiento no canceroso que puede desarrollarse en la pared interna del colon o del recto a medida que las personas envejecen. Si no se los trata o extirpa, los pólipos pueden evolucionar hasta transformarse en un tumor maligno.

Los tratamientos más frecuentes para el cáncer en general, y el CRC en particular, incluyen la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Estas terapias pueden utilizarse solas o en combinación.

La quimioterapia es una de las modalidades terapéuticas más empleada y su objetivo es destruir, mediante el empleo de fármacos, las células que componen el tumor con el fin de lograr la reducción o desaparición de la enfermedad. A los fármacos empleados en este tipo de tratamiento se les denomina antineoplásicos o quimioterápicos.

Como se ha comentado anteriormente, el cáncer se caracteriza por estar formado por células en las que se han alterado los mecanismos que regulan su división, siendo capaces de crecer descontroladamente e invadir y afectar órganos vecinos. Así, la mayoría de los fármacos que se emplean en el tratamiento quimioterápico están diseñados para poder destruir las células mientras éstas se dividen. Normalmente, cuanto más rápido se dividen más sensibles son al tratamiento.

En el tratamiento del CRC, la quimioterapia no está indicada en todos los casos, sino que su administración depende de determinados factores, tales como:

- Estadio tumoral: afectación o no de ganglios y/o de órganos próximos al tumor, así como aparición o no de metástasis.
- Estado general del paciente previo a la administración del tratamiento.

Generalmente, para el tratamiento quimioterápico del CRC se emplea la combinación de varios fármacos, principalmente el 5-fluorouracilo (5-FU), irinotecan (CPT-11) y leucovorin (LV) [2], entre otros. A continuación se detallan los esquemas de tratamientos más habituales que involucran el uso de estos fármacos.

Ensayos clínicos

Antes de adentrarnos en la descripción de los tratamientos más utilizados para tratar el cáncer de colon, definiremos cuales son las etapas empleadas en el desarrollo e implantación de medicamentos (ensayos clínicos), puesto que vamos a referirnos a ellas posteriormente.

Un ensayo clínico puede definirse como aquella investigación efectuada en seres humanos, con el fin de determinar o confirmar los efectos clínicos, farmacológicos y farmacodinámicos de un medicamento, además de estudiar su absorción, distribución, metabolismo y eliminación, para de determinar su inocuidad y/o su eficacia.

La utilización de un medicamento requiere que el beneficio de su empleo sea superior a los riesgos que pueda generar. Lo ideal sería emplear fármacos que aporten un beneficio al paciente, sin presentar ningún riesgo. Sin embargo, en la práctica, el uso de la mayor parte de los medicamentos utilizados en tratamientos quimioterápicos implica un cierto riesgo que se debe intentar reducir al mínimo. Para evaluar dichos riesgos y estudiar los factores comentados anteriormente, los estudios clínicos engloban cuatro fases:

- Fase I:

El objetivo de un estudio clínico de fase I es comprobar que un medicamento o tratamiento nuevo, que demostró ser seguro para su uso en animales, también puede administrarse de manera segura a los seres humanos. Así, en esta fase se prueba por primera vez el quimioterápico en personas. Generalmente, se estudian en individuos sanos para determinar a qué niveles de uso del medicamento se observa toxicidad, evaluar su seguridad y tener indicios iniciales de su efecto. Por lo general, los estudios clínicos de fase I duran desde varios meses hasta un año e incluyen a un grupo reducido de personas, habitualmente menos de 50. No obstante, en muchos casos, se les ofrece a personas cuyos cánceres no han respondido a un tratamiento anterior. La forma de operar es aumentar gradualmente la dosis del medicamento en estudio hasta encontrar aquella que da mejores resultados sin producir efectos secundarios graves. Otra información que busca obtenerse en estos estudios es la mejor forma de administrar el tratamiento nuevo, por ejemplo, por vía oral o intravenosa. Además, se recopilan datos sobre la absorción, el procesamiento y la distribución del medicamento en el cuerpo.

- Fase II:

Esta fase se basa en la realización de ensayos clínicos controlados, los cuales se llevan a cabo en un número limitado de pacientes estrechamente vigilados. Estos ensayos están diseñados para obtener información más detallada sobre la seguridad del tratamiento, así como para evaluar su eficacia para un cáncer determinado, lo que se puede medir por una disminución en el tamaño del tumor o a través de análisis de sangre. Los estudios clínicos de fase II suelen durar alrededor de dos años y, por lo general, incluyen entre 20 y 40 participantes.

- Fase III:

Los ensayos de fase III se realizan después de establecerse una probabilidad razonable de eficacia del medicamento, y tienen como objetivo obtener información adicional para aplicaciones específicas, así como conocer de forma más precisa los efectos adversos asociados al mismo y establecer la manera exacta en que debe usarse el medicamento. En esta fase se recopilan datos de un número elevado de

pacientes para determinar si el tratamiento nuevo es más efectivo y causa menos efectos secundarios que el tratamiento estándar actual. Generalmente, los estudios clínicos de fase III son aleatorizados, es decir, los pacientes reciben el tratamiento en investigación o el tratamiento estándar de forma aleatoria. A pesar de que se centran en pacientes con una enfermedad determinada, en general se incluyen pacientes de diversas edades y etnias, y de ambos sexos de modo que una vez obtenidos los resultados, éstos puedan aplicarse a una gran cantidad de personas. El número de participantes en un estudio clínico de fase III puede oscilar entre cientos y miles, y estos estudios pueden tardar varios años en completarse.

Una vez que se demuestra el éxito de un medicamento en un estudio clínico de fase III, los investigadores pueden presentar una solicitud de autorización en la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA, *Food and Drug Administration*) para su comercialización. Si los datos obtenidos de los estudios clínicos cumplen con las normas de este organismo, se aprueba el tratamiento para un uso determinado.

- Fase IV:

Los ensayos de la fase IV se realizan después de que el organismo de registro de medicamentos haya aprobado un fármaco para su distribución o comercialización. Estos ensayos pueden incluir investigaciones destinadas a explorar un efecto farmacológico específico, a establecer la frecuencia de reacciones adversas o a determinar los efectos de la administración de un determinado fármaco a largo plazo. También están diseñados para evaluar los efectos de un medicamento en una población que no se había estudiado adecuadamente en las fases de precomercialización (como los niños o los ancianos) o para establecer una nueva indicación clínica del mismo. Este tipo de investigación debe distinguirse de la que se realiza con fines de comercialización.

Fármacos quimioterápicos empleados en el tratamiento del cáncer colorrectal

A continuación se describen los principales antineoplásicos empleados en el tratamiento del CRC, algunos de los cuales han sido estudiados en esta Memoria.

➤ Irinotecan

El 7-etil-10-[4-(1-piperidin)-1-piperidin]carboniloxicamptotecina, comúnmente conocido como irinotecan o CPT-11, se utiliza en la práctica clínica para el tratamiento de los tumores de colon. Este antineoplásico es un derivado del alcaloide camptotecina (CPT), la cual fue aislada y caracterizada en 1966 por Wall y col. a partir de la planta *Camptotheca Acuminata* [3]. La estructura de este alcaloide está formada por cinco anillos: un sistema quinolinico (anillos A y B), un anillo de piridona (D) y uno terminal α -hidroxilactona (E) (Figura I.2). Además, tiene un centro quiral en el carbono-20 dentro del anillo lactona. Este anillo es lábil y se hidroliza fácilmente a la forma carboxilato en medio básico [3].

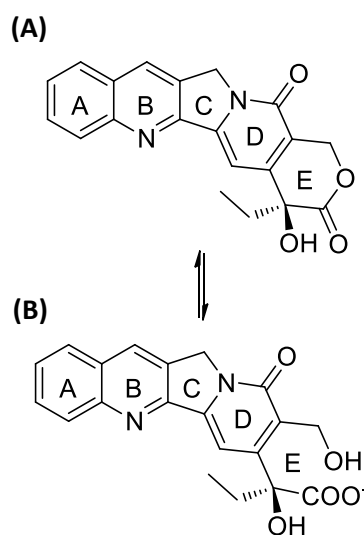


Figura I.2. Estructura de la camptotecina. **(A)** Forma lactona en medio ácido; **(B)** Forma carboxilato en medio básico.

Tras su caracterización química, las investigaciones posteriores pusieron de manifiesto que la CPT era activa “in vitro” frente a ciertos tipos de leucemias [4] y carcinosarcomas [3,5,6], así como que inhibía la síntesis de ADN y ARN en células mamarias. Este hecho atrajo rápidamente el interés sobre este compuesto como un potencial agente quimioterápico. Posteriormente se confirmó que poseía un elevado poder antitumoral contra un amplio espectro de tumores [7]. Debido a su escasa

solubilidad en agua, se evaluó clínicamente su sal sódica, pero se encontró que era diez veces menos potente [8-10].

A finales de la década de los 60, varios investigadores, de forma independiente, iniciaron estudios sobre la capacidad antitumoral de la CPT en ensayos clínicos de fase I y II, los cuales fueron publicados a principios de la década de los 70 [8-11]. En ellos se observó que el fármaco presentaba actividad en pacientes con cáncer gastrointestinal, en la mayoría de los cuales se encontró una dependencia severa entre la dosis administrada y la toxicidad, cuyos principales síntomas eran vómitos, diarrea, enterocolitis hemorrágica, leucopenia y trombocitopenia [12]. Como resultado, y a pesar del aparente éxito en el tratamiento de los tumores gastrointestinales, el interés por la CPT disminuyó. Los resultados de los ensayos preclínicos y clínicos de la CPT y análogos han sido recogidos en varios trabajos de revisión [13-15].

Sin embargo, la posterior elucidación de su mecanismo de acción, la inhibición de la topoisomerasa I, una enzima nuclear que relaja el superenrollamiento del ADN [16,17], renovó de nuevo el interés por este quimioterápico y, como consecuencia, se sintetizaron y probaron clínicamente numerosos derivados, los cuales han sido empleados en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Los más destacados son el topotecan, el 9-aminocamptotecina y el CPT-11, siendo este último el más ampliamente empleado en el tratamiento del cáncer de colon, para el cual recibió la aprobación como tratamiento de primera línea en el año 2000 [18].

La estructura del derivado CPT-11, así como de su principal metabolito activo, el 7-etil-10-hidroxicamptotecina (SN-38), se muestran en la Figura 1.3. Al igual que la camptotecina, ambos se pueden presentar en dos formas (lactona y carboxilato), dependientes del pH [19], que influyen significativamente en el perfil cinético del compuesto. El equilibrio entre la forma lactona y carboxilato ocurre rápidamente (con una vida media de 9,5 minutos [20]), por el contrario, en el caso del metabolito SN-38, éste predomina en la forma activa lactona [20,21].

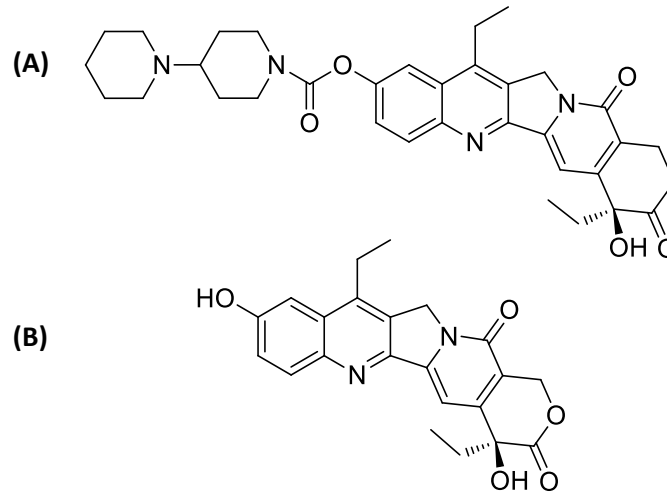


Figura I.3. Estructuras del (A) irinotecan (CPT-11) y (B) su principal metabolito, SN-38.

➤ 5-Fluorouracilo

El 5-FU es una fluoropirimidina ampliamente empleada en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, principalmente el cáncer de mama [22] y el cáncer del tracto aerodigestivo [23,24], sin embargo, es en el tratamiento del CRC donde su uso ha sido mayor [24]. Durante los últimos 40 años, el 5-FU, cuya estructura se muestra en la Figura I.4, ha sido prácticamente la única opción quimioterapéutica eficaz en pacientes con cáncer avanzado de colon y recto, y todavía es considerado el fármaco fundamental, aunque en la práctica sólo produce respuestas completas en el 10% de los pacientes, con una media de supervivencia de 9 a 12 meses y sólo un 5% de los pacientes vivos a los 3 años [25].

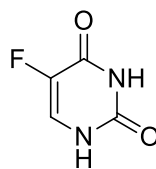


Figura I.4. Estructura del 5-FU.

El mecanismo de acción de este fármaco tiene lugar principalmente por dos vías que se resumen a continuación. Por un lado, es un antimetabolito del uracilo, el cual forma parte de la estructura del material genético. La enzima dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD), responsable de la metabolización de más del 80% del 5-FU administrado en el tratamiento del CRC [26], cataliza la conversión intracelular del 5-FU a su metabolito 5-fluorouridina-5'-trifosfato (5-FUTP), precursor del 5-fluoro-2'-desoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP), que es el metabolito activo y el cual actúa como inhibidor de la enzima timidilato sintasa (TS) uniéndose a ella. Esta unión inhibe la formación de timidina a partir del uracilo, la cual es necesaria para la síntesis de ADN [27], lo que conlleva como resultado la muerte celular. Por otra parte, el metabolito 5-FUTP es extensamente incorporado a las cadenas crecientes de ARN, y el FdUMP a las cadenas de ADN, interrumpiendo el proceso normal de replicación del material genético [23]. Esta privación de ADN y ARN afecta más a las células que crecen y se multiplican sin control que a las normales, lo que permite el control del CRC.

A pesar de su extenso empleo en el tratamiento del CRC, la tasa de respuesta global del 5-FU en la curación de esta enfermedad es bastante limitada (aproximadamente un 10-15%) [28]. Sin embargo, sigue siendo el principal agente quimioterápico empleado, debido al desarrollo de varias estrategias durante las últimas décadas encaminadas a incrementar su poder antitumoral. Una de estas estrategias consiste en modificar su vía de administración a los pacientes, ya que la infusión continua de este fármaco demostró lograr una mayor tasa de supervivencia y una menor toxicidad que si se administraba en forma de bolo [29]. Por otra parte, la combinación de 5-FU y otros fármacos como el LV, tegafur o ftorafur (TF), CPT-11 u oxaliplatino, entre otros, ha permitido diseñar nuevas estrategias de tratamiento que proporcionan tasas de supervivencias cada vez mejores [2,30].

➤ Oxaliplatino:

Este medicamento basado en el platino, cuya estructura se muestra en la Figura I.5, es un agente quimioterápico efectivo contra tumores digestivos avanzados o metastásicos, principalmente el cáncer colorrectal avanzado [31].

Su mecanismo de acción se basa en una biotransformación hacia un derivado hidratado que tiene capacidad de interactuar con el ADN formando puentes intra e intercatenarios que impiden su replicación, lo cual resulta en una actividad citotóxica y antitumoral [32].

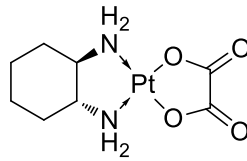


Figura I.5. Estructura del oxaliplatino.

Una de las principales desventajas del empleo de este agente antineoplásico es el importante efecto secundario que presenta, ya que causa neuropatía periférica aguda y transitoria en casi todos los pacientes tratados. La identificación temprana de la neurotoxicidad y las alteraciones en la dosis del medicamento administrado pueden prevenir el desarrollo de los síntomas crónicos, por lo que la modificación del esquema del tratamiento con oxaliplatino en los pacientes con CRC es una práctica bien establecida. Lamentablemente, dicha modificación llega a menudo demasiado tarde para evitar la toxicidad a largo plazo y el paciente termina desarrollando neuropatía crónica, la cual produce una disfunción sensorial con parestesias distales, que a menudo progresa a la ataxia sensorial y al deterioro funcional. Estos síntomas se correlacionan con la dosis acumulativa de oxaliplatino y, una vez que aparecen, pueden persistir toda la vida [33,34]. Los mecanismos responsables del desarrollo de esta neuropatía no están claros a día de hoy [33].

Líneas de tratamiento para el cáncer de colon metastático

Aproximadamente, la mitad de los pacientes diagnosticados con cáncer de colon desarrollan metástasis [30]. La mayoría de ellos no superan los dos años de vida desde la aparición de la enfermedad, ya que los tratamientos quimioterápicos no son curativos, sino que su principal objetivo es incrementar el tiempo de vida de los pacientes, así como mejorar su calidad de vida.

Como se comentó anteriormente, el 5-FU ha sido el fármaco antineoplásico más utilizado para el tratamiento del cáncer de colon durante más de 40 años, presentando una velocidad de respuesta media del 11% [35] y una supervivencia media del paciente de aproximadamente un año. A pesar de que se logró mejorar los resultados del tratamiento mediante su administración en forma de infusión continua, la vida media de supervivencia de los pacientes tratados de esta forma no superó el año en la mayoría de los estudios realizados [29], por lo que comenzó a combinarse con otros agentes quimioterápicos con el objetivo de mejorar la velocidad de respuesta al tratamiento y alargar la vida media de los pacientes.

Al combinar el 5-FU con el LV se mejoró la velocidad de respuesta prácticamente al doble (23% frente al 11%), debido a que ayuda a estabilizar la unión del complejo formado entre el FdUMP y la enzima TS, que es la base del mecanismo de acción del 5-FU. Sin embargo, la adición de LV no logra un aumento significativo del tiempo de supervivencia del paciente.

Otra estrategia empleada con el fin de incrementar la actividad del 5-FU es el uso de profármacos (capecitabina [36], TF [37], etc), que sufren una conversión a este metabolito después de la absorción gastrointestinal, y generan unos niveles plasmáticos de 5-FU similares a los que se consiguen mediante el tratamiento con 5-FU/LV intravenoso [38]. La capecitabina es un carbamato de fluoropirimidina que se administra por vía oral, y es fácilmente absorbida por la mucosa intestinal manteniéndose intacta. Por otra parte, el TF es un profármaco que sufre la absorción oral seguida por hidroxilación *in vivo* y la conversión a 5-FU. Normalmente se administra como una combinación de uracilo y TF en una relación molar 4:1 (UFT), ya que el uracilo compite con el 5-FU como sustrato de la enzima DPD, que es su principal enzima catabólica y evita su degradación [38].

Las combinaciones de 5-FU/LV con oxaliplatino o CPT-11 son, en la actualidad, los tratamientos disponibles más activos contra el CRC, ya que los dos últimos fármacos han demostrado poseer una sinergia importante en la actividad del 5-FU, ralentizando el avance de la enfermedad [39]. Así, los resultados de numerosos estudios indican que si al tratamiento con 5-FU y LV se añade oxaliplatino (FOLFOX) o irinotecan (FOLFIRI), mejora el tiempo hasta la progresión de la enfermedad y la supervivencia global en el cáncer metastásico. En la Tabla I.1 se muestran algunos de los principales tratamientos de primera línea empleados actualmente para el

tratamiento del CRC, donde se observa que la mayoría de ellos conllevan la administración conjunta de CPT-11, 5-FU y LV.

Tabla I.1. Tratamientos de primera línea para el cáncer de colón metastático.

Nombre	Régimen	Ref.
Régimen de Saltz	CPT-11: 125 mg m ⁻² IV durante 90 min, días 1, 8, 15, 22 LV: 20 mg m ⁻² bolo IV, días 1, 8, 15, 22 5-FU: 500 mg m ⁻² bolo IV, días 1, 8, 15, 22 <i>Repetir cada 6 semanas</i>	[40]
Régimen de Douillard	CPT-11: 180 mg m ⁻² durante 2 h, día 1 LV: 200 mg m ⁻² IV durante 2 h, días 1 y 2. 5-FU: 400 mg m ⁻² bolo IV, y después 600 mg m ⁻² en forma de infusión continua durante 22 h <i>Repetir cada 2 semanas</i>	[41]
FOLFIRI	CPT-11: 180 mg m ⁻² durante 90 min, día 1. LV: 200 mg m ⁻² IV durante 2 horas 5-FU: 400 mg m ⁻² bolo IV, y después 2400-3000 mg m ⁻² en forma de infusión continua durante 46 h, días 1 y 2 <i>Repetir cada 2 semanas</i>	[42,43]
-	CPT-11: 250 mg m ⁻² IV durante 60 min, día 1 LV: 90 mg día ⁻¹ en forma oral, días 1-14 UFT: 250 mg m ⁻² en forma oral, días 1-14 <i>Repetir cada 3 semanas</i>	[44]
-	CPT-11: 150 mg m ⁻² IV, días 1-15 LV: 75 mg día ⁻¹ en forma oral, días 1-21 UFT: 300 mg m ⁻² en forma oral, días 1-21 <i>Repetir cada 4 semanas</i>	[45]
Capiri	Capecitabine: 1000 mg m ⁻² en forma oral, días 1-14 CPT-11: 100 mg m ⁻² , días 1 y 8 <i>Repetir cada 22 días</i>	[46]
FOLFOX4	OXAL: 85 mg m ⁻² IV durante 2 h, día 1 LV: 200 mg m ⁻² IV durante 2 h, días 1 y 2 5-FU: 400 mg m ⁻² bolo IV, y después 600 mg m ⁻² en forma de infusión continua durante 22 h <i>Repetir cada 2 semanas</i>	[47,48]
FOLFOX6	OXAL: 100 mg m ⁻² IV durante 2 h, día 1 LV: 200 mg m ⁻² IV durante 2 h, día 1 5-FU: 400 mg m ⁻² bolo IV, y después 2400-3000 mg m ⁻² en forma de infusión continua durante 46 h <i>Repetir cada 2 semanas</i>	[43,49]

I.1.2. Antecedentes bibliográficos para la determinación de los agentes quimioterápicos empleados en el tratamiento del CRC

Es importante el desarrollo de metodologías analíticas que permitan la cuantificación de estos agentes quimioterápicos en fluidos biológicos como plasma u orina para, entre otros objetivos, estudiar su farmacocinética, es decir, conocer los procesos a los que el fármaco es sometido a través de su paso por el organismo y tratar de dilucidar su metabolismo y sus vías de excreción, desde el momento en el que es administrado hasta su total eliminación.

Una revisión exhaustiva de los datos bibliográficos publicados sobre la determinación de los agentes quimioterápicos empleados en el tratamiento del CRC nos lleva a concluir que la mayoría de los métodos propuestos para su análisis utilizan la cromatografía líquida, siendo el plasma o el suero sanguíneo las muestras analizadas mayoritariamente.

En cuanto al CPT-11 y SN-38, salvo un ensayo inmunológico (ELISA) [50], varios estudios sobre sus propiedades fluorescentes realizados por nuestro grupo de investigación [51-53], y un método establecido utilizando electroforesis capilar en la modalidad de cromatografía electrocinética micelar (MEKC, *Micellar electrokinetic chromatography*) [54], la mayoría de los métodos analíticos propuestos para su determinación utilizan cromatografía líquida con detección fluorescente (LC-FD, *Liquid Chromatography-Fluorescence Dectector*) [55-60] o espectrometría de masas (MS, *Mass Spectrometry*) [61-67].

Otra excepción es el método desarrollado por Aucelio y col., donde se analizan CPT y CPT-11 en fármacos mediante medidas fosforescentes [68]. Para ello, se induce la fosforescencia del CPT-11 utilizando $Pb(NO_3)_2$ en sustrato de celulosa tratado con el surfactante docedil sulfato sódico (SDS, *Sodium Dodecyl Sulfate*) mientras que la CPT es cuantificada usando $TiNO_3$ como un potenciador de la fosforescencia en sustratos de celulosa o de nylon. Además, emplean la segunda derivada de los espectros de excitación para conseguir selectividad en la medida de la CPT en aquellas muestras de fármacos que contienen topotecan.

Existen varias revisiones donde se recogen métodos de análisis desarrollados para determinar la CPT y sus derivados [69-71], siendo el más reciente el publicado

por Mullangi y col. en 2010 [69], donde se resumen las principales metodologías de análisis para el CPT-11 y el SN-38.

Respecto al resto de fármacos antineoplásicos en los que nos hemos centrado en esta Memoria, en la revisión bibliográfica realizada se ha encontrado un menor número de publicaciones sobre el desarrollo de metodología analítica. Aun así, la cromatografía con detección fluorescente o con espectrometría de masas de tipo triple cuadrupolo (MS/MS, *tandem mass spectrometry* o QqQ, *triple quadrupole*) vuelve a ser la técnica predominante para su determinación.

Así, en el caso del 5-FU se han propuesto varios métodos para su cuantificación en ausencia o presencia de su profármaco TF en matrices biológicas, incluyendo la cromatografía líquida de alta eficacia con detección ultravioleta (HPLC-UV, *High Performance Liquid Chromatography-UltraViolet detection*) [72-74], HPLC con detección fluorescente previa derivatización [75], cromatografía de gases acoplada a espectrometría de MS (GC-MS, *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) [76,77], HPLC-MS/MS con derivatización [78] o sin ella [79-82], siendo ésta la técnica más aplicada en la determinación de 5-FU y TF en la última década. Un ejemplo es el método propuesto por Peer y col. [79], en el que se combinaban dos sistemas de detección (MS/MS y UV), con el objetivo de analizar simultáneamente bajos niveles de 5-FU y relativamente altos niveles de TF en plasma de pacientes tratados con UFT/LV en ensayos de fase I, con aplicación a estudios farmacocinéticos. Como sistema de pretratamiento de la muestra se empleó la extracción líquido-líquido (LLE, *Liquid-Liquid Extraction*), empleando una mezcla de acetato de etilo/isopropanol (85:15, v/v) como extractante, tras la precipitación de proteínas con tampón fosfato. Empleando esta metodología, los autores obtuvieron recuperaciones comprendidas entre el 97-110% y 86-91% para el TF y el 5-FU, respectivamente.

Por otra parte, en el artículo publicado por Liu y col. [81], los dos compuestos se analizan conjuntamente en plasma empleando como sistema de detección la espectrometría de masas. La muestra se trata con metanol para precipitar las proteínas, se centrifuga y se recoge el sobrenadante, el cual se evapora a sequedad y se reconstituye en fase móvil para, posteriormente, inyectarlo en el sistema HPLC-MS/MS.

Aunque en menor medida, también se han desarrollado metodologías para el análisis de estos analitos en fármacos, como por ejemplo el método propuesto por Yang y col. [83], donde se emplea la electroforesis capilar para el análisis de 5-FU y TF, realizando una preconcentración *on-line* o *stacking* (CE-LVSE, *Capillary Electrophoresis with Large-Volume Sample Stacking*), y obteniendo LOD de 600,5 y 771,4 ng mL⁻¹, respectivamente.

En la bibliografía pueden encontrarse una gran cantidad de referencias para el análisis de LV en presencia de ácido fólico y sus metabolitos, sin embargo, son pocos los trabajos en los que se analiza de forma conjunta o en presencia de otros antineoplásicos. Un ejemplo es el artículo publicado por Vandenbosch y col. en 1993 [84], en el cual se exponen dos métodos para la determinación independiente de LV y 5-FU en plasma mediante HPLC-UV. Por una parte, el LV se extrae del plasma mediante extracción en fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*) y se introduce en el sistema cromatográfico donde es analizado empleando una columna C18. Posteriormente, la parte de la fase móvil que contiene el LV pasa a una columna empaquetada con una fase estacionaria quiral a la que está acoplada mediante una válvula con un bucle de 250 µL, donde los enantiómeros (6R)- y (6S)-LV se separan. Por otra parte, el 5-FU fue extraído de las muestras de plasma mediante LLE, y se utilizó nicotinamida como patrón interno para su análisis, el cual se realizó empleando una columna C18. La medida de la señal se llevó a cabo a 290 nm, para el LV, y a 265 nm para el 5-FU.

Un método más reciente es el propuesto por nuestro grupo de investigación para el análisis simultáneo de LV y CPT-11, mediante el uso de señales fluorescentes [52]. Debido al solapamiento de las señales y a la complejidad de la muestra biológica a la cual se aplicó el método (orina), se hizo necesario el empleo de algoritmos quimiométricos de segundo orden, concretamente PARAFAC, BLS y N-PLS. Para la determinación de ambos analitos se hizo uso de las matrices de excitación-emisión, teniendo en cuenta que el CPT-11 presenta fluorescencia nativa mientras que LV necesita irradiación ultravioleta en presencia de trazas de peróxido de hidrógeno para desarrollar la fluorescencia. Comparando el error residual de predicción proporcionado por los tres algoritmos, se concluyó que todos los métodos daban resultados similares para la determinación de CPT-11, mientras que en el caso de la determinación de LV, los mejores resultados los proporcionaba PARAFAC.

I.1.3. Descripción de las técnicas analíticas empleadas en esta parte de la Memoria

Como se ha señalado en el apartado anterior, los métodos analíticos habitualmente desarrollados para el análisis de los quimioterápicos en estudio, salvo algunas excepciones, involucran técnicas cromatográficas. Sin embargo, en la presente Memoria se aborda su análisis mediante el empleo de algoritmos de calibración multivariante de primer y segundo orden, así como utilizando la electroforesis capilar como técnica separativa, con el objetivo de proponer nuevos métodos de análisis alternativos a los ya publicados en la bibliografía, aportando nuevas herramientas analíticas para la determinación de estos compuestos.

I.1.3.1. Calibración multivariante

Se denominan señales univariantes a aquellas señales analíticas que se obtienen 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.

Por otra parte, reciben el nombre de señales multivariantes aquellas que se miden en función de dos o más variables controladas. Así, podemos tener distintos tipos de datos analíticos, los cuales se resumen en la Tabla I.2.

La idea central de todas las metodologías de calibración multivariante es compensar la falta de selectividad en las señales analizadas mediante eficientes 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.

Tabla 1.2. Clasificación de los tipos de datos analíticos y de las calibraciones a las que dan lugar.

Datos	Conjunto de calibración	Tipo de calibración
Un único dato (escalar)	Un vector	Univariante o de orden cero
Un vector de datos	Una matriz	Multivariante de primer orden
Una matriz de datos	Un cubo	Multivariante de segundo orden
Un cubo de datos	Un hipercubo	Multivariante de tercer orden
Un hipercubo de orden n	Un hipercubo de orden n+1	Multivariante de orden n

Una de las principales ventajas de la calibración multivariante es la minimización en la manipulación de las muestras. Los métodos univariantes requieren, en la mayoría de los casos, complejos procesos previos a la adquisición de la señal que, generalmente, conllevan etapas de separación, con el consiguiente consumo de tiempo, posible contaminación de las muestras y, en muchos casos, pérdida de sensibilidad, posibilitando en la mayoría de los casos la determinación cuantitativa de un único componente en una muestra compleja. Sin embargo, la utilización de estos métodos permite el análisis de más de un componente de interés en sistemas complejos reales, de forma más directa, siendo una alternativa al empleo de técnicas separativas que requieren de un instrumental sofisticado y costoso. Esto es viable ya que los algoritmos permiten obtener información cuantitativa selectiva a partir de datos poco selectivos, logrando reducir al mínimo el tratamiento previo de la muestra, lo que, a su vez, desemboca en tiempos de análisis más cortos, ambos aspectos de gran importancia en los análisis de rutina o de control sobre gran cantidad de muestras análogas.

A continuación, se describen brevemente los fundamentos teóricos de los algoritmos de calibración multivariante que se han utilizado en esta parte de la Memoria. Todos ellos 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, optimización del modelo de cálculo mediante el uso de las variables apropiadas que afectan al sistema y posterior predicción de las muestras problema de concentración desconocida.

Calibración multivariante de primer orden

El algoritmo de calibración multivariante de orden uno utilizado en esta Memoria, para la resolución de una mezcla relativamente sencilla, fue el de mínimos cuadrados parciales [85,86] (PLS, *Partial Least Squares*), el cual se basa en el análisis mediante componentes principales (PCA, *Principal Component Analysis*).

PLS es una metodología matemática usada para establecer un modelo que relacione la información de dos conjuntos de datos diferentes (pero ligados de forma desconocida):

- Conjunto de las respuestas instrumentales correspondientes a n diferentes canales de medida o longitudes de onda sobre las l disoluciones patrón, que se reúnen dando lugar a la matriz de datos X , de dimensiones $l \times n$, en donde cada fila corresponde al espectro de cada una de las disoluciones patrón.
- Conjunto formado por las concentraciones conocidas de los m componentes en las l disoluciones patrón, agrupadas en una matriz Y , de dimensiones $l \times m$, en la que las filas son las concentraciones de los diferentes componentes en el conjunto de calibración.

En la etapa de calibración se pretende llegar a conocer la relación entre X e Y , para poder aplicarla al análisis de muestras desconocidas en la etapa de predicción. Esto se consigue desarrollando un modelo de regresión sobre “variables observadas directamente”. Cada una de estas nuevas variables (llamadas “variables latentes” o “factores”) se calcula como combinación lineal de las variables originales bajo la condición de que estén correlacionadas con la variable (o variables) a predecir, que en nuestro caso es la concentración de analito o analitos a determinar. Esto se logra gracias a que los algoritmos empleados relacionan iterativamente la información relevante en la matriz X con la de la matriz Y , siempre y cuando el modelo mejore su capacidad predictiva.

En el caso más simple de una mezcla de dos componentes sólo habría, idealmente, dos variables independientes, por lo que el espectro de la mezcla podría ser reconstruido sumando los espectros de los componentes puros. Sin embargo, realmente esto no ocurre, ya que generalmente se producen variaciones

instrumentales y errores inherentes al muestreo, así como posibles cambios en la línea base y ruido en el detector. Además, hay que considerar que las posibles interacciones entre los dos componentes puros pueden producir productos intermedios o, simplemente, cambios en la fisonomía del espectro de algún componente respecto a su estado puro. Sin embargo, habrá un número finito de “espectros” matemáticos, que varían de manera independiente, que pueden ser sumados para reconstruir nuestros datos (espectros experimentales). Si estos “espectros” son calculados de algún modo, podrían usarse para reconstruir los espectros “desconocidos”, correspondientes a muestras problemas, multiplicando cada “espectro” por un factor de escala y sumando los resultados, de manera que el nuevo espectro se aproxime notablemente al espectro del problema.

Estas fracciones son conocidas como *scores* o contribución espectral y los “espectros” son conocidos como *loadings*, vectores *loading* o *factores*. Este proceso reduce mucho la complejidad de los datos ya que, a partir de un pequeño número de vectores *loading* y de *scores*, se puede reconstruir un problema dado.

La característica más importante de PLS es que la descomposición se realiza de tal forma que los *scores* presentan máxima covarianza con la variable dependiente (señal analítica).

El método de mínimos cuadrados parciales se ha convertido en una herramienta usual de calibración de primer orden, debido a la calidad de los modelos de calibración que se obtienen con él, así como por la disponibilidad de programas informáticos comerciales que permiten utilizarlo de una manera fácil. Sin embargo, todos los métodos de primer orden, incluyendo PLS, son sensibles a la presencia de interferencias no modeladas en la etapa de calibración, lo cual puede conducir a errores en las predicciones. Esta es la situación que se presenta usualmente cuando analizamos muestras naturales de composición compleja, como es el caso de las muestras biológicas.

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, es la utilización de datos con una estructura dimensional mayor (datos de tres vías [87,88]), 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.

La capacidad para modelar interferencias de la muestra que no están incluidas en la calibración se denomina “ventaja de segundo orden” [89], la cual es aprovechada por los distintos métodos de calibración multivariante de dos maneras distintas, representadas esquemáticamente en la Figura I.6.

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 I.6A), 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 I.6B). Ambas maneras implican la participación de la muestra problema en parte del proceso de calibración.

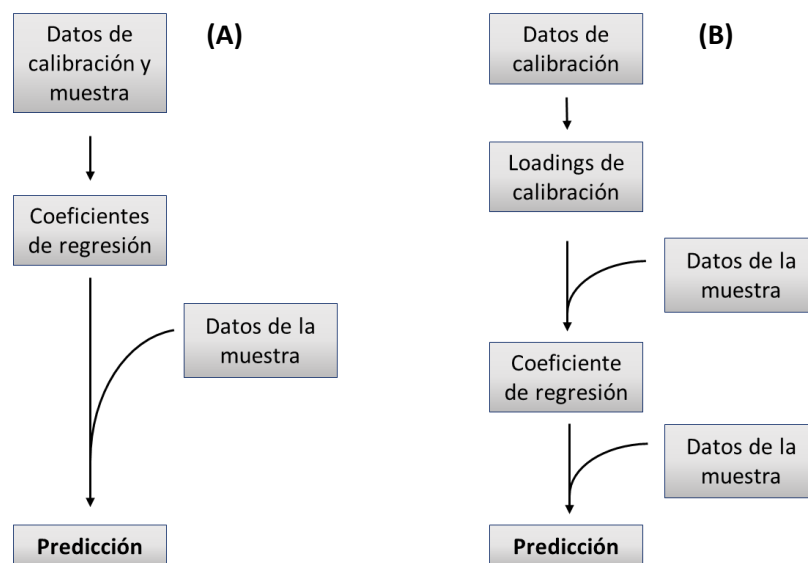


Figura I.6. Dos maneras básicas de obtener la ventaja de segundo orden: **(A)** combinando los datos de calibración con los de la muestra antes de calcular los coeficientes de regresión; **(B)** estimando los loadings a partir de los datos de calibración, y luego calculando los coeficientes de regresión, una vez que la muestra ha sido incorporada.

En esta Memoria se han empleado varios algoritmos de tres vías para la determinación multicomponente en muestras complejas: análisis factorial paralelo (PARAFAC, *PARAllel FACTor analysis*) [87], mínimos cuadrado parciales multidimensionales (N-PLS, *Multiway-Partial Least Squares*) [90] y mínimos cuadrado parciales concatenados (U-PLS, *Unfolded-Partial Least Squares*) [91]. Sin embargo, tanto N-PLS como U-PLS carecen de la ventaja de segundo orden y, por tanto, deben acoplarse a un proceso denominado “bilinealización residual” (RBL, *Residual BiLinearization*) [92] que les proporciona esta ventaja para datos de segundo orden [93].

Para conseguir dicha ventaja, el algoritmo PARAFAC sigue el procedimiento esquematizado en la Figura I.6A, mientras que en los métodos, N-PLS/RBL o U-PLS/RBL se sigue el representado en la Figura I.6B.

Estos algoritmos se describen de forma simplificada a continuación:

➤ PARAFAC

Es un método de descomposición que puede ser comparado con el modelo bilineal PCA. Fue propuesto de forma independiente en 1970 por Harshman [94] y por Carroll y Chang [95], quienes renombraron a este modelo como CANDECOMP (*CANonical DECOMPosition*).

Para el caso del análisis de datos de segundo orden, su descomposición se hace en triadas o componentes trilineales. En lugar de un vector *loading* y un *score*, como en PCA, cada componente consiste en un vector *score* y dos vectores *loading*. Esto obliga a que la estructura de los datos procesados por el modelo sea obligatoria y estrictamente trilineal, siendo esta quizás la desventaja más importante que presenta, y la que más limita su utilización. Esta descomposición, que se realiza usando el procedimiento de mínimos cuadrados alternantes (ALS, *Alternating Least-Squares*) [87], origina una solución única, proporcionando los perfiles en ambas dimensiones para todos los componentes de la muestra, así como los scores o concentraciones relativas (unicidad). Los *loadings* y *scores* se extraen directamente de los datos de tres vías, independientemente de si existen componentes sin calibrar en las nuevas muestras, lo que constituye la base de la importante ventaja de segundo orden.

Para la aplicación del modelo PARAFAC en calibración multivariante hay que tener en cuenta una serie de etapas que son: 1) establecimiento del número de componentes que provocan respuesta, 2) identificación específica de los componentes a partir de la información que provee el modelo y 3) calibración de dicho modelo para obtener las concentraciones absolutas para un componente determinado, en una muestra desconocida.

➤ U-PLS

Una alternativa para trabajar con datos de segundo orden es reorganizarlos en vectores y aplicar algoritmos de primer orden. Así, en el tratamiento de datos de segundo orden, aparece el concepto de *unfolding*.

El término *unfolding*, puede ser traducido como desdoblamiento o simplemente reorganización. Así, este método consiste en organizar un conjunto de datos multivariantes en una matriz. Se trata de ir concatenando matrices de diferentes niveles, como se muestra en la Figura I.7.

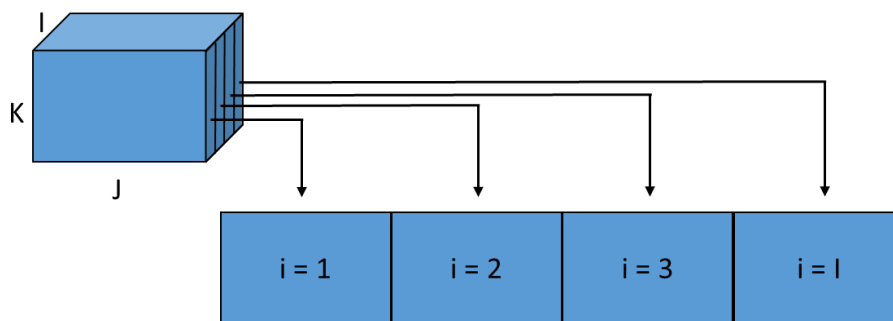


Figura I.7. Representación gráfica del concepto de *unfolding*.

Este proceso 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 multivariable de los datos, y se tratan como un conjunto de datos de dos vías.

Cuando se emplean datos de tres vías con el método U-PLS, la matriz de datos original es transformada en vectores (una dimensión). Ello se consigue desdoblado (*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 [91].

➤ N-PLS

Anteriormente se ha indicado el fundamento del algoritmo basado en mínimos cuadrados parciales (PLS) para señales de primer orden, pero dicha función puede ser extendida a señales de mayor orden.

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, consecuentemente, 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, suero u orina de 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 realmente nunca 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 [90]. 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.

Respecto a los modelos *unfolding*, los modelos multilineales son mucho más simples porque emplean menos parámetros y son más fáciles de interpretar.

Puesto que tanto U-PLS como N-PLS carecen de la ventaja de segundo orden, 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 [92,93].

Metodología de trabajo en calibración multivariante

Cuando se realiza la calibración se debe especificar el número de componentes que se deseen predecir, así como la concentración de cada uno de ellos en los patrones. También se debe seleccionar la zona de señales que se va a usar en el análisis. Una vez creado el modelo (o matriz) de calibración, se pueden resolver muestras de concentración desconocida. No es necesario especificar el contenido ni la naturaleza de aquellas sustancias que, acompañando a los componentes en estudio, pudieran estar presentes como potenciales interferencias, aunque su influencia sobre las correspondientes señales analíticas quedará implícitamente recogida en el modelo de cálculo, siendo posible, por tanto, la modulación de las mismas si se encontraran presentes en las muestras reales a analizar.

A continuación, se describen los aspectos más importantes en el modo operacional, comunes a todos los algoritmos de calibración multivariante descritos anteriormente.

- Optimización del número de factores

El número de factores (componentes o *loadings*) que debemos emplear para optimizar un modelo, debe ser aquel que garantice la adecuada resolución del problema con la menor complejidad matemática (menor tiempo de cálculo) posible. Si se emplea un número de factores inferior al óptimo se obtendría un empobrecimiento de las predicciones y, si por otra parte, se incluyen demasiados, se podría estar modelando el denominado ruido del sistema, lo que conllevaría a un sobreajuste y a la consiguiente pérdida de exactitud en los resultados.

En el caso de los algoritmos basados en mínimos cuadrados parciales (PLS, N-PLS y U-PLS), el número óptimo de factores se puede establecer empleando diversos criterios estadísticos, pero el más usado de ellos es el cálculo del parámetro *PRESS* (*Prediction Residual Error Sum of Squares*). Éste puede expresarse de la siguiente manera:

$$PRESS = \sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^m (\hat{C} - C_i)^2 \quad (\text{Ecuación 1.2})$$

siendo n el número total de muestras empleadas en la calibración, m el número total de componentes en la mezcla, \hat{C} la concentración del analito calculada por el modelo a partir de los patrones de calibración y C_i la concentración de referencia.

El valor de *PRESS* nos da una medida de lo bien que una matriz de cálculo (calibración) está determinando la concentración, para cada número de factores tenidos en cuenta. En principio, el número de factores óptimo debería ser aquel que proporciona el mínimo valor de *PRESS*. En algunos casos, se producen mínimos para volver a aumentar ligeramente después. En esta situación, se considera que el modelo comienza a añadir vectores de ruido.

Incluir demasiados factores o vectores de ruido se denomina sobreajuste. Incluso se puede producir sobreajuste cuando se optimiza el número de factores para el mínimo *PRESS*, ya que el número de factores óptimos deberá ser realmente aquel que introduce en el sistema un aumento de la capacidad predictiva estadísticamente mejor que cuando se emplea un número inferior. Por lo tanto, se debe recurrir a un tratamiento estadístico de los resultados que ponga este hecho de manifiesto.

Una propuesta de solución a este problema fue realizada por Haaland y Thomas [96,97], de manera que los valores mínimos de *PRESS* se comparan con aquellos obtenidos con un número de factores menor que el que produce el mínimo *PRESS*, haciendo uso del parámetro estadístico *F*. Estos autores determinaron empíricamente que un valor de $(1-\alpha)$ de 0.75 es una buena elección como criterio de significación, de manera que se selecciona como óptimo el número de factores correspondientes al primer valor del *PRESS* cuya probabilidad para la razón *F* es menor que 0.75.

En el caso del algoritmo PARAFAC, existen diversos métodos para efectuar la selección del número óptimo de factores. Uno de ellos es el denominado diagnóstico de la consistencia del modelo [98] (*CORCONDIA*, *CORe CONSistency DIAgnostic*).

$$\text{Core consistency} = 100 \left[\frac{1 - \sum_{d=1}^F \sum_{e=1}^F \sum_{f=1}^F (g_{def} - t_{def})^2}{\sum_{d=1}^F \sum_{e=1}^F \sum_{f=1}^F t_{def}^2} \right] \quad (\text{Ecuación I.2})$$

siendo *g* la denominada superdiagonalidad y *t* la denominada superidentidad. Si el modelo PARAFAC optimizado es válido, entonces *g* se aproxima a *t*. Si los datos no se aproximan al modelo, entonces se obtendrá una diferencia sustancial entre *g* y *t*. La diferencia entre ambas debe ser normalmente pequeña para un modelo.

Desde un punto de vista práctico, si a un grupo de datos modelados mediante PARAFAC se le incrementa de forma progresiva el número de componentes, la superidentidad normalmente disminuye de forma análoga. Después de aplicar el número máximo de factores apropiados para el modelo, e incluir uno más, la superidentidad disminuye de forma drástica, y a menudo se genera un abrupto corte cuando se emplean representaciones del valor del “core” en función del número de factores. De esta forma, el número de componentes ideales para el modelo será el anterior al que genera el salto brusco en el valor del “core”. Así, cuando su valor baja desde un valor alto, por encima aproximadamente del 60% (e incluso cerca del 100%), hasta valores muy pequeños, incluso próximos a 0,1%, esto indica que se ha llegado al número apropiado de factores.

Otra manera de seleccionar el número de factores es el análisis de los errores de regresión de la calibración lineal pseudo-univariante [99].

La determinación del número de factores óptimos es la etapa más importante del análisis, la que requiere mayor atención. En muchos casos no es posible la asignación de la naturaleza de dichos factores. Sin embargo, sí pueden ser atribuidos aquellos que tienen una relación directa con la concentración de los componentes e, incluso, aquellos debidos a interacciones entre los componentes que afectan a sus concentraciones [97,100].

- Selección de la región espectral

Aunque los métodos de calibración multivariante están diseñados para usar el espectro completo, nos podemos encontrar con circunstancias o técnicas instrumentales donde elegir la región del espectro está sobradamente justificada. Por ejemplo, en aquellos casos donde se pueda mejorar la resolución, eliminando zonas de elevado solapamiento de las señales, zonas de ruido o dispersión, zonas de no linealidad, o bien con el objetivo de disminuir el tiempo de procesamiento de datos. Los métodos matemáticos que posibilitan una elección razonada de la región del espectro adecuado, consisten en calcular la correlación entre la señal analítica con las concentraciones de cada componente, en los espectros de la matriz de calibración para cada región seleccionada, y elegir aquellas que tienen valores de R^2 próximos a 1.

- Detección de muestras discrepantes u outliers

Además del número de factores, es igualmente importante la detección de muestras que, por algún tipo de error, deban ser eliminadas en la matriz de calibración.

En un grupo de patrones de calibración pueden existir muestras que se aparten del modelo establecido y que, por consiguiente, puedan ser el origen de errores indeseables. El hecho de que el comportamiento de una muestra difiera en mayor o menor grado del conjunto, puede deberse a errores en las concentraciones (muestras discrepantes en la concentración), o a errores espectrales debidos a problemas instrumentales o de manipulación (muestras espectralmente discrepantes) o a ambas causas.

Una poderosa herramienta para la detección de muestras erróneas nos la proporciona la misma manera de calcular el *PRESS*, dejando sucesivamente y cada vez, con todas y cada una de las muestras, una fuera de la calibración. La diferencia entre la concentración puesta y la obtenida puede compararse y servir para detectar las muestras erróneas.

Una vez optimizada la matriz de cálculo teniendo en cuenta el número óptimo de factores, seleccionada la región espectral de trabajo y eliminados los patrones discrepantes si procede, se pueden predecir las muestras desconocidas.

El gran número de monografías y trabajos sobre el tema pone de manifiesto el especial interés que los métodos de calibración multivariante han suscitado en las últimas décadas. El desarrollo de instrumentos analíticos que permiten adquirir un gran conjunto de señales en periodos cortos de tiempo, así como la popularización de la utilización de ordenadores y potentes paquetes de software, han permitido el gran auge de dichos métodos de calibración. Entre los muchos trabajos que se pueden encontrar en la bibliografía reciente, existen publicaciones para el análisis de un gran número de compuestos en diversas muestras, como fármacos [101,102], plaguicidas [103-105], contaminantes emergentes [106], marcadores patológicos [107] y polifenoles [108], entre otros.

Más ejemplos, información sobre algoritmos de orden superior a dos, así como las ventajas y las limitaciones de los algoritmos disponibles para hacer frente a diferentes situaciones experimentales se recogen en varios trabajos de revisión [109-111].

1.1.3.2. Electroforesis capilar

La electroforesis capilar (*CE, Capillary Electrophoresis*) es una técnica de separación basada en las diferencias entre las movilidades electroforéticas de los distintos analitos, como consecuencia de su diferente relación carga/tamaño, dentro de un tubo capilar lleno de un electrolito soporte, cuando se someten a la acción de un campo eléctrico.

La electroforesis clásica fue descrita por primera vez como una técnica de separación por Tiselius en 1937 [112], para la separación de proteínas en diferentes

disoluciones tampón dentro de una celda electroforética a través de la cual se aplicó un campo eléctrico. Este trabajo le valió el Premio Nobel de Química en 1948 y sentó las bases de una técnica que, en ese momento, no despertó el suficiente interés de la comunidad científica debido a las importantes limitaciones que presentaba (principalmente una separación incompleta de los analitos debido a los efectos de la difusión y la convección térmica [113]). Para paliar este efecto comenzaron a utilizarse soportes sólidos para la separación, fabricados con materiales que disminúan este efecto negativo, como acetato de celulosa o geles de poliacrilamida y agarosa. Sin embargo, no fue hasta varias décadas después cuando la electroforesis capilar comenzó a convertirse en una valiosa técnica analítica, gracias al desarrollo de capilares de diámetro estrecho.

En las separaciones electroforéticas tienen lugar dos fenómenos simultáneamente: la electroósmosis y la electromigración. La movilidad electroforética de los analitos se debe principalmente a la naturaleza del ión, el medio en que se encuentra (pH y fuerza iónica del BGE en el que están disueltos) y el voltaje aplicado, y afecta únicamente a los iones de la disolución, mientras que la movilidad electroosmótica está relacionada con el flujo debido a la constitución de una doble capa de las especies en disolución sobre las cargas presentes en la superficie de la pared del capilar (doble capa de Stern) como consecuencia de la diferencia de potencial aplicado, tal y como se indica en la Figura I.8.

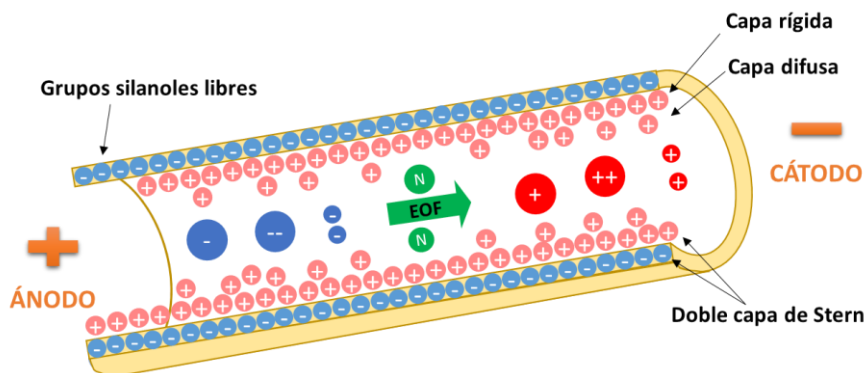


Figura I.8. Migración de los iones en CE trabajando en el modo polaridad normal.

En medio acuoso y en condiciones normales, la mayoría de las superficies sólidas de vidrio o sílice poseen un exceso de cargas negativas que pueden resultar de la ionización de los grupos funcionales de la superficie (equilibrio ácido-base) y/o adsorción de especies iónicas. En la superficie de la pared de sílice fundida del capilar probablemente ocurren ambos procesos: los numerosos grupos silanol (Si-OH) estarán en forma aniónica a pH alcalino o ligeramente ácido ($\text{pH} > 3$), y atraerán contraiones del medio para mantener el balance de cargas en el sistema. Bajo la influencia de un potencial externo positivo, los cationes que forman parte de la doble capa difusa son atraídos por el cátodo (polaridad normal). El movimiento de estos iones, que están solvatados, origina un flujo de líquido en dirección del ánodo al cátodo conocido como flujo electroosmótico (EOF, *ElectroOsmotic Flow*). Los cationes arrastran moléculas de disolvente en su movimiento hacia el cátodo originando un flujo de disolvente en ese sentido, que aumenta cuanto mayor es el pH del tampón. El movimiento global de las especies en el medio electroforético en función de su relación carga/radio se representa en la Figura I.8. En la mayoría de los casos, el EOF hace que migren en un mismo sentido la mayoría de las especies, independientemente de su carga. Asumiendo polaridad normal, que es el modo utilizado en el trabajo expuesto en esta Memoria, las moléculas neutras se desplazarán a la misma velocidad que el EOF, los cationes lo harán más rápido y los aniones más lentamente, haciendo posible el análisis de cationes, aniones y especies neutras en una sola inyección.

Actualmente, la CE constituye una de las técnicas de separación de mayor potencialidad en el análisis de mezclas complejas debido a su elevada resolución, rapidez en el análisis y relativo bajo coste en el consumo de disolventes comparada con HPLC. Se trata de una técnica sencilla, barata y fácilmente automatizable, que además presenta una gran versatilidad en cuanto a modos de operación y aplicabilidad, ya que permite la separación de una gran variedad de compuestos, tanto iónicos como moleculares, incluyendo aquellos que presentan una alta polaridad o sean termolábiles y/o no volátiles, en el mismo capilar de separación.

El desarrollo que está alcanzando esta técnica, ofreciendo la posibilidad de analizar volúmenes de muestras del orden de pico y nanolitros, ha favorecido su aplicación en áreas de la química clínica o biológica, en el análisis forense y en el análisis de alimentos, para los que se requieren volúmenes de muestra, en ocasiones,

extremadamente bajos [114]. En este sentido, una de las líneas de investigación más interesante es la referida a los métodos de pre-concentración *on-line* o *stacking* [115,116], que permiten solventar los problemas de sensibilidad en el análisis de muestras biológicas, y muestran unas interesantes perspectivas para su empleo en laboratorios clínicos [117,118]. Aunque los detectores utilizados son fundamentalmente los mismos que para las técnicas cromatográficas (absorción UV-Vis, fluorescencia, quimioluminiscencia, electroquímica, espectrometría de masas, radiométricos, etc.), el desarrollo de detectores que ofrezcan una mejor sensibilidad y selectividad, tales como los de emisión de fluorescencia inducida por láser, detectores de espectroscopía infraroja con transformada de Fourier (FTIR, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) y resonancia magnética nuclear (NMR, *Nuclear Magnetic Resonance*) o mejorar los quimioluminiscentes [119,120], ofrecen un futuro prometedor para el empleo de esta técnica en los laboratorios de rutina, principalmente en el análisis ambiental y biomédico.

Bibliografía

- [1] Web del proyecto GLOBOCAN: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
- [2] R. Díez-Fernández, P. Salinas Hernández, C. Girón-Duch, "Revisión del tratamiento quimioterápico del cáncer de colon metastático", *Farm. Hosp.* 30 (2006) 359-369.
- [3] M.E. Wall, M.C. Wani, C.E. Cook, K.H. Palmer, "Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from camptotheca acuminata", *J. Am. Chem. Soc.* 88 (1966) 3888-3890.
- [4] R.I. Geran, N.H. Greenberg, M.M. MacDonald, A.M. Schumacher B.J. Abbot, "Protocols for screening chemical agents and natural products against tumours and other biological systems", *Cancer Chemother. Rep.* 3 (1972) 1-103.
- [5] M.E. Wall, "Alkaloids with antitumor activity", *Internat. Symp. on Biochem. and Physiology of the Alkaloids*; Eds. K. Mothes, K. Schreiber and H.R. Schutte; Berlin, 1969.
- [6] R.E. Perdue, R.L. Smith, M.E. Wall, J.L. Hartwell, B.J. Abbott, "Camptotheca acuminata Decaisne (Nyssaceae). In: Source of Camptothecin, an Antileukemic Alkaloid Technical Bulletin", Technical Bull. 1415, Washington D.C., US. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 1970.
- [7] R.C. Gallo, J. Whang-Peng, R.H. Adamson, "Studies on the antitumor activity, mechanism of actions, and cell cycle effects of camptothecin", *J. Natl. Cancer Inst.* 76 (1971) 789-795.
- [8] J.A. Gottlieb, A.M. Guarino, J.B. Call, V.T. Oliverio, J.B. Block, "Preliminary pharmacological and clinical evaluation of camptothecin sodium", *Cancer Chemother. Rep.* 54 (1970) 461-470.
- [9] C.G. Moertel, H.J. Schutt, R.J. Reitmerer, R.G. Hahn, "Phase II study of camptothecin (NSC-100880) in the treatment of advanced gastrointestinal cancer", *Cancer Chemother. Rep.* 56 (1972) 95-101.
- [10] F.M. Muggia, P.J. Creaven, H.H. Jansen, M.N. Cohen, D.S. Selawry, "Phase I clinical trial of weekly and daily treatment with camptothecin (NSC-100880): correlation with preclinical studies", *Cancer Chemother. Rep.* 56 (1972) 515-521.
- [11] J.A. Gottlieb, J.K. Luce, "Treatment of malignant melanoma with camptothecin (NSC-100880)", *Cancer Chemother. Rep.* 56 (1972) 103-105.
- [12] M. Potmesil, H. Pinedo, "Camptothecins: new class of anticancer agents", CRC, Boca Raton, Florida, Estados Unidos, 1985.

-
- [13] W.J. Slichenmeyer, E.K. Rowinsky, R.C. Donehower, S.H. Kaufmann, "The current status of camptothecin analogues as antitumor agents", *J. Natl. Cancer Inst.* 85 (1993) 271-291.
- [14] M. Potmesil, "Camptothecins: from bench research to hospital wards", *Cancer Res.* 54 (1994) 1431-1439.
- [15] J. O'Leary, F.M. Muggia, "Camptothecins: a review of their development and schedules of administration", *Eur. J. Cancer* 34 (1998) 1500-1508.
- [16] Y.H. Hsiang, R. Hertzberg, S. Hecht, L.F. Liu, "Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase", *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 14873-14878.
- [17] Y.H. Hsiang, L.F. Liu, "Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin", *Cancer Res.* 48 (1988) 1722-1726.
- [18] L.B. Saltz, J.V. Cox, C. Blanke, L.S. Rosen, L. Fehrenbacher, M.J. Moore, J.A. Maroun, S.P. Acklan, P.K. Locker, N. Pirotta, G. Elfring, L.L. Millar, "Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer", *New Engl. J. Med.* 343 (2000) 905-914.
- [19] H.A. Gelderblom, M.J.A. de Jonge, A. Sparremboom, J. Verweij, "Oral topoisomerase 1 inhibitors in adult patients: present and future", *Investig. New Drugs* 17 (1999) 401-15.
- [20] L.P. Rivory, E. Chatelut, P. Canal, A. Mathieu-Boue, J. Robert, "Kinetics of the *in vivo* interconversion of the carboxylate and lactone forms of irinotecan (CPT-11) and of its metabolite SN-38 in patients", *Cancer Res.* 54 (1994) 6330-6333.
- [21] Y. Sasaki, Y. Yoshida, K. Sudoh, H. Hakasui, H. Fujii, T. Ohtsu, H. Wakita, T. Igarashi, K. Itoh, "Pharmacological correlation between total drug concentration and lactones of CPT-11 and SN-38 in patients treated with CPT-11", *Jpn. J. Cancer Res.* 86 (1995) 111-116.
- [22] D.A. Cameron, H. Gabra, R.C.F. Leonard, "Continuous 5-fluorouracil in the treatment of breast cancer", *Br. J. Cancer* 70 (1994) 120-124.
- [23] D.B. Longley, D.P. Harkin, P.G. Johnston, "5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies", *Nat. Rev. Cancer* 3 (2003) 330-338.
- [24] J.D. Hainsworth, A.A. Meluch, F.A. Greco, "Paclitaxel, carboplatin, and long-term continuous 5-fluorouracil infusion in the treatment of upper aerodigestive

- malignancies: preliminary results of phase II trial”, *Semin. Oncol.* 24 (1997) S1938-S1942.
- [25] C. Massacesi, B. Pistilli, M. Valeri, P. Lippe, M.B.L. Rocchi, R. Cellerino, A. Piga, “Predictors of short-term survival and progression to chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer treated with 5-fluorouracil based regimens”, *Am. J. Clin. Oncol.* 25 (2002) 140-148.
- [26] R.B. Diasio, B.E. Harris, “Clinical pharmacology of 5-fluorouracil”, *Clin. Pharmacokinet.* 16 (1989) 215-237.
- [27] D.V. Santi, C.S. McHenry, H. Sommer, “Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate”, *Biochemistry* 13 (1974) 471-481.
- [28] P.G. Johnston, S. Kaye, “Capecitabine: a novel agent for the treatment of solid tumors”, *Anti-cancer Drugs* 12 (2001) 639-646.
- [29] Meta-analysis Group In Cancer, “Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal cancer: Meta-analysis Group In Cancer”, *J. Clin. Oncol.* 16 (1998) 301-308.
- [30] T.J. Hobday, R.M. Goldberg, “Perspectives on the role of sequential of combination chemotherapy for first-line and salvage therapy in advanced colorectal cancer”, *Clin. Colorectal Canc.* 2 (2002) 161-169.
- [31] Y. Bécouarn, C. Agostini, N. Trufflandier, V. Boulanger, “Oxaliplatin: available data in non-colorectal gastrointestinal malignancies”, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 40 (2001) 265-272.
- [32] A. Abad, E. Martínez-Balibrea, J.L. Manzano, B. Cirauqui, “Biología molecular del cáncer colorrectal”, *Cir. Esp.* 73 (2003) 9-16.
- [33] A.H. Zedan, T.F. Hansen, Å.F. Svenningsen, O.J. Vilholm, “Oxaliplatin-induced neuropathy in colorectal cancer: many questions with few answers”, *Clin. Colorectal Canc.* 13 (2014) 73-80.
- [34] M. Sereno, G. Gutiérrez-Gutiérrez, C. Gómez-Raposo, M. López-Gómez, M. Merino-Salvador, F. Zambrana Tébar, C. Rodríguez-Antona, E. Casado, “Oxaliplatin induced-neuropathy in digestive tumors”, *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* 89 (2014) 166-178.
- [35] Meta-analysis Group In Cancer, “Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: evidence in terms of response rate. Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project”, *J. Clin. Oncol.* 10 (1992) 896-903.

-
- [36] E. Van Cutsem, C. Twelves, J. Cassidy, D. Allman, E. Bajetta, M. Boyer, R. Bugat, M. Findlay, S. Frings, M. Jahn, J. McKendrick, B. Osterwalder, G. Perez-Manga, R. Rosso, P. Rougier, W.H. Schmiegel, J.F. Seitz, P. Thompson, J.M. Vieitez, C. Weitzel, P. Harper, "Oral capecitabine compared with intravenous fluorouracil plus leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: results of a large phase III study", *J. Clin. Oncol.* 19 (2001) 4097-4106.
- [37] R. Labianca, G.D. Beretta, S. Mosconi, L. Milesi, "The role of uracil-tegafur (UFT) in elderly patients with colorectal cancer", *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* 52 (2004) 73-80.
- [38] A.D. Fishman, S. Wadler, "Advances in the treatment of metastatic colorectal cancer", *Clin. Colorectal Canc.* 1 (2001) 20-35.
- [39] M.A. Berciano-Guerrero, J.C. Villa-Guzmán, R. Acosta-Guerrero, G. Castañeda-Peñalvo, J. Rodríguez-Flores, "Current trends in the chemotherapy of colorectal cancer", *Curr. Med. Chem.* 19 (2012) 4414-4430.
- [40] L.B. Saltz, J.V. Cox, C. Blanke, L.S. Rosen, L. Fehrenbacher, M.J. Moore, J.A. Maroun, S.P. Ackland, P.K. Locker, N. Pirotta, G.L. Elfring, L.L. Miller, "Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group", *N. Engl. J. Med.* 343 (2000) 905-914.
- [41] J.Y. Douillard, D. Cunningham, A.D. Roth, M. Navarro, R.D. James, P. Karasek, P. Jandik, T. Iveson, J. Carmichael, M. Alakl, G. Gruia, L. Awad, P. Rougier, "Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: A multicentre randomised trial", *Lancet* 355 (2000) 1041-1047.
- [42] T. André, C. Louvet, F. Maindault-Goebel, C. Couteau, M. Mabro, J.P. Lotz, V. Gilles-Amar, M. Krulik, E. Carola, V. Izrael, A. de Gramont, "CPT-11 (irinotecan) addition to bimonthly, high-dose leucovorin and bolus and continuous-infusion 5-fluorouracil (FOLFIRI) for pretreated metastatic colorectal cancer. GERCOR", *Eur. J. Cancer* 35 (1999) 1343-1347.
- [43] C. Tournigand, T. André, E. Achille, G. Lledo, M. Flesh, D. Mery-Mignard, E. Quinaux, C. Couteau, M. Buyse, G. Ganem, B. Landi, P. Colin, C. Louvet, A. de Gramont, "FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study", *J. Clin. Oncol.* 23 (2004) 229-237.
- [44] M. Hill, H. Mackay, D. Cunningham, "Phase I/II study of oral uracil/tegafur (UFT), leucovorin and irinotecan in patients with advanced colorectal cancer", *Ann. Oncol.* 11 (Suppl. 4) (2000) 45.

- [45] K. Okabayashi, H. Hasegawa, Y. Ishii, T. Endo, H. Ochiai, T. Kubota, Y. Kitagawa, "Combination chemotherapy of biweekly irinotecan (CPT-11) plus tegafur/uracil (UFT) and leucovorin (LV) for patients with metastatic colorectal cancer: phase I/II study in Japanese patients", *Cancer Chemoth. Pharm.* 63 (2009) 501-507.
- [46] A. Grothey, K. Jordan, O. Kelliner, "Randomized phase II trial of capecitabine plus irinotecan vs capecitabine plus oxaliplatin as first line therapy of metastatic colorectal cancer", *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 22 (2003) 255 (abstract 1022).
- [47] A. de Gramont, A. Figer, M. Seymour, M. Homerin, A. Hmissi, J. Cassidy, C. Boni, H. Cortes-Funes, A. Cervantes, G. Freyer, D. Papamichael, N. Le Bail, C. Louvet, D. Hendler, F. de Braud, C. Wilson, F. Morvan, A. Bonetti, "Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer", *J. Clin. Oncol.* 18 (2000) 2938-2947.
- [48] M.L. Rothenberg, A.M. Oza, R.H. Bigelow, J.D. Berlin, J.L. Marshall, R.K. Ramanathan, L.L. Hart, S. Gupta, C.A. Garay, B.G. Burger, N. Le Bail, D.G. Haller, "Superiority of oxaliplatin and fluorouracil-leucovorin compared with either therapy alone in patients with progressive colorectal cancer after irinotecan and fluorouracil-leucovorin: interim results of a phase III trial", *J. Clin. Oncol.* 21 (2003) 2059-2069.
- [49] F. Maindrant-Goebel, C. Louvet, T. André, E. Carola, J.P. Lotz, J.L. Molitor, M.L. Garcia, V. Gilles-Amar, V. Izrael, M. Krulik, A. de Gramont, "Oxaliplatin added to the simplified bimonthly leucovorin and 5-fluorouracil regimen as second-line therapy for metastatic colorectal cancer (FOLFOX6). GERCOR", *Eur. J. Cancer* 35 (1999) 1338-1342.
- [50] T. Saita, H. Fujiot, M. Mori, "Development of ELISAs for irinotecan and its active metabolite SN-38", *Biol. Pharm. Bull.* 23 (2000) 911-916.
- [51] M.I. Rodríguez-Cáceres, I. Durán-Merás, N.E. Ornelas Soto, P.L. López de Alba, L. López Martínez, "Spectrofluorimetric determination of irinotecan in the presence of oxidant agents and metal ions", *Talanta* 74 (2008) 1484-1491.
- [52] M.I. Rodríguez-Cáceres, I. Durán-Merás, N.E. Ornelas Soto, P.L. López de Alba, L. López Martínez, "Determination of anticarcinogenic and rescue therapy drugs in urine by photoinduced spectrofluorimetry using multivariate calibration: comparison of several second-order methods", *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 1119-1127.
- [53] M.I. Rodríguez-Cáceres, D. Bohoyo Gil, I. Durán-Merás, M.C. Hurtado-Sánchez, "Spectrofluorimetric determination of SN-38, a promising new anti-tumor agent,

-
- in the presence and absence of organized media", *Appl. Spectrosc.* 65 (2011) 298-306.
- [54] F.F.C. Marques, A.L.M.C. Cunha, A. Sa, R.Q. Aucelio, "Determination of the camptothecin derivatives CPT-11 and SN-38 in urine and saliva by micellar electrokinetic chromatography", *Anal. Lett.* 45 (2012) 1849-1861.
- [55] Z.M. Prijovich, P.A. Burnouf, S.R. Roffler, "Versatile online SPE-HPLC method for the analysis of Irinotecan and its clinically relevant metabolites in biomaterials", *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 360-367.
- [56] I.M. Shaikh, K.B. Tan, G.N.C. Chiu, "Simultaneous determination of doxorubicin and irinotecan in conjunction with their major metabolites by ultra high performance liquid chromatography", *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 36 (2013) 914-925.
- [57] M.T. Baylatry, A.C. Joly, J.P. Pelage, L. Bengrine-Lefevre, J.L. Prugnaud, A. Laurent, C. Fernandez, "Simple liquid chromatography method for the quantification of irinotecan and SN-38 in sheep plasma: application to in vivo pharmacokinetics after pulmonary artery chemoembolization using drug eluting beads", *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 738-742.
- [58] Z.Q. Zhang, J. Yao, X.T. Wu, J.J. Zou, J.B. Zhu, "An accurate assay for simultaneous determination of irinotecan and its active metabolite SN-38 in rat plasma by LC with fluorescence detection", *Chromatographia* 70 (2009) 399-405.
- [59] E. Gravel, P. Bourget, L. Mercier, A. Paci, "Fluorescence detection combined with either HPLC or HPTLC for pharmaceutical quality control in a hospital chemotherapy production unit: Application to camptothecin derivative", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 581-586.
- [60] X.X. Yang, Z.P. Hu, S.Y. Chan, B.C. Goh, W. Duan, E. Chan, S.F. Zhou, "Simultaneous determination of the lactone and carboxylate forms of irinotecan (CPT-11) and its active metabolite SN-38 by high performance liquid chromatography: application to plasma pharmacokinetic studies in the rat", *J. Chromatogr. B* 821 (2005) 221-228.
- [61] D.J. Park, J.H. Won, A.R. Cho, H.J. Yun, J.H. Heo, T.H. Hwhang, D.H. Lee, W.M. Kim, "Determination of irinotecan and its metabolite SN-38 in rabbit plasma and tumors using a validated method of tandem mass spectrometry coupled with liquid chromatography", *J. Chromatogr. B* 962 (2014) 147-152.

- [62] S. Maeda, Y. Miwa, "Multicomponent high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of ten chemotherapeutic drugs in wipe samples", *J. Chromatogr. B* 921-922 (2013) 43-48.
- [63] N. Kumar, D. Sangeetha, S.P. Reddy, "UPLC and LC-MS studies on degradation behavior of irinotecan hydrochloride and development of a validated stability-indicating ultra-performance liquid chromatographic method for determination of irinotecan hydrochloride and its impurities in pharmaceutical dosage forms", *J. Chromatogr. Sci.* 50 (2012) 810-819.
- [64] L. Goldwirt, F. Lemaitre, N. Zahr, R. Farinotti, C. Fernandez, "A new UPLC-MS/MS method for the determination of irinotecan and 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) in mice: Application to plasma and brain pharmacokinetics", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 66 (2012) 325-333.
- [65] W. Zhang, G.E. Dutschman, X. Li, M. Ye, Y.C. Cheng, "Quantitation of irinotecan and its two major metabolites using a liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometric", *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 3038-3044.
- [66] F. D'Esposito, B.N. Tattam, I. Ramzan, M. Murray, "A liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (LC-MS/MS) assay for the determination of irinotecan (CPT-11) and its two major metabolites in human liver microsomal incubations and human plasma samples", *J. Chromatogr. B* 875 (2008) 522-530.
- [67] S. Bardin, W. Guo, J.L. Johnson, S. Khan, A. Ahmad, J.X. Duggan, J. Ayoub, I. Ahmad, "Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric assay for the simultaneous quantification of Camptosar® and its metabolite SN-38 in mouse plasma and tissues", *J. Chromatogr.* 1073 (2005) 249-255.
- [68] R.Q. Aucelio, P.M.S. Maia, A.L.M.C. da Cunha, F.F.C. Marques, "Room-temperature phosphorimetry for the determination of trace contaminations of camptothecin in anticancer drugs", *Microchem. J.* 96 (2010) 108-113.
- [69] R. Mullangi, P. Ahlawat, R.N. Srinivas, "Irinotecan and its active metabolite, SN-38: review of bioanalytical methods and recent update from clinical pharmacology perspectives", *Biomed. Chromatogr.* 24 (2010) 104-123.
- [70] L. Zufia, A. Alda, J. Giráldez, "Separation methods for camptothecin and related compounds", *J. Chromatogr. B* 764 (2001) 141-159.
- [71] M. Palumbo, C. Sissi, B. Gatto, S. Moro, G. Zagotto, "Quantitation of camptothecin and related compounds", *J. Chromatogr. B* 764 (2001) 121-140.

-
- [72] E. Matsushima, K. Yoshida, R. Kitamura, K. Yoshida, "Determination of S-1 (combined drug of tegafur), 5-chloro-2,4-dihydropyridine and potassium oxonate and 5-fluorouracil in human plasma and urine using high-performance liquid chromatography and gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry", *J. Chromatogr. B* 691 (1997) 95-104.
- [73] L. Zufía, A. Aldaz, C. Castellanos, J. Giráldez, "Determination of 5-fluorouracil and its prodrug tegafur in plasma and tissue by high-performance liquid chromatography in a single injection: validation for application in clinical pharmacokinetic studies", *Ther. Drug Monit.* 25 (2003) 221-228.
- [74] D.F. Chu, J.K. Gu, W.H. Liu, J.P. Fawcett, Q.G. Dong, "Sensitive liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of 5-fluorouracil and its prodrug, tegafur, in beagle dog plasma", *J. Chromatogr. B* 795 (2003) 377-382.
- [75] C.G. Kindberg, C.M. Riley, J.F. Stobaugh, M. Slavik, "Analysis of 5-fluorouracil in plasma by precolumn derivatization with 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin, followed by multi-dimensional high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr.* 473 (1988) 431-444.
- [76] C.D. Bates, D.G. Watson, N. Willmott, H. Logan, J. Golberg, "The analysis of 5-fluorouracil in human plasma by gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry (GC-NICIMS) with stable isotope dilution", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 9 (1991) 19-21.
- [77] L.W. Anderson, R.J. Parker, J.M. Ahlgren, J.D. Wilkinson, J.M. Strong, "Gas chromatographic-mass spectrometric method for routine monitoring of 5-fluorouracil in plasma of patients receiving low-level protracted infusions", *J. Chromatogr. B* 581 (1992) 195-201.
- [78] K. Wang, M. Nano, T. Mulligan, E.D. Bush, R.W. Edom, "Derivatization of 5-fluorouracil with 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin for determination by liquid chromatography-mass spectrometry", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 9 (1998) 970-976.
- [79] G. Remaud, M. Boisdron-Celle, A. Morel, A. Gamelin, "Sensitive MS/MS-liquid chromatography assay for simultaneous determination of tegafur, 5-fluorouracil and 5-fluorodihydrouracil in plasma", *J. Chromatogr. B* 824 (2005) 153-160.
- [80] C.J. Peer, T.J. Mcmanus, H.I. Hurwitz, W.P. Petros, "Development and utilization of a combined LC-UV and LC-MS/MS method for the simultaneous analysis of tegafur and 5-fluorouracil in human plasma to support a phase I clinical study of oral UFT®/leucovorin", *J. Chromatogr. B* 898 (2012) 32-37.

- [81] K. Liu, D.F. Zhong, H.Y. Zou, X.Y. Chen, "Determination of tegafur, 5-fluorouracil, gimeracil and oxonic acid in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52 (2010) 550-556.
- [82] G. Remaud, M. Boisdron-Celle, A. Morel, A. Gamelin, "Sensitive MS/MS-liquid chromatography assay for simultaneous determination of tegafur, 5-fluorouracil and 5-fluorodihydrouracil in plasma", *J. Chromatogr. B* 824 (2005) 153-160.
- [83] Y. Yang, Q. Liu, W. Tao, L. Nie, S. Yao, "Improved determination of 5-fluorouracil and its prodrug tegafur in pharmaceuticals by large-volume sample stacking in CE", *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 3296-3301.
- [84] C. Vandenbosch, S. van Belle, M. de Smet, G. Taton, V. Bruynseels, G. Vandenhoven, D.L. Massart, "Determination of leucovorin and 5-fluorouracil in plasma by high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. B* 612 (1993) 77-85.
- [85] H. Wold, "Partial least squares", *Encyclopedia of the Statistical Sciences*. John Wiley & Sons, 6 (1985) 581-591.
- [86] H. Abdi, "Partial Least Squares (PLS) Regression", *Encyclopedia of Social Sciences Research Methods*. Thousand Oaks (CA): Sage (2003) 792-795.
- [87] R. Bro, "PARAFAC. Tutorial and applications", *Chemometr. Intell. Lab.* 38 (1997) 149-171.
- [88] N.M. Faber, R. Bro, P.K. Hopke, "Recent developments in CANDECOMP/PARAFAC algorithms: A critical review", *Chemometr. Intell. Lab.* 65 (2003) 119-137.
- [89] E. Sánchez, B.R. Kowalski, "Generalized rank annihilation factor analysis", *Anal. Chem.* 58 (1986) 496-499.
- [90] R. Bro, "Multiway calibration. Multilinear PLS", *J. Chemometr.* 10 (1996) 47-61.
- [91] S. Wold, P. Geladi, K. Esbensen, J. Öhman, "Multi way principal components and PLS analysis", *J. Chemometr.* 1 (1987) 41-56.
- [92] J. Öhman, P. Geladi, S. Wold, "Residual bilinearization. Part I: theory and algorithms", *J. Chemometr.* 4 (1990) 79-90.
- [93] 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. Chemometr.* 19 (2005) 253-265.
- [94] R.A. Harsman, "UCLA workings papers in phonetics", 16 (1979).

-
- [95] J.D. Carroll, J. Chang, "Analysis of individual differences in multidimensional scaling via an N-way generalization of 'Eckart-Young' decomposition", *Psychometrika* 35 (1970) 283-319.
- [96] 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.
- [97] D.M. Haaland, E.V. Thomas, "Partial least-squares methods for spectral analyses: 2. Application to simulated and glass spectral data", *Anal. Chem.* 60 (1988) 1202-1208.
- [98] R. Bro, H.A.L. Kiers, "A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models", *J. Chemometr.* 17 (2003) 274-286.
- [99] A. Muñoz de la Peña, A. Espinosa Mansilla, D. González Gómez, A.C. Olivieri, H.C. Goicoechea, "Interference-free analysis using three-way fluorescence data and the parallel factor model. Determination of fluoroquinolone antibiotics in human serum", *Anal. Chem.* 75 (2003) 2640-2646.
- [100] S. Sekulic, M.B. Seasholtz, Z. Wang, B.R. Kowalsky, S.E. Lee, B.R. Holt, "Nonlinear multivariate calibration methods in analytical chemistry". *Anal. Chem.* 65 (1993) 835A-845A.
- [101] M.R. Alcaráz, A.V. Schenone, M.J. Culzoni, H.C. Goicoechea, "Modeling of second-order spectrophotometric data generated by a pH-gradient flow injection technique for the determination of doxorubicin in human plasma", *Microchem. J.* 112 (2014) 25-33.
- [102] M.D. Gil García, F. Cañada Cañada, M.J. Culzoni, L. Vera-Candioti, G.G. Siano, H.C. Goicoechea, M. Martínez Galera, "Chemometric tools improving the determination of anti-inflammatory and antiepileptic drugs in river and wastewater by solid-phase microextraction and liquid chromatography diode array detection", *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5489-5496.
- [103] L. Rubio, M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, "Identification and quantification of carbamate pesticides in dried lime tree flowers by means of excitation-emission molecular fluorescence and parallel factor analysis when quenching effect exists", *Anal. Chim. Acta* 820 (2014) 9-22.
- [104] R.M. Maggio, P.C. Damiani, A.C. Olivieri, "Multivariate curve-resolution analysis of pesticides in water samples from liquid chromatographic-diode array data", *Talanta* 83 (2011) 1173-1180.

- [105] J.W.B. Braga, C.B.G. Bottoli, I.C.S.F. Jardim, H.C. Goicoechea, A.C. Olivieri, R.J. Poppi, "Determination of pesticides and metabolites in wine by high performance liquid chromatography and second-order calibration methods", *J. Chromatogr. A* 1148 (2007) 200-210.
- [106] M.R. Alcaráz, G.G. Siano, M.J. Culzoni, A. Muñoz de la Peña, H.C. Goicoechea, "Modeling four and three-way fast high-performance liquid chromatography with fluorescence detection data for quantitation of fluoroquinolones in water samples", *Anal. Chim. Acta* 809 (2014) 37-46.
- [107] 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.
- [108] X.H. Zhang, H.L. Wu, J.Y. Wang, D.Z. Tu, C. Kang, J. Zhao, Y. Chen, X.X. Miu, R.Q. Yu, "Fast HPLC-DAD quantification of nine polyphenols in honey by using second-order calibration method based on trilinear decomposition algorithm", *Food Chem.* 138 (2013) 62-69.
- [109] G.M. Escandar, H.C. Goicoechea, A. Muñoz de la Peña, A.C. Olivieri, "Second- and higher-order data generation and calibration: A tutorial", *Anal. Chim. Acta* 806 (2014) 8-26.
- [110] J.A. Arancibia, P.C. Damiani, G.M. Escandar, G.A. Ibañez, A.C. Olivieri, "A review on second- and third-order multivariate calibration applied to chromatographic data", *J. Chromatogr. B* 910 (2012) 22-30.
- [111] A.C. Olivieri, G.M. Escandar, A. Muñoz de la Peña, "Second-order and higher-order multivariate calibration methods applied to non-multilinear data using different algorithms", *Trac-Trend. Anal. Chem.* 30 (2011) 607-617.
- [112] A. Tiselius, "A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures" *Trans. Faraday Soc.* 33 (1937) 524-531.
- [113] K. Altria, "Capillary electrophoresis guidebook: principles, operation and applications", Humana Press, Totowa (1996) 29-48.
- [114] A. Varenne, S. Descroix, "Recent strategies to improve resolution in capillary electrophoresis-A review", *Anal. Chim. Acta* 628 (2008) 9-23.

-
- [115] L. Steven, J. Simpson, J.P. Quirino, S. Terabe, "On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis. Fundamentals and applications", *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 504-541.
- [116] A. Šlampová, Z. Malá, P. Pantůčová, P. Gebauer, P. Boček, "Contemporary sample stacking in analytical electrophoresis", *Electrophoresis* 34 (2013) 3-18.
- [117] R. Jabeen, D. Payne, J. Wiktorowicz, A. Mohammad, J. Petersen, "Capillary electrophoresis and the clinical laboratory", *Electrophoresis* 27 (2006) 2413-2438.
- [118] A. Macià, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, "Different samples stacking strategies to analyze some nonsteroidal anti-inflammatory drugs by micellar electrokinetic capillary chromatography in mineral waters", *J. Chromatogr. A* 1117 (2006) 234-245.
- [119] M. Król, A. Karoly, P. Kościelniak, "Raman spectroscopy and capillary electrophoresis applied to forensic colour inkjet printer inks analysis", *Forensic Sci. Int.* 242 (2014) 142-149.
- [120] A.M. García Campaña, L. Gámiz-Gracia, W.R. Baeyens, F. Alés Barrero, "Derivatization of biomolecules for chemiluminescent detection in capillary electrophoresis" *J. Chromatogr. B* 793 (2003) 49-74.

I.2. Análisis de CPT-11 y SN-38 en muestras de suero y orina mediante calibración multivariante de primer orden

I.2.1. Introducción al artículo científico 1

Como se ha comentado anteriormente, el CPT-11 es uno de los principales fármacos empleado en el tratamiento de primera línea del cáncer de colon, siendo el SN-38 su principal metabolito y el que presenta actividad contra las células tumorales.

Este profármaco posee un perfil farmacológico complejo, ya que depende de un conjunto de enzimas implicadas en transformaciones metabólicas y en el transporte activo de proteínas, que regulan la absorción intestinal y los mecanismos de secreción hepatobiliar. Además, presenta una gran cadena en su estructura a la cual se unen las enzimas y que es un requisito para tener actividad farmacológica. La farmacocinética del CPT-11 en plasma humano ha sido objeto de muchos estudios y se ha descrito que, justo después de la administración intravenosa, se alcanza un pico de concentración, el cual disminuye rápidamente como resultado de las múltiples vías de eliminación [1,2].

Un importante factor farmacológico es su unión a las proteínas del plasma. De acuerdo a su naturaleza hidrofílica, en sangre el 80% se encuentra principalmente unido y/o localizado en los eritrocitos, mientras que el SN-38 está unido en un 99% fundamentalmente a albúmina y linfocitos, y en menor grado a eritrocitos y neutrófilos [3]. *In vivo*, el equilibrio entre la forma lactona y carboxilato ocurre rápidamente, con una vida media de 9,5 min [4], por el contrario, en el caso del metabolito SN-38, éste predomina en la forma activa lactona [4,5]. En presencia de albúmina, la forma lactona de ambos es más estable [6], por lo que el porcentaje de lactona disponible es mayor que en ausencia de esta proteína. Las formas lactona y carboxilato del CPT-11 se unen a la albúmina con fortalezas similares. Por su parte, la unión del metabolito SN-38 en su forma lactona es más fuerte que la correspondiente en su forma carboxilato. Esto explica la mayor estabilidad del SN-38 *in vivo* comparado con el CPT-11 [6].

En cuanto al metabolismo, el CPT-11 se degrada principalmente en el hígado, por lo que la excreción biliar, en la que participan varias familias de enzimas, es la principal vía de eliminación tanto en animales como en humanos. A pesar de esto, este fluido ha sido analizado en pocos pacientes [7-9], encontrándose que los porcentajes de excreción para el CPT-11, varían entre el 3 y el 22% de la dosis administrada, mientras que para el SN-38 varían entre el 0,1 y el 0,9% [7]. Cuando se

administra ciclosporina A (un inhibidor de la secreción biliar) aumentan significativamente las concentraciones de ambos compuestos en plasma [10].

Otras vías de eliminación frecuentes son heces y orina. A pesar de que en la bibliografía existen numerosos métodos donde se analizan simultáneamente el fármaco y su metabolito en muestras de plasma, existe poca información sobre los niveles en los que se encuentran en muestras de orina. En uno de los pocos trabajos encontrados sobre este tema se describe que el CPT-11 y dos de sus metabolitos, el SN-38 y el APC (7-etil-10-[4-N-(ácido-5-aminopentanoico)-1-piperidino]-carboniloxi-camptotecina), son los compuestos que se detectan principalmente en las primeras 24 horas después de su administración [2,8]. El CPT-11 se excreta entre un 10 y un 22% de la dosis administrada, mientras que el SN-38 contribuye sólo con un 0,18-0,43%. Se considera que la excreción del CPT-11 por vía urinaria es completa en 48 horas [8]. Por último, en cuanto a la eliminación fecal, se ha encontrado que un 63,7% de la dosis administrada se elimina por esta vía [8].

A continuación se presenta el **artículo científico 1**, donde se muestra el desarrollo de un método para la resolución de ambos compuestos en muestras de orina y suero sanguíneo, basado en la medida de sus señales fluorescentes en combinación con algoritmos quimiométricos sencillos de primer orden, concretamente PLS. En ambas muestras fue necesario realizar una etapa de preconcentración para poder alcanzar los niveles en los que el SN-38 se encuentra en las muestras de orina. Para realizar este pretratamiento se recurrió a una extracción líquido-líquido con cloroformo, optimizada previamente en un trabajo anterior de nuestro grupo de investigación para el SN-38 [11], ligeramente modificada, mientras que para el caso de las muestras de suero, al presentar una mayor complejidad en su composición, fue necesario realizar una precipitación previa de las proteínas.

Bibliografía

- [1] L.P. Rivory, M.C. Haaz, P. Canal, F. Lokiec, J.P. Armand, J. Robert, "Pharmacokinetic interrelationships of irinotecan (CPT-11) and its three major plasma metabolites in patients enrolled in phase I/II trials", *Clin. Cancer Res.* 3 (1997) 1261-1266.
- [2] A. Sparreboom, M.J.A. de Jorge, P. de Bruijn, E. Brouwer, K. Nooter, W.J. Loos, R.J. van Alphen, R.H.J. Mathijssen, G. Stoter, J. Verweij, "Irinotecan (CPT-11) metabolism and disposition in cancer patients", *Clin. Cancer Res.* 4 (1998) 2747-2754.
- [3] O. Combes, J. Barré, J.C. Duché, L. Vernillet, Y. Archimbaud, M.P. Marietta, J.P. Tillement, S. Urien, "In vitro binding and partitioning of irinotecan (CPT-11) and its metabolite, SN-38, in human blood", *Investig. New Drugs* 18 (2000) 1-5.
- [4] L.P. Rivory, E. Chatelut, P. Canal, A. Mathieu-Boue, J. Robert, "Kinetics of the in vivo interconversion of the carboxylate and lactone forms of irinotecan (CPT-11) and of its metabolite SN-38 in patients", *Cancer Res.* 54 (1994) 6330-6333.
- [5] Y. Sasaki, Y. Yoshida, K. Sudoh, H. Hakasui, H. Fujii, T. Ohtsu, H. Wakita, T. Igarashi, K. Itoh, "Pharmacological correlation between total drug concentration and lactones of CPT-11 and SN-38 in patients treated with CPT-11", *Jpn. J. Cancer Res.* 86 (1995) 111-116.
- [6] T.G. Burke, C.B. Munshi, Z.H. Mi, Y. Jiang, "The important role of albumin in determining the relative human blood stabilities of the camptothecin anticancer drugs", *J. Pharm. Sci.* 84 (1995) 518-519.
- [7] F. Lokiec, P. Canal, C. Gay, E. Chatelut, J.P. Armand, H. Roche, R. Bugat, E. Goncalves, A. Mathieu-Boue, "Pharmacokinetics of irinotecan and its metabolites in human blood, bile and urine", *Cancer Chemother. Pharmacol.* 36 (1995) 79-82.
- [8] J.G. Slatter, L.J. Schaaf, J.P. Sams, K.L. Feenstra, M.G. Johnson, P.A. Bombardt, K.S. Cathcart, M.T. Verburg, L.K. Pearson, L.D. Compton, D.S. Millar, L.L. Baker, C.V. Pesheck, R.S. Lord, "Pharmacokinetics, metabolism, and excretion of irinotecan (CPT-11) following I.V. infusion of [(14)C]CPT-11 in cancer patients", *Drug Metab. Dispos.* 28 (2000) 423-433.
- [9] T. Itoh, I. Takemoto, S. Itagaki, K. Sasaki, T. Hirano, K. Iseki, "Biliary excretion of irinotecan and its metabolites", *J. Pharm. Pharmacol. Sci.* 7 (2004) 13-18.
- [10] E. Gupta, A.R. Safa, X. Wang, M.J. Ratain, "Pharmacokinetic modulation of irinotecan and metabolites by cyclosporin A", *Cancer Res.* 56 (1996) 1309-1314.

- [11] M.I. Rodríguez-Cáceres, D. Bohoyo Gil, I. Durán-Merás, M.C. Hurtado-Sánchez, "Spectrofluorimetric determination of SN-38, a promising new antitumor agent, in the presence and absence of organized media", *Appl. Spectrosc.* 65 (2011) 298-306.

I.2.2. Artículo científico 1

Analytical Sciences, 27 (2011) 745-749

“First-order multivariate calibration applied to the simultaneous fluorometric determination of the anticancer agents CPT-11 and SN-38 in serum and urine samples”

**Isabel Durán Martín-Merás, María Isabel Rodríguez-Cáceres,
María del Carmen Hurtado-Sánchez**

Abstract

The first-order multivariate calibration method was used for the simultaneous determination of the camptothecin derivative, CPT-11, and its main metabolite, SN-38. The method is based on the fluorescence emission of these compounds in acidic media (acetate buffer, pH 4.75) and in the presence of ethanol (50%). The experimental calibration matrix was constructed with 12 samples using a central composite design. The cross-validation method was used for selecting the optimum number of factors. The results showed that simultaneous determination could be performed in the range 0.08-1.50 and 0.10-0.40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for CPT-11 and SN-38, respectively. The method was successfully applied to the simultaneous determination of both analytes in human urine and in serum samples previously extracted with chloroform.

1. Introduction

Irinotecan (CPT-11) is a water-soluble derivative of camptothecin used mainly in the treatment of the colorectal cancer, although responses have been observed also in lung, cervical and ovarian cancer. Following the administration of CPT-11 *in vivo*, the dipiperidino moiety is cleaved by serum and tissue esterases [1,2], yielding the main metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38). This compound is 100-to-1000-fold more active *in vitro* than CPT-11 itself [3]. The plasma pharmacokinetics

of CPT-11 in humans has been addressed in several studies. After administration, peak plasma concentration was reached at the end of infusion with a rapid decrease as a result of different elimination pathways.

Depending on the enzyme system, different metabolites can appear, such as SN-38, APC (7-ethyl-10-[4-N-(5-aminopentanoic acid)-1-piperidino]carbonyloxycamptothecin) or NPC (7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-amino]carbonyloxycamptothecin). The excretion in humans is through the urine, feces and bile. In urine, CPT-11 and SN-38 are the main compounds detected, with CPT-11 accounting for about 10-22% of the administered dose and SN-38 contributing only 0.18-0.43% [4].

At physiological pH, CPT-11 and SN-38 exist in two distinguishable forms, an active lactone ring (closed form) and an inactive hydroxyl acid (ring-opened form). For that reason, several methodologies have been developed for the quantitation of both forms of CPT-11 and SN-38 [5-11]. It has been demonstrated that the biological activities of CPT-11 and SN-38 both *in vitro* and *in vivo* are significantly greater for the lactone than for the carboxylate species and that stabilization of the DNA-topoisomerase complex, which is considered to mediate the tumour inhibitory activity of camptothecins, requires the drug to be present in the lactone form [12].

In general, high-performance liquid chromatography (HPLC) has been used for the resolution of the mixture using mass spectrometry [13-15], fluorescence detection [16-19] or both connected in parallel [20]. Most of the developed methods have been applied to biological fluids. The sample preparation has been performed either by fast deproteinization of chilled blood sample in cold methanol [8], cold methanol-acetonitrile [9,11,17] or by regular solid-phase extraction on disposable extraction columns [21,22] or by liquid-liquid extraction [23,24].

Both CPT-11 and SN-38 present native fluorescence which has been the base for the development of several analytical methods. Thus, Rodríguez-Cáceres *et al.* [25] studied the fluorescent characteristics of CPT-11 in both acidic and basic media. They proposed the determination of CPT-11 in the presence of oxidant agents and metal ions with limits of detection between 0.46 and 2.57 ng mL⁻¹. The spectrofluorometric methods were applied to human urine and no pretreatment of the sample was necessary; only a dilution 1:20 with water was made. On the other hand, photoinduced spectrofluorometry and multivariate calibration have been used for the

resolution of the mixture of CPT-11 and leucovorin [26]. Among the multivariate methods, parallel factor analysis (PARAFAC), multiway partial least-squares (N-PLS) or bilinear least-squares (BLLS) were used. Direct determination of mixtures of both drugs in urine was accomplished on the basis of excitation-emission matrices and the three-way multivariate methods.

Although molecular fluorescence allows high sensitivity and moderate selectivity, in complex samples, spectral overlap is often a serious limitation and separation procedures are necessary to apply univariate spectrofluorometric methods. The application of multivariate calibration techniques has resulted in improved applicability, precision and accuracy in multicomponent spectral analysis. Assuming a linear relationship between concentration and fluorescence intensity, researchers reported that partial least squares (PLS) has been successful in the quantitative analysis of multicomponent mixtures even in those cases where there is strong overlap of the spectral features [27-29].

The interest in the determination of these compounds is related to the fact that both can be present in the patients receiving a treatment of CPT-11 as intravenous infusion, due to the fact that CPT-11 is a prodrug that requires metabolic activation to SN-38.

In this paper, a chemometric model based on the application of a PLS method is proposed for the determination of CPT-11 and its main metabolite SN-38. The results obtained show that the direct fluorometric analysis with a multivariate calibration technique can be an alternative and fast method for the determination of both analytes.

2. Experimental

2.1. Reagents and chemicals

All experiments were performed with analytical reagent grade chemicals. Stock solutions of CPT-11 and SN-38 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), containing 126 and 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectively, were prepared in methanol. Working solutions were daily prepared by appropriate dilution in water. Acetic acid/sodium acetate buffer solution (1.0 mol L^{-1}) was prepared by dissolving the suitable amount of sodium acetate

(Scharlau, Barcelona, Spain) with ultrapure water and adjusting the pH of the resulting solution to the desired pH with hydrochloric acid (Scharlau). HClO₄ 5% (Panreac, Barcelona, Spain) was prepared by dilution in ultrapure water. Ethanol and chloroform, used in extraction of samples, were purchased from Panreac. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q Integral A10 system.

2.2. Apparatus and software

Fluorescence measurements were made using a fluorescence spectrophotometric Varian Model Cary Eclipse, equipped with two Czerny-Turner monochromators (excitation and emission), a xenon light source and two photomultiplier tubes as detectors. Excitation and emission bandwidths of 2.5 and 5 nm, respectively, were used in these studies. The emission spectra were registered at $\lambda_{\text{exc}} = 377$ nm. A Crison MicropH 501 meter (Barcelona, Spain) furnished with a combined glass/saturated calomel electrode was used for pH measurements. The pH meter was calibrated with two buffers at pH 4.00 and 7.02.

The software package THE UNSCRAMBLER® v6.11 (CAMO A/S Olav Tryggvasonsgt, N-7011, Trondheim, Norway), running under Windows XP, was used for the experimental design. All calculations were done with MatLab 5.3, using MVC1 routine (First-Order MultiVariate Calibration) [30] and the program ACOC [31] for the statistical analysis.

2.3. Procedure for the simultaneous determination in urine

In this work, the method of external calibration has been employed. For this purpose a calibration set was constructed (12 samples) using a central composite design with the central point replicated three times. The levels correspond to values in the ranges 0.08-1.50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for CPT-11 and 0.10-0.40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for SN-38.

CPT-11 and SN-38 binary mixtures were prepared as follows: aliquots of 9.0 mL of human urine were placed in a separating funnel and spiked with appropriate volumes of CPT-11 and SN-38. Then, the pH was adjusted to 4.75 with 1.0 mL of acetic/acetate buffer solution (1,0 mol L⁻¹) and ultrapure water was added to complete 10 mL. This solution was extracted with 10 mL of chloroform by vigorous

shaking for 90 s. The organic phase was evaporated to dryness at 40 °C in a water bath under vacuum. The residues were re-dissolved in 5.0 mL of absolute ethanol, and 1.0 mL acetic acid/sodium acetate buffer 1.0 mol L⁻¹ and pH 4.75 and ultrapure water was added up to 10.0 mL. The corresponding emission spectra were registered between 380 and 670 nm exciting at 377 nm. The optimized calibration model for PLS method was applied to the spectra of the samples to calculate the concentration of each chemical in the mixture.

2.4. Procedure for the simultaneous determination in serum

The sample, a pool of serum, was stored frozen until analysis. Before analysis, the samples were thawed and homogenized. Then, 1.0 mL of serum was spiked with known concentrations of CPT-11 and SN-38 and 500 µL of 5% HClO₄ were added. The samples were then extracted twice with 5.0 mL chloroform by vigorous mixing for 45 s. After centrifugation at 10000 *g* for 10 min at room temperature, the lower organic layers were carefully removed, combined, and mixed. After that, chloroform was evaporated to dryness at 40 °C in a water bath under vacuum. The residues were re-dissolved with 1.5 mL of ethanol; then 300 µL of acetate buffer solution and ultrapure water to a final volume of 3 mL were added. Finally, the solution was filtered through a nylon filter 0.2 µm in diameter. The fluorescence emission spectra were recorded between 380 and 670 nm, exciting at 377 nm, and used as the analytical signal to make the calibration. The analysis was carried out in triplicate.

3. Results and Discussion

In a previous paper, the luminescence characteristics of SN-38 were examined and several spectrofluorometric methods for the analysis of lactone (acidic medium) and carboxylate (basic medium) forms of SN-38 in absence and the presence of organized media have been proposed [32]. Now, we explain the resolution of the binary mixture of CPT-11 and its metabolite SN-38. The emission spectra of aqueous solutions of CPT-11 and SN-38 at pH 5 are shown in Fig. 1.

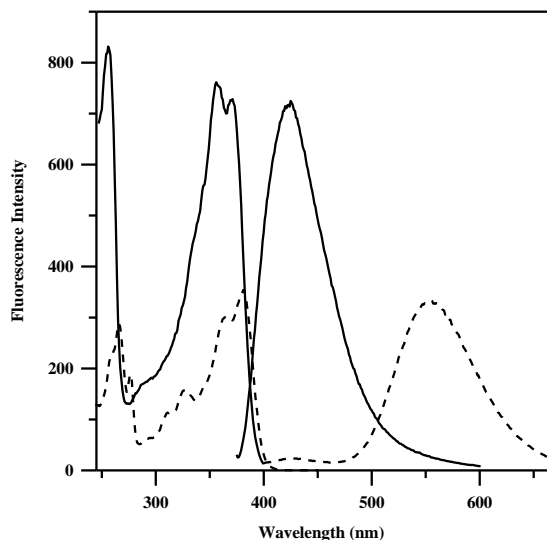


Figure 1. Excitation and emission spectra of CPT-11 (continuous line), SN-38 (dashed line). $[CPT-11] = [SN-38] = 0.50 \mu\text{g mL}^{-1}$; $\lambda_{\text{exc}} / \lambda_{\text{em}} (CPT-11) = 368/426 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}} (SN-38) = 377/556 \text{ nm}$; pH 5 (sodium acetate, 0.1 M); EtOH/H₂O (50:50, v/v).

As can be seen in Fig. 1, CPT-11 shows an emission maximum at 423 nm, while SN-38 shows an emission maximum at 556 nm. The spectral characteristics of both compounds seem to be sufficiently different to allow the determination of both analytes without interferences of each other. However, the low signal that CPT-11 presents at 556 nm interferes in the determination of SN-38; for this reason, first-derivative fluorescence was used to resolve the mixture. Emission spectra were smoothed using the Savitzky-Golay method (15 experimental points) and first-derivative spectra were obtained ($\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$), as can be seen in Fig. 2. Using the zero crossing technique, CPT-11 can be determined at 392 nm, where the signal of SN-38 is practically zero, and SN-38 can be determined at 590 nm. Calibration graphs were constructed for both analytes alone and in the presence of the other as interference. When the slopes of the calibration graphs of SN-38 in the presence and in the absence of CPT-11 were compared with a *t*-test and a *F*-test, for a confidence level of 95%, using the program ACOC [31], interference of CPT-11 in the determination of SN-38 could be observed. For this reason, the resolution of the mixture is not possible using a first-derivative method.

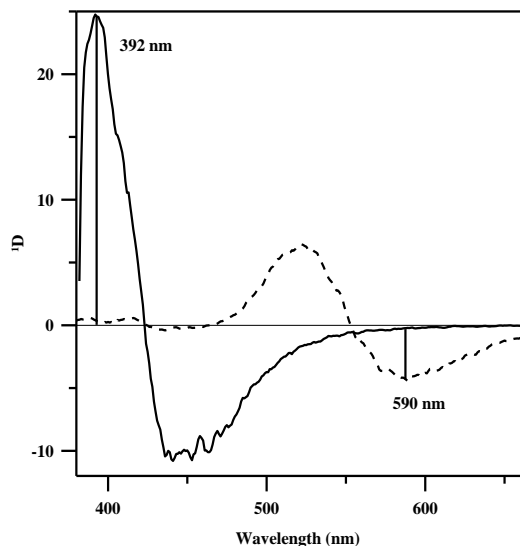


Figure 2. First-derivative spectra of CPT-11 (continuous line) and SN-38 (dashed line). [CPT-11] = [SN-38] = 0.50 $\mu\text{g mL}^{-1}$; λ_{exc} = 377 nm, pH 5 (sodium acetate, 0.1 M), EtOH/H₂O (50:50, v/v).

Secondly, synchronous fluorescence was assayed. Total luminescence spectra of both compounds, in the form of an excitation-emission matrix (EEM) were recorded and later contour plots were obtained. Due to the larger separation between the two maxima (133 nm), it was impossible to find a compromise value to pass as close as possible near the maxima of the two analytes of the mixture. For all of those reasons, the study was performed by application of chemometric methods.

3.1. Selection of the optimum number of factors and statistical parameters

PLS-1 method was employed to perform the determination. It is well known that PLS performs the spectral factoring, by trying to account for the spectral variation, while assuming that the new basis vectors relate to the calibration concentrations. PLS-1 is used to calibrate one simple chemical constituent at a time. The data set was composed with the emission spectra. To establish a quantitative model for the system. We prepared 12 calibration samples containing different

amounts of CPT-11 and SN-38 using a central composite design. The composition of the calibration matrix is collected in Table 1. The spectral region between 380 and 670 nm was selected for the analysis.

Table 1. Composition of the different mixtures used in the calibration set for the determination of CPT-11 and SN-38 by PLS-1 method.

Calibration set	[CPT-11] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	[SN-38] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	0.00	0.28
2	1.79	0.28
3	0.79	0.00
4	0.79	0.52
5	0.08	0.10
6	1.50	0.10
7	0.08	0.45
8	1.50	0.45
9	0.79	0.28
10	0.79	0.28
11	0.79	0.28
12	0.00	0.00

Due to SN-38 shows lower fluorescence than CPT-11, the emission spectra were recorded by exciting at 377 nm, which is the wavelength maximum of SN-38. The selection of the number of principal components or factors to be used in the calibration with the PLS algorithms is very important in order to achieve the best predictions. This allows modeling the system with the optimum amount of information, avoiding overfitting. The cross-validation procedure was applied, consisting of systematically removing one of the training samples in turn, and using only the remaining ones for construction of the latent factors and regression. The predicted concentrations were then compared with the actual ones for each of the calibration samples, and the predicted error sum of squares, PRESS, was calculated. The PRESS was computed in the same manner, each time a new factor was added to the PLS model.

To select the optimum number of factors, the criterion proposed by Haaland and Thomas [33,34] was used. The number of factors for the first PRESS value that

had an F-ratio probability falling below 0.75 was selected as the optimum. In our case, the value of F corresponding to a probability < 0.75 yield an optimum number of factors of 2 for both components. Once the optimal number of factors is determined, it is necessary to perform the final calibration, using all the calibration samples with the optimal number of factors. The statistical results obtained for two analytes are summarized in Table 2. The values of the square of the correlation coefficient (R^2) and the relative error of prediction (REP) are included in order to give an indication both of the average error in the analysis and the quality of fit of all data to a straight line for each component.

Table 2. Statistical parameters of the PLS-1 methods using the spectral data set.

Component	Nº Factors	PRESS	p	REP (%)	R^2
CPT-11	2	1.06×10^{-2}	0.50	4.01	0.998
SN-38	2	2.44×10^{-3}	0.50	5.71	0.993

In order to test the performance of the proposed method, we applied it to the determination of artificial mixtures containing various concentrations of both compounds. The above mentioned model was used to predict the concentration of the analytes in synthetic mixtures. Results are summarized in Table 3. As can be seen, the amounts added and found were consistent for all of the mixtures tested. The mean recovery values are 99.2 and 99.9% for CPT-11 and SN-38, respectively. The results can be considered satisfactory keeping in mind the spectral overlapping between CPT-11 and SN-38.

Table 3. Recovery of CPT-11 and SN-38 in synthetic mixtures.

Added ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Found ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		% Recovery	
<i>CPT-11</i>	<i>SN-38</i>	<i>CPT-11</i>	<i>SN-38</i>	<i>CPT-11</i>	<i>SN-38</i>
0.80	0.15	0.78	0.16	97.5	106.7
0.60	0.40	0.58	0.39	96.7	97.5
0.90	0.20	0.94	0.20	104.4	100.0
1.00	0.30	0.97	0.31	97.0	103.3
1.30	0.30	1.32	0.29	101.5	96.7
1.50	0.45	1.47	0.43	98.0	95.6

3.2. Application of the method to urine and serum samples

The proposed method has been applied to the determination of CPT-11 and SN-38 in human urine and serum samples, spiked with these compounds, due to the difficulty to obtain real samples.

In accordance with previous studies [4], the administered dose of CPT-11 varies between 100 and 350 mg m⁻². In urine, and within 24 h after CPT-11 administration, it has been found that about 10-22% of the administered dose has been eliminated as CPT-11 and about 0.18-0.43% as SN-38. In serum, the pharmacokinetics of CPT-11 is slightly different [35] and the concentrations varied between 10⁻³-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for CPT-11 and between 5x10⁻⁴-0.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for SN-38. Accordingly, the recovery from urine samples was determined with three different concentrations, comprised between 0.5-1.5 and 0.15-0.45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for CPT-11 and SN-38, respectively. Serum samples were spiked with concentrations between 0.08-1.5 and 0.10-0.40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, for CPT-11 and SN-38, respectively.

The percentages of recoveries found by application of the PLS-1 calibration method to the emission spectral data in urine and serum samples are shown in Tables 4 and 5, respectively. Three spectra of three different samples, at the same concentration, were used for each concentration level included in Tables 4 and 5. As can be seen, the agreement between calculated and experimental values is good. The mean recovery was between 92 and 108% for CPT-11 and between 93 and 102% for SN-38.

Table 4. Recovery of CPT-11 and SN-38 in urine samples.

Added ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Found ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		% Recovery	
<i>CPT-11</i>	<i>SN-38</i>	<i>CPT-11</i>	<i>SN-38</i>	<i>CPT-11</i>	<i>SN-38</i>
		0.57	0.15		
0.50	0.15	0.51	0.14	106 (7)	96 (4)
		0.51	0.14		
		1.00	0.28		
1.00	0.30	1.13	0.29	108 (7)	96 (2)
		1.11	0.29		
		1.48	0.42		
1.50	0.45	1.44	0.39	98 (2)	93 (6)
		1.47	0.44		

^aSD: Standard deviation.

Table 5. Recovery of CPT-11 and SN-38 in serum samples.

Added ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Found ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		% Recovery	
<i>CPT-11</i>	<i>SN-38</i>	<i>CPT-11</i>	<i>SN-38</i>	<i>CPT-11</i>	<i>SN-38</i>
		0.67	0.43		
0.75	0.50	0.77	0.53	98 (8)	93 (9)
		0.77	0.43		
		0.97	0.60		
1.00	0.60	1.10	0.62	105 (7)	101 (2)
		1.07	0.60		
		1.30	0.43		
1.50	0.40	1.43	0.40	92 (2)	102 (4)
		1.40	0.40		

^aSD: Standard deviation.

Detection limits are not directly calculated by MVC1, although they can be calculated indirectly. The limit of detection corresponds to the concentration (calculated with α and β probability of error) derived from the instrumental response at zero concentration level (calculated with an α probability of error) [30]. In our case, the limit of detection in urine and in serum was defined as the concentration that

gave a signal three times greater than the background noise. Their values were calculated with samples of each biological fluid in the absence of the analytes. The emission spectra were then recorded, and the data obtained were subject to first-order analysis. The values found in urine samples are 0.062 and 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for CPT-11 and SN-38, respectively. In serum samples the values of LOD are 0.045 and 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for CPT-11 and SN-38, respectively.

4. Conclusions

The above results show that PLS is an excellent calibration method for the simultaneous determination of CPT-11 and SN-38, based on the differences in their emission spectra. In this work, a method for the simultaneous determination of CPT-11 and SN-38 in urine and serum samples is proposed. In both cases, the agreement between calculated and experimental values was acceptable, obtaining recoveries between 92 and 108%. For the first time, the mixture of CPT-11 and SN-38 has been resolved using fluorescence spectroscopy and chemometric methods. Although chromatographic methods are frequently used to determine these analytes, they are both more time consuming and more expensive than the procedure here developed.

References

- [1] N. Kaneda, H. Nagata, T. Furuta, T. Yokokura, "Metabolism and pharmacokinetics of the camptothecin analogue CPT-11 in the mouse", *Cancer Res.* 50 (1990) 1715-1720.
- [2] T. Tsuji, N. Kaneda, K. Kado, T. Yokokura, T. Yoshimoto, D. Tsuru, "CPT-11 converting enzyme from rat serum: purification and some properties", *J. Pharmacobio-Dyn.* 14 (1991) 341-349.
- [3] Y. Kawato, M. Aonuma, Y. Hirota, H. Kuga, K. Sato, "Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11", *Cancer Res.* 51 (1991) 4187-4191.
- [4] R.H.J. Mathijssen, R.J. van Alphen, J. Verweij, W.J. Loos, K. Nooter, G. Stoter, A. Sparreboom, "Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11)", *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 2182-2194.

- [5] X.X. Yang, Z.P. Hu, S.Y. Chan, B.C. Goh, W. Duan, E. Chan, S.F. Zhou, "Simultaneous determination of the lactone and carboxylate forms of irinotecan (CPT-11) and its active metabolite SN-38 by high performance liquid chromatography: application to plasma pharmacokinetic studies in the rat", *J. Chromatogr. B* 821 (2005) 221-228.
- [6] K. Sano, M. Yoshikawa, S. Hayasaka, K. Satake, Y. Ikegami, H. Yoshida, T. Ishikawa, S. Sawada, S. Tanabe, "Simple non-ion-paired high-performance liquid chromatographic method for simultaneous quantitation of carboxylate and lactone forms of 14 new camptothecin derivatives", *J. Chromatogr. B* 795 (2003) 25-34.
- [7] T.S. Owens, H. Dodds, K. Fricke, S.K. Hanna, K.R. Crews, "High-performance liquid-chromatographic assay with fluorescence detection for the simultaneous measurement of carboxylate and lactone forms of irinotecan and three metabolites in human plasma", *J. Chromatogr. B* 788 (2003) 65-74.
- [8] D.F. Chollet, L. Goumaz, A. Renard, G. Montay, L. Vernillet, V. Arnera, D.J. Mazzo, "Simultaneous determination of the lactone and carboxylate forms of the camptothecin derivative CPT-11 and its metabolite SN-38 in plasma by high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. B* 718 (1998) 163-175.
- [9] V.M.M. Herben, D. Mazee, D.M. van Gortel-van Zomeren, S. Zeedijk, H. Rosing, J.H.M. Schellens, W.W. ten Bokkel Huinink, J.H. Beijnen, "Sensitive determination of the carboxylate and lactone forms of the novel antitumor drug irinotecan and its active metabolite in plasma by HPLC", *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 21 (1998) 1541-1558.
- [10] N. Kaneda, Y. Hosokawa, T. Yokokura, "Simultaneous determination of the lactone and carboxylate forms of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38), the active metabolite of irinotecan (CPT-11), in rat plasma by high performance liquid chromatography", *Biol. Pharm. Bull.* 20 (1997) 815-819.
- [11] L.P. Rivory, J. Robert, "Reversed-phase high-performance liquid-chromatographic method for the simultaneous quantitation of the carboxylate and lactone forms of the camptothecin derivative irinotecan, CPT-11, and its metabolite SN-38 in plasma", *J. Chromatogr. B* 661 (1994) 133-141.
- [12] W.J. Slichemeyer, E.K. Rowinsky, R.C. Donehower, S.H. Kaufmann, "The current status of camptothecin analogues as anti-tumor agents", *J. Natl. Cancer Inst.* 85 (1993) 271-291.

- [13] W. Zhang, G.E. Dutschman, X. Li, M. Ye, Y.C. Cheng, "Quantitation of irinotecan and its two major metabolites using a liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry", *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 3038-3044.
- [14] S. Khan, A. Ahmad, I. Ahmad, "A sensitive and rapid liquid chromatography tandem mass spectrometry method for quantitative determination of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) in human plasma containing liposome-based SN-38 (LE-SN38)", *Biomed. Chromatogr.* 17 (2003) 493-499.
- [15] S. Ragot, P. Marquet, F. Lachatre, A. Rousseau, E. Lacassie, J.M. Gaulier, J.L. Dupuy, G. Lachatre, "Sensitive determination of irinotecan (CPT-11) and its active metabolite SN-38 in human serum using liquid-chromatography-electrospray mass spectrometry", *J. Chromatogr. B* 736 (1999) 175-184.
- [16] Z.Q. Zhang, J. Yao, X.T. Wu, J.J. Zou, J.B. Zhu, "An accurate assay for simultaneous determination of irinotecan and its active metabolite SN-38 in rat plasma by LC with fluorescence detection", *Chromatographia* 70 (2009) 399-405.
- [17] S. Poujol, F. Pinguet, F. Malosse, C. Astre, M. Ychou, S. Culine, F. Bressolle, "Sensitive HPLC-fluorescence method for irinotecan and four major metabolites in human plasma and saliva: application to pharmacokinetic studies", *Clin. Chem.* 49 (2003) 1900-1908.
- [18] F.A. de Jong, R.H.J. Mathijssen, P. de Bruijn, W.J. Loos, J. Verweij, A. Sparreboom, "Determination of irinotecan (CPT-11) and SN-38 in human whole blood and red blood cells by liquid chromatography with fluorescence detection", *J. Chromatogr. B.* 795 (2003) 383-388.
- [19] P. de Bruijn, J. Verweij, W.J. Loos, K. Nooter, G. Stoter, A. Sparreboom, "Determination of irinotecan (CPT-11) and its active metabolite SN-38 in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection", *J. Chromatogr. B* 698 (1997) 277-285.
- [20] K. Sai, N. Kaniwa, S. Ozawa, J.-I. Sawada, "An analytical method for irinotecan (CPT-11) and its metabolites using a high-performance liquid chromatography: parallel detection with fluorescence and mass spectrometry", *Biomed. Chromatogr.* 16 (2002) 209-218.
- [21] I. Barilero, D. Gandia, J.P. Armand, A. Mathieu-Boué, M. Ré, A. Gouyette, G.G. Chabot, "Simultaneous determination of the camptothecin analogue CPT-11 and its active metabolite SN-38 by high-performance liquid chromatography: application to plasma pharmacokinetic studies in cancer patients", *J. Chromatogr. B* 575 (1992) 275-280.

- [22] A. Kurita, N. Kaneda, "High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of the camptothecin derivative irinotecan hydrochloride, CPT-11, and its metabolites SN-38 and SN-38 glucuronide in rat plasma with a fully automated on-line solid-phase extraction system, PROSPEKT", *J. Chromatogr. B* 724 (1999) 335-344.
- [23] P. de Bruijn, J. Verweij, W.J. Loos, K. Nooter, G. Stoter, A. Sparreboom, "Determination of irinotecan (CPT-11) and its active metabolite SN-38 in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection", *J. Chromatogr. B* 698 (1997) 277-285.
- [24] W.J. Loos, A. Sparreboom, J. Verweij, K. Nooter, G. Stoter, J.H.M. Schellens, "Determination of the lactone and lactone plus carboxylate forms of 9-aminocamptothecin in human plasma by sensitive high-performance liquid chromatography with fluorescence detection", *J. Chromatogr. B* 694 (1997) 435-441.
- [25] M.I. Rodríguez-Cáceres, I. Durán-Merás, N.E. Ornelas Soto, P.L. López de Alba, L. López Martínez, "Spectrofluorimetric determination of irinotecan in the presence of oxidant agents and metal ions", *Talanta* 74 (2008) 1484-1891.
- [26] M.I. Rodríguez-Cáceres, I. Durán-Merás, N.E. Ornelas Soto, P.L. López de Alba, L. López Martínez, "Determination of anticarcinogenic and rescue therapy drugs in urine by photoinduced spectrofluorimetry using multivariate calibration: comparison of several second-order methods", *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 1119-1127.
- [27] M. del Olmo, C. Díez, A. Molina, I. de Orbe, J.L. Vilchez, "Resolution of phenol, *o*-cresol, *m*-cresol and *p*-cresol mixtures by excitation fluorescence using partial least-squares (PLS) multivariate calibration", *Anal. Chim. Acta* 335 (1996) 23-33.
- [28] A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, D. González Gómez, "Partial least squares multicomponent fluorimetric determination of fluoroquinolones in human urine samples", *Talanta* 62 (2004) 853-260.
- [29] A. Espinosa-Mansilla, I. Durán-Merás, R. Galian, "Simultaneous fluorimetric determination of pteridin derivatives: comparison between synchronous, partial least-squares and hybrid linear analysis methods", *Appl. Spectrosc.* 55 (2001) 701-707.
- [30] A.C. Olivieri, H.C. Goicochea, F.A. Iñón, "MCV1: an integrated MatLab toolbox for first-order multivariate calibration", *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 73 (2004) 189-197.

- [31] 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. Educator* 10 (2005) 1-9.
- [32] M.I. Rodríguez-Cáceres, D. Bohoyo Gil, I. Durán-Merás, M.C. Hurtado-Sánchez, "Spectrofluorimetric determination of SN-38, a new promising antitumor agent, in the presence and absence of organized media", *Appl. Spectrosc.* 65 (2011) 298-306.
- [33] 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.
- [34] D.M. Haaland, E.V. Thomas, "Partial Least-Squares methods for spectral analyses. 2. Application to simulated and glass spectral data", *Anal. Chem.* 60 (1988) 1202-1208.
- [35] J. Escoriza, A. Aldaz, C. Castellanos, E. Calvo, J. Giráldez, "Simple and rapid determination of irinotecan and its metabolite SN-38 in plasma by high-performance liquid chromatography: application to clinical pharmacokinetic studies", *J. Chromatogr. B* 740 (2000) 159-168.

I.2.3. Discusión del artículo científico 1

Como se ha señalado en el artículo, el CPT-11 y su principal metabolito, el SN-38, son compuestos fluorescentes. Ambos presentan máximos de emisión a 423 nm y 377 nm, respectivamente. Sin embargo, a pesar de la gran diferencia existente entre ellos, la determinación simultánea de ambos no puede llevarse a cabo mediante fluorescencia clásica, debido a que el CPT-11 emite radiación a la longitud de onda de máxima emisión del SN-38, interfiriendo en la determinación del mismo, y viceversa. Por ello, se intentó llevar a cabo la resolución de la mezcla por fluorescencia derivada y sincrónica, estudiando varias posibilidades, pero en ningún caso se obtuvieron buenos resultados, por lo se recurrió a técnicas de calibración multivariante. Finalmente, para la resolución de esta mezcla se empleó el programa MVC1 (*First-Order Multivariate Calibration*), con el que se lleva a cabo una calibración multivariante de primer orden mediante el algoritmo PLS, que permite realizar tanto validaciones cruzadas como calibraciones y predicciones de muestras desconocidas.

Optimización del método con el algoritmo PLS

PLS presenta varias ventajas importantes ya que emplea datos espectrales completos, una característica fundamental para la resolución de mezclas complejas de varios analitos y, además, permite que los procedimientos analíticos puedan llevarse a cabo en un corto período de tiempo. Sin embargo, este algoritmo es sensible a la presencia de interferencias no modeladas en la etapa de calibración, lo cual puede conducir a errores en las predicciones de analitos presentes en muestras complejas donde existen multitud de sustancias que pueden actuar como potenciales interferentes produciendo una señal de fondo, que solape con la de los compuestos de interés. Por este motivo, en este trabajo, dada la complejidad de las muestras biológicas a las que se pretende aplicar el método, fue necesario optimizar previamente la extracción de ambos analitos de dichas muestras.

En trabajos anteriores llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, se estudiaron las condiciones óptimas (pH, disolvente, etc.) en las que el SN-38 y el CPT-11 exhiben su máxima fluorescencia. En ambos casos, los estudios realizados pusieron de manifiesto que ambos mostraban más señal en su forma lactona, particularmente cuando el pH del medio se fijaba en 4,00, en el caso del CPT-11, y en

4,75 en el caso del SN-38, siempre con disolución reguladora acético/acetato sódico 0,1 M; y en medio hidroetanólico, concretamente cuando la composición del mismo tenía una relación etanol:agua 50:50 (v/v). Por este motivo, los patrones utilizados tanto para la construcción de la matriz de calibración, como para realizar la posterior validación del método fueron preparados en estas condiciones. Además, es importante destacar que, como se explicará a continuación, ambos se sometieron a una etapa de extracción con cloroformo, seguida de la posterior eliminación del disolvente y reconstitución del extracto obtenido en las condiciones óptimas mencionadas. Finalmente, el espectro de emisión empleado como señal analítica se registró en todos los casos excitando a la longitud de onda de máxima absorción del SN-38, puesto que es el analito menos fluorescente de los dos estudiados.

Para la determinación del número óptimo de factores se siguió el criterio propuesto por Haaland y Thomas anteriormente mencionado, según el cual el número óptimo de factores es el correspondiente al primer valor del *PRESS* cuya probabilidad para la razón *F* es menor que 0,75. Para ambos analitos se seleccionó un número óptimo de factores igual a 2 por cumplirse este criterio.

Análisis de CPT-11 y SN-38 en orina y suero

Dada la dificultad de obtener muestras reales de orina procedentes de pacientes con cáncer, el método propuesto se aplicó a muestras de orina de personas sanas contaminadas con CPT-11 y SN-38. Como está descrito en la introducción, el CPT-11 se excreta en orina entre un 10 y 22% de la dosis administrada, mientras que el SN-38 contribuye sólo con un 0,18-0,43%, detectándose prácticamente en su totalidad en las 24 horas siguientes a la administración del profármaco. La dosis de CPT-11 administrada a pacientes con cáncer de colon metastático varía entre 100 y 350 mg m⁻², por lo que, para conocer cuál es la dosis óptima para un paciente, es necesario conocer el área superficial de éste. Para hacer este cálculo se utilizan los nomogramas, que son tablas de tres columnas que correlacionan la altura y el peso de una persona. La altura del paciente se sitúa en la columna de la izquierda y el peso en la de la derecha, y se utiliza una regla para dibujar una línea entre las dos columnas. El punto en el cual la línea intercepta la columna del medio representa el área superficial del paciente. Así, por ejemplo, si un paciente tiene un peso de 80 kg y una altura de

1,76 m, su área superficial es de 2 m². Para este paciente, la dosis que se debe administrar debería ser:

$$\text{Dosis} = 100 - 350 \text{ mg m}^{-2} \times 2 \text{ m}^2 = 200 - 700 \text{ mg de CPT-11}$$

Teniendo en cuenta que sólo el 0,18-0,43% de ésta dosis es excretada en forma de SN-38 en las primeras 24 horas, el rango de concentración de SN-38 que se debe estudiar estará comprendido entre 0,15-0,45 µg mL⁻¹ si se administra la dosis mínima de CPT-11 (por ejemplo, en el régimen de Saltz, que es uno de los tratamientos de primera línea más empleado), el cual coincide con el rango de linealidad establecido en nuestro método.

En el caso del CPT-11, dado que su excreción en orina es considerablemente mayor, los niveles de este compuesto excretados en ella son del orden de los 10-30 µg mL⁻¹, siendo necesario realizar una dilución de la muestra para poder cuantificarlo mediante el método propuesto. Por este motivo, no es viable la determinación de ambos compuestos simultáneamente en los niveles en los que realmente se encuentran en la orina, por lo que las concentraciones de CPT-11 con las que se trabajó para poder validar la aplicación del método a muestras reales estuvieron comprendidas entre 0,50 y 1,50 µg mL⁻¹.

Como se ha explicado anteriormente, PLS presenta como limitación importante la incapacidad de determinar los analitos de interés en muestras que puedan contener sustancias no calibradas. En este caso, puesto que se ha utilizado la orina sin diluir, es probable que exista interferencia por parte de la matriz de la misma, por lo que la extracción de los analitos de interés se presenta como un paso necesario.

En un trabajo previo se optimizó un proceso de extracción líquido-líquido sencillo para el análisis de SN-38 en muestras de orina. Este consistió en la extracción de un determinado volumen de orina, cuyo pH se había fijado en 4,75, con el mismo volumen de cloroformo agitando durante 90 segundos y, posteriormente, en la eliminación del disolvente orgánico con un rotavapor para finalmente reconstituir el residuo seco obtenido en aquellas condiciones donde el SN-38 manifestaba su máxima fluorescencia (pH 4,75 y 50% de EtOH). De esta forma la recuperación obtenida para este analito fue del 100%. Para comprobar si el CPT-11 se extrae en las mismas condiciones, se aplicó la misma metodología a una orina contaminada con 1,50 µg mL⁻¹ de este compuesto y se registró su espectro de emisión. Sin embargo,

cuando este espectro se comparó con el de un patrón de CPT-11 de la misma concentración y en las mismas condiciones, se observó que su extracción no era completa. Una ligera modificación del pH fijado en la muestra de orina que va a ser extraída con cloroformo, de 4,75 a 5,00, fue suficiente para incrementar la recuperación del analito hasta valores cercanos al 100%, por lo que finalmente el pH de las muestras se fijó en 5,00. A pesar de esto, cuando los dos analitos fueron extraídos conjuntamente, el porcentaje de recuperación de ambos disminuyó. Se comprobó que el mismo hecho tenía lugar en la extracción de patrones acuosos, por lo que los patrones de calibración se sometieron al mismo proceso de extracción que las muestras de orina analizadas posteriormente, con el objetivo de corregir esta extracción incompleta, y que no interfiriera en la posterior determinación de los compuestos.

En cuanto al suero, en la bibliografía se recoge que la concentración en la que ambos analitos pueden encontrarse presente está comprendida entre 10^{-3} - $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ en el caso del CPT-11, y $0,50 \times 10^{-3}$ - $0,40 \mu\text{g mL}^{-1}$ en el caso del SN-38. Sin embargo, dada la limitación en cuanto a sensibilidad del método propuesto, los rangos de ambos analitos que se estudiaron en suero fueron $0,08$ - $1,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $0,10$ - $0,40 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. En este caso para la extracción de los analitos de interés también se optó por realizar una extracción líquido-líquido con cloroformo, pero fue necesario realizar la precipitación de las proteínas contenidas en la muestra con una disolución de HClO_4 al 5%. El proceso de extracción requirió un tiempo de agitación de 45 segundos, seguido de un centrifugado durante 10 min para conseguir la correcta separación de las fases. Al igual que en el caso de la muestras de orina, se seleccionó la fase orgánica y se evaporó a sequedad a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ en un rotavapor, y el extracto resultante se reconstituyó en las condiciones óptimas.

Como se pone de manifiesto en el trabajo, las recuperaciones obtenidas en los valores de concentración predichos por el algoritmo en ambas muestras son próximas al 100% en todos los casos, por lo que se demuestra su capacidad resolutive en una mezcla relativamente sencilla como la que se afrontó.

**I.3.Evaluación de métodos de calibración multivariante
de segundo orden en la determinación de CPT-11 y
talidomida en muestras de orina**

I.3.1. Introducción al artículo científico 2

Los fármacos quimioterápicos ejercen su acción, fundamentalmente, sobre las células que se dividen rápidamente, como es el caso de las células tumorales. Sin embargo, las células sanas de la sangre, mucosas (tubo digestivo, cavidad bucal, vejiga, etc.) y las del folículo piloso, entre otras, también pueden verse afectadas. Debido a la acción de los medicamentos sobre éstas últimas, pueden aparecer una serie de síntomas más o menos intensos y generalmente transitorios denominados efectos secundarios. Éstos dependen del tipo de fármaco empleado, de la dosis administrada al paciente y de la susceptibilidad individual de cada uno de ellos.

El CPT-11 y sus metabolitos presentan importantes efectos secundarios en los pacientes que son tratados con este medicamento, entre los que destacan diarrea, náuseas y vómitos, estreñimiento, astenia, anemia, cólico, fiebre, dolor, leucocitopenia, granulocitopenia, pérdida de peso corporal, deshidratación, alopecia, disnea, insomnio y mareo [1]. Los mecanismos por los cuales se producen estos efectos no deseados aún no han sido elucidados en su totalidad, pero cualquiera que sea su causa, la gravedad de los mismos limita la cantidad de fármaco que se puede administrar a los pacientes, haciendo necesario en algunos casos la interrupción del tratamiento.

Estudios en ensayos clínicos de fase II [2,3] han puesto de manifiesto que la administración combinada de CPT-11 y talidomida a pacientes con cáncer colorrectal metastático proporciona un sinergismo contra la enfermedad, destruyendo más rápidamente a las células cancerosas, además de reducir los efectos secundarios asociados a este fármaco.

La talidomida, *N*-ftalimido-glutarimida, fue creada y comercializada por primera vez en Alemania en 1957 por la empresa Grünenthal como fármaco para combatir principalmente los vómitos y las náuseas de las mujeres embarazadas durante los primeros meses de gestación. Sin embargo, a principios de la década de los 60 se puso de manifiesto que provocaba graves anomalías congénitas en las extremidades de los recién nacidos e incluso su muerte, por lo que su uso fue interrumpido [4]. Investigaciones posteriores permitieron observar que la estructura química de la talidomida *in vivo* es una mezcla racémica, es decir, existen dos enantiómeros que se interconvierten en condiciones fisiológicas, cuya estructura se muestra en la Figura

1.9, de los cuales uno de ellos, concretamente el enantiómero *S*-talidomida resultó ser un agente antiangiogénico que inhibe la formación de nuevos vasos sanguíneos, y que origina una patología conocida como focomelia caracterizada por la ausencia de extremidades, mientras que solo el enantiómero *R* posee el efecto sedativo e hipnótico por el cual se administraba [5].

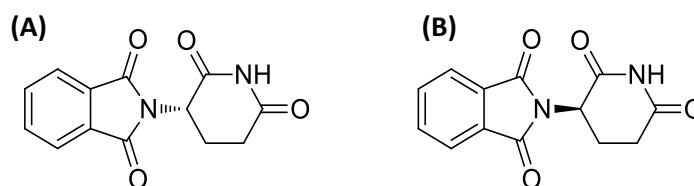


Figura 1.9. Estructura química de ambos enantiómeros de la talidomida.
(A) *S*-(-)-talidomida (forma teratogénica); **(B)** *R*-(+)-talidomida (forma sedativa).

No obstante, en los últimos años, ha habido un resurgimiento del interés por este fármaco debido a su demostrada utilidad en el tratamiento de diferentes enfermedades como la lepra, síndrome de Behcet, la enfermedad injerto contra huésped, la estomatitis aftosa, la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, el SIDA, diferentes lesiones de la piel como el eritema nodoso leproso y varios tipos de cáncer entre los que se incluyen el mieloma múltiple, Sarcoma de Kaposi, melanoma maligno, carcinoma de células renales y cáncer de próstata, entre otros [6-8].

El mecanismo de acción de la talidomida no está del todo esclarecido, pero se ha descubierto que presenta diversas actividades biológicas y que posee efecto antiinflamatorio, inmunomodulatorio y antiangiogénico. Sus efectos antiinflamatorios son atribuidos, entre otros motivos, a la inhibición de la citoquina conocida como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el cual está mediado por la aceleración de la degradación de su ARNm. Las citoquinas son un conjunto de proteínas responsables de la comunicación intercelular, inducen la activación de receptores específicos de membrana, funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulinas. La talidomida, además, inhibe selectivamente la producción de otras citoquinas relacionadas con el sistema inmune, como las IL-1b, IL-6, IL-12, interfiriendo en la respuesta inmune

celular. Por último, como se ha mencionado anteriormente, causa una interrupción potente de la angiogénesis, por lo que es muy efectiva en el tratamiento de enfermedades en las que la proliferación vascular es nociva [5].

El objetivo principal del **artículo científico 2** que se presenta a continuación es comparar la capacidad predictiva de varios algoritmos de segundo orden en la resolución de la mezcla binaria compuesta por el CPT-11 y la talidomida en muestras de orina, empleando matrices de excitación-emisión como señal analítica, ya que, como se expondrá en el mismo, se trata de una mezcla particularmente compleja debido a la gran diferencia existente entre el rendimiento cuántico de fluorescencia de ambos compuestos y a la importante señal procedente del fondo de la orina, la cual actúa como interferente en la determinación de la talidomida.

Bibliografía

- [1] H. Fujii, M. Koshiyama, M. Konishi, M. Yoshida, K. Tauchi, "Intermittent, repetitive administrations of irinotecan (CPT-11) reduces its side-effects", *Cancer Detect. Prev.* 26 (2002) 210-212.
- [2] R. Govindarajan, "Irinotecan and thalidomide in metastatic colorectal cancer", *Oncology* 14 (2000) 29-32.
- [3] R. Govindarajan, A.M. Maddox, A.M. Safar, "The efficacy of thalidomide and irinotecan in metastatic colorectal carcinoma (phase II study)", *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 21 (2002) 102b.
- [4] M. Espinosa Bosch, A.J. Ruiz Sánchez, F. Sánchez Rojas, C. Bosch Ojeda, "Recent advances in analytical determination of thalidomide and its metabolites", *J. Pharmaceut. Biomed.* 46 (2008) 9-17.
- [5] M.E. Franks, G.R. Macpherson, W.D. Figg, "Thalidomide", *Lancet* 363 (2004) 1802-1811.
- [6] S.J. Matthews, C. McCoy, "Thalidomide: a review of approved and investigational uses", *Clin. Ther.* 25 (2003) 342-395.
- [7] R.J. Amato, "Thalidomide therapy for renal cell carcinoma", *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* 46 (2003) S59-S65.
- [8] V. Eleutherakis-Papaiakovou, A. Bamias, M.A. Dimopoulos, "Thalidomide in cancer", *Ann. Oncol.* 15 (2004) 1151-1160.

I.3.2. Artículo científico 2

Talanta 88 (2012) 609-616

“Comparison of the predictive ability of several second-order multivariate methods in the simultaneous determination of two therapeutic drugs in human urine”

**María del Carmen Hurtado-Sánchez, Isabel Durán-Merás,
María Isabel Rodríguez-Cáceres, Ana Jiménez-Girón, Alejandro C. Olivieri**

Abstract

The aim of this paper is to study the applicability of second-order multivariate methods in the simultaneous determination of two therapeutic drugs in human urine samples. The studied drugs, irinotecan and thalidomide, are used in the treatment of malignant tumours. Irinotecan (CPT-11) is used to treat colorectal cancer; recent studies have shown the benefits of using thalidomide in combination with CPT-11 in the treatment of this disease. CPT-11 is highly fluorescent, but the native fluorescence of thalidomide is very weak. The second-order methods assayed were parallel factor analysis (PARAFAC), unfolded partial least-squares (U-PLS) and multidimensional partial least-squares (N-PLS), both combined with the residual bilinearization procedure (RBL). The excitation-emission matrices (EEMs) of the samples were recorded as analytical signal. The accuracy and precision of the algorithms were evaluated through the root mean square error of prediction (RMSEP) and the elliptical joint confidence region test (EJCR), obtaining better results with PARAFAC, which was successfully applied to the determination of thalidomide and CPT-11 in human urine samples, after a previous liquid-liquid extraction with chloroform.

Keywords: *Thalidomide, CPT-11, Second-order multivariate calibration, Urine, PARAFAC, N-PLS/RBL, U-PLS/RBL.*

1. Introduction

Thalidomide (*N*-phthalimido-glutarimide) is a sedative, hypnotic and anti-inflammatory drug. Many years ago, it was prescribed to pregnant women as an antiemetic to prevent morning sickness and to help them to sleep, until its teratogenic effects were discovered. Afterwards, thalidomide was neither prescribed nor sold for decades. However, in recent years, it has been shown to be a valuable drug for a variety of illnesses, and there is an increased use of oral thalidomide for the treatment of a variety of autoimmune-related diseases such as erythema nodosum leprosum [1], Behcet's syndrome [2,3], Crohn's disease [4,5], and graft-versus-host disease [6-8], infectious diseases such as mycobacterial infections and HIV [9], and cancers such as colorectal, renal or prostate carcinoma [10-11].

Recently, thalidomide has been administered with irinotecan (CPT-11) for the treatment of colorectal carcinoma. CPT-11, a water-soluble semi-synthetic derivative of camptothecin (CPT), is reportedly effective for the treatment of various types of cancer, mainly colorectal cancer. However, it presents side effects, mostly leucopenia and late diarrhea [12], and sometimes it is necessary to stop the chemotherapy. A number of studies have demonstrated that simultaneous administration of both compounds decrease these effects. For example, Govindarajan *et al.* showed in an interim analysis of nine patients with metastatic colorectal cancer, that thalidomide had almost eliminated the dose-limiting gastrointestinal toxic effects of CPT-11, especially diarrhea and nausea, and eight of nine patients were able to complete the chemotherapy course [13].

Although the exact antitumor mechanism is unknown, thalidomide exhibits both immuno-modulating and anti-angiogenic effects. Based on potentially synergistic mechanisms of action, thalidomide has the potential to enhance the activity of conventional chemotherapy.

An exhaustive bibliographic revision showed that there are no published methods for the simultaneous determination of thalidomide and CPT-11. Normally, due to its low fluorescence intensity, thalidomide has been analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV-detection at 220 nm [14-16], mass spectrometry (MS), or tandem MS [17] detection in different types of biological samples. Other techniques such as chiral stationary phase (CSP)-HPLC, capillary

electrophoresis (CE) or capillary electrochromatography (CEC) are aimed to separate the (+)-(R)- and (-)-(S)-enantiomers [18]. A single work was reported on a fluorescence method to determine thalidomide, achieving a limit of detection of $1.2 \mu\text{g L}^{-1}$ [19]. Also, thalidomide is a synthetic derivative of glutamine and at physiologic pH can undergo hydrolysis to form this compound again. Li *et al.* have been developed a HPLC method with indirect UV detection, for study the purity of thalidomide and determine glutamine in thalidomide drug substances and products [20].

On the other hand, CPT-11 has been usually determined by HPLC with fluorimetric detection [21-23]. So, Sparreboom *et al.* have been developed a method for simultaneous determination of CPT-11 and their mains metabolites in human plasma, urine and feces, with a previous simple pretreatment of the biological samples consisted in rapid protein precipitation with a mixed of solvent extraction of methanol-5% (w/v) and aqueous perchloric acid (1:1, v/v) [24]. Some authors have proposed their determination by molecular fluorescence: Rodríguez-Cáceres *et al.* have studied the fluorescent characteristics of CPT-11 in acidic and basic media, developing two methods for its determination in acidic media, using as oxidants I_2/I^- and Ce(IV) in the presence of Fe^{3+} . These methods were successfully applied to human urine samples and pharmaceuticals [25,26].

In the last decades, multivariate calibration methods have been introduced for the analysis of complex samples [27]. The advantage of using data involving high-dimensional structured information is the higher stability towards interferences and matrix effects, in comparison with first-order methodologies. In some situations, multiway analysis allows for a direct separation of the measured signals into the underlying contributions from individual analytes. Moreover, these methods present the benefit of short time analysis due to the avoidance of long and tedious pretreatment of samples to eliminate interferences. Parallel factor analysis (PARAFAC) [28] is especially useful when the data follow the so-called trilinear model, and achieves the second-order advantage (analyte quantitation in the presence of uncalibrated interferences). An alternative to working with second-order data is to rearrange them in vectors and then apply a first-order algorithm such as unfolded partial-squares (U-PLS) or the multi-dimensional variant N-PLS. However, N-PLS and U-PLS do not provide the second-order advantage, unless they are complemented

with the additional procedure of residual bilinearization (RBL) [29-31]. Examples of application of second-order calibration methods to the analysis of different mixtures in biological samples include the determination of naproxen and salicylic acid in serum and naproxen, salicylic acid and salicylic acid mixtures in urine [32], fluoroquinolone antibiotics in human serum [33], methotrexate and leucovorin in human urine [34] or flufenamic and meclofenamic acids in human urine samples [35], among others. Recently, several reviews about the applications of second-order calibration methods have been published [36,37].

In the present work, we have resolved a complex mixture of two analytes, CPT-11 and thalidomide, which presents several difficulties. On one hand, CPT-11 is highly fluorescent while thalidomide presents poor native fluorescence. On the other hand, urine presents a strong native fluorescence, and this signal is overlapped with the fluorescent signal of thalidomide. Three-way fluorescence data recorded in the form of excitation-emission fluorescence matrices (EEMs) were processed with PARAFAC and with N-PLS/RBL and U-PLS/RBL, and the advantages and disadvantages of these chemometric methods are discussed. Good recoveries were obtained in synthetic binary samples with all the multivariate methods employed, but in urine samples only PARAFAC yields good results, because N-PLS/RBL and U-PLS/RBL are unable to differentiate the signal due to thalidomide from the native fluorescence of urine.

2. Experimental procedure

2.1. Reagents

All experiments were performed with analytical reagent grade chemicals. (+)-Thalidomide and CPT-11 were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q Integral A10 system. A stock standard solution of thalidomide was prepared by dissolving 10.0 mg in 100 mL of acetonitrile:ultrapure water (20:80 v/v), while a stock standard solutions of CPT-11 containing 126 $\mu\text{g mL}^{-1}$ was prepared in methanol. A buffer solution (pH 5.0, $C_i=0.1$ M) was prepared by dissolving a suitable amount of sodium acetate (Scharlau, Spain) with ultrapure water and adjusting the pH of the resulting solution to the desired

value with hydrochloric acid (Scharlau, Spain). Chloroform and methanol were from Panreac (Barcelona, Spain).

2.2. Apparatus and software

Fluorescence measurements were performed on a Varian Model Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer, equipped with two Czerny-Turner monochromators, a xenon light source and two photomultiplier tubes as detectors. The Cary Eclipse software was used for data acquisition. The corresponding excitation-emission matrices were registered in the following ranges: excitation, 265-385 nm each 10 nm and emission, 365-485 nm each 2 nm. The instrument was set up as follows: wavelength scanning speed, 1000 nm/min, monochromators band pass exc/em (nm/nm), 5/5, and detector voltage, 600 V. The cell was thermostated at 25 °C.

A Crison MicropH 501 meter (Barcelona, Spain) equipped with a combined glass/saturated calomel electrode was used for pH measurements.

The software package The Unscrambler® v6.11 (CAMO A/S Olav Tryggvasonsgt, N-7011, Trondheim, Norway) was used for the experimental design. All calculations were done using MatLab R2008a, using the MVC2 routine (Second-Order MultiVariate Calibration), an integrated MatLab toolbox for second-order calibration developed by A. C. Olivieri [38], and the program ACOC, developed by our group [39] for the statistical analysis.

2.3. Calibration, validation and spiked urine samples

A calibration set was constructed using a central composite design with the central point replicated three times. Concentration levels ranging from 2.02 to 18.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of thalidomide and from 0.02 to 0.20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of CPT-11 were employed. This design provided a total of eleven standards. However, six additional standards were added containing only thalidomide with the object of maximizing the information about this analyte. For preparing a given calibration sample, appropriate aliquots of stocks solutions were mixed with 0.6 mL of buffer acetic acid/acetate

(0.1 M, pH 5) and with ultrapure water to complete to 3.0 mL. Analytes were extracted with 5 mL of chloroform after shaking vigorously for 90 s. The organic phase was evaporated to dryness at 40 °C in a rotatory evaporator and the residue was dissolved in 1.00 mL of methanol and 0.3 mL of acetic/acetate buffer solution 0.1 M and deionized water was added to complete to 5.0 mL. The excitation-emission matrices of these solutions were recorded in the wide spectral excitation range from 265 to 385 nm and emission range from 365 to 485 nm, and the data were subjected to three-way analysis.

A validation set was also prepared, composed of four samples with three replicates each, in the same form as those for calibration, but using a random design, i.e., selecting the target concentrations of both analytes at random from each calibration range (see Table 1 for details on the composition of these samples).

Spiked urine samples were prepared as follows: 1.00 mL of human urine spiked with CPT-11 and thalidomide was placed in a separating funnel, the pH was fixed to 5 by adding acetic/acetate buffer solution 0.1 M, and finally deionized water was added to complete to 3.00 mL. Analytes were extracted with 5 mL of chloroform after shaking vigorously for 90 s. The organic phase was evaporated to dryness at 40 °C in a rotatory evaporator and the residue was dissolved in 1.00 mL of methanol and 0.3 mL of acetic/acetate buffer solution 0.1 M and deionized water was added to complete to 5.0 mL. Each urine sample was prepared in triplicate (details on the nominal analyte concentrations for these samples are provided below). The EEMs were subsequently recorded for all these samples in the same manner as described above.

3. Results and discussion

3.1. Fluorimetric study of the analytes

Thalidomide is weakly fluorescent, while CPT-11 presents a high fluorescence emission, as can be seen in Fig. 1. The excitation spectra show maxima located at 300 and 368 nm for thalidomide and CPT-11 respectively, and the emission spectra show maxima at 400 nm for thalidomide and 427 nm for CPT-11. As is shown in Fig. 1, the quantification of thalidomide in the presence of CPT-11 is challenging, due to the poor

fluorescence intensity of the former analyte and to the fact that in the working wavelength regions the signal of this analyte is overlapped with that for urine.

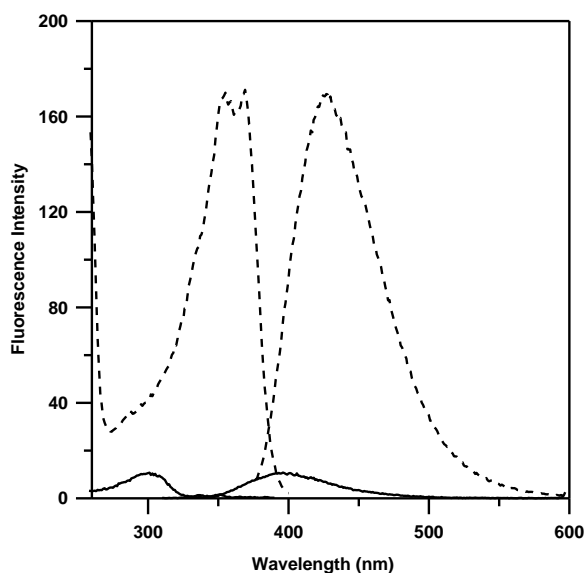


Figure 1. Excitation and emission spectrum of $25.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ thalidomide (—) and $0.11 \mu\text{g mL}^{-1}$ CPT-11 (-----).

Fig. 2 shows the emission spectrum of thalidomide, typical urine diluted 1:5 and the same urine diluted 1:5 but spiked with thalidomide. As can be seen, the thalidomide emission spectrum is completely overlapped with a typical human urine spectrum, making necessary the use advanced multi-way modeling techniques for quantifying thalidomide in the presence of the urine background.

We propose a fluorescence method in combination with second-order multivariate calibration algorithms, which have proved to be very powerful in the resolution of complex mixtures. Hence, PARAFAC, U-PLS/RBL and N-PLS/RBL performances have been evaluated regarding the quantitation of both analytes in urine, since all of them have the interesting second-order advantage (the possibility to determine one or several analytes in the presence of unexpected components) [40,41].

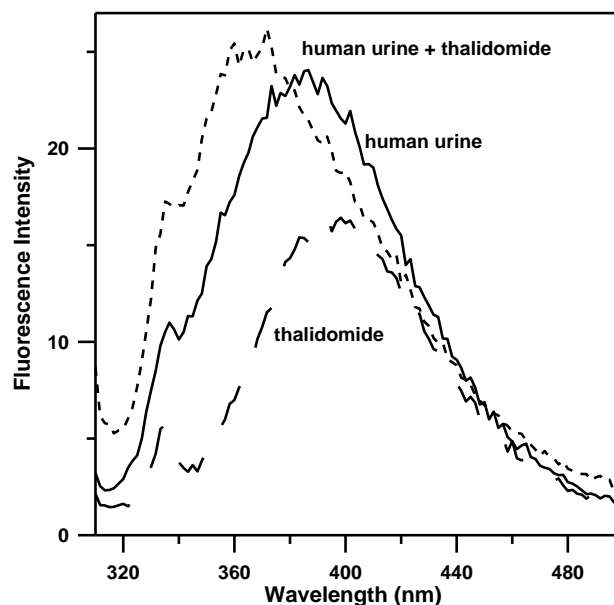


Figure 2. Emission spectrum of $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ thalidomide (-----), human urine diluted 1:5 (—) and human urine diluted 1:5 and spiked with $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ of thalidomide. (-----). $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$.

On the other hand, the fluorescence signal of a typical urine sample without any pretreatment is significantly higher than the signal of THL, precluding the direct determination of this analyte. With the purpose of reducing the matrix signal, a previous liquid-liquid extraction process with chloroform is necessary. According to previous studies [22,23], the pH of the aqueous phase was fixed at 5.0 by the addition of 0.3 mL of 0.1 M of acetic acid/acetate buffer solution in a final volume of aqueous phase of 3.0 mL. The shaking time and phase volume ratio were optimized; a shaking time of 90 s and a phase ratio aqueous/organic of 0.6 were selected as optimum values.

3.2. Validation Data

To establish a quantitative model for the system, 17 calibration samples containing different amounts of THL and CPT-11 were prepared using a central composite design with three levels. The levels correspond to values in the range 0.02-

0.20 mg L⁻¹ for CPT-11 and 2.02-18 mg L⁻¹ for THL. The composition of the calibration samples is summarized in Table 1. As can be seen, six samples containing only THL are included with the aim of improving the robustness of the calibration, due to the low fluorescence of this compound. In all cases, samples were previously extracted with chloroform and the organic phase was evaporated to dryness under vacuum at 40 °C. The residue was re-dissolved with 1.00 mL of methanol and 0.3 mL of 0.1 M acetic acid/acetate buffer solution (to fix the pH to 5.0), and deionized water to complete to 5.0 mL.

Table 1. Composition of the calibration set.

Calibration set	[THL] (µg mL ⁻¹)	[CPT-11] (µg mL ⁻¹)
P1	-	0.11
P2	17.92	0.11
P3	10.08	-
P4	10.08	0.20
P5	2.02	0.02
P6	17.92	0.02
P7	2.02	0.20
P8	17.92	0.20
P9	10.08	0.11
P10	10.08	0.11
P11	10.08	0.11
P12	6.05	-
P13	6.05	-
P14	8.06	-
P15	8.06	-
P16	14.00	-
P17	14.00	-

Fig. 3 shows the contour plot of an EEM for a mixture containing THL and CPT-11. It was recorded in wide spectral excitation and emission ranges, 265-385 and 365-485 nm, respectively, and shows Rayleigh scattering. This latter signal is undesirable because it is not correlated with the target concentration of the studied analytes. Therefore, for both calibration and prediction purposes, an optimal region was selected for each analyte: for THL, 275-325 nm for excitation and 397-485 nm for

emission, and for CPT-11, 265-385 nm for excitation and 397-485 nm for emission. The region selected for THL is restricted in order to avoid the interference due to the signal of CPT-11, and to obtain the best statistical indicators in the calibration step.

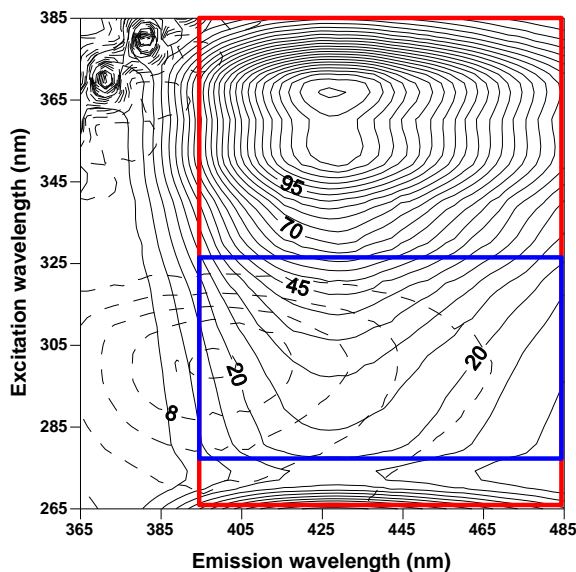


Figure 3. Contours plots of the total fluorescence spectra of aqueous solution (pH 5.0) of $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ thalidomide (—) and $0.11 \mu\text{g mL}^{-1}$ CPT-11 (-----). The selected area illustrates the spectral excitation and emission ranges of work for the second-order multivariate analysis of thalidomide (—) and CPT-11 (—).

A first phase in the data processing with different second-order algorithms is the estimation of the number of responsive components. With N-PLS and U-PLS the usual procedure is the well-known leave-one-sample cross-validation procedure, according to Haaland and Thomas' criterion [42,43]. In both of these methods the number of components was 3 for thalidomide and 2 for CPT-11. In the case of these validation samples, there is no need to assess the number of interferents (required by the RBL procedure), because the composition of these samples is similar to those employed for calibration, and thus RBL is not employed.

In the case of PARAFAC, several procedures are available for estimating the number of responsive components: 1) the core consistency diagnostic test

(CORCONDIA) [44], 2) the consideration of the residuals of the PARAFAC least-squares fit models for an increasing trial number of components [28], and 3) the visual examination of the recovered profiles. For the presently discussed analytical problem, the best results were obtained by assessing the number of PARAFAC components using a combination of 2) and 3), as discussed in detail below.

Fig. 4A shows the fitting residuals as a function of increasing components for thalidomide. The optimum number of factors for this analyte is 3, where the residuals stabilized at a value compatible with the instrumental noise. Although two components might be expected for these samples in view of their composition, the need of three components can be explained considering the very small contribution of this analyte to the total signal of the sample (even the Raman solvent scattering shows a signal comparable to that of thalidomide, as shown in Fig. 5). Consequently, a small background fluorescent signal would compete with that of the analyte. These facts could explain the three responsive components for this analyte.

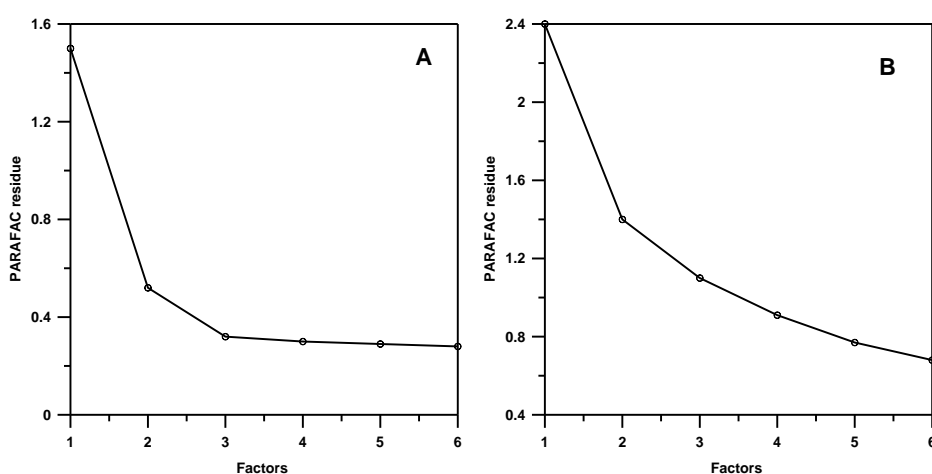


Figure 4. Plot of the prediction residuals a function of a trial number of factors for test, containing $12.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ thalidomide and $0.120 \mu\text{g mL}^{-1}$ CPT-11, corresponding to work region of thalidomide (A) and CPT-11 (B).

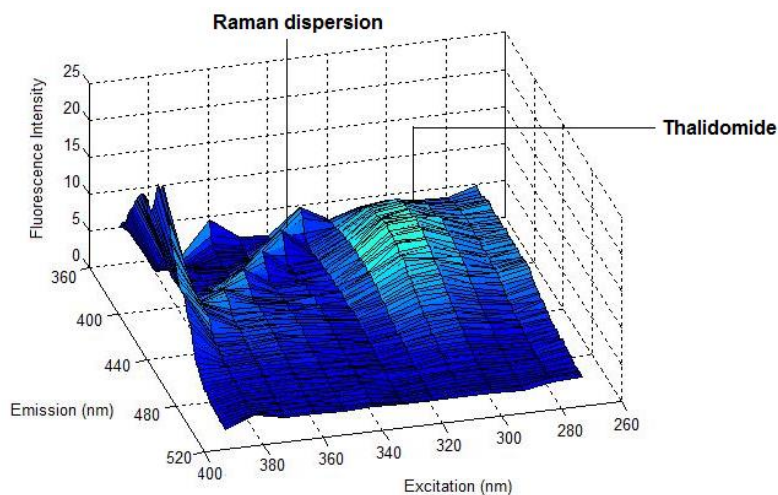


Figure 5. Excitation-emission matrix of standard containing $14.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ thalidomide.

For CPT-11, on the other hand, the fitting residuals did not appear to stabilize on increasing the number of components (Fig. 4B). Nevertheless, this number for CPT-11 was selected after visual examination the profiles extracted by the PARAFAC model, the results obtained in the analysis of the validation set of samples, and on the basis of their chemical composition. The optimal number of factors selected for CPT-11 was 2.

In Table 2 the results obtained in the analysis of the validation samples are summarized. In general, the added and found contents were consistent for all of the mixtures tested. The recoveries are better for CPT-11, as expected from the higher fluorescence intensity for this analyte. However, the results obtained for thalidomide can be considered satisfactory taking into account its low signal and the overlapping with CPT-11.

In order to get further insight into the accuracy and precision of the algorithms analyzed, nominal versus found concentration values were compared by application of the EJCR (Elliptical Joint Confidence Region) test [45,46].

Table 2. Recovery of thalidomide and CPT-11 in artificial mixtures.

Added ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Found ($\mu\text{g mL}^{-1}$)											
		PARAFAC				N-PLS				U-PLS			
THL	CPT-11	THL	% Rec	CPT-11	% Rec	THL	% Rec	CPT-11	% Rec	THL	% Rec	CPT-11	% Rec
		10.48	130.0	0.083	102.5	10.90	135.2	0.083	97.6	11.06	137.2	0.083	97.6
8.06	0.081	9.43	117.0	0.089	109.9	9.19	114.0	0.087	93.1	10.15	125.9	0.087	93.1
		11.17	138.6	0.087	107.4	11.01	136.6	0.083	97.6	11.27	139.8	0.084	96.4
		13.54	112.7	0.122	101.7	13.08	108.9	0.120	100.0	13.30	110.7	0.120	100.0
12.01	0.120	13.44	111.9	0.124	103.3	13.17	109.7	0.122	98.4	13.82	115.1	0.122	98.4
		13.50	112.4	0.123	102.5	13.22	110.1	0.123	97.6	13.33	111.0	0.123	97.6
		17.36	115.7	0.160	100.6	17.30	115.3	0.149	106.7	16.08	107.1	0.149	106.7
15.01	0.159	16.55	110.3	0.162	101.9	16.73	111.5	0.158	100.6	15.77	105.1	0.158	100.6
		15.98	106.5	0.157	98.7	15.91	106.0	0.160	99.4	15.33	102.1	0.160	99.4
		20.00	111.6	0.192	95.5	20.17	112.6	0.190	105.8	19.14	106.8	0.190	105.8
17.92	0.201	18.69	104.3	0.198	98.5	20.41	113.9	0.196	102.6	19.21	107.2	0.196	102.6
		18.93	105.6	0.197	98.0	20.08	112.1	0.195	103.1	19.14	106.8	0.195	103.1
% Rec^a (SD)^b		115 (10)		102 (4)		115 (10)		100 (4)		115 (13)		100 (4)	
RMSEP^c		1.9		5.0x10 ⁻³		2.1		5.6x10 ⁻³		1.8		5.6x10 ⁻³	
% REP^d		12.6		3.4		13.7		4.0		13.4		4.0	

^a Rec: average recovery; ^b SD: Standard Deviation.

^c RMSEP: Root Mean Square Error Prediction; ^d REP: Relative Error of Prediction.

The corresponding plots are shown in Fig. 6. For both analytes, all confidence regions contain the ideal point of unit slope and zero intercept (indicating accuracy), but the elliptic size obtained with PARAFAC is smaller, suggesting that this chemometric methodology show better predictive ability than both N-PLS and U-PLS. These results are confirmed with the statistical results shown in Table 2, with very satisfactory values for the root mean square error of prediction (RMSEP) and relative error of prediction (REP) for the two analytes and with the three second-order calibration methods.

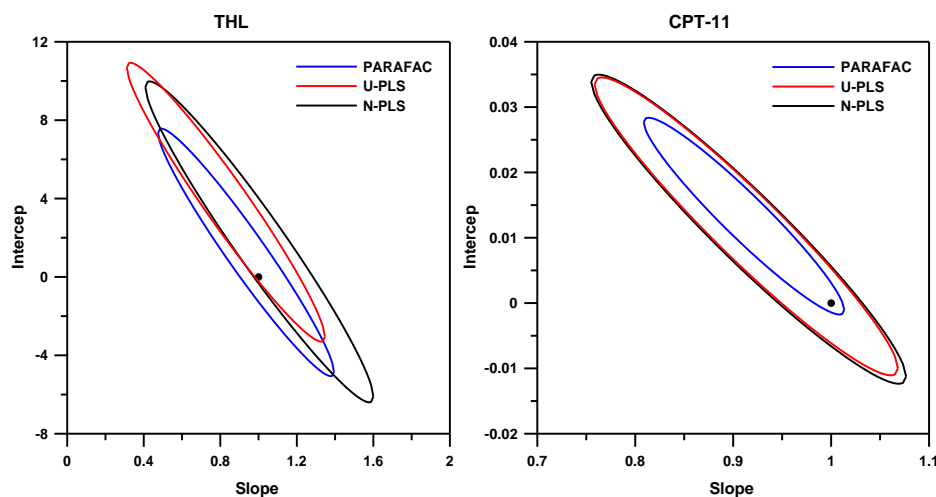


Figure 6. EJC (95% confidence level) for the slope and intercept of the regressions of the theoretical versus predicted concentrations of thalidomide and CPT-11.

3.3. Urine samples

With the purpose of analyzing the potentiality of the evaluated second-order algorithms, the determination of the analytes in urine was carried out. A set of twelve urine samples was investigated with the aid of PARAFAC, N-PLS/RBL and U-PLS/RBL, all potentially achieving the second-order advantage (the RBL procedure is required to complement the PLS methods because of the presence of the urine signal in the test samples). When applying N-PLS/RBL and U-PLS/RBL to the spiked urine samples, it was necessary to assess the number of unexpected components (N_{unx}) to be

employed in the RBL procedure. This can be done by analysing the sample modelling residuals, s_u , as a function of a trial number of unexpected components, as has already been described [47]. The result was the same for all urine samples, and showed that a single new factor, besides those required for calibration (see above in connection with the validation samples). Therefore, in addition to the calibration factors (3 for thalidomide and 2 for CPT-11), one RBL component was needed for all test urine samples. The new factor is required to model the urine background. The spectrum of this factor is similar to the urine spectrum and all correlation coefficients between the new factors and the corresponding urine background were found to be close to 1.

When applying PARAFAC, the assessment of the number of components was made by analyzing the least-squares residues as a function of the number of components, as well as visually inspecting the profiles obtained with different number of components for each urine sample. All urine samples required the consideration of four factors for THL and three factors for CPT-11.

The prediction results obtained for the urine set are represented in Fig. 7. Three spectra of three different samples were used for each concentration level. As can be seen, the agreement between calculated and experimental values for CPT-11 is reasonable with the three procedures. However, in the presence of urine, unsatisfactory results were obtained for thalidomide when N-PLS/RBL and U-PLS/RBL were applied. With both of these multivariate methods, the relative errors of prediction for THL are higher in comparison with those of obtained the synthetic validation samples. Better results are obtained when the PARAFAC algorithm was applied: all predictions are reasonable and the relative error of prediction is significantly smaller than those for the PLS/RBL models. The poor results obtained when N-PLS/RBL and U-PLS/RBL were applied can be attributed to the extensive spectral overlapping between the analyte THL and the urine background, which apparently cannot be handled by the RBL procedure. In the presently studied case, only thalidomide predictions are affected, which is logical if we consider that the urine background mainly affects the signal of this particular analyte (see Fig. 2).

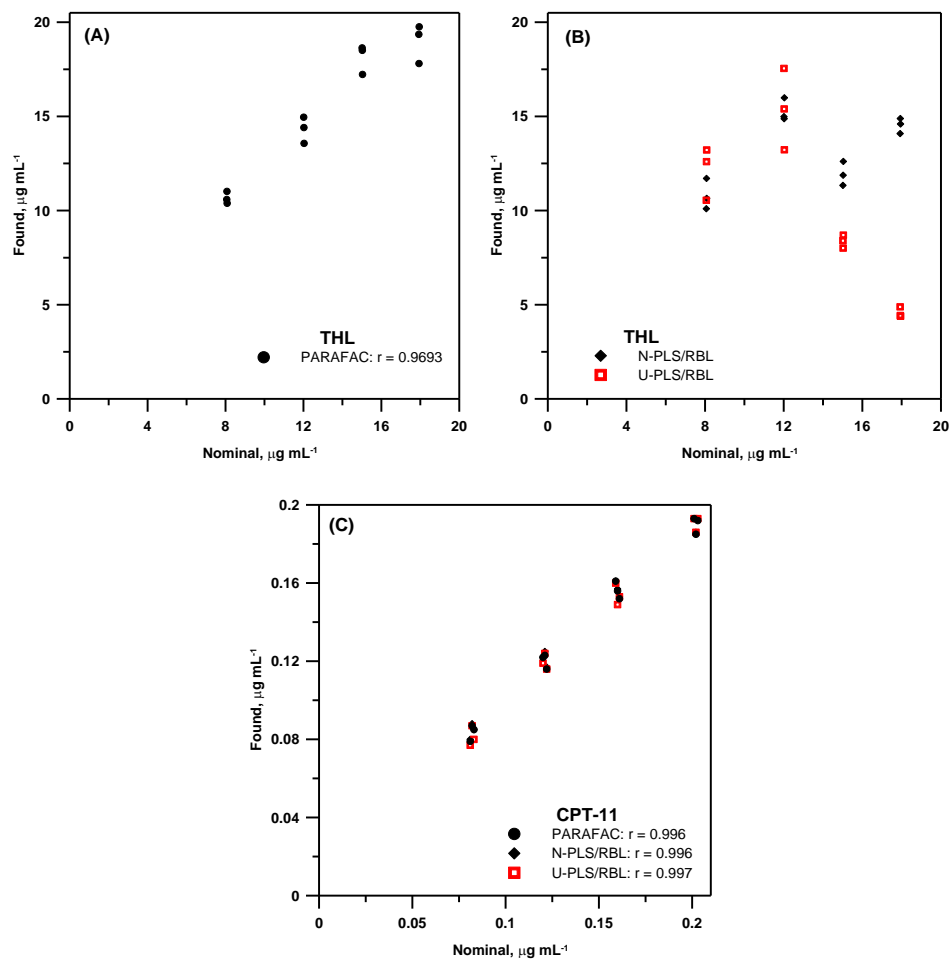


Figure 7. Plots of THL (A and B) and CPT-11 (C) predicted concentrations in urine spiked samples as a function of the nominal values using PARAFAC, U-PLS/RBL and N-PLS/RBL.

The behavior is more pronounced with increasing concentrations of THL; N-PLS/RBL and U-PLS/RBL provide very poor recoveries for concentrations higher than $12 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. 7B). Further studies should be made in order to gain a deeper insight into this interesting aspect of these second-order multivariate calibration. For CPT-11, good results are obtained in all cases, see Fig. 7C. In this case, when nominal versus found concentration values were compared, all the slopes calculated are near 1 and the regression coefficients of the three procedures are all excellent.

4. Conclusions

The resolution of mixtures of two analytes with different fluorescence quantum yields, such as thalidomide and CPT-11 (two anticancer drugs), has been studied by recording three-way data sets, and applying several algorithms such PARAFAC, N-PLS and U-PLS. The use of three-way data, exploiting the information contained in full fluorescence excitation-emission matrices and second-order algorithms, allowed the successful simultaneous determination of thalidomide and CPT-11 in synthetic samples. The simultaneous determination of thalidomide and CPT-11 in urine samples presents several difficulties. The problems are: 1) the high degree of overlap between the signals of the analytes and the human urine, 2) the absolute intensity of the urine background, which is, on the average, comparable to that for thalidomide in the investigated concentration ranges and 3) thalidomide is weakly fluorescent. In this case, N-PLS and U-PLS, in combination with the separate procedure RBL, give good results for CPT-11, but the recoveries for THL are considerably worse, probably because these algorithms are unable to differentiate the signal due to thalidomide from the native fluorescence of urine. However, when the processing algorithm was PARAFAC, the resolution of mixtures of THL and CPT-11 in human urine samples provided good recoveries. Recoveries for CPT-11 are better than for thalidomide, as expected due to the fact that the fluorescence intensity of thalidomide is lower than for CPT-11, and the background signal of urine mainly overlaps with the thalidomide signal. A noticeable result from this study is that under such adverse conditions, PARAFAC allows for the successful quantitation of the analytes.

References

- [1] E.P. Sampaio, G. Kaplan, A. Miranda, J.A. Nery, C.P. Miguel, S.M. Viana, "The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum", *J. Infect. Dis.* 168 (1993) 408-414.
- [2] V. Hamuryudan, C. Mat, S. Saip, Y. Ozyazgan, A. Siva, S. Yurdakul, K. Zwingenberger, H. Yazici, "Thalidomide in the treatment of the mucocutaneous lesions of the Behcet syndrome. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial", *Ann. Intern. Med.* 128 (1998) 443-450.
- [3] J.M. Gardner-Medwin, N.J. Smith, R.J. Powell, "Clinical experience with thalidomide in the management of severe oral and genital ulceration in conditions

- such as Behçet's disease: use of neurophysiological studies to detect thalidomide neuropathy", *Ann. Rheum. Dis.* 53 (1994) 828-832.
- [4] E.D. Ehrenpreis, S.V. Kane, L.B. Cohen, R.D. Cohen, S.B. Hanauer, "Thalidomide therapy for patients with refractory Crohn's disease: an open-label trial", *Gastroenterology* 117 (1999) 1271-1277.
- [5] E.A. Vasiliauskas, L.Y. Kam, M.T. Abreu-Martin, P.V. Hassard, K.A. Papadakis, H. Yang, J.B. Zeldis, S.R. Targan, "An open-label pilot study of low-dose thalidomide in chronically active, steroid-dependent Crohn's disease", *Gastroenterology* 117 (1999) 1278-1287.
- [6] G.B. Vogelsang, E.R. Farmer, A.D. Hess, V. Altamonte, W.B. Beschorner, D.A. Jabs, R.L. Corio, L.S. Levin, O.M. Colvin, J.R. Wingard, "Thalidomide for the treatment of chronic graft-versus-host disease", *N. Engl. J. Med.* 326 (1992) 1055-1058.
- [7] P.M. Parker, N. Chao, A. Nademanee, M.R. O'Donnell, G.M. Schmidt, D.S. Snyder, A.S. Stein, E.P. Smith, A. Molina, D.E. Stepan, A. Kashyap, I. Planas, R. Spielberger, G. Somlo, K. Margolin, K. Zwingenberger, K. Wilsman, R.S. Negrin, G.D. Long, J.C. Niland, K.G. Blume, S.J. Forman, "Thalidomide as salvage therapy for chronic graft-versus-host disease", *Blood* 86 (1995) 3604-3609.
- [8] P.V. Browne, D.J. Weisdorf, T. DeFor, W.J. Miller, S.M. Davies, A. Filipovich, P.B. McGlave, N.K.C. Ramsay, J. Wagner, H. Enright, "Response to thalidomide therapy in refractory chronic graft-versus-host disease", *Bone Marrow Transplant.* 26 (2000) 865-869.
- [9] B. Radeff, R. Kuffer, J. Samson, "Recurrent aphthous ulcer in patient infected with human immunodeficiency virus: successful treatment with thalidomide", *J. Am. Acad. Dermatol.* 23 (1990) 523-525.
- [10] R. Govindarajan, A.M. Maddox, A.M. Safar, "The efficacy of thalidomide and irinotecan in metastatic colorectal carcinoma (Phase II study)", *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 21 (2002) 102b.
- [11] S. Pridgeon, M. Drake, "Thalidomide and its use in renal and prostate cancer", *Cancer Therapy* 3 (2005) 65-76.
- [12] J.R. Hecht, "Gastrointestinal toxicity of irinotecan", *Oncology* 12 (1998) 72-78.
- [13] R. Govindarajan, K.M. Heaton, J.R. Broadwater, A. Zeitlin, N.P. Lang, M. Hauer-Jensen, "Effect of thalidomide on gastrointestinal toxic effects of irinotecan", *Lancet* 356 (2000) 566-567.

- [14] J. Sastre Torano, A. Verbon, H.J. Guchelaar, "Quantitative determination of thalidomide in human serum with high-performance liquid chromatography using protein precipitation with trichloroacetic acid and ultraviolet detection", *J. Chromatogr. B* 734 (1999) 203-210.
- [15] X. Yang, Z. Hu, S.Y. Chan, P.C. Ho, E. Chan, W. Duan, B.C. Goh, S. Zhou, "Determination of thalidomide by high performance liquid chromatography: Plasma pharmacokinetic studies in the rat", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 299-304.
- [16] G. Saccomanni, V. Turini, C. Manera, G. Placanica, E.O. Salè, C. Jemos, M. Giorgi, M. Macchia, "High performance liquid chromatographic determination of thalidomide in patients affected by hepatocellular carcinoma", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 447-451.
- [17] S.K. Teo, R.S. Chandula, J.L. Harden, D.I. Stirling, S.D. Thomas, "Sensitive and rapid method for the determination of thalidomide in human plasma and semen using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *J. Chromatogr. B* 767 (2002) 145-161.
- [18] M. Espinosa-Bosch, A.J. Ruiz-Sánchez, F. Sánchez-Rojas, C. Bosch-Ojeda, "Recent advances in analytical determination of thalidomide and its metabolites", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 9-17.
- [19] C.E. Cardoso, R.O.R. Martins, R.Q. Aucelio, "Evaluation of a spectrofluorimetric method for the selective determination of thalidomide in pharmaceutical tablets, urine and blood serum", *Microchem. J.* 77 (2004) 1-7.
- [20] J. Li, M.S. Jaworsky, D.I. Stirling, "The determination of a potential impurity in Thalidomide drug substance and product by HPLC with indirect UV detection", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 19-27.
- [21] H. Sumiyoshi, Y. Fujiwara, T. Ohune, N. Yamaoka, K. Tamura, M. Yamakido, "High-performance liquid chromatographic determination of irinotecan (CPT-11) and its active metabolite (SN-38) in human plasma", *J. Chromatogr. B* 670 (1995) 309-316.
- [22] N.E. Schoemaker, H. Rosing, S. Jansen, J.H. Schellens, J.H. Beijnen, "High-performance liquid chromatographic analysis of the anticancer drug irinotecan (CPT-11) and its active metabolite SN-38 in human plasma", *Ther. Drug Monit.* 25 (2003) 120-124.
- [23] X. Yang, Z. Hu, S.Y. Chan, B.C. Goh, W. Duan, E. Chan, S. Zhou, "Simultaneous determination of the lactone and carboxylate forms of irinotecan (CPT-11) and

- its active metabolite SN-38 by high-performance liquid chromatography: Application to plasma pharmacokinetic studies in the rat", *J. Chromatogr. B* 821 (2005) 221-228.
- [24] A. Sparreboom, P. de Bruijn, M.J.A. de Jonge, W.J. Loos, G. Stoter, "Liquid chromatographic determination of irinotecan and three major metabolites in human plasma, urine and feces", *J. Chromatogr. B* 712 (1998) 225-235.
- [25] M.I. Rodríguez-Cáceres, I. Durán Merás, N.E. Ornelas Soto, P.L. López de Alba, L. López Martínez, "Determination of anticarcinogenic and rescue therapy drugs in urine by photoinduced spectrofluorimetry using multivariate calibration: comparison of several second-order methods", *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 1119-1127.
- [26] M.I. Rodríguez-Cáceres, I. Durán Merás, N.E. Ornelas Soto, P.L. López de Alba, L. López Martínez, "Spectrofluorimetric determination of irinotecan in the presence of oxidant agents and metal ions", *Talanta* 74 (2008) 1484-1491.
- [27] 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.
- [28] R. Bro, "PARAFAC. Tutorial and applications", *Intell. Lab. Syst.* 38 (1997) 149-171.
- [29] 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. Chemometr.* 19 (2005) 253-265.
- [30] D. Bohoyo Gil, A. Muñoz de la Peña, J.A. Arancibia, M. Escandar, A.C. Olivieri, "Second-order advantage achieved by unfolded-partial least-squares/residual bilinearization modeling of excitation-emission fluorescence data presenting inner filter effects", *Anal. Chem.* 78 (2006) 8051-8058.
- [31] M.J. Culzoni, H.C. Goicoechea, A.P. Pagani, M.A. Cabezón, A.C. Olivieri, "Evaluation of partial least-squares with second-order advantage for the multi-way spectroscopic analysis of complex biological samples in the presence of analyte-background interactions", *Analyst* 131 (2006) 718-723.
- [32] J.A. Arancibia, A.C. Olivieri, G.M. Escandar, "First-and second-order multivariate calibration applied to biological samples: determination of anti-inflammatories in serum and urine", *Anal. Bioanal. Chem.* 374 (2002) 451-459.
- [33] A. Muñoz de la Peña, A. Espinosa Mansilla, D. González Gómez, A.C. Olivieri, H.C. Goicoechea, "Interference-free analysis using three-way fluorescence data and the parallel factor model. Determination of fluoroquinolone antibiotics in human serum", *Anal. Chem.* 75 (2003) 2640-2646.

- [34] A.C. Olivieri, J.A. Arancibia, A. Muñoz de la Peña, I. Durán-Merás, A. Espinosa Mansilla, "Second-order advantage achieved with four-way fluorescence excitation-emission-kinetic data processed by parallel factor analysis and trilinear least-squares. Determination of methotrexate and leucovorin in human urine", *Anal. Chem.* 76 (2004) 5657-5666.
- [35] A. Muñoz de la Peña, N. Mora Díez, D. Bohoyo Gil, A.C. Olivieri, G.M. Escandar, "Simultaneous determination of flufenamic and meclofenamic acids in human urine samples by second-order multivariate parallel factor analysis (PARAFAC) calibration of micellar-enhanced excitation-emission fluorescence data", *Anal. Chim. Acta* 569 (2006) 250-259.
- [36] G.M. Escandar, A.C. Olivieri, N.M. Faber, H.C. Goicoechea, A. Muñoz de la Peña, R.J. Poppi, "Second-and third-order multivariate calibration: data, algorithms and applications", *Trac-Trend. Anal. Chem.* 26 (2007) 752-765.
- [37] V. Gómez, M.P. Callao, "Analytical applications of second-order calibration methods", *Anal. Chim. Acta* 627 (2008) 169-183.
- [38] 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.
- [39] 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.* 10 (2005) 1-9.
- [40] K.S. Booksh, B.R. Kowalski, "Theory of analytical chemistry", *Anal. Chem.* 66 (1994) 782A-791A.
- [41] J. Öhman, P. Geladi, S. Wold, "Residual bilinearization: Part I Theory and algorithms", *J. Chemometr.* 4 (1990) 79-90.
- [42] 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.
- [43] D.M. Haaland, E.V. Thomas, "Partial Least-Squares methods for spectral analyses. 2. Application to simulated and glass spectral data", *Anal. Chem.* 60 (1988) 1202-1208.
- [44] R. Bro, H.A.L. Kiers, "A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models", *J. Chemometr.* 17 (2003) 274-286.

- [45] J. Riu, F.X. Rius, "Method comparison using regression with uncertainties in both axes", *Trac-Trends. Anal. Chem.* 16 (1997) 211-216.
- [46] F.J. Del Rio, J. Riu, F.X. Rius, "Graphical criterion for the detection of outliers in linear regression taking into account errors in both axes", *Anal. Chim. Acta* 446 (2001) 49-58.
- [47] A. Muñoz de la Peña, I. Durán Merás, A. Jiménez Girón, H.C. Goicoechea, "Evaluation of unfolded-partial least-squares coupled to residual trilinearization for four-way calibration of folic acid and methotrexate in human serum samples", *Talanta* 72 (2007) 1261-1268.

I.3.3. Discusión del artículo científico 2

El objetivo original del trabajo presentado fue la resolución de la mezcla compuesta por los fármacos CPT-11 y talidomida en muestras de orina, planteando una metodología sencilla basada en la medida de sus señales fluorescentes, dada la experiencia de nuestro grupo de investigación en la determinación del CPT-11 utilizando este tipo de señales, así como los buenos resultados aportados por otros autores en el análisis de la THL. Sin embargo, el bajo rendimiento cuántico de fluorescencia que presenta este último compuesto en comparación con el del CPT-11 y, el hecho de que la orina presenta una señal de fondo que solapa completamente con la de la THL, hace que sea necesario recurrir de nuevo a técnicas quimiométricas que nos ayuden en la resolución de esta compleja mezcla.

Estudios previos

Con el objetivo de mejorar la sensibilidad del método en el análisis de la THL, en primer lugar estudiamos la posibilidad de incrementar su fluorescencia en presencia de disolventes orgánicos o medios organizados como surfactantes o ciclodextrinas. Sin embargo, en este último caso no se observó un aumento significativo en la señal medida, mientras que en relación con la presencia de disolventes orgánicos en el medio, se comprobó que la fluorescencia de la THL disminuye en presencia de MeOH y ACN, y que el EtOH presenta una señal de fondo en la zona de emisión de este compuesto que solapa completamente con la suya. Por otra parte, se evaluó la posible oxidación de la THL con H₂O₂, observando que la intensidad de fluorescencia disminuía en presencia de este agente oxidante. Finalmente, se intentó irradiar este analito con luz UV con la esperanza de observar la formación de algún fotoproducto fluorescente, sin la obtención de ningún resultado positivo.

En estas condiciones nos pareció que, dada la complejidad de la mezcla a la que nos enfrentábamos, el sistema presentado era muy interesante para comparar la capacidad resolutoria de los algoritmos quimiométricos de segundo orden más habituales: PARAFAC, U-PLS y N-PLS.

Interferencia por parte de la muestra de orina

Para poder determinar ambos analitos en muestras de orina es necesario extraerlos previamente, con el objetivo de disminuir, en la medida de lo posible, la señal procedente del fondo de la misma. Para este fin se ha empleado la extracción líquido-líquido previamente optimizada para el CPT-11 y SN-38 en el artículo científico 1, empleando cloroformo como disolvente extractante. Sin embargo, la reconstitución del extracto obtenido tuvo que ser modificada mediante la sustitución del EtOH en el que se redisolvían los analitos por MeOH, puesto que el primero presenta fluorescencia en la zona de emisión de la talidomida, interfiriendo en su determinación. Además, la fluorescencia del analito en presencia de MeOH también se ve disminuida, por lo que el porcentaje de este disolvente en la disolución final fue de un 20% (en contraste con el 50% optimizado previamente), de forma que se aseguraba la redisolución del extracto, pero minimizando el efecto de este disolvente sobre la fluorescencia de la THL.

Cuando las muestras de orina son extraídas en estas condiciones, ciertos compuestos presentes en ella, y que proporcionan señal en el mismo intervalo de longitudes de onda que la THL, también se extraen junto con los analitos de interés, interfiriendo en su análisis, por lo que los algoritmos de segundo orden evaluados deben poseer la capacidad de distinguir esta señal procedente del fondo de la muestra, de la de los analitos de interés para poder llevar a cabo una correcta determinación de los mismos.

Optimización de los parámetros de calibración y validación del método con cada algoritmo

Puesto que los algoritmos empleados son de segundo orden, necesitamos señales analíticas de tres vías. En este caso utilizamos matrices de excitación-emisión, las cuales fueron registradas siempre en las mismas condiciones, concretamente excitando entre en el rango de longitudes de onda de 285 a 385 nm (cada 10 nm) y registrando la emisión entre 365 y 485 nm (cada 2 nm), con el objetivo de no perder información analítica de ninguno de los dos analitos estudiados. Sin embargo, en el rango mencionado aparece la dispersión Raileigh, la cual es indeseable puesto que no está relacionada con la concentración de ningún analito en estudio y puede producir

desviaciones de la linealidad en las rectas de calibrado obtenidas. Por tanto, para ambos compuestos, se seleccionó el rango de excitación y emisión óptimo, tanto para la calibración como para la etapa de predicción. En el caso de este último compuesto, la región seleccionada fue más restrictiva que para el CPT-11 con el objetivo de impedir la interferencia de este compuesto tanto como sea posible. En ambos casos, los máximos de excitación y emisión de cada uno de ellos están dentro del rango seleccionado.

Una vez construida la matriz de calibración, el primer paso en el procesado de los datos consistió en la determinación del número de factores óptimos para cada analito, con cada uno de los algoritmos estudiados. Como ya se ha comentado anteriormente, este punto es muy importante para asegurar que el algoritmo pueda predecir las concentraciones con la mayor exactitud posible.

Para la optimización del número de factores, haciendo uso del test CORCONDIA se analizaron una a una todas las muestras del conjunto de validación encontrándose discrepancias en los resultados obtenidos para los diferentes patrones, como se puede observar en las representaciones mostradas en la Figura I.9.

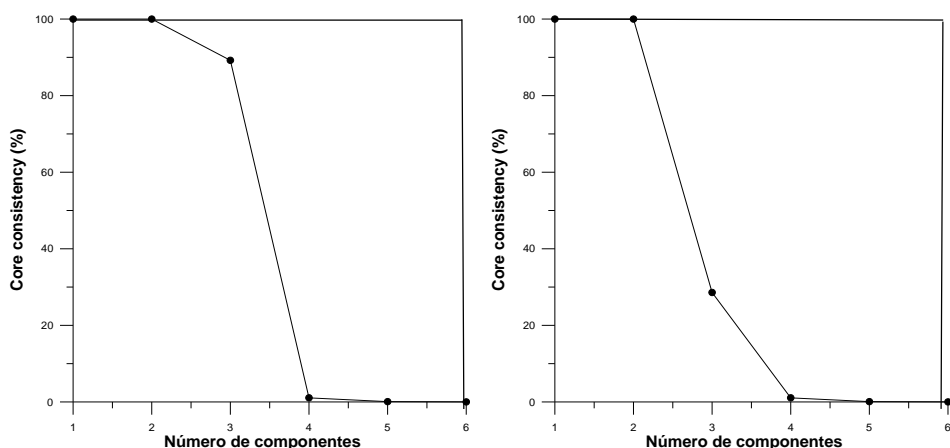


Figura I.9. Representación del *Core consistency* en función del número de factores para diferentes muestras de validación.

Por este motivo, se utilizaron otras alternativas existentes para la determinación de este parámetro, como el análisis de los residuos del ajuste por mínimos cuadrados en la predicción (s_r) en función del número de componentes. De este modo, en el caso de la THL, se obtuvo que el número óptimo de factores igual a 3, ya que los residuos se estabilizaron en un valor comparable con el ruido instrumental (Figura 4, artículo científico 2). Aunque conociendo la composición de los patrones cabría esperar obtener un número de factores igual a 2, el número de factores óptimos encontrado puede explicarse considerando la pequeña contribución de este analito a la señal total, que puede compararse incluso con la señal de dispersión Raman del disolvente, como se explica en el artículo. En el caso del CPT-11, a pesar de que su señal es mucho mayor, los residuos parecen que no llegan a estabilizarse con el número de componentes, por lo que se seleccionó un número de factores óptimos igual a 2, analizando los perfiles obtenidos por el modelo y en base a la composición química de las muestras.

En el caso de N-PLS y U-PLS, para la determinación del número de factores, se realizó el cálculo del parámetro *PRESS* mediante la validación cruzada, y se empleó el criterio propuesto por Haaland y Thomas para su elección. Para ambos algoritmos, al igual que en el caso de PARAFAC, el número de factores óptimo fue 2 para el CPT-11 y 3 para la THL.

Una vez fijado este parámetro, así como la región espectral de trabajo, se analizaron todos los patrones de validación preparados, los cuales contenían ambos analitos en concentración conocida, y que habían sido sometidos al mismo procedimiento de extracción que los patrones de calibración. En el caso del CPT-11 todas las recuperaciones obtenidas fueron próximas al 100%. Además, se evaluaron la exactitud y precisión de los algoritmos mediante el cálculo de los parámetros RMSEP y REP, encontrándose valores muy satisfactorios. Los resultados obtenidos para la THL fueron ligeramente superiores al 100%, siendo la precisión y exactitud del análisis de este compuesto inferior a la del CPT-11. El hecho de que los resultados encontrados para el CPT-11 sean mejores que los obtenidos para la THL era de esperar dado el mayor rendimiento cuántico de fluorescencia del primero. Además, es destacable que los valores de recuperación obtenidos en el análisis de la THL son más próximos al 100% a medida que aumenta la concentración de este analito en los patrones de validación. Aun así, los resultados obtenidos pueden considerarse satisfactorios dada

su baja señal y el solapamiento con el CPT-11 y, en general, cabe destacar que los tres métodos muestran similar capacidad de predicción en el caso de muestras artificiales o patrones.

Análisis de orina

Una vez comprobada la eficacia de los algoritmos para resolver la mezcla de interés empleando patrones de validación de composición perfectamente conocida, se llevó a cabo el análisis de las muestras de orina. Puesto que ésta proporciona señal en el rango de longitudes de onda seleccionado, en todos los casos fue necesario considerar un factor más que el optimizado anteriormente, tanto para la THL como para el CPT-11, como se demuestra en la Figura I.10, en el caso de PARAFAC, al representar el residuo de la predicción frente al número óptimo de componentes.

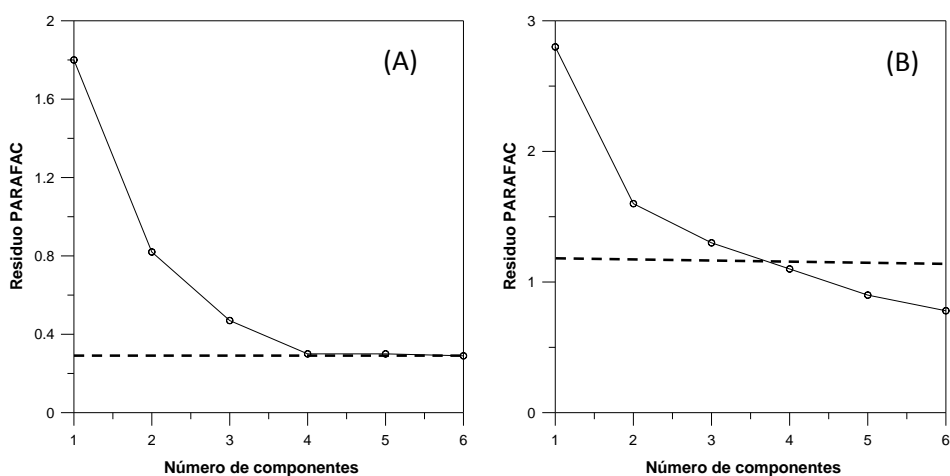


Figura I.10. Representación de los residuos de predicción (s_r) en función del número de componentes para una muestra de orina que contiene $17,92 \mu\text{g mL}^{-1}$ de THL y $0,11 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CPT-11, empleando el rango seleccionado para **(A)** la THL y **(B)** CPT-11.

En el caso de los algoritmos N-PLS y U-PLS, éstos deben emplearse combinados con la herramienta RBL para proporcionarles la ventaja de segundo orden y poder modelar la señal procedente del fondo de la orina, la cual no ha sido tomada en cuenta

en la etapa de calibración. Por esto, es necesario de nuevo tener en cuenta un componente RBL en cada caso.

Una vez establecido el número de factores se analizaron muestras de orina contaminadas con ambos analitos, las cuales se sometieron al procedimiento experimental descrito anteriormente. Al igual que en el análisis de los patrones, el CPT-11 fue resuelto correctamente por los tres algoritmos. En cambio, en el caso de la THL, únicamente se obtuvieron buenos resultados empleando PARAFAC. Esto puede ser debido a que cuando N-PLS y U-PLS se aplican a muestras complejas que presentan un fondo con señal variable, como puede ser la orina, la única posibilidad de obtener buenos resultados es incorporar a la matriz de calibración numerosas muestras en ausencia de los analitos de interés, para poder aproximarnos a una modelación de dicha interferencia. En este caso, este inconveniente sólo parece afectar a la predicción de la THL, algo que es lógico si se tiene en cuenta que la señal de fondo de la orina interfiere fundamentalmente con este analito.

I.4. Determinación de compuestos quimioterápicos en orina mediante electroforesis capilar con detección UV-Visible y fluorescente en serie

I.4.1. Introducción al artículo científico 3

En las últimas décadas, el tratamiento del cáncer de colon se realiza combinando el CPT-11 con 5-FU y LV, los cuales se administran de forma intravenosa, o bien con UFT/LV de forma oral, siendo el UFT una combinación de uracilo y TF en una relación molar 4:1. Durante el metabolismo del TF, éste se transforma en 5-FU, el cual es el metabolito que presenta la actividad anticancerígena, mientras que, como ya se ha expuesto anteriormente, el metabolito activo del CPT-11 es el SN-38. Una exhaustiva revisión bibliográfica nos permitió comprobar que, a día de hoy, no se ha publicado ningún método que permita el análisis de este grupo de compuestos de forma conjunta, lo que nos llevó a desarrollar un procedimiento sencillo para su determinación en muestras de orina, de forma rápida, y con la sensibilidad adecuada. Para ello, recurrimos a técnicas separativas acopladas a dos sistemas de detección en serie, con el objetivo de poder cuantificar los compuestos, que se encuentran en diferentes niveles de concentración, en una única etapa de análisis puesto que, como se ha puesto de manifiesto en los trabajos anteriores, los algoritmos quimiométricos muestran una gran capacidad resolutive pero presentan una importante limitación en cuanto a la aplicación real.

La técnica seleccionada para ello fue la electroforesis capilar, por presentar una serie de ventajas importantes, entre las que cabe destacar su alta eficiencia en la separación de los componentes a analizar, alto poder de resolución, corto tiempo de análisis, bajo consumo de muestra y de reactivos, y gran versatilidad en cuanto a modos de operación y aplicabilidad.

Por otra parte, presenta como principal inconveniente su baja sensibilidad, debido a los pequeños volúmenes de muestra empleados. El sistema de detección más extensamente utilizado en CE es la detección UV-Visible *on-line* o DAD (*Diode Array Detector*) que permite registrar los espectros de los compuestos separados. En ambos casos, la ventana de detección se encuentra en el propio capilar, en el cual se quema una pequeña sección para retirar la capa de poliimida que lo recubre. De acuerdo con la Ley de Lambert-Beer, la absorbancia de la muestra es directamente proporcional a la longitud del camino óptico a través del cual se mide, por lo que en esta técnica el paso de luz está limitado por el pequeño diámetro interno del capilar. Existe la posibilidad de aumentar el camino óptico en la zona de detección utilizando

capilares de burbuja [1] o en forma de Z [2], con los cuales se consigue un aumento de la sensibilidad de 3 a 5 veces con respecto a los capilares normales del mismo diámetro interno. Sin embargo, su uso no se ha generalizado dado que su manejo no es sencillo y, aunque el incremento de sensibilidad obtenido es apreciable, la eficacia en cuanto a la resolución de los picos puede verse afectada de manera importante.

Son muchas las variables que influyen en la separación electroforética: forma y tamaño de los iones, campo eléctrico (voltaje aplicado para la separación), temperatura, viscosidad, fuerza iónica y pH del electrolito soporte, siendo un paso crítico del desarrollo del método analítico la correcta optimización de todos los parámetros instrumentales con el fin de desarrollar una metodología robusta, que proporcione unos resultados reproducibles y fiables. Esta optimización se basa frecuentemente en experimentos de ensayo y error, y puede llegar a ser un proceso lento. El uso de diseños de experimentos permite el estudio de múltiples factores de una manera sistemática y lógica, y conduce a la identificación de las condiciones idóneas.

Orlandini y col. [3] recogen, en un trabajo de revisión muy interesante, recientes aplicaciones de diversa metodología de diseño experimental, empleadas en la optimización de métodos analíticos utilizando la técnica de electroforesis capilar. En esta revisión se describen las características de las estrategias quimiométricas (tipo de diseño, factores y respuestas) aplicadas para hacer frente a una serie de desafíos analíticos en un conjunto de artículos de investigación publicados entre 2007 y 2013. Los autores ponen de manifiesto el amplio uso de las estrategias de diseño experimental en el desarrollo de métodos electroforéticos, y describen las importantes ventajas que presentan respecto a la forma de operar clásica basada en los ensayos de acierto y error. Por otra parte, también destacan la importancia del entendimiento de las herramientas estadísticas implicadas en los diseños de experimentos, así como la responsabilidad del investigador a la hora de planificar las experiencias adecuadas que proporcionen información fundamental en la optimización del método de análisis.

Por este motivo, en este trabajo se han estudiado las condiciones electroforéticas óptimas para la separación de los compuestos de interés empleando esta metodología, para poder conocer cómo influye cada parámetro en el sistema y

simplificar la etapa de optimización de las variables mediante la realización de un menor número de experiencias, lo que conlleva un menor consumo de tiempo.

En el **artículo científico 3** se propone un método electroforético con detección UV-Visible y fluorescente en serie para el análisis simultáneo de todos los compuestos en orina, previa extracción líquido-líquido sobre soporte sólido (SS-LLE, *Solid-Supported Liquid-Liquid Extraction*). A pesar de que, como se ha comentado, la electroforesis capilar presenta como principal inconveniente una baja sensibilidad, es posible el desarrollo de metodología analítica sensible debido a las herramientas de preconcentración ya descritas, siendo su aplicación aun más conveniente en aquellas muestras donde los analitos a determinar no se encuentren en muy baja concentración, como es el caso que se pretende resolver en este apartado.

Bibliografía

- [1] R.O. Cole, D.L. Hillera, C.A. Chwojdak, M.J. Sepaniak, "Evaluation of extended light path capillaries for use in capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection", *J. Chromatogr. A* 736 (1996) 239-245.
- [2] Y. Mrestani, R.H.H. Neubert, "Thiamine analysis in biological media by capillary zone electrophoresis with a high-sensitivity cell", *J. Chromatogr. A* 871 (2000) 351-356.
- [3] S. Orlandini, R. Gotti, S. Furlanetto, "Multivariate optimization of capillary electrophoresis methods: A critical review", *J. Pharm. Biomed.* 87 (2014) 290-307.

I.4.2. Artículo científico 3

Enviado a Journal of Chromatography B

“Development of a simple capillary electrophoresis method with UV-Visible and fluorimetric detection in series to analyze chemotherapeutic agents, previous solid-supported liquid-liquid extraction”

María del Carmen Hurtado-Sánchez, María Isabel Acedo-Valenzuela, Isabel Durán-Merás, María Isabel Rodríguez-Cáceres.

Abstract

Capillary electrophoresis (CE) was used for the rapid determination of three chemotherapeutic drugs employed to treat colorectal cancer: irinotecan, tegafur and leucovorin, and their main metabolites (SN-38 and 5-fluorouracil), in human urine samples. Two experimental designs have been applied to achieve an optimal electrophoretic separation of the compounds. Firstly, a Plackett-Burman design was used to select factors that influence significantly in the electrophoretic separation and, secondly, an experimental design (central composite design) along with the response surface methodology have been used to find the optimal values of each variable. Finally, a phosphate buffer (pH 11.34; 20 mM) was selected as the background electrolyte. A hydrodynamic injection (9 s, 30 mbar) was applied and the separation was carried out using a separation temperature and voltage of 25 °C and 25 kV, respectively. A capillary with two detection windows for serial online UV and fluorescence detection (FD) was satisfactorily employed. A solid-supported liquid-liquid extraction procedure was optimized for the clean-up of the urine samples and the extraction of the analytes. Matrix effects were assessed and suppression signal was observed for three of the analytes, thus, matrix-matched calibration was used for compensating residual matrix effects on these analytes. The CE-FD-DAD proposed method allows the separation and quantification of the chemotherapeutics in less than 7 min. Detection limits range between 0.01 to 0.30 mg L⁻¹. The method was

satisfactorily applied to the determination of the target compounds in human urine samples, with recoveries comprised between 92.4 and 107.7%.

Keywords: *Capillary electrophoresis, Chemotherapeutic agents, Colorectal cancer, Human urine, Response surface methodology, Solid-supported liquid-liquid extraction.*

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cause of cancer death and the second most lethal cancer overall [1]. According to the United States National Institute, the highest levels of success of first-line combination therapy on overall survival are achieved with the combination of irinotecan (CPT-11) and bolus and/or infusional 5-fluorouracil/leucovorin (5-FU/LV) [2].

Many anticancer drugs are sparingly water soluble and they show a low permeability at the intestinal level. The administration of a pro-drug represents one approach to overcome these obstacles [3]. Pro-drugs could be defined as “chemicals with little or no pharmacological activity, undergoing biotransformation to a therapeutically active metabolite”. Pro-drugs are inactive but are converted *in vivo* to active cytotoxic compounds, by different mechanisms.

Irinotecan (CPT-11 or 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]-carbonyloxy-camptothecin) is a water soluble camptothecin derivative. It is a pro-drug, converted *in vivo* to its active metabolite, SN-38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin). As a single agent, or in combined modality regimens, has been investigated in gastric cancer [4], non-small cells lung cancer [5], advanced solid malignancy tumour and others [6].

On the other hand, 5-fluorouracil (5-FU or 2,4-dihydroxy-5-fluoropyrimidine) has been used in cancer therapy [7] since its discovery in 1957. This molecule is active as a single agent in colorectal cancer, and as part of combination regimens for breast, head and/or neck, and upper gastrointestinal malignancies [3]. Its direct administration has several disadvantages and, to avoid them, the use of the pro-drug tegafur (TF or 1-(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil) was introduced.

Leucovorin (LV or folinic acid or 5-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid) is used as a rescue agent and also as a modulator of the pyrimidine antagonist 5-FU. The biological activity of LV is apparently restricted to the (6S)-LV diastereoisomer, which is rapidly converted to its active metabolite (6S)-5-methyltetrahydrofolate [8].

In April 2000, CPT-11 was approved in association with 5-FU and LV as first line in the treatment of advanced colorectal cancer [9]. This combination is known as IFL schedule when the drugs are administered as a bolus formulation, whereas is called FOLFIRI regimen when the drugs are administered intravenously [10].

There are many treatment schemes, among others, the Saltz regimen [9]: 125 mg m⁻² of CPT-11, 500 mg m⁻² of 5-FU and 20 mg m⁻² of LV (IV bolus), and the FOLFIRI regimen [10]: CPT-11 (180 mg m⁻² IV over 90 minutes), concurrently with LV (400 mg m⁻² [or 2 x 250 mg m⁻²] IV over 120 minutes); followed by 5-FU (400-500 mg m⁻² IV bolus) then 5-FU (2400-3000 mg m⁻² intravenous infusion over 46 hours).

To date, no analytical method about the simultaneous resolution of the five analytes presented in this work has been developed. In the literature, only binary mixtures of these drugs have been determined. Thus, without using separation techniques, Durán-Merás *et al.* [11] resolve the binary mixture CPT-11 + SN-38, using spectrofluorimetry coupled with first-order multivariate calibration (PLS-1). Also, second-order multivariate methods has been applied to resolve the mixture of CPT-11 and LV using photoinduced spectrofluorimetry and PARAFAC, N-PLS and BLLS [12], and the mixture LV + methotrexate has been resolved using four-way fluorescence excitation-emission-kinetic data [13].

Although this work shows that the resolution of binary mixture can be performed by spectroscopic methods, separation techniques are usually used. Thus, HPLC with UV [14-16], fluorescence [17-19] or mass detection [14, 20-22] have been proposed.

HPLC with UV detection has been employed for the resolution of TF + 5-FU in human plasma [14], in beagle dog plasma [15] and to analyze LV + 5-FU in human plasma [16], whereas HPLC with fluorimetric detection [17-19] has been mainly used for the resolution of the mixture CPT-11 + SN-38.

Only one reference about the use of CE for the analysis of CPT-11 and SN-38 has been found [23]. However, the mixture of 5-FU and its pro-drug tegafur has been studied by capillary zone electrophoresis (CZE) with UV [24-27] or electrochemical detection [28].

In 2012, Aucelio *et al.* [23] carried out the determination of CPT-11 and SN-38, in urine and saliva, using micellar electrokinetic chromatography (MEKC). The detection of the analytes was made at 368 nm, using a borate buffer (pH 8.8) solution containing sodium dodecyl sulphate and acetonitrile. The authors made an on-line preconcentration and use a Z shaped cell.

The determination of 5-FU and tegafur in pharmaceuticals has been improved by using large-volume sample stacking in CE [24]. Also, due that in the last decades 5-FU has been one of the most frequently antineoplastic agents used; it has been regarded for environmental monitoring. For this reason, Mahnik *et al.* [25] propose the use of CE for its determination in hospital effluents.

On the other hand, the determination of 5-FU in plasma samples has also been carried out by CE, using a running buffer composed of TRIS/H₃PO₄ (pH 7.0; 30 mM) and 5% isopropanol [26]. Flores *et al.* [27] developed a rapid CZE method for the direct determination of 6-thioguanine, methotrexate and 5-FU in human urine, with a limit of detection for 5-FU of 2.60 mg L⁻¹. Also, CZE has been applied to the analysis of 5-FU in urine and bovine serum albumin with electrochemical detection [28]. Finally, the determination of LV together with methotrexate and folic acid, in human urine, has been performed by CZE, using a phosphate buffer (pH 12; 15 mM), in approximately 9.0 min. Detection limits for the three compounds in urine were 0.35 mg L⁻¹ [29].

In this paper, we describe the development of an easy, quick and cheap capillary electrophoretic method with fluorescence and diode array detectors in series, CE-FD-DAD, for determination of the chemotherapeutic compounds used in the first-line treatment of colorectal cancer.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and materials

For all experiments, analytical reagent grade chemicals and solvents were used. CPT-11, SN-38, LV, and TF were supplied from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain), and 5-FU was purchased from Fluka (Madrid, Spain). Stock standard solutions of individual analytes (with concentrations ranging from 156.0 to 331.4 mg L⁻¹) were prepared by dissolving adequate amounts of the powder presentations of each compound in methanol, with exception of LV, which was dissolved in ultrapure water, and stored under refrigeration at 4 °C.

The background electrolyte (BGE) was prepared from disodium hydrogen phosphate (Panreac, Barcelona, Spain), adjusting the pH to 11.34 with NaOH (Scharlau, Barcelona, Spain).

Methanol and acetonitrile were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain), while chloroform and ethyl acetate were obtained from Panreac (Barcelona, Spain).

Ultrapure water was obtained from a Millipore Milli-QA10 System (Millipore S.A.S., Molsheim, France).

2.2. Instrumentation and software

All CE experiments were conducted using a capillary electrophoresis system Hewlett Packard ^{3D}CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), equipped with temperature control in the sample tray (by a thermostatic bath) and in the capillary (by forced air), a fluorescence detector (Argos 250B, Flux Instruments, Switzerland) with a fluorescence flow-cell mounted on the modified cassette for the Agilent CE, and equipped with a Xe-Hg lamp, a 240-400 nm band-pass as excitation filter and a 418 nm cut-off emission filter, and a diode array detector (DAD) (Agilent Technologies). Studies were carried out using a fused-silica capillary of 58.5 cm × 75 µm i.d. × 375 µm o.d. (BGB Analytik, Switzerland), with two detection windows (Fig. 1). The software package ChemStation was used to control the instrument.

A Crison MicropH 2001 (Barcelona, Spain), equipped with a combined glass/saturated calomel electrode, was used for pH measurements.

Chem Elut cartridges (3 mL) from Agilent Technologies (Madrid, Spain) were used for the solid-supported liquid-liquid extraction of human urine samples.

The software package THE UNSCRAMBLER® [30] was employed for the experimental designs and response surface methodology studies. Calibration curves and analytical figures of merit were performed by means of the ACOC program [31], in MATLAB code.

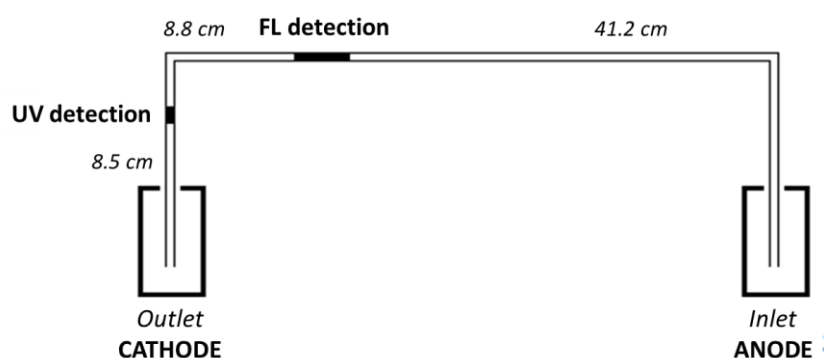


Figure 1. Dimensions of capillary employed in electrophoretic separation.

2.3. Capillary electrophoresis method

The background electrolyte (BGE) for the separation of the chemotherapeutic compounds was prepared daily, and consisted in a phosphate buffer (pH 11.34; 20 mM). The buffer vials were filled with new filtered BGE solution each three injections.

Before the first use, the capillary was conditioned by rising at 900 mbar with 1.0 M NaOH for 15 min at 50 °C, followed by ultrapure water for 15 min, and BGE for 15 min, at 25 °C. At the beginning of each day, the capillary was rinsed with ultrapure water, 0.1 M NaOH and BGE for 10 min in each case, at 900 mbar. For the separation, the capillary was previously flushed with BGE for 3 min (900 mbar) and, after the separation, in post-conditioning, was rinsed with 0.1 M NaOH for 3 min at 2 bar and ultrapure water for 2 min at 2 bar.

Samples were hydrodynamically injected at 30 mbar for 9 s, and then followed by an injection of running buffer at 30 mbar during 1 s to minimize the sample loss. Separation was performed at 25 kV for 6 min at 25 °C. Under these conditions the current were 112-115 μ A.

2.4. Human urine analysis

A 2.0 mL aliquot of a pool of human urine spiked with the analytes was transferred to a Chem Elut cartridge and, after 2 min, the analytes were eluted with 2.0 mL of ethyl acetate-methanol mixture (95:5, v/v), and the eluate was collected in a round-bottom flask. Elution was repeated with another 5.0 mL of the same mixture and, finally, with 5.0 mL of chloroform. The combined eluates were evaporated at 40 °C until dryness under pressure, and reconstituted in 1.0 mL of MeOH followed by 1.0 mL of BGE, prior to injection into the CE system. The separation of analytes was carried out under the conditions described in Section 2.3. SN-38 was fluorimetrically monitored, while the rest of compounds were photometrically detected at 265, 272, 288 and 360 nm, for 5-FU, TF, LV, CPT-11, respectively.

3. Results and Discussion

3.1. Optimization of detection parameters

Among the analyzed compounds, only CPT-11 and its metabolite SN-38 are fluorescent while the rest of compounds only present spectrophotometric characteristics. The structures of each analyte are shown in Fig. 2. In order to have the best conditions for the fluorimetric and UV detection of these compounds, previous studies in relation to its spectral behavior were carried out. First, the structures and pK_a values from the studied compounds were revised; LV presents the lowest pK_a value (3.76), while CPT-11 and SN-38 show the highest values. Previous studies carried out in our research group show that the highest pK_a value of CPT-11 is 8.93 [32], while SN-38 shows a pK_a value of 8.65 [33]. Thus, solutions of each analyte in a concentration level of 0.50 mg L⁻¹ were prepared in presence of borate buffer (pH 9.2; 100 mM), because at this pH all compounds are in its anionic forms, and the absorption spectra for each analyte were obtained. The wavelengths of maximum

absorbance were 265, 272, 288, 360 and 410 nm, for 5-FU, TF, LV, CPT-11 and SN-38, respectively. In these conditions, the excitation and emission spectra of CPT-11 and SN-38 were also registered. CPT-11 presents an excitation maximum centered at 360 nm and an emission maximum centered at 440 nm. SN-38 shows two excitation maxima at 340 and 410 nm, and a single emission maximum at 548 nm.

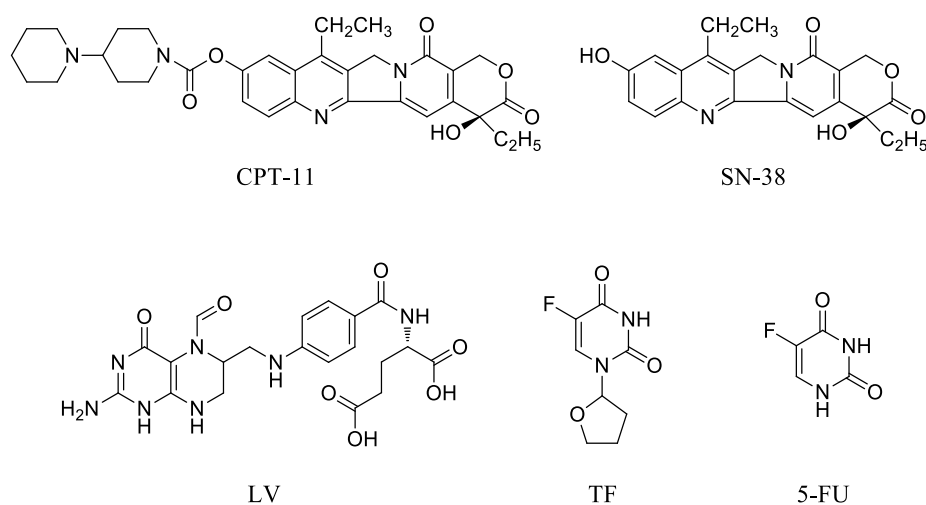


Figure 2. Structures of the chemoterapeutic compounds analyzed.

According to these results, the maximum absorption wavelength of each analyte were selected in the diode array detector. In the fluorescence detector, the operative range was selected by means of a band-pass filter for excitation in the 240-400 nm range, and a long-pass filter for emission at 418 nm, which allows collecting the emission radiation from 418 nm to higher wavelengths.

3.2. Optimization of the chemical conditions for the separation by response surface methodology

Experimental design is a powerful tool for optimizing different non-homogenous parameters and conditions. In our case, chemical variables such as percentage of organic solvent or buffer pH and composition, and instrumental variables such as, capillary temperature, injection time or voltage of separation,

among others, can influence in the electrophoretic migration of the analytes and, therefore, in the development of the separation.

For this reason and, in order to achieve the best conditions in the determination of the studied compounds, statistical experimental design was used to optimize the separation process into two steps. Firstly, a screening experimental design was used in order to enhance the most significant variables that influence in the electrophoretic separation. Secondly, a central composite design and response surface analysis methodology were employed to further investigate the mutual interactions between these variables, and to identify their optimal values that allow achieve the best resolution in the lowest analysis time as possible.

Two-level Plackett-Burman design was used to screen and identify the most influence variables in the electrophoretic separation of the analytes. The variables studied were: pH (10.5-12.3), concentration of BGE (10-30 mM), % MeOH in BGE (0-1%), voltage (10-20 kV), temperature (15-30 °C) and injection time (3-15 s). For this study, the aqueous samples were constituted by standard solutions containing 10.0 mg L⁻¹ of each analyte in presence of phosphate buffers of different concentrations and pH as BGE. Camptothecin (CPT) was used as internal standard and all samples were eluted under the conditions indicated in the design. The influence of pH was studied in basic medium, and the selected interval, 10.5-12.3, well above pK_a's values of the studied analytes, allows us to improve the fluorescence sensibility of SN-38 [33], without affecting the electrophoretic resolution.

Under these conditions, the variables that have a significant influence ($p < 0.05$) are voltage, temperature and injection time, all with a positive effect, and % MeOH in BGE, that presents a negative effect. The concentration and pH of phosphate buffer are not crucial variables in the above mentioned range for the electrophoretic separation of the chemotherapeutic compounds. Thus, a phosphate buffer (pH 11.34; 20 mM) was selected as BGE for further experiments, and was prepared in absence of MeOH.

Next, a full factorial design was employed to select the optimum values of the three most influential factors. For this, a central composite design was used with the purpose of calculating simultaneously the effect of the change in each one of these variables and also their possible interactions. Five levels were fixed for each variable

and three central samples were also included, giving rise to a total of 17 experiments (Table 1). The runs were carried out in a randomized sequence to minimize the effect of uncontrolled variables on the response. In the selection of the response function (RF), sensitivity and electrophoretic parameters have been taken into account. The selected RF was:

$$RF = \frac{\bar{A}'}{\text{run time} \cdot \bar{w}_{1/2}}$$

where \bar{A}' is the average of the corrected peak areas (calculated as the division of the peak area of each analyte by its corresponding migration time), run time is the migration time of the last analyte, and $\bar{w}_{1/2}$ is the average of the width peaks at half height of all analytes. The values obtained for these parameters in each run can be seen in Table 1.

Table 1. Central composite design^a.

Run	V (kV) (10-25 kV)	T (°C) (15-30 °C)	Injection time (s) (3-15 s)	Run time (min)	RF
1	17.5	15.0	9.0	11.3	1.1617
2	17.5	30.0	9.0	9.0	1.7746
3	10.0	22.5	9.0	21.3	0.4046
4	25.0	22.5	9.0	5.6	5.0142
5	17.5	22.5	3.0	9.8	0.9817
6	17.5	22.5	15.0	9.5	1.8240
7	13.0	18.0	5.5	14.7	0.6088
8	13.0	27.0	5.5	13.0	0.8402
9	22.0	18.0	5.5	7.4	2.3881
10	22.0	27.0	5.5	6.5	3.2805
11	13.0	18.0	12.6	14.7	0.8153
12	13.0	27.0	12.6	7.5	3.0849
13	22.0	18.0	12.6	7.1	3.1807
14	22.0	27.0	12.6	6.4	4.1748
15	17.5	22.5	9.0	9.4	1.8928
16	17.5	22.5	9.0	9.1	1.9239
17	17.5	22.5	9.0	9.2	1.9005

^a Lowest and highest values for each variable were given in brackets.

The numerator of this expression evaluates the sensitivity through the peak areas values at 265 nm. The denominator represents the performance of the electrophoretic separation. The separation voltage correlates directly with the migration time (run time of the separation), and it affects to the resolution. The migration time decreased with the increasing voltage. The running time is an important factor because in some samples, the time is excessive, it even takes more than 20 min. On the other hand, the peak width parameter has been included because it is affected both by the temperature and injection time. In this way, peak width increases proportionally with the injection time. Narrower peaks in short running time, give higher values for the RF. Resolution has not been included in RF because the obtained values for all standards were higher than 1 and peaks were good resolved.

The optimization of the model was made with The Unscrambler® software package [30], and the results were interpreted by the response surface methodology. In the corresponding analysis of variance (ANOVA) a second-grade quadratic model has been assumed (model check quadratic, p -value (95%) = 0.0006). It was proven that the effects of voltage (p -value = 0.0002), temperature (p -value = 0.0384) and injection time (p -value = 0.0350) contribute significantly to the model for a 95% confidence level. Nevertheless, the interactions voltage-temperature (p -value = 0.7175, voltage-injection time (p -value = 0.6535), and temperature-injection time (p -value = 0.2306) are not significant to the model for the considered confidence level. On the other hand, the p -value (95%) calculated for lack of fit was 0.0583, which means that the model describes the true shape of the response surface. Fig. 3 shows the response surface estimated by the model, for each pair of variables. In these surfaces, the maximum value of RF corresponds to the values of variables: voltage, 25 kV; temperature, 25 °C; and injection time, 9 s. Under these conditions, the migration of the analytes was fast and the peaks were well resolved to the baseline, as can be seen in Fig. 4. Analysis time was completed in 6 min, and the total time per run, including pre and post-run, was 15 min.

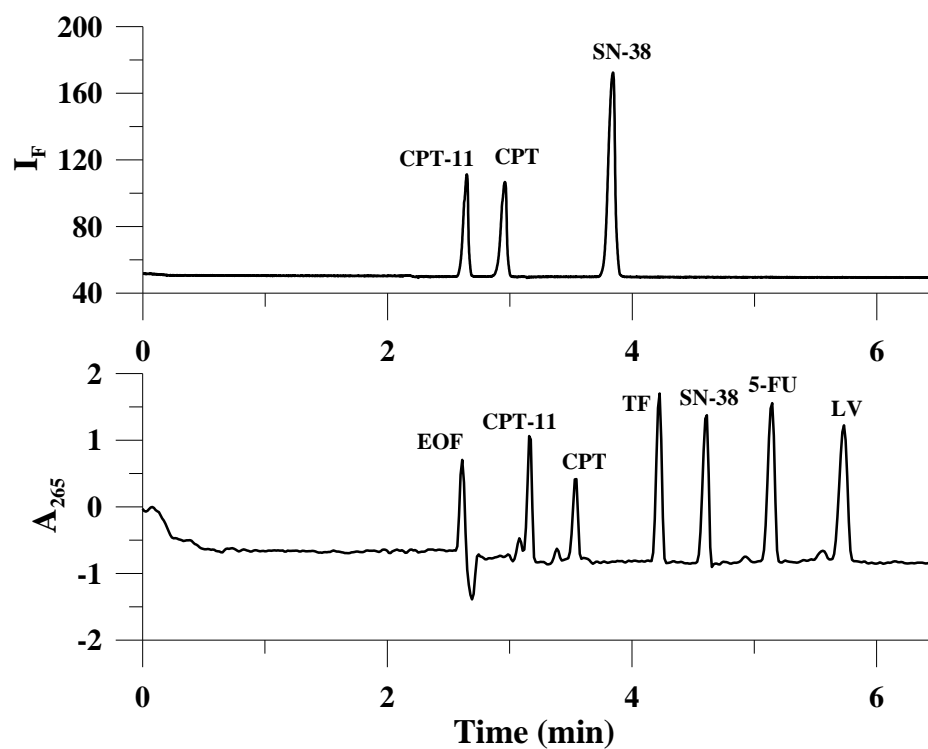


Figure 4. Electropherograms of a 10 mg L⁻¹ stock standard solution of each chemotherapeutic. Conditions: capillary, 58.5 cm x 75 μ m i.d.; capillary temperature, 25 $^{\circ}$ C; 9 s hydrodynamic injection; applied voltage, 25 kV; phosphate buffer (pH 11.34; 20 mM) as BGE; UV detection at 265 nm; Fluorescence detection by means of a band-pass filter for excitation in the 240-400 nm range, and a cut-off filter for emission at 418 nm.

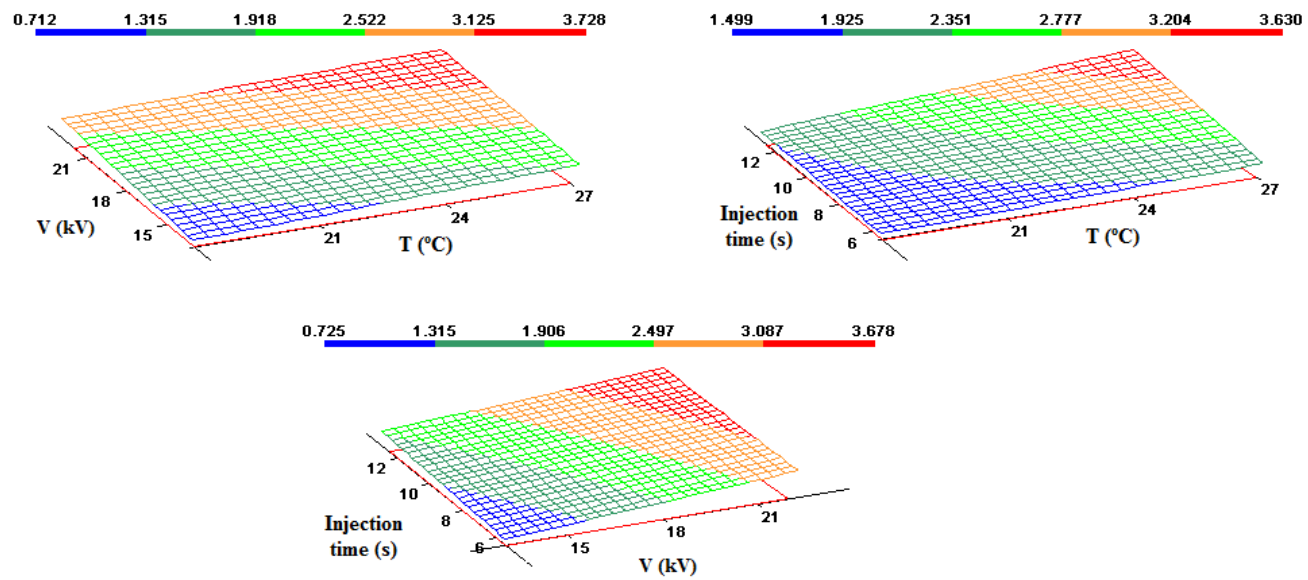


Figure 3. Response surface plots of the effects of voltage, temperature and injection time, and their interaction.

3.3. Analysis of real samples: extraction procedure optimization

Because some of the tested analytes absorb at low wavelengths (265-288 nm), the direct injection was not possible because the urine is a complex matrix with several compounds absorbing at these wavelengths, thus, it presents a background that interferes in the analysis of the compounds of interest. For this reason, a clean-up step of the sample, previous to the analysis, was required to eliminate interferences. Liquid-liquid extraction (LLE), and solid phase extraction (SPE) with C18 cartridges, are the most widely applied methods to remove possible contaminants in the analysis of chemotherapeutic compounds in biological samples.

Firstly, extraction procedures with C18 cartridges were assayed with urine samples spiked with the compounds of interest. For that, the cartridges were previously conditioned with 4.0 mL of MeOH and 4.0 mL of ultrapure water. The sample was passed through the cartridge, and the retained compounds were eluted with MeOH. BGE was added to the resulting solution and the corresponding electropherogram was registered in the optimized conditions. The results obtained showed that CPT-11, SN-38 and TF were successfully extracted, whereas recoveries achieved from LV were low, and 5-FU was not eluted from the cartridge. Bearing in mind the structures of these compounds and the studies carried out, we observed that LV was not retained in the C18 cartridge probably due to its high polarity, while 5-FU, the less polar compound, is retained in the C18 cartridge and is not eluted by the MeOH, which is a relatively polar solvent. Other solvents with lower polarity, such as ACN, n-butanol and tetrahydrofuran, were assayed as extracting solvent, but 5-FU was not extracted from the cartridge in any case.

Bearing this in mind, LLE was employed as urine samples cleaning procedure. Several solvents (ethyl acetate, dichloromethane, chloroform, carbon tetrachloride, n-butanol and acetonitrile) were individually evaluated by extracting spiked urine samples with a volume ratio urine sample:solvent 1:1 and agitation time of 90 s. Of all solvents assayed, none provides a simultaneous extraction of all compounds. Chloroform provided the best results for the extraction of CPT-11, SN-38 and TF, with recoveries near to 100%. 5-FU was only extracted with n-butanol and LV with ethyl acetate. According to the obtained results, three consecutive extraction steps with different solvents would be necessary to achieve a complete extraction and analysis

of the target compounds in urine. Taking into account that the total analysis time would be too long and the problems detected due to the formation of emulsions in the extraction steps, this option was rejected and a relatively new extraction technology, the solid-supported liquid-liquid extraction (SS-LLE), was considered.

SS-LLE offers advantages regarding to traditional extraction techniques: high recoveries, removal of the matrix effect, minimum sample handling, prevents the formation of emulsions and reduced sample volumes [34]. It is conceptually analogous to traditional LLE, however, it uses an inert support material such as modified diatomaceous earth, with a high surface area for extraction interface and a modified flow-through technology. Other advantage offered by this extraction technique is that not require solvent preconditioning and the sample is directly loaded in the cartridge.

A SS-LLE procedure has been previously proposed to analyze 5-FU in plasma and urine samples [35], using an ethyl acetate-methanol mixture (95:5, v/v) as the extracting solvent. This extraction method has been modified and extended to the analysis of the five analytes studied in human urine samples. Chem Elut cartridges, packed with inert diatomaceous earth sorbent, have been employed. Parameters such as extraction pH, solvent of elution and volume, among others, were carefully studied and optimized. For that, an aliquot of 2.0 mL of a human urine sample was spiked with 0.50 mg L⁻¹ of SN-38 and 10.0 mg L⁻¹ of the rest of compounds of interest.

Firstly, the capability of the ethyl acetate-methanol solvents mixture (95:5, v/v) to extract all target compounds was tested. The results obtained showed that CPT-11 was not eluted under these conditions, and for this reason, a second extracting solvent was employed: chloroform. Several combinations and volumes of these solvents were tested in order to achieve the maximum recovery as possible. Finally, the following combination of solvents: 2.0 mL of ethyl acetate-methanol (95:5, v/v), followed by 5.0 mL of the same mixture, and 5.0 mL of chloroform.

Regarding the influence of pH, this variable was studied in a range comprised between 1 and 8. For that, 0.5 mL of trichloroacetic (pH 1), or 0.5 mL of chloroacetic/chloroacetate (pH 2 and 3), acetic/acetate (pH 4, 4.4, 5, 5.6 and 6) and TRIS (pH 7 and 8) buffers were added to the urine sample before the extraction. The obtained results showed that at low values of pH (1-3), urine interferences, which

overlap with TF signal, are also eluted. Between pH 3 and 6, the maximum extraction recoveries were achieved for 5-FU, and for LV the best results were obtained at pH 4.4 and 6. As a compromise, pH 5, fixed with acetic/acetate buffer was selected as optimum.

In SS-LLE, the aqueous sample is adsorbed and distributed as a thin film over the solid support. In consequence, it is necessary to wait a few minutes before elution of the target compounds. Different waiting times between the addition of the sample to the cartridge and the elution step (0, 2, 5, 10 and 15 min) were tested, and it was found that the extraction efficiency was kept constant from 2 min, and this time was selected as optimum. This behavior shows that the equilibrium state is reached very quickly decreasing the total duration of the extraction procedure.

Under these optimized conditions, the final recoveries of the compounds were approximately 100% for CPT-11, SN-38 and TF, while the percentage of extraction for 5-FU and LV were 65% and 47%, respectively. In Fig. 5A, the electropherograms corresponding to a spiked urine sample after the optimized extraction procedure, and a standard mixture of the analytes, are shown. These electropherograms were registered at the optima UV wavelength of each analyte, and for CPT-11 and SN-38, the electropherograms obtained by using fluorescence detection were also included. As it is observed, in presence of urine the migration time of LV is affected. With the object to confirm that this peak corresponds to LV, urine samples were spiked only with different concentrations of this analyte (7.0, 12.0 and 25.0 mg L⁻¹) and, as can be seen in Fig. 5B, the peak increases with the concentration of LV. Also, it was confirmed by obtaining the spectrum in the peak with DAD detector and comparing it with the spectrum of a standard solution. This suggests that, despite the SS-LLE procedure, a matrix-effect occurs.

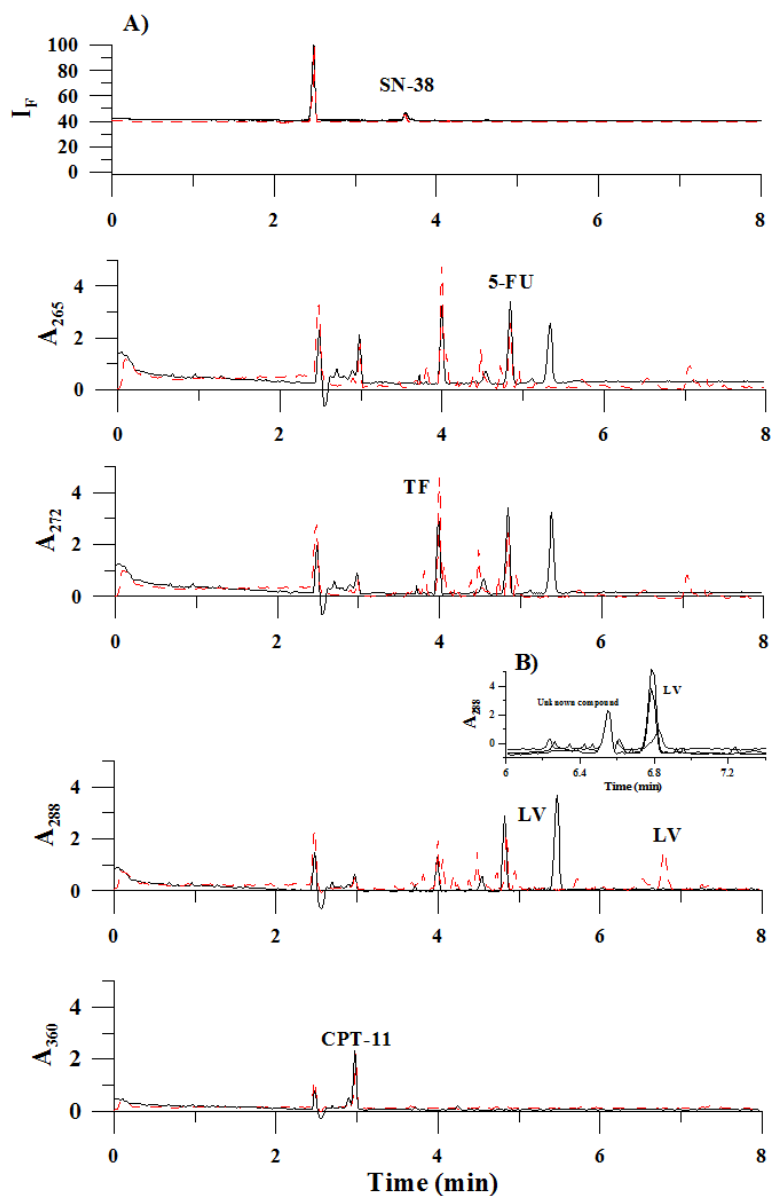


Figure 5. (A) Electropherograms corresponding to a stock standard solution (—), and a spiked human urine sample, after optimized SS-LLE procedure (-----). [CPT-11] = [TF] = [5-FU] = [LV] = 10 mg L⁻¹; [SN-38] = 0.5 mg L⁻¹. Separation and fluorescence detection conditions as indicated in Figure 2. UV detection: 5-FU at 265 nm; TF at 272 nm; LV at 288 nm, and CPT-11 at 360 nm. **(B)** Electropherograms of urine samples spiked with different levels of LV.

3.4. Evaluation of matrix effects

Matrix effects were tested by comparing the slopes from standard addition and external standard calibrations. This comparison was carried out with ACOC program [31], at 95% of confidence level. Results obtained showed that, except for TF, matrix suppression effect was observed for all compounds.

Matrix-matched calibration method can be used to compensate the matrix effect when matrix suppression phenomena cannot be eliminated, if blank samples are available. To apply this type of calibration, it is necessary to check if the matrix effect found for each analyte is independent of the sample. For that, slopes of external calibration curves in water were compared with slopes of external calibration curves from three urine samples. All samples were taken from healthy people, to assure the complete absence of the target compounds in them, of different ages (woman of 26 years old and two men of 27 and 50 years old, respectively). Then, slope ratios matrix/solvent (urine samples /external calibration) were obtained for each compound, considering a tolerable signal enhancement or suppression effect if the slope ratio ranged from 0.9 to 1.1, whereas values higher than 1.1 or lower than 0.9 imply a strong matrix effect. The calibration curves for each compound are shown in Fig. 6. From the values of the slope ratios matrix/solvent is possible to deduce that the matrix effect is irrelevant for TF and 5-FU, and is important for CPT-11, SN-38 and LV (Fig. 7). For these analytes, signal suppression was observed for all urine samples analyzed. Due to the significant matrix-effect observed for these three analytes, the analysis of the chemotherapeutics in urine samples has been carried out using matrix-matched calibration.

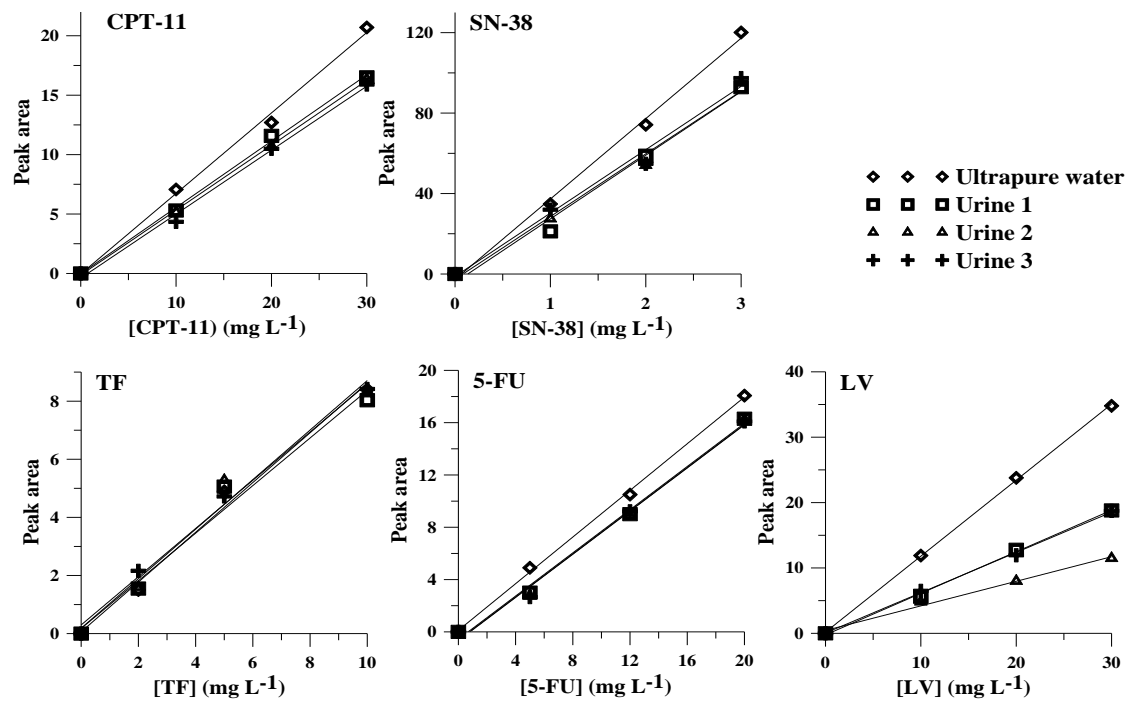


Figure 6. Comparison between calibration curves in water and in three human urine samples, after optimized SS-LLE procedure. UV detection: 5-FU at 265 nm; TF at 272 nm; LV at 288 nm, and CPT-11 at 360 nm. Fluorescence detection: SN-38, by means of a band-pass filter for excitation in the 240-400 nm range, and a cut-off filter for emission at 418 nm.

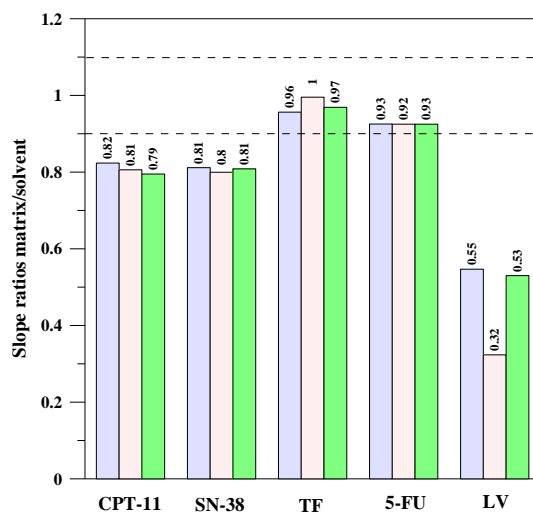


Figure 7. Slope ratios matrix/solvent comparison; Urine 1: blue, Urine 2: red and Urine 3: green.

3.5. Method validation

The method was validated in terms of linearity, precision, accuracy, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ). Matrix-matched calibration curves were used, and for this, aliquots of a pool of blank human urine samples, collected from four healthy volunteers, were spiked with the analytes at four concentration levels in the ranges 1-30 mg L⁻¹ for CPT-11 and LV, 2-20 mg L⁻¹ for TF and 5-FU and 0.05-3.5 mg L⁻¹ for SN-38, and submitted to the SS-LLE procedure. Each standard was prepared in triplicate. Peak areas at the optimum UV wavelengths for each analyte were selected as analytical signal. For CPT-11 and SN-38 peak areas from the signal obtained with the fluorescence detector were also employed.

Good linearity was obtained with determination coefficients higher than 0.99 for all compounds, when calibration curves were obtained. Results of the least squares regression analysis and detection and quantification limits are summarized in Table 2. The LOD and LOQ were calculated as the concentrations corresponding to 3 and 10 times the standard deviation of the signal from baseline from the electropherograms. These data are summarized in Table 2.

Table 2. Validation parameters of the proposed method.

Compound	Detector	Linear range (mg L ⁻¹)	Intercept (SD) ^a	Slope (SD) ^a (mg L ⁻¹)	R ²	LOD ^b (mg L ⁻¹)	LOQ ^c (mg L ⁻¹)	Precision ^d	
								Intraday (n = 5)	Interday (n = 5)
CPT-11	DAD (360 nm)	1.0-30.0	-0.4 (0.3)	5.56 (0.02)	0.9934	0.19	0.63	1.3	3.4
	FD	0.05-3.5	0.89 (0.3)	16.4 (0.2)	0.9990	0.01	0.03	1.9	1.7
SN-38	DAD (418 nm)	1.0-30.0	-1.1 (0.6)	1.75 (0.03)	0.9986	0.22	0.73	1.6	3.8
	FD	0.05-3.5	-0.8 (0.7)	31.7 (0.6)	0.9974	0.01	0.03	2.4	2.9
TF	DAD (272 nm)	2.0-20.0	1.7 (0.2)	1.12 (0.02)	0.9984	0.23	0.77	4.5	6.1
5-FU	DAD (265 nm)	2.0-20.0	-0.6 (0.2)	0.84 (0.02)	0.9967	0.25	0.83	5.4	3.3
LV	DAD (218 nm)	2.0-30.0	0.3 (0.1)	0.67 (0.01)	0.9994	0.30	1.00	3.1	4.7

^aSD: Standard Deviation.

^bLimit of detection.

^cLimit of quantification.

^dExpressed as Relative Standard Deviation (% RSD). Standard solutions employed containing 16.0 mg L⁻¹ CPT-11; 0.3 mg L⁻¹ SN-38; 10.0 mg L⁻¹ TF; 10.0 mg L⁻¹ 5-FU and 16.0 mg L⁻¹ LV.

To evaluate the repeatability (intraday precision, $n = 5$) of the method, one spiked blank sample with 16.0 mg L^{-1} CPT-11 and LV, 10.0 mg L^{-1} TF and 5-FU, and 0.30 mg L^{-1} SN-38 was assayed. Interday precision (reproducibility) was analyzed during five consecutive days at the same concentration levels. As can be seen, both intraday and interday precision values are lower than 7%, which indicates the repeatability of the proposed method, therefore the use of the internal standard CPT is not necessary.

3.6. Application of the method to the analysis of chemotherapeutic compounds in human urine samples

Due to the difficulty to obtain real urine samples, after the optimization of the conditions for the extraction and separation of the chemotherapeutic compounds, the method was checked by analyzing a human urine pool from four healthy people, spiked at three concentrations levels with the five chemotherapeutics, in triplicate, and using the optimized SS-LLE procedure.

To know the concentration levels in which these compounds are presents in human urine, the doses administered in the main first-line treatments applied to patients with colorectal cancer [9, 10, 36-39] were analyzed using a colorectal cancer nomogram [40], and considering a patient with a weight of 80 kg and a height of 1.76 m.

In accordance with previous researches about excretion of these compounds in human urine, in the first 24 h, all compounds are excreted in a range between 4-22% [41-44], with exception of SN-38, which is excreted in a range between 0.18 and 0.43% [41]. These percentages allow us to conclude that, in urine, all compounds are present in the range of mg L^{-1} , with the exception of SN-38, which is present in levels of $\mu\text{g L}^{-1}$. For this reason, analysis of CPT-11, TF, 5-FU and LV in urine was carried out with the DAD detector, while SN-38 was analyzed employing the fluorescence signal.

The results obtained when urine samples were analyzed by the proposed CE-FD-DAD method, are summarized in Table 3. It can be seen that satisfactory recoveries, comprised between 92.4 and 107.7%, were obtained in all cases.

Table 3. Recoveries of the compounds analyzed in spiked human urine samples.

Compound	Concentration (mg L ⁻¹)		%Rec. (SD) ^a	Concentration (mg L ⁻¹)		% Rec. (SD)	Concentration (mg L ⁻¹)		% Rec. (SD)
	Added	Found		Added	Found		Added	Found	
CPT-11	7.00	6.92	97.8 (1.3)	12.0	11.72	94.2 (3.0)	25.00	23.78	95.1 (0.7)
		6.87			11.04			23.94	
		6.74			11.15			23.61	
SN-38	0.35	0.37	105.1 (1.8)	0.55	0.55	101.0 (0.9)	1.20	1.28	105.3 (1.4)
		0.38			0.56			1.27	
		0.36			0.55			1.24	
TF	6.00	5.48	92.4 (1.0)	10.00	10.57	103.8 (1.7)	17.00	16.23	96.3 (0.8)
		5.56			10.24			16.37	
		5.59			10.33			16.50	
5-FU	6.00	5.62	97.2 (3.1)	10.00	10.27	107.7 (2.0)	17.00	17.02	100.9 (0.9)
		5.89			10.08			17.12	
		5.98			10.47			17.31	
LV	7.00	7.67	107.2 (2.4)	12.00	12.52	102.10 (2.1)	26.00	26.40	103.8 (2.0)
		7.33			12.22			23.34	
		7.52			12.02			27.24	

^aSD: Standard Deviation.

4. Conclusions

Surface response methodology has been employed to optimize an electrophoresis capillary method, with both fluorimetric and UV detection, to analyze five compounds used in chemotherapy for colorectal cancer, employing a phosphate buffer (pH 11.34; 20 mM) as BGE. Firstly, a Plackett-Burman design was employed to highlight the most important variables that influence in the electrophoretic separation and, secondly, a central composite design was used to optimize them. Finally, the separation was executed using a voltage of 25 kV and 25 °C of temperature. Also, the sample was hydrodynamically injected in the system during 9 s. In these conditions, a good peak resolution was achieved in less than 6 min.

Once the method was optimized, it was applied to the analysis of the target compounds in human urine samples. For that, due to the background provided for this sample, a SS-LLE was optimized to eliminate the potential interferences. A very good extraction recovery was obtained for CPT-11, SN-38 and TF, approximately of 100%, but only around 50% of recovery was achieved in the case of 5-FU and LV. Finally, this method was validated by the analysis of the compounds in spiked urine samples. Matrix effects were found for all compounds except for TF and 5-FU, for that reason, matrix-matched calibration was employed to solve this drawback. The detection limits of the developed CE-FD-DAD procedure are adequate to determine the normal levels of the target analytes in urine samples.

References

- [1] C. Fuchs, E.P. Mitchell, P.M. Hoff, "Irinotecan in the treatment of colorectal cancer", *Cancer Treat. Rev.* 32 (2006) 491-503.
- [2] C.H. Köhne, "Level of evidence of irinotecan clinical trials and recent data in colorectal cancer", *EJC Suppl.* 2 (2004) 3-7.
- [3] S. Mazzaferro, K. Bouchemal, G. Ponchel, "Oral delivery of anticancer drugs II: the prodrug strategy", *Drug Discov. Today* 18 (2013) 93-98.
- [4] H. Wilke, O. Bouché, P. Rougier, C.H. Köhne, "Irinotecan for the treatment of gastric cancer", *EJC Suppl.* 7 (2004) 48-51.
- [5] M.H. Jagasia, C.J. Langer, D.H. Johnson, F. Yunus, J.S. Rodgers, L.L. Schlabach, A.G. Cohen, Y. Shyr, D.P. Carbone, R.F. DeVore, "Weekly irinotecan and cisplatin in

- Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: a multicenter Phase II study”, *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 68-73.
- [6] H.C. Pilot, R.M. Goldberg, J.M. Reid, J.A. Sloan, P.A. Skaff, C. Erlichman, J. Rubin, P.A. Burch, A.A. Adjei, S.A. Alberts, L.J. Schaaf, G. Elfring, L.L. Miller, “Phase I dose-finding and pharmacokinetic trial of irinotecan hydrochloride (CPT-11) using a once-every-three-week dosing schedule for patients with advanced solid tumor malignancy”, *Clin. Cancer Res.* 6 (2000) 2236-2244.
- [7] C. Heidelberger, N.K. Chaudhuri, P. Danneberg, D. Mooren, L. Griesbach, R. Duschinsky, R.J. Schnitzer, E. Plevin, J. Scheiner, “Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds”, *Nature* 179 (1957) 663-666.
- [8] J.A. Straw, E.M. Newman, J.H. Doroshov, “Pharmacokinetics of leucovorin (D,L-5-formyltetrahydrofolate) after intravenous injection and constant intravenous infusion”, *NCI Monogr.* 5 (1987) 41-45.
- [9] L.B. Saltz, J.V. Cox, C. Blanke, L.S. Rosen, L. Fehrenbacher, M.J. Moore, J.A. Maroun, S.P. Acklan, P.K. Locker, N. Pirotta, G. Elfring, L.L. Millar, “Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer”, *New Engl. J. Med.* 343 (2000) 905-914.
- [10] F. Petrelli, K. Borgonovo, M. Cabiddu, M. Ghilardi, V. Lonati, F. Maspero, M.G. Sauta, G.D. Beretta, S. Barni, “FOLFIRI-bevacizumab as first-line chemotherapy in 3500 patients with advanced colorectal cancer: a pooled analysis of 29 published trials”, *Clin. Colorectal Canc.* 12 (2013) 145-151.
- [11] I. Durán-Merás, M.I. Rodríguez-Cáceres, M.C. Hurtado-Sánchez, “First-order multivariate calibration applied to the simultaneous fluorometric determination of the anticancer agents CPT-11 and SN-38 in serum and urine samples”, *Anal. Sci.* 27 (2011) 745-750.
- [12] M.I. Rodríguez-Cáceres, I. Durán-Merás, N.E. Ornelas Soto, P.L. López de Alba, L. López Martínez, “Determination of anticarcinogenic and rescue therapy drugs in urine by photoinduced spectrofluorimetry using multivariate calibration: comparison of several second-order methods”, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 1107-1108.
- [13] A.C. Olivieri, J.A. Arancibia, A. Muñoz de la Peña, I. Durán-Merás, A. Espinosa Mansilla, “Second-order advantage achieved with four-way fluorescence excitation-emission-kinetic data processed by parallel factor analysis and trilinear least-squares: determination of methotrexate and leucovorin in human urine”, *Anal. Chem.* 76 (2004) 5657-5666.

- [14] C.J. Peer, T.J. Mcmanus, H.I. Hurwitz, W.P. Petros, "Development and utilization of a combined LC-UV and LC-MS/MS methods for the simultaneous analysis of tegafur and 5-fluorouracil in human plasma to support a phase I clinical study of oral UTF[®]/leucovorin", *J. Chromatogr. B* 898 (2012) 32-37.
- [15] D.F. Chu, J.K. Gu, W.H. Liu, J.P. Fawcett, Q.G. Dong, "Sensitive liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of 5-fluorouracil and its prodrug, tegafur, in beagle dog plasma", *J. Chromatogr. B* 795 (2003) 377-382.
- [16] C. Vandenbosch, S. Van Belle, M. De Smet, G. Taton, V. Bruynseels, G. Vandenhoven, D.L. Massart, "Determination of leucovorin (folinic acid) and fluorouracil in plasma by high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. B* 612 (1993) 77-85.
- [17] S. Poujol, F. Pinguet, F. Malosse, C. Astre, M. Ychou, S. Culine, F. Bessolle, "Sensitive HPLC-fluorescence method for Irinotecan and four major metabolites in human plasma and saliva: application to pharmaceutical studies", *Clin. Chem.* 49 (2003) 1900-1908.
- [18] F.A. de Jong, R.H.J. Mathijssen, P. de Bruijn, W.J. Loos, J. Verweij, A. Sparreboom, "Determination of irinotecan (CPT-11) and SN-38 in human whole blood and red blood cells by liquid chromatography with fluorescence detection", *J. Chromatogr. B* 795 (2003) 383-388.
- [19] T.S. Owens, H. Dodds, K. Fricke, S.K. Hanna, K.R. Crews, "High-performance liquid-chromatographic assay with fluorescence detection for the simultaneous measurement of carboxylate and lactone forms of Irinotecan and three metabolites in human plasma", *J. Chromatogr. B* 788 (2003) 65-74.
- [20] K. Sai, N. Kaniwa, S. Ozawa, J.I. Sawada, "An analytical method for irinotecan (CPT-11) and its metabolites using a high-performance liquid chromatography: parallel detection with fluorescence and mass spectrometry", *Biomed. Chromatogr.* 16 (2002) 209-218.
- [21] L. Goldwirt, F. Lemaitre, N. Zahr, R. Farinotti, C. Fernandez, "A new UPLC-MS/MS method for the determination of irinotecan and 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) in mice: Application to plasma and brain pharmacokinetics", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 66 (2012) 325-333.
- [22] F. D'Esposito, B.N. Tattam, I. Ramzan, M. Murray, "A liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (LC-MS/MS) assay for the determination of irinotecan (CPT-11) and its two major metabolites in human liver microsomal incubations and human plasma samples", *J. Chromatogr. B* 875 (2008) 522-530.

- [23] F.F.C. Marques, A.L.M. Cunha, A. Sa, R.Q. Aucelio, "Determination of the camptothecin derivatives CPT-11 and SN-38 in urine and saliva by micellar electrokinetic chromatography", *Anal. Lett.* 45 (2012) 1849-1861.
- [24] Y. Yang, Q. Liu, W. Tao, L. Nie, S. Yao, "Improved determination of 5-FU and its prodrug tegafur in pharmaceuticals by large-volume sample stacking in CE", *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 3296-3301.
- [25] S.N. Mahnik, B. Rizovski, M. Fuerhacker, R.M. Mader, "Determination of 5-fluorouracil in hospital effluents", *Anal. Bioanal. Chem.* 380 (2004) 31-35.
- [26] H.J. Lu, Y.L. Guo, H. Zhang, Q.Y. Ou, "Rapid determination of 5-fluorouracil in plasma using capillary electrophoresis", *J. Chromatogr. B* 788 (2003) 291-296.
- [27] J. Rodríguez Flores, J.J. Berzas Nevado, G. Castañeda Peñalvo, M.I. Rodríguez-Cáceres, "Direct capillary electrophoretic determination of three chemotherapeutic drugs in human urine", *Chromatographia* 57 (2003) 493-496.
- [28] T.Y. You, X.Q. Wang, X.R. Yang, E.K. Wang, "End-column amperometric detection of 5-fluorouracil by capillary electrophoresis with a carbon fibre microelectrode", *Anal. Lett.* 32 (1999) 1109-1119.
- [29] J. Rodríguez Flores, J. Castañeda Peñalvo, A. Espinosa Mansilla, M.J. Rodríguez Gómez, "Capillary electrophoretic determination of methotrexate, leucovorin and folic acid in human urine", *J. Chromatogr. B* 819 (2005) 141-147.
- [30] Unscrambler v. 6.11b, CAMO A/S Olav Tryggvasonsgt, N-7011, Trondheim, Norway.
- [31] 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. Educator* 10 (2005) 1-9.
- [32] M.I. Rodríguez Cáceres, I. Durán-Merás, N.E. Ornelas Soto, P.L. López de Alba, L. López Martínez, "Spectrofluorimetric determination of irinotecan in the presence of oxidant agents and metal ions", *Talanta* 74 (2008) 1484-1491.
- [33] M.I. Rodríguez-Cáceres, D. Bohoyo-Gil, I. Durán-Merás, M.C. Hurtado-Sánchez, "Spectrofluorimetric determination of SN-38, a promising new anti-tumor agent, in the presence and absence of organized media", *Appl. Spectrosc.* 65 (2011) 298-306.
- [34] F. Nave, M.J. Cabrita, C. Teixeira da Costa, "Use of solid-supported liquid-liquid extraction in the analysis of polyphenols in wine", *J. Chromatogr. A* 1169 (2007) 23-30.

- [35] M. Barberi-Heyob, J.L. Merlin, B. Weber, "Analysis of 5-fluorouracil in plasma and urine by high performance liquid chromatography", *J. Chromatogr.* 581 (1992) 218-286.
- [36] T. André, C. Louvet, F. Maindrault-Goebel, C. Couteau, M. Mabro, J.P. Lotz, V. Gilles-Amar, M. Krulik, E. Carola, V. Izrael, A. de Gramont, "CPT-11 (irinotecan) addition to bimonthly, high-dose leucovorin and bolus and continuous-infusion 5-fluorouracil (FOLFIRI) for pretreated metastatic colorectal cancer", *Eur. J. Cancer* 35 (1999) 1343-1347.
- [37] C. Tournigand, T. André, E. Achille, G. Lledo, M. Flesh, D. Mery-Mignard, E. Quinaux, C. Couteau, M. Buyse, G. Ganem, B. Landi, P. Colin, C. Louvet, A. de Gramont, "FOLFIRI Followed by FOLFOX6 or the Reverse Sequence in Advanced Colorectal Cancer: A Randomized GERCOR Study", *J. Clin. Oncol.* 23 (2004) 229-237.
- [38] M. Hill, H. Mackay, D. Cunningham, "Phase I/II study of oral uracil/tegafur (UFT) leucovorin and irinotecan in patients with advanced colorectal cancer", *Ann. Oncol.* 11 (Suppl. 4) (2000) 45.
- [39] K. Okabayashi, H. Hasegawa, Y. Ishii, T. Endo, H. Ochiai, T. Kubota, Y. Kitagawa, "Combination chemotherapy of biweekly irinotecan (CPT-11) plus tegafur/uracil (UFT) and leucovorin (LV) for patients with metastatic colorectal cancer: phase I/II study in Japanese patients", *Cancer Chemoth. Pharm.* 63 (2009) 501-507.
- [40] D.C. Baquiran, "Cancer Chemotherapy Handbook" (second ed.), Lippincott (2001).
- [41] J. Escoriza, A. Aldaz, C. Castellanos, E. Calvo, J. Giráldez, "Simple and rapid determination of irinotecan and its metabolite SN-38 in plasma by high-performance liquid chromatography: application to clinical pharmacokinetic studies", *J. Chromatogr. B* 740 (2000) 159-168.
- [42] J.L. Grem, "Mechanisms of Action and modulation of fluorouracil", *Semin. Radiat. Oncol.* 7 (1997) 249-259.
- [43] B.W. McGuire, L.L. Sia, J.D. Haynes, J.C. Kisicki, M.L. Gutierrez, E.L. Stokstad, "Absorption kinetics of orally administered leucovorin calcium", *NCI Monogr.* 5 (1987) 47-56.
- [44] J. Taïeb, J. Desramé, P. Artru, "Les fluoropyrimidines orales en oncologie digestive", *Gastroenterol. Clin. Biol.* 28 (2004) 231-239.

I.4.3. Discusión del artículo científico 3

Optimización del método electroforético

En primer lugar se construyó el capilar en el que tiene lugar la separación electroforética de los analitos. Puesto que todos los compuestos presentan absorción, pero únicamente CPT-11 y su metabolito SN-38 son fluorescentes, en el capilar se abrieron dos ventanas correspondientes a los detectores de UV-Visible y fluorescente, con el objetivo de poder monitorizar las dos señales en serie y aumentar la sensibilidad en el análisis de los compuestos fluorescentes, concretamente del SN-38, ya que se encuentra en menor concentración en las muestras de orina.

Como la separación se lleva a cabo en medio básico, en primer lugar se registraron los espectros de absorción y de fluorescencia de los compuestos a un pH tal que se encontraran de forma aniónica en disolución. Los espectros se muestran en la Figura I.11, donde se observa que las longitudes de onda de absorción máxima fueron 265, 272, 288, 360 y 410 nm para el 5-FU, TF, LV, CPT-11 y SN-38, respectivamente, por lo que se fijaron estos valores en el detector DAD. En el caso de la detección fluorescente, los máximos de $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ fueron 360/444 nm para el CPT-11 y 410/548 nm de SN-38. Para llevar a cabo la detección fluorescente de estos analitos se empleó un filtro de excitación de interferencia en el rango 240-400 nm y un filtro de emisión de corte a partir de 418 nm.

Para la optimización de los parámetros que influyen en la separación electroforética, se utilizaron dos diseños de experimentos. En primer lugar se hizo uso de un diseño Plackett-Burman para seleccionar las variables que influyen de forma significativa en nuestro sistema. En segundo lugar, se utilizó un diseño central compuesto en combinación con el análisis de superficie de respuesta para estudiar las interacciones entre estas variables e identificar sus valores óptimos que garanticen la mejor resolución en la separación electroforética, en el menor tiempo de análisis posible. De esta manera, el número de experimentos necesario se redujo sustancialmente.

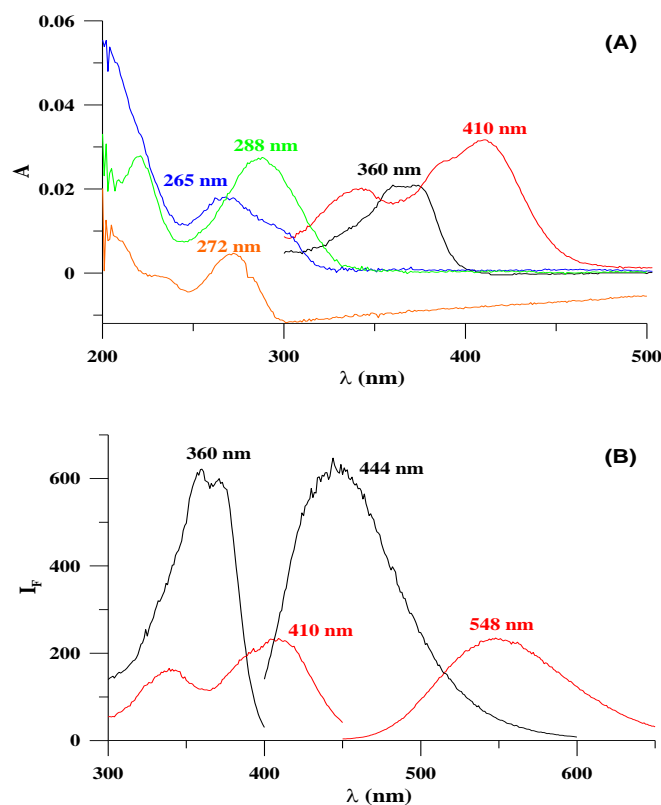


Figura I.11. (A) Espectros de absorción del CPT-11 (negro), SN-38 (rojo), 5-FU (azul), TF (naranja) y LV (verde); **(B)** Espectros de excitación y emisión del CPT-11 (negro) y SN-38 (rojo); Concentración de cada analito = $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$; pH 9.2.

- Diseño Plackett-Burman:

Los factores considerados, ya que influyen en la movilidad de los analitos de estudio y en su correcta separación, fueron el pH (10,5-12,3) y concentración del BGE (10,0-30,0 mM) y el contenido de MeOH en el mismo (0-10%), así como el voltaje (10-20 kV) y la temperatura (15-30 °C) aplicados durante la separación electroforética y, por último, el tiempo de duración de la inyección hidrodinámica de la muestra. La CPT fue incluida en este estudio como posible patrón interno para corregir la falta de repetitividad del método si la hubiera, basándonos en referencias bibliográficas publicadas por otros autores.

En todos los casos se utilizó tampón fosfato como BGE, por lo que se prepararon varias disoluciones de diferente concentración y pH para el estudio. Durante la inyección de la muestra la presión se mantuvo constante a 30 mbar y, tras ésta, se inyectó BGE a 30 mbar durante 1 s para minimizar la posible pérdida de muestra.

La evaluación de los resultados obtenidos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA, *ANalysis Of VARiance*), para identificar cuáles son las variables que influyen en el sistema de manera significativa ($p < 0,05$). Para ello, previamente es necesaria la obtención de una función de respuesta (RF, *Response Function*) que permita interpretar los resultados obtenidos y estudiar así el sistema correctamente. Se probaron varias funciones de respuesta y, finalmente, la siguiente fue elegida como óptima por proporcionar un mejor ajuste al sistema:

$$RF = \frac{\sum R}{\text{Tiempo de análisis}} + \bar{A}'$$

donde R es la resolución y A' es el área corregida de cada analito. A todos los valores de $R > 1,5$, se les asignó un valor de 1,5.

El test ANOVA proporcionó los siguientes valores del parámetro p para las variables estudiadas: pH BGE ($p = 0,2163$), concentración de BGE ($p = 0,1910$), porcentaje de MeOH en BGE ($p = 0,0016$), V ($p = 0,0101$), T ($p = 0,0021$) y tiempo de inyección ($p = 0,0003$). Por lo tanto, aquellas variables que tienen una influencia significativa ($p > 0,05$) en la separación de los compuestos de interés fueron el % de MeOH en el BGE, V, T y tiempo de inyección, mientras que la concentración y pH del tampón fosfato no son variables cruciales para la separación electroforética de los compuestos quimioterápicos. El análisis de los resultados mostró que, mientras el tiempo de inyección, T y V presentan un efecto positivo, el porcentaje MeOH en BGE presenta un efecto negativo en la función de respuesta. Por esta razón, decidimos eliminar el contenido de metanol del BGE. Por último, se seleccionó un tampón fosfato (pH 11,34; 20 mM) como BGE.

- Diseño Central Compuesto:

Una vez conocidas las variables que afectan al sistema, se utilizó un diseño central compuesto para obtener el valor óptimo de cada una de ellas. Al igual que para el diseño Plackett-Burman, para el estudio se prepararon disoluciones que contienen 10,0 mg L⁻¹ de todos los compuestos en BGE. Durante la inyección de la muestra la presión se mantuvo constante a 30 mbar y, tras ésta, se inyectó BGE a 30 mbar durante 1 s para minimizar la posible pérdida de muestra.

De nuevo se optimizó una función de respuesta adecuada que represente al sistema en estudio:

$$RF = \frac{\bar{A}'}{\text{Tiempo de análisis} \times w_{1/2}}$$

donde A' es el área de pico corregida y w_{1/2} es la anchura del pico a media altura. Para el cálculo de la función de respuesta se utilizó nuevamente la señal a obtenida a 265 nm en el detector DAD.

En el análisis de los efectos de cada factor y sus interacciones se observó que todas las variables y su correspondiente interacción influyen en la separación electroforética de los analitos, siendo todos los valores de la función *p* inferiores a 0,05.

La relación entre cada par de variables fue investigada mediante la metodología de la superficie de respuesta. Las mejores condiciones en la separación electroforética, es decir, buena resolución para todos los compuestos junto con bajos tiempos de análisis, se obtuvieron para altos valores de los factores estudiados. Teniendo en cuenta estos resultados y la observación de los electroferogramas obtenidos en las pruebas experimentales, los valores seleccionados como óptimos para cada variable fueron: voltaje, 25 kV; temperatura, 25 °C; y tiempo de inyección, 9 s. En estas condiciones, los tiempos de migración de analitos son bajos y todos los picos están bien resueltos.

Análisis de orina

Una vez optimizadas las condiciones instrumentales de trabajo y establecidos los parámetros de calidad del método, se procedió al análisis de muestras de orina. Ante la dificultad de obtener muestras reales que contengan los compuestos de interés, se emplearon muestras de orina de personas sanas contaminadas con las concentraciones adecuadas de cada analito, las cuales fueron calculadas teniendo en cuenta su farmacocinética. Para ello, se consideraron las dosis administradas en los principales tratamientos de primera línea aplicados a pacientes con cáncer de colon y de nuevo se hizo uso de un nomograma para calcular el área superficial de un paciente con un peso de 80 kg y una altura de 1,76 m.

Los estudios sobre farmacocinética publicados en la literatura sobre la excreción de estos compuestos en orina ponen de manifiesto que, durante las primeras 24 h, todos los compuestos se excretan en un intervalo de porcentajes comprendido entre 4-22%, a excepción del SN-38, que es excretado entre un 0,18 y 0,43%. Estos datos nos llevan a concluir que todos los compuestos están presentes a niveles de varios mg L⁻¹, con la excepción de SN-38, que está presente a niveles de µg L⁻¹. En base a esta información y a los rangos de linealidad del método para cada analito, la determinación de CPT-11, TF, 5-FU y del LV se hizo con detección DAD, mientras que el SN-38 fue analizado empleando la señal de fluorescencia.

Ensayos previos realizados mediante análisis de la orina diluida con agua o BGE, e inyectada directamente en el tubo capilar, nos permitieron comprobar que la muestra presenta compuestos absorbentes a las longitudes de onda empleadas para la detección de los compuestos, cuya señal solapa con la de los analitos a determinar. Por esta razón, es necesario un paso de limpieza de las muestras de orina antes del análisis para eliminar interferencias. La extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida con cartuchos C18 son las técnicas más ampliamente aplicadas para eliminar los posibles contaminantes en el análisis de compuestos quimioterápicos en muestras biológicas. Sin embargo, en nuestro caso estas técnicas no proporcionaron buenos rendimientos en la extracción de todos los analitos de interés, sobre todo en el caso del 5-FU, por lo que recurrimos a una técnica más novedosa como es la extracción líquido-líquido con soporte sólido (*Solid-Supported Liquid-Liquid Extraction, SS-LLE*).

La SS-LLE ofrece una serie de ventajas respecto a las técnicas de extracción anteriormente mencionadas como altas recuperaciones, eliminación del efecto matriz y mínima manipulación de la muestra. Además previene la formación de emulsiones y permite emplear pequeños volúmenes de muestra. Es conceptualmente análoga a la extracción líquido-líquido tradicional, sin embargo, utiliza un material de soporte inerte como tierra de diatomeas, la cual presenta un gran área superficial, lo que favorece la extracción. Otra ventaja de esta técnica es que no requiere precondicionamiento del cartucho, sino que muestra es cargada directamente en el mismo.

Como el 5-FU fue el analito que más problemas presentó en la extracción mediante técnicas convencionales, se optimizó un método mediante SS-LLE para la extracción conjunta de todos ellos. Para ello, se emplearon cartuchos Chem Elut empacados con tierra de diatomeas en su interior. Parámetros como el pH de extracción, el disolvente de elución y su volumen, entre otros, fueron cuidadosamente estudiados y optimizados, para lo cual se emplearon muestras de orina contaminadas con 0,50 mg L⁻¹ de SN-38 y 10,0 mg L⁻¹ del resto de compuestos, de las cuales se tomaban alícuotas de 2,0 mL para cada ensayo.

Se comprobó la existencia de efecto matriz mediante la comparación de las pendientes de patrón externo y adición patrón, para un nivel de confianza del 95%, obteniéndose que, con excepción del TF y el 5-FU, todos los analitos presentaron un efecto matriz negativo, por lo que para eliminarlo se recurrió a la calibración en matriz.

Finalmente, se validó el método mediante la obtención de los parámetros de calidad y el análisis de un *pool* de orina contaminado con concentraciones conocidas de cada analito, obteniéndose en todos los casos recuperaciones satisfactorias.



PARTE II

Análisis de marcadores del estrés oxidativo en muestras biológicas y alimentos

II.1. Introducción

II.1.1. Reacción de Maillard

La reacción de Maillard, también conocida como glicación no enzimática, fue descrita por Louis-Camille Maillard en 1912 [1]. En su origen, esta reacción se propuso para describir el proceso de oscurecimiento no enzimático que tenía lugar en ciertos alimentos. Actualmente, y a partir de las dos últimas décadas del siglo XX durante las cuales se ha profundizado en el estudio de esta reacción *in vivo*, también se la ha asociado con el proceso de envejecimiento así como con la aparición y desarrollo de diversos procesos patológicos.

Bajo la denominación de reacción de Maillard se engloban una serie de reacciones químicas extremadamente complejas en la que intervienen carbohidratos (principalmente azúcares reductores), a través de sus grupos carbonilos, y aminos, preferentemente aminos primarias (grupo α -amino de los aminoácidos, péptidos o proteínas) [2].

Con el fin de clarificar todos los procesos que tienen lugar, J.E. Hodge [3] propuso un esquema dividido en tres etapas, en las que en cada una de ellas se incluyen una serie de reacciones:

- *Etapas inicial: Formación de productos incoloros*

Reacción A: Condensación carbohidrato-amina.

Reacción B: Reordenamiento de Amadori/reordenamiento de Heyns.

- *Etapas intermedia o de propagación: Formación de productos incoloros o amarillos, con fuerte absorción en el UV*

Reacción C: Deshidratación de azúcares.

Reacción D: Fragmentación de azúcares.

Reacción E: Degradación de aminoácidos (Degradación de Strecker).

- *Etapas final: Formación de productos muy coloreados.*

Reacción F: Condensación aldólica.

Reacción G: Condensación aldehído-amina y formación de compuestos heterocíclicos nitrogenados.

Estas etapas, así como las reacciones involucradas en cada una de ellas, se esquematizan de forma simplificada en la Figura II.1, aunque es necesario aclarar que este esquema se encuentra aún bajo debate y que el mecanismo completo de las reacciones aún no es del todo conocido [4].

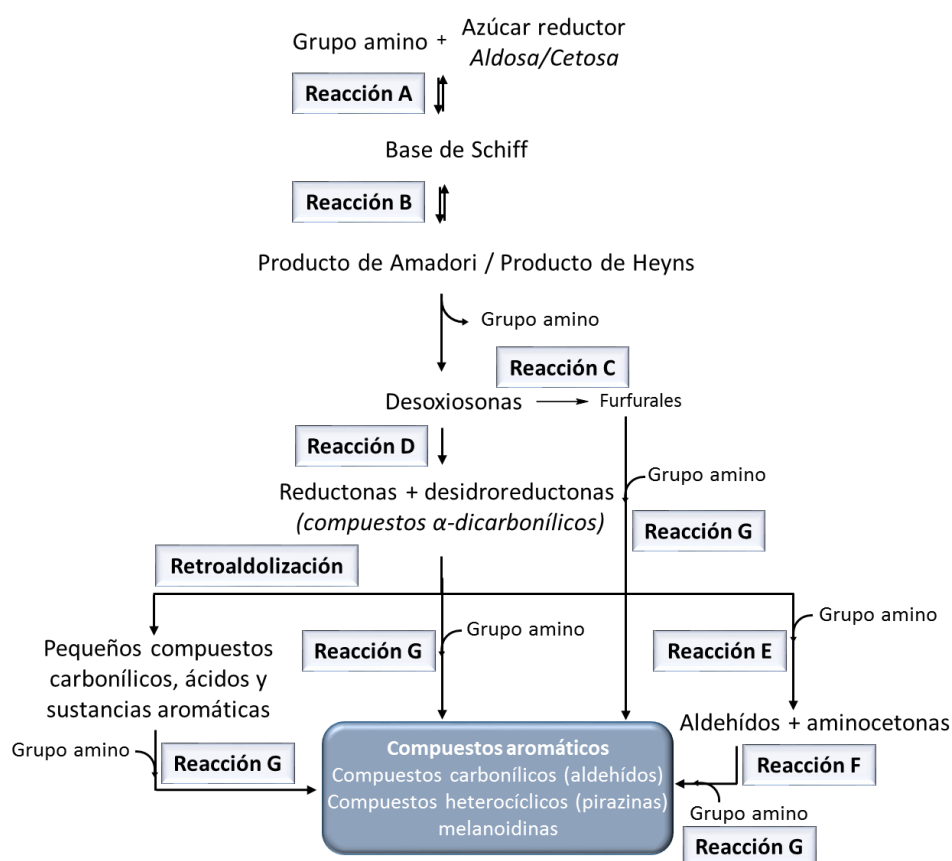


Figura II.1. Esquema general de la Reacción de Maillard.

Durante la etapa de iniciación tiene lugar la condensación entre un grupo amino y un azúcar reductor, dando lugar a la formación espontánea y reversible de una base de Schiff, la cual sufre un reordenamiento para originar una cetamina estable denominada producto de Amadori o producto de Heyns, en función de que el azúcar de partida sea un aldosa o una cetosa, respectivamente. Hasta este punto las

reacciones son completamente reversibles, y los productos no se acumulan indefinidamente, sino que alcanzan en un estado estacionario una concentración de equilibrio.

La etapa intermedia incluye la reacción de los compuestos de Amadori (o de Heyns) para formar productos de deshidratación, fragmentación y degradación de aminoácidos vía la reacción de Strecker (especialmente a altas temperaturas). El primer paso (reacción C) parte del producto de Amadori dando lugar a la fragmentación del azúcar, liberándose el grupo amino y formándose intermedios altamente reactivos e inestables denominados desoxiosonas. Dependiendo del pH del medio, las principales desoxiosonas formadas son la 1-desoxiglucosona (pH neutro), la 3-desoxiglucosona (pH ligeramente ácido) y la 4-desoxiglucosona (pH ligeramente básico). Estos compuestos dan lugar a furfurales [5] o reductonas [6] en una etapa conocida como deshidratación de azúcares, en función de que el pH del medio sea ácido o alcalino, respectivamente. Las reductonas, a su vez, pueden deshidratarse y generar dehidroreductonas, las cuales pueden degradarse a través de tres vías en etapas más avanzadas [7]. En primer lugar, pueden reaccionar de nuevo con un grupo amino en lo que se conoce como la degradación de Strecker. En este proceso, un grupo α -dicarbonilo (o aquellos compuestos que pueden dar lugar a ellos fácilmente, tales como las reductonas o las dehidroreductonas) oxida al grupo amino de un aminoácido formando el correspondiente aldehído y α -aminocetona, y generando dióxido de carbono y amoníaco. Las reductonas y dehidroreductonas también dan lugar a otros aldehídos por reacciones de retroaldolización, en las que el grupo carbonilo insaturado se hidrata en el doble enlace para finalmente formar dos moléculas más pequeñas de carbonilo. Finalmente, también pueden sufrir una fuerte deshidratación y formar compuestos cíclicos como furanos, pirroles o piranonas, entre otros.

Durante la etapa final tienen lugar una serie de reacciones de deshidratación, fragmentación, ciclación y polimerización, en las cuales participa de nuevo el grupo amino, y que conducen a la formación de las melanoidinas finales, las cuales proporcionan aroma, sabor y color al alimento. Estos compuestos pueden formarse a partir de los aldehídos obtenidos en la degradación de Strecker, bien a partir de una condensación aldólica, o a través de la reacción con grupos aminos vía condensación aldehído-amina.

En alimentos procesados térmicamente o almacenados por períodos prolongados, así como en bebidas fermentadas, estas reacciones conducen a la formación de pigmentos pardos o negros de alto peso molecular llamados melanoidinas, así como a modificaciones, favorables o no, del olor y del sabor. Los trabajos publicados en la primera mitad del siglo XX muestran que la reacción de Maillard puede tener un efecto adverso sobre la calidad nutricional de las proteínas de los alimentos [8,9]. Este efecto se debe al bloqueo de aminoácidos esenciales y, en consecuencia, a una reducción en la disponibilidad biológica o incluso a la inhibición que ejercen determinados compuestos formados sobre la actividad de las enzimas digestivas [10]. Por otra parte, las melanoidinas presentan propiedades antioxidantes en los alimentos, ya que pueden inhibir la oxidación de lípidos insaturados y de otros compuestos presentes en ellos como vitaminas, polifenoles y flavonoides. Además, está demostrado que las melanoidinas presentan una actividad antimicrobiana que puede inhibir el crecimiento de microorganismos y prevenir el deterioro de los alimentos, preservando la calidad de los mismos [10,11].

La reacción de Maillard depende de varios factores como el tipo de azúcar y el compuesto portador del grupo amino implicados (proteína, aminoácido o ácido nucleico), tiempo, temperatura de reacción y contenido en agua. En la bibliografía se encuentra descrito que el primer factor mencionado determina el tipo de compuestos formados, mientras que el resto influye en la cinética del proceso [12]. El pH es otro parámetro importante que influye tanto sobre la velocidad como en la dirección de la reacción [12-14].

Como se comentó anteriormente, la complejidad de la reacción de Maillard surge en parte de las múltiples reacciones de fragmentación posible de la molécula de azúcar, que constituyen puntos de ramificación en el progreso de la reacción y, como consecuencia, el establecimiento de muchas vías de reacción paralelas. Otros autores demostraron la presencia de radicales libres estables en la formación de las melanoidinas, pudiendo ser el azúcar reductor o la base de Schiff los compuestos de partida para esta reacción (Reacción H) [15,16].

La formación de los compuestos 1,2-dicarbonílicos (o α -dicarbonílicos), que son el objetivo de estudio de esta Tesis Doctoral (Figura II.2), tiene lugar principalmente en la etapa intermedia o etapa de propagación de la reacción de Maillard, a partir de la degradación del producto de Amadori o por fragmentación de las desoxiosonas.

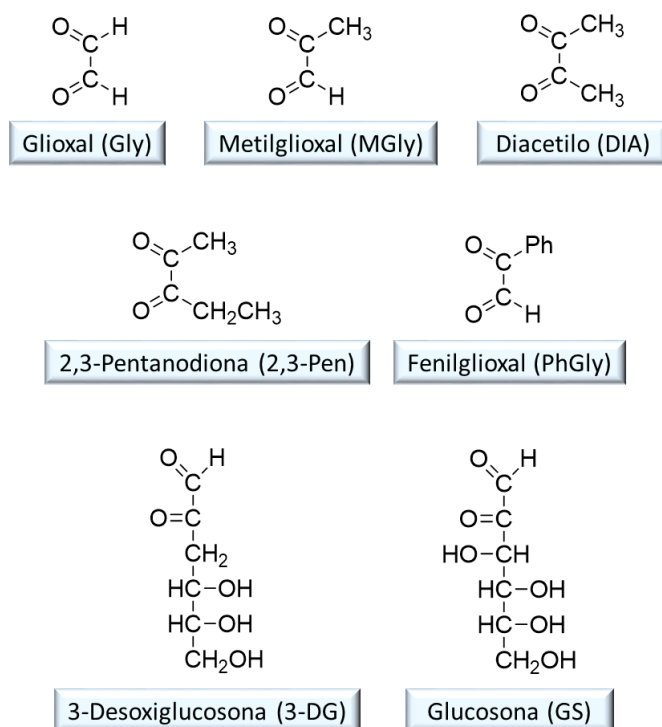


Figura II.2. Estructuras de los compuestos α -dicarbonílicos analizados.

El mecanismo de esta reacción es una retroaldolización, aunque también intervienen procesos de fisión oxidativa. Los compuestos α -dicarbonílicos que se originan durante esta reacción son particularmente reactivos y se consideran precursores de las melanoidinas, así como de compuestos volátiles responsables del aroma de los alimentos. Thornalley ha demostrado que pueden formarse hasta 11 compuestos α -dicarbonílicos a partir de monosacáridos [17].

Otra vía importante de formación de estos compuestos es a partir de la autoxidación de la glucosa, la cual se muestra en la Figura II.3.

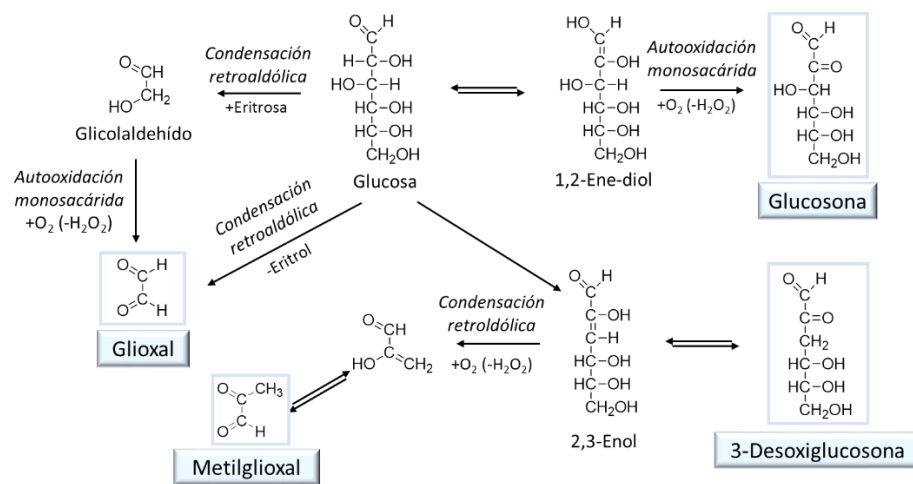


Figura II.3. Formación de compuestos α -dicarbonílicos a partir de la oxidación de la glucosa [18].

Aunque inicialmente la reacción de Maillard ha estado relacionada con procesos que pueden tener lugar en los alimentos, los procesos de glicación no enzimática también pueden darse en condiciones fisiológicas *in vivo*. La investigación sobre dicha reacción en estos sistemas se inició a partir de las dos últimas décadas del siglo XX, cuando Monier y Cerami postularon que la reacción de Maillard de proteínas podría tener un papel importante en el envejecimiento de las proteínas de matriz extracelular y en otras patologías relacionadas [19]. *In vivo*, la glicación ocurre preferentemente en las proteínas, aunque también la sufren otras biomoléculas que presentan grupos aminos en su estructura, como los lípidos y los ácidos nucleicos. En estos sistemas, durante la etapa de finalización, el producto de Amadori sufre cambios complejos como reacciones de deshidratación, condensación, ciclación y oxidación, que dan lugar a la formación de aductos estables denominados productos finales de la glicación avanzada (AGEs, *Advanced Glycation End-products*) [20]. Los AGEs, que tienden a acumularse en los tejidos, son una familia heterogénea de compuestos con estructuras complejas que presentan entrecruzamientos intra e intermoleculares, como pirralinas, imidazolonas, pentosidina, carboximetil-lisina, etc., aunque muchos de ellos aún no han sido caracterizados.

Se ha demostrado que los compuestos α -dicarbonílicos juegan un papel fundamental en la formación de los AGEs, ya que provocan daño tisular porque pueden reaccionar con residuos libres de lisinas y argininas, induciendo la formación irreversible y la acumulación de estos compuestos [21]. En particular, se ha encontrado que los grupos α -dicarbonilos reactivos tales como el glioxal (Gly) y el metilglioxal o 2-oxopropanal (MGly), modifican rápidamente las cadenas laterales reactivas de las proteínas [22]. Otro compuesto de gran importancia en estas rutas bioquímicas es la 3-desoxiglucosona (3-DG), que reacciona con los grupos amino libres produciendo entrecruzamientos, lo que provoca la descomposición de las proteínas a través de la formación de AGEs en la etapa tardía de la reacción de Maillard [23].

Cuando la presencia de compuestos α -dicarbonílicos en el entorno celular supone un exceso persistente, se origina lo que Lyons y Jenkins [24] denominaron estrés carbonílico, el cual definieron como un mecanismo patogénico relevante en el envejecimiento fisiológico, y en patologías como la diabetes mellitus, la insuficiencia renal y el síndrome de Alzheimer. Este exceso de compuestos α -dicarbonílicos reactivos puede ser consecuencia de un aumento en su formación y/o de una disminución en su detoxificación enzimática [21]. A día de hoy, numerosas investigaciones han confirmado una fuerte relación entre la formación de AGEs y los cambios fisiológicos observados en las enfermedades mencionadas, así como en enfermedades vasculares, aterosclerosis y procesos relacionados con el envejecimiento [20,25-30].

Tal como se ha indicado, los compuestos α -dicarbonílicos pueden tener origen endógeno, pero se ha demostrado recientemente que también existe una absorción importante de compuestos de origen exógeno, tanto a nivel intestinal (a partir de alimentos como la carne asada, pan tostado y bebidas como la cerveza o el vino) como a nivel pulmonar (a partir del humo generado en la combustión del tabaco) [31].

II.1.2. Antecedentes bibliográficos para el análisis de compuestos α -dicarbonílicos

II.1.2.1. Derivatización de los compuestos α -dicarbonílicos

Dado que estos compuestos intermedios de la reacción de Maillard juegan un papel muy importante en el desarrollo de diversas enfermedades, su detección y cuantificación tiene un gran interés. Se han propuesto diversos procedimientos para su análisis, que en la gran mayoría de los casos incluyen un proceso de derivatización previa seguido de una separación mediante cromatografía líquida o de gases, o bien mediante electroforesis capilar. Esta derivatización es necesaria, ya que se trata de compuestos de bajo peso molecular que presentan una estructura simple y con poca deslocalización electrónica, por lo que sus propiedades absorptivas son muy escasas.

De manera general, podemos indicar que los compuestos α -dicarbonílicos se pueden transformar en derivados con buenas propiedades absorbentes a través de algunas de las vías que se incluyen en el esquema representado en la Figura II.4 [32-35], y que se explican de forma más detallada a continuación.

Un gran número de procedimientos descritos utilizan como agente derivatizador la *o*-fenilendiamina (1,2-diaminobenceno) o algunos de sus derivados como la 4,5-dicloro-1,2-fenilendiamina, la 4,5-dimetil-1,2-fenilendiamina, la 4-metoxi-*o*-fenilendiamina o el 1,2-diamino-4,5-dimetoxibenceno, para originar compuestos quinoxalínicos. La utilización de este reactivo fue propuesta por primera vez por Moree-Testa y Saint-Jalm [36] para la determinación de los compuestos α -dicarbonílicos presentes en el humo del tabaco. Los derivados quinoxalínicos formados se determinaron mediante cromatografía de gases y mediante HPLC con detección UV a 312 nm. A partir de aquí, este reactivo ha sido ampliamente utilizado para la determinación de compuestos α -dicarbonílicos, principalmente de cadena corta tales como Gly y MGly, en matrices de diferente naturaleza [37,38].

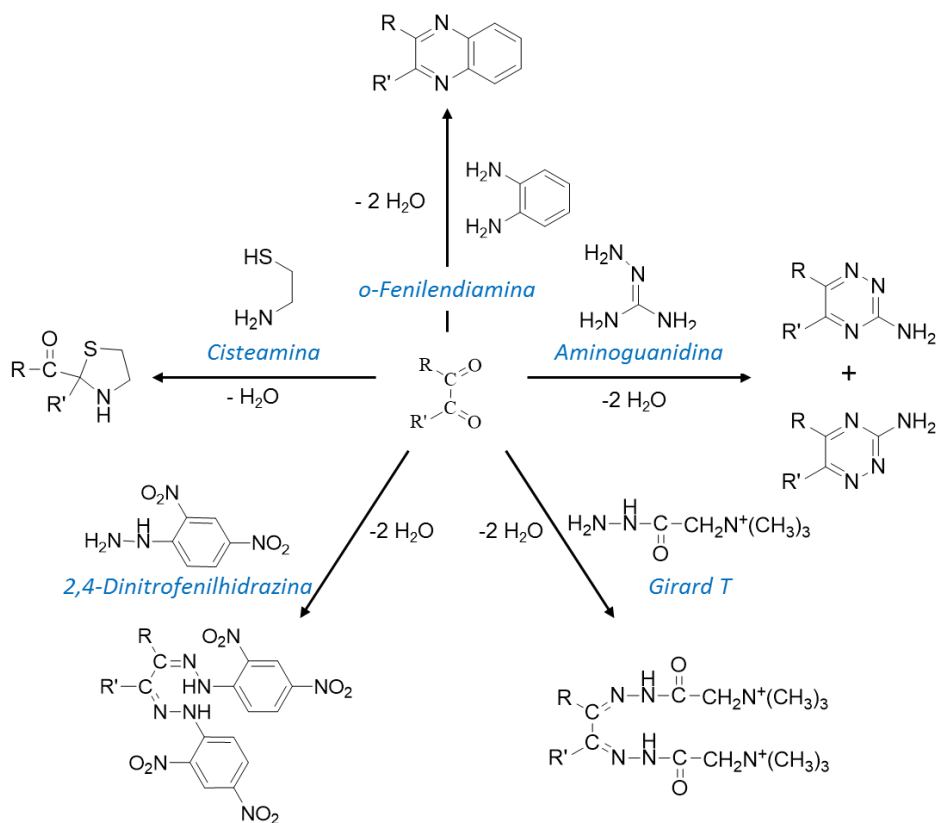


Figura II.4. Reacciones de derivatización propuestas para el análisis de los compuestos α -dicarbonílicos [32].

Uno de los mayores inconvenientes de este reactivo es el elevado tiempo de reacción que se necesita para obtener derivados estables, llegando incluso en algunos casos hasta 24 horas el tiempo necesario para que la reacción sea completa y cuantitativa. Las condiciones físico-químicas en las que se lleva a cabo esta reacción involucran un pH neutro o ligeramente ácido y un calentamiento moderado o incluso temperatura ambiente [39]. La determinación más frecuente de los derivados quinoxalínicos formados se lleva a cabo previa separación cromatográfica en fase inversa, a temperatura ambiente, aplicando una elución en gradiente y utilizando como sistema de detección un detector de absorción en el UV [40,41,39] o un

detector fluorescente [42], aunque en la bibliografía también se encuentran descritos algunos trabajos donde se determinan mediante cromatografía gaseosa acoplada a detectores de nitrógeno fósforo [43] o MS [44], y mediante CE con detección UV [45]. Otro reactivo que genera derivados quinoxalínicos y ha sido empleado para el análisis de estos compuestos es el 2,3-diaminonaftaleno [46]

La reacción entre los compuestos α -dicarbonílicos y la 2,4-dinitrofenilhidracina tiene lugar en medio ácido e hidroalcohólico, y en caliente, para originar las correspondientes hidrazonas. Las primeras referencias al uso de este reactivo como agente derivatizante para la determinación de compuestos α -dicarbonílicos se refieren al análisis de MGly mediante detección del derivado formado con espectrofotometría UV-Visible [47,48]. Posteriormente, Kuwata y col. [49] lo propusieron para la determinación de aldehídos en gases atmosféricos, gases industriales y humo de tabaco, separando los derivados originados mediante HPLC con detección UV-Visible. En el resto de trabajos publicados, las hidrazonas han sido analizadas por varias técnicas, incluyendo espectrofotometría, HPLC y GC con diferentes sistemas de detección [50]. Las aplicaciones más recientes se centran en el análisis de Gly en muestras de aire de diferente naturaleza [51-53].

Por otra parte, los compuestos α -dicarbonílicos también reaccionan con la cisteamina dando lugar a la formación de tiazolidinas, incubando los reactivos en condiciones suaves (a temperatura ambiente y pH neutro o ligeramente básico) durante varias horas y con un alto rendimiento estequiométrico [32]. Los derivados formados son relativamente volátiles, por lo que la técnica normalmente empleada para su análisis es la GC [54,55].

La aminoguanidina es otro de los reactivos más empleados para el análisis de los compuestos α -dicarbonílicos. La reacción se lleva a cabo a 37 °C y a pH próximo a 7,4, normalmente fijado con tampón fosfato [56]. Los derivados formados son 3-amino-1,2,4-triazinas sustituidas, las cuales se analizan comúnmente mediante HPLC con detección UV o MS. En la bibliografía se encuentra descrito un tiempo mínimo de reacción de 1 h para el caso de los compuestos α -dicarbonílicos de cadena corta, como Gly, MGly y diacetilo o 2,3-butanodiona (DIA), el cual se extiende hasta 24 h para los compuestos de cadena larga como la 3-DG, 1-desoxiglucosona (1-DG) y glucosona (GS) [57,58], siendo común dejar los reactivos incubando durante la noche. Números estudios han confirmado que esta reacción también tiene lugar *in vivo*,

impidiendo la reacción entre los derivados α -dicarbonílicos reactivos originados a partir del producto de Amadori y las proteínas y, por tanto, previniendo la formación de los AGEs [59,60].

El reactivo de Girard-T (cloruro de trimetilaminoacetohidrazida) en condiciones ácidas o alcalinas suaves, reacciona con aldehídos y cetonas que contienen grupos α -dicarbonílicos para producir compuestos que absorben fuertemente la luz ultravioleta [61]. La 4,5-diaminofthalhidrazida también reacciona con compuestos α -dicarbonílicos, incluyendo el fenilglioxal, a 100 °C durante 45 min en presencia de ácido clorhídrico diluido y de β -mercaptoetanol (β -ME), para formar derivados altamente quimioluminiscentes [62].

Otra alternativa es el empleo de derivados de la hidroxilamina para formar oximas. Los más empleados son aquellos que contienen flúor, como por ejemplo el clorhidrato de (2,3,4,5,6-pentafluorofenyl)-*o*-methilhidroxilamine. La formación de las oximas es dependiente del pH, y tiene lugar con relativa facilidad tanto en disoluciones acuosas como en medio orgánico. Los derivados formados son extraídos fácilmente con disolventes orgánicos y normalmente su determinación se lleva a cabo mediante GC. La detección mediante captura electrónica es particularmente sensible para la determinación de los derivados fluorados [63].

Aunque en menor medida, la determinación de estos compuestos también se ha llevado a cabo empleando sistemas de detección electroquímicos. Un ejemplo es el método propuesto por Zhang y col. [64] para la determinación de Gly y MGly en muestras de suero y orina mediante electroforesis capilar con detección amperométrica, tras derivatización con ácido 2-tiobarbitúrico en medio ácido durante 90 min a 75 °C.

En las dos últimas décadas, nuestro grupo de investigación ha propuesto la utilización de dos nuevos agentes derivatizantes, concretamente la 2,4,5-triamino-6-hidroxi-pirimidina (TRI) y la 5,6-diamino-2,4-dihidroxipirimidina (DDP), para la determinación de los compuestos α -dicarbonílicos. Estos reactivos transforman los compuestos de interés en derivados pteridínicos y lumazínicos, respectivamente, los cuales presentan un gran rendimiento cuántico de fluorescencia. Además, como se comentará más adelante, el empleo de estos reactivos disminuye considerablemente

el tiempo de reacción necesario para completar la derivatización, y al mismo tiempo permite trabajar en condiciones menos drásticas de temperatura.

La utilización de TRI como reactivo derivatizante da lugar a la formación de derivados pteridínicos, y fue propuesto por Espinosa-Mansilla y col. [34] Esta reacción de derivatización se lleva a cabo en medio ligeramente ácido fijado con tampón ácido cloroacético/acetato de sodio (pH 2,90; 0,04 M). Se estudiaron detalladamente los tiempos de reacción a diferentes temperaturas para algunos compuestos α -dicarbonílicos de cadena corta (Gly, MGly y DIA). Dado que los derivados formados son altamente fluorescentes, su determinación se realizó mediante HPLC-FD ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ = 275/447 nm), lo que permitió proponer un método más selectivo y más sensible que los publicados hasta la fecha.

De igual forma que con los derivados pteridínicos, Espinosa-Mansilla y col. [35] también estudiaron la formación de derivados lumazínicos utilizando el DDP como reactivo derivatizante. En este caso la reacción fue optimizada para Gly y MGly, encontrando que transcurre en medio básico, el cual se fijó con 0,125 mL de tampón amoniaco/cloruro de amonio (pH 10,0; 0,5 M), mediante calentamiento a 60 °C durante 30 min. Los derivados formados se analizaron nuevamente con cromatografía líquida con detección fluorescente, registrando la emisión a 500 nm (λ_{exc} = 330 nm).

En la presente Tesis Doctoral se ha extendido el estudio y la optimización de las reacciones de derivatización para la formación de derivados pteridínicos y lumazínicos a otros compuestos α -dicarbonílicos de cadena corta, como son la 2,3-pentanodiona (2,3-Pen) y el fenilgloxal (PhGly), y a compuestos de cadena larga, concretamente la 3-DG y la GS, con el fin de desarrollar métodos sencillos y sensibles que permitan analizarlos simultáneamente en muestras biológicas y en alimentos, mejorando considerablemente los tiempos de reacción necesarios para la formación de otros derivados ya publicados en la bibliografía.

II.1.2.2. Presencia de compuestos α -dicarbonílicos en muestras biológicas

Debido a las implicaciones clínicas que presentan estos compuestos, en la bibliografía se han descrito numerosos métodos de análisis en diferentes fluidos

biológicos como suero [65], plasma [66,67], orina [64-66], fluido peritoneal [68] e incluso uñas [69].

La mayoría de estudios relacionados con la presencia de estos compuestos en muestras biológicas están referidos a Gly y MGly, debido a que son los analitos que más interés han despertado en cuanto a su implicación en la formación y acumulación de los AGEs, y a su papel como marcadores de los procesos de oxidación lipídica. Los niveles de Gly y, en general, de otros compuestos α -dicarbonílicos en tejidos y en fluidos biológicos, están limitados por la alta eficiencia catalítica de detoxificación del sistema glioxalasa, así como por las reacciones relativamente rápidas que tiene lugar entre el Gly y las proteínas. En personas sanas, los primeros estudios realizados por Odani y col. [70] establecieron niveles de Gly en torno a 67 ng mL^{-1} ($1,16 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$). Estos datos no han sido corroborados por estudios posteriores y los niveles que actualmente se manejan para individuos sanos son más bajos. Thornalley y col. [71] establecieron concentraciones de $0,21 \pm 0,14 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ y estos datos son similares a los dados por Lapolla y col. que describen niveles del orden de $0,3 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ [72]. En pacientes con patologías renales sometidos a diálisis, los niveles de Gly pueden ser el doble o superiores y se han llegado a describir concentraciones de $0,76 \pm 0,21 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ [73]. Algo similar ocurre en pacientes diabéticos, en los cuales se han descrito concentraciones del orden de $0,45 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$.

En muestras de orina, los primeros estudios realizados por Espinosa y col. [35] establecieron concentraciones de Gly de $0,33 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$. Estos niveles son similares a los aportados en trabajos posteriores para individuos sanos, $0,53 \pm 0,22 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, los cuales se incrementan hasta $1,92 \pm 0,97 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ en personas diabéticas [74].

De los compuestos α -dicarbonílicos de cadena larga, las glucosonas, el que más atención ha recibido ha sido la 3-DG. Este compuesto puede originarse *in vivo* a partir de la fructosa-3-fosfato o a partir de la descomposición espontánea del compuesto fosforilado de Amadori, fructosamina-3-fosfato [75,76]. Los niveles de este compuesto en sangre son bastante más bajos que los de Gly. Henning y col. [77] dan concentraciones de $0,043 \pm 0,005 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ en personas sanas y $0,065 \pm 0,020 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ en pacientes sometidos a hemodiálisis.

Por otra parte, no está descrito que el DIA se origine de manera endógena, sin embargo, es uno de los compuestos α -dicarbonílicos más controlado en determinadas

atmósferas de trabajo, ya que la inhalación de este compuesto puede producir problemas respiratorios [78]. El análisis de este compuesto en orina es de gran importancia, ya que existen estudios realizados con ratas en los que se ha demostrado que esta es la vía principal de excreción de este analito [79]. En este sentido, su determinación en orina podría ser de gran interés en estudios sobre la evaluación de exposición a fuentes exógenas [80]. Además, existen indicios de que los compuestos α -dicarbonílicos exógenos reaccionan con enzimas digestivas, lo que reduce su biodisponibilidad y podría ser una vía para favorecer la eliminación de estos compuestos a través de la orina [81].

II.1.2.3. Presencia de compuestos α -dicarbonílicos en alimentos

Como se ha explicado anteriormente, una de las vías de formación de los compuestos α -dicarbonílicos es el tratamiento térmico al que se someten los alimentos, pero también pueden originarse durante los procesos de fermentación y/o de maduración del mismo. En general, la presencia de compuestos α -dicarbonílicos en alimentos está relacionada con su calidad. Así, en algunos casos, el nivel de estos compuestos puede ser considerado como un indicador de una maduración óptima, mientras que en otros puede ser indicador de su deterioro [82]. Los compuestos α -dicarbonílicos pueden originarse de forma exógena en alimentos por la autooxidación de los azúcares o por la reacción de Maillard, pero también por la degradación de los lípidos [32] y la fermentación microbiana [18]. La primera reacción tiene lugar preferentemente en alimentos con un alto contenido en carbohidratos, especialmente monosacáridos.

A pesar del papel que desempeñan los compuestos α -dicarbonílicos, los datos relativos al contenido de estos compuestos en alimentos no son muy elevados y frecuentemente están limitados a determinados alimentos ricos en azúcares, como por ejemplo las mieles [83,84], y otros como leche [85], mantequilla [85] o café [86], aunque como consecuencia de diferentes procesos de fermentación también se ha detectado su presencia en vino [87,88], cerveza [89] o vinagre [90].

La miel ha sido uno de los productos más estudiados ya que, debido a su alto contenido en glucosa y fructosa, la formación de compuestos α -dicarbonílicos durante

el suave tratamiento térmico al que son sometidas durante la manufacturación, así como durante el tiempo de almacenamiento, es relativamente importante. Los compuestos más analizados en esta matriz han sido el Gly y el MGly, los cuales han sido determinados en mieles de diferente origen floral, encontrándose concentraciones comprendidas entre 0,3-1,3 mg kg⁻¹ y 0,8-33 mg kg⁻¹, respectivamente [83,84]. Marceau y Yaylayan [83] estudiaron el perfil en compuestos α -dicarbonílicos que presentan 21 muestras diferentes de miel provenientes principalmente de distintas regiones de Canadá. Relacionaron los niveles de los compuestos α -dicarbonílicos con el origen botánico de las mieles y con diferentes parámetros físico-químicos, así como con el tiempo de almacenamiento. También detectaron que en las mieles más oscuras las concentraciones de estos compuestos son mayores que en las mieles claras. En las últimas décadas las denominadas mieles de Manuka están atrayendo mucha atención debido a las propiedades antimicrobianas que presentan, las cuales se atribuyen a los altos niveles de MGly que contienen, ya que presentan valores de hasta 30 mg kg⁻¹ [91].

Uno de los edulcorantes más utilizados en alimentos y en las bebidas edulcoradas es el jarabe de maíz rico en fructosa, que puede llegar a contener hasta un 42% de este azúcar. Esto implica que en bebidas que utilizan este edulcorante, las concentraciones de Gly y de MGly pueden estar comprendidas entre 15,8-104,6 y 23,5-139,5 (mg/100 mL), respectivamente [92]. En este tipo de bebidas, Lo y col. han detectado cantidades relativamente altas de 3-DG [93]. Por otra parte, este compuesto se ha determinado como uno de los α -dicarbonílicos más abundantes en cerveza [87] y en productos lácteos sin lactosa [94].

II.1.3. Descripción de las técnicas analíticas empleadas en esta parte de la Memoria

En la presente Tesis Doctoral se proponen nuevos métodos de análisis de compuestos α -dicarbonílicos, tanto en muestras de orina como de vino, mediante cromatografía líquida con detección fluorescente.

La cromatografía líquida de alta eficacia es una técnica de sobra conocida y que está extensamente descrita en la bibliografía. Está fundamentada en la separación de

los analitos en función de su afinidad por una fase estacionaria, a través de la cual se desplazan, o por un eluyente o fase móvil por el que son arrastrados a través de ésta.

En los últimos años, debido a varios factores como la mayor complejidad de las muestras analizadas, el mayor número de compuestos que se desean determinar en las mismas y el gran número de análisis requeridos, su evolución ha estado enfocada hacia el desarrollo de columnas cromatográficas que proporcionen análisis más rápidos, pero al mismo tiempo con una mejor eficacia en la separación de los compuestos de interés. Así, se distinguen dos factores que afectan principalmente a la eficacia de una columna cromatográfica: su longitud y el tamaño de las partículas empaquetadas en ella. Como se explicará a continuación, es posible lograr una mayor eficacia en la separación mediante la disminución de ambos parámetros, es decir, acortando la longitud de la columna, y empaquetando en ella partículas de diámetro más pequeño.

Además, es importante destacar que una mayor velocidad de análisis sin pérdida en el rendimiento de la separación no solo mejora la productividad analítica, sino que al disminuir el tiempo de análisis también lo hace el consumo de disolvente empleado en la fase móvil y, por tanto, el coste económico del método y el impacto ambiental del mismo.

II.1.3.1. Nuevas aportaciones en el campo de la cromatografía líquida: UHPLC

Teoría cinética. Ecuación de van Deemter

El término “eficacia” de una columna se utiliza para describir el ensanchamiento de los picos correspondientes a los solutos en su movimiento a través de la misma. Este término puede abordarse desde un punto de vista cinético a través de la ecuación de van Deemter [95], la cual fue desarrollada en primer lugar para columnas empaquetadas en cromatografía de gases.

La teoría cinética considera que el ensanchamiento de los picos en un cromatograma se produce como consecuencia de los distintos procesos de transferencia de masa durante el desplazamiento de un compuesto a lo largo de la columna a una velocidad finita. Según esta teoría, la forma de los picos depende de los siguientes factores:

- *Difusión por turbulencia y trayectorias seguidas por la fase móvil.* Está relacionado con el perfil de caudal de la fase móvil a través de la fase estacionaria. El tamaño de las partículas de relleno, su distribución por tamaños y su regularidad, son el origen de la formación de caminos preferentes de los solutos a través de ella, por tanto, el soluto puede recorrer múltiples trayectorias de distinta longitud aleatoriamente. Este factor es independiente de la velocidad de la fase móvil.

- *Difusión longitudinal del soluto a lo largo de la columna.* El soluto tiende a difundir hacia los bordes de la zona, ensanchando el pico cromatográfico. Cuanto menor es el caudal de fase móvil mayor es el ensanchamiento por difusión.

- *Equilibrio del soluto entre las fases móvil y estacionaria* no suficientemente rápido (resistencia a la transferencia de masa). Ya que el soluto requiere un cierto tiempo para transferirse entre la fase móvil y la fase estacionaria, cuando el caudal es demasiado rápido no puede alcanzarse el equilibrio, y la zona del soluto en la fase móvil se adelanta respecto a la fase estacionaria, lo que tiene como consecuencia un ensanchamiento del pico cromatográfico.

Estos tres factores se identifican con los parámetros A, B y C, respectivamente, de la ecuación de van Deemter, que de forma simplificada puede expresarse de la siguiente manera:

$$H = A + \frac{B}{u} + C \times u \quad (\text{Ecuación II.1})$$

donde H es la altura equivalente a un plato teórico (HETP, *Height Equivalent to a Theoretical Plate*) y u es la velocidad lineal de la fase móvil que a su vez se define como L/t_0 (L es la longitud de la columna y t_0 es el tiempo muerto).

La ecuación de van Deemter permite estudiar el poder de resolución de una columna cromatográfica a distintos flujos de fase móvil, como se muestra en la Figura II.5, donde se representa la variación de los tres términos de la ecuación en función de dicha velocidad. En ella, se observa que la contribución del término **A** es independiente de la velocidad de la fase móvil, mientras que **B/u** aumenta cuando la velocidad disminuye y que el término **Cx u** predomina a velocidades elevadas. Con esta representación se busca conocer el valor óptimo de flujo de fase móvil para un

determinado sistema cromatográfico, que será aquel que proporcione un valor mínimo de H. A velocidades inferiores a la óptima, la difusión longitudinal (B) origina un incremento en la altura del plato y un ensanchamiento de la banda mientras que, a velocidades superiores, la resistencia a la transferencia de masa entre fases (C, equilibrio lento) provoca que el soluto se extienda.

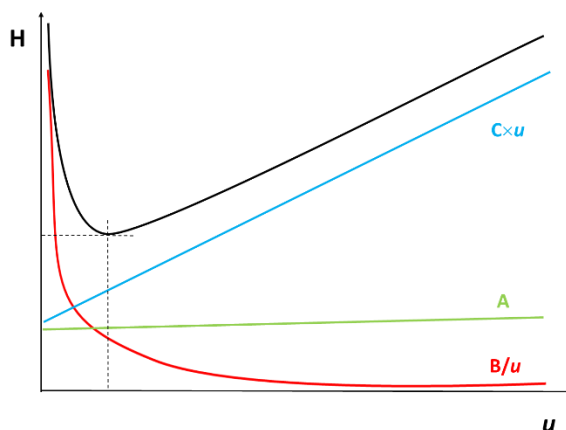


Figura II.5. Representación gráfica de la ecuación de van Deemter para HPLC.

En HPLC normalmente se trabaja a velocidades de flujo medias superiores al correspondiente mínimo valor de H con objeto de reducir el tiempo de análisis, lo que conlleva un aumento de este parámetro y, como consecuencia, una pérdida en la eficacia de la separación, ya que ambos términos son inversamente proporcionales.

Como ya se ha indicado, el término A de la ecuación de van Deemter es independiente de la velocidad de la fase móvil, pero es función del tamaño de las partículas de la fase estacionaria, de forma que:

$$A = \lambda d_p \quad (\text{Ecuación II.2})$$

donde λ es una constante que depende de las dimensiones, geometría y uniformidad del empaquetamiento de la columna, y d_p es el diámetro medio de las partículas de la fase estacionaria.

Por otra parte, aunque el término de difusión en la ecuación de van Deemter (término B) depende de la velocidad de la fase móvil, disminuyendo a medida que aumenta ésta, su contribución al valor de H suele ser despreciable en cromatografía líquida, como se muestra en la Figura II.5, por los bajos valores de los coeficientes de difusión de los líquidos que constituyen la fase móvil.

Finalmente, el término C se descompone en dos, C_s y C_m , según se considere la transferencia de masa en la fase estacionaria y móvil, respectivamente. Mientras que C_s puede considerarse despreciable para fases estacionarias sólidas, el término C_m viene descrito por la siguiente ecuación:

$$C_m = \frac{d_p^2}{D_m} \quad (\text{Ecuación II.3})$$

donde, D_m es el coeficiente de difusión molecular del soluto en la fase móvil. Según la ecuación II.3, el término C de la ecuación de van Deemter depende proporcionalmente del tamaño de partícula empaquetada en la fase estacionaria por lo que, cuando éste disminuye, H también lo hace, lo que da como resultado un aumento en la eficiencia cromatográfica. Esta eficiencia más alta está disponible desde un rango mucho más amplio de flujo que con tamaños de partícula más grandes, como se demuestra en la Figura II.6, donde se muestran diferentes curvas de van Deemter en función del tamaño de partícula.

Por tanto, según la ecuación de van Deemter, queda demostrado que al disminuir el tamaño de partícula es posible aumentar y mantener el número de platos teóricos de la columna, es decir, su capacidad resolutive, incluso aumentando la velocidad del flujo de la fase móvil, como consecuencia de la menor difusión de las moléculas del analito a través de la fase estacionaria, consiguiéndose picos más estrechos con óptima resolución cromatográfica.

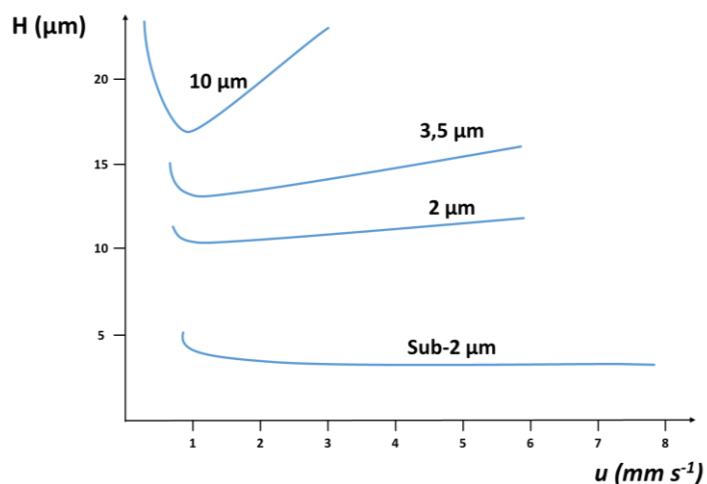


Figura II.6. Representación gráfica de la ecuación de van Deemter para columnas empaquetadas con diferentes tamaños de partícula [96].

El problema es que cuanto menores son las partículas de relleno mayor es la resistencia que se opone al flujo de fase móvil que pasa a través de la columna, por lo que es necesario trabajar con elevadas presiones. Esto ha supuesto un desafío significativo en el ámbito instrumental y ha obligado a desarrollar instrumentación capaz de trabajar a las altas presiones que generan estos flujos y, en definitiva, a establecer una nueva variante de la cromatografía líquida denominada cromatografía líquida de ultra eficacia (*UHPLC, Ultra-High Pressure Liquid Chromatography*).

Fekete y col. [97] recogen, en un reciente trabajo de revisión, un resumen y una extensa comparativa de la eficiencia en la separación cromatográfica que proporcionan las columnas empaquetadas con partículas de pequeño tamaño. A continuación, se describen las características más destacables de los dos tipos de columnas de pequeño tamaño de partícula utilizadas en esta Tesis Doctoral.

Columnas empaquetadas con partículas de tamaño inferior a 2 µm (Sub-2 µm)

Hace una década, las dimensiones típicas de las columnas utilizadas eran 250 x 4,6 mm o 150 x 4,6 mm, y estaban empaquetadas con partículas porosas de 5 µm de

diámetro. Estas columnas tenían una altura mínima equivalente a un plato teórico de entre 10 y 15 μm . Usando esta configuración, los instrumentos de HPLC convencionales, que operaban normalmente a presión máxima de 400 bar, eran suficientes. En la última década, este tipo de columnas están siendo sustituidas por otras empaquetadas con partículas totalmente porosas de diferentes diámetros (1,5, 1,7, 1,8, 1,9 y 2 μm), que proporcionan valores de HETP del orden de 3 μm . Este tipo de columnas requieren instrumentos capaces de soportar presiones superiores a 1200 bares, de forma que se puedan utilizar altos caudales de fase móvil sin pérdida de resolución bajo las condiciones optimizadas [98]. Para aliviar las consecuencias del calor generado por los estos elevados caudales, este tipo de columnas deben tener diámetros internos estrechos, siendo las dimensiones típicas de una columna de estas características de 5 cm de longitud y 2,1 mm de diámetro interno (aunque este último puede oscilar entre 1 y 2,1 mm) [99]. Actualmente, este tipo de columnas están siendo muy utilizadas para el análisis medioambiental, biomédico y farmacéutico con muy buenos resultados [98,100-102]. Varios estudios también han demostrado la excelente eficacia que presentan las partículas sub-1 μm , sin embargo, su uso no está aún muy extendido debido a que la presión generada es demasiado alta.

Columnas empaquetadas con partículas de núcleo sólido (core-shell)

Este tipo de columnas están constituidas por partículas con una capa de sílice porosa de 0,5 μm sobre un núcleo sólido de sílice de 1,7 μm de diámetro, por lo que su diámetro total es de 2,7 μm . Estas partículas generan aproximadamente una presión igual a la mitad de la generada con una columna empaquetada con partículas porosas de 1,8 μm , lo que hace posible reducir los tiempos de análisis manteniendo la eficiencia y, al mismo tiempo, requieren una presión relativamente baja, por lo que es posible utilizarlas en los sistemas convencionales de HPLC [103,104]. Este beneficio se deriva de que, a diferencia de las partículas totalmente porosas, la trayectoria del flujo de fase móvil en el interior de la partícula es menor, lo que proporciona una mayor cinética de transferencia de masa y un mejor rendimiento a velocidades altas de fase móvil [105].

Otra ventaja que presentan es la homogeneidad en el empaquetamiento, en gran parte debido a la distribución de tamaño de partícula muy estrecho y a la mayor densidad de partículas, lo que disminuye el término A de la ecuación de van Deemter

y, por tanto, la altura equivalente del plato teórico [106]. Este hecho se muestra representado en la Figura II.7, donde se pone de manifiesto que un mejor empaquetamiento implica un menor número de caminos alternativos disponibles que el soluto puede recorrer y, por tanto, menores distancias para alcanzar el equilibrio.

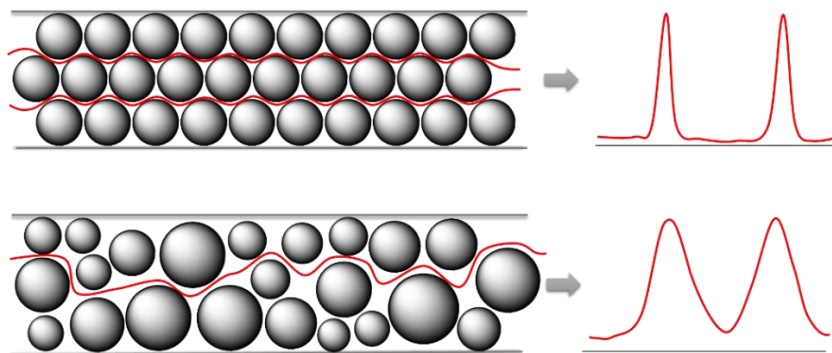


Figura II.7. Recorrido de soluto en columnas cromatográficas con diferentes tamaños de partículas y empaquetamiento.

Columnas monolíticas

A pesar de que en esta Memoria no se han empleado, cabe mencionar también las columnas monolíticas, con fases estacionarias poliméricas o constituidas por monolitos de sílica [107], las cuales han demostrado ser una muy buena alternativa a las columnas empaquetadas con partículas porosas para separaciones de alta eficiencia en HPLC, ya que disminuyen la transferencia de masa para altas velocidades de fase móvil [97]. Una de las principales ventajas de columnas monolíticas es que pueden trabajar soportando altos caudales (hasta 10 mL min^{-1}) en longitudes de columna convencional (4,6 mm de diámetro interior) sin generar altas presiones [108].

Bibliografía

- [1] L.C. Maillard, "Action des acides aminés sur les sucres: formation des mélanoidines par voie méthodique", *C. R. Acad. Sci.* 154 (1912) 66-68.
- [2] V.H. Nursten, "The Maillard Reaction Chemistry, Biochemistry and Implications", Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2005.
- [3] J.E. Hodge, "Chemistry of browning reactions in model systems", *J. Agric. Food Chem.* 1 (1953) 928-943.
- [4] M.A.J.S. van Boekel, "Formation of flavour compounds in the Maillard reaction", *Biotechnol. Adv.* 24 (2006) 230-233.
- [5] C.J. Moye, Z.S. Krzeminski, "The formation of 5-hydroxymethylfurfural from hexoses", *Aust. J. Chem.* 16 (1963) 258-269.
- [6] J.C. Cheftel, H. Cheftel, "Introducción a la bioquímica de los alimentos", Ed. Acribia, Zaragoza, 1980, 306-308.
- [7] V. Varlet, C. Prost, T. Serot, "Volatile aldehydes in smoked fish: Analysis methods, occurrence and mechanisms of formation", *Food Chem.* 105 (2007) 1536-1556.
- [8] E.V. McCollum, M. Davis, "The cause of the loss of nutritive efficiency of heated milk", *J. Biol. Chem.* 23 (1915) 247-254.
- [9] E.O. Greaves, A.F. Morgan, M.K. Loveen, "The effect of amino acid supplements and variations in temperature and duration of heating upon the biological value of heated casein", *J. Nutr.* 6 (1938) 115-128.
- [10] T. Obretenov, G. Vernin, "Melanoidins in the Maillard reaction", *Dev. Food Sci.* 40 (1998) 455-482.
- [11] H.Y. Wang, H. Qian, W.R. Yao, "Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity", *Food Chem.* 128 (2011) 573-584.
- [12] F. Jousse, T. Jongen, W. Agterof, S. Russell, P. Braat, "Simplified kinetic scheme of flavor formation by the Maillard reaction", *J. Food Sci.* 67 (2002) 2534-2542.
- [13] L.N. Bell, "Maillard reaction as influenced by buffer type and concentration", *Food Chem.* 1 (1997) 143-147.
- [14] J.S. Kim, Y.S. Lee, "Effect of reaction pH on enolization and racemization reactions of glucose and fructose on heating with amino acid enantiomers and formation of melanoidins as result of the Maillard reaction", *Food Chem.* 108 (2008) 582-592.

-
- [15] M. Namiki, T. Hayashi, "Development of novel free radicals during amino-carbonyl reaction of sugar with amino acids", *J. Agric. Food Chem.* 23 (1975) 487-491.
- [16] T. Hofmann, W. Bors, K. Stettmaier, "Studies on radical intermediates in the early stage of the non-enzymatic browning of carbohydrates and primary amino acids", *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 379-390.
- [17] P.J Thornalley, "Dicarbonyl intermediates in the Maillard reaction", *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1043 (2005) 1-7.
- [18] Y. Wang, C.T. Ho, "Flavour chemistry of methylglyoxal and glyoxal", *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 4140-4149.
- [19] V.M. Monier, A. Cerami, "Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins", *Science* 211 (1981) 491-493.
- [20] F.J. Tessier, "The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation", *Pathol. Biol.* 58 (2010) 214-219.
- [21] A.D. McCarthy, "Glicación, glicoxidación y estrés carbonílico: relevancia en las complicaciones vasculares de la Diabetes mellitus", *Rev. Arg. Endocrinol. Metab.* 37 (2000) 141-163.
- [22] S. Ohmari, K. Mori, K. Shibara, M. Kawase, "Enzymology and molecular biology of carbonyl metabolism", H. Weiner, T.G. Flynn (Eds), vol. 2, A.R. Liss, New York (1989) 397.
- [23] N. Igaki, M. Sakai, H. Hata, M. Oimomi, S. Baba, H. Kato, "Effects of 3-deoxyglucosone on the Maillard reaction", *Clin. Chem.* 36 (1990) 631-634.
- [24] T.J. Lyons, A.J. Jenkins, "Glucation, oxidation, and lipooxidation in the development of the complication of diabetes: a carbonyl stress hypothesis", *Diabetes Rev.* 5 (1997) 365-391.
- [25] M. Brownlee, "The pathological implications of protein glycation", *Clin. Invest. Med.* 18 (1995) 275-281.
- [26] P.J. Thornalley, "The glyoxalase system in health and disease", *Molec. Aspects Med.* 14 (1993) 287-371.
- [27] A. Bierhaus, M.A. Hofmann, R. Ziegler, P.P. Nawroth, "AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept", *Cardiovasc. Res.* 37 (1998) 586-600.

- [28] A. Rojas, M.A. Morales, "Advanced glycation and endothelial functions: A link towards vascular complications in diabetes", *Life Sci.* 76 (2004) 715-730.
- [29] V.P. Reddy, A. Beyaz, "Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases", *Drug Discov. Today* 11 (2006) 646-654.
- [30] N. Rabbani, P.J. Thornalley, "Glyoxalase in diabetes, obesity and related disorders", *Semin. Cell. Dev. Biol.* 22 (2011) 309-317.
- [31] H. Vlassara, M.R. Palace, "Diabetes and advanced glycation endproducts", *J. Intern. Med.* 251 (2002) 87-101.
- [32] T. Shibamoto, "Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation system", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 12-25.
- [33] M.A. Glomb, R. Tschirnich, "Detection of α -dicarbonyl compounds in maillard reaction systems and in vivo", *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 5543-5550.
- [34] A. Espinosa-Mansilla, I. Duran-Merás, F. Salinas, "High-performance liquid chromatographic fluorometric determination of glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl in urine by prederivatization to pteridinic rings", *Anal. Biochem.* 255 (1998) 263-273.
- [35] A. Espinosa-Mansilla, I. Durán-Merás, F. Cañada Cañada, M.P. Márquez, "High-performance liquid chromatographic determination of glyoxal and methylglyoxal in urine by prederivatization to lumazinic rings using in serial fast scan fluorimetric and diode array detectors", *Anal. Biochem.* 371 (2007) 82-91.
- [36] P. Moree-Testa, Y. Saint-Jalm, "Determination of α -dicarbonyl compounds in cigarette smoke", *J. Chromatogr. A* 217 (1981) 197-208.
- [37] S. Ohmori, M. Mori, M. Kawase, S. Tsuboi, "Determination of methylglyoxal as 2-methylquinoxaline by high-performance liquid chromatography and its application to biological samples", *J. Chromatogr. B* 414 (1987) 149-155.
- [38] F. Niyati-Shirkhodaee, T. Shibamoto, "Gas chromatographic analysis of glyoxal and methylglyoxal formed from lipids and related compounds upon ultraviolet irradiation", *J. Agric. Food Chem.* 41 (1993) 227-230.
- [39] M. Roldan, J. Loebner, J. Degen, T. Henle, T. Antequera, J.R. Carrascal, "Advanced glycation end products, physico-chemical and sensory characteristics of cooked lamb loins affected by cooking method and addition of flavour precursors", *Food Chem.* 168 (2015) 487-495.

-
- [40] Y.K. Shiryaeva, V.V. Krylin, V.N. Titov, "Chromatographic determination of methylglyoxal in blood plasma as the test for glycototoxicity and accumulation of glycation end-products", *Bull. Exp. Biol. Med.* 153 (2012) 114-117.
- [41] I. Nemet, L. Varga-Defterdarovic, Z. Turk, "Preparation and quantification of methylglyoxal in human plasma using reverse-phase high-performance liquid chromatography", *Clin. Biochem.* 37 (2004) 875-881.
- [42] A. Gómez Ojeda, K. Wrobel, A.R. Corrales Escobosa, M.E. Garay-Sevilla, K. Wrobel, "High-performance liquid chromatography determination of glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl in urine using 4-methoxy-*o*-phenylenediamine as derivatizing reagent", *Anal. Biochem.* 449 (2014) 52-58.
- [43] J.M. Stephens, R.C. Schlothauer, B.D. Morris, D. Yang, L. Fearnley, D.R. Greenwood, K.M. Loomes, "Phenolic compounds and methylglyoxal in some New Zealand manuka and kanuka honeys", *Food Chem.* 120 (2010) 78-86.
- [44] B. Martineau, T. Acree, T. Henick-Kling, "A simple and accurate GC/MS method for the quantitative analysis of diacetyl in beer and wine", *Biotechnol. Tech.* 8 (1994) 7-12.
- [45] I. Mikšik, J. Gabriel, Z. Deyl, "Capillary electrophoresis of *o*-phenylenediamine derivatives (quinoxalines) of dicarbonyl sugars", *J. Chromatogr. A* 638 (1993) 343-348.
- [46] X.-M. Chen, D.D. Kitt, "Identification and quantification of α -dicarbonyl compounds produced in different sugar-amino acid Maillard reaction model systems", *Food Res. Int.* 44 (2011) 2775-2782.
- [47] R.A. Cooper, A. Anderson, "The formation and catabolism of methylglyoxal during glycolysis in *Escherichia Coli*", *FEBS Lett.* 11 (1970) 273-276.
- [48] R.P. Gilbert, R.B. Brandt, "Spectrophotometric determination of methylglyoxal with 2,4-dinitrophenylhydrazine", *Anal. Chem.* 47 (1975) 2418-2422.
- [49] K. Kuwata, M. Uebori, Y. Yamasaki, "Determination of aliphatic and aromatic aldehydes in polluted airs as their 2,4-dinitrophenylhydrazones by high performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. Sci.* 17 (1979) 264-268.
- [50] M. Vogel, A. Büldt, U. Karst, "Hydrazine reagents as derivatizing agents in environmental analysis - a critical review", *Fresenius J. Anal. Chem.* 366 (2000) 781-791.

- [51] E. Grosjean, D. Grosjean, P.G. Green, J.M. Hughes, "LC-DAD/MS Analysis of carbonyl (2,4-dinitrophenyl)hydrazones", Agilent Technologies, Publication No. 5986-8850E (2000).
- [52] R. Olsen, S. Thorud, M. Hersson, S. Øvrebø, E. Lundanes, T. Greibrokk, D.G. Ellingsen, Y. Thomassen, P. Molander, "Determination of the dialdehyde glyoxal in workroom air-development of personal sampling methodology", *J. Environ. Monit.* 9 (2007) 687-694.
- [53] F. Yan-Li, M. Cui-Cui, F. Zheng-Ru, C. Ying-Jun, "Determination of airborne dicarbonyls by HPLC analysis using annular denuder/filter system coated with 2,4-dinitrophenylhydrazine", *Chin. J. Anal. Chem.* 39 (2011) 1653-1658.
- [54] S.E. Ebeler, A.J. Clifford, T. Shibamoto, "Quantitative analysis by gas chromatography of volatile carbonyl compounds in expired air from mice and humans", *J. Chromatogr. B* 702 (1997) 211-215.
- [55] A. Yasuhara, K. Kawada, T. Shibamoto, "Gas chromatographic-mass spectrometric method for analysis of trace carbonyl compounds in foods and beverages", *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 2664-2670.
- [56] J. Hirsch, E. Petrakova, M.S. Feather, "The reaction of some dicarbonyl sugars with aminoguanidine", *Carbohydr. Res.* 232 (1992) 125-130.
- [57] M. Yamaguchi, J. Ishida, Z. Xuan-Xuan, M. Nakamura, T. Yoshitake, "Determination of glyoxal, methylglyoxal, diacetyl and 2,3-pentandione in fermented foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection", *J. Liq. Chromatogr.* 17 (1994) 203-211.
- [58] P.J. Thornalley, A. Yurek-George, O.K. Argirov, "Kinetics and mechanism of the reaction of aminoguanidine with the R-oxoaldehydes glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone under physiological conditions", *Biochem. Pharmacol.* 60 (2000) 55-65.
- [59] T.W.C. Lo, T. Selwood, P.J. Thornalley, "The reaction of methylglyoxal with aminoguanidine under physiological conditions and prevention of methylglyoxal binding to plasma proteins", *Biochem. Pharmacol.* 48 (1994) 1865-1870.
- [60] P.J. Thornalley, "Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts", *Arch. Biochem. Biophys.* 419 (2003) 31-40.
- [61] R.E.J. Mitchel, H.C. Birnboim, "The use of Girard-T reagent in a rapid and sensitive method for measuring glyoxal and certain other α -dicarbonyl compounds", *Anal. Biochem.* 81 (1977) 47-56.

-
- [62] M. Yamaguchi, H. Yoshida, H. Nohta, "Luminol-type chemiluminescence derivatization reagents for liquid chromatography and capillary electrophoresis", *J. Chromatogr. A* 950 (2002) 1-19.
- [63] D.A. Cancilla, S.S. Que Hee, "*o*-(2,3,4,5,6-Pentafluorophenyl)methylhydroxylamine hydrochloride: a versatile reagent for the determination of carbonyl-containing compounds", *J. Chromatogr.* 627 (1992) 1-16.
- [64] J. Zhang, H. Zhang, M. Li, D. Zhang, Q. Chu, J. Ye, "A novel capillary electrophoretic method for determining methylglyoxal and glyoxal in urine and water samples", *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 5124-5129.
- [65] L.A. Zardari, M.Y. Khuhawar, A.J. Laghari, "Capillary GC analysis of glyoxal and methylglyoxal in the serum and urine of diabetic patients after use of 2,3-diamino-2,3-dimethylbutane as derivatizing reagent", *Chromatographia* 70 (2009) 891-897.
- [66] K.J. Knecht, M.S. Feather, J.W. Baynes, "Detection of 3-deoxyfructose and 3-deoxyglucosone in human urine and plasma: evidence for intermediate stages of the Maillard reaction *in vivo*", *Arch. Biochem. Biophys.* 294 (1992) 130-137.
- [67] M.-Y. Wu, B.-G. Chen, C.D. Chang, M.H. Huang, T.-G. Wu, D.-M. Chang, Y.-J. Lee, H.C. Wang, C.I. Lee, C.-L. Chern, R.H. Liu, "A novel derivatization approach for simultaneous determination of glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone in plasma by gas chromatography-mass spectrometry", *J. Chromatogr. A* 1204 (2008) 81-86.
- [68] S. Mittelmaier, M. Fünfroeken, D. Fenn, T. Fichert, M. Pischetsrieder, "Identification and quantification of the glucose degradation product glucosone in peritoneal dialysis fluids by HPLC/DAD/MS-MS", *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 877-882.
- [69] J.Z. Min, M. Yamamoto, H. Yu, T. Higashi, T. Toyo'oka, "Rapid and sensitive determination of the intermediates of advanced glycation end products in the human nail by ultra-performance liquid chromatography with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry", *Anal. Biochem.* 424 (2012) 187-194.
- [70] H. Odani, T. Shinzato, Y. Matsumoto, J. Usami, K. Maeda, "Increase in three alpha,beta-dicarbonyl compound levels in human uremic plasma: specific *in vivo* determination of intermediates in advanced Maillard reaction", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256 (1999) 89-93.

- [71] P.J. Thornalley, A.C. McLellan, T.W.C. Lo, J. Benn, P.H. Sönksen, "Negative association of red blood cell reduced glutathione concentration with diabetic complications", *Clin. Sci.* 91 (1996) 575-582.
- [72] A. Lapolla, R. Flamini, T. Tonus, D. Fedele, A. Senesi, R. Reitano, E. Marotta, G. Pace, R. Seraglia, P. Traldi, "An effective derivatization method for quantitative determination of glyoxal and methylglyoxal in plasma samples by gas chromatography/mass spectrometry". *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 876-878.
- [73] S. Agalou, N. Karachalias, P.J. Thornalley, B. Tucker, A.B. Dawney, "Estimation of alpha-oxoaldehydes formed from the degradation of glycolytic intermediates and glucose fragmentation in blood plasma of human subjects with uraemia", *Excerpta Med. Int. Congr. Ser.* 1245 (2002) 181-182.
- [74] A. Gómez Ojeda, K. Wrobel, A.R. Corrales Escobosa, M.E. Garay-Sevilla, K. Wrobel, "High-performance liquid chromatography determination of glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl in urine using 4-methoxy-*o*-phenylenediamine as derivatizing reagent", *Anal. Biochem.* 449 (2014) 52-58.
- [75] S. Lal, B. Szwegold, A. Taylor, "Metabolism of fructose-3-phosphate in the diabetic rat lens", *Arch. Biochem. Biophys.* 318 (1995) 191-199.
- [76] G. Delpierre, F. Collard, "Fructosamine 3-kinase is involved in an intracellular deglycation pathway in human erythrocytes". *Biochem. J.* 365 (2002) 801-808.
- [77] C. Henning, K. Liehr, M. Girndt, C. Ulrich, M.A. Glomb, "Extending the spectrum of α -dicarbonyl compounds *in vivo*", *J. Biolog. Chem.* 289 (2014) 28676-28688.
- [78] R. Kanwal, G. Kullman, C. Piacitelli, R. Boylstein, N. Sahakian, S. Martin, K. Fedan, K. Kreiss, "Evaluation of flavorings-related lung disease risk at six microwave popcorn plants", *J. Occup. Environ. Med.* 48 (2006) 149-157.
- [79] National Toxicology Program (2007). Chemical information review document for artificial butter flavoring and constituents. Diacetyl [CAS No. 431-03-8] and acetoin [CAS No. 513-86-0]. Supporting nomination for toxicological evaluation by the National Toxicology Program, January 2007. Prepared by Integrated Laboratory Systems, Inc. Research Triangle Park, NC Under Contract No. N01-ES-35515 for National Toxicology Program, National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, US Department of Health and Human Services Research Triangle Park, NC.

-
- [80] M. Otsuka, S. Ohmori, "Simple and sensitive determination of diacetyl and acetoin in biological samples and alcoholic drinks by gas chromatography with electron-capture detection", *J. Chromatogr. B* 577 (1992) 215-220.
- [81] A. Amoroso, G. Maga, M. Daglia, "Cytotoxicity of α -dicarbonyl compounds submitted to in vitro simulated digestion process", *Food Chem.* 140 (2013) 654-659.
- [82] H. Jaeger, A. Janositz, D. Knorr, "The Maillard reaction and its control during food processing. The potential of emerging technologies", *Pathol. Biol.* 58 (2010) 207-213.
- [83] E. Marceau, V.A. Yaylayan, "Profiling of α -dicarbonyl content of commercial honeys from different botanical origins: identification of 3,4-dideoxyglucoson-3-ene (3,4-DGE) and related compounds", *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 10837-10844.
- [84] K.U. Weigel, T. Opitz, T. Henle, "Studies on the occurrence and formation of 1,2-dicarbonyls in honey", *Eur. Food Res. Technol.* 218 (2004) 147-151.
- [85] V. Macciola, G. Candela, A. De Leonardis, "Rapid gas-chromatographic method for the determination of diacetyl in milk, fermented milk and butter", *Food Control* 19 (2008) 873-878.
- [86] A. Papetti, D. Mascherpa, G. Gazzani, "Free α -dicarbonyl compounds in coffee, barley coffee and soy sauce and effects of in vitro digestion", *Food Chem.* 164 (2014) 259-265.
- [87] G. De Revel, A. Bertrand, "A method for the detection of carbonyl compounds in wine: glyoxal and methylglyoxal", *J. Sci. Food Agric.* 61 (1993) 267-272.
- [88] G. De Revel, L. Pripis-Nicolau, J.C. Barbe, A. Bertrand, "The detection of α -dicarbonyl compounds in wine by formation of quinoxaline derivatives", *J. Sci. Food Agric.* 80 (2000) 102-108.
- [89] N. Moreira, S. Meireles, T. Brandão, P. Guedes de Pinho, "Optimization of the HS-SPME-GC-IT/MS method using a central composite design for volatile carbonyl compounds determination in beers", *Talanta* 117 (2013) 523-531.
- [90] R.J. García-Villanova, R.M. García Estepa, "Fluorimetric determination of diacetyl and 2,3-pentanedione with isoniazide and a zirconium salt", *Talanta* 40 (1993) 1419-1423.
- [91] N.A. Al-Habsi, K. Niranjana, "Effect of high hydrostatic pressure on antimicrobial activity and quality of Manuka honey", *Food Chem.* 135 (2012) 1448-1454.

- [92] C.Y. Lo, S. Li, Y. Wang, D. Tan, M. Pan, S. Sang, C.T. Ho, "Reactive dicarbonyl compounds and 5-(hydroxymethyl)-2-furfural in carbonated beverages containing high fructose corn syrup", *Food Chem.* 107 (2008) 1099-1105.
- [93] A. Bravo, J.C. Herrera, E. Scherer, Y. Ju-Nam, H. Rübsam, J. Madrid, C. Zufall, R. Rangel-Aldao, "Formation of alpha-dicarbonyl compounds in beer during storage of Pilsner", *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 4134-4144.
- [94] M. Hellwig, J. Degen, T. Henle, "3-Deoxygalactosone, a "new" 1,2-dicarbonyl compound in milk products", *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 10752-10760.
- [95] J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, "Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography", *Chem. Eng. Sci.* 5 (1956) 271-289.
- [96] M.E. Swartz, "UPLC™: An Introduction and Review", *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 28 (2005) 1253-1263.
- [97] S. Fekete, E. Oláh, J. Fekete, "Fast liquid chromatography: The domination of core-shell and very fine particles", *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 57-71.
- [98] T. Cajka, O. Fiehn, "Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry", *Trac-Trend. Anal. Chem.* 61 (2014) 192-206.
- [99] F. Gritti, G. Guiochon, "On the extra-column band-broadening contributions of modern, very high pressure liquid chromatographs using 2.1 mm I.D. columns packed with sub-2 µm particles", *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7677-7689.
- [100] G. D'Orazio, A. Rocco, S. Fanali, "Fast-liquid chromatography using columns of different internal diameters packed with sub-2 µm silica particles", *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 213-220.
- [101] E. Gerónimo, V.C. Aparicio, S. Bárbaro, R. Portocarrero, S. Jaime, J.L. Costa, "Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina", *Chemosphere* 107 (2014) 423-431.
- [102] M.J. Motilva, A. Serra, A. Macià, "Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview", *J. Chromatogr. A* 1292 (2013) 66-82.
- [103] K.K. Unger, R. Skudas, M.M. Schulte, "Particle packed columns and monolithic columns in high-performance liquid chromatography-comparison and critical appraisal" *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 393-415.

-
- [104] J.M. Cunliffe, T.D. Maloney, "Fused-core particle technology as an alternative to sub-2- μm particles to achieve high separation efficiency with low backpressure", *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 3104-3109.
- [105] A. Abraham, M. Al-Sayah, P. Skrdla, Y. Bereznitski, Y. Chen, N. Wu, "Practical comparison of 2.7 μm fused-core silica particles and porous sub-2 μm particles for fast separations in pharmaceutical process development", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (2010) 131-137.
- [106] J.J. DeStefano, T.J. Langlois, J.J. Kirkland, "Characteristics of superficially-porous silica particles for fast HPLC: some performance comparisons with sub-2- μm particles", *J. Chromatogr. Sci.* 46 (2008) 254-260.
- [107] P. Jandera, "Advances in the development of organic polymer monolithic columns and their applications in food analysis-A review", *J. Chromatogr. A* 1313 (2013) 37-53.
- [108] O. Núñez, H. Gallart-Ayala, C.P.B. Martins, P. Lucci, "New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis", *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 298-323.

II.2. Determinación de compuestos α -dicarbonílicos en orina mediante HPLC con detección fluorescente, previa derivatización a compuestos pteridínicos

II.2.1. Introducción al artículo científico 4

Como se ha comentado en la introducción de esta parte de la Memoria, los compuestos α -dicarbonílicos presentan un papel relevante en la formación de los AGEs, que a su vez están implicados en numerosas enfermedades anteriormente ya mencionadas. Una de ellas es la diabetes mellitus, cuya principal anomalía es la hiperglucemia, siendo la elevada concentración de glucosa la responsable, al menos en parte, de la gran mortalidad producida en esta enfermedad [1,2]. Los productos finales de la glicación avanzada se producen por la reacción no enzimática de la glucosa y otros derivados (Gly, MGly y 3-DG, entre otros) con grupos amino de proteínas de larga vida, alterándose la estructura, las propiedades físico-químicas y la función de las proteínas intracelulares y extracelulares, y originando diversos mecanismos patológicos que desembocan en las complicaciones derivadas de esta enfermedad como cataratas, osteoporosis, artrosis, debilitamiento del sistema inmunitario y complicaciones vasculares [2,3]. En relación con esta última, se sabe que en pacientes con diabetes el riesgo de mortalidad por complicaciones cardiovasculares es de 2 a 4 veces superior al de la población general [4].

Una fuerte evidencia a favor de que los AGEs y los productos de glicoxidación estarían implicados en el desarrollo de complicaciones diabéticas, consiste en que la aminoguanidina, un inhibidor *in vitro* de las reacciones de glicación avanzada, también inhibe un amplio rango de complicaciones en animales diabéticos [5].

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que los niveles de compuestos α -dicarbonílicos en fluidos biológicos de pacientes diabéticos son mayores que en pacientes sanos [6-8]. Por ejemplo, en un trabajo publicado por Zardari y col. [9] se propone un método analítico mediante cromatografía gaseosa con detección de ionización de llama para el análisis de Gly y MGly en suero y orina de pacientes sanos y diabéticos. Los niveles de estos compuestos determinados en suero estuvieron comprendidos entre 0,19-0,33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 0,20-0,29 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para Gly y MGly, respectivamente, en el caso de pacientes diabéticos, y entre 0,05-0,08 y 0,04-0,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, en el suero de pacientes sanos. En la orina, los niveles encontrados estuvieron comprendidos entre 0,18-0,40 y 0,25-0,36 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para el Gly y MGly, respectivamente, en pacientes diabéticos, no siendo analizados por los autores en la orina de pacientes sanos.

Por otra parte, Min y col. [10] han publicado un trabajo reciente donde se determinan por primera vez compuestos α -dicarbonílicos, concretamente Gly, MGly y 3-DG, en muestras de uña humana mediante UHPLC-ESI-TOF-MS, previa derivatización de los compuestos con 4,5-dimetil-1,2-fenilenediamina. Los autores aplicaron la metodología desarrollada a uñas de pacientes sanos y diabéticos, estableciendo que no había diferencias significativas en el contenido de Gly y MGly en los dos tipos de uñas. Sin embargo, si se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre las concentraciones de 3-DG observadas, por lo que afirman que este compuesto puede ser un potencial marcador en el diagnóstico de esta enfermedad.

Basándonos en la experiencia de nuestro grupo de investigación en la derivatización de compuestos α -dicarbonílicos de cadena corta (Gly, MGly y DIA) a derivados pteridínicos y posterior optimización de procedimientos para el análisis de los derivados originados, en el **artículo científico 4** se planteó su aplicación a otros compuestos α -dicarbonílicos de cadena corta (2,3-Pen, y PhGly) y de cadena larga (GS y 3-DG). Así, utilizando el TRI como reactivo derivatizador, se han optimizado en primer lugar todos los parámetros que influyen en la etapa de reacción de derivatización, y se ha propuesto un método mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorescente, con el objetivo de poder analizarlos conjuntamente en muestras de orina. El método fue validado mediante la obtención de los correspondientes parámetros de calidad, y aplicado a muestras de orina de personas sanas y de pacientes enfermos con diabetes mellitus.

Bibliografía

- [1] The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, "The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in insulin dependent diabetes mellitus", *N. Eng. J. Med.* 329 (1993) 977-986.
- [2] H. Vlassara, M.R. Palace, "Diabetes and advanced glycation endproducts", *J. Inter. Med.* 251 (2002) 87-101.
- [3] N. Ahmed, P.J. Thornalley, "Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications?", *Diabetes Obes. Metab.* 9 (2007) 233-245.
- [4] The Emerging Risk Factors Collaboration, "Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death", *N. Engl. J. Med.* 364 (2011) 829-841.
- [5] M. Brownlee, H. Vlassara, A. Kooney, P. Ulrich, A. Cerami, "Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein crosslinking", *Science* 232 (1986) 1629-1632.
- [6] A.C. McLellan, P.J. Thornalley, J. Benn, P.H. Sonksen, "The glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications", *Clin. Sci.* 87 (1994) 21-9.
- [7] P.J. Beisswenger, S.K. Howell, A. Touchette, S. Lal, B.S. Szwegold, "Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes", *Diabetes* 48 (1999) 198-202.
- [8] J.P. Nicolay, J. Schneider, O.M. Niemoeller, F. Artunc, M. Portero-Otin, G. Haik, P.J. Thornalley, E. Schleicher, T. Wieder, F. Lang, "Stimulation of suicidal erythrocyte death by methylglyoxal", *Cell Physiol. Biochem.* 18 (2006) 223-232.
- [9] L.A. Zardari, M.Y. Khuhawar, A.J. Laghari, "Capillary GC analysis of glyoxal and methylglyoxal in the serum and urine of diabetic patients after use of 2,3-diamino-2,3-dimethylbutane as derivatizing reagent", *Chromatographia* 70 (2009) 891-897.
- [10] J.Z. Min, M. Yamamoto, H. Yu, T. Higashi, T. Toyo'oka, "Rapid and sensitive determination of the intermediates of advanced glycation end products in the human nail by ultra-performance liquid chromatography with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry", *Anal. Biochem.* 424 (2012) 187-194.

II.2.2. Artículo científico 4

Journal of Separation Science, 35 (2012) 2575-2584

“Development of a method for the determination of advanced glycation end products precursors by liquid chromatography and its application in human urine samples”

María del Carmen Hurtado-Sánchez, Anunciación Espinosa-Mansilla, María Isabel Rodríguez-Cáceres, Elisabet Martín-Tornero, Isabel Durán-Merás

Abstract

A liquid chromatographic method with fluorimetric detection has been developed to determine the most abundant α -dicarbonyl compounds, generated as intermediates in the Maillard reaction, previous derivatization to high fluorescent pteridinic derivatives. Hence, the biomarkers D-glucosone, 3-deoxyglucosone, glyoxal, methylglyoxal, diacetyl, 2,3-pentanedione, and phenylglyoxal were quantified using a gradient elution mode. The experimental conditions of the derivatization reaction and mobile phase composition were optimized. Linearity ranges (peak area versus α -dicarbonyl compound concentration) from 1.0 to 100.0 ng mL⁻¹ were obtained. Detection limits were comprised between 0.3 and 11.0 ng mL⁻¹. The high sensitivity of the method allows the determination of α -dicarbonyl compounds present in human urine, such as D-glucosone, 3-deoxyglucosone, glyoxal, and methylglyoxal, which are used as biomarkers, in order to investigate their roles in several diseases, with special emphasis in diabetes mellitus. With the aim of avoiding the interferences due to pteridinic compounds present in urine, a cleanup step with an ISOLUTE ENV+ cartridge was carried out. The concentrations of these urinary biomarkers have been reported as a normalized ratio to urinary creatinine, and determined in healthy and in diabetic volunteers, of different ages and sex. In all urine samples, standard addition and external calibration procedures were applied and compared.

Keywords: α -Dicarbonyl compounds, Creatinine, Liquid chromatography-fluorescence detection, Solid phase extraction, Urine.

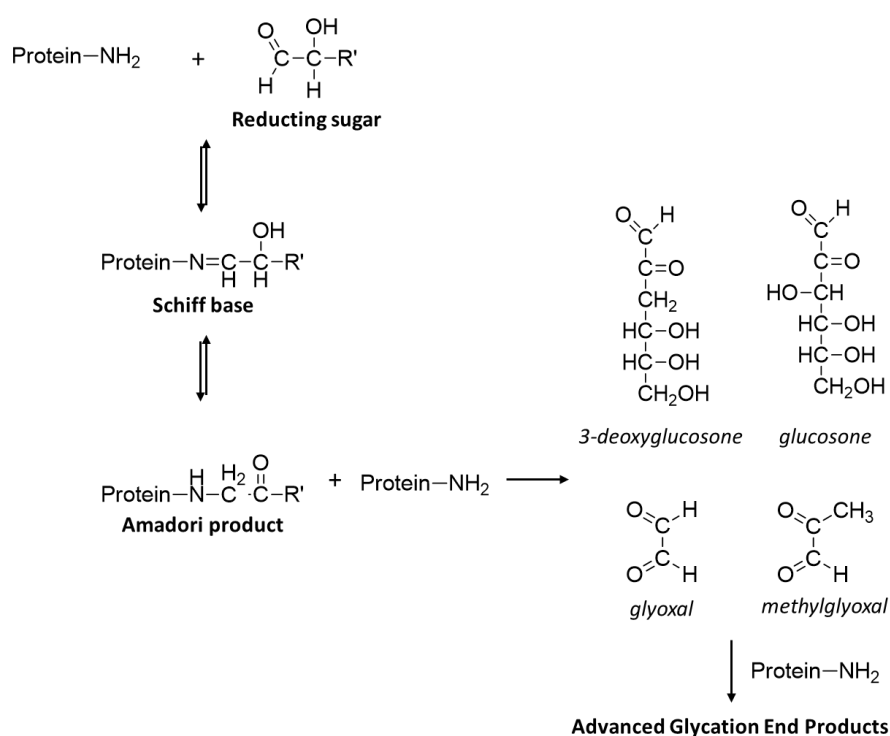
1. Introduction

α -Dicarbonyl compounds, such as dialdehydes, α -oxoaldehydes, and diketones, are attracting much attention because of their clinical significance. These compounds are related with chronic and age-related diseases, because they are highly reactive compounds that interact with proteins and nucleic acids. In this context, α -oxoaldehydes are involved in the nonenzymatic glycation of proteins, also known as Maillard reaction, which is an endogenous chemical reaction between the aldehyde group of a reducing sugar (as glucose), and the primary amine group of a protein, nucleic acid, or lipid. It begins with the spontaneous formation of a reversible Schiff base, which rearranges to give a stable ketoamine or Amadori product. Through oxidation and dehydration reactions, Amadori products are degraded into α -dicarbonyl compounds, mainly glyoxal (Gly), methylglyoxal (MGly), and 3-deoxyglucosone (3-DG). Other glucosones, such as D-glucosone (GS), are generated in smaller amounts.

These dicarbonyl compounds are much more reactive than the sugars from which they are derived, acting as propagators of the reaction by reacting with free amino groups of proteins, and being intermediate products in the formation of advanced glycation end products (AGEs) [1,2] (Scheme 1). AGEs are stable end-stage adducts, formed by the nonenzymatic glycation of sugar reducers with proteins and are related with the oxidative stress. Their formation *in vivo* has been related with the development of several diseases, including diabetes mellitus, cardiovascular disorders, Alzheimer, or Parkinson [3]. Also, diacetyl (DIA) has been found in biological tissues as a product from the lipid oxidation reactions [4]. For this reason, the levels of some of these compounds have been currently used as biomarkers, in order to investigate their roles in the above mentioned diseases.

On the other hand, other dicarbonyl compounds, such as DIA and 2,3-pentanedione (2,3-Pen), have been determined in many food products, because they are also reactive intermediates formed during food heat treatments through the Maillard reaction [5], and during fermentation and maturation processes [6]. Other

dicarbonyl compounds, such as phenylglyoxal (PhGly), are produced during the alcoholic fermentation of wines [7]. In general, the presence of α -dicarbonyl compounds in foods is related with their quality, and the level of these compounds, in some cases, may be considered as an indicator of optimum maturation, while in others may be indicator of spoilage [8]. These compounds have been determined in wine [9], coffee [10], butter and milk [11], among others.



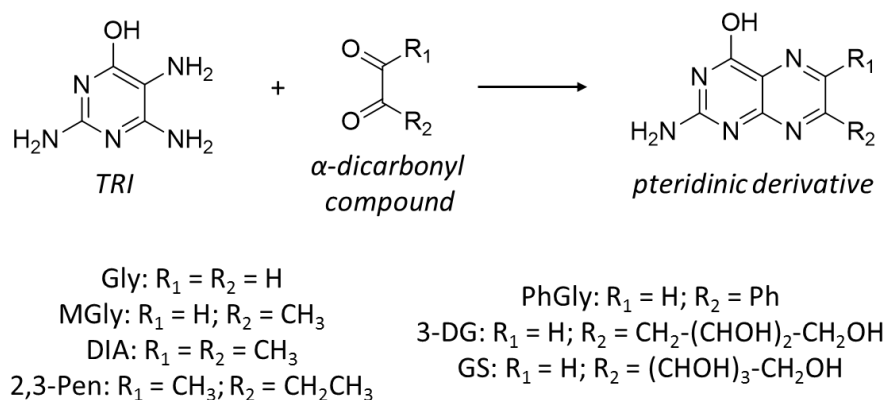
Scheme 1. Nonenzymatic glycation reactions.

In the last decades, a high number of methods has been developed, for the analysis of α -dicarbonyl compounds in biological samples, such as human urine [12,13] and serum [14]. Various techniques have been reported and, in the majority of the methods, direct measurements are not possible, and a previous derivatization step becomes inevitable. In a recent review, Shibamoto summarized the development of several methods proposed for trace analysis of these compounds, in various types of samples [15]. More recently, gas chromatography has been proposed for the

analysis of Gly, MGly, and/or 3-DG, preceded by a derivatization step with *o*-(2,3,4,5,6)-pentafluorobenzyl hydroxylamine (PFBOA) or 1,2-diaminepropane, with flame ionization or MS detection [16-18]. The analysis of these compounds by capillary electrophoresis, also involves the derivatization of the analytes, and methods using UV or amperometric detection, have been proposed [19,20].

HPLC with fluorescence detection (LC-FD) is the most commonly employed method [12,13,21]. Nevertheless, as dicarbonyl compounds have not native fluorescence, the developed methods for their analysis normally include a previous derivatization step. For instance, these compounds have been derivatized to fluorescent quinoxalines with 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene [22], 1,2-diaminobenzene or *o*-phenylenediamine [10,23,24], and 2,3-diaminobenzene [7,14], and to chemiluminescent quinoxaline derivatives with 4,5-diaminophthalhydrazide [21], among others. In our research group, dicarbonyl compounds of low molecular mass, Gly, MGly, and DIA, have been derivatized to pteridinic and lumazinic compounds with 2,4,5-triamino-6-hydroxypyrimidine (TRI) [12] and 5,6-diamino-2,4-dihydroxypyrimidine (DDP) [13], respectively.

In this paper, a chromatographic method with FD is reported for the simultaneous determination of seven α -dicarbonyl compounds, previous derivatization into pteridinic compounds. The derivatization reaction is presented in Scheme 2. Previous studies have been carried out for the optimization of the derivatization reaction and the chromatographic conditions, in order to develop a sensitive and selective procedure for the simultaneous determination of the analytes in urine samples. The analysis of urine samples is the most used approach to obtain information about the above-mentioned biomarkers. On the other hand, urine samples contain endogenous pteridines, which interfere in the analysis of the α -dicarbonyl compounds. To eliminate these interferences, a solid-phase extraction procedure has been optimized. Urinary biomarkers are reported as a normalized ratio to urinary creatinine (CREA). The amount of CREA was analyzed by the classic Jaffè reaction [25], modified by Heinegard *et al.* [26]



Scheme 2. Derivatization reaction and α -dicarbonyl compound structures.

2. Experimental

2.1. Reagents and materials

DIA (97%), 2,3-Pen (97%), PhGly (97%), CREA (98%), and aqueous solutions of Gly (40%) and MGly (40%) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). GS (98%) and 3-DG (95%) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). Stock standard solutions of 3-DG ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), GS ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$), PhGly ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), and CREA ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) were prepared by dissolving in ultrapure water adequate amounts of the powder presentations of each compound. Stock solutions of DIA ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$), 2,3-Pen ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$), Gly ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), and MGly ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) were prepared by weighting and dilution of the adequate aliquots in ultrapure water. Stock analyte solutions were prepared separately and stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Fresh working standard mixture solutions were daily prepared by suitable dilution of stock analyte solutions with ultrapure water. TRI (97%) was obtained from Fluka (Madrid, Spain) and a 2.6 mM stock solution was daily prepared in 50 mM hydrochloric acid containing 200 mM of β -mercaptoethanol (β -ME) from Sigma-Aldrich. Picric acid (98%) was purchased from Sigma-Aldrich and a 25 mM aqueous solution was prepared with ultrapure water. A 2 g L^{-1} sodium dodecyl sulfate (SDS) solution was prepared from Sigma-Aldrich. Two solutions (0.4 and 0.8 mM) were prepared from phosphoric acid reagent grade ($85\% \text{ (p/v)}$, density = 1.70 g mL^{-1}) from Scharlau

(Barcelona, Spain), by dilution in ultrapure water. All solutions were prepared with Milli-Q water (Millipore S.A.S., Molsheim, France). Methanol and acetonitrile HPLC grade were purchased from Panreac (Barcelona, Spain).

Fresh urine samples were collected from eight healthy volunteers (five men and three women), 25-50 years old; one healthy child, 7 years old, and two volunteers with diabetes mellitus, a woman and a man, 40 and 50 years old, respectively. Urine samples were immediately frozen after collection at -18 °C until analysis.

Mobile phase was filtered through a 0.22 µm membrane nylon filter (Teknokroma, Barcelona, Spain), and degassed by ultrasonication before use. ISOLUTE ENV+ SPE cartridges (200 mg, 3 mL), packed with hydroxylated polystyrenedivinylbenzene copolymer (Biotage, Uppsala, Sweden), were employed for the urine cleanup. Samples were also filtered through 0.22 µm membrane PTFE filters (Millipore, Madrid, Spain) before injection.

2.2. Instrumentation

Chromatographic studies were performed on an Agilent Model 1100 LC instrument (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), equipped with an on-line degasser, a quaternary pump, a manual six-way injection valve containing a 20 µL loop, a diode array detector (DAD), and a fluorescence detector, connected on line. The ChemStation software was used for controlling the instrument, data acquisition, and data interpretation.

The chromatographic separation was achieved on a Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 × 4.6 mm, 5.6 µm; Agilent Technology) analytical column. The column temperature was controlled by a coil with recirculating water, which was selected through a thermostatic bath at 15 °C. The flow rate was 1 mL min⁻¹. Detection was performed by fluorimetric detector at 437 nm ($\lambda_{exc} = 275$ nm).

Kinetic-spectrophotometric measurements were performed using a UV-Visible spectrophotometer Varian Model Cary 50 Bio, equipped with a Xenon lamp. All measurements were realized in 1 cm quartz cells at 37 °C, using a thermostatically controlled Varian Cary cell holder. The solid-phase extraction was carried out in a Varian vacuum system.

A Crison MicropH 501 meter (Barcelona, Spain), equipped with a combined glass/saturated calomel electrode, was used for pH measurements.

2.3. Separation method of α -dicarbonyl compounds by direct LC-FD

In a 25-mL volumetric flask, aliquots of working solutions of GS, 3-DG, Gly, MGly, DIA, 2,3-Pen, and PhGly were placed, and 1.25 mL of 2.6 mM acidic TRI solution were added. The mixture was heated at 85 °C for 60 min, cooled in icewater, and diluted with 0.4 mM phosphoric acid solution up to the mark. The resulting solution was filtered through 0.22 μ m membrane PTFE filters, and aliquots of 20 μ L were injected. For the chromatographic elution of the derivatized dicarbonyl compounds, the flow rate was set at 1 mL min⁻¹, and a mobile phase composed by 95:5 (v/v) phosphoric acid (0.4 mM, pH \approx 3.2)/acetonitrile (eluent A), and acetonitrile (eluent B) was employed. A gradient mode was established consisting in a first isocratic step, 0-7 min (eluent A), and a second lineal gradient step, 7-16.5 min up to 20% eluent B. Finally, the column employed, C18, was reequilibrated during 5 min in the initial conditions. For analysis, fluorescence was measured at 437 nm, exciting at 275 nm, using the peak area as analytical signal.

2.4. Analysis of GS, 3-DG, Gly, and MGly in human urine

Aliquots of 0.30 mL of unfrozen urine were diluted to 3 mL with ultrapure water, and the resulting solution was passed through an ISOLUTE ENV+ polymeric cartridge, previously conditioned with 5 mL of methanol and 5 mL of ultrapure water. For the elution of the retained dicarbonyl compounds, 3 mL of ultrapure water were passed through the cartridge. Then, 0.5 mL of 2.6 mM acidic TRI solution were added to the eluate, and the mixture was heated at 85 °C for 60 min, cooled in ice-water, and diluted with 0.8 mM phosphoric acid solution up to 10 mL. The resulting solution was filtered through 0.22 μ m membrane PTFE filters, and aliquots of 20 μ L were injected. For the chromatographic elution of the pteridinic derivatives, the flow rate was set at 1 mL min⁻¹. The mobile phase was composed of 0.8 mM phosphoric acid solution/acetonitrile (99:1, v/v). Between every human urine injection, a cleanup step was introduced consisting in that pure acetonitrile was pumped through the column during 2 min. Then, mobile phase was maintained for 5 min in order to reequilibrate

the column. The standard addition method was used to calculate the concentrations of each of the α -dicarbonyl compounds in the urine samples. Thus, different spiked urine samples at three different concentration levels of each α -dicarbonyl compound: 10, 30, and 60 ng mL⁻¹ for GS and 3-DG; 3, 10, and 20 ng mL⁻¹ for Gly; and 5, 15, and 30 ng mL⁻¹ for MGly were analyzed, and peak areas ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 275/437$ nm) were selected as analytical signal.

2.5. Analysis of CREA in human urine

To determine CREA in urine, 2 mL of working picrate reagent composed by equal volumes of 25 mM picric acid solution and 300 mM phosphate buffer (pH \approx 12.7) in 2 g L⁻¹ SDS solution were placed in a 1 cm path length quartz cell thermostated at 37 °C. Just after, 200 μ L of 1:10 diluted urine with ultrapure water was added. The reaction was assumed to start after the last drop of the urine sample was added to the cell. The absorbance of the picrate-creatinine complex was monitored at 510 nm during 2 min. The reaction rate, calculated between 30 and 90 s, was employed as the analytical signal.

3. Results and Discussion

3.1. Optimization of derivatization variables

It is well known that α -dicarbonyl compounds do not present adequate absorbent properties for their analysis, and it is necessary a derivatization step. The derivatization reaction with TRI has already been optimized and a chromatographic method for the determination of Gly, MGly, and DIA has been proposed [12]. In this paper, the use of TRI as derivatized reagent was expanded to other α -dicarbonyl compounds, such as 3-DG, GS, 2,3-Pen, and PhGly. In short, pteridinic derivatives are formed and the rate of the derivatization reaction is not affected with the pH in the range between 3.5 and 7.0. Furthermore, pH values higher than 7.0 are not suitable because the TRI solutions are unstable. Preliminary studies were done to evaluate the effect of physical and chemical variables in the derivatization reaction of the mixture. In most of the cases, the α -dicarbonyl compounds give rise to a single pteridinic derivative, which is highly fluorescent, presenting two excitation maxima, at 275 and

357 nm, and an emission maximum, at 437 nm, in acidic media. However, PhGly was transformed in two derivatives with different spectral characteristic.

The establishment of the nature of those peaks has been carried out by obtaining the fluorescence spectra in the apex of the peaks with the fast-scanning fluorescence detector. These spectra are shown in Fig. 1B and for all derivatives, except for one of the derivatives of PhGly, the spectra are similar and its characteristic wavelengths correspond to the pteridinic derivatives. The peak of the second PhGly derivative (peak 9) presents a bathochromic shift to 295 and 370 nm, for the excitation maximum, and to 445 nm for the emission maximum.

In order to select the optimum acidity of the medium, chromatographic studies of the derivatization reaction were performed. Phosphoric acid 0.4 mM (pH \approx 3.2)/acetonitrile (95:5, v/v) was selected as optimum mobile phase, and a flow rate of 1 mL min⁻¹ was employed to study the influence of the acidity in the derivatives formation. Physicochemical conditions for the derivatization reaction were 65 °C for 45 min. The obtained results showed that peak areas of pteridinic derivatives of GS, 3-DG, and PhGly decrease with the acidity, while peak areas of derivatives of Gly, MGly, DIA, and 2,3-Pen are increasing up to 100 mM HCl, and decrease for higher values. Finally, although the formation of some derivatives decrease for high concentrations of HCl, a concentration of 50 mM HCl was selected as optimum because the degradation of TRI is not so high.

Even so, the products of decomposition of TRI were not completely eliminated. Cordeiro *et al.* [23] suggested preparing the derivatized reagent in presence of β -ME. In this way, the influence of this agent in the derivatization reaction was studied. Thus, TRI acidic solutions were prepared in presence of different concentrations of β -ME comprised between 200 and 600 mM. It could be observed that degradation of TRI was avoided in the same extension independent of the concentration of β -ME employed. Therefore, the solution of TRI was prepared in HCl 50 mM and in presence in 200 mM of β -ME. Fig. 1A shows the chromatograms of a TRI solution in presence and in absence of 200 mM β -ME, and it can be observed that, in the presence of β -ME, the degradation of the reagent is practically eliminated.

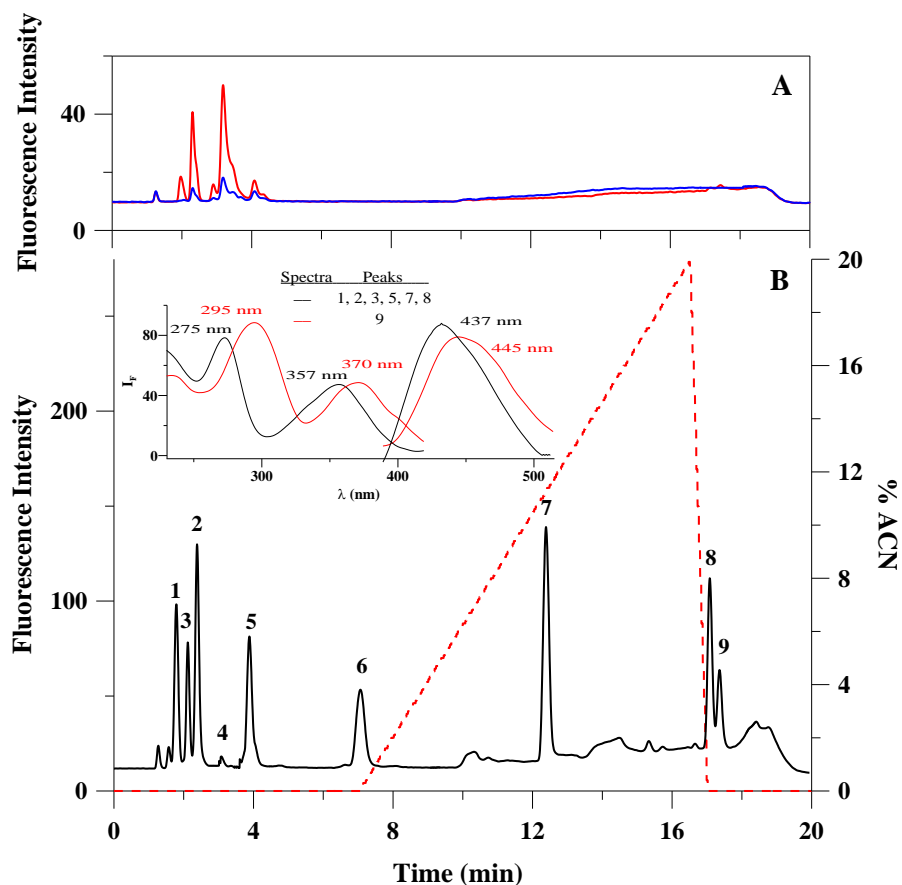


Figure 1. (A) Chromatograms of an aliquot of acidic TRI solution in absence (—) and presence (—) of β -ME 200 mM. (TRI) = 3.76×10^{-5} M; (B) Chromatogram of a mixture sample composed of GS, 3-DG, Gly, MGly, DIA, 2,3-Pen, and PhGly. Physicochemical conditions: TRI, 1.30×10^{-4} M (in 50 mM HCl and 200 mM β -ME); derivatizing time, 60 min; T = 85 °C; $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ = 275/437 nm. Dashed line represents the gradient percentage acetonitrile profile. Peaks: 1 = GS-TRI, 2 = 3DG-TRI, 3 = Gly-TRI, 4 = TRI, 5 = MGly-TRI, 6 = DIA-TRI, 7 = 2,3Pen-TRI, 8 and 9 = PhGly-TRI.

Temperature and reaction time are two very important parameters that influence in the TRI-dicarbonyl compound reaction rates. For this reason, a series of standard mixture solutions containing 60.0 ng mL⁻¹ GS, 60.0 ng mL⁻¹ 3-DG, 35.0 ng mL⁻¹ Gly, 42.0 ng mL⁻¹ MGly, 50.0 ng mL⁻¹ DIA, 500.0 ng mL⁻¹ 2,3-Pen, 50.0 ng mL⁻¹ PhGly, and TRI solution (185 mM) were placed in 25-mL volumetric

flasks, and incubated at 60, 85, and 95 °C, during several heating times, in the range 20-90 min. Finally, aliquots of 20 μ L were injected in the chromatographic system, and the elution was carried out in the conditions mentioned above. For GS, 3-DG, Gly, MGly, and PhGly derivatives, the peak area of the formed adducts increased with both variables.

However, for DIA and 2,3-Pen derivatives, the peak area decreased with heating times higher than 60 min at 95 °C. It can be concluded that heating may cause decomposition of the DIA-TRI and 2,3-Pen-TRI adducts. Thus, a temperature of 85 °C and a heating time of 60 min were selected as optimum. In order to achieve a high yield of reaction, the (TRI)/(α -dicarbonyl compounds) ratio was studied and a 50:1 ratio was fixed for later studies. The pteridinic derivatives are very stable and did not show significant changes in the peaks morphology and area under the peaks over a 12-h period.

3.2. Optimization of chromatographic conditions

Preliminary chromatographic studies were performed in order to separate the seven derivatives of GS, 3-DG, Gly, MGly, DIA, 2,3-Pen, and PhGly. To achieve a good resolution between the peaks corresponding to the pteridinic derivatives, the acetonitrile percentage and pH of mobile phase were optimized. The effect of the pH of the mobile phase on the retention of the pteridinic derivatives was studied between 2.8 and 6.0. The retention factor values are not influenced by the pH of the mobile phase, and a 0.4 mM phosphoric acid (pH 3.2) was selected for the further studies. The effect of the acetonitrile percentage was studied in the range 0-5%. When 5% acetonitrile was fixed, the α -dicarbonyl derivative peaks were resolved, except for Gly and MGly derivatives, which overlapped with the highly fluorescent TRI degradation products.

In these conditions, the retention times of the peaks corresponding to 2,3-Pen and PhGly derivatives were 20 min and 3 h, respectively. In order to reduce them, a gradient mode for the elution of these peaks was assayed. Thus, a mobile phase composed by 0.4 mM phosphoric acid/acetonitrile (95:5, v/v) (eluent A), and acetonitrile (eluent B), was employed. The gradient mode, once optimized, consisted in a first isocratic step, 0-7 min (eluent A), and a second lineal gradient step,

7-16.5 min up to 20% eluent B. Finally, the column employed, C18, was reequilibrated during 5 min in the initial conditions. A flow rate of 1 mL min⁻¹ was selected and, in these conditions, all derivatives were eluted in a time lower than 18 min, as can be seen in Fig. 1B.

3.3. Analytical characteristics of the LC-FD method for standards

The linearity of the method was assessed by preparing calibration standards with concentrations from 10.0 to 80.0 ng mL⁻¹ of GS and 3-DG, from 1.0 to 10.0 ng mL⁻¹ of Gly and DIA, from 1.0 to 15.0 ng mL⁻¹ of MGly, from 10.0 to 50.0 ng mL⁻¹ of PhGly, and from 10.0 to 100.0 ng mL⁻¹ of 2,3-Pen, as previously explained in Section 2.3. Each standard was introduced in the chromatographic system by triplicate and was eluted under optimum conditions. FD was realized at 437 nm, exciting at 275 nm. Under these conditions, all analytes are eluted in less than 18 min and the retention times of each one are shown in Table 1. Calibration curves for each one of the seven analytes were built by plotting the peak areas as a function of the standard concentration, by triplicate.

As PhGly is transformed in two derivatives, the calibration for this analyte was performed in two ways: considering the peak area of each individual derivative or considering the sum of the areas of the two peaks. The best results were obtained in the second case. Linearity ranges, regression equations and statistical parameters obtained with the ACOC program [27], have been summarized in Table 1. The linearity for all analytes has been tested by examination of the residuals plots [28] and by the criterion of Cuadros-Rodríguez *et al.* [29]. In the first case, the errors scatter randomly around the zero line, and by the second procedure, the numerical values obtained are summarized in Table 1. These results show an adequate linearity in all cases.

Table 1. Analytical and statistical parameters for the chromatographic determinations of α -dicarbonyl compounds (FD, $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 275/437$ nm).

Analyte	t_R (SD) ^a (min)	Linear range (ng mL ⁻¹)	Regression equation	Determination coefficient, R ²	Linearity (%)	LOD ^b (ng mL ⁻¹)	LOQ ^c (ng mL ⁻¹)	(γ^{-1}) ^d (ng mL ⁻¹)	RSD ^e
GS	1.78 (0.01)	10.0-80.0	$y = 25.2(0.4)x + 136(18)$	0.9972	99	1.45	4.82	1.5	7.2
3-DG	2.11 (0.01)	10.0-80.0	$y = 22.8(0.2)x - 59(12)$	0.9985	99	0.13	0.43	1.1	3.4
Gly	2.38 (0.01)	1.0-10.0	$y = 243(4)x + 251(26)$	0.9960	98	0.16	0.55	0.2	7.0
MGly	3.87 (0.04)	1.0-15.0	$y = 136(1)x + 43(12)$	0.9987	99	0.44	1.46	0.5	1.9
DIA	7.02 (0.07)	1.0-10.0	$y = 236(3)x + 100(18)$	0.9979	99	0.43	1.43	0.4	6.2
2,3-Pen	12.3 (0.3)	10.0-100.0	$y = 44.7(0.8)x + 354(48)$	0.9960	98	1.43	4.76	5.8	5.7
PhGly	17.09 (0.02) 17.37 (0.02)	10.0-50.0	$y = 22.1(0.4)x + 496(13)$	0.9958	98	1.52	5.06	2.8	6.0
Photometric analysis, Jaffè method									
Analyte		Linear range (μ g mL ⁻¹)	Regression equation	Determination coefficient, R ²	Linearity (%)	LOD ^b (μ g mL ⁻¹)	LOQ ^c (μ g mL ⁻¹)	(γ^{-1}) ^d (μ g mL ⁻¹)	RSD ^e
CREA	-	1-150	$Y = 0.00157 (0.00002)x + 0.003 (0.002)$	0.9974	99	4.4	14.6	2.5	4.3

^a Standard deviation; ^b Limit of detection (calculated as three times the signal/noise ratio); ^c Limit of quantification (calculated as 10 times the signal/noise ratio);

^d Analytical sensitivity; ^e Relative standard deviation, (n = 10). Standard solution employed containing 40.0 ng mL⁻¹ GS, 40.0 ng mL⁻¹ 3-DG, 5.0 ng mL⁻¹ Gly, 8.0 ng mL⁻¹ MGly, 5.0 ng mL⁻¹ DIA, 50.0 ng mL⁻¹ 2,3-Pen; 30.0 ng mL⁻¹ PhGly, 75.0 μ g mL⁻¹ CREA.

The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were obtained as 3 and 10 times, respectively, the signal/noise ratio [28]. Hence, in all standard chromatograms, the height to base line was measured in different zones, and the standard deviation was calculated. The obtained value was divided between calibration curves slopes for each analyte, obtained employing the peak height as analytical signal, and multiplied by 3 or 10 to calculate LOD or LOQ, respectively. These values are also summarized in Table 1. 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 [29], are summarized in Table 1. The precision of the method, expressed as relative standard deviation, was determined for each analyte under the optimized conditions, by injection of ten individual replicates, and values comprised between 1.9 and 7.2% were obtained (Table 1).

3.4. Analysis of GS, 3-DG, Gly, and MGly in human urine by SPE-HPLC method

In the quantification of the α -dicarbonyl compounds in urine, in the chromatographic conditions previously optimized, unknown compounds of urine overlapped with the pteridinic derivatives of 3-DG and Gly. In consequence, the composition of the mobile phase and the temperature of the chromatographic system have been slightly modified. The peaks more overlapped are the corresponding with the minor retention times and, with the object of increasing the capacity factor of these peaks, the initial percentage of acetonitrile was decreased from 95:5 (v/v) to 99:1 (v/v), and the concentration of phosphoric acid was increased from 0.4 to 0.8 mM. Thus, the mobile phase selected as optimum for the analysis of these compounds in urine samples was phosphoric acid (0.8 mM)/acetonitrile, 99:1 (v/v). A flow rate of 1 mL min⁻¹ was established and fluorescence excitation/emission wavelengths of 275/437 nm were employed. In these conditions, the retention times precision are not good enough and this affect mainly to the resolution of MGly derivative peak with regard to the urine interferences. The effect of the temperature can be critical in the separation of closely similar substances and, like the stabilization of the temperature column usually leads to the stabilization of the retention times, a

study of the influence of this variable has been carried out. The values assayed were comprised between 10 and 30 °C. The temperature of the column was kept constant using a coil with recirculating water, controlled with a thermostatic bath. It could be observed that the peak resolution decreases with the temperature, thus, 15 °C was selected as optimum for further analysis.

It is noticeable that, in these conditions, only four α -dicarbonyl compounds are detectable in urine samples, specifically, GS, 3-DG, Gly, and MGly.

3.5. Optimization of solid-phase extraction method

As biological fluids have naturally present pteridines in non-fluorescent reduced form, when the urine samples are derivatized under the optimized conditions, low amounts of oxidized form could be present and be potential interferences in the dicarbonyl compounds analysis. In order to remove the potential interfering compounds from urine samples, a cleanup SPE step was performed before analysis. The aim was to retain natural pteridines in the cartridge and that the α -dicarbonyl compounds pass through it. Previous studies showed that ISOLUTE ENV+ (hydroxylated polystyrene-divinylbenzene copolymer) cartridges can be used with this purpose [30]. This cartridge was selected because its ability to retain the most polar water-soluble compounds. In this case, pteridines are more polar than dicarbonyl compounds, and when urine samples pass through the cartridge, pteridines are retained while α -dicarbonyl compounds are practically unretained [31]. On the other hand, as the α -dicarbonyl compounds present in urine are GS, 3-DG, Gly, and MGly, the optimization of the cleanup step was carried out for the analysis of these four biomarkers.

An ISOLUTE ENV+ (200 mg) cartridge was conditioned with 5 mL of methanol, to obtain better surface contact with the aqueous solution being extracted, and with 5 mL of ultrapure water, at a speed of 1 mL min⁻¹. In these conditions, interferences were totally retained in the cartridge. The elution of α -dicarbonyl compounds still retained was tested with different solvents as acetonitrile, methanol, and ultrapure water. To calculate the recovery of the SPE procedure, stock standard solutions of 60 ng mL⁻¹ GS and 3-DG, 20 ng mL⁻¹ Gly and 25 ng mL⁻¹ MGly, were used. Among the studied solvents, ultrapure water has proved to be the most appropriate for the

elution of α -dicarbonyl compounds retained in the cartridge. It also presents the advantage that it is not necessary to eliminate the organic solvents before derivatization reaction and HPLC analysis. The required elution volume was assayed, and 3 mL of ultrapure water was selected as optimum. With this procedure, all α -dicarbonyl compounds present in urine were successfully eluted (recoveries higher than 90%). In Fig. 2A, the chromatograms corresponding to underivatized human urine samples, before and after the SPE cleanup process, are shown. It can be observed that the chromatogram obtained before cleanup presents peaks that interfere with the analytes of our interest. However, in the chromatogram obtained with the same urine sample, but after the cleanup with the ISOLUTE ENV+ cartridge, the background is greatly reduced. Also, in the chromatograms of derivatized urine samples with TRI, Fig. 2B, the peaks corresponding to the naturally excreted GS, 3-DG, Gly, and MGly, can be observed, and these peaks increase when the urine sample is fortified with the analytes.

3.6. Analysis of CREA in human urine

In these studies, determination of CREA has been included because its contents in urine may be used to normalize the ratio of excretion of the biomarkers. The CREA contents of urine samples were analyzed chromatographically and spectrophotometrically. In the optimized proposed method for our analysis, CREA does not react with the derivative reagent, TRI, and it can be analyzed by LC-DAD at 215 nm, in the same run, together with the α -dicarbonyl compounds (retention time = 1.5 min). However, when the solid-phase extraction step was used, CREA was not eluted in the optimized conditions. This involves that the analysis of CREA and of the α -dicarbonyl compounds needs two runs for each urine sample, before and after the SPE step. In this case, the time per analysis is longer and we opted to analyze the CREA content in the urine samples by other independent method.

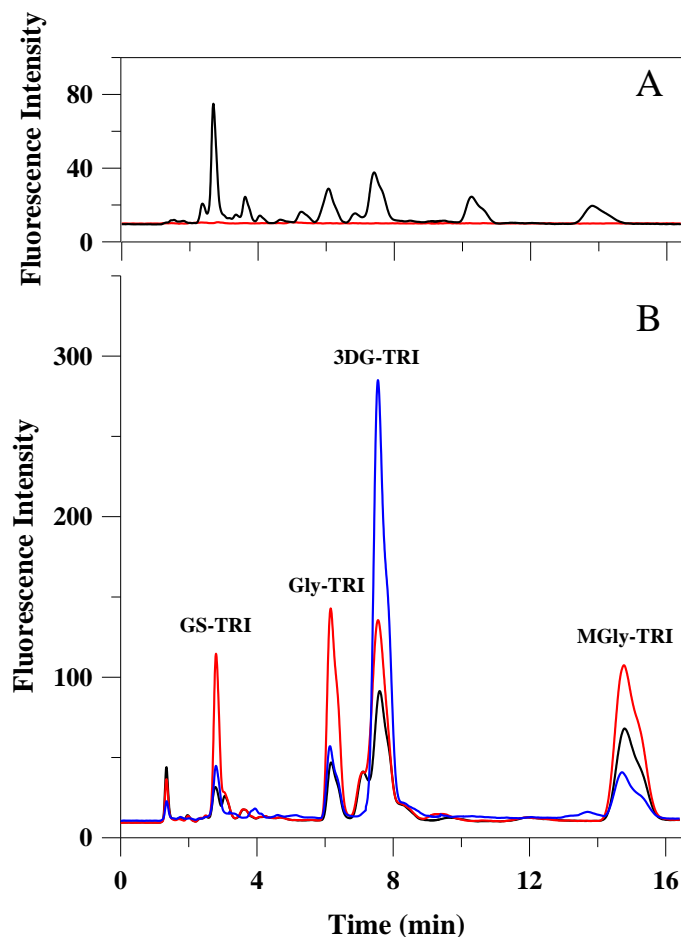


Figure 2. (A) Chromatograms of underivatized human urine sample with (—) or without (—) SPE clean-up. **(B)** Chromatograms of a derivatized human urine sample from healthy volunteer (—), from volunteer with diabetes mellitus (—), and from human urine sample from healthy volunteer spiked with GS, 3-DG, Gly, and MGly (—). Physicochemical derivatization conditions: TRI, 1.30×10^{-4} M (in 50 mM HCl and 200 mM β -ME); derivatizing time, 60 min; T = 85 °C. $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ = 275/437 nm.

A useful procedure for its quantification in biologic fluids is based on the Jaffè reaction that uses a colorimetric procedure with picric acid as reagent [25]. A modification of this procedure involves doing it in presence of a tensioactive, to prevent the precipitation of the proteins, and using the kinetic rate of the reaction as analytical signal [26]. Applying the methodology described in Section 2.5, the

analytical parameters established for CREA in the range 10-150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ are reported in Table 1. With the object of proving if the results obtained by chromatography and spectrometry methods are in agreement, six urine samples were analyzed by both methods, and the mean values were compared by using two-way analysis of variance. In both procedures, urine samples were diluted and derivatized, with TRI in the LC-DAD method, and with picric acid in the photometric method. Three replicates of each sample were analyzed and the mean values were compared. Not significant differences, at 95% confidence level, were found between both methods.

3.7. Chromatographic analysis of urine samples

Urine samples were collected from healthy volunteers of both sexes, with different ages, and from two volunteers with diabetes mellitus. External standard and standard addition methods were carried out to examine the possible matrix effect. The calibration parameters obtained for external calibration and for standard addition calibration with different urine samples are summarized in Table 2. In urine of healthy volunteers, no statistically significant difference ($p > 0.05$) was found for any analytes. However, in the urine of diabetes volunteers (urine 3), the slope value of the calibration graphs of each of the analytes show statistically significant difference ($p < 0.05$). Consequently, the effect of the urine matrix is important in urine of persons with diabetes mellitus and, with the aim of avoiding possible errors in the urine analysis, the standard addition method is advisable.

Accuracy and precision of the proposed method for the analysis of α -dicarbonyl compounds in urine has been evaluated in three concentration levels, by spiking urine samples with 10, 30, and 60 ng mL^{-1} for GS and 3-DG; 3, 10, and 20 ng mL^{-1} for Gly; and 5, 15, and 30 ng mL^{-1} for MGly, respectively, by injection of five individual replicates in each case. The precision values obtained, expressed as % RSD, were comprised between 1.5 and 4.7%, 1.9 and 4.3%, and 0.7 and 5.6% for spiked levels lower, middle, and upper, respectively, and recovery values were between 89 and 111%.

Table 2. Comparison between results obtained by external and standard addition methods.

Analyte	External calibration			Standard addition calibration				Slopes comparison test ^d	
	Slope ₁ (S _b) ^a	S _{y/x1} ^b	R ²	Urine	Slope ₂ (S _b) ^a	S _{y/x2} ^b	R ²	Test F ^e	Test t
GS	17.4 (0.2)	20	0.9982	1	17.6 (0.7)	31	0.9972	$F_{cal}=2.23 < F_{tab}=19.4$	$t_{cal}=0.22 < t_{tab}=2.13$; Slope ₁ ≈ Slope ₂
				2	16.5 (0.3)	15	0.9993	$F_{cal}=1.93 < F_{tab}=3.81$	$t_{cal}=1.91 < t_{tab}=2.13$; Slope ₁ ≈ Slope ₂
				3	7.4 (0.3)	16	0.9958	$F_{cal}=1.70 < F_{tab}=3.81$	$t_{cal}=21.0 > t_{tab}=2.13$; Slope ₁ ≠ Slope ₂
3-DG	28.9 (0.4)	72	0.9979	1	29.1 (0.9)	41	0.9981	$F_{cal}=3.16 < F_{tab}=3.81$	$t_{cal}=0.44 < t_{tab}=2.13$; Slope ₁ ≈ Slope ₂
				2	25.8 (0.8)	39	0.9978	$F_{cal}=3.46 < F_{tab}=3.81$	$t_{cal}=1.32 < t_{tab}=2.13$; Slope ₁ ≈ Slope ₂
				3	63.3 (0.8)	38	0.9965	$F_{cal}=3.57 < F_{tab}=3.81$	$t_{cal}=2.24 > t_{tab}=2.13$; Slope ₁ ≠ Slope ₂
Gly	141.0 (1.3)	50	0.9990	1	134.2 (3.2)	49	0.9989	$F_{cal}=1.04 < F_{tab}=3.81$	$t_{cal}=1.89 < t_{tab}=2.13$; Slope ₁ ≈ Slope ₂
				2	130.0 (1.3)	88	0.9918	$F_{cal}=6.67 < F_{tab}=19.4$	$t_{cal}=2.00 < t_{tab}=2.13$; Slope ₁ ≈ Slope ₂
				3	67.3 (2.7)	41	0.9968	$F_{cal}=1.45 < F_{tab}=3.81$	$t_{cal}=2.16 > t_{tab}=2.13$; Slope ₁ ≠ Slope ₂
MGly	93.4 (1.6)	84	0.9664	1	87.0 (3.9)	89	0.9961	$F_{cal}=1.12 < F_{tab}=19.4$	$t_{cal}=1.61 < t_{tab}=2.13$; Slope ₁ ≈ Slope ₂
				2	96.0 (4.1)	94	0.9964	$F_{cal}=1.25 < F_{tab}=19.4$	$t_{cal}=0.63 < t_{tab}=2.13$; Slope ₁ ≈ Slope ₂
				3	25.0 (1.3)	31	0.9943	$F_{cal}=1.32 < F_{tab}=3.81$	$t_{cal}=18.3 < t_{tab}=2.13$; Slope ₁ ≠ Slope ₂

^a S_b, slope deviation; ^b S_{y/x}, regression deviation; ^c Urine 1: healthy man (31 years old), Urine 2: healthy woman (25 years old), Urine 3: diabetes mellitus's patient (50 years old); ^d For $\alpha = \beta = 0.05$; ^e In all cases S_{y/x1} ≈ S_{y/x2} were obtained.

Eleven different urine samples were analyzed by the standard addition method, and the obtained results, expressed as α -dicarbonyl compounds/CREA ratios, are shown in Table 3. The results found in healthy persons are similar with data previously reported [13,32]. However, in the urine samples of diabetic volunteers, the α -dicarbonyl compound/CREA ratios are high than in healthy persons. In the diabetic volunteers, the levels of 3-DG are significant higher than in the healthy volunteers, and this is in accordance with the studies that link a high concentration of 3-DG with the diabetic patients, and with the risk to suffer complications [33].

Table 3. Results from HPLC analysis of α -dicarbonyl compound in human urine using the standard addition method.

Age (sex)	GS/CREA ^a	3-DG/CREA ^a	Gly/CREA ^a	MGly/CREA ^a
Healthy volunteers				
7 (Male)	0.81 (0.08)	3.4 (0.2)	0.28 (0.02)	1.2 (0.1)
25 (Male)	0.11 (0.06)	1.70 (0.2)	0.21 (0.02)	0.97 (0.08)
25 (Male)	0.16 (0.05)	4.4 (1.3)	0.28 (0.03)	0.8 (0.1)
31 (Male)	0.22 (0.04)	0.65 (0.07)	0.10 (0.01)	0.30 (0.02)
42 (Male)	0.16 (0.02)	0.71 (0.05)	0.11 (0.01)	0.51 (0.02)
50 (Male)	0.23 (0.04)	0.93 (0.08)	0.19 (0.02)	0.81 (0.04)
20 (Female)	0.29 (0.06)	1.70 (0.20)	0.29 (0.01)	1.10 (0.07)
25 (Female)	0.20 (0.02)	1.13 (0.08)	0.15 (0.03)	0.51 (0.03)
34 (Female)	0.69 (0.04)	1.2 (0.3)	0.25 (0.03)	0.73 (0.05)
Volunteers with diabetes mellitus				
50 (Male)	0.6 (0.1)	6.1 (0.5)	0.84 (0.06)	3.8 (0.3)
40 (Female)	2.42 (0.08)	10.1 (1.5)	0.57 (0.04)	2.0 (0.1)

^a Expressed as $\mu\text{g mg}^{-1}$ (SD, standard deviation).

Amounts added in the standard additions: GS and 3-DG: 10.0, 30.0, and 60.0 ng mL⁻¹; Gly: 3.0, 10.0, and 20.0 ng mL⁻¹; MGly: 5.0, 15.0, and 30.0 ng mL⁻¹.

4. Concluding remarks

In this work, a sensitive method for the determination of several α -dicarbonyl compounds, GS, 3-DG, Gly, MGly, DIA, PhGly, and 2,3-Pen, prior derivatization to highly fluorescence pteridinic derivatives, has been developed. The generated

derivatives have widely different relative retention, and an adequate separation has been obtained by applying a gradient elution. Its application to urine samples, with a prior SPE cleanup step, allowed the quantification of the α -dicarbonyl compounds present in urine (GS, 3-DG, Gly, and MGly). The α -dicarbonyl/CREA ratios in urine appears similar in young healthy women and men, and only in diabetic volunteers, significantly higher values were obtained.

In a previous paper, another method to analyze Gly and MGly in human urine with a prior derivatization to pteridines has been proposed by our research group [12]. In comparison with it, important improvements have been introduced in this work. In first place, other α -dicarbonyl compounds, such as GS and 3-DG, have been analyzed together with Gly and MGly in urine samples. These four compounds take a most relevant role as precursors in the *in vivo* formation of the AGEs, and they are used as biomarkers of disease of diabetes mellitus. Hence, their simultaneous determination is of high clinical interest. On the other hand, the presence of β -ME in the derivatization reagent eliminates the interferences due to the decomposition of TRI, and the chromatographic method proposed is more selective. Also, derivatization conditions have been modified (from heating time of 45 min at 60 °C to 60 min at 85 °C), and in this way the sensibility of process has been increased. Finally, an SPE cleanup step has been included before the derivatization process, and potential interferences due to the endogenous pteridinic compounds can be removed.

References

- [1] A. Lapolla, P. Traldi, D. Fedele, "Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins", *Clin. Biochem.* 38 (2005) 103-115.
- [2] P.J. Thornalley, A. Langborg, S. Minhas, "Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose", *Biochem. J.* 344 (1999) 109-116.
- [3] N. Rabbani, P.J. Thornalley, "Glyoxalase in diabetes, obesity and related disorders", *Semin. Cell. Dev. Biol.* 22 (2011) 309-317.
- [4] T. Shibamoto, "Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 12-25.

- [5] M.A.J.S. Van Boekel, "Formation of flavour compounds in the Maillard reaction", *Biotechnol. Adv.* 24 (2006) 230-233.
- [6] A. Bravo, B. Sánchez, E. Scherer, J. Herrera, R. Aldao, "Compuestos alfa-dicarbonílicos como indicadores y precursores del deterioro del sabor durante el envejecimiento de la cerveza", *Cerveza Malta* 158 (2003) 15-26.
- [7] G. De Revel, L. Pripis-Nicolau, J.C. Barbe, A. Bertrand, "The detection of α -dycarbonyl compounds in wine by formation of quinoxaline derivatives", *J. Sci. Food Agric.* 80 (2000) 102-108.
- [8] H. Jaeger, A. Janositz, D. Knorr, "The Maillard reaction and its control during food processing. The potential of emerging technologies", *Pathol. Biol.* 58 (2010) 207-213.
- [9] A.C. Da Silva-Ferreira, S. Reis, C. Rodrigues, C. Oliviera, P. Guedes de Pinho, "Simultaneous determination of ketoacids and dicarbonyl compounds, key Maillard intermediates on the generation of aged wine aroma", *J. Food. Sci.* 72 (2007) S314-S318.
- [10] M. Daglia, A. Papetti, C. Aceti, B. Sordelli, V. Spini, G. Gazanni, "Isolation and Determination of α -Dicarbonyl Compounds by RP-HPLC-DAD in Green and Roasted Coffee", *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 8877-8882.
- [11] V. Macciola, G. Candela, A. De Leonardis, "Rapid gas-chromatography method for the determination of diacetyl in milk, fermented milk and butter", *Food Control* 19 (2008) 873-878.
- [12] A. Espinosa Mansilla, I. Durán-Merás, F. Salinas, "High performance liquid chromatographic-fluorometric determination of glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl in urine by prederivatization to pteridinic rings", *Anal. Biochem.* 255 (1998) 263-273.
- [13] A. Espinosa Mansilla, I. Durán-Merás, F. Cañada-Cañada, M.P. Márquez, "High-performance liquid chromatographic determination of glyoxal and methylglyoxal in urine by prederivatization to lumazinic rings using in serial fast scan fluorimetric and diode array detectors", *Anal. Biochem.* 371 (2007) 82-91.
- [14] Y. Uchida, Y. Kurano, T. Endo, M. Aoyama, S. Ito, "Immunochemical detection of 3-deoxyglucosone in serum", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325 (2004) 1090-1098.
- [15] T. Shibamoto, "Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 12-25.

- [16] M.Y. Khuhawar, L.A. Zardari, A.J. Laghari, "Capillary gas chromatography determination of methylglyoxal from serum of diabetic patients by precolumn derivatization with 1,2-diaminopropane", *J. Chromatogr. B* 873 (2008) 15-19.
- [17] M.Y. Wu, B.G. Chen, C.D. Chang, M.H. Huang, T.G. Wu, D.M. Chang, Y.J. Lee, H.C. Wang, C.I. Lee, C.L. Chern, R.H. Liu, "A novel derivatization approach for simultaneous determination of glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone in plasma by gas chromatography-mass spectrometry", *J. Chromatogr. A* 1204 (2008) 81-86.
- [18] S. Gensberger, S. Mittelmaier, M.A. Glomb, M. Pischetsrieder, "Identification and quantification of six major α -dicarbonyl process contaminants in high-fructose corn syrup", *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 2923-2931.
- [19] M.A. Mirza, A.J. Kandhro, S.Q. Memon, M.Y. Khuhawar, R. Arain, "Determination of glyoxal and methylglyoxal in the serum of diabetic patients by MEKC using stilbenediamine as derivatizing reagent", *Electrophoresis* 28 (2007) 3940-3947.
- [20] J. Zhang, H. Zhang, M. Li, D. Zhang, Q. Chu, J. Ye, "A novel capillary electrophoretic method for determining methylglyoxal and glyoxal in urine and water samples", *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 5124-5129.
- [21] J. Ishida, S. Sonezaki, M. Yamaguchi, "5-Diaminophthalhydrazide as a highly sensitive chemiluminescence derivatization reagent for α -dicarbonyl compounds in high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. A* 598 (1992) 203-208.
- [22] Z.J. Wang, K. Zaitso, Y. Ohkura, "High-performance liquid chromatographic determination of alpha-keto acids in human serum and urine using 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene as a precolumn fluorescence derivatization reagent", *J. Chromatogr. B* 430 (1988) 223-231.
- [23] C. Cordeiro, A. Ponces Freire, "Methylglyoxal assay in cells as 2-methylquinoxaline using 1,2-diaminobenzene as derivatizing reagent", *Anal. Biochem.* 234 (1996) 221-224.
- [24] K. Koike, M. Koike, "Fluorescent analysis of alpha-keto acids in serum and urine by high-performance liquid chromatography", *Anal. Biochem.* 141 (1984) 481-487.
- [25] M.Z. Jaffè, "Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins", *Physiol. Chem.* 10 (1886) 391-400.

- [26] 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.* 10 (2005) 337-345
- [28] K. Danzar, L.A. Currie, "Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part I. Fundamentals and single component calibration (IUPAC Recommendations 1998)", *Pure Appl. Chem.* 70 (1998) 993-1014.
- [29] 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.
- [30] A. Jiménez Girón, A. Espinosa Mansilla, I. Durán-Merás, E. Martín Tornero, XIII JAI, Barcelona, Spain 2011, www.jornadasanalisis.com.
- [31] C.W. Huck, G.K. Bonn, "Recent Developments in Polymer-Based Sorbents for Solid-Phase Extraction", *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 51-72.
- [32] K.J. Knecht, M.S. Feather, W. Baynes, "Detection of 3-deoxyfructose and 3-deoxyglucosone in human urine and plasma: evidence for intermediate stages of the Maillard reaction in vivo", *Arch. Biochem. Biophys.* 294 (1992) 130-137.
- [33] H. Kusunoki, S. Miyata, T. Ohara, B.F. Liu, A. Uriuhara, H. Kojima, K. Suzuki, H. Miyazaki, Y. Yamashita, K. Inaba, M. Kasuga, "Relation between serum 3-deoxyglucosone and development of diabetic microangiopathy", *Diabetes Care* 26 (2003) 1889-1894.

II.2.3. Discusión del artículo científico 4

Optimización de la reacción de derivatización

A pesar de que la optimización de las variables físico-químicas que afectan a la reacción de derivatización ya había sido previamente realizada por nuestro grupo de investigación, al iniciar este estudio nos pareció oportuno comprobar cómo se comportaban los compuestos α -dicarbonílicos de cadena larga en estas condiciones. Con este fin, se evaluaron de nuevo la temperatura, el tiempo de reacción, el exceso de reactivo derivatizante y el pH del medio. Para estos estudios se utilizó el área de pico como señal analítica, empleando las condiciones cromatográficas previamente optimizadas para su separación, y que se encuentran descritas en la Sección 2.3 del artículo científico 4.

El estudio previo de la influencia del pH, puso de manifiesto que la velocidad de la reacción y la formación de los derivados no se afectan en un intervalo de pH comprendido entre 3,5 y 7. Sin embargo, la degradación del TRI es altamente dependiente del pH del medio, comprobándose que la formación de posibles subproductos que coeluyen con los derivados de interés se restringía en medios relativamente ácidos. En el estudio de la influencia de la concentración de HCl sobre las reacciones de derivatización se observaron dos tipos de comportamiento, los cuales se muestran en la Figura II.8 ejemplificados con la formación de los derivados del Gly y la 3-DG.

Por una parte, la formación de los derivados de Gly, MGly, DIA y 2,3-Pen no se ve afectada por la concentración de HCl en un intervalo comprendido entre 0-0,1 M, disminuyendo para concentraciones superiores. Sin embargo, el área de pico correspondiente al derivado de la 3-DG disminuye drásticamente en presencia de bajas concentraciones de este ácido, al igual que las áreas correspondientes a los derivados de GS y al PhGly, para estabilizarse posteriormente a medida que la concentración de HCl en el medio aumenta.

A la vista de este comportamiento tan diferente, y como situación de compromiso, decidimos seleccionar como concentración óptima de HCl 0,05 M y preparar la disolución de TRI en presencia de este ácido, para evitar en la medida de lo posible la descomposición del reactivo derivatizante sin perder mucha sensibilidad en la determinación de los compuestos de interés. No obstante, la acidez del medio

fijada no fue suficiente como para evitar completamente la degradación del TRI, por lo que se recurrió a preparar la disolución de TRI en presencia de β -ME.

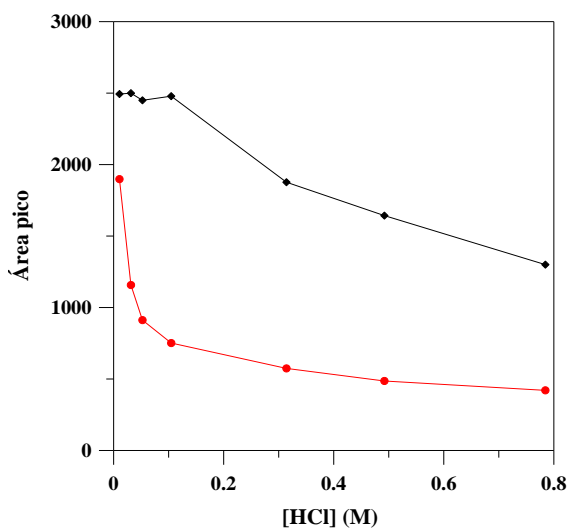


Figura II.8. Influencia de la concentración de HCl en la formación de los derivados Gly-TRI (—◆—) y 3-DG-TRI (—●—). $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 275/437 nm.

En cuanto a la influencia de la temperatura, estudiada entre 60-95 °C, y del tiempo de calentamiento (entre 20-90 min), se observó que en todos los casos el área de pico aumentaba a medida que lo hacían ambos parámetros, como se muestra, de forma representativa para la formación del derivado del Gly, en la Figura II.9A. Sin embargo, en el caso del DIA (Figura II.9B) y la 2,3-Pen, cuando la reacción se lleva a cabo a 95 °C, tiene lugar una disminución en la formación del derivado a un tiempo de reacción superior a 60 min. Para evitar esta situación, se seleccionaron como valores óptimos de temperatura y tiempo de calentamiento 85 °C y 60 min, respectivamente.

Finalmente, se estableció un exceso de TRI de 50 frente a la concentración total de compuestos α -dicarboxílicos ya que, a pesar de que algunos compuestos necesitan menos cantidad para alcanzar el rendimiento de reacción, la 2,3-Pen requiere más concentración de TRI, como se muestra en la Figura II.10.

En estas condiciones se observa la formación de un único derivado para cada uno de los compuestos α -dicarboxílicos estudiados, a excepción del PhGly, que da

lugar a la formación de dos derivados pteridínicos, cuyas características espectrales, al igual de las del resto de derivados, han sido ampliamente comentadas en el artículo científico 4.

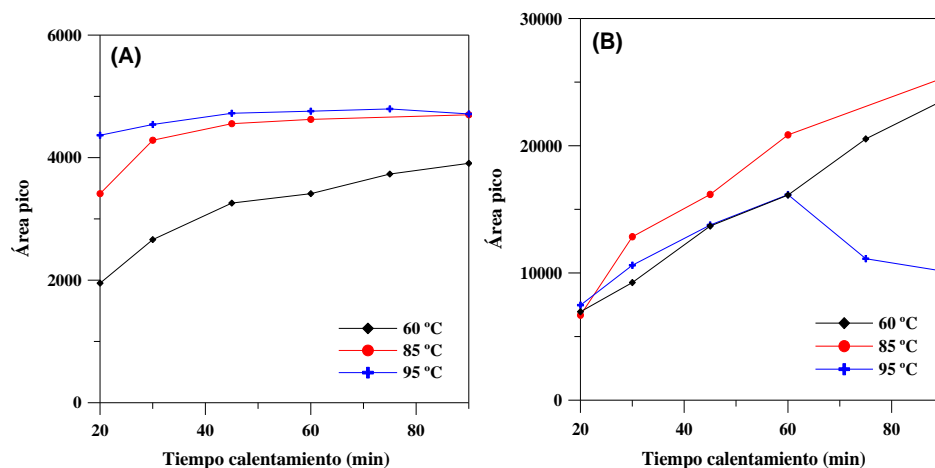


Figura II.9. Influencia de la temperatura y del tiempo de reacción sobre la formación del derivado (A) Gly-TRI y (B) DIA-TRI. $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 275/437 nm.

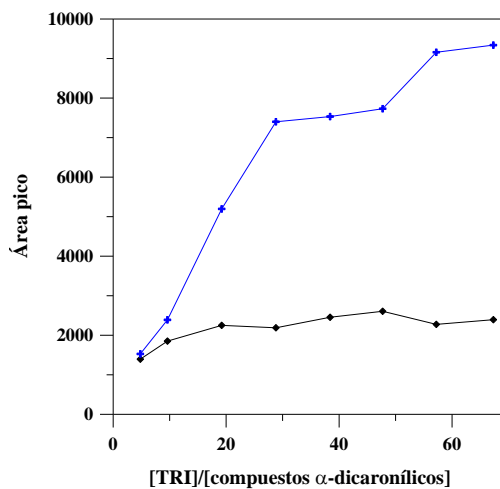


Figura II.10. Influencia del exceso de concentración de TRI sobre la formación de los derivados Gly-TRI (—◆—) y 2,3-Pen-TRI(—+—). $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 275/437 nm.

Análisis de orina

Las condiciones iniciales establecidas para la separación cromatográfica usando patrones de calibración no proporcionaron buenos resultados en el análisis de las muestras de orina, ya que se producía la coelución de algunos compuestos presentes en la matriz junto con algunos de los analitos de interés, principalmente con los derivados del Gly y 3-DG, como se muestra en la Figura II.11.

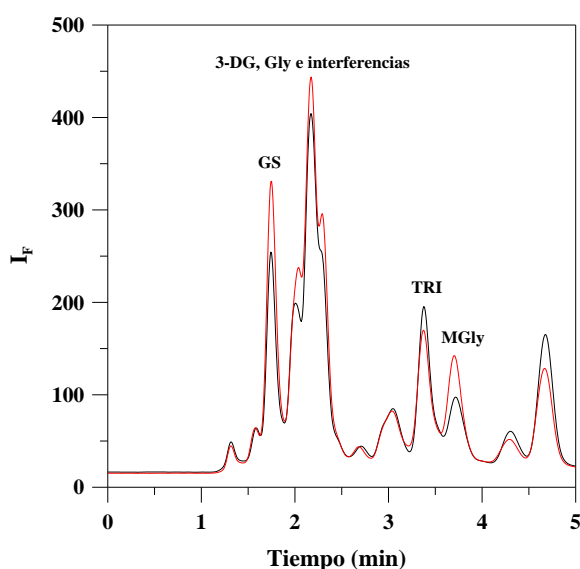


Figura II.11. Cromatogramas correspondientes a una muestra de orina derivatizada (—), y contaminada con GS, 3-DG, Gly, MGly y DIA y derivatizada (—). [TRI] = $1,30 \times 10^{-4}$ M (en 50 mM HCl y 200 mM β -ME), 60 min; T = 85 °C. $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 275/437 nm.

Como los picos más solapados son los que presentan menor tiempo de retención, y con el objeto de aumentar el factor de capacidad de estos compuestos, se varió ligeramente la composición de la fase móvil aumentando su polaridad y la concentración de ácido. La fase móvil seleccionada como óptima para el análisis de estos compuestos en muestras de orina fue ácido fosfórico (0,8 mM)/acetonitrilo, 99:1 (v/v).

En estas nuevas condiciones se consiguieron resolver a línea base los picos de los analitos menos retenidos. Sin embargo, el pico correspondiente al MGly solapaba

ligeramente con el de otro compuesto. Puesto que el efecto de la temperatura puede ser crítico en la separación de sustancias muy similares, se llevó a cabo un estudio de la influencia de esta variable sobre los tiempos de retención y los factores de capacidad de los compuestos, en un rango comprendido entre 10 y 30 °C. Para ello, la temperatura de la columna se mantuvo constante mediante el empleo de un baño termostático con un sistema de recirculación de agua. Se observó que la resolución entre los picos disminuía a medida que aumentaba la temperatura, por lo que se seleccionó una temperatura de trabajo de 15 °C. En estas condiciones, todos los picos correspondientes a los derivados de interés salen perfectamente definidos y separados de los correspondientes a otros presentes en la orina humana.

Otro inconveniente añadido a la hora de llevar a cabo la aplicación propuesta fue que la orina contiene pteridinas de forma natural. Éstas suelen estar presentes en formas reducidas no fluorescentes, sin embargo, cuando las muestras de orina son derivatizadas bajo las condiciones optimizadas, pueden transformarse en su forma oxidada, las cuales son fluorescentes y, por tanto, pueden actuar como posibles interferencias en el análisis de los compuestos α -dicarbonílicos. Ejemplos de pteridinas interferentes presentes en la orina es el pterin y el 6-metilpterin, ya que coinciden con el derivado pteridínico formado por la reacción entre el TRI y el Gly o el MGly, respectivamente. Con el fin de eliminar dichas interferencias, se optimizó un paso de limpieza de las muestras de orina mediante una extracción en fase sólida previo a la derivatización y análisis de las mismas.

Estudios anteriores realizados por nuestro grupo de investigación pusieron de manifiesto que los cartuchos ISOLUTE ENV+ (cuya composición es un copolímero de poliestireno y divinilbenceno hidroxilado) se pueden utilizar con este fin debido a su capacidad para retener compuestos polares solubles en agua. En este caso, las pteridinas presentan una polaridad mayor que los compuestos α -dicarbonílicos y, cuando las muestras de orina se pasan a través del cartucho, quedan retenidas, mientras que los compuestos de interés son eluidos prácticamente en su totalidad, aunque pueden quedar parcialmente retenidos en él. Por este motivo, se ensayaron diferentes disolventes como acetonitrilo, metanol y agua ultrapura para completar la elución, siendo el agua el más apropiado al proporcionar recuperaciones próximas al 100% en todos los casos. Además, presenta la ventaja de que no es necesario un paso de eliminación de disolvente orgánico antes de la reacción de derivatización. Una vez

que los compuestos α -dicarbonílicos han sido completamente eluidos de los cartuchos, son derivatizados y analizados mediante el método cromatográfico propuesto.

En la Figura 2A del artículo científico 4 se muestran dos cromatogramas, correspondientes a muestras de orina no derivatizadas, antes y después de ser sometidas al proceso de limpieza mediante SPE finalmente optimizado, el cual se explica de forma detallada en el artículo. Como puede observarse en ella, el cromatograma obtenido presenta picos correspondientes a las pteridinas naturales presentes en la orina que interfieren en el análisis de nuestros compuestos de interés. No obstante, estas son completamente eliminadas tras la limpieza con el cartucho ISOLUTE ENV+.

Una vez optimizado todo el procedimiento, se procedió a su aplicación en muestras de orina, observándose que, de los siete compuestos α -dicarbonílicos estudiados, únicamente 4 de ellos se encuentran presentes en este fluido biológico: GS, 3-DG, Gly y MGly.

Los contenidos de estos metabolitos en orina se deben calcular respecto a un compuesto de referencia existente en la misma, para corregir las variaciones diarias que se producen en el volumen de orina excretado, evitando así la necesidad de recolectar las orinas de 24 horas. En análisis clínico, la creatinina, subproducto de la creatina, es el mejor patrón interno natural para normalizar la excreción de la mayoría de los metabolitos en orina, ya que su tasa de excreción diaria es casi constante para un individuo. A pesar de que es interesante poder analizar este compuesto y los metabolitos de interés en la misma alícuota de orina y empleando la misma técnica, para poder minimizar así los posibles errores cometidos en la determinación, en nuestro caso no fue posible debido a que la creatinina queda retenida en los cartuchos ISOLUTE ENV+, por lo que se recurrió a un método tradicional rápido y eficaz para cuantificarla, el cual ha sido descrito detalladamente en el artículo científico 4.

Una vez optimizadas la separación cromatográfica y la SPE para asegurar la ausencia de interferencias en la orina, se llevó a cabo el análisis de GS, 3-DG, Gly y MGly en orina de 9 personas sanas de ambos sexos y diferentes edades, así como de 2 pacientes con diabetes mellitus. Pese a que los datos que se presentan en este

artículo en cuanto al análisis de muestras de orina procedentes de pacientes con esta enfermedad son insuficientes a la hora de realizar una extrapolación de los resultados, en ellos se refleja que los niveles de todos los compuestos α -dicarbonílicos estudiados son superiores en las muestras procedentes de pacientes con diabetes que en las procedentes de pacientes sanos, lo que está de acuerdo con la información encontrada en la bibliografía.

**II.3. Estudio de derivados lumazínicos de compuestos
 α -dicarbonílicos en diferentes columnas
cromatográficas. Análisis de dichos
compuestos en muestras de vino**

II.3.1. Introducción al artículo científico 5

Como se ha puesto de manifiesto anteriormente, en la bibliografía se encuentran descritos una gran variedad de métodos de análisis para la determinación de compuestos α -dicarbonílicos en muestras alimenticias y en diferentes tipos de bebidas. En este apartado, con este fin, se plantea el desarrollo de un método cromatográfico con detección fluorescente, previa derivatización a compuestos lumazínicos, en diferentes tipos de vinos.

Los compuestos α -dicarbonílicos tienen importancia en el aroma del vino debido a su impacto sensorial y a su reactividad con otros componentes del mismo. Existen dos posibles fuentes de compuestos α -dicarbonílicos en el vino que son capaces de generar la reacción de Strecker. Por una parte se encuentran las orto-quinonas provenientes de la oxidación de orto-difenoles y, en segundo lugar, los compuestos α -dicarbonílicos que se dan de forma natural en el vino y cuyos principales representantes son: Gly, MGly, DIA y 2,3-Pen. Estos compuestos se encuentran en todos los tipos de vinos, aunque existen en mayores concentraciones en los vinos tintos debido, en gran parte, a la fermentación maloláctica [1], y en los vinos blancos dulces producidos a partir de uvas botritizadas, los cuales pueden contener niveles elevados de Gly y MGly [2].

Durante la fermentación maloláctica tiene lugar la descarboxilación, por acción de las bacterias lácticas como *Saccharomyces cerevisiae* y *Oenococcus oeni* (*Leuconostoc oenos*), entre otras, del ácido málico en ácido láctico y CO_2 , produciéndose, por tanto, una disminución de la acidez total. El mecanismo que tiene lugar es aquel en el que se produce una primera deshidrogenación, que lleva a la formación de ácido oxalacético, una posterior descarboxilación que conduce a la formación de ácido pirúvico y, finalmente, una reducción de éste hasta ácido láctico, reacción en la que se utiliza el hidrógeno liberado en la primera deshidrogenación y en la que interviene una enzima deshidrogenasa láctica. Este proceso es dependiente de varios factores como la temperatura y el pH del medio, así como del contenido de etanol y SO_2 [3], y se da en mucha mayor medida en vinos tintos que en blancos, probablemente porque los primeros contienen una mayor cantidad de compuestos fenólicos y taninos que afectan al crecimiento y metabolismo de las bacterias responsables de esta fermentación [4].

A diferencia de la fermentación alcohólica, la fermentación maloláctica, que normalmente ocurre después de la terminación de la primera [5], es un proceso relativamente lento que a menudo puede necesitar varios meses para completarse. Considerando que la fermentación alcohólica es un proceso microbiológico esencial para la conversión del zumo de uva en vino, la fermentación maloláctica puede o no puede ser deseable, dependiendo del tipo de vino y el momento en que ocurre. Para vinos comerciales, puede ser ventajosa ya que resulta en una disminución de su acidez y puede mejorar su calidad sensorial y su estabilidad microbiológica [6-8]. Sin embargo, esta fermentación generalmente no es deseada en los vinos blancos afrutados donde pueden disminuir la frutalidad y nunca es apropiada en los vinos después del embotellado puesto que conduce a su efervescencia y a la formación de turbidez. Adicionalmente, la disminución en la acidez de los vinos elaborados con uvas que de antemano sean poco ácidas puede ser perjudicial para su calidad.

Durante este proceso, el ácido cítrico también es metabolizado por la bacteria *Oenococcus oeni*, formando como uno de los principales productos el DIA, que es considerado uno de los más importantes responsables de las cualidades organolépticas del vino, confiriéndole un sabor mantecoso o a nuez. Nielsen y Richelieu [5] establecieron que la concentración máxima de DIA en un vino es fuertemente dependiente de la concentración de oxígeno y el potencial redox de éste y, en menor medida, de la concentración inicial de ácido cítrico. Así, éste es descompuesto en una primera reacción por la enzima citratoliasa a los ácidos acético y oxalacético, y éste último, tras una descarboxilación en la que participa el enzima oxalacetato descarboxilasa, se convierte en pirúvico y CO₂. Este piruvato es el punto de partida de otras rutas metabólicas que llevan a la formación de acetaldehído, acetoína y diacetilo.

Por otra parte, Pripis-Nicolau y col. [9] estudiaron los principales productos de reacción formados a partir de ciertos aminoácidos y compuestos α -dicarbonílicos en soluciones de vino sintéticas, obteniendo aldehídos, tales como metional, 2-metilpropanal, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal, y fenilacetaldehído, característicos por mostrar aromas de alteración y umbrales de percepción particularmente bajos.

El análisis de compuestos α -dicarbonílicos, tanto en muestras biológicas como en alimentos, se ha llevado a cabo predominantemente mediante cromatografía líquida clásica, empleando en todos los casos columnas empaquetadas con partículas

C18 de 5 μm de diámetro. Como ya se ha comentado en la Introducción de esta parte de la Memoria, actualmente este tipo de columnas están siendo sustituidas por otras de menor tamaño de partícula que ofrecen mayores ventajas, por lo que en este caso nos propusimos optimizar las condiciones cromatográficas para la separación de los derivados formados para diferentes tipos de columnas cromatográficas que incluyen la mencionada anteriormente, una columna con partículas porosas de 1,8 μm de diámetro y una columna de núcleo sólido. Los resultados obtenidos se plasman en el **artículo científico 5**, que se presenta a continuación.

Bibliografía

- [1] C.R. Davis, D. Wibowo, R. Eschenbruch, T.H. Lee, G.H. Fleet, "Practical implications of malolactic fermentation: A review", *Am. J. Enol. Vitic.* 36 (1985) 290-301.
- [2] I. Guillou, A. Bertrand, G. De Revel, J.C. Barbe, "Occurrence of hydroxypropanedial in certain musts and wines", *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 3382-3386.
- [3] C. Knoll, S. Fritsch, S. Schnell, M. Grossmann, D. Rauhut, M. du Toit, "Influence of pH and ethanol on malolactic fermentation and volatile aroma compound composition in white wines", *LWT - Food Sci. Technol.* 44 (2011) 2077-2086.
- [4] N. Vivas, A. Lonvaud-Funel, Y. Glories, "Effect of phenolic acids and anthocyanins on growth, viability and malolactic activity of a lactic acid bacterium", *Food Microbiol.* 14 (1997) 291-300.
- [5] J.C. Nielsen, M. Richelieu, "Control of flavor development in wine during and after Malolactic Fermentation by *Oenococcus oeni*", *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (1999) 740-745.
- [6] M.H. Laurent, T. Henick-Kling, T.E. Acree, "Changes in the aroma and odor of Chardonnay due to malolactic fermentation", *Vitic. Enol. Sci.* 49 (1994) 3-10.
- [7] C.G. Edwards, R.B. Beelman, "Inducing malolactic fermentation in wines", *Biotech. Adv.* 7 (1989) 333-360.
- [8] R. Flamini, G. De Luca, R. Di Stefano, "Changes in carbonyl compounds in Chardonnay and Cabernet Sauvignon wines as a consequence of malolactic fermentation", *Vitis* 41 (2002) 107-112.
- [9] L. Pripis-Nicolau, G. De Revel, A. Bertrand, A. Maujean, "Formation of flavor components by the reaction of amino acid and carbonyl compounds in mild conditions", *J. Agr. Food Chem.* 48 (2000) 3761-3766.

11.3.2. Artículo científico 5

Journal of Agricultural of Food Chemistry, 62 (2014) 97-106

“Evaluation of liquid chromatographic behavior of lumazinic derivatives, from α -dicarbonyl compounds, in different C18 columns: Application to wine samples using a fused-core column and fluorescence detection”

María del Carmen Hurtado-Sánchez, Anunciación Espinosa-Mansilla, María Isabel Rodríguez-Cáceres, Isabel Durán-Merás

Abstract

Several C18 columns, packed with totally porous particles of different sizes and shell thicknesses, have been compared for simultaneous determination of α -dicarbonyl compounds, previous derivatization to lumazinic derivatives. Chromatographic conditions for the separation have been optimized for each column, and chromatographic parameters have been calculated and exhaustively compared. A core-shell C18 column provided the best results, and a HPLC method with fluorimetric detection has been proposed. The developed method has been validated in terms of linearity, precision, and sensitivity. Detection and quantification limits obtained were comprised between 0.2 and 2.5 and 0.8 and 1.3 ng mL⁻¹, respectively, while RSD values obtained were lower than 6% and 5% in intraday and interday repeatability studies, respectively. The method has been applied to analysis of the α -dicarbonyl compounds in different types of wines. The higher levels of the total α -dicarbonyl compounds were found in sweet wines and the lower levels in white wines.

Keywords: *α -Dicarbonyl compounds, Lumazinic derivatives, C18 columns, Fluorescence detection, Wine samples.*

1. Introduction

α -Dicarbonyl compounds are reactive intermediates formed in physiological systems by lipid peroxidation of polyunsaturated fatty acids [1,2] and in biological systems through the Maillard reaction by degradation of sugars [3,4]. In processed foods, these compounds are formed from carbohydrates during thermal processing in the course of the Maillard reaction, and they are also important compounds present in food products obtained by fermentation processes, such as wine. In this matrix, α -dicarbonyl compounds are formed as a consequence of the malolactic fermentation, a process that can occur after or simultaneously with alcoholic fermentation. During malolactic fermentation decarboxylation of L-malic acid takes place, and in consequence, acidity levels are reduced and several compounds related with the aroma and flavors are formed [5,6]. Among the identified formed compounds, dicarbonyl compounds with a short chain such as diacetyl (DIA), glyoxal (Gly), methylglyoxal (MGly), 2,3-pentanedione (2,3-Pen), and phenylglyoxal (PhGly) are included [5-7]. These compounds are present in all types of wines, with levels higher in red wines [8], and these concentrations are increased during age [9]. They play an important role in wines because they have a great influence on flavor and sensory characteristics. Specifically, DIA and 2,3-Pen are the most important compounds in the aroma of wines, and DIA is responsible for the buttery flavor of certain wines [10]. In addition, α -dicarbonyl compounds present reactivity with other components, which contribute to the loss of nutritional quality and increment production of toxic compounds in the wine [11]. Glucosones, such as glucosone (GS) and 3-deoxyglucosone (3-DG), are α -dicarbonyl compounds with a C-6 backbone, which can be also formed from hexoses through monosaccharide autoxidation [12]. To date, to our knowledge, no data about the quantities of these compounds in wines have been reported.

A number of methods have been developed for determination of α -dicarbonyl compounds in several matrices such as biological samples and processed and fermented foods, and the HPLC method is the most common. The more frequent derivatization reaction is formation of quinoxaline derivatives, and different diaminobenzenes have been proposed as derivatizing reagents: 2,4-dinitrophenylhydrazine [13], 1,2-diaminobenzene [14] and 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene [15,16]. Other reagents used have been 6-hydroxy-1,2,3-triaminopyrimidine [17,18],

2,3-diamino-naphthalene [19], or 5,6-diamino-2,4-dihydropyrimidine [20]. For analysis of these compounds in wine samples, methods such as gas chromatography with a mass-selective detector (GC-MS) [21] or a thermoionic detector (GC-NPD) [22] have been proposed as alternative techniques. However, the methodology more frequently used is based on formation of quinoxaline derivatives and analysis by reversed phase-liquid chromatography (RP-LC) with photometric detection [22-24]. All HPLC methods employ C18 columns with particles of 5 μm for chromatographic separation of the corresponding derivatives [25]. In this point, development of packed columns with smaller particle diameter to work in reverse phase could improve analysis in terms of separation efficiency and also in terms of reduction of the analysis time, which is an important factor to take into account. In this way, columns packed with core-shell and totally porous sub-2 μm particles have been most frequently employed in qualitative and quantitative analysis [26].

The efficiency of a packed column is described by the Deemter's plate height model [27], which explains the variation of this parameter with the linear velocity. The key concept of porous shell (or fused-core) particles is to increase both efficiency and separation velocity by reducing the mass transfer (C term in the van Deemter curve) [28]. This is possible because it has a silica core that allows keeping their diameter large enough to avoid pressure limitations at high linear velocities. This type of column is constituted by a solid silica core of 1.7 μm in size with a porous outer layer 0.5 μm thick and a total particle size of 2.7 μm . On the other hand, packing of columns with porous sub-2 μm particles consist of derivatized, high purity porous-silica microspheres having reproducible bonded monolayers. The rigidity and extremely narrow particle-size distribution of totally porous particles allow high-resolution and fastest analysis since operation at high flow rates is possible. However, this column has the disadvantage that usually an ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) system is required to achieve the best results, while a fused core column allows fast separation on a conventional LC system, without significant loss in efficiency or resolution [29]. In the past decade, comparative studies about the separation of compounds in columns with different particle size, such as pharmaceutical compounds [30] or aflatoxins [29], among others, have been realized by several authors, and in all cases, they concluded that columns with small particle size achieve major separation efficiency and improve the analytical method developed. On the other hand, core-shell columns have been compared with

sub-2 μm porous particles columns in pharmaceutical compound analysis [31], and a higher capacity of the core-shell columns to accomplish better separation efficiency under the same operation conditions was demonstrated.

The present paper is focused in two ways: first, to investigate the chromatographic behavior, in different packed columns, of the lumazinic derivatives formed from α -dicarbonyl compounds, in order to explore the advantages of columns with core-shell and minor particle size in analysis of these compounds; second, apply the obtained results in development of a simple, rapid, and competitive method to determine these compounds in different types of wines.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals, standards and samples

DIA, 2,3-Pen, and PhGly, all of 97% purity, and aqueous solutions of Gly and MGly, 40% purity, were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). GS (98%) and 3-DG (95%) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (California, USA). Stock standard solutions of 3-DG ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), GS ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$), and PhGly ($135 \mu\text{g mL}^{-1}$) were prepared by dissolving in ultrapure water adequate amounts of the powder presentation of each compound. Stock solutions of DIA ($600 \mu\text{g mL}^{-1}$), 2,3-Pen ($150 \mu\text{g mL}^{-1}$), Gly ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), and MGly ($70 \mu\text{g mL}^{-1}$) were prepared by weighting and dilution of the adequate aliquots in ultrapure water. Stock analyte solutions were prepared separately and stored at 4 °C. Working standard mixture solutions were daily prepared by suitable dilution of stock analyte solutions with ultrapure water. 5,6-Diamino-2,4-dihydropyrimidine sulfate (DDP) (95%) was purchased from Sigma-Aldrich, and a 8.6 mM stock solution was daily prepared by dissolving adequate amounts in ultrapure water containing 200 mM β -mercaptoethanol (β -ME), also provided from Sigma-Aldrich. Ammonia/ammonium chloride buffer was prepared by dissolving ammonium chloride from Panreac (Barcelona, Spain) in ultrapure water and fixing the pH at 10.0 with ammonia (Panreac). Phosphoric acid (85%) was provided by Scharlau (Barcelona, Spain), acetic acid (95.5%) by Romil Chemical LTD (Cambridge, England), and formic acid (98%) by Fluka (Seelze, Germany). Different solutions of pH between 2.9 and 4.0 were prepared by dilution of an adequate volume of concentrated acid in ultrapure water. Methanol (MeOH), HPLC grade, was purchased

from Panreac. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q water system (Millipore S.A.S., Molsheim, France). Wines analyzed were acquired from local markets and kept at 4 °C, avoiding exposure to direct light. Specifically, red wines (Monasterio de Tentudia, Ribera del Duero, and Merlot), white wines (Rioja Comportillo, Viña Canchal, and Manzanilla), red sweet wines (Vin Santo and Port Tawny), and white sweet wines (Málaga Dulce and Oremus Tokaji) were purchased. Most of them are from Spain, with the exception of red sweet wines (from Italy and Portugal) and Oremus Tokaji wine (from Hungary).

2.2. Instrumentation and software

Chromatographic studies were performed on an Agilent model 1100 LC instrument (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), equipped with an online degasser, quaternary pump, manual six-way injection valve, UV-Visible diode-array detector, rapid scan fluorescence spectrophotometer detector, and the Chemstation software package to control the instrument, data acquisition, and data analysis. Chromatographic studies and analytical separation were carried out in columns purchased from Agilent. The column temperature was controlled by a coil with recirculating water, in which the temperature was selected through a thermostatic bath. The injection volume was set at 20 μL for the Zorbax-Eclipse XDB C18 column and at 10 μL for columns with minor particle size. The flow rate was 1 mL min^{-1} for Eclipse columns and 0.5 mL min^{-1} for the Poroshell column. Detection was performed with a fluorimetric detector at 450 nm, exciting at 270, 330, and 350 nm.

A Crison MicropH 501 m (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 [32], in MATLAB code.

2.3. General procedure: calibration curves

To build the calibration curves, aliquots of each α -dicarbonyl compound in variable volume were placed in 25 mL volumetric flasks, and 0.125 mL of ammonia/ammonium chloride buffer (0.5 M, pH = 10) and 1.5 mL of 8.6 mM DDP

solution containing 200 mM β -ME were added. After 30 min at 60 °C, solutions were cooled in ice water and diluted with 0.4 mM phosphoric acid solution (pH 3.2) up to the mark. Resulting solutions were filtered through a 0.22 μ m nylon filter, and aliquots of 10 μ L were injected in the chromatographic system. Separation was performed with a Poroshell 120 column, employing a solution of 0.4 mM phosphoric acid solution (pH 3.2)/MeOH (95:5, v/v) (eluent A) and MeOH (eluent B) as mobile phase, with the following gradient mode: 0-5 min, 0% B; 5-13 min, 30% B; 13-13.5 min, 40% B. These conditions were maintained until 25 min, and finally, the eluent B content was decreased to the initial conditions (0% B) and the column was re-equilibrated for 5 min. The eluate was fluorimetrically monitored at 450 nm (exciting at 270, 330, and 350 nm), and peak areas were used as analytical signal. Three replicas of each standard were used. Temperature was fixed at 25 °C, and a flow rate of 0.5 mL min⁻¹ was employed.

2.4. Analysis of α -dicarbonyl compounds in wine samples

Analysis of the α -dicarbonyl compounds in red, white, and sweet wines was carried out by the standard addition method. For each wine sample, adequate volumes were added in a 25 mL volumetric flask. Increasing volumes of a standard mixture of the dicarbonyl compounds were added, and the general procedure was followed for the derivatization step. Separation of derivatives was carried out in a Poroshell 120 column thermostated at 25 °C. A mobile phase composed of 0.4 mM phosphoric acid solution (pH 3.2)/MeOH (95:5, v/v) (eluent A) and MeOH (eluent B) was employed by following the same gradient mode described in section below. Fluorescence excitation/emission wavelengths of 330/450 nm were employed.

3. Results and discussion

The first aim of this work is to realize a comparative study of the chromatographic behavior of the lumazinic derivatives from α -dicarbonyl compounds using three different C18 columns. In any case, the focus was to obtain baseline separation of all compounds in the shortest time and with the lowest solvent consumption as possible in order to achieve a simple, a fast, and an environmental

friendly method, susceptible of being applied to analysis of these compounds in wine samples.

3.1. Formation of lumazinic derivatives

The most extensively applied methods in wine analysis for control of α -dicarbonyl compounds levels are based on reaction with 1,2-diaminobenzene to form quinoxaline derivatives that can be determined by HPLC with UV detection at 313 nm [22], fluorimetric detection exciting at 350 nm [33], or GC with a MS or NPD detector [34]. These derivatization reactions need high temperatures and reaction times close to 3 h. In this paper, DDP is proposed as derivatizing reagent in order to simplify the derivatization reaction. Optimization of the conditions for formation of the lumazinic derivatives for Gly and MGly was described in previous work [20]. In this work, the use of DDP as derivatizing reagent was expanded to the seven α -dicarbonyl compounds that can be present in wine samples. The scheme of the derivatization reaction is shown in Fig. 1.

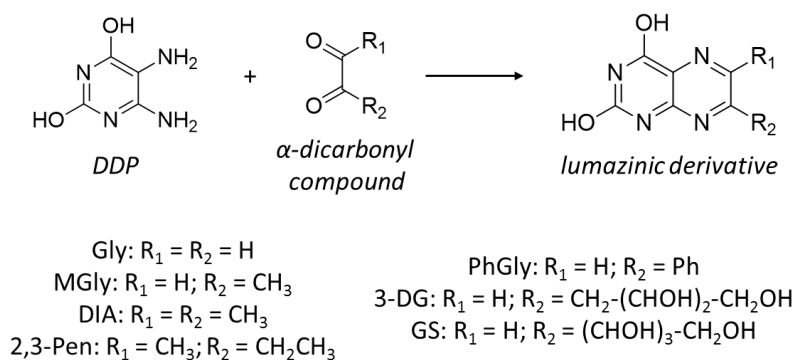


Figure 1. Derivatization reaction of α -dicarbonyl compounds with 5,6-diamino-2,4-dihydroxypyrimidine (DDP) to yield the corresponding lumazinic derivatives.

The physicochemical variables that influence the yield and reaction rate, such as pH, temperature, reaction time, and DDP excess, were studied chromatographically by monitoring the derivatization reaction. In accordance with previous studies, the yield of the reaction of α -dicarbonyl compounds with DDP was optimal at pH 10, and

this value was fixed in all solutions with 0.125 mL of ammonia/ammonium chloride buffer (0.5 M). Temperature and reaction time are two very important parameters that influence in the DDP-dicarbonyl compound reaction rates. For this reason, a series of standard mixture solutions containing 1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ GS, 400.0 ng mL^{-1} 3-DG, 100.0 ng mL^{-1} Gly, 100.0 ng mL^{-1} MGly, 100.0 ng mL^{-1} DIA, 120.0 ng mL^{-1} 2,3-Pen, 500.0 ng mL^{-1} PhGly, and DDP solution (7.5×10^{-2} mM) (concentrations enough so that all obtained derivatives provide a good signal, easily measurable, and whose variations are detectable, when the conditions of the reaction are changed) were placed in 25 mL volumetric flasks at pH 10 and incubated at 45, 60, and 80 °C during several heating times in the range 2-60 min. After completing the reaction times, the flasks were cooled in ice water and made to volume with 0.4 mM phosphoric acid (pH 3.2), and aliquots of 10 μL of these solutions were injected in the chromatographic system. For all α -dicarbonyl compounds, except for DIA and PhGly, the peak area of the derivatives increased with temperature and is maintained constant between 60 and 80 °C. The peak area of DIA and PhGly derivatives increased up to 60 °C, and for higher temperatures, the signal decreases. Finally, we selected 60 °C as the optimum heating temperature.

With respect to the heating time, the peak area of the seven lumazinic derivatives increased up to 15 min. However, the reaction rate for formation of GS and 3-DG lumazinic derivatives is more dependent on the heating time, and after 60 min, these reactions had not been completed. With the object of not extending the total time of the derivatization reactions, a compromise value of 30 min was selected as optimum.

In the optimized conditions of temperature and reaction time, the DDP/total α -dicarbonyl compounds ratio was studied in a range between 10:1 and 70:1. For all compounds a 10:1 ratio was enough to obtain the maxima signal; however, for GS and DIA a 30:1 ratio was necessary, and this relation was chosen as optimum. Studies carried out showed that in the derivatization conditions DDP is degraded into several products, with the object of minimizing the appearance of degradation products that can interfere in the analysis of some of the lumazinic derivatives, and in accordance with previous research [14,18] β -ME is added to the DDP solution. The influence of this reagent in the stabilization of DDP has been studied by preparing DDP solutions (0.8 mM) in the presence of different concentrations of β -ME (200, 400, and 600

mM). Aliquots of each solution were placed in a 25 mL volumetric flask, heated at 60 °C for 30 min at pH 10, diluted with 0.4 mM phosphoric acid (pH = 3.2) until the mark, and injected into the chromatographic system. It can be observed that degradation of DDP was avoided in the same extension, independent of the concentration of β -ME employed. Therefore, a solution of DDP was prepared in the presence in 200 mM of this compound. Fig. 2A shows the chromatograms of a DDP solution in the presence and in the absence of 200 mM β -ME, and it can be observed that, in the presence of β -ME, degradation of the reagent is practically avoided and signal decreases.

In Fig. 2B, a representative chromatogram from lumazinic derivatives obtained in physicochemical-optimized conditions is shown. As can be seen, all α -dicarbonyl compounds become a single lumazinic derivative, except 2,3-Pen and PhGly, which form two derivatives. For unequivocal identification of the derivatives, a comparison of the retention time of Gly derivative with a reference standard of lumazine was done. A standard solution containing 50 ng mL⁻¹ of lumazine was injected in the chromatographic system, in the conditions previously described. As expected, retention time and excitation spectra of both peaks are coincident, and this allows confirmation of formation of the lumazinic derivatives.

Spectral characteristics of all derivatives were studied in order to achieve higher sensitivity in their analysis, and excitation and emission spectra were obtained for each peak (Fig. 2C). All of them, except the PhGly derivatives, presented excitation and emission wavelengths characteristics of the lumazines at 330 and 475 nm, respectively. Also, the two derivatives of 2,3-Pen have identical spectral characteristics, with excitation and emission wavelengths at 330 and 475 nm, respectively, and both are formed in similar extension, as can be seen in the chromatogram shown in Fig. 2B, where the peak areas of the two derivatives are similar. In the case of the PhGly derivatives, its spectral characteristics are different.

Thus, the lumazinic derivative with minor elution time (PhGly 1) presents excitation and emission wavelengths at 270 and 420 nm, respectively, while the other derivative (PhGly 2) shows excitation at 355 nm and emission at 410 nm. On the other hand, in this case formation of one of the derivatives (PhGly 2) is more favorable than the other, probably due to steric impediments.

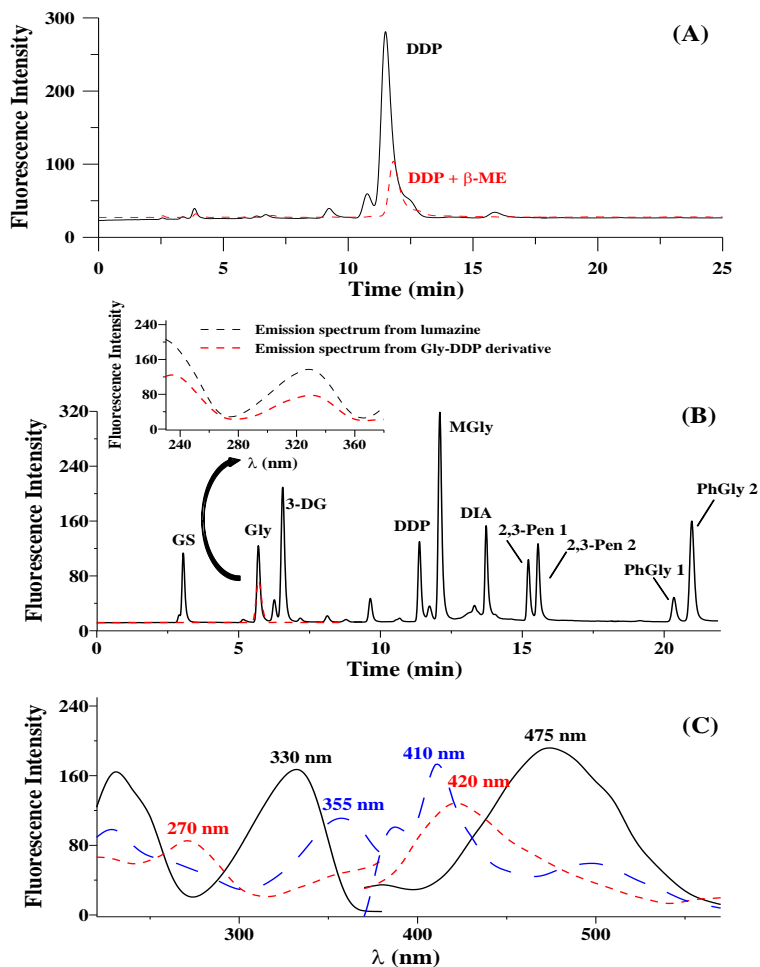


Figure 2. (A) Influence of the presence of β -ME in the degradation process of DDP in the derivatization reaction conditions. Chromatograms correspond to a DDP solution (7.5×10^{-2} mM) in the absence of β -ME (continuous line) and in the presence of 200 mM of β -ME (dashed line). $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 330/450$ nm. (B) HPLC/FLD chromatograms from a stock standard solution of the α -dicarbonyl compounds in the presence of DDP solution (7.5×10^{-2} mM) at pH 10, derivatized in optimized conditions (heating for 30 min at 60 °C) (continuous line), and of a standard solution of lumazine, 50 ng mL^{-1} (dashed line). $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 330/450$ nm. [GS] = $1.0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, [3-DG] = 400.0 ng mL^{-1} , [Gly] = 100.0 ng mL^{-1} , [MGly] = 100.0 ng mL^{-1} , [DIA] = 100.0 ng mL^{-1} , [2,3-Pen] = 120.0 ng mL^{-1} , and [PhGly] = 500.0 ng mL^{-1} . (C) Excitation and emission spectra of lumazinic derivatives GS, 3-DG, Gly, MGly, DIA, and 2,3-Pen (—), PhGly 1 (----), and PhGly 2 (---).

Table 1. Column Characteristics and Optimum Chromatographic Parameters for Each Column.

Column	Mobile Phase	Gradient mode	Other parameters
Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 mm x 4.6 mm, 5.6 μm)	- 40 mM H ₃ PO ₄ / MeOH (98:2, v/v) (eluent A) - MeOH (eluent B)	0-8 min, 0% B; 8-13 min, 20% B; 13-14 min, 35% B; 35% B until 25 min Flow rate: 1 mL min ⁻¹	T _{column} : 30 °C V _{injection} : 20 μ L t ₀ : 1.4 min P ₀ : 145 bar
Agilent Poroshell 120 EC-C18 (150 mm x 3 mm, 2.7 μm)	- 40 mM H ₃ PO ₄ / MeOH (95:5, v/v) (eluent A) - MeOH (eluent B)	0-5 min, 0% B; 5-13 min, 30% B; 13-13.5 min, 40% B; 40% B until 25 min Flow rate: 0.5 mL min ⁻¹	T _{column} : 25 °C V _{injection} : 10 μ L t ₀ : 1.8 min P ₀ : 245 bar
Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 RRHT (50 mm x 4.6 mm, 1.8 μm)	- 40 mM H ₃ PO ₄ / MeOH (98:2, v/v) (eluent A) - MeOH (eluent B)	0-5 min, 0% B; 5-13 min, 35% B; 35% B until 18 min Flow rate: 1 mL min ⁻¹	T _{column} : 20 °C V _{injection} : 10 μ L t ₀ : 0.5 min P ₀ : 180 bar

As a consequence of the different excitation and emission wavelengths of the lumazinic derivatives, a fluorescence detector was programmed in multiexcitation mode and each chromatogram was recorded simultaneously exciting at 270, 330, and 350 nm. A wavelength of 450 nm was selected as the emission wavelength as a compromise in order to analyze all compounds in only one run.

3.2. Optimization of separation and comparison of columns efficiency

With the aim of selecting the more appropriate column for separation of the seven α -dicarbonyl-DDP derivatives, we realized a systematic comparison of three columns assayed. This study was performed in order to develop a simple, reliable, and robust method for efficient separation and quantification of these compounds. In this study, reversed phase C18 columns with different dimensions and different size and surface particles were tested. The columns used were Zorbax-Eclipse XDB C18 (5.6 μm), Poroshell 120 (2.7 μm), and Zorbax-Eclipse XDB-C18 RRHT (1.8 μm). The most important parameters that influence chromatographic separation, such as mobile phase composition, flow rate, and column temperature, were assayed with each column.

The composition of the mobile phase has a large influence in complete resolution of the derivatives. Due to the analytes differing widely in polarity, isocratic elution is unviable and it was necessary to use a binary gradient. The two solvents employed in the gradient elution were mixtures of acid/MeOH, as solvent A, and MeOH 100% as solvent B. The presence of acid in the mobile phase is essential to complete resolution of the lumazinic derivatives, so the influence of the nature of the acid used in solvent A and the pH of the mobile phase was studied. Acetic, phosphoric, and formic acids were assayed, and the pH was varied between 2.9 and 4.0 for each acid. The behavior of the α -dicarbonyl-DDP derivatives was identical with the three columns assayed, independent of the acid used. In general, the retention times of DIA, 2,3-Pen, and PhGly lumazine derivatives are not affected, and the retention times of the less retained derivatives decreased as the pH increased. Finally, 0.4 mM phosphoric acid (pH 3.2) was selected as the aqueous component of solvent A for the three columns.

Below, the composition of solvent A was optimized for each column by modifying the phosphoric acid (0.4 mM)/MeOH ratio between 99:1 and 99:5, v/v. Also, different gradients with methanol as solvent B were assayed to achieve baseline separation of all derivatives in a time as short as possible. Optimized conditions for each column are summarized in Table 1.

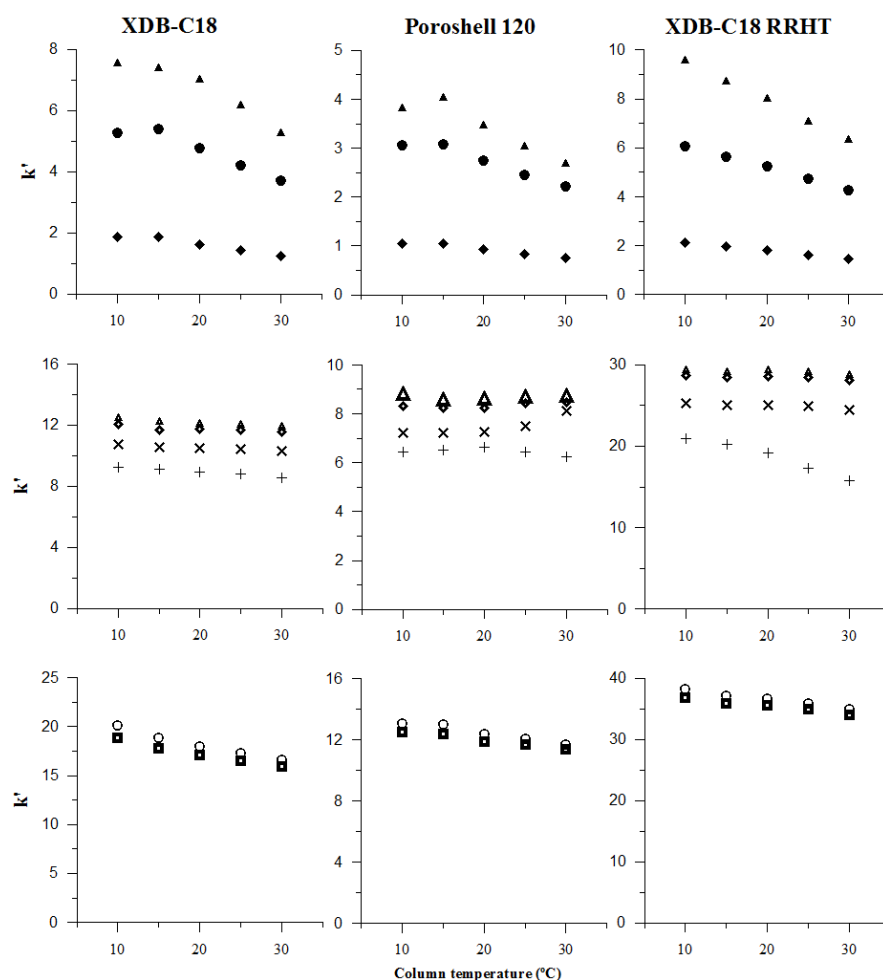


Figure 3. Variation of capacity factor (k') with column temperature for the three columns studied: (◆) GS, (●) Gly, (▲) 3-DG, (+) MGly, (×) DIA, (◇) 2,3-Pen (1), (△) 2,3-Pen (2), (□) PhGly (1), and (○) PhGly (2).

Also, the influence of the temperature in the separation has been studied with the three columns. In general, the capacity factors decreased with increasing temperature for all compounds. It is noticeable that this effect is greater for the less retained compounds and when the mobile phase is 100% aqueous, as can be seen in Fig. 3. In gradient mode, as the percentage of methanol increased and the mobile phase viscosity was varying, the effect of temperature in the capacity factors decrease, and the variation in the last four analytes eluted is lower.

Representative chromatograms obtained in the optimized conditions with the three columns assayed, XDB-C18, Poroshell, and XDB-C18 RRHT, are shown in Fig. 4. As can be seen, the use of a conventional monomeric C18 column results in a lack of complete separation between the peak of the MGly-DDP derivative and the peak of the DDP reagent. In addition, more polar analytes presented peak tailing and, in general, peak shape was wider than in the other columns. On the other hand, lower analysis time is obtained with the XDB-C18 RRHT column. It is important to remark that elution order of MGly derivative and DDP is inverted in this column. The Poroshell column achieves complete separation of the compounds in 25 min with narrow and symmetric peaks.

Once elution conditions were established, chromatographic parameters (column resolution (R), capacity factor (k'), and theoretical plate number (N)) were calculated to obtain information about the efficiency of each column in the chromatographic separation of the lumazinic derivatives. These parameters have been calculated following eqs 1-3, and the obtained values are summarized in Table 2.

$$R = \frac{1.17 (t_{R2} - t_{R1})}{(w_{1/2})_1 + (w_{1/2})_2} \quad (1)$$

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2)$$

$$N = 5.54 \times (t_R/w_{1/2})^2 \quad (3)$$

where t_R is the retention time, t_0 is the dead time, and $w_{1/2}$ is the width of the peak at half height.

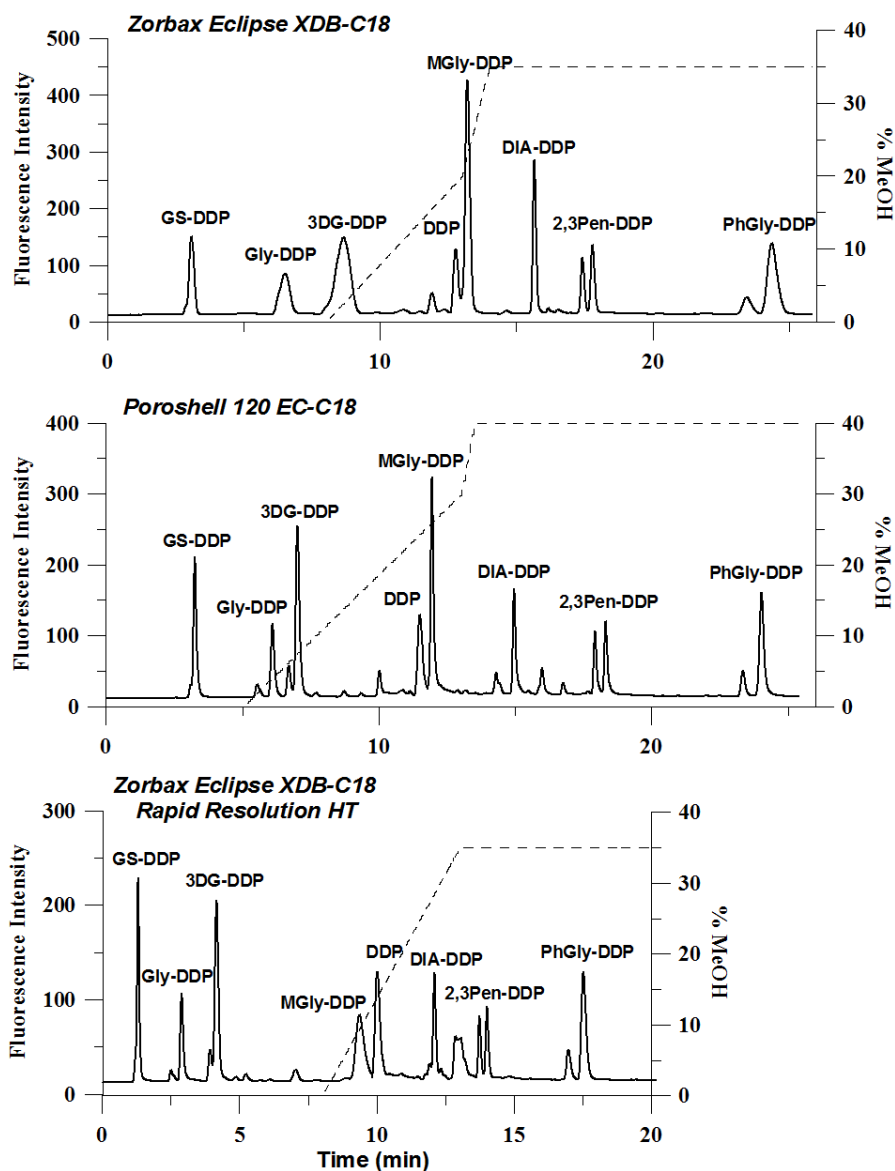


Figure 4. Optimum separation of lumazinic derivatives in the three columns assayed. Dashed lines indicated the gradient program employed. $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 330/450$ nm.

Retention time is the most important parameter to know the length of analysis. For all compounds, using the optimized elution conditions, retention times were shorter with the XDB-C18 RRHT column than with conventional C18 and Poroshell

columns, getting a total scan time of 18 min, against the 25 min for the other two columns. Thus, the column length reduction decreases analysis time, as expected. Retention times of the lumazinic derivatives in the three columns assayed can be seen in Table 2.

Table 2. Chromatographic parameters calculated for each α -dicarbonyl compound in the three columns assayed.

Column	α -Dicarbonyl compound	t_R (SD) ^a (min)	R (SD) ^a	k' (SD) ^a	N (SD) ^a
Zorbax Eclipse XDB-C18	GS	2.89 (0.05)	6.59 \pm 0.06	1.06 \pm 0.03	1480 \pm 77
	Gly	5.90 (0.10)	7.41 \pm 0.18	3.24 \pm 0.09	1984 \pm 148
	3-DG	7.80 (0.20)	3.03 \pm 0.04	4.57 \pm 0.16	2052 \pm 145
	MGly	12.79 (0.07)	1.17 \pm 0.07	8.12 \pm 0.03	27283 \pm 1593
	DIA	15.34 (0.03)	8.57 \pm 0.10	9.93 \pm 0.02	47071 \pm 2150
	2,3-Pen (1)	17.2 \pm 0.02	7.07 \pm 0.06	11.27 \pm 0.02	81245 \pm 1595
	2,3-Pen (2)	17.55 \pm 0.02	1.34 \pm 0.01	11.51 \pm 0.02	72407 \pm 1703
	PhGly (1)	22.70 \pm 0.06	12.67 \pm 0.22	15.18 \pm 0.04	27549 \pm 1303
	PhGly (2)	23.51 \pm 0.07	1.40 \pm 0.02	15.76 \pm 0.04	24488 \pm 754
Poroshell 120 EC-C18	GS	3.30 \pm 0.02	9.79 \pm 0.08	0.84 \pm 0.01	4348 \pm 117
	Gly	6.25 \pm 0.05	13.04 \pm 0.11	2.49 \pm 0.01	10018 \pm 177
	3-DG	7.31 \pm 0.06	4.06 \pm 0.03	3.07 \pm 0.01	12178 \pm 149
	MGly	12.05 \pm 0.04	1.58 \pm 0.03	5.72 \pm 0.04	34227 \pm 632
	DIA	15.04 \pm 0.05	11.68 \pm 0.11	7.39 \pm 0.05	57992 \pm 688
	2,3-Pen (1)	18.03 \pm 0.04	12.06 \pm 0.12	9.05 \pm 0.06	88847 \pm 2298
	2,3-Pen (2)	18.45 \pm 0.04	1.68 \pm 0.02	9.29 \pm 0.06	82818 \pm 2207
	PhGly (1)	23.70 \pm 0.10	17.63 \pm 0.45	12.28 \pm 0.10	74283 \pm 5729
	PhGly (2)	24.60 \pm 0.10	2.08 \pm 0.09	12.70 \pm 0.11	76963 \pm 9321
Zorbax Eclipse XDB-C18 RRHT	GS	1.30 \pm 0.02	6.34 \pm 0.17	1.65 \pm 0.05	931 \pm 52
	Gly	2.88 \pm 0.03	7.96 \pm 0.16	4.87 \pm 0.13	2605 \pm 122
	3-DG	4.13 \pm 0.04	5.10 \pm 0.14	7.42 \pm 0.21	4023 \pm 188
	MGly	9.37 \pm 0.09	12.13 \pm 0.23	18.10 \pm 0.44	3927 \pm 186
	DIA	12.08 \pm 0.03	8.54 \pm 0.16	23.63 \pm 0.55	69012 \pm 7705
	2,3-Pen (1)	13.73 \pm 0.03	8.81 \pm 0.20	27.00 \pm 0.63	86418 \pm 4532
	2,3-Pen (2)	14.00 \pm 0.03	1.45 \pm 0.03	27.55 \pm 0.64	80582 \pm 7418
	PhGly (1)	16.95 \pm 0.06	10.83 \pm 0.44	33.54 \pm 0.75	39543 \pm 3950
	PhGly (2)	17.20 \pm 0.10	1.57 \pm 0.06	34.63 \pm 0.77	43576 \pm 3225

^aSD: Standard Deviation.

Peak resolution describes the degree of separation between two compounds. Usually an R value of 1 is accepted to consider that a separation is satisfactory, but R must be equal to or higher than 1.5 to achieve a baseline resolution. As can be seen in Table 2, better resolution for all compounds is achieved when the separation was carried out with a Poroshell column. It is important to highlight that R has been calculated with respect to the previous peak eluted; thus, in the case of columns XDB-C18 and Poroshell, MGly resolution is referred to its separation from the DDP. However, as the order of elution between DDP and MGly derivative changes in XDB-C18 RRHT, the resolution of MGly is calculated with regard to the 3-DG derivative, with a resolution value of DDP-MGly of 1.4 ± 0.1 .

In relation to k' values, in the case of the Poroshell column, they are comprised between 0.84 and 12.7, which are near the ideal values (1 and 10), [35] while for XDB-C18 RRHT, k' values are too high (approximately 35 for the last derivative). This is in agreement with the fact that superficially porous particles typically have about one-half to three-quarters the surface area of totally porous particles, resulting in a smaller capacity factor value for columns of core-shell particles in size comprised between 2.5 and 2.7 μm [36].

On the other hand, N values, calculated based on the width of peak at half height, were greater for the Poroshell column in all cases, which indicates more efficient chromatographic separation. Other aspects like solvent consumption were taken into account. In this way, although the analysis time for the XDB-C18 RRHT column is lower, solvent consumption is higher than with Poroshell (12.5 against 18 mL per run) due to the flow rate employed with this column being one-half.

In order to evaluate the precision of analysis with the three columns, repeatability was assessed by injection of 10 standard solutions, in the optimized conditions, for each column. The RSD from the signal of the peak area was between 1.6% and 7.4% for XDB-C18, 2.4% and 6.3% for XDB-C18 RRHT, and 2.3% and 6.0% for Poroshell. Therefore, significant differences were not found.

In summary, although the XDB-C18 RRHT column has the fastest elution time, resolution was enhanced with the core-shell column. Also, the solvent reduction achieved with this column is a good advantage with the aim of developing a method

of analysis less polluting as possible; thus, the Poroshell 120 column was chosen for the following experiments.

3.3. Method validation: analytical parameters

For validation of the method, a calibration curve of each compound was established employing the peak area as analytical signal, and using the optimized conditions for the selected Poroshell column (Table 1). The linearity of the method was assessed by preparing calibration standards with concentrations ranging from 10.0 to 600 ng mL⁻¹ of GS, from 4.0 to 120.0 ng mL⁻¹ of Gly and 3-DG, from 4.0 to 40.0 ng mL⁻¹ of MGly and DIA, from 4.0 to 150.0 ng mL⁻¹ of PhGly, and from 4.0 to 60.0 ng mL⁻¹ of 2,3-Pen. The pH 10 of the derivatization reaction was maintained with ammonia/ammonium chloride buffer, and the concentration of DDP was 0.86 mM, as previously explained in Section 2.3. Standard solutions containing all α -dicarbonyl compounds were prepared in triplicate for each concentration level, and the analytical figures of merit were calculated employing the peak areas as analytical signal. The analytical figures of merit obtained for each α -dicarbonyl compound are shown in Table 3. Evaluation of the precision of the optimized method was done by analyzing standard solutions of the α -dicarbonyl compounds in the same day (intraday precision, n=10) and in consecutive days (interday precision, n = 6). Intraday and interday repeatability values, expressed as relative standard deviation (RSD), are lower than 6.0% and 5.0%, respectively, so they may be considered as a guarantee of the goodness of the proposed method, and use of an internal standard is not required. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated as concentrations corresponding to 3 and 10 times the standard deviation of the signal from baseline from chromatograms obtained in intraday precision study. The resulting value was divided between calibration curves slopes for each analyte, calculated by employing the peak height as analytical signal. Low values are obtained that are indicative of the high sensitivity of the developed method. These values are summarized in Table 3.

Table 3. Calibration data and validation parameters.

α -Dicarbonyl compound	Linear range (ng mL ⁻¹)	Intercept (SD) ^a	Slope (SD) ^a (ng mL ⁻¹)	R ²	LOD ^b (ng mL ⁻¹)	LOQ ^c (ng mL ⁻¹)	Precision ^d	
							Intraday (n=10)	Interday (n=6)
GS	10-600	-29 (17)	2.10 (0.02)	0.9989	2.49	8.30	2.9	5.0
Gly	4-120	464 (33)	11.80 (0.20)	0.9975	0.48	1.60	4.5	4.9
3-DG	4-125	70 (34)	7.74 (0.08)	0.9986	0.83	2.77	3.6	4.3
MGly	4-40	26 (26)	32.50 (0.40)	0.9978	0.15	0.50	4.5	2.1
DIA	4-30	188 (22)	24.00 (0.50)	0.9963	0.24	0.80	6.0	2.3
2,3-Pen (1)	4-150	-72 (32)	7.80 (0.10)	0.9974	0.77	2.57	3.9	3.4
2,3-Pen (2)		-12 (18)	8.75 (0.06)	0.9994	0.68	2.27	2.3	3.2
PhGly (1)	4-60	-16 (13)	8.00 (0.10)	0.9978	1.07	3.57	4.7	5.0
PhGly (2)		32 (15)	14.30 (0.10)	0.9991	0.63	2.11	5.7	3.3

^aSD: Standard Deviation.

^bLimit of detection.

^cLimit of quantification.

^d Expressed as Relative Standard Deviation (% RSD). Standard solution employed containing 300.0 ng mL⁻¹ GS, 60.0 ng mL⁻¹ Gly, 3-DG, 20.0 ng mL⁻¹ MGly, DIA, 75.0 ng mL⁻¹ 2,3-Pen and 30.0 ng mL⁻¹ PhGly.

3.4. Quantitative measurement of α -dicarbonyl compounds in wines

After evaluation and selection of the optimum column for separation of seven α -dicarbonyl compounds, the proposed method was applied to analysis of different red, white, and sweets wines. To carry out quantification of the α -dicarbonyl compounds in wine samples, the influence of the matrix effect over chromatographic separation was first evaluated. For this standard addition calibration curves, from each of the α -dicarbonyl compounds in wine samples, were established, and calibration slopes were compared with the corresponding slopes of the external standard calibration plots of each analyte at the 95% confidence level. In all cases, considerable differences were obtained, and these results suggest that there is a matrix effect. As a consequence, calibration curves were constructed using the standard addition method for each of the wines analyzed and used to quantify each analyte in duplicate.

It is important to bear in mind that levels of α -dicarbonyl compounds vary with the type of wine and, for this reason, adequate sample dilutions were optimized for each type of wine analyzed. The volume chosen for each wine is shown in Table 4. The low volumes of samples needed for analysis, in comparison with other published methods, highlight the sensitivity of the proposed method. Ten wines were analyzed following the methodology described in Section 2.4: 3 red wines, 3 white wines, 2 sweet red wines, and 2 sweet white wines. Fig. 5 shows an example of chromatograms obtained from each type of wine analyzed, and the results obtained for each α -dicarbonyl are shown in Table 4. Contrary to the literature [22], PhGly was not detected in any of the different wines analyzed in this study. Also, in all samples, only one lumazinic derivative from 2,3-Pen was observed.

To date, the dicarbonyl compound more relevant in wines is DIA, since it has a pronounced butter odor and its presence in wines at high concentrations is undesirable [8]. Depending on the type of wine, the contents of DIA [37,38] ranged from 0.2 to 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As it can be seen in Table 4, in the samples analyzed in this paper the content of DIA varies between 0.29 and 8.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$. It can be observed that in red wines the content is higher than in white wines, in accordance with previous research, and no significant differences were found between not sweet and sweet wines, with the exception of Ribera Duero wine.

Table 4. Concentrations of the six α -dicarbonyl compounds detected in commercial wine samples.

Type of wine	[GS] ^a	[Gly] ^a	[3-DG] ^a	[MGly] ^a	[DIA] ^a	[2,3-Pen] ^a	Total α -DC ^a
Red Wines^b							
Monasterio Tentudía, 2008 (Extremadura, Spain)	4.50 (0.20)	1.85 (0.08)	13.50 (0.30)	1.58 (0.05)	3.10 (0.60)	3.00 (0.04)	27.53 (0.71)
Ribera Duero, 2010 (Spain)	0.50 (0.20)	1.35 (0.03)	7.70 (0.40)	0.68 (0.01)	8.80 (0.20)	1.45 (0.02)	20.48 (0.49)
Merlot, 2009 (Extremadura, Spain)	1.70 (0.20)	7.10 (0.20)	10.40 (0.50)	0.42 (0.02)	1.22 (0.05)	5.60 (0.03)	26.46 (0.58)
White Wines^c							
Rioja Comportillo, 2011 (D.O. Rioja, Spain)	0.70 (0.10)	1.53 (0.08)	4.90 (0.20)	0.73 (0.03)	0.29 (0.01)	2.22 (0.03)	10.37 (0.24)
Viña Canchal, 2011 (Extremadura, Spain)	0.40 (0.10)	1.12 (0.05)	7.90 (0.30)	0.21 (0.01)	0.63 (0.02)	1.17 (0.03)	11.43 (0.32)
Manzanilla, dry wine (D.O. SanLúcar de Barrameda , Spain)	5.20 (0.20)	1.10 (0.10)	6.10 (0.20)	0.28 (0.01)	0.64 (0.02)	0.90 (0.04)	14.22 (0.30)
Red Sweet wines^d							
Vin Santo (Toscana, Italy)	138 (11)	4.50 (0.30)	133 (5)	1.68 (0.08)	1.02 (0.06)	2.30 (0.10)	280 (12)
Port Tawny (Porto, Portugal)	89 (13)	8.90 \pm 0.40)	39 (4)	0.95 (0.05)	1.50 (0.09)	1.90 (0.10)	141 (14)
White sweet wines^d							
Málaga Dulce (Málaga, Spain)	261 (7)	8.40 (0.20)	126 (5)	0.90 (0.05)	2.80 (0.10)	2.61 (0.08)	402 (9)
Oremus Tokaji, 2008 (Hungary)	37 (1)	5.50 (0.20)	75 (2)	3.21 (0.06)	0.60 (0.07)	4.60 (0.10)	126 (2)

^a Concentration expressed as $\mu\text{g mL}^{-1}$ (SD, Standard deviation).

Aliquot of wine samples:^b 500 μL for Gly, MGly, DIA and 2,3-Pen, and 120 μL for 3-DG and DIA; ^c 1500 μL

^d 120 μL for Gly, MGly, DIA and 2,3-Pen, and 50 μL of a solution wine/water (1:50, v/v) for GS and 3-DG.

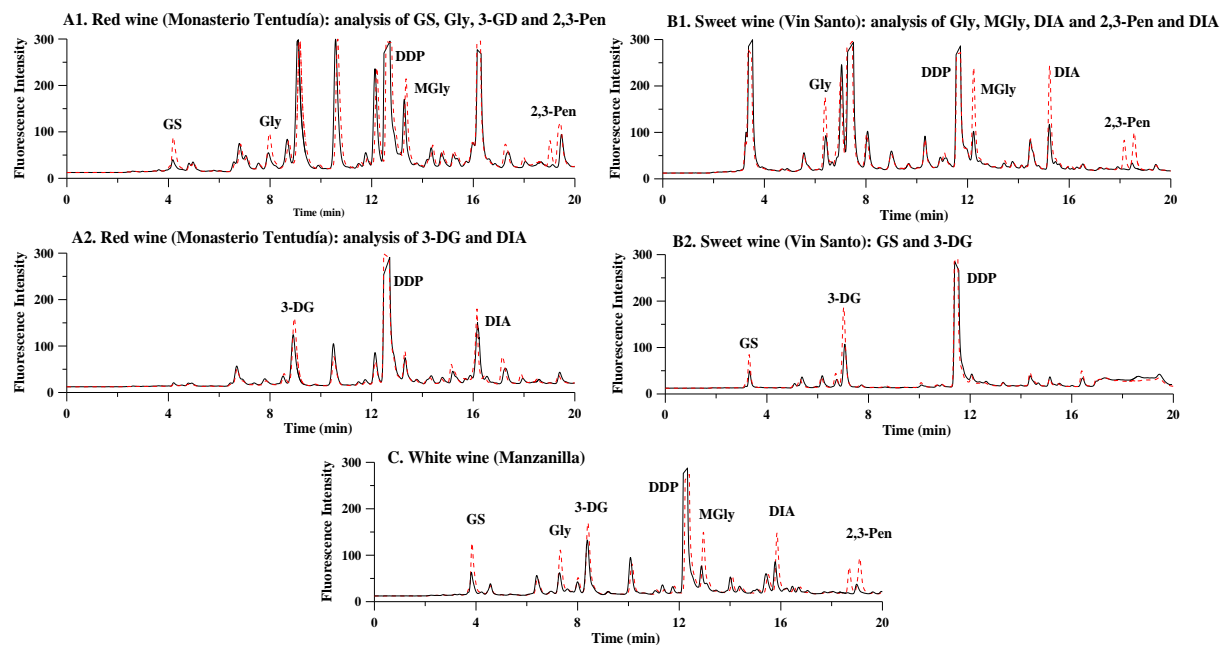


Figure 5. Chromatograms obtained from each type of wine analyzed (continuous line) and from wine samples spiked with 125.0 ng mL⁻¹ GS, 60.0 ng mL⁻¹ 3-DG, 40.0 ng mL⁻¹ Gly, 6.0 ng mL⁻¹ MGly, 6.0 ng mL⁻¹ DIA, and 40.0 ng mL⁻¹ 2,3-Pen (dashed line). **(A1)** Analysis of GS, Gly, MGly, and 2,3-Pen in red wine (Monasterio Tentudia, 0.50 mL of sample). **(A2)** Analysis of 3-DG and DIA in red wine (Monasterio Tentudia, 0.12 mL of sample). **(B1)** Analysis of Gly, MGly, DIA, and 2,3-Pen in sweet wine (Vin Santo, 0.12 mL of sample). **(B2)** Analysis of GS and 3-DG in sweet wine (Vin Santo, 0.50 mL of a solution wine/water (1:50 v/v)). **(C)** Analysis of six α -dicarbonyl compounds in white wine (Manzanilla, 1.50 mL of sample). $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 330/450$ nm.

With respect to the other α -dicarbonyl compounds with a short chain, concentrations found for Gly and MGly were similar to those previously reported [33]. Values ranged from 1.1 to 1.85 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for Gly and 0.28 to 1.68 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for MGly, with the exception of Merlot wine, whose concentration of Gly found was 7.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Thus, the levels found in Merlot wine are close to the levels found for sweet wines, in which the quantities of Gly and MGly found were higher (between 4.5 and 8.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 0.9 and 3.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for Gly and MGly, respectively). In all cases the relation Gly/MGly is greater than unity. With respect to the levels of 2,3-Pen, these are similar in all wines analyzed ranging between 0.9 and 5.60 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and no appreciable differences were found between sweet and not sweet wines.

On the other hand and with respect to the α -dicarbonyl sugars, 3-DG and GS have been detected in all wines analyzed. In red and white wines, the content of GS varies between 0.4 and 5.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and the 3-DG content between 4.9 and 13.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. In sweet wines, the concentration of both glucosones increases considerably, independent of whether they are red or white, and their concentrations vary between 37 and 261 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Due to the high concentration of glucosones obtained in sweet wines, it was important to check if formation of the α -dicarbonyl compounds from sugars was not favored by the high temperature of the derivatization reaction conditions. Therefore, in sweet wines, the derivatization reaction was performed at room temperature for 2 h and 30 min, and aliquots of these samples were analyzed. A comparison of the chromatograms, obtained at room temperature and higher temperature, does not show significant differences. This fact allows us to conclude that the elevated concentrations of glucosones found in sweet wines are related to its high levels of sugars.

Finally, if the total α -dicarbonyl concentration is analyzed, it can be observed that no significant variations were found in each type of red or white wine analyzed. However, if we made a comparison between red and white wines, we can confirm that the total α -dicarbonyl concentration is significantly higher in red wines. On the other hand, in sweet wines, a great difference has been found between the wines analyzed, and values of total α -dicarbonyl concentration amounting to 402 $\mu\text{g mL}^{-1}$ have been found. In addition, Tokaji wine, which it is a sweet white wine produced with botrytized grapes, contains higher levels of MGly. In spite of this, the total

α -dicarbonyl concentration found is lower compared to the other sweet wines analysed.

4. Conclusions

In conclusion, all types of columns tested were able to separate the lumazinic derivatives with sufficient resolution and peak symmetry in the optimum chromatographic conditions, although they differed in analysis time and separation efficiency of the derivatives analyzed. The conventional C18 column had the lowest resolution and peaks wider than columns with minor particle size. By comparing the chromatographic behavior of lumazinic derivatives in small particle size columns, it can be observed that although the XDB-C18 RRHT column provides the lowest retention times the best separation efficiency and lowest solvent consumption is achieved with the Poroshell column. For this reason, the comparison study carried out showed that the Poroshell column was most appropriate for analysis of α -dicarbonyl compounds previous derivatization to lumazines, and this column was selected for their analysis in wine samples. Derivatization reaction time, temperature, and sample volume employed in analysis have considerably decreased with respect to the previous published method. On the other hand, a very sensitive and reproducible method to analyze these compounds in different commercial wine samples has been developed, and no pretreatment of sample is required. The sensitivity of the method is presented as a useful alternative to other methods, even with MS detection, whose instrumentation is more costly and complicated and not available in many laboratories. A comparison between red and white wines shows that the total α -dicarbonyl concentration is significantly higher in red ones. In sweet wines, total amounts up to 400 mg mL⁻¹ have been found.

References

- [1] P.J. Thornalley, "Advanced glycation and development of diabetic complications: Unifying the involvement of glucose, methylglyoxal and oxidative stress", *Endocrinol. Metab.* 3 (1996) 149-166.

- [2] K. Uchida, M. Kanematsu, K. Sakai, T. Matsuda, N. Hattori, D. Suzuki, T. Miyata, N. Noguchi, E. Niki, T. Osawa, "Protein-bound acrolein: Potential markers for oxidative stress", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 (1998) 4882-4887.
- [3] M.A.J.S. Van Boekel, "Formation of flavour compounds in the Maillard reaction", *Biotechnol. Adv.* 24 (2006) 230-233.
- [4] X.M. Chen, D.D. Kitts, "Identification and quantification of α -dicarbonyl compounds produced in different sugar-amino acid Maillard reaction model systems", *Food Res. Int.* 4 (2011) 2775-2782.
- [5] R. Flamini, G. De Luca, R. Di Stefano, "Changes in carbonyl compounds in Chardonnay and Cavernet Sauvignon wines as a consequence of a malolactic fermentation", *Vitis* 41 (2002) 107-112.
- [6] R. Flamini, A. Dalla Vedova, "Glyoxal/glycolaldehyde: A redox system involved in malolactic fermentation of wine", *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 2300-2303.
- [7] G. De Revel, A. Bertrand, "A method for the detection of carbonyl compounds in wine: glyoxal and methylglyoxal", *J. Sci. Food Agric.* 61 (1993), 267-272.
- [8] E.J. Bartowsky, P.A. Henschke, "The buttery attribute of wine -diacetyl- desirability spoilage and beyond", *Int. J. Food Microbiol.* 96 (2004) 235-252.
- [9] C.M. Oliveira, A.C. Silva-Ferreira, V. De Freitas, A.M.S. Silva, "Oxidation mechanisms occurring in wines", *Food Res. Int.* 44 (2011) 1115-1126.
- [10] C.R. Davis, D. Wibowo, R. Eschenbruch, T.H. Lee, G.H. Fleet, "Practical implications of malolactic fermentation: A review", *Am. J. Enol. Viticult.* 36 (1985) 290-301.
- [11] R.M. Ramos, J. Grosso Pacheco, L. Moreira Gonçalves, I.M. Valente, J.A. Rodrigues, A. Araújo Barros, "Determination of free and total diacetyl in wine by HPLC-UV using gas-diffusion microextraction and pre-column derivatization", *Food Control* 24 (2012) 220-224.
- [12] P.J. Thornalley, "Monosaccharide autoxidation in health and disease", *Environ. Health Perspect.* 64 (1985) 297-307.
- [13] Y. Deng, P.H. Yu, "Simultaneous determination of formaldehyde and methylglyoxal in urine: involvement of semicarbazide sensitive amine oxidase-mediated deamination in diabetic complications", *J. Chromatogr. Sci.* 37 (1999) 317-322.

- [14] C. Cordeiro, A. Ponces-Freire, "Methylglyoxal assay in cells as 2-methylquinoxaline using 1,2-diaminobenzene as derivatizing reagent", *Anal. Biochem.* 234 (1996) 221-224.
- [15] A.C. McLellan, S. Phillips, P.J. Thornalley, "The assay of methylglyoxal in biological systems by derivatization with 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene", *Anal. Biochem.* 206 (1992) 17-23.
- [16] K. Akira, Y. Matsumoto, T. Hashimoto, "Determination of urinary glyoxal and methylglyoxal by high-performance liquid chromatography", *Clin. Chem. Lab. Med.* 42 (2004) 147-153.
- [17] A. Espinosa-Mansilla, I. Durán-Merás, F. Salinas, "High performance liquid chromatographic-fluorometric determination of glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl in urine by prederivatization to pteridinic rings", *Anal. Biochem.* 255 (1998) 263-273.
- [18] M.C. Hurtado-Sánchez, A. Espinosa-Mansilla, M.I. Rodríguez-Cáceres, E. Martín-Tornero, I. Durán-Merás, "Development of a method for the determination of advanced glycation end products precursors by liquid chromatography and its application in human urine samples", *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 2575-2584.
- [19] H. Yamada, S. Miyata, N. Igaki, H. Yatabe, Y. Miyauchi, T. Ohara, M. Sakai, H. Shoda, M. Oimomi, M. Kasuga, "Increase in 3-deoxyglucosone levels in diabetic rat plasma. Specific in vivo determination of intermediate in advanced Maillard reaction", *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 20275-20280.
- [20] A. Espinosa-Mansilla, I. Durán-Merás, F. Cañada-Cañada, M.P. Márquez, "High-performance liquid chromatographic determination of glyoxal and methylglyoxal in urine by prederivatization to lumazinic rings using in serial fast scan fluorimetric and diode array detectors", *Anal. Biochem.* 371 (2007) 82-91.
- [21] Y. Hayasaka, E.J. Bartowsky, "Analysis of diacetyl in wine using solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry", *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 612-617.
- [22] G. De Revel, L. Pripis Nicolau, J.C. Barbe, A. Bertrand, "The detection of alpha-dicarbonyl compounds in wine by formation of quinoxaline derivatives", *J. Sci. Food Agric.* 80 (2000) 102-108.
- [23] A. Barros, J.A. Rodrigues, P.J. Almeida, T. Oliva-Teles, "Determination of glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl in selected beer and wine, by HPLC with UV spectrophotometric detection, after derivatization with *o*-phenylenediamine", *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 22 (1999) 2061-2069.

- [24] R.M. Ramos, J.G. Pacheco, L.M. Gonçalves, I.M. Valente, J.A. Rodrigues, A. Barros, "Determination of free and total diacetyl in wine by HPLC-UV using gas-diffusion microextraction and precolumn derivation", *Food Control* 24 (2012) 220-224.
- [25] T. Shibamoto, "Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 12-25.
- [26] S. Fekete, E. Oláh, J. Fekete, "Fast liquid chromatography: the domination of core-shell and very fine particles", *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 57-71.
- [27] U.D. Neue, "HPLC Columns: theory, technology, and practice", Wiley-VCH: New York, 1997.
- [28] D.V. McCalley, "Instrumental considerations for the effective operation of short, highly efficient fused-core columns. Investigation of performance at high flow rates and elevated temperatures", *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4561-4567.
- [29] A. Abraham, M. Al-Sayah, P. Skrdla, Y. Bereznitski, Y. Chen, N. Wu, "Practical comparison of 2.7 μm fused-core silica particles and porous sub-2 μm particles for fast separations in pharmaceutical process development", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (2010) 131-137.
- [30] L. Nováková, P. Solich, "A comparison of performance of various analytical columns in pharmaceutical analysis: conventional C18 and high throughput C18 zorbax columns", *J. Chromatogr. A* 1088 (2005) 24-31.
- [31] A. Medina, N. Magan, "Comparison of three different C18 HPLC columns with different particle sizes for the optimization of aflatoxins analysis", *J. Chromatogr. B* 889-890 (2012) 138-143.
- [32] 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.* 10 (2005) 337-345.
- [33] A.C. Da Silva-Ferreira, S. Reis, C. Rodrigues, C. Oliveira, P. Guedes de Pinho, "Simultaneous determination of ketoacids and dicarbonyl compounds, key Maillard intermediates on the generation of aged wine aroma", *J. Food Sci.* 72 (2007) S314-S318.
- [34] Compendium of international analysis of methods: α -dicarbonyl compounds by GC after derivatization. Method for the determination of α -dicarbonyl compounds of wine by GC after derivatization by 1,2-diaminobenzene (OIV-Oeno 386B-2010) Method OIV-MA-AS315-21, 2010.

- [35] I.B. Murphy, C.A. Stutte, "Analysis for substituted benzoic and cinnamic acids using high-pressure liquid chromatography", *Anal. Biochem.* 86 (1978) 220-228.
- [36] J.J. DeStefano, S.A. Schuster, J.M. Lawhorn, J.J. Kirkland, "Performance characteristics of new superficially porous particles", *J. Chromatogr. A* 1258 (2012) 76-83.
- [37] J. Guillou, A. Bertrand, G. De Revel, J.C. Barbe, "Occurrence of hydroxypropanedial in certain musts and wines", *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 3382-3386.
- [38] E. Peynaud, "Le Gout du Vin", Dunod: Paris, 1980, 44-45.

II.3.3. Discusión del artículo científico 5

Optimización de la reacción de derivatización

A diferencia de la reacción para formar derivados pteridínicos, la formación de derivados lumazínicos transcurre en mayor medida en medio básico. En estudios previos de nuestro grupo de investigación se comprobó que la velocidad de esta reacción está fuertemente afectada por la acidez del medio, aumentando a medida que lo hace el pH hasta alcanzar un valor de 10, para disminuir ligeramente a valores superiores. La única diferencia en cuanto a la estructura entre el TRI y el DDP radica en el sustituyente localizado en el carbono 2 del anillo pirimidínico, el cual es un grupo amino en el caso del TRI, y un grupo hidroxilo en el caso del DDP. En la bibliografía se encuentra descrito que el pH óptimo para que transcurran este tipo de reacciones de adición-eliminación, donde tiene lugar el ataque de un agente nucleofílico (en este caso un grupo amino) a un carbonilo, está comprendido entre 4 y 6. Una hipótesis para que la reacción entre el DDP y el compuesto transcurra más favorablemente mediante catálisis básica es la formación de un equilibrio cetoenólico del reactivo que favorece el ataque nucleofílico del grupo amino al carbonilo, el cual en medio ácido podría estar impedido por la posible protonación y formación del grupo amonio correspondiente.

Al igual que ocurre con el TRI, el DDP se degrada en las condiciones de reacción originando subproductos que, posteriormente, en la separación cromatográfica, pueden eluir al mismo tiempo que los derivados de interés. Por este motivo, de nuevo se estudió la posibilidad de disminuir esta degradación preparándolo en presencia de β -ME, observando que este reactivo es capaz de conseguir que la descomposición del derivatizante sea considerablemente menor, como se observa en la Figura 2A del artículo científico.

A continuación, y ya en presencia de este reactivo, se llevó a cabo la optimización del exceso óptimo de DDP. En la Figura II.12 se representan las variaciones del área de pico frente al exceso de DDP para el Gly, DIA y GS. Al igual que el Gly, el MGly, la 3-DG y la 2,3-Pen alcanzan un rendimiento máximo de reacción para un exceso de DDP de 10 veces frente a la concentración de compuestos α -dicarbonílicos totales. Sin embargo, como se muestra en la Figura II.12, el DIA y la

GS necesitan como mínimo un exceso de TRI igual o superior a 30, por lo que finalmente se fijó éste como óptimo.

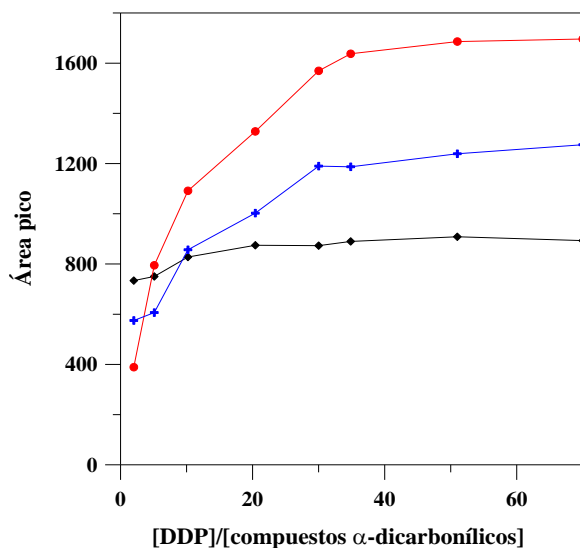


Figura II.12. Influencia del exceso de reactivo derivatizante sobre la formación de los derivados Gly-DDP (—◆—) y DIA-DDP (—+—) y GS-DDP (—●—).
 $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ 330/450 nm.

Del mismo modo se optimizaron la temperatura y el tiempo de calentamiento, con disoluciones que contienen todos los analitos con el exceso de DDP optimizado, Para ello, el tiempo de calentamiento se varió entre 2 y 60 min para diferentes temperaturas (45, 60 y 85 °C), encontrando que una temperatura de 60 °C es suficiente para lograr la formación de los derivados en un tiempo razonable. Como se observa en la Figura II.13, bastaría con calentar durante 15 min para conseguir la completa formación del derivado del Gly. Este mismo comportamiento se observa para el MGly, DIA, 2,3-Pen y PhGly. En cambio, las glucosonas requieren un tiempo mínimo de reacción de 30 min, por lo que finalmente se seleccionó éste para las sucesivas experiencias por no ser un tiempo excesivamente largo.

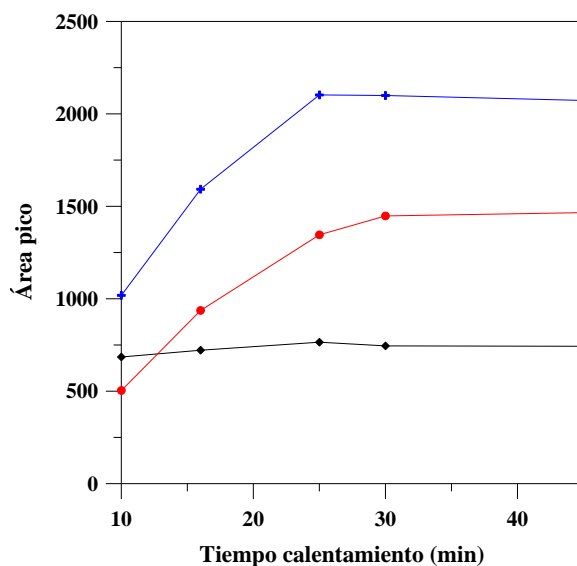


Figura II.13. Influencia del tiempo de calentamiento sobre la formación de los derivados Gly-DDP (—◆—) y la 3-DG-DDP (—+—) y GS-DDP (—●—).
 $T^a = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\lambda_{exc}/\lambda_{em} 330/450\text{ nm}$

En este caso, al igual que sucedía mediante la reacción con TRI, se observa la formación de un único derivado lumazínico a partir de la mayoría de los compuestos α -dicarbonílicos estudiados, a excepción de la 2,3-Pen y el PhGly, donde se observa la formación de los dos derivados posibles.

Optimización en la separación de los derivados lumazínicos con columnas de diferente tamaño de partícula.

En este trabajo se ha estudiado el comportamiento cromatográfico de los derivados lumazínicos en columnas de diferentes características (longitud, y tamaño y tipo de partícula). En la Tabla 1 del artículo científico 5 se detallan las características de cada una de las columnas estudiadas, así como las condiciones óptimas que aseguran una mejor separación de los derivados, las cuales se pueden ver en los cromatogramas representados en la Figura 4. En cada caso, el flujo de fase móvil seleccionado estuvo limitado por la presión máxima generada en el sistema. A partir de los correspondientes cromatogramas se obtuvieron los datos oportunos para el cálculo de los parámetros cromatográficos que nos ayudaron a discernir que columna

presenta una mayor eficacia: resolución cromatográfica (R), factor de capacidad (k') y número de platos teóricos (N), cuyos valores para cada analito y cada columna se encuentran resumidos en la Tabla 2 del artículo.

La R indica el grado de separación de un componente respecto a otro, considerándose satisfactoria una separación cuando R vale 1, aunque para que exista una resolución prácticamente total (resolución a línea base), este parámetro debe ser igual o superior a 1,5. En este trabajo, la R obtenida para cada uno de los derivados en todas las columnas es bastante buena, siendo el valor mínimo encontrado de 1,17 en el caso de la separación entre el derivado del MGly y el pico correspondiente al reactivo derivatizante con la columna Zorbax C18 de diámetro de partícula de 5 μm .

El parámetro k' es comúnmente usado para caracterizar el comportamiento de un analito en un sistema cromatográfico, así como su retención, de tal forma que cuanto mayor es su valor mayor es la afinidad del soluto por la fase estacionaria. En un sistema multicomponente se intenta mantener el valor de este parámetro entre 1 y 10. En nuestro estudio, estos valores ideales sólo se alcanzan de manera aproximada con la columna de partículas de núcleo sólido Poroshell 120, donde los valores obtenidos para todos los derivados están comprendidos entre 0,84 y 12,7. Para el resto de columnas el valor superior aumenta considerablemente, alcanzando un valor máximo de 34,63 para el segundo derivado del PhGly en la columna de partícula porosa de 1,8 μm .

La temperatura también es una variable que afecta de manera importante a la separación cromatográfica, ya que influye de forma directa en las propiedades físicas del eluyente. Así, al aumentar el valor de este parámetro:

- se reduce considerablemente la viscosidad de la fase móvil, lo cual reduce en el mismo factor la caída de presión del sistema;
- provoca un aumento en los coeficientes de difusión de los analitos. Esto, a su vez, tiene dos consecuencias: se reduce la resistencia a la transferencia de masa en ambas fases (disminuyendo la pendiente positiva de la curva de van Deemter) y se desplaza la velocidad óptima hacia mayores velocidades lineales.

- disminuye la constante dieléctrica y la tensión superficial del agua, por lo que aumenta el poder de elución del solvente en fase inversa y, como consecuencia, se puede reducir la cantidad del disolvente orgánico de la fase móvil.

Se estudió la variación de k' con la temperatura en cada columna, encontrando en todos los casos que a medida que aumenta el valor de esta variable disminuye k' .

Finalmente, se realizó el cálculo de N , que es el parámetro que está directamente relacionado con la eficacia de la columna, siendo mayor ésta cuando mayor es N . Para todos los compuestos N fue mayor en la columna Poroshell, lo que pone de manifiesto la mayor eficacia de esta columna frente a las demás.

Análisis de compuestos α -dicarbonílicos en diferentes muestras de vino

Una vez seleccionada la columna de trabajo y optimizadas las condiciones cromatográficas y de derivatización, se procedió al análisis de muestras de vino de diferentes tipos: blancos, tintos, blancos dulces y tintos dulces.

Puesto que el contenido en compuestos α -dicarbonílicos depende del tipo de vino, es necesario realizar diferentes diluciones para que la señal obtenida esté dentro del intervalo lineal obtenido para cada analito. Además, es importante remarcar que incluso para un mismo tipo de vino, la concentración de los diferentes compuestos α -dicarbonílicos que contiene puede diferir mucho entre sí.

Por tanto, en primer lugar se realizaron pruebas encaminadas a encontrar la dilución óptima para el correcto análisis de cada tipo de vino. Para ello, se ensayaron varias diluciones para cada uno de los cuatro vinos estudiados tomando diferentes alícuotas y sometiénolas al proceso de derivatización. El volumen de muestra finalmente seleccionado para el análisis de cada compuesto en cada tipo de vino es el expuesto en el artículo científico 5, los cuales se sometieron a reacción en las condiciones optimizadas para llevar a cabo el análisis de los compuestos de interés. La comparación estadística entre las pendientes de las rectas de calibrado de patrón externo y adición patrón demostraron que existen diferencias significativas entre ambas para un nivel de confianza del 95%, por lo que se llevó a cabo el análisis de las diferentes muestras de vino mediante el método de adición patrón.

De los resultados obtenidos se puede concluir que los vinos dulces, debido a que su contenido en glucosa y fructosa es elevado, poseen una mayor concentración de glucosonas que el resto de los vinos estudiados. Por otra parte, como se esperaba, dentro de los vinos secos, la concentración de compuestos α -dicarbonílicos es mayor en los vinos blancos que en los tintos. Finalmente, en ninguno de los vinos estudiados se detectó la presencia de PhGly, a pesar de los datos publicados en la bibliografía por otros autores.



PARTE III

Determinación de contaminantes en aguas superficiales

III.1. Introducción

III.1.1. Contaminación medioambiental

La rápida expansión de la industrialización en el mundo, el nacimiento de nuevas tecnologías, la creciente urbanización alrededor de las grandes ciudades y pueblos, impulsadas por el aumento de la población, y los intentos de satisfacer sus necesidades, están directamente relacionados con el consumo de enormes cantidades de sustancias químicas. Actualmente, esta gran variedad de compuestos, en su mayoría de origen antropogénico, se pueden englobar en dos grandes grupos: los plaguicidas, para los cuales existe una legislación bien establecida, y los contaminantes emergentes, cuyos efectos negativos han pasado desapercibidos hasta hace relativamente poco tiempo, pero que actualmente han cobrado un gran interés debido al impacto medioambiental que supone su acumulación, aunque aún hoy en día no existe un control sobre los niveles permitidos para estos compuestos en muestras medioambientales. A continuación se comentarán las características más importantes de cada grupo.

III.1.1.1. Plaguicidas

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, *Environmental Protection Agency*) define los plaguicidas como cualquier sustancia o mezcla de sustancias, naturales o sintéticas, destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier tipo de plaga [1].

Estos compuestos pueden clasificarse atendiendo a diversos criterios: según su toxicidad, los plaguicidas pueden catalogarse como extremadamente peligrosos, altamente peligrosos, moderadamente peligrosos o ligeramente peligrosos [2]; según su vida media se clasifican en permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes; atendiendo al tipo de plaga que controlan (insecticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas, rodenticidas, etc.) y, finalmente, según sea su estructura química. Dentro de este último grupo la EPA distingue principalmente 4 tipos: organofosforados, carbamatos, organoclorados y piretroides.

En la actualidad, los plaguicidas presentan un gran número de usos entre los que destacan [3]:

-
- eliminar, controlar o atraer a toda clase de plagas que destruyen las plantas y que afectan a la producción agrícola,
 - destruir las malezas,
 - destruir el follaje y un número excesivo de flores,
 - combatir los organismos patógenos en seres humanos, animales y plantas,
 - regular el crecimiento de las plantas o sus partes,
 - combatir los microorganismos que causan la descomposición de los productos agrícolas,
 - combatir plagas de insectos y otros animales (por ejemplo en casas, bodegas o almacenes),
 - proteger textiles en fábricas y establecimientos de limpieza en seco,
 - prevenir el desarrollo de algas en las piscinas,
 - combatir hongos en pinturas y productos de papel,
 - combatir el crecimiento de algas en las naves y barcos.

Todas estas actividades ponen de manifiesto la importancia que estos compuestos tienen en la sociedad. Así, la utilización de los plaguicidas en la agricultura representa un beneficio innegable, garantizando una mayor producción agrícola y un mayor beneficio económico en este sector, abasteciendo un mercado cada día mayor y más exigente [4]. Por otra parte, ofrecen la ventaja de evitar la propagación de enfermedades a través de insectos, ácaros o roedores, y son empleados como desinfectantes en lugares críticos para la salud, como hospitales, donde previenen la aparición de organismos patógenos [5]. Sin embargo, a pesar de las numerosas funciones que realizan y los beneficios que presentan para la sociedad, los plaguicidas se consideran de las sustancias más tóxicas que causan contaminación en el medio ambiente, dada su alta movilidad y capacidad de bioacumulación [5]. Tanto es así, que los efectos tóxicos que generan sobre la salud humana han sido motivo de preocupación y objeto de estudio durante muchos años. A pesar de esto, los mecanismos de toxicidad para la mayoría de ellos son pocos comprendidos hasta la fecha y, además, dependen de sus características químicas.

La salud humana puede verse afectada por los plaguicidas en dos aspectos diferentes. Por un lado, se puede producir una toxicidad crónica derivada de una prolongada exposición a dosis muy bajas a uno o a varios de estos productos, o a la

ingesta de alimentos que los contienen y, por otro lado, puede tener lugar una toxicidad aguda causada accidentalmente durante su manipulación. Entre los principales efectos crónicos que provocan en los seres humanos cabe destacar alteraciones en el sistema nervioso, endocrino y reproductivo (esterilidad), mutagénesis o carcinogénesis, entre otros, mientras que la dermatitis, quemaduras, vómitos, diarreas, cefaleas, pérdida de la conciencia, abortos o somnolencia son algunos de los efectos agudos producidos [5].

En las últimas décadas, el comportamiento de los plaguicidas en cuanto a su distribución en el medio ambiente ha sido ampliamente estudiado, poniéndose de manifiesto la elevada complejidad de sus transformaciones una vez que son liberados en el medio, ya que pueden provocar diferentes tipos de contaminaciones, desde inmediatas y puntuales hasta persistentes y tardías [6]. Es de resaltar que la actividad agrícola es la fuente primordial de exposición a plaguicidas [4,7]. Gran parte del producto aplicado se deposita en suelos y aguas colindantes o se dispersa en la atmósfera, pudiendo ser transportado largas distancias a través del aire [8]. Esta situación depende de las condiciones climáticas como la lluvia y la dirección e intensidad del viento, de las características geológicas como el tipo de suelo y la presencia de corrientes de agua, y de otros factores como la fórmula y la presentación del producto (líquido, polvo, gel, gas, etc.), así como de la técnica de aplicación (aérea, terrestre, etc.) [9]. Los vientos fuertes, las temperaturas altas y los terrenos poco estables favorecen el arrastre del producto, así como las presentaciones en polvo o aerosoles. Otros fenómenos que favorecen la diseminación ambiental de estos compuestos son la fotodegradación y la volatilización, además de la lixiviación y el lavado superficial del suelo, relacionadas ambas con las corrientes de agua y con la lluvia [10,11]. Estos últimos son los responsables de que gran parte del producto aplicado contamine el medio acuático.

La contaminación de aguas superficiales y subterráneas por plaguicidas está muy extendida [5] y se rige por las características fisicoquímicas de los compuestos (solubilidad en agua, capacidad de ser retenidos por los componentes del suelo y su tasa de degradación), las propiedades del medio en que se aplican, y otros factores externos tales como los patrones de lluvia y vientos locales o la topología de la zona [12-15]. Una vez que los plaguicidas se encuentran en el medio acuático, la calidad de

las aguas superficiales y subterráneas, las cuales constituyen las fuentes de agua potable para gran parte de la población mundial, disminuye sustancialmente.

En el agua, los plaguicidas se encuentran sujetos a una gran variedad de procesos de diverso carácter: físicos (acumulación, deposición, dilución y difusión), químicos (hidrólisis y oxidación), fotoquímicos (fotólisis y fotodegradación) y bioquímicos (biotransformación, biodegradación y bioacumulación) [13,16]. Estos procesos, en algunos casos, pueden dar lugar a sustancias de toxicidad aún mayor que, si se acumulan en los organismos acuáticos, pueden producir efectos ecotoxicológicos en ellos [17,18]. Los niveles de concentración de residuos de plaguicidas son generalmente muy bajos [19], pero su liberación a largo plazo en el medio ambiente, incluso en pequeñas cantidades, conduce a la acumulación, con los consiguientes efectos negativos que esto genera.

Por todo lo expuesto anteriormente, se concluye que la exposición a estos compuestos químicos por parte de la población general es ubicua y tiende a ser crónica [4]. Son diversos los tipos de plaguicidas que, en períodos prolongados, desde múltiples fuentes y a dosis bajas, penetran en el organismo utilizando distintas vías, siendo las principales fuentes de exposición para la población los alimentos de origen vegetal (frutas, verduras, cereales, leguminosas) o animal (carne bovina, porcina y sus derivados, pescado, productos lácteos, huevo, etc.) [20], la exposición al agua, el aire y la tierra contaminados, así como el uso directo de estos productos en el trabajo o en el hogar [21].

A pesar de que en los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo para el desarrollo de sustancias cada vez más eficaces a dosis más pequeñas, la cantidad de plaguicidas empleados sigue siendo aún muy elevada, lo que ha obligado a la adopción de medidas legislativas restrictivas para proteger el medio ambiente contra la contaminación, provocando el desarrollo de leyes que controlen los niveles máximos permitidos para estos compuestos en suelos, aguas superficiales o de consumo y alimentos.

La lista de plaguicidas utilizados es muy larga, pero sólo algunos de ellos están regulados por la Unión Europea (UE). El consejo de la Unión Europea establece en el Anexo I de la Directiva 2013/39/UE [22] una lista de 41 sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, en la que se incluyen las 33 sustancias prioritarias

identificadas en la Directiva 2008/105/CE [23] del Parlamento Europeo y del Consejo, y otros 8 contaminantes que ya estaban regulados por la Unión Europea. De todas ellas, solo aproximadamente la tercera parte son plaguicidas.

En cuanto a los niveles de plaguicidas tolerados en aguas, la Directiva Europea 98/83/EC [24] establece límites máximos permitidos de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ para la concentración individual de cada plaguicida, y $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para la concentración total, en aguas destinadas a consumo humano.

No obstante, las normativas más recientes van encaminadas a la reducción del consumo de estos compuestos químicos. Por ejemplo, en España, en el Real Decreto 1311/2012 [25] se establece el marco de acción para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios, mediante el fomento de la gestión integrada de plagas a partir de planteamientos o técnicas alternativas, tales como los métodos no químicos, logrando así disminuir su uso.

A pesar de esto, la utilización de estos compuestos hoy día sigue siendo muy elevada, por lo que es muy importante el desarrollo de metodologías analíticas sensibles y selectivas que permitan poder determinarlos a los bajos niveles exigidos por la normativa legal vigente, para poder controlar así la calidad de las aguas.

Tendencias actuales para la determinación de plaguicidas en agua

Una revisión bibliográfica sobre los métodos desarrollados para el análisis de plaguicidas en agua, pone de manifiesto que, aunque hace años la espectrofotometría [26,27], espectrofluorescencia [28], técnicas electroquímicas [29,30] o métodos biológicos [31] se emplearon con este objetivo, en las últimas décadas los avances en este campo han estado enfocados al desarrollo de métodos de análisis multiresiduos, con los que sea posible la determinación simultánea de un elevado número de plaguicidas. En este sentido, las técnicas separativas son la herramienta más idónea, sobre todo la GC y la LC, ambas acopladas a módulos de detección mediante espectrometría de masas. Es importante destacar que con estas técnicas también se pretende el seguimiento de los productos de degradación y/o transformación de los contaminantes, con la finalidad de conseguir una completa evaluación del riesgo medioambiental [32].

En las décadas de los 40-60, los plaguicidas organoclorados fueron probablemente el grupo más popular de compuestos empleados en agricultura y, por tanto, fueron el foco de los esfuerzos de investigación de los químicos analíticos. Debido al carácter altamente hidrofóbico y a la relativamente alta estabilidad térmica de estos plaguicidas, la GC fue la técnica más utilizada para su determinación [33,34]. El uso de detectores de captura electrónica altamente sensibles, y de otros detectores selectivos como el detector de nitrógeno fósforo, el detector fotométrico de llama, así como el posterior acoplamiento de columnas GC a un espectrómetro de masas, aumentó aún más la prevalencia de la GC sobre las otras técnicas analíticas utilizadas para el análisis de plaguicidas y de otros contaminantes orgánicos en muestras de agua.

Sin embargo, aunque en la actualidad se sigue empleando la GC con este fin [35], el uso de plaguicidas cada vez más polares y fácilmente degradables ha incrementado el número de métodos que emplean la cromatografía líquida para la determinación de estos compuestos en todo tipo de aguas. Así, actualmente, LC-MS es una de las técnicas más poderosas para el análisis de plaguicidas polares, no volátiles y térmicamente inestables. Concretamente, la cromatografía líquida acoplada a un detector de masas en tándem es hoy en día la técnica clave y una de las más utilizada para la determinación de estos contaminantes en muestras de agua, debido a su alta selectividad y especificidad [36,37].

En las últimas décadas se han publicado multitud de trabajos sobre análisis de plaguicidas mediante esta técnica en aguas superficiales [38-42], subterráneas [38,42-44], aguas de desecho [40,45] y potable [39,41,46,47], principalmente.

A pesar de su fuerte potencial, estas técnicas presentan una limitación respecto al número máximo de compuestos incluidos en el análisis. Por el contrario, los espectrómetros de masas de alta resolución como, por ejemplo, los analizadores de tiempo de vuelo (TOF, *Time Of Flight*), cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF, *Quadrupole Time of Flight*) u Orbitrap, permiten obtener el valor de la masa exacta con un error muy bajo, debido a su alta sensibilidad en modo de adquisición del espectro completo de masas. Por este motivo, ofrecen la posibilidad de investigar la presencia de compuestos no preseleccionados en las muestras una vez efectuado el análisis [48,49]. La principal ventaja de esto es que, aparte de no ser necesario un nuevo análisis, la cantidad de compuestos que pueden ser investigados es enorme.

Además, la alta selectividad (ausencia de interferencias) y especificidad (fórmula empírica correcta asignada) que presentan este tipo de analizadores hacen que su uso sea muy ventajoso en la búsqueda de compuestos desconocidos en las muestras medioambientales, como otros plaguicidas no permitidos o metabolitos de los mismos. Otra ventaja adicional es que la identificación de los compuestos puede llevarse a cabo sin utilizar patrones de referencia [49].

Las muestras ambientales en general, y las de agua en particular, presentan una composición compleja que, junto con los bajos niveles de concentración en los que se encuentran en ellas los plaguicidas de interés, hace que la etapa de preparación de la muestra previa al análisis sea crucial, ya que debido a la gran manipulación a la que se somete la muestra con el objetivo de preconcentrar los compuestos y separarlos de potenciales interferencias, se pueden cometer fácilmente errores experimentales o de contaminación adicional. En esta etapa, la SPE, tanto *on-line* como *off-line*, ha sido la técnica más utilizada para la extracción de los analitos, aunque la LLE [50], la microextracción en fase sólida (SPME, *Solid Phase MicroExtraction*) [51], la microextracción en fase líquida (LPME, *Liquid Phase MicroExtraction*) [52], la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME, *Dispersive Liquid-Liquid MicroExtraction*) [35] y la extracción por sorción en barra agitadora (SBSE, *Stir Bar Sorptive Extraction*) [53] también han sido ampliamente empleadas, no solo en muestras de agua, sino también en otro tipo de muestras como suelos o alimentos.

A pesar de que estas técnicas también son eficientes para la extracción de los plaguicidas y para la limpieza de la muestra antes de la determinación cuantitativa [54], la SPE permite emplear un volumen de muestra más pequeño y, en comparación con la LLE, necesita un menor volumen de disolventes orgánicos, además de proporcionar mejores recuperaciones en la extracción de la mayoría de plaguicidas [55]. Además, la conexión en línea con LC-MS (SPE *on-line*) resulta en una preparación automatizada de la muestra y del procedimiento analítico que ha sido muy utilizado en los últimos años, y cuyas principales ventajas se comentarán más adelante. Por otra parte, la inexistencia de un extracto final para determinaciones paralelas puede representar una desventaja en comparación con los procedimientos *off-line* [56].

III.1.1.2. Contaminantes emergentes

Los contaminantes emergentes se definen como aquellos contaminantes previamente desconocidos o no reconocidos como tales, cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva, pero sí la preocupación por las posibles consecuencias de la misma. Abarcan una amplia gama de productos químicos artificiales, principalmente fármacos y productos de cuidado personal y del hogar (PPCPs, *Pharmaceuticals and Personal Care Products*) y disruptores endocrinos, entre otros, los cuales son extensamente usados en todo el mundo y, además, son indispensables para la sociedad moderna [57,58]. También se engloban dentro de los contaminantes emergentes los surfactantes que se emplean en la industria, principalmente detergentes, agentes adherentes, dispersantes, emulsionantes, solubilizantes y agentes espumantes.

Los disruptores endocrinos son productos químicos naturales (como hormonas estrógenas) o sintéticos (como el bisfenol A) que pueden alterar el sistema hormonal de los seres vivos. Los estudios en aves, anfibios y peces demuestran que causan feminización, intersexualidad en machos y desarrollo sexual anormal [59]. Los efectos que pueden causar en el ser humano no son del todo conocidos, aunque se cree que pueden generar cáncer, malformaciones en el desarrollo y esterilidad [60].

Sin embargo, el mayor grupo de estos contaminantes son aquellos que pertenecen al grupo de los PPCPs [61]. En él se incluyen los medicamentos de uso humano y veterinario (principalmente analgésicos, antibióticos o antihipertensivos), las drogas, los suplementos alimenticios, los edulcorantes, la cafeína y la nicotina. También son PPCPs las fragancias, los cosméticos, los protectores solares, los repelentes de insectos, los jabones y los acondicionadores.

Por otra parte, algunos autores también consideran a los plaguicidas como contaminantes emergentes, a pesar de que su efecto nocivo sobre el medio ambiente es ya bastante conocido desde hace muchos años. Respecto a esto, es importante añadir que, aunque estos son conocidos, los metabolitos procedentes de su descomposición y que aparecen en concentraciones elevadas en las aguas no lo son tanto, y a menudo pueden presentar una toxicidad mayor que los compuestos de los que proceden.

Los contaminantes emergentes alcanzan el medio ambiente procedentes de diversas fuentes antropogénicas y están distribuidos en varias matrices ambientales como aire, agua, suelo, sedimentos y receptores ecológicos. No se trata de un grupo de contaminantes particularmente persistentes, aunque por exigencias de su propio diseño son compuestos relativamente poco biodegradables. Además, es importante resaltar que, debido a la elevada producción y consumo de estos compuestos, y a la consecuente continua introducción de los mismos en el medio ambiente, no necesitan ser persistentes para ocasionar efectos negativos.

De todos los contaminantes nombrados anteriormente, los plaguicidas y los productos farmacéuticos son los más detectados en muestras medioambientales, particularmente en agua [62].

La presencia de productos farmacéuticos en el agua natural se considera un problema ambiental debido a su potencial riesgo toxicológico sobre organismos vivos, incluso a bajas concentraciones [62,63]. La mayoría son fácilmente transportados al medio acuático donde se incorporan a través de varias vías como los residuos domésticos, excreción de medicamentos no metabolizados, vertidos de productos no utilizados, vertidos de la industria farmacéutica y hospitales, de efluentes de aguas residuales de plantas de tratamiento municipales, y aquellos procedentes de la actividad ganadera [64]. Debido a su alta polaridad y baja volatilidad, son capaces de penetrar en todas las etapas del ciclo del agua [65], planteando un serio peligro para las redes de suministro.

Estos compuestos no son separados en las plantas de tratamiento de aguas residuales, ya que los sistemas convencionales de depuración no son capaces de eliminarlos por completo, por lo que contaminan fácilmente ríos, lagos, estuarios, y pueden estar presentes también en las aguas potables [66]. Así, numerosos análisis han confirmado la presencia de residuos de medicamentos y sus metabolitos en los diferentes compartimentos del medio acuático: aguas residuales, agua subterránea, agua superficial y agua potable [67].

Tendencias actuales para la determinación de contaminantes emergentes

Los distintos tipos de contaminantes emergentes han sido analizados por muy diversas técnicas entre las que destacan la fotometría y fluorescencia clásica o acopladas a sistemas de análisis por inyección en flujo [68,69], la cromatografía líquida acoplada a un sistema de detección fluorescente [70] o fotométrico [71] y mediante el uso de algoritmos quimiométricos, fundamentalmente de segundo orden [72,73], basados en el uso de señales fluorescentes o cromatográficas.

No obstante, al igual que sucede con los plaguicidas, en los últimos años la espectrometría de masas se ha alzado como la técnica de referencia para el análisis de contaminantes emergentes, tanto acoplada a cromatografía líquida [74,75] como gaseosa [76,77], debido a su carácter complementario cuando se enfrentan a una amplia gama de contaminantes orgánicos de diferente polaridad y volatilidad. Concretamente, se ha observado una tendencia clara hacia el uso de analizadores de alta resolución, ya que permiten realizar una variedad de tareas como cuantificación y confirmación de los analitos, análisis retrospectivo, y descubrimiento de metabolitos y productos de transformación [78]. Por ejemplo, la GC ha sido acoplada al sector magnético, sobre todo para el análisis de dioxinas, y también ha crecido el interés por los analizadores Orbitrap y TOF [79-81].

Por otra parte, el empleo de diversos nanomateriales en análisis de compuestos químicos emergentes ha experimentado un crecimiento rápido en los últimos años, convirtiéndose en una de las tendencias más importantes en el análisis de muestras medioambientales. Esto es debido a que muchos estudios han puesto de manifiesto que son capaces de jugar papeles importantes en diversas técnicas para mejorar su sensibilidad y selectividad, así como para simplificar los procedimientos analíticos y aumentar su rendimiento [82]. Así, entre otras aplicaciones, estos materiales han sido empleados en detección electroquímica, como hilos moleculares para mejorar la transferencia de electrones o como catalizadores para acelerar las reacciones químicas. Además, pueden utilizarse como fases estacionarias o adsorbentes debido a su gran superficie y afinidad específica para las moléculas de contaminantes.

En cuanto a los niveles en los que se encuentran en las muestras de agua, podemos destacar que la determinación de contaminantes emergentes presenta una

problemática similar a la comentada anteriormente para los plaguicidas, puesto que se encuentran en concentraciones del orden de partes por billón, o incluso partes por trillón, en este tipo de muestras. Por este motivo, recurrir al empleo de sistemas de pretratamiento de la muestra encaminados a la preconcentración de estos compuestos resulta inevitable, empleando para ello las mismas técnicas enumeradas en el caso anterior [83,84], siendo el uso del sistema SPE *on-line* el que de nuevo presenta mayor relevancia en las publicaciones más recientes [85,86].

III.1.2. Descripción de las técnicas analíticas empleadas en esta parte de la Memoria

En la sección experimental de esta segunda parte de la Memoria se expone el desarrollo de dos métodos de análisis para estos tipos de compuestos. Uno de ellos se ha enfocado hacia la determinación de un grupo de herbicidas, mediante cromatografía líquida de ultra eficacia acoplada a detección con espectrometría de masas de triple cuadrupolo en muestras de agua. En el segundo, en el que nos hemos centrado en el análisis de contaminantes emergentes, se plantea una metodología basada en uso de señales fluorescentes procesadas mediante algoritmos de calibración multivariante de segundo orden. Estos algoritmos ya han sido descritos en el apartado I.1.3.1 de la Parte I de esta Memoria, por lo que a continuación se expondrán las características más relevantes de la espectrometría de masas.

III.1.2.1. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)

Acoplamiento de la cromatografía líquida de ultra eficacia a la espectrometría de masas (UHPLC-MS)

Como se ha explicado en la Parte II de esta Memoria, en los últimos años la cromatografía líquida ha experimentado mejoras considerables en cuanto a instrumentación, con el objetivo de lograr análisis más rápidos manteniendo un rendimiento cromatográfico aceptable o, dicho de otro modo, conseguir una mayor resolución de los compuestos en un tiempo de análisis razonable [87]. Estos avances han sido impulsados principalmente por los incrementos constantes en el número de

análisis realizados en algunos campos como, por ejemplo, en toxicología, análisis ambiental, química clínica y control antidopaje, y a que además en estos casos el tiempo de entrega de los resultados del análisis debe ser el mínimo posible [88]. En este sentido, la introducción de columnas con relleno de partículas porosas con tamaño inferior a 2 μm y la extensión del límite superior de presión en los instrumentos cromatográficos hasta 1300 bar ha abierto nuevas fronteras en la resolución y velocidad de análisis [89]. Sin embargo, en el acoplamiento entre UHPLC y espectrometría de MS existen ciertas restricciones. La primera de ellas está relacionada con los picos cromatográficos tan estrechos obtenidos con UHPLC, que requieren analizadores de MS con altas velocidades de barrido, que sólo están disponibles en las últimas generaciones de dispositivos de MS. Esto es necesario para que puedan llevarse a cabo las medidas suficientes (puntos de adquisición por pico) de forma que el pico cromatográfico que proporciona el compuesto se defina correctamente y se eviten pérdidas de sensibilidad. Se ha establecido que para fines cuantitativos son necesarios al menos entre 10 y 15 puntos de adquisición por pico, sin embargo, este criterio puede ser difícil de cumplir dependiendo de la velocidad de barrido del analizador empleado. Así, algunos analizadores son más fácilmente compatibles con UHPLC (por ejemplo QqQ o TOF) que otros (trampa de iones o transformada de Fourier-MS).

En segundo lugar, como en UHPLC la velocidad lineal de la fase móvil es mayor, la fuente de ionización debe ser capaz de proporcionar alta sensibilidad a caudales de flujo relativamente elevados, al menos de hasta 1 mL min⁻¹.

A pesar de estas limitaciones, los instrumentos UHPLC-MS han sido empleados con éxito en la última década para múltiples aplicaciones como bioanálisis, análisis de fármacos y sus metabolitos, metabolómica, análisis medioambiental, etc.

Espectrometría de masas: fuentes de ionización

La espectrometría de masas es una técnica empleada tanto para la identificación de compuestos desconocidos, como para la cuantificación de compuestos conocidos, así como para elucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas. Se fundamenta en la separación de partículas moleculares o atómicas por su diferente relación masa/carga (m/z).

El proceso de la espectrometría de masas comprende, básicamente, cuatro etapas: a) introducción de la muestra líquida en el sistema y generación de moléculas, fragmentos moleculares y/o átomos en fase gaseosa, b) ionización de los átomos o moléculas con la consiguiente pérdida de electrones o protones, c) separación de los iones formados según su relación m/z y d) detección de los iones, en condiciones de alto vacío, para obtener finalmente el espectro de masas deseado, en el que se presenta la abundancia relativa de los iones y fragmentos separados respecto a la relación m/z .

El acoplamiento de este sistema de detección a la cromatografía líquida fue descrito por primera vez por Baldwin y McLafferty en 1973 [90], y representó un avance muy importante en el desarrollo de esta técnica. Sin embargo, el progreso y las aplicaciones de LC-MS estuvieron restringidos durante muchos años debido a que las fuentes de ionización existentes no eran compatibles con el flujo continuo de líquidos. El principal desafío para los investigadores fue conseguir la manera de introducir elevados flujos de fase móvil, típicamente de 1 mL min^{-1} , en un sistema de detección que requiere alto vacío. Otro desafío consistió en superar la barrera que suponía la falta de afinidad entre un detector de MS y las fases móviles no volátiles frecuentemente empleadas en LC, así como resolver las dificultades para ionizar analitos no volátiles o lábiles térmicamente. A principio de los años 70, el desarrollo de la ionización química a presión atmosférica (APCI, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) [91-93] supuso un gran avance, pero fue el desarrollo de la interfase mediante ionización por electrospray (ESI, *Electrospray Ionization*) en 1989 por Fenn y col. [94] la que mejoró sustancialmente el análisis de moléculas polares con pesos moleculares medios y térmicamente inestables. Como reconocimiento a su contribución a la Química Analítica, John B. Fenn recibió el premio Nobel de Química en 2002.

A continuación, se explicarán los fundamentos de las principales interfases empleadas en LC-MS:

En la interfase APCI, el mecanismo se basa en un proceso de ionización química en el que las moléculas de la fase móvil actúan como gas reactivo, una vez ionizadas por una descarga de electrones. De este modo, el flujo proveniente de LC se nebuliza en un tubo vaporizador de sílice fundida caliente donde el disolvente se evapora casi por completo. La mezcla gas-vapor entra en la fuente a presión atmosférica donde se

produce la ionización química mediante los electrones que se generan en una aguja corona, donde se aplica un potencial comprendido entre 2-5 kV. Entre las moléculas del analito y las de la fase móvil tienen lugar reacciones de transferencia protónica en fase vapor y, como resultado, se pueden obtener moléculas de analito protonadas, desprotonadas y también aductos con moléculas de solvente de la propia fase móvil o con modificadores añadidos en ella o en el vial, siendo muy comunes los aductos de sodio y de amonio. Los aductos formados con moléculas de solvente (H_3O^+ , CH_3OH_2^+ , CH_3CNH^+ , etc.) se suelen convertir en $[\text{M}+\text{H}]^+$ cuando aumenta el voltaje de cono, ya que la primera fragmentación que sufren (fragmentación de cono) es la pérdida de la molécula de solvente. Para la formación de aductos suele ser necesario la incorporación de modificadores. Generalmente, los aductos de sodio y potasio suelen descartarse como iones precursores debido a su baja fragmentación y poca reproducibilidad, prefiriéndose trabajar con el ion molecular protonado o, en su defecto, con el aducto de amonio, ya que éstos suelen requerir aditivos más volátiles y más compatibles con MS, como el ácido fórmico o el acetato de amonio.

Cuando el acoplamiento LC-MS se lleva a cabo mediante una interfase ESI, los analitos disueltos en la fase móvil pasan al detector de MS a través de un capilar metálico, en cuya punta se aplica un potencial de 3 a 6 kV a presión atmosférica, generándose a su salida un aerosol de gotas microscópicas cargadas. A continuación, y como consecuencia de la elevada diferencia de potencial, se produce una evaporación hasta que el tamaño de las gotas es tal que existe una densidad de carga suficiente para que se liberen iones de la muestra de la superficie de las gotas. La mayor parte de las moléculas de disolvente se evaporan (desolvatación) al atravesar la región a presión atmosférica de la fuente del espectrómetro de masas (a unos 120 °C). Dicha desolvatación es asistida por una corriente de nitrógeno (a unos 350 °C), generándose iones con una o más cargas eléctricas que se transfieren a través de lentes focalizadoras al analizador de masas. Hoy en día, la ESI está considerada como la interfase de referencia para el acoplamiento entre LC y MS. Para lograr rendimientos aceptables en cuanto a ionización de los compuestos y sensibilidad, el flujo óptimo de líquido proveniente de la columna cromatográfica debe estar comprendido entre 0,05 y 0,3 mL min⁻¹, aunque esto depende de la geometría de la fuente y del flujo del gas nitrógeno.

Al igual que ocurre en APCI, los iones que se forman pueden ser de carga positiva o negativa. Cuando la ionización tiene lugar en modo positivo, los iones normalmente se presentan como moléculas protonadas, aductos de sodio, potasio o amonio, mientras que en modo negativo corresponden a moléculas desprotonadas o aductos de formiato o acetato.

Para limitar la pérdida de sensibilidad que puede tener lugar en MS a elevadas velocidades de flujo de la fase móvil, se han propuesto diversas soluciones técnicas relacionadas con la modificación del diseño de la fuente y sus especificaciones. Así, la casa comercial Agilent Technologies recientemente ha incluido una característica adicional a sus fuentes de ionización ESI, denominada "*Jet Stream*" [95]. Esta tecnología, la cual se ha empleado en el trabajo experimental expuesto en esta Memoria, consiste en utilizar una corriente de gas adicional calentado a 350 °C con un caudal de 11 mL min⁻¹, el cual se centra en el aerosol y desolvata los iones de forma más eficiente, mejorando así la sensibilidad incluso a velocidades de flujo más altas. Según el proveedor, con este sistema se logra un aumento de 5 a 10 veces en la sensibilidad para flujos comprendidos entre 0,25 hasta 2 mL min⁻¹. Una de las principales desventajas de esta estrategia es que el consumo de gas es significativamente más alto en comparación a una interfaz ESI convencional. Sin embargo, la mayoría de los laboratorios analíticos que poseen instrumentos de MS se encuentran equipados con generadores de nitrógeno y, por lo tanto, el coste asociado es bastante limitado.

La principal diferencia entre ambas interfases se encuentra en el estado de las moléculas de analito durante el proceso de ionización. Así, mientras que ESI en primer lugar ioniza los compuestos y posteriormente elimina el disolvente con ayuda de una corriente de gas inerte a alta temperatura, APCI actúa de manera inversa, es decir, en primer lugar calienta la fase móvil que eluye de la columna y luego con una aguja aplica una corona de descarga para ionizar las moléculas gaseosas. ESI, por tanto, es más idónea para aquellas sustancias susceptibles de ionizarse en disolución, es decir las más polares, mientras que APCI se emplea más para sustancias apolares. La eficacia de ESI frente a APCI radica en que, al ionizar en primer lugar, los iones de igual carga formados se repelen entre sí, por lo que la nebulización y evaporación del disolvente posterior es más fácil y rápida.

Aunque en un principio fueron diseñadas como dos interfases independientes, en los últimos años han comenzado a comercializarse de forma conjunta como fuentes de doble función, donde ambas se intercambian en tiempos de adquisición muy bajos. Esta doble funcionalidad abre las puertas al desarrollo de metodologías de análisis que pueden abarcar un mayor número de compuestos en un mismo método de análisis.

Aunque APCI y ESI son las fuentes de ionización más empleadas en su acoplamiento a LC, en las últimas décadas se han desarrollado otras como la fotoionización a presión atmosférica (APPI, *Atmospheric Pressure Photoionization*) [96], la cual surgió como alternativa para el análisis de moléculas apolares y de bajo peso molecular. En este caso, el flujo de líquido de salida de la columna cromatográfica se evapora nebulizándolo a alta temperatura de una forma similar a APCI, generando una nube de gas con analitos en fase gaseosa. La principal diferencia respecto a ella es que, en lugar de aplicar voltaje para conseguir la ionización, se aplica radiación electromagnética, concretamente la ionización se provoca por un haz de fotones emitido por una lámpara de ultravioleta. Se han descrito dos tipos de APPI: la directa y aquella que necesita un compuesto dopante que favorezca la ionización. En la APPI directa las moléculas se ionizan cuando su primer potencial de ionización (usualmente entre 7 y 10 eV) es menor al de la energía del fotón. Tras la absorción de un fotón, los iones cambian el estado energético de un electrón que es emitido, obteniéndose cationes radicales. En el caso de APPI con dopante, son las moléculas de este compuesto las que absorben los fotones para que, una vez ionizados, se los transmitan a las moléculas de los analitos de la muestra.

Finalmente, otra interfase de reciente desarrollo es la ionización por láser a presión atmosférica (APLI, *Atmospheric Pressure Laser Ionization*) [97], la cual basa la ionización en la excitación molecular producida por un flujo de fotones a una frecuencia fija de 248 nm creada por un láser, y presenta una aplicación muy interesante para el análisis de compuestos apolares como los hidrocarburos policíclicos aromáticos.

Espectrometría de masas: analizadores

La principal diferencia entre los diversos espectrómetros de masas se encuentra en el tipo de analizador utilizado. La función del analizador es la separación, trabajando a muy bajas presiones, de los iones en fase gaseosa que se han formado en la fuente de ionización, en función de su relación m/z . La capacidad de un espectrómetro de masas para distinguir entre masas se expresa normalmente en términos de resolución, definiéndose como la capacidad de separar iones de masas adyacentes. La resolución está íntimamente ligada a la sensibilidad, de manera que cuando se trabaja con mucha resolución la sensibilidad que se obtiene suele ser deficiente, y viceversa.

Los espectrómetros de masas se clasifican principalmente en función del principio de operación del analizador de masas. Los analizadores de mayor relevancia que se pueden encontrar actualmente en el mercado son el de cuadrupolo (Q, *Quadrupole*) y la trampa de iones (IT, *Ion Trap*) dentro del grupo de los analizadores de masas de baja resolución, y el TOF, Orbitrap, sector magnético y resonancia ciclotrónica con transformada de Fourier (FT-ICR, *Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance*) como principales analizadores de alta resolución. Cada tipo de analizador posee características y aplicaciones especiales, así como beneficios y limitaciones. La selección del tipo de analizador a utilizar debe realizarse en base a que aplicación se le dará, el costo y el rendimiento deseado, ya que el analizador determina varias características del resultado del experimento, entre estas la resolución y el rango de m/z de los iones que pueden ser medidos.

De todos los analizadores citados, a continuación se explicarán las características y modos de trabajo del analizador cuadrupolar, puesto que es el que se ha utilizado en el desarrollo experimental del trabajo que se presenta en esta parte de la Memoria.

➤ Analizador de Masas Cuadrupolo (Q)

Un analizador cuadrupolar consiste en cuatro barras cilíndricas o hiperbólicas, alineadas paralelamente entre sí, equidistantes a un eje central imaginario situado sobre el eje z . Mediante la aplicación de voltajes variables de corriente continua y de radiofrecuencia a cada pareja de barras opuestas, se consigue que los iones de una

relación m/z determinada pasen por el túnel formado por las 4 barras siguiendo trayectorias oscilantes estables que conducen al detector, mientras que el resto de los iones se desvía. Variando rápidamente el voltaje aplicado se pueden seleccionar los iones de diferentes masas que llegan al detector. De este modo, el cuadrupolo actúa como un filtro de iones, discriminándolos en función de su relación m/z .

Actualmente, los cuadrupolos son los analizadores más usados para estudios cuantitativos de los denominados compuestos *target* (diana), es decir, de compuestos previamente seleccionados, que son los que se quieren determinar. La razón reside en el hecho de que ofrecen buenas sensibilidades para la determinación de analitos a niveles de concentración muy bajos en un rango de masas de hasta 4000 m/z , además de buena reproducibilidad y precisión en la cuantificación a un precio razonable.

➤ Analizador Triple Cuadrupolo (QqQ) o analizador de masas en tándem (MS/MS)

La posibilidad de poder acoplar dos analizadores de espectrometría de masas aumenta considerablemente el potencial y las posibilidades que ofrece la técnica de LC-MS. De hecho, la espectrometría de masas en tándem es hoy día una de las técnicas más empleada en el análisis multiresiduo por su versatilidad y las prestaciones que ofrecen en cuanto a sensibilidad y selectividad.

Este instrumento se caracteriza por el acoplamiento de dos cuadrupolos (Q), mediante uno intermedio que hace de celda de colisión (q). Aquí es importante resaltar que, aunque usualmente se emplea la denominación de triple cuadrupolo para este tipo de analizadores, la celda de colisión suele ser un hexapolo u octapolo, y su diseño está dirigido a potenciar la eficiencia en la transmisión de los iones desde la celda de colisión hasta el segundo cuadrupolo, además de presentarse como un espacio adecuado para la fragmentación. Así, en el primer cuadrupolo (Q_1) se selecciona la relación m/z de interés, que se suele denominar como ión precursor, el cual pasa a la celda de colisión donde se fragmenta en varios iones producto, los cuales son separados y seleccionados en el segundo cuadrupolo (Q_2).

El analizador QqQ ofrece una gran versatilidad, ya que permite la adquisición de datos en diferentes modos, dependiendo de cómo opere cada uno de los

cuadрупolos. Cada uno de esos modos de adquisición presenta unas características que lo hacen idóneo para un objetivo en concreto:

- Barrido de todos los iones (*full scan*): En este modo todas las moléculas que se ionizan en la interfase llegan al detector donde se registra un espectro de masas continuo en un rango definido. La selección de los iones tiene lugar en Q_1 .
- Monitorización de un ión seleccionado (SIM, *Selected Ion Monitoring*): Este modo de adquisición está dirigido a la medida de uno o varios iones específicos, que son seleccionados en el primer cuadrupolo.

Para trabajar con cualquiera de estos dos modos basta con disponer de un analizador de cuadrupolo simple, puesto que ni la celda de colisión ni el segundo cuadrupolo (Q_2) actúan en el proceso de selección. El primer modo ofrece información cualitativa (con una serie importante de limitaciones), mientras que el segundo tiene fines cuantitativos.

- Barridos de iones producto (*Product Ion Scan*): Este barrido se lleva a cabo seleccionando en el primer cuadrupolo (Q_1) una o varias m/z concretas (iones precursores), las cuales pasan a la celda de colisión donde son a su vez fragmentadas en varios iones (iones productos) con una energía de colisión determinada para cada ión precursor, y en presencia de un gas inerte. Dichos iones productos son seleccionados en modo *full scan* por Q_2 , de forma que se obtiene la medida de todos los fragmentos del ión precursor. Este modo de adquisición es ideal para la obtención de la máxima información estructural del ión precursor.
- Monitorización de la reacción seleccionada (SRM, *Selected Reaction Monitoring*): También llamado modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). En este caso se selecciona el ión precursor (o iones precursores) en Q_1 , el cual se fragmenta en la celda q en varios iones productos. De cada ión precursor,

únicamente un ión producto es seleccionado por Q_2 . Este modo es muy adecuado para el análisis de un grupo de compuestos con estructura muy similar, ya sean o no de la misma familia, o para el análisis de metabolitos provenientes de un mismo analito. Con este último modo de trabajo, el cual ha sido utilizado en el trabajo presentado en esta Tesis, se consigue aumentar de manera significativa la relación S/N al disminuir considerablemente el ruido químico repercutiendo en un notable aumento de la sensibilidad. Además, trabajar con transiciones específicas se traduce en métodos altamente selectivos, pudiendo utilizarse el análisis con finalidad confirmatoria.

En este modo de adquisición, el *dwell time*, es decir, la cantidad de tiempo que el instrumento recoge las señales para una determinada m/z , es otro factor muy importante a tener en cuenta. Este parámetro debe seleccionarse como un compromiso entre la sensibilidad requerida y la velocidad de adquisición de datos según las anchuras de pico alcanzado con UHPLC y el número de compuestos (o número de transiciones) que debe ser monitorizado [98]. Este parámetro depende del número de transiciones que mida el equipo en un determinado intervalo de tiempo, es decir, aunque en MS para compuestos con diferentes transiciones no hay problema de solapamiento de picos, si en un determinado intervalo de tiempo el detector debe medir muchas transiciones, menor será el tiempo que pueda tomar medidas de cada una de ellas y, por tanto, menor será la sensibilidad alcanzada para esos compuestos. Normalmente, los instrumentos actuales disponen de un software que permite programar el intervalo de tiempo en el que medir una determinada transición, evitando que el analizador tome medidas de cada una de ellas durante todo el tiempo de análisis.

Como ya se ha comentado anteriormente, mediante el uso de LC-MS/MS se consigue incrementar tanto la sensibilidad como la selectividad de los métodos de análisis, aumentando la seguridad de que el compuesto determinado, incluso a muy bajos niveles de concentración, sea el analito buscado y no otro componente de la matriz. La gran selectividad que proporciona la técnica evita, en general, tener que realizar separaciones cromatográficas exhaustivas, incluso en compuestos de polaridades muy similares que coeluyen. Así, en LC-MS/MS podemos obtener una “doble separación”, una producida en la columna cromatográfica y la otra en el

analizador. De este modo, se pueden diferenciar analitos con idéntico tiempo de retención pero con distintas transiciones y viceversa. A pesar de ello, no debe menospreciarse el papel que juega la cromatografía en la disminución del efecto matriz y en las posibles interferencias que podrían afectar a alguna de las transiciones adquiridas.

Estudio del efecto matriz

A pesar de que en la etapa de preconcentración usualmente llevada a cabo para el análisis de plaguicidas, y en la separación cromatográfica en sí, ya se reduce de manera importante la presencia de interferentes procedentes de la muestra, éstos no son completamente eliminados y, en algunos casos, cabe la posibilidad de que ciertos compuestos estructuralmente semejantes al analito se preconcentren al mismo tiempo que éste, generando el efecto contrario al buscado. Cuando dichos compuestos no deseados pasan al analizador de masas pueden interferir en el proceso de ionización del analito, produciendo una exaltación o supresión de la señal analítica y generando lo que se conoce como efecto matriz [99]. Este hecho puede afectar directamente a la calidad de los resultados provocando que se generen datos cuantitativamente incorrectos cuando se utilizan patrones preparados en ausencia de la matriz para realizar el calibrado.

Este efecto matriz depende de factores tales como la interfase de ionización utilizada, la matriz objeto del análisis, las características físico-químicas del analito y, sobre todo, de los interferentes que eluyen al mismo tiempo de retención que el analito de interés. Así, la evaluación del efecto matriz en métodos mediante LC-MS es fundamental para asegurar la calidad del método desarrollado y es, por tanto, una parte esencial en la etapa de validación.

Para eliminar o reducirlo al máximo, existen diversas aproximaciones cuya aplicabilidad variará en función de los analitos estudiados, el tipo de matriz, los niveles de concentración en los que se encuentran los analitos de interés, el coste de los análisis, el número de muestras a analizar, etc. A continuación, se comentan más detalladamente cada una de las posibles alternativas.

La corrección preferida del efecto matriz es, sin duda, la utilización de patrones internos. Se considera patrón interno aquel compuesto que presente características físico-químicas muy similares a la del analito de interés, es decir, que su retención en la columna cromatográfica, ionización en la fuente y fragmentación sea lo más similar posible a la del analito, y que no se encuentre presente en la muestra real a analizar. Así, la estructura del patrón interno debe ser lo más parecida posible a la del analito para que su ionización se vea afectada del mismo modo. Por este motivo, el patrón interno ideal para corregir el efecto matriz es el mismo analito marcado isotópicamente, ya que de esta forma nos aseguramos la similitud estructural y que no se encuentre presente en la naturaleza.

La elección del patrón interno debe hacerse adecuadamente. En primer lugar, el porcentaje de compuesto marcado en la naturaleza debe ser bajo con el fin de que no interfiera en la correcta cuantificación. Por este motivo son preferibles los marcajes con ^{13}C o D que con ^{37}Cl o ^{34}S , ya que estos son más abundantes en la naturaleza. Aun así, existen ciertas limitaciones a la hora de seleccionar la molécula marcada de manera adecuada. Cuando se usan moléculas deuteradas, el posicionamiento de los D en la estructura debe ser aquel que impida o dificulte en mayor grado su intercambio con H del medio para evitar irreproducibilidades en la señal del patrón interno. En el caso de optar por patrones marcados con ^{13}C , debido a que su abundancia isotópica natural es del 1%, una muestra que contenga el analito sin marcar también aportará ese porcentaje de su concentración a la añadida de patrón interno, en el caso de que tuviéramos una molécula marcada en un solo átomo, por lo que es preferible que los patrones presenten más de un ^{13}C en la molécula. Tampoco es recomendable que el patrón interno presente demasiados átomos marcados isotópicamente, ya que esto puede ocasionar demasiadas diferencias estructurales respecto a las moléculas de analito, lo que llevaría a correcciones insatisfactorias. Así, el número habitual de átomos marcados suele ser entre 2 y 5, aunque esto depende mucho del analito en cuestión.

Las principales limitaciones que presenta el uso de patrones internos marcados isotópicamente son la ausencia de disponibilidad comercial de ciertos compuestos marcados y su elevado coste, incrementándose ambas limitaciones a medida que crece la multiresidualidad del método. Por ello, otro tipo de patrones internos que pueden usarse son sustancias de estructura análoga a las de analito, cuya

probabilidad de encontrarse en la muestra a analizar es muy baja o nula, y que comparten ciertas características con los analitos que les hacen comportarse de manera similar en el proceso de ionización.

Alternativamente, una de las soluciones más sencillas que se puede adoptar para disminuir el efecto matriz es la dilución de las muestras o de los extractos de éstas con el disolvente en el que se encuentran preparados los patrones. Con esta aproximación se consigue disminuir la carga de matriz y, en consecuencia, los interferentes causantes de las inhibiciones o exaltaciones de la señal de los analitos, asemejándose el comportamiento al de los patrones usados para su cuantificación. Para la aplicación de esta aproximación deberemos disponer de sensibilidad suficiente para que, tras la dilución, se puedan todavía alcanzar los límites de detección y cuantificación deseados.

Otra alternativa útil es la realización de un calibrado en matriz. De esta manera, se iguala el efecto matriz al mismo nivel en los patrones de calibración y en las muestras. Así, se consigue corregir el efecto matriz (no eliminarlo), aunque con una probable pérdida de sensibilidad. Este tipo de calibrado se limita a aquellas muestras de igual composición y características, siendo imposible de aplicar cuando las muestras son muy heterogéneas entre sí, como ocurre con la mayoría de muestras medioambientales que, pese a pertenecer a un mismo tipo, pueden diferenciarse mucho en su composición (por ejemplo, aguas superficiales tomadas en distintos puntos pueden tener diferentes matrices que afecten de manera desigual a los analitos). Para poder estudiar si se da este efecto o no, otra limitación de esta técnica es que es necesario disponer de muestras que no presenten el analito de interés o de un blanco homogéneo que comparta las mismas características de la matriz de análisis.

Una última posibilidad es el empleo de la calibración mediante adición patrón, es decir, añadir cantidades crecientes del analito de interés a una cantidad fija de muestra. Las principales limitaciones son básicamente dos: un aumento considerable del tiempo de análisis, ya que se necesitarán varias inyecciones por muestra y la necesidad de prever el nivel esperado de residuo para proceder a realizar las adiciones correctas.

Bibliografía

- [1] http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm#what_pesticide.
- [2] C.S. Parkin, A.J. Gilbert, E.S.E. Southcombe, C.J. Marshall, "British crop protection council scheme for the classification of pesticide application equipment by hazard", *Crop. Prot.* 13 (1994) 281-285.
- [3] M. Tankiewicz, J. Fenik, M. Biziuk, "Determination of organophosphorus and organonitrogen pesticides in water samples", *Trac-Trend. Anal. Chem.* 29 (2010) 1050-1063.
- [4] D.J. Ecobichon, "Pesticide use in developing countries", *Toxicology* 160 (2001) 27-33.
- [5] M.W. Aktar, D. Sengupta, A. Chowdhury, "Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards", *Interdisc. Toxicol.* 2 (2009) 1-12.
- [6] A. Nougadère, J.C. Reninger, J.L. Volatier, J.C. Leblanc, "Chronic dietary risk characterization for pesticide residues: A ranking and scoring method integrating agricultural uses and food contamination data", *Food Chem. Toxicol.* 49 (2011) 1484-1510.
- [7] C. Sattler, H. Kächele, G. Verch, "Assessing the intensity of pesticide use in agriculture", *Agr. Ecosyst. Environ.* 119 (2007) 299-304.
- [8] S. Siddik Cindoruk, Y. Tasdemir, "The investigation of atmospheric deposition distribution of organochlorine pesticides (OCPs) in Turkey", *Atmos. Environ.* 87 (2014) 207-217.
- [9] E. Papadopoulou-Mourkidou, D.G. Karpouzas, J. Patsias, A. Kotopoulou, A. Milothridou, K. Kintzikoglou, P. Vlachou, "The potential of pesticides to contaminate the groundwater resources of the Axios river basin in Macedonia, Northern Greece. Part I. Monitoring study in the north part of the basin", *Sci. Total Environ.* 321 (2004) 127-146.
- [10] D.M. Silburn, J.L. Foley, R.C. deVoil, "Managing runoff of herbicides under rainfall and furrow irrigation with wheel traffic and banded spraying", *Agr. Ecosyst. Environ.* 180 (2013) 40-53.
- [11] M. Kuster, M. López de Alda, D. Barceló, "Liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis and regulatory issues of polar pesticides in natural and treated waters", *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 520-529.

- [12] E. Herrero-Hernández, M.S. Andrades, A. Álvarez-Martín, E. Pose-Juan, M.S. Rodríguez-Cruz, M.J. Sánchez-Martín, "Occurrence of pesticides and some of their degradation products in waters in a Spanish wine region", *J. Hydrol.* 486 (2013) 234-245.
- [13] Z. Vryzas, G. Vassiliou, C. Alexoudis, E. Papadopoulou-Mourkidou, "Spatial and temporal distribution of pesticide residues in surface waters in northeastern Greece", *Water Res.* 43 (2009) 1-10.
- [14] X. Tang, B. Zhu, H. Katou, "A review of rapid transport of pesticides from sloping farmland to surface waters: Processes and mitigation strategies", *J. Environ. Sci.* 24 (2012) 351-361.
- [15] S. Reichenberger, M. Bach, A. Skitschak, H.G. Frede, "Mitigation strategies to reduce pesticide inputs into ground- and surface water and their effectiveness; A review", *Sci. Total Environ.* 384 (2007) 1-35.
- [16] R. Moreno-González, J.A. Campillo, V.M. León, "Influence of an intensive agricultural drainage basin on the seasonal distribution of organic pollutants in seawater from a Mediterranean coastal lagoon (Mar Menor, SE Spain)", *Mar. Pollut. Bull.* 77 (2013) 400-411.
- [17] E. De Gerónimo, V.C. Aparicio, S. Bárbaro, R. Portocarrero, S. Jaime, J.L. Costa, "Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina", *Chemosphere* 107 (2014) 423-431.
- [18] T. Polard, S. Jean, L. Gauthier, C. Laplanche, G. Merlina, J. Sánchez-Pérez, E. Pinelli, "Mutagenic impact on fish of runoff events in agricultural areas in south-west France", *Aquat. Toxicol.* 101 (2011) 126-134.
- [19] A. Masiá, J. Campo, P. Vázquez-Roig, C. Blasco, Y. Picó, "Screening of currently used pesticides in water, sediments and biota of the Guadalquivir River Basin (Spain)", *J. Hazard. Mater.* 263 (2013) 95-104.
- [20] M. Porta, E. Puigdomenech, F. Ballester, J. Selva, N. Ribas-Fito, S. Llop, T. López, "Monitoring concentrations of persistent organic pollutants in the general population: the international experience", *Environ. Int.* 34 (2008) 546-561.
- [21] R. McKinlay, J.A. Plant, J.N.B. Bell, N. Voulvoulis, "Calculating human exposure to endocrine disrupting pesticides via agricultural and non-agricultural exposure routes", *Sci. Total Environ.* 398 (2008) 1-12.

-
- [22] Directiva 2013/39/UE del parlamento europeo y del consejo de 12 de agosto de 2013 por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas.
- [23] Directiva 2008/105/CE del parlamento europeo y del consejo de 16 de diciembre de 2008 relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE y 86/280/CEE del Consejo, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE.
- [24] Directiva 98/83/CE del consejo de 3 de noviembre de 1998 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano.
- [25] Real Decreto 1311/2012, de 14 de septiembre, por el que se establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios.
- [26] A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, A. Zamoro, "Simultaneous determination of pesticides by multivariate spectral analysis and derivative spectrophotometry", *Anal. Chim. Acta* 258 (1992) 47-53.
- [27] T. Galeano Díaz, I. Durán-Merás, M.F. Alexandre Franco, "Stopped flow kinetic-spectrophotometric determination of Diquat in waters", *Water Res.* 36 (2002) 783-787.
- [28] I. Duran-Merás, A. Muñoz de la Peña, M.I. Acedo-Valenzuela, A. Jiménez Girón, "Stopped-flow and kinetic-fluorimetric determination of quinalphos in water samples", *Talanta* 69 (2006) 397-402.
- [29] T. Galeano-Díaz, A. Guiberteau-Cabanillas, A. Espinosa-Mansilla, M.D. López-Soto, "Adsorptive stripping square wave voltammetry (Ad-SSWV) accomplished with second-order multivariate calibration: Determination of fenitrothion and its metabolites in river water samples", *Anal. Chim. Acta* 618 (2008) 131-139.
- [30] T. Galeano Díaz, A. Guiberteau Cabanillas, M.D. Lopez Soto, J.M. Ortiz, "Determination of fenthion and fenthion-sulfoxide, in olive oil and in river water, by square-wave adsorptive-stripping voltammetry", *Talanta* 76 (2008) 809-814.
- [31] S. Galassi, M. Mingazzini, M. Battegazzore "The use of biological methods for pesticide monitoring", *Sci. Total Environ.* 132 (1993) 399-414.
- [32] R.B. Geerdink, W.M.A. Niessen, U.A.T. Brinkman, "Trace-level determination of pesticides in water by means of liquid and gas chromatography", *J. Chromatogr. A* 970 (2002) 65-93.

-
- [33] I. Liška, J. Slobodník, "Comparison of gas and liquid chromatography for analysing polar pesticides in water samples", *J. Chromatogr. A* 733 (1996) 235-258
- [34] G.R. van der Hoff, P. van Zoonen, "Trace analysis of pesticides by gas chromatography", *J. Chromatogr. A* 843 (1999) 301-322.
- [35] M.L. Martins, O.D. Prestes, M.B. Adaime, R. Zanella, "Determination of pesticides and related compounds in water by dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry", *Anal. Methods* 6 (2014) 5020-5027.
- [36] N. Dujaković, S. Grujić, M. Radišić, T. Vasiljević, M. Laušević, "Determination of pesticides in surface and ground waters by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry", *Anal. Chim. Acta* 678 (2010) 63-72.
- [37] A. Masiá, C. Blasco, Y. Picó, "Last trends in pesticide residue determination by liquid chromatography-mass spectrometry", *Trends Environ. Anal. Chem.* 2 (2014) 11-24.
- [38] T. Reemtsma, L. Alder, U. Banasiak, "A multimethod for the determination of 150 pesticide metabolites in surface water and groundwater using direct injection liquid chromatography-mass spectrometry", *J. Chromatogr. A* 1271 (2013) 95-104.
- [39] K. Seebunrueng, Y. Santaladchaiyakit, S. Srijaranai, "Vortex-assisted low density solvent based demulsified dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in water samples", *Chemosphere* 103 (2014) 51-58.
- [40] H. Singer, S. Jaus, I. Hanke, A. Lück, J. Hollender, A.C. Alder, "Determination of biocides and pesticides by on-line solid phase extraction coupled with mass spectrometry and their behaviour in wastewater and surface water", *Environ. Pollut.* 158 (2010) 3054-3064.
- [41] A. Garcia-Ac, P.A. Segura, L. Viglino, A. Fürtös, C. Gagnon, M. Prévost, S. Sauvé, "On-line solid-phase extraction of large-volume injections coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantitation and confirmation of 14 selected trace organic contaminants in drinking and surface water", *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8518-8527.
- [42] T. Reemtsma, L. Alder, U. Banasiak, "Emerging pesticide metabolites in groundwater and surface water as determined by the application of a multimethod for 150 pesticide metabolites", *Water Res.* 47 (2013) 5535-5545.

-
- [43] C. Postigo, M.J. López de Alda, D. Barceló, A. Ginebreda, T. Garrido, J. Fraile, "Analysis and occurrence of selected medium to highly polar pesticides in groundwater of Catalonia (NE Spain): An approach based on on-line solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry detection", *J. Hydrol.* 383 (2010) 83-92.
- [44] M. Köck-Schulmeyera, A. Ginebreda, C. Postigo, T. Garrido, J. Fraile, M. López de Alda, D. Barceló, "Four-year advanced monitoring program of polar pesticides in groundwater of Catalonia (NE-Spain)", *Sci. Total Environ.* 470-471 (2014) 1087-1098.
- [45] M. Köck-Schulmeyer, M. Villagrasa, M. López de Alda, R. Céspedes-Sánchez, F. Ventura, D. Barceló, "Occurrence and behavior of pesticides in wastewater treatment plants and their environmental impact", *Sci. Total Environ.* 458-460 (2013) 466-476.
- [46] L. Maldaner, I.C.S.F. Jardim, "Determination of some organic contaminants in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Talanta* 100 (2012) 38-44.
- [47] S. Narayan Sinha, K. Vasudev, M.V. Rao, M. Odetokun, "Quantification of organophosphate insecticides in drinking water in urban areas using lyophilization and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry techniques", *Int. J. Mass. Spectrom.* 300 (2011) 12-20.
- [48] F. Hernández, T. Portolés, M. Ibáñez, M.C. Bustos-López, R. Díaz, A.M. Botero-Coy, C.L. Fuentes, G. Peñuela, "Use of time-of-flight mass spectrometry for large screening of organic pollutants in surface waters and soils from a rice production area in Colombia", *Sci. Total Environ.* 439 (2012) 249-259.
- [49] F. Hernández, J.V. Sancho, M. Ibáñez, S. Grimalt, "Investigation of pesticide metabolites in food and water by LC-TOF-MS", *Trac-Trend. Anal. Chem.* 27 (2008) 862-872.
- [50] L. Sun, H.K. Lee, "Stability studies of propoxur herbicide in environmental water samples by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization ion-trap mass spectrometry", *J. Chromatogr. A* 1014 (2003) 153-163.
- [51] A. Masiá, Y. Moliner-Martinez, M. Muñoz-Ortuño, Y. Pico, P. Campíns-Falcó, "Multiresidue analysis of organic pollutants by in-tube solid phase microextraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry", *J. Chromatogr. A* 1306 (2013) 1-11.

-
- [52] M.I. Pinto, G. Sontag, R.J. Bernardino, J.P. Noronha, "Pesticides in water and the performance of the liquid-phase microextraction based techniques. A review", *Microchem. J.* 96 (2010) 225-237.
- [53] C. Margoum, C. Guillemain, X. Yang, M. Coquery, "Stir bar sorptive extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of pesticides in water samples: Method validation and measurement uncertainty", *Talanta* 116 (2013) 1-7.
- [54] Y. Picó, M. Fernández, M.J. Ruiz, G. Font, "Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment", *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 117-131.
- [55] R.C. Duca, G. Salquebre, E. Hardy, B.M.R. Appenzeller, "Comparison of solid phase- and liquid/liquid-extraction for the purification of hair extract prior to multi-class pesticides analysis", *J. Chromatogr. B* 955-956 (2014) 98-107.
- [56] P. López-Roldán, M.J. López de Alda, D. Barceló, "Simultaneous determination of selected endocrine disruptors (pesticides, phenols and phthalates) in water by in-field solid-phase extraction (SPE) using the prototype PROFEXS followed by on-line SPE (PROSPEKT) and analysis by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation-mass spectrometry", *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 599-609.
- [57] J.Q. Jiang, Z. Zhou, V.K. Sharma, "Occurrence, transportation, monitoring and treatment of emerging micro-pollutants in waste water - A review from global views", *Microchem. J.* 110 (2013) 292-300.
- [58] A. Kumar, I. Xagorarakis, "Pharmaceuticals, personal care products and endocrine-disrupting chemicals in U.S. surface and finished drinking waters: a proposed ranking system", *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 5972-598.
- [59] E. Diamanti-Kandarakis, J.P. Bourguignon, L.C. Giudice, R. Hauser, G.S. Prins, A.M. Soto, R.T. Zoeller, A.C. Gore, "Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement", *Endocr. Rev.* 30 (4) (2009) 293-342.
- [60] A.M. Soto, C. Sonnenschein, "Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens", *Nat. Rev. Endocrinol.* 6 (2010) 363-370.
- [61] O.A.H. Jones, N. Voulvoulis, J.N. Lester, "Human pharmaceuticals in the aquatic environment a review", *Environ. Technol.* 22 (2001) 1383-1394.

-
- [62] L. Proia, V. Osorio, S. Soley, M. Köck-Schulmeyer, S. Pérez, D. Barceló, "Effects of pesticides and pharmaceuticals on biofilms in a highly impacted river", *Environ. Pollut.* 178 (2013) 220-228.
- [63] J.L. Rodríguez-Gil, M. Catalá, S.G. Alonso, R.R. Maroto, Y. Valcárcel, Y. Segura, R. Molina, J.A. Melero, F. Martínez, "Heterogeneous photo-Fenton treatment for the reduction of pharmaceutical contamination in Madrid rivers and ecotoxicological evaluation by a miniaturized fern spores bioassay", *Chemosphere* 80 (2010) 381-388.
- [64] S. Ortiz de García, G. Pinto Pinto, P. García Encina, R. Irusta Mata, "Consumption and occurrence of pharmaceutical and personal care products in the aquatic environment in Spain", *Sci. Total Environ.* 444 (2013) 451-465.
- [65] R. Breton, A. Boxall, "Pharmaceuticals and personal care products in the environment: regulatory drivers and research needs", *QSAR Comb. Sci.* 22 (2003) 399-409.
- [66] X. Yang, R.C. Flowers, H.S. Weinberg, P.C. Singer, "Occurrence and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in an advanced wastewater reclamation plant", *Water Res.* 45 (2011) 5218-5228.
- [67] P. Houeto, A. Carton, M. Guerbet, A.C. Mauclair, C. Gatignol, P. Lechat, "Assessment of the health risks related to the presence of drug residues in water for human consumption: Application to carbamazepine", *Regul. Toxicol. Pharm.* 62 (2012) 41-48.
- [68] G.M. Escandar, D. González Gómez, A. Espinosa Mansilla, A. Muñoz de la Peña, H.C. Goicoechea, "Determination of carbamazepine in serum and pharmaceutical preparations using immobilization on a nylon support and fluorescence detection", *Anal. Chim. Acta* 506 (2004) 161-170.
- [69] P.D. Tzanavaras, D.G. Themelis, "Review of recent applications of flow injection spectrophotometry to pharmaceutical analysis", *Anal. Chim. Acta* 588 (2007) 1-9.
- [70] L. Patrolecco, N. Ademollo, P. Grenni, A. Tolomei, A. Barra Caracciolo, S. Capria, "Simultaneous determination of human pharmaceuticals in water samples by solid phase extraction and HPLC with UV-fluorescence detection", *Microchem. J.* 107 (2013) 165-171.
- [71] A. Espinosa-Mansilla, M.I. Acedo-Valenzuela, A. Muñoz de la Peña, F. Cañada Cañada, F. Salinas López, "Determination of antitubercular drugs in urine and pharmaceuticals by LC using a gradient flow combined with programmed diode array photometric detection", *Talanta* 58 (2002) 273-280.

- [72] A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña, F. Cañada-Cañada, D. González Gómez, "Determinations of fluoroquinolones and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in urine by extractive spectrophotometry and photoinduced spectrofluorimetry using multivariate calibration", *Anal. Biochem.* 347 (2005) 275-286.
- [73] S. Mas, A. de Juan, R. Tauler, A.C. Olivieri, G.M. Escandar, "Application of chemometric methods to environmental analysis of organic pollutants: A review", *Talanta* 80 (2010) 1052-1067.
- [74] M. Ibáñez, E. Gracia, J.V. Sancho, F. Hernández, "Importance of MS selectivity and chromatographic separation in LC-MS/MS-based methods when investigating pharmaceutical metabolites in water. Dipyrone as a case of study", *J. Mass Spectrom.* 47 (2012) 1040-1046.
- [75] R. Rodil, J. Benito Quintana, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, "Multi-residue analytical method for the determination of emerging pollutants in water by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2958-2969.
- [76] E. Bizkarguenaga, O. Ros, A. Iparraguirre, P. Navarro, A. Vallejo, A. Usobiaga, O. Zuloaga, "Solid-phase extraction combined with large volume injection-programmable temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry for the multiresidue determination of priority and emerging organic pollutants in wastewater", *J. Chromatogr. A* 1247 (2012) 104-117.
- [77] A. Prieto, S. Schrader, M. Moeder, "Determination of organic priority pollutants and emerging compounds in wastewater and snow samples using multiresidue protocols on the basis of microextraction by packed sorbents coupled to large volume injection gas chromatography-mass spectrometry analysis", *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6002-6011.
- [78] F. Hernández, M. Ibáñez, R. Bade, L. Bijlsma, J.V. Sancho, "Investigation of pharmaceuticals and illicit drugs in waters by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry", *Trac-Trend. Anal. Chem.* DOI: 10.1016/j.trac.2014.08.003.
- [79] F. Hernández, J.V. Sancho, M. Ibañez, E. Abad, T. Portoles, L. Mathioti, "Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences", *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 1251-1264.
- [80] M.I. Cervera, T. Portolés, E. Pitarch, J. Beltrán, F. Hernández, "Application of gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for target and non-target

-
- analysis of pesticide residues in fruits and vegetables”, *J. Chromatogr. A* 1244 (2012) 168-177.
- [81] J. Robles-Molina, F.J. Lara-Ortega, B. Gilbert-López, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, “Multi-residue method for the determination of over 400 priority and emerging pollutants in water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry”, *J. Chromatogr. A* 1350 (2014) 30-43.
- [82] Q. Liu, Q. Zhou, G. Jiang, “Nanomaterials for analysis and monitoring of emerging chemical pollutants”, *Trac-Trend. Anal. Chem.* 58 (2014) 10-22.
- [83] C. Mahugo-Santana, Z. Sosa-Ferrera, M.E. Torres-Padrón, J.J. Santana-Rodríguez, “Application of new approaches to liquid-phase microextraction for the determination of emerging pollutants”, *Trac-Trend. Anal. Chem.* 30 (2011) 731-748.
- [84] N. Gilart, R.M. Marcé, F. Borrull, N. Fontanals, “New coatings for stir-bar sorptive extraction of polar emerging organic contaminants”, *Trac-Trend. Anal. Chem.* 54 (2014) 11-23.
- [85] S. Idder, L. Ley, P. Mazellier, H. Budzinski, “Quantitative on-line preconcentration-liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry method for the determination of pharmaceutical compounds in water”, *Anal. Chim. Acta* 805 (2013) 107-115.
- [86] R. Celano, A.L. Piccinelli, L. Campone, L. Rastrelli, “Ultra-preconcentration and determination of selected pharmaceutical and personal care products in different water matrices by solid-phase extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction prior to ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis”, *J. Chromatogr. A* 1355 (2014) 26-35.
- [87] P.W. Carr, D.R. Stoll, X. Wang, “Perspectives on recent advances in the speed of high performance liquid chromatography”, *Anal. Chem.* 83 (2011) 1890-1900.
- [88] V. Viette, D. Guillarme, R. Mylonas, Y. Mauron, M. Fathi, S. Rudaz, D. Hochstrasser, J.L. Veuthey, “A multi-target screening analysis in human plasma using fast liquid chromatography-hybrid tandem mass spectrometry (Part I)”, *Clin. Biochem.* 44 (2011) 32-44.
- [89] M. Rodriguez-Aller, R. Gurny, J.L. Veuthey, D. Guillarm, “Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: Constraints and possible applications”, *J. Chromatogr. A* 1292 (2013) 2-18.

-
- [90] M.A. Baldwin, F.W. McLafferty, "Liquid Chromatography-mass spectrometry interface I: the direct introduction of liquid solutions into a chemical ionization mass spectrometer", *J. Mass. Spectrom.* 7 (1973) 1111-1112.
- [91] E.C. Horning, M.G. Horning, D.I. Carroll, I. Dzidic, R.N. Stillwell, "New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure", *Anal. Chem.* 45 (1973) 936-943.
- [92] D.I. Carroll, I. Dzidic, R.N. Stillwell, K.D. Haegele, E.C. Horning, "Atmospheric pressure ionization mass spectrometry. Corona discharge ion source for use in a liquid chromatograph-mass spectrometer-computer analytical system", *Anal. Chem.* 47 (1975) 2369-2373.
- [93] I. Dzidic, D.I. Carroll, R.N. Stillwell, E.C. Horning, "Comparison of positive ions formed in nickel-63 and corona discharge ion sources using nitrogen, argon, isobutane, ammonia and nitric oxide as reagents in atmospheric pressure ionization mass spectrometry", *Anal. Chem.* 48 (1976) 1763-1768.
- [94] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules", *Science* 246 (1989) 64-71.
- [95] A. Mordehai, J. Fjeldsted, in: Agilent technical note 5990-3494 EN, "Compatibility of Agilent Jet Stream thermal gradient focusing technology with CE/MS" (2009).
- [96] D.B. Robb, T.R. Covey, A.P. Bruins, "Atmospheric Pressure Photoionization: An Ionization Method for Liquid Chromatography-Mass Spectrometry", *Anal. Chem.* 72 (2000) 3653-3659.
- [97] M. Constapel, M. Schellenträger, O.J. Schmitz, S. Gäb, K.J. Brockmann, R. Giese, T. Benter, "Atmospheric-pressure laser ionization: a novel ionization method for liquid chromatography/mass spectrometry", *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 19 (2005) 326-336.
- [98] M. Rodriguez-Aller, R. Gurny, J.L. Veuthey, D. Guillarme, "Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: Constraints and possible applications", *J. Chromatogr. A* 1292 (2013) 2-18.
- [99] C. Ghosh, C.P. Shinde, B.S. Chakraborty, "Influence of ionization source design on matrix effects during LC-ESI-MS/MS analysis", *J. Chromatogr. B* 893-894 (2012) 193-200.

**III.2. Análisis de pesticidas en aguas superficiales
mediante cromatografía de líquidos de ultra eficacia
acoplada a espectrometría de masas de triple
cuadrupolo**

III.2.1. Introducción al artículo científico 6

El acoplamiento de UHPLC a detectores de MS/MS posibilita el desarrollo de métodos rápidos y sensibles, idóneos para el análisis multiresiduos de compuestos en muestras complejas (suelos, aguas, fluidos biológicos). Pese a ser una técnica relativamente reciente y de elevado coste económico, en la bibliografía se pueden encontrar multitud de métodos basados en ella [1,2], la mayoría de ellos con el analizador trabajando en modo MRM, ya que, como se ha explicado en la Introducción de esta parte de la Memoria, este modo de adquisición de datos es muy ventajoso, ya que provee al método de una gran selectividad.

Sin embargo, a pesar de la elevada sensibilidad que se alcanza, en el caso del análisis de plaguicidas en muestras de agua, como ya se ha comentado anteriormente, se requieren etapas previas de tratamiento de la muestra dada la pequeña concentración en la que suelen encontrarse este tipo de compuestos en ellas. Así, normalmente, los métodos de análisis desarrollados para su determinación conllevan largas etapas encaminadas a separar los analitos de la matriz de la muestra antes del análisis, y a la preconcentración de los mismos. Sin embargo, una metodología de preparación de la muestra ideal debe ser rápida, exacta, precisa y consumir poco volumen de muestra y de disolventes orgánicos, los cuales son costosos y perjudiciales para el medio ambiente. Otras demandas para los métodos de extracción moderna incluyen alto rendimiento en la extracción de los compuestos de interés y compatibilidad con el análisis subsecuente. Muchos de estos requisitos se pueden conseguir en cierta medida con la automatización de todas las partes de los métodos analíticos, incluyendo la etapa de preparación de la muestra, sistema de separación y posterior detección [3].

Por este motivo cada vez existe un mayor número de publicaciones en las que esta etapa de preconcentración, normalmente basada en SPE, se lleva a cabo de forma *on-line*. Concretamente, respecto al desarrollo de diferentes métodos multiresiduales para el análisis de plaguicidas en muestras de agua de diferente procedencia, en la bibliografía existe un gran número de referencias donde se emplea esta metodología [4-10]. Es de resaltar que, además de para el análisis de plaguicidas en aguas, esta técnica ha sido aplicada a numerosos analitos en varias matrices, como así está

recogido en dos trabajos de revisión publicados recientemente por Núñez y col. [11] y Pan y col. [12].

El acoplamiento SPE-LC ha sido ampliamente utilizado para el tratamiento directo de muestras acuosas desde su introducción a finales de la década de los 70 y principios de los 80 [13-15]. Las primeras aplicaciones se centraron en el uso de precolumnas rellenas con partículas C18, que permitieron la extracción satisfactoria de plaguicidas apolares y moderadamente polares [16]. Sin embargo, su aplicación es muy limitada en el caso de analitos más polares, para los cuales posteriormente se introdujeron fases adsorbentes con mayor capacidad de retención, tales como rellenos de sílice enlazada [17] o de carbono activado o grafitizado [18]. Estos últimos permiten concentrar compuestos orgánicos altamente polares mediante interacciones hidrofóbicas e interacciones π - π , mientras que las sílices enlazadas se encuentran entre las fases más comunes en SPE, pero son inadecuadas para algunas aplicaciones, ya que, entre otras desventajas, pueden contener grupos silanol libres que interactúan de forma irreversible con algunos compuestos, son inestables a pH extremos y los volúmenes de ruptura de las sílices en fase reversa para moléculas pequeñas y altamente polares son, con frecuencia, insuficientes para su cuantificación a niveles de traza [19].

Otros adsorbentes hidrofílicos desarrollados para mejorar la eficiencia en la retención de los compuestos son los adsorbentes poliméricos [19,20], los cuales retienen a los analitos a través de interacciones π - π y fuerzas de Van der Waals. Los más comunes son los copolímeros derivados del poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB, *PolyStyrene-DiVinylBenzene*), entre los cuales existe una gran variedad de tipos [21]. De todos ellos, los de tipo PLRP-s o PRP-1 [17] son los más utilizados en el modo de SPE *on-line* por las buenas recuperaciones que proporciona. Los cartuchos Oasis HLB (*Hydrophilic Lipophilic Balance*), cuyo sorbente es un copolímero macroporoso basado en polivinilpirrolidona-divinilbenceno (PVP-DVB, *PolyVinylPyrrolidone-DiVinylBenzene*) también poseen capacidad para extraer compuestos con un amplio rango de polaridad y han sido empleados en modo *on-line* [22].

Respecto al acoplamiento entre SPE y LC, se puede destacar que en las primeras aplicaciones se utilizaban montajes instrumentales a base de bombas y válvulas de alta y baja presión, de manera que se podían llevar a cabo preconcentraciones más o menos automatizadas, hasta que posteriormente comenzaron a desarrollarse equipos

instrumentales especialmente diseñados para llevar a cabo esta modalidad de acoplamiento, tales como el OSP-2 de Merk o el PROSPEKT de Spark Holland.

La principal ventaja de la SPE *on-line*, respecto al modo *off-line* es la automatización de los pasos de acondicionamiento del cartucho, paso de la muestra, lavado y elución de los compuestos retenidos. Además, los instrumentos más modernos permiten la extracción de una muestra al mismo tiempo que la anterior se analiza mediante LC. Esto reduce considerablemente el tiempo de pretratamiento y, como consecuencia, el tiempo de análisis global de la muestra también es menor. Por otra parte, la casi inexistente manipulación ésta por parte del analista permite reducir los posibles errores experimentales cometidos durante el análisis, así como el riesgo de contaminación de la muestra o pérdidas del analito por evaporación o por degradación durante la preconcentración. También se consigue una mayor sensibilidad debido a la transferencia y análisis de la totalidad de la especie extraída, en contraste con los procedimientos SPE *off-line* donde sólo una alícuota del extracto se inyecta en la columna. El análisis de toda la muestra conduce a reducir los límites de detección y, consecuentemente, los volúmenes de muestra necesarios para el análisis son menores. Finalmente, en la SPE *on-line* se requiere el empleo de un volumen considerablemente menor de disolvente orgánico [3].

Como todas las técnicas de preconcentración, la técnica SPE-LC puede presentar problemas de selectividad ya que, además de los analitos de interés se pueden extraer y preconcentrar otros interferentes presentes en la muestra. Respecto a esto, cabe destacar que una de las posibles soluciones es el empleo de un sistema de detección muy selectivo como la espectrometría de masas, lo que convierte a la técnica SPE-LC-MS en una herramienta muy potente por su combinación de sensibilidad y selectividad. Aun así, el efecto matriz en muestras complejas sigue estando presente y es un hándicap que, como se ha comentado anteriormente, deber ser cuidadosamente evaluado.

A continuación se presenta el **artículo científico 6**. En este trabajo se aborda el desarrollo y validación de un método multiresiduo para el análisis de un grupo de 37 herbicidas mediante SPE *on-line* acoplada a UHPLC-MS/MS y su posterior aplicación a muestras de aguas superficiales procedentes de la provincia de Almería. Los herbicidas seleccionados, los cuales son ampliamente empleados en la agricultura, pertenecen en su mayoría a las familias de las triazinas, sulfonilureas y fenilureas, entre otras. La

eficacia de la extracción SPE *on-line*, en cuanto a porcentaje de recuperación y tiempo de análisis, ha sido comparada con la de la SPE *off-line* para cada uno ellos. Además, se ha evaluado el efecto matriz de las muestras analizadas empleando diversos procedimientos.

Bibliografía

- [1] M. Rodríguez-Aller, R. Gurny, J.L. Veuthey, D. Guillarme, "Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: Constraints and possible applications", *J. Chromatogr. A* 1292 (2013) 2-18.
- [2] O. Núñez, H. Gallart-Ayala, C.P.B. Martins, P. Lucci, "New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis", *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 298-323.
- [3] S. Rodríguez-Mozaz, M.J. López de Alda, D. Barceló, "Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water", *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 97-115.
- [4] F. Hernández, O.J. Pozo, J.V. Sancho, F.J. López, J.M. Marín, M. Ibáñez, "Strategies for quantification and confirmation of multi-class polar pesticides and transformation products in water by LC-MS2 using triple quadrupole and hybrid quadrupole time-of-flight analyzers", *Trac-Trend Anal. Chem.* 24 (2005) 596-612.
- [5] J.M. Marín, J.V. Sancho, O.J. Pozo, F.J. López, F. Hernández, "Quantification and confirmation of anionic, cationic and neutral pesticides and transformation products in water by on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *J. Chromatogr. A* 1133 (2006) 204-214.
- [6] M. Kuster, M.J. López de Alda, C. Barata, D. Raldú, D. Barceló, "Analysis of 17 polar to semi-polar pesticides in the Ebro river delta during the main growing season of rice by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Talanta* 75 (2008) 390-401.
- [7] H. Singer, S. Jaus, I. Hanke, A. Lück, J. Hollender, A.C. Alder, "Determination of biocides and pesticides by on-line solid phase extraction coupled with mass spectrometry and their behaviour in wastewater and surface water", *Environ. Pollut.* 158 (2010) 3054-3064.
- [8] R. Loos, G. Locoro, S. Contini, "Occurrence of polar organic contaminants in the dissolved water phase of the Danube River and its major tributaries using SPE-LC-MS2 analysis", *Water Res.* 44 (2010) 2325-2335.
- [9] C. Postigo, M.J. López de Alda, D. Barceló, A. Ginebreda, T. Garrido, J. Fraile, "Analysis and occurrence of selected medium to highly polar pesticides in groundwater of Catalonia (NE Spain): An approach based on on-line solid phase

- extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry detection", *J. Hydrol.* 383 (2010) 83-92.
- [10] C. Fernández-Ramos, D. Šatínský, P. Solich, "New method for the determination of carbamate and pyrethroid insecticides in water samples using on-line SPE fused core column chromatography", *Talanta* 129 (2014) 579-585.
- [11] O. Núñez, H. Gallart-Ayala, C.P.B. Martins, P. Lucci, R. Busquets, "State-of-the-art in fast liquid chromatography-mass spectrometry for bio-analytical applications", *J. Chromatogr. B* 927 (2013) 3-21.
- [12] J. Pan, C. Zhang, Z. Zhang, G. Li, "Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography", *Anal. Chim. Acta* 815 (2014) 1-15.
- [13] H.P.M. Van Vliet, T.C. Bootsmann, R.W. Frei, U.A.T. Brinkman, "On-line trace enrichment in high-performance liquid chromatography using a pre-column", *J. Chromatogr. A* 185 (1979) 483-495.
- [14] G.J. De Jong, "The use of a pre-column for the direct high-performance liquid chromatographic determination of the anti-depressants clovoxamine and fluvoxamine in plasma", *J. Chromatogr. B* 183 (1980) 203-211.
- [15] W. Roth, K. Beschke, R. Jauch, A. Zimmer, F.W. Koss, "Fully automated high-performance liquid chromatography: A new chromatograph for pharmacokinetic drug monitoring by direct injection of body fluids", *J. Chromatogr. B* 222 (1981) 13-22.
- [16] C. Erger, T.C. Schmidt, "Disk-based solid-phase extraction analysis of organic substances in water", *Trac-Trend Anal. Chem.* 61 (2014) 74-82.
- [17] A. Namera T. Saito, "Advances in monolithic materials for sample preparation in drug and pharmaceutical analysis", *Trac-Trend Anal. Chem.* 45 (2013) 182-196.
- [18] J. Slobodník, Ö. Öztezkizan, H. Lingeman, U.A.T. Brinkman, "Solid-phase extraction of polar pesticides from environmental water samples on graphitized carbon and Empore-activated carbon disks and on-line coupling to octadecyl-bonded silica analytical columns", *J. Chromatogr. A* 750 (1996) 227-238.
- [19] C.F. Poole, "New trends in solid-phase extraction", *Trac-Trend Anal. Chem.* 22 (2003) 362-373.
- [20] M.C. Hennion, "Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography", *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 3-54.

- [21] N. Fontanals, R.M. Marcé, F. Borrull, "Tendencias en sorbentes poliméricos para la extracción en fase sólida de compuestos polares", *Boletín del Grupo de Cromatografía y Técnicas Afines* 31 (2010) 3-27.
- [22] T. Vega-Morales, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, "Development and optimisation of an on-line solid phase extraction coupled to ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry methodology for the simultaneous determination of endocrine disrupting compounds in wastewater samples", *J. Chromatogr A* 1230 (2012) 66-76.

III.2.2. Artículo científico 6

Journal of Chromatography A, 1305 (2013) 193-202

“Rapid and sensitive on-line solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis of pesticides in surface waters”

María del Carmen Hurtado-Sánchez, Roberto Romero González, María Isabel Rodríguez-Cáceres, Isabel Durán-Merás, Antonia Garrido-Frenich

Abstract

A simple, fast and sensitive method has been developed for the determination of 37 LC-amenable pesticides in surface water samples. On-line solid phase extraction (SPE) coupled to ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) was employed for pre-concentration and analysis of all compounds in 16 min. SPE parameters were evaluated in order to increase sample throughput and detectability. Thus, injected sample volume, sample loading flow, carryover effects and reusability of the cartridges employed were studied, observing that 70 extractions can be performed with the same cartridge. Validation parameters were performed and good linearity ($R^2 > 0.99$ in all cases) and precision (interday relative standard deviation values were lower than 14%) were obtained. Limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) were lower than 6.0 and 18.0 ng L⁻¹ applying an injection sample volume of 1.5 mL, respectively, with exception of thifensulfuron methyl, whose limits were 10.0 and 33.0 ng L⁻¹, respectively. On-line SPE recoveries were evaluated for four concentration levels (0.01, 0.03, 0.10 and 0.20 µg L⁻¹) and acceptable values were found. The on-line SPE method was also compared with off-line SPE. Matrix effects were observed for majority of compounds and standard addition method was selected for analysis of real water samples. Finally, surface water samples were analyzed and, in all cases, the pesticide concentrations were below than the allowable limit in water for human consumption.

Keywords: *Pesticide residues, Surface water, On-line SPE, UHPLC-MS/MS.*

1. Introduction

Pesticides are substances widely employed in agriculture because of their capacity to protect crops against a wide range of threats from weeds, fungal diseases and insect pests, avoiding economic losses and increasing agricultural productivity and performance. In spite of these advantages, their use should be limited because they also can cause important environmental pollution in water, sediment, mammals, fish and birds, as well as serious health effects, such as diseases of the nervous system, reproductive disorders, cancer or genetic problems [1].

In order to control pesticide pollution in environmental waters, pesticide levels are legislated by several directives, where maximum values are set. The United States Environmental Protection Agency (EPA) has established maximum contamination levels (MCLs) for some pesticides in drinking water, such as atrazine (3.0 mg L^{-1}) or simazine (4.0 mg L^{-1}) [2]. European legislation is more restrictive and the Council Directive 80/778/EEC [3] has set limits for pesticides at $0.1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ for individual pesticides and $0.5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ for the sum of all pesticides in water for human consumption. On the other hand, Directive 2008/105/EC [4] set environmental quality standards for priority substances and certain pollutants in surface waters, such as atrazine ($0.6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) and diuron ($0.2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$). In addition, surface water contamination is normally extended to soils [5,6] or groundwater nearby [7], facilitating the exposure of contaminants to food, animals and humans [8].

In Spain and in Almería province particularly, agricultural practices are strongly dependent on the use of pesticides due to climatic and soil conditions, posing a potential risk to water quality standards. Although a downward trend in the consumption of pesticides in Spain is observed from 2004, herbicides are still widely used. In 2010, approximately 21,216 t of herbicides were employed in Spain, and 7,696 t were used in Andalusia region [9]. Due to the high consumption of pesticides and the severe environmental impact resulting from their presence in water, many occurrence, fate and risk studies have been carried out worldwide [10-15], and certain pesticides were found in some cases. For example, pesticides such as carbendazim, simazine, diuron and terbuthylazine were detected in water samples from Andalusia region at concentrations ranging from 0.16 to $5.5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ [11]. Basically, triazines and urea pesticides have been detected at higher levels than the established limit in other regions of Spain, such as Catalonia, where $29 \pm 6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ of atrazine was found in natural

water, or propazine, which was found at concentration range between 16 ± 5 and $33 \pm 8 \mu\text{g L}^{-1}$ [12]. Furthermore, polar pesticides were detected in other countries such as China [13], United States [14] or Australia [15].

Because pesticides are usually detected at low concentrations in water samples, it is necessary the combination of extraction procedures with high detectable techniques in order to be able to analyze them below regulated values. In this way, solid phase extraction (SPE) in combination with gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) [16-21] or liquid chromatography coupled to MS (LC-MS) [22-25] is the most commonly applied approach. Bearing in mind that most of the pesticides detected in water are LC-amenable compounds, LC or ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) coupled to MS has become a useful tool in multi-residue analysis of pesticides in environmental samples because of its inherent high selectivity and detectability than classical techniques [26].

In relation to the extraction procedure, off-line SPE methods usually require high sample volume (250 mL to 1 L by each individual analysis) and they are time consuming [25]. On the other hand, on-line SPE devices provide a number of significant advantages, including high sample throughput, minimal solvent utilization, and fast sample preparation. In addition, small sample volumes are usually needed (5-40 mL) [27]. For this reason, during the last decade, the use of on-line SPE coupled to LC-MS technique increased and several methods have been published for the analysis of polar and non-polar pesticides in water samples [28-31]. Furthermore, on-line SPE-LC-MS has been applied to analyze also other classes of compounds in water samples, such as pharmaceutical residues [32], antibiotics [33,34] or cyanotoxins [35], and in other matrices such as cortisol in urine [36] or steroids in serum [37].

In spite of these advantages, up to now, the use of on-line-SPE-UHPLC methods for the analysis of polar pesticides implied relatively high sample loading flow (between 5 and 20 mL min^{-1}) [30,31]. In addition, the run time per analysis was always higher than 20 min [31], and the maximum number of pesticides analyzed in each method is around 20 [29]. In this sense, the novelty of the proposed method is the possibility to analyze a higher number of compounds in less time (16 min), employing lower sample volume than in previous works published in the literature and decreasing the use of solvents. Therefore, in this study, an on-line-SPE-UHPLC-MS/MS method for the analysis of 37 herbicides most frequently employed in the region of interest has been

developed and validated. Four of these pesticides (atrazine, diuron, isoproturon and simazine) are included in the list of 33 priority substances in the field of water policy established in Annex II of Directive 2008/105/CE [4]. Thus, the aim of this work was the establishment of an easily automatable method, which allows the routine analysis of LC-amenable pesticides in water samples, minimizing sample volume, sample handling and limits of detection (LODs).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and materials

Pesticide analytical standards (purity higher than 99%) were supplied from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany). Stock standard solutions of individual analytes (with concentrations ranging from 179.4 to 596.8 mg L⁻¹) were prepared by dissolving adequate amounts of the powder presentations of each compound in methanol, and stored in a freezer at -20 °C. A multi-compound working standard solution, containing 2 mg L⁻¹ of each compound, was prepared by further dilution of the individual stock standard solutions with methanol and it was stored under refrigeration at 4 °C. An aqueous solution of 5 mM ammonium formate and 0.01% (v/v) formic acid (content > 98%) was prepared by dissolving a suitable amount of ammonium formate with ultrapure water and the appropriate volume of formic acid was added to the resulting solution. Both reagents were purchased from Fluka (Seelze, Germany). Methanol (MeOH) and acetonitrile (ACN) were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and Scharlau (Barcelona, Spain), respectively, while 2-propanol and ethyl acetate (EtOAc) were purchased from J.T. Baker (Deventer, Holland). All the solvents were HPLC grade. Ultrapure water was obtained from a Millipore Milli-Q Gradient water system (Bedford, MA, USA).

For off-line SPE extractions, HLB cartridges (500 mg, 6 cm³) were provided by Scharlau and Waters (Milford, MA, USA). Sodium chloride (NaCl) and hydrochloride acid (HCl) supplied from J.T. Baker were employed to adjust conductivity and pH of real water samples.

2.2. Liquid chromatographic separation

Chromatographic analysis was carried out using an Agilent series 1290 RRLC instrument (Agilent, Santa Clara, CA, USA) equipped with a high-performance autosampler (G4226A), a binary pump (G4220A), a column compartment thermostat (G1316C), an autosampler thermostat (G1330B) and an Agilent triple quadrupole mass spectrometer (6460A). The chromatographic separation was achieved on a Poroshell 120 EC-C18 (50 mm × 4.6 mm, 2.7 μm; Agilent Technology) analytical column, consisting of a 1.7 μm nonporous core and a 0.5 μm porous silica layer. This design improves column efficiency and mass transfer kinetics but at low pressures. The column temperature was set at 30 °C. For the chromatographic elution the flow rate was set at 0.35 mL min⁻¹. A mobile phase composed by an aqueous solution of ammonium acetate (5 mM) and 0.01% (v/v) formic acid (eluent A), and ACN (eluent B) was employed. The elution started at 90% of eluent A during 0.5 min, and then it was decreased to 10% until 5.5 min. This composition was kept constant during 2.5 min. After that, it was returned to the initial conditions in 1.5 min, and the column was reequilibrated during 1.5 min obtaining a total run time of 11 min.

2.3. Tandem mass spectrometric detection

The system was coupled to an Agilent triple quadrupole (QqQ) mass spectrometer (6460A) equipped with a Jet Stream ESI ion source (G1958-65138). Nitrogen was employed as collision gas (99.9%, Praxair, Madrid, Spain). The Jet Stream ion source parameters were: drying gas temperature and sheath gas temperature were set at 325 and 400 °C, respectively; drying gas flow and sheath gas flow were 5 and 11 mL min⁻¹ respectively; nebulizer pressure was 45 psi; capillary voltage was set at 3500 V in positive mode acquisition. MS parameters were optimized by direct injection of individual solutions of pesticides, containing 25 mg L⁻¹ of each compound (prepared in ACN) using a mobile phase consisting in ACN:formic acid 0.01% (v/v), 50:50 (v/v), at a flow rate of 0.2 mL min⁻¹. First, full-scan mass spectra were acquired operating in MS mode, and a precursor ion and optimum fragmentor voltages were selected for all compounds. After that, MS/MS spectra were obtained and the collision energy was optimized for the two product ions more abundant of each pesticide.

For data acquisition and sample quantification, Agilent Mass Hunter Quantitative analysis (Agilent Technologies, Inc.) was employed. MS/MS signal acquisition was performed in dynamic selected reaction monitoring mode and a delta retention time of ± 1 min was employed. For each pesticide, two signals were monitored, corresponding to the transition between the precursor ion and the two most abundant product ions (Table 1). The most abundant product ion was used for quantification while the other one was used for confirmation as specified in the Directive 2002/657/EC [38].

2.4. On-line solid-phase extraction

The on-line SPE system consisted of an automated liquid sampler (ALS) (G1329B) fitted with a 900 μL injection loop with multi-draw capability and a programmable 6-positions election (G1159A) valve that load the sample onto selected SPE cartridges. A second programmable 6 ports/2 positions valve (G1158B) was used to select between the load or elution modes by directing liquid flow with a quaternary pump (G1311B), used to transfer the sample to SPE cartridges, or a binary pump, used to elute the sample from the cartridges to the LC column for analytical separation. Cartridges of rigid macroporous spherical particles of polystyrene and divinylbenzene (PLRP-s) with dimensions 10 mm \times 2 mm were employed (Spark Holland, Emmen, The Netherlands). The quaternary pump delivered the loading solvent composed by 5 mM ammonium acetate and 0.01% (v/v) formic acid (eluent A) at a flow rate of 2 mL min^{-1} . Two injections of 750 μL (total injection volume 1500 μL) of sample volume were loaded onto a PLRP-s cartridge. Sample takes 1.5 min to get to the cartridge. At 1.6 min after injection, the valve position switched and the analytes retained in the cartridge were progressively transferred to the chromatographic column, where they were separated using the LC solvent gradient described above (run time: 11 min). During MS/MS analysis, the sample injection loop was flushed with ACN. The cartridge were washed with 2-propanol (eluent C) at 2 mL min^{-1} to increase their average life and conditioned with ACN (eluent B) during 2 min. The complete gradient of quaternary pump is shown in Table 2. After that, the system was equilibrated for 3.5 min prior to the next injection (total run time: 16 min).

Table 1. Retention Time Windows (RTWs) and MS/MS parameters.

Compound	RTW (min)	Quantitation transition (m/z) ^a	Confirmation transition (m/z) ^a	Fragmentor (V)	Ion Ratio (%)
Quinmerac	3.99-4.04	222.0 > 204.0 (12)	222.0 > 141.0 (32)	80	35
Atrazine desisopropyl	4.01-4.09	174.1 > 68.1 (32)	174.1 > 104.0 (24)	110	66
Metamitron	4.39-4.41	203.1 > 175.1 (12)	203.1 > 104 (20)	110	48
Chloridazon	4.51-4.53	222.0 > 77.0 (36)	222.0 > 104.0 (20)	140	88
Atrazine desethyl	4.55-4.58	188.1 > 146.0 (16)	188.1 > 79 (28)	110	24
Metoxuron	5.05-5.06	229.1 > 72.1 (16)	229.1 > 156.0 (20)	110	9
Thifensulfuron methyl	5.12-5.15	388.0 > 167.0 (8)	388.0 > 141.1 (24)	110	7
Metsulfuron methyl	5.15-5.19	404.1 > 163.0 (8)	404.1 > 263.9 (8)	80	92
Cinosulfuron	5.35-5.37	414.1 > 183.0 (12)	414.1 > 157.1 (24)	110	12
Lenacil	5.35-5.36	235.1 > 153.1 (8)	235.1 > 136.0 (36)	80	16
Simazine	5.36-5.38	202.1 > 68.1 (32)	202.1 > 132 (16)	110	64
Terbutylazine desethyl	5.38-5.40	202.1 > 146.0 (12)	202.1 > 79.0 (28)	80	21
Triasulfuron	5.47-5.49	402.1 > 167.1 (12)	402.1 > 141.1 (16)	110	63
Metribuzin	5.55-5.56	215.1 > 187.1 (20)	215.1 > 57.2 (32)	90	63
Iodosulfuron methyl	5.61-5.65	530.0 > 163.0 (8)	530.0 > 389.8 (8)	110	65
Chlortoluron	5.67-5.69	213.1 > 72.1 (20)	213.1 > 46.2 (12)	110	53
Isoproturon	5.81-5.82	207.1 > 72.1 (16)	207.1 > 165.1 (8)	110	20
Diuron	5.87-5.89	233.0 > 72.1 (16)	233.0 > 46.2 (12)	110	48
Atrazine	5.87-5.90	216.1 > 174.0 (12)	216.1 > 104.0 (28)	110	24
Monolinuron	5.92-5.96	215.1 > 126.0 (12)	215.1 > 99 (32)	80	63

^aCollision energy (eV) is given in brackets.

Table 1 (cont.). Retention Time Windows (RTWs) and MS/MS parameters.

Compound	RTW (min)	Quantitation transition (m/z) ^a	Confirmation transition (m/z) ^a	Fragmentor (V)	Ion Ratio (%)
Terbumeton	5.97-5.98	226.2 > 170.1 (12)	226.2 > 69.0 (36)	110	10
Bensulfuron methyl	5.98-6.00	411.1 > 149.0 (16)	411.1 > 182 (12)	110	42
Metobromuron	6.06-6.08	259.0 > 148.0 (8)	259.0 > 170.0 (12)	110	88
Metazachlor	6.11-6.12	278.1 > 134.1 (16)	278.1 > 210.0 (4)	80	73
Propazine + Terbutylazine	6.29-6.30	230.1 > 174.0 (12)	230.1 > 146.0 (20)	110	82
Sebutylazine	6.46-6.48	230.1 > 174.0 (12)	230.1 > 104.0 (28)	110	5
Linuron	6.50-6.52	249.0 > 159.9 (12)	249.0 > 182.0 (8)	110	87
Propyzamide	6.72-6.73	256.0 > 190.0 (8)	256.0 > 173.0 (20)	110	50
Tepaloxymid	6.72-6.75	342.2 > 249.9 (5)	342.2 > 165.8 (20)	110	48
Prometryn	6.76-6.77	242.1 > 158.0 (20)	242.1 > 200.1 (12)	140	50
Tebutam	7.01-7.02	234.2 > 91.1 (20)	234.2 > 65.1 (64)	110	28
Metolachlor	7.05-7.06	284.1 > 252.1 (8)	284.1 > 176.1 (24)	110	39
Thiazopyr	7.26-7.28	397.1 > 377.1 (20)	397.1 > 335.0 (28)	170	55
Fenoxaprop-P-ethyl	7.26-7.65	362.1 > 288.0 (12)	362.1 > 91.1 (40)	140	18
Cycloxydim	8.04-8.07	326.2 > 280.1 (8)	326.2 > 180.1 (16)	110	49
Sethoxydim	8.36-8.38	328.2 > 178.1 (16)	328.2 > 282.1 (4)	110	70

^aCollision energy (eV) is given in brackets.

Table 2. Analytical gradient established in quaternary pump in the on-line SPE system.

Step	Time (min)	% Eluent A ^a	% Eluent B ^a	% Eluent C ^a	Flow (mL min ⁻¹)
1	0.0	100	0	0	2.0
2	0.5	100	0	0	2.0
3	2.0	100	0	0	0.1
4	7.0	0	100	0	0.1
5	7.5	0	100	0	2.0
6	9.5	0	100	0	2.0
7	10.0	0	0	100	2.0
8	12.0	0	0	100	2.0
9	12.5	100	0	0	2.0

^a Eluent A, B and C are corresponding to 5 mM ammonium acetate and 0.01% (v/v) formic acid solution, ACN and 2-propanol, respectively.

2.5. Off-line SPE

Off-line SPE method developed by Barco-Bonilla *et al.* [16] for LC-amenable pesticides was employed. Briefly, 250 mL of spiked water sample were adjusted to pH 3.0 with 2 mol L⁻¹ HCl. In order to adjust the conductivity, 2.5 g NaCl were added, and 1% (v/v) MeOH was also added to avoid analyte adsorption in the glass material. The resulting solution was passed through polymeric cartridges, previously conditioned with 3 mL of EtOAc, 3 mL of MeOH and 3 mL of ultrapure water without allowing the cartridges to dry out. Then, the water samples were passed through the cartridges under vacuum from a pump with a flow rate of 10 mL min⁻¹. The cartridges were dried for 3 h and the pesticides were eluted with 5 mL of MeOH, followed by 5 mL of EtOAc. The extracts were evaporated under a stream of nitrogen and the compounds were redissolved into a final volume of 2.0 mL of a mixture of MeOH/formic acid 0.01% (v/v)/ammonium acetate (5 mM) (50:50, v/v). Finally, 1 mL of the solution was transferred into a vial and 5 µL were injected into the UHPLC-QqQ-MS/MS system. The concentration factor achieved was 125.

2.6. Sample collection and treatment

Nineteen surface waters (including irrigation and river waters) were analyzed with the proposed method. The samples were collected from different places of Almería province and filtered through a 0.22 μm membrane nylon filter if it is necessary. This step is important to avoid clogging SPE cartridges by suspended particles. After that, samples were stored at 4 °C and analyzed within 24 h of collection. Results were expressed as mean value \pm standard deviation obtained from the calibration curve data provided by ACOC program [39].

2.7. Method validation

2.7.1. Linearity

Linearity was evaluated in ultrapure water in the range 0.001-0.500 $\mu\text{g L}^{-1}$, and calibration curves were estimated by least-squares regression procedure. Three replicates for each calibration level were analyzed.

2.7.2. LOD and LOQ

LOD and limit of quantification (LOQ) were measured by evaluating the signal to noise ratio (S/N) in water fortified at 0.10, 0.30, 0.40, 0.70, 1.0, 3.0 and 5.0 ng L^{-1} for all individual pesticides. LOD and LOQ were determined as the lowest concentration level that provided S/N values of 3 and 10, respectively making use of the confirmation transition. Blank surface water sample were employed for this study.

2.7.3. Precision

Intraday precision, expressed as relative standard deviation (RSD) in %, was calculated in surface water, by analysis of five replicates at four concentration levels (0.01, 0.03, 0.10 and 0.20 $\mu\text{g L}^{-1}$). On the other hand, interday precision was measured analyzing three concentration levels (0.01, 0.10 and 0.20 $\mu\text{g L}^{-1}$) in five different days.

2.7.4. Matrix effect

In order to test the possible matrix effect, slopes of calibration curves from ultrapure and surface water sample were compared employing ACOC program [39], at 95% confidence level. Each calibration curve comprised five concentration points in triplicate within the range of LOQ-0.500 $\mu\text{g L}^{-1}$.

2.7.5. Recovery

To evaluate on-line SPE absolute analytical recovery, four concentration levels (0.01, 0.03, 0.10 and 0.20 $\mu\text{g L}^{-1}$) were assessed, using five replicates for each concentration level. Recoveries were calculated as a percentage of the concentration obtained in the analysis of spiked blank superficial water with the standard addition method with respect to the real concentration of the samples analyzed. Results were compared with recoveries obtained from off-line SPE applying the procedure described in Section 2.5, when blank superficial water was spiked with solutions of pesticides at 0.20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (three replicates).

3. Results and discussion

3.1. UHPLC-MS/MS development

All analytes were determined by positive ionization mode. Under the experimental conditions, protonated molecules, $[\text{M}+\text{H}]^+$, were observed for all compounds, except for metsulfuron methyl, which mainly formed the sodium adduct, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, which was used as precursor ion. Table 1 shows the MS/MS transitions for quantification and confirmation of the selected pesticides. Two different ion sources, ESI and ESI Jet Stream, were tested, and finally the second one was selected because it provided more ion abundance. Once MS parameters were established, chromatographic conditions were optimized in order to attain an adequate elution of the target compounds and short analysis time. The mobile phase composition was evaluated bearing in mind that propazine, terbuthylazine and sebuthylazine present very analogous structure.

Furthermore, their chromatographic behavior was very similar and their separation was difficult. Thus, various analytical gradients were evaluated and two

different aqueous solutions, formic acid 0.01% (v/v) and formic acid 0.01% (v/v)/ammonium acetate (5 mM), were tested, whereas ACN and MeOH were tested as organic phase. Aqueous solution with formic acid 0.01% (v/v)/ammonium acetate (5 mM) (eluent A) provides higher ion abundance in the majority of cases, whereas ACN (eluent B) was chosen as organic solvent instead of MeOH due to better peak shape achieved. For the chromatographic elution, column temperature was kept at 30 °C and the flow rate was set at 0.35 mL min⁻¹. Using the conditions described in Section 2.2, sebuthylazine was separated but propazine and terbuthylazine coeluted and they must be analyzed together. Fig. 1 shows a representative chromatogram obtained from a surface water sample spiked with 0.20 µg L⁻¹ of target compounds.

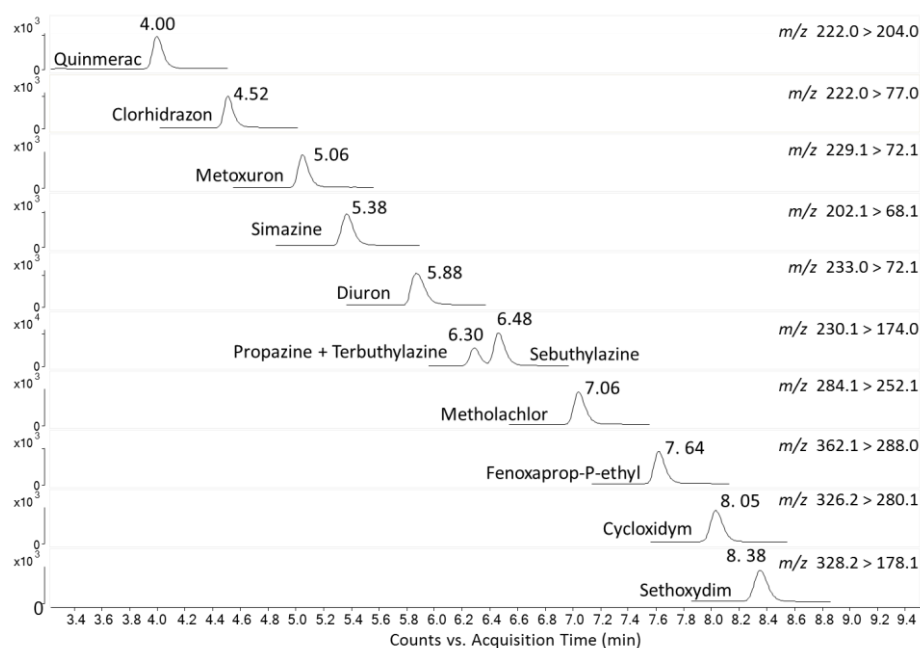


Figure 1. UHPLC-MS/MS chromatograms of representative pesticides from a surface water sample spiked with 0.20 µg L⁻¹ of each pesticide.

3.2. Optimization of the on-line SPE procedure

Parameters such as sample volume, sample loading flow and quaternary pump gradient were studied. Carryover effects and reusability of the cartridges were also evaluated. First, sample volume was assessed by injecting different volumes (from 500 to 1800 μL) of surface water spiked with $0.10 \mu\text{g L}^{-1}$ of the target pesticides. Sample loop capacity is 900 μL and in all cases two identical and consecutive volumes of the sample were injected. For the majority of compounds, analytical signal (peak area) increased with the sample volume until 1500 μL , and this volume was established as optimum. On the other hand, flow rates of formic acid 0.01% (v/v)/ammonium acetate (5 mM) solution, which was used to load sample, was evaluated checking several values (1.5, 2.0, 2.5, 3.0 and 3.5 mL min^{-1}). When flow rate was fixed at 1.5 mL min^{-1} , retention time increased but peak shape was very wide and deformed. For the rest of the evaluated flow rates (2.0- 3.5 mL min^{-1}), the same results were obtained: retention times were slightly higher and peaks appear well resolved. For this reason, 2.0 mL min^{-1} was selected as optimum because the solvent consumption was minimized. After the elution of the compounds to the chromatographic column, a washing cartridge step with ACN during 2 min was introduced. Finally, cartridge was conditioned with aqueous phase during 3.5 min.

To evaluate carryover effect, signal obtained from both blank surface water sample spiked with $0.10 \mu\text{g L}^{-1}$ of each pesticide and non-spiked sample, injected consecutively, were compared. It was considered that there is carryover effect if signal obtained from blank sample is greater than 10% of the signal from the spiked sample. No carryover effect for any compound was observed. Using the chromatographic conditions described in the experimental part, the reusability of the cartridge was estimated by examining the stability of analyte peak areas. For that, blank surface water samples spiked with $0.50 \mu\text{g L}^{-1}$ of each pesticide were consecutively injected. First, only ACN was employed to wash the cartridge between successive runs, and significant variation of peak area for the majority of analytes was observed after 20 extractions with the same cartridge. However, when a previous wash step with 2-propanol was included before ACN, reusability of the cartridge was increased to 70 extractions. Fig. 2 shows the obtained results for chloridazon, metoxuron, prometryn and tebutam. Therefore, the introduction of 2-propanol increases the life-time of the cartridge, and it was used for further experiments. For this reason, quaternary pump gradient was

modified and 2 min washing step with 2-propanol was introduced before washing step with ACN. In this way, run time was incremented by 2.5 min, but the cartridges can be used for further analysis, reducing the cost of the developed method. The final gradient mode is shown in Table 2. The total analysis time (sample analysis plus the conditioning and equilibration times) was 16 min.

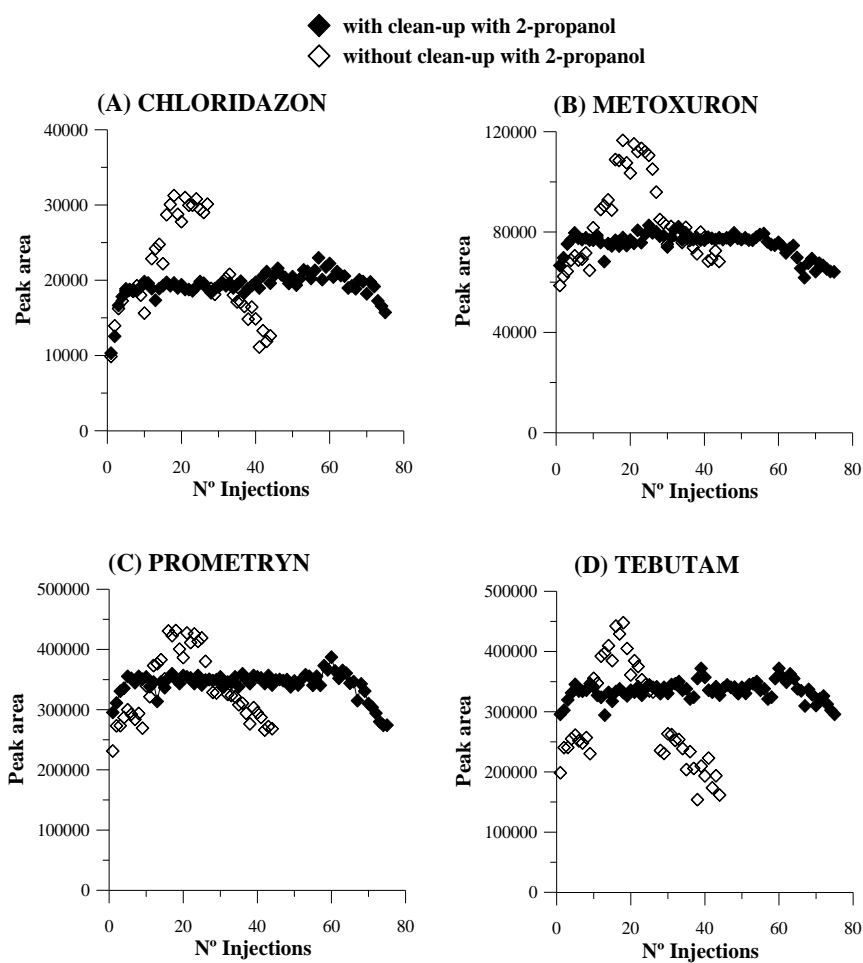


Figure 2. Reusability cartridge study, showed for **(A)** chlorhidazon, **(B)** metoxuron, **(C)** prometryn and **(D)** tebutam, from a surface water sample spiked with $0.50 \mu\text{g L}^{-1}$ of each pesticide.

3.3. Matrix effects

It is important to study matrix effects when using LC-MS techniques [40]. For this reason, a comparison of the slopes between external calibration curve in ultrapure water and standard addition curve from a surface water sample were carried out with ACOC program, at 95% of confidence level. Except for tebutam, prometryn, propyzamide, cycloxydim, tepraloxym and triasulfuron, matrix effect was observed for all pesticides. For most of the pesticides, matrix suppression effect was observed although for some pesticides as atrazine desisopropyl, simazine, terbutylazine desethyl, atrazine and propazine, the signal was increased (matrix enhancement effect). For this reason, several options to minimize this effect were considered. The use of isotopically labeled pesticides employed as internal standard (ISs) could be one of the best options to correct analyte signal suppression or enhancement resulting from matrix interferences. However, these interferences are different for each pesticide and the ideal situation would be that each analyte should be corrected by its own isotope-labeled molecule. For that, this choice is problematic in multi-residue method due to the commercial unavailability of internal standards for several compounds and the economic cost of method will be increased.

On the other hand, to evaluate if matrix matched calibration could be used to compensate matrix effect, three samples of surface water were analyzed by standard addition method and slopes were compared. This experience was assessed in water without and with pretreatment of samples, which was based on adjusting the pH to 3 with HCl 2 mol L⁻¹ and the conductivity with 2.5 g of NaCl. As a representative example of the obtained results, a comparison of calibration curves from three pesticides is shown in Fig. 3. As it can be seen, in both cases the same results were obtained, which shows that the pH and conductivity of the water do not influence in the extraction process and matrix effect. In addition, it can be observed that application of matrix calibration is not reliable due to the differences of the composition of the environmental waters, affecting the ionization of the compounds and therefore, the matrix effect.

Due to high detectability of developed method, a sample dilution might be a good option to eliminate matrix effect. For this reason, several dilutions with ultrapure water, 1:1, 1:5 and 1:10, were tested by comparing the slopes of calibration curves obtained from three water samples and external calibration curve from ultrapure

water. As it can be seen in Fig. 3, in some cases, slopes were very similar when 1:10 dilution was used (e.g. quinmerac). However, this matrix effect was only diminished, but not eliminated for most of the compounds (e.g. atrazine desisopropyl or cinosulfuron). Although higher water dilution could be performed, it was not considered due to the loss of detectability.

Other options such as additional water clean-up steps are time-consuming, involving more sample manipulation and may increase the analytical errors associated to sample treatment. For this reason, standard addition methodology was finally selected to analyze real samples.

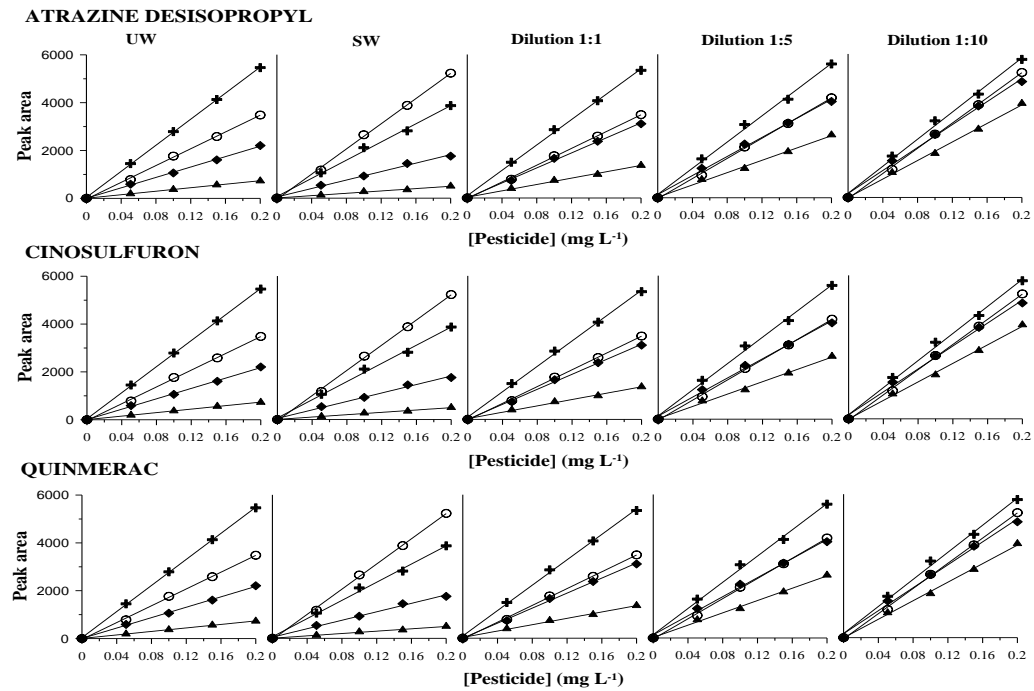


Figure 3. Comparison of slopes from ultrapure water (\circ) and three surface water samples: water sample 1 (\blacklozenge), water sample 2 (+) and water sample 3 (\blacktriangle), with and without pH and conductivity adjust and by 1:1, 1:5 and 1:10 dilutions, for three pesticides.

3.4. Method validation

Validation has been performed to assess the linearity, precision, recovery of extraction procedure, LOD and LOQ of the proposed method. Linearity has been established in ultrapure water in the range LOQ-0.500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Different linearity range were obtained depending on the compound (see Table 3), and determination coefficients (R^2) were higher than 0.99 for all compounds. To evaluate interday precision of the overall analytical procedure, RSDs were evaluated at three concentrations levels, obtaining values lower than or equal to 14% (see Table 3), indicating that the developed method was reproducible. Furthermore, intraday precision was also evaluated (see Table 4) and it can be observed that RSD values were lower than 10% for the four concentrations evaluated. LODs ranged between 0.1 and 6.0 ng L^{-1} , except for thifensulfuron methyl whose value was 10.0 ng L^{-1} . LOQs ranged from 0.3 to 18.0 ng L^{-1} , although thifensulfuron methyl can only be quantified at concentrations higher than 33.0 ng L^{-1} . Moreover, the selectivity of the method was evaluated by analyzing control blank samples. The absence of any signal at the same retention time of the selected compounds indicated that there were not any matrix interferences or contamination that may give a false positive signal.

On-line SPE recoveries were calculated at four concentration levels. As it can be seen in Table 4, for several pesticides (metamitron, atrazine desethyl, thifensulfuron methyl, triasulfuron, iodosulfuron methyl, linuron, tepraloxymid, thiazopyr, cycloxydim, sethoxydim) recoveries ranged between 60% and 80% at a concentration of 0.01 $\mu\text{g L}^{-1}$, whereas recoveries were slightly higher when concentration increased. Thus, the recovery values obtained for all compounds ranged from 80-124%, 86-129% and 74-119% at 0.03, 0.10 and 0.20 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. On the other hand, recovery values obtained at 0.20 $\mu\text{g L}^{-1}$ were compared with those values obtained by off-line SPE employing two different HLB cartridges using the experimental procedure described in Section 2.5. The results are shown in Table 4. It can be observed that in all cases, on-line SPE provides better or similar recoveries than off-line SPE, except for cinosulfuron, which was recovered to 98% and 114% with both off-line SPE cartridges and 74% with on-line SPE. Furthermore, it can be highlighted that tebutam and fenoxaprop-P-ethyl were not retained when HLB 1 cartridges were used (recovery lower than 50%), while cycloxydim and sethoxydim were not extracted with both tested cartridges, although they were successfully retained with on-line SPE.

Table 3. Validation parameters of the proposed method.

Compound	Linear range ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R ²	LOD (ng L^{-1})	LOQ (ng L^{-1})	Interday Precision ^a		
					0.01 $\mu\text{g L}^{-1}$	0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$	0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$
Quinmerac	0.002-0.500	0.9991	0.5	1.6	9	7	12
Atrazine desisopropyl	0.010-0.400	0.9996	3.0	10.0	9	7	7
Metamitron	0.010-0.300	0.9994	3.0	10.0	5	5	7
Chloridazon	0.001-0.300	0.9978	0.4	1.3	2	4	8
Atrazine desethyl	0.018-0.300	0.9964	6.0	18.0	4	3	7
Metoxuron	0.010-0.500	0.9990	3.0	10.0	6	5	5
Thifensulfuron methyl	0.033-0.300	0.9983	10.0	33.0	5	3	11
Metsulfuron methyl	0.007-0.300	0.9964	2.0	6.7	8	11	4
Cinosulfuron	0.016-0.300	0.9964	5.0	16.0	7	3	9
Lenacil	0.013-0.500	0.9992	4.0	13.0	7	7	4
Simazine	0.010-0.500	0.9989	3.0	10.0	5	2	1
Terbutylazine desethyl	0.003-0.500	0.9989	1.0	3.3	4	8	5
Triasulfuron	0.010-0.500	0.9985	3.0	10.0	4	7	3
Metribuzin	0.016-0.300	0.9969	5.0	16.0	1	6	3
Iodosulfuron methyl	0.010-0.040	0.9976	3.0	10.0	5	9	9
Chlortoluron	0.002-0.500	0.9989	0.5	1.6	5	4	4
Isoproturon	0.010-0.300	0.9976	3.0	10.0	3	7	4
Diuron	0.016-0.300	0.9959	5.0	16.0	2	3	2

^a Expressed as RSD values (n = 5).

Table 3 (cont.). Validation parameters of the proposed method.

Compound	Linear range ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R ²	LOD (ng L^{-1})	LOQ (ng L^{-1})	Interday Precision ^a		
					0.01 $\mu\text{g L}^{-1}$	0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$	0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$
Atrazine	0.013-0.300	0.9977	4.0	13.0	3	7	7
Monolinuron	0.007-0.300	0.9979	2.0	6.7	5	2	3
Terbumeton	0.013-0.500	0.9986	4.0	13.0	2	3	4
Bensulfuron methyl	0.007-0.500	0.9991	2.0	6.7	4	8	4
Metobromuron	0.016-0.500	0.9991	5.0	16.0	7	4	8
Metazachlor	0.001-0.500	0.9992	0.1	0.3	1	6	6
Propazine + Terbutylazine	0.001-0.500	0.9988	0.3	1.0	8	4	3
Sebutylazine	0.003-0.500	0.9982	1.0	3.3	8	4	3
Linuron	0.018-0.500	0.9985	6.0	18.0	8	5	9
Propyzamide	0.016-0.040	0.9980	5.0	16.0	6	4	7
Tepraloxymid	0.013-0.300	0.9971	4.0	13.0	7	8	7
Prometryn	0.001-0.500	0.9992	0.3	1.0	3	6	8
Tebutam	0.001-0.500	0.9984	0.2	0.7	4	8	5
Metolachlor	0.001-0.500	0.9986	0.2	0.7	2	7	8
Thiazopyr	0.010-0.500	0.9965	3.0	10.0	10	8	7
Fenoxaprop-P-ethyl	0.005-0.400	0.9966	1.5	5.0	11	6	4
Cycloxydim	0.016-0.300	0.9970	5.0	16.0	8	14	3
Sethoxydim	0.003-0.300	0.9976	1.0	3.3	8	10	6

^a Expressed as RSD values (n = 5).

Table 4. Recoveries values obtained from on-line SPE and off-line SPE.

Compound	On-line SPE ^a				Off-line SPE ^b	
	0.01 µg L ⁻¹	0.03 µg L ⁻¹	0.10 µg L ⁻¹	0.20 µg L ⁻¹	HLB 1 ^c	HLB 2 ^d
Quinmerac	90 (4)	114 (4)	104 (1)	112 (2)	95 (6)	111 (1)
Atrazine desisopropyl	106 (2)	114 (2)	111 (1)	117 (2)	96 (7)	104 (2)
Metamitron	76 (4)	102 (4)	99 (1)	104 (1)	100 (3)	100 (2)
Chloridazon	91 (4)	118 (4)	97 (1)	102 (4)	102 (5)	105 (2)
Atrazine desethyl	59 (6)	86 (4)	101 (3)	91 (6)	97 (4)	103 (1)
Metoxuron	83 (1)	108 (2)	100 (2)	99 (1)	102 (9)	112 (1)
Thifensulfuron methyl	66 (5)	97 (5)	93 (5)	84 (1)	83 (9)	100 (4)
Metsulfuron methyl	115 (6)	124 (3)	100 (5)	106 (2)	87 (7)	100 (6)
Cinosulfuron	70 (5)	80 (3)	89 (4)	74 (4)	98 (11)	114 (1)
Lenacil	105 (2)	112 (3)	95 (3)	119 (1)	94 (8)	91 (4)
Simazine	101 (4)	109 (3)	110 (1)	108 (1)	96 (7)	98 (3)
Terbutylazine desethyl	104 (2)	115 (3)	99 (1)	119 (1)	99 (6)	100 (1)
Triasulfuron	70 (7)	103 (3)	87 (4)	90 (4)	93 (8)	105 (3)
Metribuzin	91 (6)	112 (4)	106 (2)	104 (2)	89 (8)	72 (2)
Iodosulfuron methyl	76 (4)	109 (5)	92 (4)	104 (4)	86 (8)	103 (3)
Chlortoluron	99 (2)	108 (2)	99 (2)	102 (1)	102 (9)	111 (3)
Isoproturon	99 (3)	105 (3)	97 (2)	101 (1)	101 (9)	108 (2)
Diuron	130 (4)	92 (4)	109 (1)	102 (5)	104 (9)	115 (2)

^a Repeatability values, expressed as RSD, are given in brackets (n = 5); ^b Recovery values calculated at 0.2 µg L⁻¹ (n = 3).

^c HLB 1 obtained from Scharlau; ^d HLB 2 obtained from Waters; ^e n.e.: non extracted. Recovery values lower than 10 %.

Table 4 (cont.). Recoveries values obtained from on-line SPE and off-line SPE.

Compound	On-line SPE ^a				Off-line SPE ^b	
	0.01 µg L ⁻¹	0.03 µg L ⁻¹	0.10 µg L ⁻¹	0.20 µg L ⁻¹	HLB 1 ^c	HLB 2 ^d
Atrazine	94 (3)	103 (4)	100 (1)	106 (4)	97 (7)	105 (2)
Monolinuron	106 (4)	111 (6)	109 (2)	102 (3)	85 (4)	109 (5)
Terbumeton	104 (3)	105 (3)	99 (1)	102 (2)	100 (9)	115 (3)
Bensulfuron methyl	110 (2)	120 (6)	108 (1)	106 (3)	99 (10)	110 (1)
Metobromuron	116 (7)	107 (2)	102 (1)	100 (2)	88 (7)	102 (1)
Metazachlor	96 (3)	108 (3)	100 (2)	103 (2)	98 (9)	111 (2)
Propazine + Terbutylazine	115 (3)	120 (3)	97 (1)	109 (2)	97 (7)	110 (2)
Sebutylazine	98 (4)	115 (7)	104 (1)	108 (1)	97 (7)	108 (2)
Linuron	77 (7)	112 (5)	97 (2)	95 (3)	98 (9)	116 (4)
Propyzamide	117 (8)	105 (4)	104 (2)	102 (3)	82 (7)	105 (3)
Tepaloxymid	74 (9)	102 (7)	98 (5)	93 (2)	97 (9)	110 (3)
Prometryn	83 (4)	103 (4)	97 (1)	95 (1)	97 (8)	113 (1)
Tebutam	90 (1)	109 (3)	99 (1)	96 (1)	18 (1)	78 (11)
Metolachlor	111 (2)	108 (3)	105 (1)	103 (2)	82 (5)	104 (4)
Thiazopyr	77 (5)	112 (4)	129 (2)	99 (4)	60 (4)	102 (2)
Fenoxaprop-P-ethyl	104 (1)	101 (4)	95 (2)	86 (1)	44 (4)	n.e.
Cycloxydim	68 (2)	91 (6)	87 (2)	85 (2)	n.e. ^e	n.e.
Sethoxydim	78 (2)	88 (5)	86 (2)	90 (2)	n.e.	n.e.

^a Repeatability values, expressed as RSD, are given in brackets (n = 5); ^b Recovery values calculated at 0.2 µg L⁻¹ (n = 3).

^c HLB 1 obtained from Scharlau; ^d HLB 2 obtained from Waters; ^e n.e.: non extracted. Recovery values lower than 10 %.

3.5. Analysis of polar pesticides in water samples

To evaluate the applicability of the proposed method, nineteen surface water samples from Almería province, including irrigation and river water, were analyzed. Standard addition methodology was employed and water samples were spiked in the concentration range comprised between 0.01 and 0.20 $\mu\text{g L}^{-1}$. In five samples none of the target pesticides were detected. In the rest of the samples, several pesticides, such as simazine, metribuzine, isoproturon, diuron, atrazine, terbutometon, sebuthylazine, linuron, prometryn and fenoxaprop-P-ethyl, were detected at trace levels ($< \text{LOQ}$), whereas other compounds were detected at concentrations higher than LOQ, showing the obtained results in Table 5. Among the analyzed waters, the highest number of pesticides was detected in an irrigation water sample for agricultural practices: terbuthylazine desethyl ($6.4 \pm 3.5 \text{ ng L}^{-1}$), tebutam ($3.3 \pm 1.8 \text{ ng L}^{-1}$), prometryn ($9.2 \pm 0.9 \text{ ng L}^{-1}$), metazachlor ($6.4 \pm 1.1 \text{ ng L}^{-1}$), metolachlor ($11.4 \pm 1.5 \text{ ng L}^{-1}$) and thiazophyr ($7.4 \pm 1.2 \text{ ng L}^{-1}$), showing some positive results in Fig. 4.

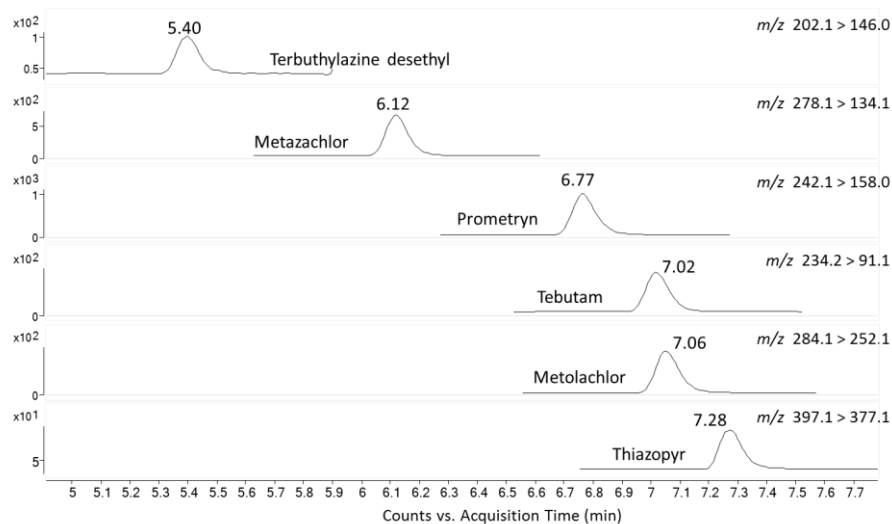


Figure 4. UHPLC-MS/MS chromatograms from pesticides found in a surface water sample: terbuthylazine desethyl ($6.4 \pm 3.5 \text{ ng L}^{-1}$), tebutam ($3.3 \pm 1.8 \text{ ng L}^{-1}$), prometryn ($9.2 \pm 0.9 \text{ ng L}^{-1}$), metazachlor ($6.4 \pm 1.1 \text{ ng L}^{-1}$), metolachlor ($11.4 \pm 1.5 \text{ ng L}^{-1}$) and thiazophyr ($7.4 \pm 1.2 \text{ ng L}^{-1}$).

Table 5. Concentration of polar pesticides in surface water samples expressed as ng L⁻¹ (SD).

Compound	Sample number													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	12	13	17	19	
Chloridazon														< LOQ
Metoxuron				< LOQ										< LOQ
Lenacil														< LOQ
Simazine			< LOQ			< LOQ	< LOQ			< LOQ	< LOQ			< LOQ
Terbutylazine desethyl			21.8 (3.6)				< LOQ			8.6 (2.1)	10.9 (2.2)			6.4 (3.5)
Metribuzin		< LOQ					< LOQ							
Chlortoluron														< LOQ
Isoproturon														
Diuron			< LOQ				< LOQ							< LOQ
Atrazine	< LOQ													< LOQ
Terbumeton						< LOQ								< LOQ
Metazachlor	1.1 (1.8)											0.9 (0.6)	6.4 (1.1)	
Propazine + Terbutylazine														< LOQ
Sebuthylazine	< LOQ	< LOQ						< LOQ	< LOQ					
Linuron						< LOQ								
Prometryn	< LOQ		< LOQ											9.2 (0.9)
Tebutam	1.7 (1.4)													3.3 (1.8)
Metolachlor	1.6 (1.9)	3.8 (3.1)	2.7 (1.8)	2.0 (1.6)	2.8 (2.1)	1.3 (3.5)						1.8 (1.1)	11.4 (1.5)	
Thiazopyr														7.4 (1.2)
Fenoxaprop-P-ethyl	< LOQ		< LOQ			< LOQ		< LOQ						

4. Conclusions

A very simple, sensitive and stable on-line SPE-UHPLC-MS/MS method has been developed for pesticide analysis in surface water samples. Good recovery values were obtained for all pesticides. Furthermore, three pesticides that were not retained with conventional extraction off-line SPE, fenoxaprop-P-ethyl, cycloxydim and sethoxydim, were successfully analyzed with this method. By comparison between external calibration and standard addition curves, matrix effect was detected for most of the pesticides evaluated. For this reason, matrix calibration and water sample dilution were checked in order to diminish this effect but improvements were not achieved. Finally, standard addition method was selected to analyze real samples. Method provides good validation parameters in terms of linearity, precision and trueness. The proposed method is suitable to be used in routine analysis due to sample pretreatment is not required allowing very rapid trace enrichment from low sample volume (1500 μ L) with minimal sample handling. The method was applied to the analysis of 19 real surface water samples and some pesticides as atrazine desethyl, metazachlor and metolachlor, have been detected at trace levels.

References

- [1] M.W. Aktar, D. Sengupta, A. Chowdhury, "Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards", *Interdisc. Toxicol.* 2 (2009) 1-12.
- [2] <http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm#List> (Accessed March 2013).
- [3] Council Directive 80/778/EEC of 15 July 1980 relating to the quality of water intended for human consumption as amended by Council Directives 81/858/EEC and 91/692/EEC (further amended by Council Regulation 1882/2003/EC).
- [4] Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council.
- [5] C.S. Jacobsen, P. van der Keur, B.V. Iversen, P. Rosenberg, H.C. Barlebo, S. Torp, H. Vosgerau, R.K. Juhler, V. Ernstsén, J. Rasmussen, U.C. Brinch, O.H. Jacobsen,

- “Variation of MCPA, metribuzine, methyltriazine-amine and glyphosate degradation, sorption, mineralization and leaching in different soil horizons”, *Environ. Pollut.* 156 (2008) 794-802.
- [6] K. Müller, G.N. Magesan, N.S. Bolan, “A critical review of the influence of effluent irrigation on the fate of pesticides in soil”, *Agric. Ecosyst. Environ.* 120 (2007) 93-116.
- [7] M.J. Cerejeira, P. Viana, S. Batista, T. Pereira, E. Silva, M.J. Valério, A. Silva, M. Ferreira, A.M. Silva-Fernandes, “Pesticides in Portuguese surface and ground waters”, *Water Res.* 37 (2003) 1055-1063.
- [8] M. Margni, D. Rossier, P. Crettaz, O. Jolliet, “Life cycle impact assessment of pesticides on human health and ecosystems”, *Agric. Ecosyst. Environ.* 93 (2002) 373-392.
- [9] http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/servtc2/visorEstadisticas/es.juntadeandalucia.cma.VisorEstadisticas/index.html?grupo=2010&lr=lang_es (Accessed March 2013).
- [10] G.N. Piccirilli, G.M. Escandar, F. Cañada, I. Durán-Merás, A. Muñoz de la Peña, “Flow-through photochemically-induced fluorescence optosensor for the determination of linuron”, *Talanta* 77 (2008) 852-857.
- [11] A. Belmonte Vega, A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, “Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry”, *Anal. Chim. Acta* 538 (2005) 117-127.
- [12] C. Cháfer-Pericás, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, “On-fibre solid-phase microextraction coupled to conventional liquid chromatography versus in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography for the screening analysis of triazines in water samples”, *J. Chromatogr. A* 1125 (2006) 159-171.
- [13] G. Zhao, S. Song, C. Wang, Q. Wu, Z. Wang, “Determination of triazine herbicides in environmental water samples by high-performance liquid chromatography using graphene-coated magnetic nanoparticles as adsorbent”, *Anal. Chim. Acta* 708 (2011) 155-159.
- [14] W.A. Battaglin, E.T. Furlong, M.R. Burkhardt, C.J. Peter, “Occurrence of sulfonylurea, sulfonamide, imidazolinone, and other herbicides in rivers, reservoirs and ground water in the Midwestern United States, 1998”, *Sci. Total Environ.* 248 (2000) 123-133.

- [15] A.T.K. Tran, R.V. Hyne, P. Doble, "Determination of commonly used polar herbicides in agricultural drainage waters in Australia by HPLC", *Chemosphere* 67 (2007) 944-953.
- [16] N. Barco-Bonilla, R. Romero González, P. Plaza-Bolaños, A. Garrido Frenich, J.L.Martínez Vidal, "Analysis and study of the distribution of polar and non-polar pesticides in wastewater effluents from modern and conventional treatments", *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7817-7825.
- [17] T.S. Thompson, B.D. Miller, "Use of solid phase extraction disks for the GC-MS analysis of acidic and neutral herbicides in drinking water", *Chemosphere* 36 (1998) 2867-2878.
- [18] J. Quintana, I. Martí, F. Ventura, "Monitoring of pesticides in drinking and related waters in NE Spain with a multiresidue SPE-GC-MS method including an estimation of the uncertainty of the analytical results", *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 3-13.
- [19] W.T. Ma, K.K. Fu, Z. Cai, G.B. Jiang, "Gas chromatography/mass spectrometry applied for the analysis of triazine herbicides in environmental waters", *Chemosphere* 52 (2003) 1627-1632.
- [20] M.C. Bruzzoniti, C. Sarzanini, G. Costantino, M. Fungi, "Determination of herbicides by solid phase extraction gas chromatography-mass spectrometry in drinking waters", *Anal. Chim. Acta* 578 (2006) 241-249.
- [21] J.J. Berzas, C. Guiberteau Cabanillas, M.J. Villaseñor Llerena, V. Rodríguez Robledo, "Sensitive SPE GC-MS-SIM screening of endocrine-disrupting herbicides and related degradation products in natural surface waters and robustness study", *Microchem. J.* 87 (2007) 62-71.
- [22] E.T. Furlong, M.R. Burkhardt, P.M. Gates, S.L. Werner, W.A. Battaglin, "Routine determination of sulfonylurea, imidazolinone, and sulfonamide herbicides at nanogram-per-liter concentrations by solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry", *Sci. Total Environ.* 248 (2000) 135-146
- [23] A. Laganà, A. Bacaloni, I. De Leva, A. Faberi, G. Fago, A. Marino, "Occurrence and determination of herbicides and their major transformation products in environmental waters", *Anal. Chim. Acta* 462 (2002) 187-198.
- [24] E. Ayano, H. Kanazawa, M. Ando, T. Nishimura, "Determination and quantitation of ulfonylurea and ureaherbicides in water samples using liquid chromatography with an electrospray mass detector", *Anal. Chim. Acta* 507 (2004) 211-218.

- [25] R. Loos, G. Locoro, S. Contini, "Occurrence of polar organic contaminants in the dissolved water phase of the Danube River and its major tributaries using SPE-LC-MS(2) analysis", *Water Res.* 44 (2010) 2325-2335.
- [26] J.L. Martínez Vidal, P. Plaza-Bolaños, R. Romero-González, A. Garrido Frenich, "Determination of pesticide transformation products: A review of extraction and detection methods", *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6767-6788.
- [27] R.A. Trenholm, B.J. Vanderford, S.A. Snyder, "On-line solid phase extraction LC-MS/MS analysis of pharmaceutical indicators in water: a green alternative to conventional methods", *Talanta* 79 (2009) 1425-1432.
- [28] J.M. Marín, J.V. Sancho, O.J. Pozo, F.J. López, F. Hernández, "Quantification and confirmation of anionic, cationic and neutral pesticides and transformation products in water by on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *J. Chromatogr. A* 1133 (2006) 204-214.
- [29] M. Kuster, M.J. López de Alda, C. Barat, D. Raldúa, D. Barceló, "Analysis of 17 polar to semi-polar pesticides in the Ebro river delta during the main growing season of rice by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Talanta* 75 (2008) 390-401.
- [30] C. Postigo, M.J. López de Alda, D. Barceló, A. Ginebreda, T. Garrido, J. Fraile, "Analysis and occurrence of selected medium to highly polar pesticides in groundwater of Catalonia (NE Spain): An approach based on on-line solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry detection", *J. Hydrol.* 383 (2010) 83-92.
- [31] H. Singer, S. Jaus, I. Hanke, A. Lück, J. Hollender, A.C. Alder, "Determination of biocides and pesticides by on-line solid phase extraction coupled with mass spectrometry and their behaviour in wastewater and surface water", *Environ. Pollut.* 158 (2010) 3054-3064.
- [32] J. Bones, K. Thomas, P.N. Nesterenko, B. Paull, "On-line preconcentration of pharmaceutical residues from large volume water samples using short reversed-phase monolithic cartridges coupled to LC-UV-ESI-MS", *Talanta* 70 (2006) 1117-1128.
- [33] M.J. García-Galán, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, "Determination of 19 sulfonamides in environmental water samples by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS)", *Talanta* 81 (2010) 355-366.

- [34] Q.T. Dinh, F. Alliot, E. Moreau-Guigon, J. Eurin, M. Chevreuil, P. Labadie, "Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC-MS/MS", *Talanta* 85 (2011) 1238-1245.
- [35] E. Beltrán, M. Ibáñez, J.V. Sancho, F. Hernández, "Quantification and confirmation of anionic, cationic and neutral pesticides and transformation products in water by on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *J. Chromatogr. A* 1133 (2006) 204-214.
- [36] Y.C. Barrett, B. Akinsanya, S.Y. Chang, O. Vesterqvist, "Automated on-line SPE LC-MS/MS method to quantitate 6beta-hydroxycortisol and cortisol in human urine: use of the 6beta-hydroxycortisol to cortisol ratio as an indicator of CYP3A4 activity", *J. Chromatogr. B* 821 (2005) 159-165.
- [37] U. Ceglarek, L. Kortz, A. Leichtle, G.M. Fiedler, J. Kratzsch, J. Thiery, "Rapid quantification of steroid patterns in human serum by on-line solid phase extraction combined with liquid chromatography-triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry", *Clin. Chim. Acta* 401 (2009) 114-118.
- [38] Commission Decision 2002/657/CE of 12 August 2002, implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
- [39] 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.* 10 (2005) 337-345.
- [40] P.J. Taylor, "Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry", *Clin. Biochem.* 38 (2005) 328-334.

III.2.3. Discusión del artículo científico 6

Optimización del método UHPLC-MS/MS

En primer lugar, se optimizaron los parámetros del detector de masas para cada uno de los 37 herbicidas analizados. Con el objetivo de cumplir con la Directiva 2002/657/CE, el analizador se programó en modo MRM y se monitorizaron dos iones de cada compuesto, el más abundante (ión precursor) se empleó para la cuantificación del plaguicida, mientras que el de menor abundancia y formado a través de la fragmentación del primero (ión producto) fue utilizado para su confirmación.

La fuente de ionización seleccionada para el análisis fue la ESI *Jet Stream*, cuya principal diferencia respecto a la fuente ESI convencional es que permite trabajar con mayor temperatura y cantidad de gas gracias a una segunda corriente de N₂ (llamada gas cortina) que focaliza la entrada de los iones hacia el cuadrupolo.

Todos los analitos fueron determinados en modo de ionización positiva ya que presentó mayor abundancia que en modo negativo. Bajo las condiciones experimentales de trabajo, en todos los casos se seleccionó como ión precursor la molécula protonada, [M+H]⁺, excepto para el metsulfuron metil, que formó principalmente el aducto sodiado, [M+Na]⁺.

Una vez establecidos todos los parámetros del detector, el siguiente paso fue la optimización de la fase móvil empleada en la separación cromatográfica. Se estudiaron dos fases acuosas diferentes, ácido fórmico 0.01 % y ácido fórmico 0.01%/formiato amónico 5 mM. Finalmente se seleccionó la última puesto que, aunque la separación cromatográfica obtenida con ambas fue similar, ésta proporcionó una mayor abundancia de los iones. En cuanto al componente orgánico de la fase móvil, en primer lugar se seleccionó el MeOH. Sin embargo, cuando se introdujo la etapa de preconcentración *on-line*, se observó una deformidad en la forma de los picos que desapareció cuando este disolvente fue sustituido por ACN.

El gradiente óptimo de fase móvil se seleccionó atendiendo a la separación de tres triazinas con estructura muy similar: sebutilazina, propazina y terbutilazina (Figura III.1). La propazina y la terbutilazina presentan las mismas transiciones de cuantificación y confirmación, por lo que es necesario conseguir su completa separación a línea base para poder analizarlas de manera independiente. Dada su similar estructura esto no fue posible, por lo que finalmente se cuantificaron de forma conjunta.

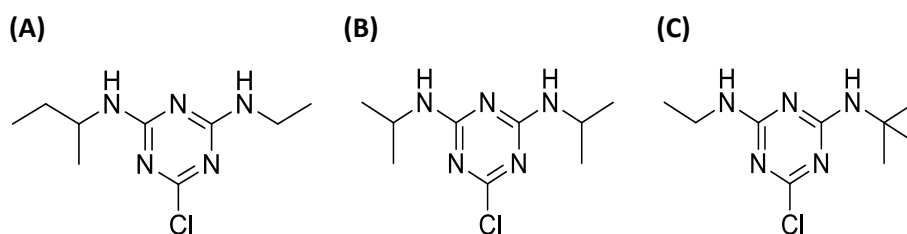


Figura III.1. Estructuras de la **(A)** sebutilazina, **(B)** propazina y **(C)** terbutilazina.

La columna cromatográfica seleccionada para el análisis fue del tipo núcleo sólido que se caracterizan por poseer una fase estacionaria formada por partículas con un núcleo de sílica no porosa, de 1,7 μm de diámetro, y una capa de sílice porosa de 0,5 μm . El uso de estas partículas como fase estacionaria, en combinación con instrumentos capaz de soportar altas presiones, permiten alcanzar una mayor eficacia en la separación cromatográfica, incluso trabajando a altas velocidades de flujo de fase móvil, como se ha explicado en la Parte II de esta Memoria.

Optimización de la SPE on-line

Una vez establecido el método cromatográfico, el siguiente paso fue la optimización de un método de SPE *on-line* que simplificara la etapa de preconcentración y proporcionara una mayor sensibilidad, de forma rápida y con el menor consumo de muestra posible. El equipo empleado para ello, cuyo esquema se muestra en la Figura III.2, consistió en un muestreador automático equipado con un sistema de inyección con capacidad de 900 μL y una válvula de inyección con 6 posiciones programables, que carga la muestra en el sistema de preconcentración. Es importante resaltar que la toma de muestra tiene lugar en dos pasos consecutivos, en los que el inyector toma el mismo volumen.

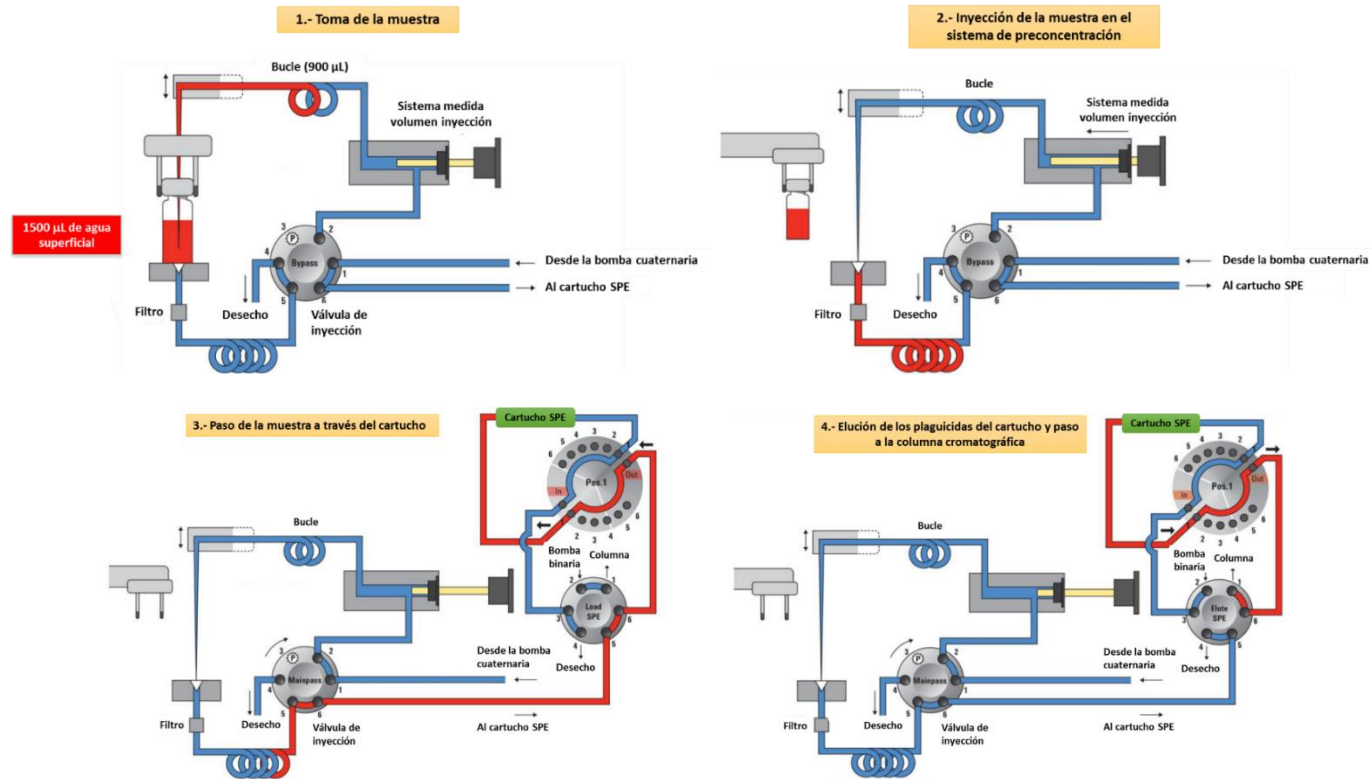


Figura III.2. Esquema del preconcentrador SPE *on-line*.

Una vez que la muestra está en el sistema, una segunda válvula de 6 posiciones programables permite seleccionar entre el paso de la muestra por el cartucho, arrastrada por un eluyente que previamente debe ser optimizado (y que es impulsado por una bomba cuaternaria) o, mediante el cambio de posición correspondiente, el paso de fase móvil, procedente de la bomba binaria del cromatógrafo, por el cartucho para eluir los compuestos anteriormente retenidos. Una vez que los compuestos han sido eluidos del cartucho, estos son direccionados hacia la columna cromatográfica, donde tiene lugar su correspondiente separación y posterior análisis con el detector de MS.

Se emplearon cartuchos reutilizables de partículas esféricas y rígidas con macroporos de poliestireno y divinilbenceno (PLRP-s) con dimensiones de 10 x 2 mm. Como se comentó anteriormente, en este punto fue necesario sustituir el MeOH por ACN como fase orgánica puesto que con el primer disolvente los picos aparecían deformados. Además, en este punto de la optimización del método, es necesario modificar el gradiente de la bomba binaria del cromatógrafo para compensar el tiempo adicional que tarda la muestra en llegar a la columna una vez que es eluida del cartucho. Para eso, basta con sumar 0,5 min al primer paso del gradiente. Un tiempo mayor es innecesario y solo contribuye a retrasar la salida de los compuestos de la columna y, por tanto, a alargar el tiempo total de análisis.

En la SPE *on-line* existen una serie de parámetros que afectan a la retención de los compuestos en el cartucho y que es necesario controlar para conseguir un óptimo rendimiento en la extracción y un proceso repetitivo: volumen de muestra tomado y flujo del eluyente que arrastra la muestra hacia el cartucho. Además es importante estudiar si existe lo que se conoce como *carryover* o efecto memoria, o si por el contrario el cartucho empleado puede reutilizarse más de una vez, lo que sería ideal para disminuir costos y aumentar la eficiencia del método. Las experiencias llevadas a cabo y la optimización de los parámetros se detalla en el artículo científico 6.

El método de extracción se validó a cuatro niveles de concentración (0,01, 0,03, 0,1 y 0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$) mediante el cálculo de los porcentajes de recuperación correspondientes, obteniéndose recuperaciones algo menores para el menor nivel de concentración estudiado (60-80%), y entre un 80-129% para todos los compuestos en el resto de concentraciones. El método SPE-LC *on-line* desarrollado se comparó con un proceso SPE *off-line*, previamente optimizado por el grupo de investigación, en

términos de porcentaje de recuperación de cada uno de los analitos a un nivel de concentración de $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$. Para ello se emplearon cartuchos HLB suministrados por Waters y Scharlau. Ambos cartuchos presentaron buenas recuperaciones para la mayoría de los plaguicidas estudiados, a excepción del tebutam, metolaclor, fenoxaprop-P-etil, cicloxidim y setoxidim. Estos dos últimos herbicidas no fueron extraídos por ninguno de los dos cartuchos HLB, mientras que el fenoxaprop-P-etil no se extrajo del cartucho de Waters. Por el contrario, los cartuchos PLRP-s empleados en la SPE *on-line* mostraron una gran capacidad de extracción para todos los compuestos y unos valores de recuperación mucho mejores que los cartuchos HLB, por lo que el método de preconcentración *on-line* no solamente simplifica la etapa de extracción respecto al proceso *off-line*, sino que además proporciona mejores resultados en el análisis de los herbicidas estudiados.

Estudio del efecto matriz

Mediante la comparación de las pendientes correspondientes a las rectas de patrón externo (realizadas en agua ultrapura) y adición patrón (realizadas con una muestra de agua superficial contaminada con los plaguicidas de interés) para cada uno de los compuestos estudiados, se observó la presencia de efecto matriz para todos ellos, a excepción del tebutam, prometrin, propizamida, cicloxidim, tepraloxidim y triasulfuron.

En espectrometría de masas el efecto matriz es un problema relativamente común, aunque existen varias metodologías para su corrección las cuales ya se han comentado en el apartado introductorio de esta parte de la Memoria. En este trabajo se ha evaluado la posibilidad de aplicar cada una de ellas para su eliminación, tal y como se explica detalladamente en el artículo científico. Así, en primer lugar se descartó la posibilidad del empleo de patrón interno dado el gran número de herbicidas analizados y la imposibilidad de disponer del patrón idóneo correspondiente para cada uno de ellos. Por otra parte, gracias a la buena sensibilidad obtenida para todos los analitos se pensó que se podría, mediante una simple dilución de las muestras, corregir satisfactoriamente el efecto matriz en todos los casos, asegurando una correcta cuantificación, independientemente de la muestra de agua analizada. Sin embargo, el efecto matriz no se eliminó por completo para algunos analitos incluso diluyendo la

muestra hasta un total de 10 veces, por lo que esta opción también fue descartada. Además, se observó que el efecto matriz encontrado dependía tanto de los analitos como de las matrices en las que se encontraban disueltos. Debido a esta falta de homogeneidad, resultaba extremadamente difícil y arriesgado establecer un criterio general de corrección para la totalidad de los compuestos seleccionados. Por este motivo, y dada la rapidez y simplicidad del método desarrollado, se optó por recurrir a la calibración mediante el método de adición patrón para el análisis de las muestras reales.

Finalmente, el método desarrollado fue validado y aplicado a un total de 19 muestras de agua superficiales de la provincia de Almería, procedentes de río, pozos, fuentes, etc., encontrándose en algunas de ellas (correspondientes a zonas cercanas a tierras de cultivo) varios plaguicidas en concentraciones de trazas, pero en ningún caso en niveles superiores a los límites establecidos en la legislación. La adquisición de dos transiciones por compuesto permitió, en una sola inyección llevar a cabo la identificación fiable de los positivos encontrados.

Este trabajo nos permite concluir que UHPLC acoplado a un analizador MS/MS en modo MRM es una herramienta analítica excelente para métodos multiresiduo de cuantificación y confirmación (con una selección previa de los compuestos de interés) ya que, gracias a su alta sensibilidad y selectividad, permite alcanzar bajos límites de detección aplicando procedimientos sencillos de tratamientos de muestras.

III.3. Análisis de carbamazepina, ofloxacina y piroxicam mediante fluorescencia fotoinducida en combinación con algoritmos quimiométricos de segundo orden

III.3.1. Introducción al artículo científico 7

Como se ha puesto de manifiesto en la introducción de esta parte de la Memoria, los fármacos constituyen uno de los grupos de contaminantes prioritarios dentro del grupo de contaminantes emergentes, por lo que la propuesta de métodos de análisis para este tipo de compuestos en matrices ambientales o alimenticias está incrementándose año tras año. La mayor parte de dicha metodología analítica está basada en separaciones cromatográficas acopladas a detección con espectrometría de masas que, si bien es una herramienta muy potente para el análisis de compuestos que se encuentran en baja concentración en matrices complejas por su selectividad y sensibilidad, requiere de un instrumental sofisticado y caro que lamentablemente no está disponible en muchos laboratorios analíticos. Por este motivo, en el presente trabajo de investigación nos propusimos como objetivo el desarrollo de un método sencillo basado en el tratamiento de señales fluorescentes, de fácil y rápida adquisición, con los algoritmos quimiométricos de segundo orden que han sido previamente descritos (Parte I de esta Tesis Doctoral).

Los contaminantes objeto de estudio han sido la carbamazepina (CBZ), el piroxicam (PX) y la ofloxacina (OFL), que son representativos de diversos grupos de fármacos.

La CBZ (5*H*-dibenzo-(b,f)-azepine-5-carboxamida) es un fármaco anticonvulsivo que evita el cúmulo excesivo, rápido y repetitivo de impulsos eléctricos entre células nerviosas, manteniendo normal la actividad cerebral. Su uso es común en el tratamiento de la epilepsia, aunque también está descrito para el tratamiento de episodios maníacos y del trastorno afectivo bipolar, dado que presenta propiedades estabilizadoras del ánimo, y también se utiliza en el tratamiento de dolores neuropáticos, esclerosis múltiple, depresión, trastorno por estrés postraumático, abstinencia de drogas y alcohol, síndrome de piernas inquietas, diabetes insípida y neuralgia del trigémino [1]. Se caracteriza por poseer una fuerte lipofilia. Aproximadamente el 70-80% de la CBZ administrada por vía oral se adsorbe, concretamente se une con proteínas, mientras que el porcentaje restante se elimina principalmente por vía renal.

El PX (4 hidroxí-2-metil-*N*-(2-piridil)-2*H*-1,2-benzotiazina-3-carboxamida-1,2-dióxido) es un conocido antiinflamatorio no-esteroideo (NSAIDs, *Non-Steroidal Anti-*

Inflammatory Drug) que presenta actividad analgésica y antipirética. Exhibe una respuesta rápida y eficaz en el tratamiento de muchas enfermedades como la artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante, gota aguda, neuralgia, dolor postparto y lesiones deportivas, entre otras [2,3]. Aproximadamente un 5% de la droga administrada se excreta a través de la orina [4].

La OFL (ácido 9-fluoro-2,3-dihidro-3-metil-10-(4-metil-L-piperazinil)-7-oxo-7H-pirido[1,2,3-de]-1,4-benzoxazine-6-carboxílico) es un antibiótico de las familias de las fluoroquinolonas, ampliamente utilizado como agente antimicrobiano dada su actividad de amplio espectro y farmacocinética favorable [5]. Está indicado para múltiples cuadros infecciosos como neumonías, bronquitis, enfermedades venéreas e infecciones de la próstata, piel y vías urinarias, incluyendo las causadas por microorganismos con resistencia a varios antibióticos. Apenas se metaboliza en el organismo y la mayor parte se elimina inalterada a través de la orina [6].

Los tres analitos son de uso frecuente y terminan en las aguas por las vías anteriormente comentadas, por lo que es importante el desarrollo de métodos sencillos y rápidos para su determinación en este medio. La CBZ es el compuesto farmacéutico más detectado en sistemas acuáticos, encontrándose en niveles de partes por billón a partes por trillón en los efluentes de plantas de tratamientos de aguas u hospitales, e incluso en aguas superficiales y aguas potables [7,8]. De hecho, este medicamento ha sido propuesto por varios autores como marcador antropogénico por excelencia del agua. Trabajos recientes han determinado que se trata de un compuesto bastante persistente y que las eficiencias de eliminación por la estaciones de depuración de aguas residuales son inferiores al 10% [9]. El PX y la OFL por su parte también han sido detectados en numerosas muestras acuosas [10].

En cuanto a sus propiedades fluorescentes, la CBZ, que es el contaminante más abundante de los tres analizados, no presenta fluorescencia nativa, por lo que es necesario inducirla para poder analizarla con la metodología planteada. Una de los métodos más comúnmente empleado para ello es la obtención de derivados fluorescentes a partir de especies no fluorescentes, por ejemplo, a partir de la reacción con un reactivo derivatizante que dé lugar a la formación de compuestos con esta característica. Sin embargo, para que esa opción sea viable el compuesto debe reunir una serie de características estructurales que lo hagan propenso a sufrir ese tipo de reacción, algo que no siempre se cumple.

Otra alternativa es la fluorescencia fotoinducida (PIF, *Photo-Induced Fluorescence*), basada en la obtención de fotoproductos fuertemente fluorescentes mediante irradiación con luz UV de analitos débilmente o no fluorescentes, y posterior detección fluorimétrica de los mismos. Es importante tener en cuenta que para que una reacción inducida fotoquímicamente sea útil, desde el punto de vista analítico, debe reunir los siguientes requisitos:

- el analito debe absorber fuertemente en el UV para que tenga lugar la reacción fotoquímica,
- la radiación absorbida debe ser de una longitud de onda que no sea absorbida significativamente por el fotoproducto, evitándose así numerosas reacciones secundarias de descomposición posterior,
- los fotoproductos deberán ser química y térmicamente estables, al menos en el intervalo de tiempo necesario para la realización de las medidas, y presentar un aumento de la rigidez estructural respecto al compuesto de partida que dé lugar a un aumento de la absorptividad molar,
- el proceso de fotoconversión debe tener un elevado rendimiento.

Estos requisitos raramente se cumplen simultáneamente, aunque se trata de buscar las condiciones químicas más adecuadas, así como las condiciones de irradiación más ventajosas, a fin de conseguir los resultados óptimos para cada analito.

En los últimos años, la PIF ha sido ampliamente empleada para el análisis de contaminantes como pesticidas [11-13] o fármacos [14,15], dada las numerosas ventajas que ofrece esta técnica, entre las que destacan:

- el uso de fotones como reactivo para la conversión de los analitos, en lugar de un reactivo químico, implica que no se necesita un sistema de mezcla y, por tanto, el analito no sufre dilución,
- la mayoría de las reacciones fotoquímicas transcurren vía radicales libres, con altas velocidades de reacción, resultando tiempos de conversión cortos,
- se trabaja a temperatura ambiente,

- la técnica es fácil de desarrollar, no requiere equipamiento caro y puede ser aplicada tanto en estado estacionario como acoplada a sistemas dinámicos como análisis por inyección en flujo (FIA, *Flow Injection Analysis*), HPLC, o cromatografía plana,

- desde el punto de vista analítico, otra ventaja es que no es necesario identificar la estructura del compuesto o compuestos fluorescentes formados después de la irradiación con luz UV, a condición de que la señal obtenida sea reproducible.

En el presente trabajo, se hace uso de esta herramienta, en combinación con algoritmos quimiométricos de segundo orden, para el análisis de los contaminantes emergentes mencionados anteriormente. La metodología de trabajo seguida, así como los resultados obtenidos se presentan en el **artículo científico 7**.

Bibliografía

- [1] D.P. Mohapatra, S.K. Brar, R. Dagherir, R.D. Tyagi, P. Picard, R.Y. Surampalli, P. Drogui, "Photocatalytic degradation of carbamazepine in wastewater by using a new class of whey-stabilized nanocrystalline TiO₂ and ZnO", *Sci. Total Environ.* 485-486 (2014) 263-269.
- [2] P.C. Damiani, M. Bearzotti, M. Cabezo, A.C. Olivieri, "Spectrofluorometric determination of piroxicam", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 233-236.
- [3] N. Alizadeh, F. Keyhanian, "Sensitive and selective spectrophotometric assay of piroxicam in pure form, capsule and human blood serum samples via ion-pair complex formation", *Spectrochim. Acta A* 130 (2014) 238-244.
- [4] P.A. Milligan, "Determination of piroxicam and its major metabolites in the plasma, urine and bile of humans by high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. B* 576 (1992) 121-128.
- [5] H.C. Neu, "Quinolone antimicrobial agents", *Annu. Rev. Med.* 43 (1992) 465-486.
- [6] H. Wang, Z.X. Liao, M. Chen, X.L. Hu, "Effects of hepatic fibrosis on ofloxacin pharmacokinetics in rats", *Pharmacol. Res.* 53 (2006) 28-34.
- [7] I. Ferrer, E.M. Thurman, "Analysis of 100 pharmaceuticals and their degradates in water samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry", *J. Chromatogr. A* 1259 (2012) 148-157.
- [8] M. Hampel, J.E. Bron, J.B. Taggart, M.J. Leaver, "The antidepressant drug Carbamazepine induces differential transcriptome expression in the brain of Atlantic salmon, *Salmo salar*", *Aquat. Toxicol.* 151 (2014) 114-123.
- [9] Y. Zhang, S.W. Geiben, C. Gal, "Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies", *Chemosphere* 73 (2008) 1151-1161.
- [10] L.H.M.L.M. Santos, M. Gros, S. Rodriguez-Mozaz, C. Delerue-Matos, A. Pena, D. Barceló, M. Conceição, B.S.M. Montenegro, "Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals", *Sci. Total Environ.* 461-462 (2013) 302-316.
- [11] P.A. Diaw, A. Maroto, O.M.A. Mbaye, M.D. Gaye-Seye, L. Stephan, A. Coly, L. Deschamps, A. Tine, J.J. Aaron, P. Giamarchi, "Determination of phenylurea pesticides by direct laser photo-induced fluorescence" *Talanta* 116 (2013) 569-574.

- [12] O.M.A. Mbaye, A. Maroto, M.D. Gaye-Seye, L. Stephan, L. Deschamps, J.J. Aaron, P. Giamarchi, "A new direct laser photo-induced fluorescence method coupled on-line with liquid chromatographic separation for the simultaneous determination of ANILIDES pesticides", *Talanta* DOI: 10.1016/j.talanta.2014.08.052.
- [13] M. Mbaye, M.D. Gaye Seye, J.J. Aaron, A. Coly, A. Tine, "Application of flow injection analysis-photo-induced fluorescence (FIA-PIF) for the determination of α -cypermethrin pesticide residues in natural waters", *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 403-410.
- [14] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, A. Sanz, E. Bravo, "Simultaneous determination of doxorubicin, daunorubicin, and idarubicin by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *Electrophoresis* 22 (2001) 134-138.
- [15] A. Pena, J.R. Albert-Garcia, L.J.G. Silva, C.M. Lino, J. Martínez Calatayud, "Photo-induced fluorescence of magnesium derivatives of tetracycline antibiotics in wastewater samples", *J. Hazard. Mater.* 179 (2010) 409-414.

III.3.2. Artículo científico 7

Enviado a Talanta

“Green analytical determination of emerging pollutants in environmental waters using excitation-emission photoinduced fluorescence data and multivariate calibration”

**María del Carmen Hurtado-Sánchez, Valeria A. Lozano,
María Rodríguez-Cáceres, Isabel Durán-Merás, Graciela M. Escandar**

Abstract

An eco-friendly strategy for the simultaneous quantification of three emerging pharmaceutical contaminants is presented. The proposed analytical method, which involves photochemically induced fluorescence matrix data combined with second-order chemometric analysis, was used for the determination of carbamazepine, ofloxacin and piroxicam in water samples of different complexity without the need of chromatographic separation. Excitation-emission photoinduced fluorescence matrices were obtained after UV irradiation in an acidic medium, and subsequently processed by applying second-order algorithms. Although different alternatives were applied, only one of them was able to overcome the strong spectral overlapping among the studied pollutants and, in addition, allowed their successful quantitation in very interferent media. The sensitivity of the method in both superficial and underground water samples was enhanced by a simple solid-phase extraction procedure with C18 membranes, which proved to be a successful extraction/preconcentration of pollutants at trace levels. Limits of detection in real water samples subjected to a preconcentration factor of 1:125 ranged from about 0.04 to 0.3 ng mL⁻¹, as calculated for the first time using a very recent and novel IUPAC-consistent approach. Relative prediction errors around 10% were achieved. The proposed strategy is significantly simpler and greener than current liquid chromatography-mass spectrometry methods, without compromising the analytical quality of the obtained results.

Keywords: *Emerging pollutants, Photoinduced fluorescence, Unfolded partial least squares/residual bilinearization, Water samples.*

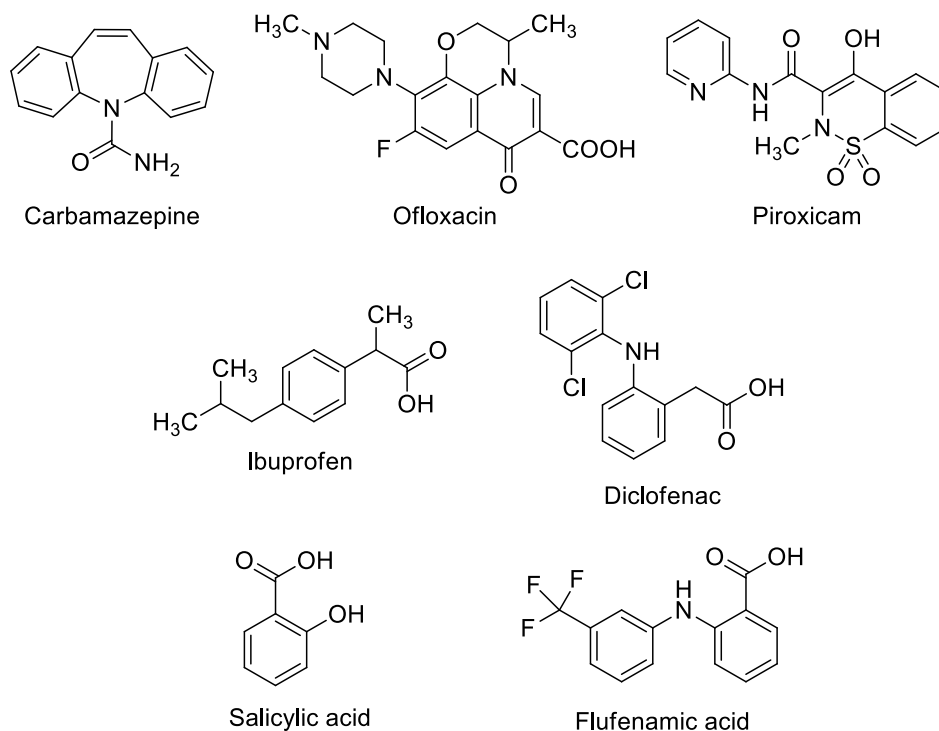
1. Introduction

Emerging pollutants are compounds not currently covered by existing water-quality regulations and, because many of them show toxic effects, they represent potential threats to ecosystems and human health [1,2]. These pollutants do not need to persist to negatively affect the well-being of exposed organisms, since their introduction into the environment is continuous, especially those belonging to the pharmaceutical group [1-7]. Pharmaceutically active compounds used in both human and veterinary medicine are excreted via feces and urine, partly transformed into glucuronides and sulphates or even unchanged, and are suspected to enter aquatic bodies through the effluents of sewage treatment plants [7-11]. Therefore, continuous efforts are devoted to develop appropriate methods for their monitoring and quantification in natural samples.

Although liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) is one of the most commonly applied methods for the determination of pharmaceutical compounds and their degradation products in the aquatic environment [2,12,13], greener methodologies, i.e. without separations and clean up steps, and minimizing the use of organic solvents, are very welcome [14].

In the present work, three emerging pollutants, representative of different groups of therapeutic drugs, were investigated: the anticonvulsant carbamazepine (CBZ), the antibacterial fluoroquinolone ofloxacin (OFL), and the non-steroidal anti-inflammatory piroxicam (PX) (Scheme 1). These therapeutic drugs are frequently found in environmental waters, representing a common threat for human and living aquatic organisms. The fact that these pollutants display photo-induced fluorescence (PIF) upon UV irradiation would allow their quantification based on this type of signal. It is known that relatively few molecules present fluorescent properties and the group of compounds that form fluorescent photoproducts is even smaller. Moreover, some fluorescent analytes undergo photodegradation after the sample has been subjected to UV irradiation, resulting in quenching of the signals. These facts may lead to the erroneous conclusion that methods based on PIF measurements present limited

spectral interferences. However, as will be demonstrated in this paper, when dealing with multicomponent systems, the probability of the occurrence of interferences significantly increases and, in principle, clean-up and separation procedures are almost unavoidable for the proper quantification of target analytes.



Scheme 1. Chemical structures of carbamazepine (CBZ), ofloxacin (OFL), piroxicam (PX), ibuprofen (IBU), diclofenac (DICLO), salicylic acid (SAL) and flufenamic acid (FLU).

Recently, our research group quantified CBZ, as a single analyte, in environmental waters using the PIF signals obtained after UV irradiation of acidic solutions in a simple laboratory-constructed reactor [15]. In the latter work, the lack of selectivity was overcome by multi-way calibration displaying the so-called second-order advantage [16] and, thus, the quantification of the pollutant was performed in the presence of unknown sample constituents. Second-order data were obtained by measuring excitation-emission photoinduced fluorescence matrices (EPIFMs) and

processed them by different algorithms, although successful results were obtained with the aid of multivariate curve resolution-alternating least-squares (MCR-ALS) [17].

The critical difference of the present report with the earlier work is that the simultaneous resolution of three usual anthropogenic emerging contaminants which strongly overlap their PIF spectra is presently intended, with the concomitant change in both data analysis and results interpretation. Further, the determinations are performed in solutions containing the analytes and additional pharmaceuticals as potential interferents, such as ibuprofen (IBU), diclofenac (DICLO), salicylic acid (SAL) and flufenamic acid (FLU) (Scheme 1). The latter compounds, which are profusely employed in our geographical region and may thus be present in real water samples, showed fluorescence signals (either in native form or from their photoproducts) significantly overlapping with those of the studied compounds.

Three chemometric algorithms which achieve the second-order advantage, i.e., parallel factor analysis (PARAFAC) [18], MCR-ALS, and unfolded partial least-squares coupled to residual bilinearization (U-PLS/RBL) [19,20], were applied to process the EEPFMs. Noticeable differences in the prediction capabilities of the employed algorithms were found and discussed. To the best of our knowledge, it is the first time that the selectivity offered by the chemometric analysis is evaluated for the simultaneous determination of several analytes using EEPFMs in very interfering media. The feasibility of determining the three emergent pollutants in real water samples using sustainable resources is demonstrated.

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

CBZ, OFL and PX were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Methanol (MeOH), formic acid and hydrochloric acid (HCl) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). IBU, DICLO, SAL and FLU were of analytical grade and were used as received. Stock standard solutions of individual analytes ($404.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ CBZ, $420.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ PX and $510.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ OFL) were prepared by dissolving an appropriate amount of each compound in methanol, and stored at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Working analyte solutions of $2.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ were daily prepared by dilution of stock standard solutions in ultrapure water. Ultra pure Milli-Q water was used throughout the work.

2.2. Instrumentation

Fluorescence measurements were performed on an Aminco Bowman (Rochester, NY, USA) Series 2 luminescence spectrophotometer, equipped with a 150 W xenon lamp. EPIFMs were measured from 246 to 333 nm (each 3 nm) and from 380 to 480 nm (each 1 nm), respectively. In this way, the matrices were of size 29×100. Both the excitation and emission slit widths were of 8 nm using 1.00 cm quartz cells. The photomultiplier tube (PMT) sensitivity was fixed at 600 V and the temperature of the cell compartment was regulated at 20 °C using a thermostatic bath (Cole-Parmer, IL, USA). The EPIFMs were saved in ASCII format, and transferred to a PC for subsequent chemometric analysis.

Chromatographic separations were carried out with an Agilent 1200 Series liquid chromatograph system coupled to micrOTOF-Q II (Bruker Daltonics). The LC instrument was equipped with a binary pump system using a Zorbax Eclipse XDB-C18 column (3×50 mm, 1.8 μm, Agilent Technologies). The compounds were analyzed with an electrospray ion source under positive ionization mode. The mass spectrometer was operated in scan mode MS from 150 to 700 m/z. The flow rate was 0.3 mL min⁻¹ and the sample volume injected was 40 μL. For the analysis the optimized conditions were as follows: solvent (A) water in 0.1 % formic acid, solvent (B) MeOH in 0.1 % formic acid. The gradient elution was: 0-6 min 5% B; 6-8.5 min 100% B; 8.5-10 min 5% B (return to initial conditions); 10-12 min in equilibration of the column. The source parameters were: gas temperature 200 °C, gas flow 4 L min⁻¹, nebulizer pressure 10 psi, capillary voltage 4500 V and reference ions for mass calibration: CBZ 237.097142 [M+H]⁺, OFL 362.150038 [M+H]⁺ and PX 332.057588 [M+H]⁺.

2.3. Chemometric algorithms and software

A brief theoretical description of the applied algorithms can be found in the Supplementary Material. The routines employed are written in MATLAB 7.10 [21]. All algorithms were implemented using the graphical interface of the MVC2 toolbox [22], which is available on the Internet [23]. The software package Design Expert 6.0 (Stat-Ease Inc.) was used for the experimental design.

2.4. Calibration, validation and test samples

A calibration set was built by employing a central composite design. The concentration ranges were between 0.0 and 60 ng mL⁻¹ for all the studied analytes (Table 1). The corresponding volumes of the aqueous standard solutions of each analyte were transferred into 2.00 mL volumetric flasks and 2 mol L⁻¹ HCl was added to the mark. These solutions were transferred to a 1.0 cm quartz cell, and irradiated during 20 min in a laboratory-constructed reactor described in a previous work [15]. Finally, solutions were cooled to 20 °C and their EPIFMs were recorded in the conditions described in Section 2.2.

Table 1. Calibration samples provided by a central composite design.

Sample	CBZ ^a	OFL ^a	PX ^a
1	30.0	0.0	30.0
2	30.0	60.0	30.0
3	30.0	30.0	0.0
4	30.0	30.0	60.0
5	0.0	30.0	30.0
6	60.0	30.0	30.0
7	12.2	12.2	12.2
8	12.2	47.8	12.2
9	12.2	12.2	47.8
10	12.2	47.8	47.8
11	47.8	12.2	12.2
12	47.8	47.8	12.2
13	47.8	12.2	47.8
14	47.8	47.8	47.8
15	30.0	30.0	30.0

^a All concentrations are given in ng mL⁻¹.

A set of 15 validation samples, having analyte concentrations different from the calibration ones, was prepared and processed in a similar way as the calibration solutions. The concentrations of the three analytes were selected at random from the corresponding calibration ranges.

As will be demonstrated below, among emerging pollutants of pharmaceutical origin, IBU, DICLO, SAL and FLU have fluorescence signals (either native or photoinduced) that significantly overlap with those of the studied compounds. Therefore, with the purpose of evaluating the method in the presence of these interfering pollutants, 15 samples were prepared containing random concentrations of CBZ, OFL, and PX in the range 0-60 ng mL⁻¹ and high concentrations of interferents, namely 1000-3000, 100-300, 3000-8000 and 1000-5000 ng mL⁻¹ for IBU, DICLO, SAL and FLU, respectively. Taking into account that the highest concentration of each analyte was about 60 ng L⁻¹, this ensures that each interferent was between 2 and 130 times more concentrated than the analytes.

2.5. Water samples

The proposed methodology was applied for the quantification of CBZ, OFL, and PX in real water samples. The latter included: river water (Paraná River, Argentina), underground waters (Funes City and Santa Rosa City, Argentina) and tap water (Venado Tuerto City, Santa Fe, Argentina), and were prepared by spiking the waters with the analytes at two different concentrations, obtaining levels between 0.08 and 14 ng mL⁻¹. All samples were then sequentially filtered through a filter paper and through a 20 µm nylon membrane to remove suspended solid materials. To improve the sensitivity of water analysis, most samples were subjected to a solid-phase extraction (SPE) procedure with C18 disks. Each disk was previously conditioned with 0.5 mL of MeOH and 1 mL of ultrapure water. Aliquots of either 100 mL (analyte concentrations larger than 0.2 ng mL⁻¹) or 250 mL (analyte concentrations lower than 0.2 ng mL⁻¹) were passed through the disks under vacuum, with a flow rate of about 10 mL min⁻¹. No pre-concentration was applied for analyte concentrations larger than 6 ng mL⁻¹.

After elution of the retained organic compounds with 500 µL of MeOH, the extract was collected in a 2.00 mL volumetric flask, the solvent was evaporated by using nitrogen, and the residue was reconstituted with 2 mol L⁻¹ HCl until the mark. This implies a degree of preconcentration of 1:50 or 1:125, depending on the sample volume. Finally, the samples were subjected to the procedure described above, and the analyte concentrations were estimated using second-order multivariate calibration.

Aliquots of the investigated samples were analyzed by LC-MS. A similar SPE procedure was applied, but after elution of the retained organic compounds with 500 μL of MeOH, the extract was collected in a 2.00 mL volumetric flask, reconstituted with ultra pure Milli-Q water until the mark, and injected in the chromatographic system.

3. Results and Discussion

3.1. Preliminary studies

In a first stage, the photoinduced fluorescence properties of the three studied analytes were evaluated. As previously reported [15], CBZ is naturally non-fluorescent, but displays fluorescence signals upon UV irradiation in an acidic medium, with excitation and emission maxima at 308 and 410 nm respectively (Fig. 1A). To obtain the largest signals, optimal working conditions were found to be 2 mol L⁻¹ HCl, and 20 min irradiation time with two 4 W germicide tubes separated by 6 cm from each other.

On the other hand, OFL displays native fluorescence in aqueous solution, with excitation and emission maxima at about 290 and 500 nm respectively (Fig. 1B). When an OFL acid solution (2 mol L⁻¹ HCl) is irradiated with UV light in the same conditions as those used for CBZ, excitation and emission spectra with maxima at 252 and 435 nm are observed, which are ascribed to the formation of fluorescent photoproducts.

Finally, while no significant fluorescence emission is observed for a neutral aqueous PX solution, intense signals are detected at pH < 2 [24]. Under UV irradiation in a 2 mol L⁻¹ HCl medium, the PX photoproducts display excitation and emission fluorescence maxima at about 294 nm and 372 nm, respectively (Fig. 1C). Among the PX photoproducts, 2-aminopyridine exhibits maxima near the above values [25], and therefore this compound could be responsible for the fluorescence observed for irradiated PX.

Linear relationships between the original analyte concentrations and the obtained fluorescence intensities were corroborated. Among the three studied analytes, CBZ shows the lowest signals (Fig. 1) and, consequently, the experimental conditions for the quantitative analyses were adjusted in order to optimize the CBZ signals. These conditions were indicated above and were maintained in the subsequent experiments.

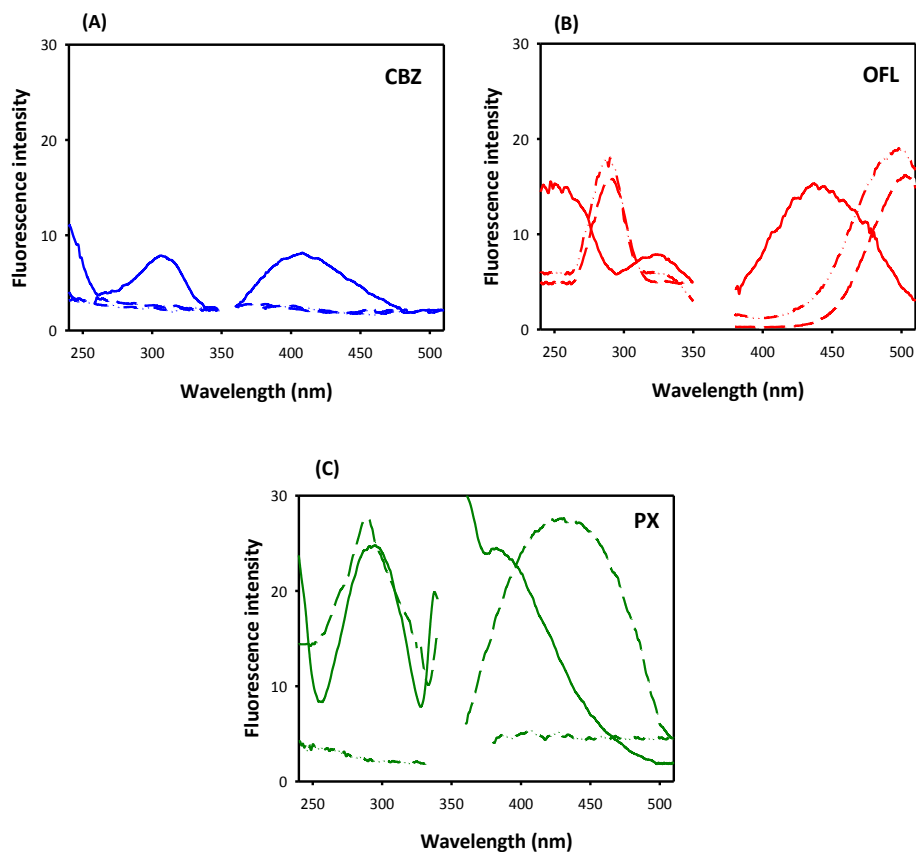


Figure 1. Excitation and emission fluorescence spectra for **(A)** CBZ, **(B)** OFL and **(C)** PX in water solution (dash-dot-dotted line), and in 2 mol L⁻¹ HCl solution, before (dashed line) and after UV irradiation (solid line). [CBZ] = [OFL] = [PX] = 60.0 ng mL⁻¹.

3.2. Quantitative analysis

Fig. 2A shows the normalized fluorescence spectra for the CBZ, OFL and PX photoproducts obtained upon UV irradiation under the employed working conditions. It is clear that overlapping occurs among both the excitation and emission spectra, which hinders the direct spectrofluorimetric determination of the three analytes through a typical zeroth-order calibration. The situation regarding selectivity becomes more serious if other fluorescent pollutants are also present (Fig. 2B). Therefore, with the purpose of overcoming the spectral overlapping problem avoiding previous

separation steps, a second-order calibration using EEPiFMs and applying algorithms which achieve the second-order advantage [16] was intended. As indicated in the introduction, the second-order advantage refers to the property of selected chemometric algorithms to predict the concentrations of the analytes in the presence of any number of unsuspected constituents of the samples, avoiding the requirement of either interference removal, as in zeroth-order calibration, or the construction of a large and diverse calibration set, as in first-order calibration.

3.2.1. Calibration and validation samples

After the UV irradiation procedure, EEPiFMs were recorded for the calibration and validation samples (Fig. 3A), where only CBZ, PX and OFL are present, and these data were subjected to chemometric analysis. It is known that a set of EEPiFMs can be arranged as a three-way array, which in general complies with the trilinearity conditions [26] and, therefore, the first option when choosing the algorithm for data processing should be PARAFAC [27].

The selection of optimum number of PARAFAC components was performed following the procedures described in the Supplementary Material. The estimated number of components in validation samples was 4, which can be justified taking into account the presence of the three analytes and the background signal.

Fig. 4A illustrates the prediction of concentration values for each analyte when PARAFAC was applied to the validation set. As can be concluded, while the predictions for both OFL and PX are in good agreement with the nominal values, the results for the CBZ are poor. This conclusion is also obtained when the elliptical joint confidence region (EJCR) test is applied [28]. This approach computes the joint confidence interval for the intercept and the slope of the found vs. nominal concentration plot. The estimated intercept and slope are compared with their ideal values of 0 and 1 using the elliptical joint confidence region test. In the cases of OFL and PX, the corresponding ellipses contain the theoretical (0,1) point, but the latter is away from the obtained ellipse for CBZ. The poor PARAFAC recovery results obtained for CBZ may be ascribed to a lack of selectivity for this analyte, i.e., the significant spectral overlapping between weak CBZ signals and those for PX (Fig. 2A), which prevents the successful decomposition of the three-way data.

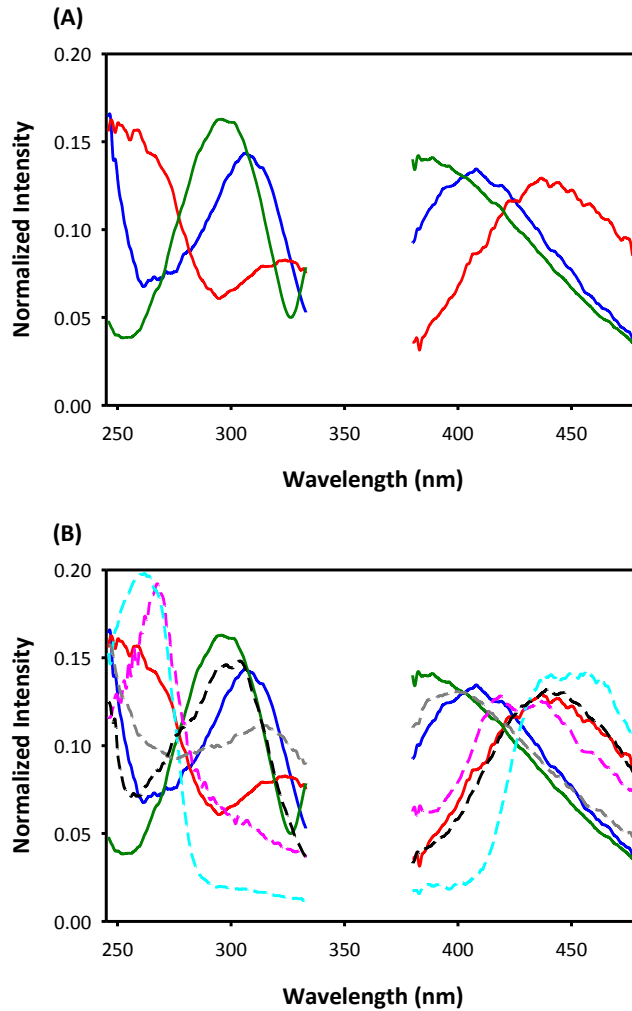


Figure 2. (A) Normalized excitation and emission photoinduced fluorescence spectra for CBZ (blue line), OFL (red line) and PX (green line). **(B)** The same spectra as in part A, and the normalized excitation and emission fluorescence spectra for DICLO (dashed-gray line), FLU (dashed-cyan line), IBU (dashed-pink line) and SAL (dashed-black line) after UV irradiation.

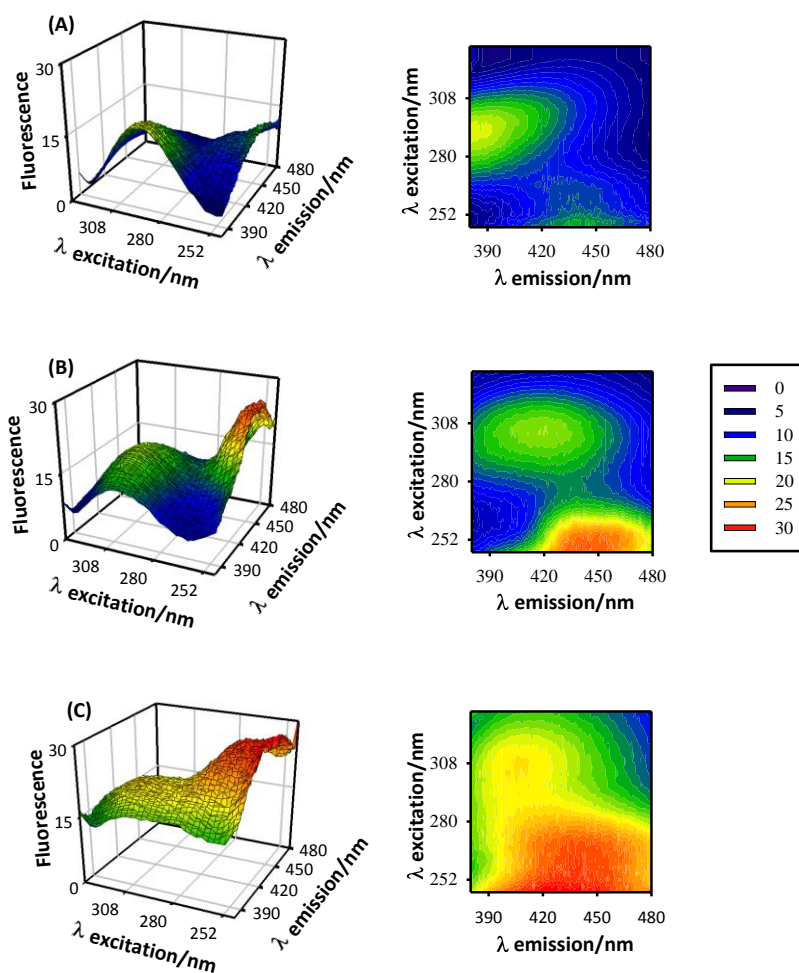


Figure 3. Three-dimensional plots and the corresponding contour plots of excitation-emission photoinduced fluorescence for **(A)** a validation sample containing 28.0 ng mL^{-1} CBZ, 32.0 ng mL^{-1} OFL and 31.5 ng mL^{-1} PX, **(B)** a test sample containing 7.8 ng mL^{-1} CBZ, 8.2 ng mL^{-1} OFL, 16.8 ng mL^{-1} PX, 3000 ng mL^{-1} IBU, 1500 ng mL^{-1} DICLO, 1500 ng mL^{-1} SAL and 100 ng mL^{-1} FLU, and **(C)** a spiked underground water after solid-phase extraction (original concentrations are: $[\text{CBZ}] = 0.34 \text{ ng mL}^{-1}$, $[\text{OFL}] = 0.36 \text{ ng mL}^{-1}$ and $[\text{PX}] = 0.34 \text{ ng mL}^{-1}$).

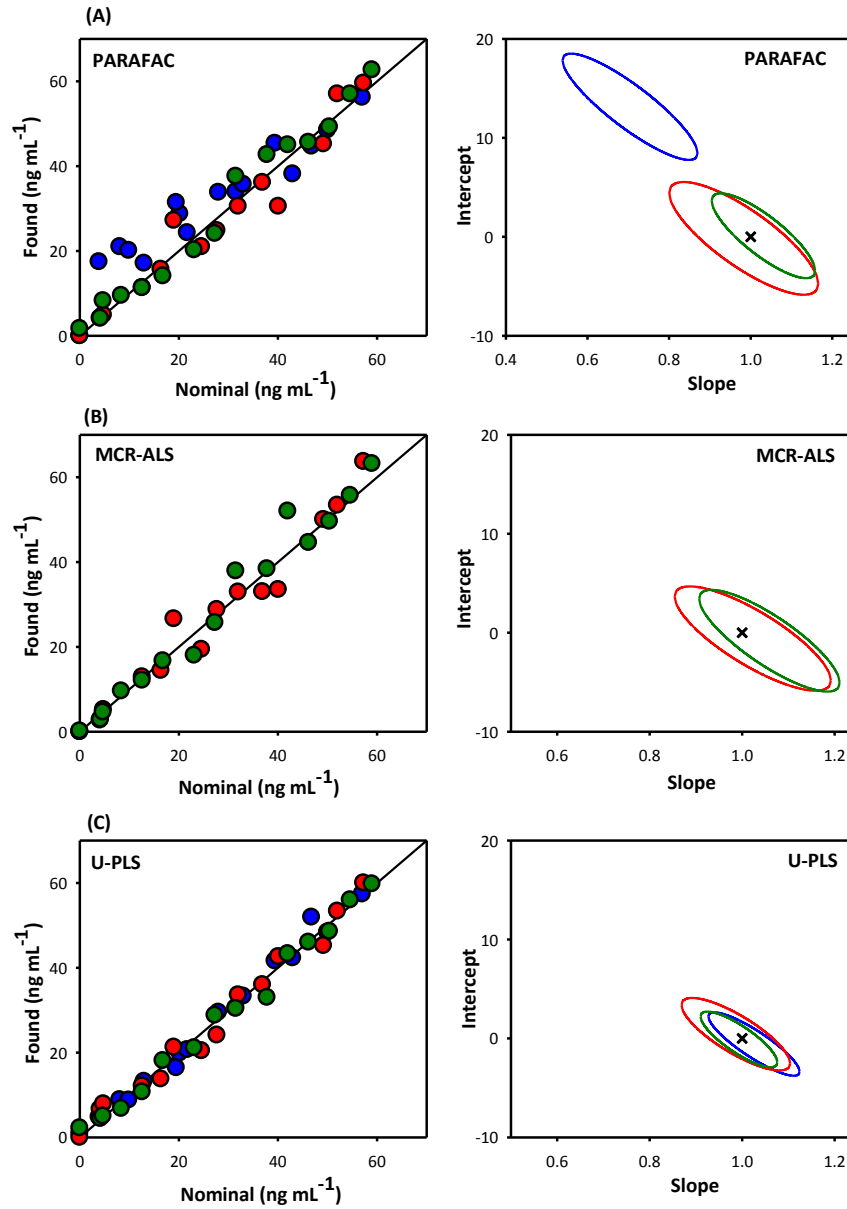


Figure 4. Plots for the CBZ (blue), OFL (red) and PX (green) predicted concentrations in validation samples as a function of the nominal values (the solid lines are the perfect fits), and elliptical joint regions (at 95% confidence level) for the slope and intercept of the regression of the corresponding data. Black points mark the theoretical (intercept = 0, slope = 1) point. **(A)** PARAFAC, **(B)** MCR-ALS, and **(C)** U-PLS.

MCR-ALS, which had proven to be the best algorithm when CBZ was determined in natural waters by a similar EEPFIM approach [15], was also evaluated in validation samples. Since a significant overlapping among the studied analytes is observed in excitation and emission spectra, both modes of augmentation were checked, e.g. building the augmented column-wise (emission spectral) and the augmented row-wise (excitation spectral) matrices. The selection of the optimum number of MCR-ALS components was performed following the procedures described in the Supplementary Material. For validation samples in both augmentation modes the optimum number of components was four, and they were ascribed to the three analytes and the background. Non-negativity constraints in both data modes were applied, and the selected convergence criterion was 0.1% (relative change in fit for successive iterations).

MCR-ALS in both augmentation modes showed a similar behavior to that of PARAFAC, rendering good results for OFL and PX (Fig. 4B) but unsuitable predictions for CBZ (data not shown). This fact was also ascribed to the significant spectral overlapping between CBZ and strong PX signals. Since both PARAFAC and MCR-ALS were not able to render satisfactory results for CBZ in validation samples, more complex samples were not processed with these algorithms.

In relatively recent years, the algorithm U-PLS/RBL has been successfully employed in systems whose data require certain flexibility to be processed [27] and, therefore, this algorithm was checked in the presently studied system. In a first phase, the ability of U-PLS to quantitate the three analytes was analyzed in the validation samples. In a second step, considerably more complex samples were studied with U-PLS/RBL, using RBL to model the residues of U-PLS regression as a sum of bilinear contributions from the unexpected components.

The optimum number of latent variables, estimated according to the cross-validation method (see Supplementary Material), was four for CBZ and OFL and three for PX. Apparently, due to the relatively high intensities of PX signals, U-PLS does not require an additional component to model the background signal.

The U-PLS predicted concentrations for each analyte in the validation set are in good agreement with the corresponding nominal values (Fig. 4C), even for the conflicting analyte CBZ. The fact that U-PLS renders good results for this analyte can be

justified on the basis of the use of latent variables, which are flexible enough to overcome the problem of the high degree of spectral similarity among certain analytes.

If the EJCR for the corresponding slopes and intercepts of the above plots are analyzed (Fig. 4), we conclude that all ellipses include the theoretically expected point (1,0). For OFL and PX they are significantly smaller than that corresponding to PARAFAC, suggesting better precision. The statistical results shown in Table 2, with a relative error of prediction (REP) values equal to or less than 10% for the three analytes, also support this conclusion.

As regards the limits of detection (LODs), it is important to remark that they were calculated according to the novel IUPAC-consistent estimator suggested by Allegrini and Olivieri for PLS calibration [29]. This approach combines mathematical and analytical criteria, leading to a new LOD estimator which adopts the form of a detection interval, as shown in Table 2.

3.2.2. Test samples

Many emergent pollutants are potentially able to produce interference, either by themselves or through fluorescent photoproducts generated by UV irradiation. This phenomenon was verified for IBU, DICLO, SAL and FLU, whose signals strongly overlap those for the three target pollutants (Fig. 2B). Therefore, with the purpose of simulating a genuine situation, test samples containing the three analytes and the above compounds, which could be concomitantly present in real samples, were prepared and analysed.

Fig. 3B shows the three-dimensional plots and the corresponding contour plots of the EEPFMs of a typical test sample with interferences.

When U-PLS was applied to the test samples, in addition to the latent variables estimated for modeling the calibration set, the introduction of the RBL procedure was needed, with two additional components corresponding to the unexpected sample constituents. Adding more unexpected components did not improve the fit. Apparently, U-PLS/RBL considers the profiles of the four interferences as two mathematical components, and is able to distinguish these combined signals from those of the analytes and the background signals.

Table 2. Statistical results for CBZ, OFL and PX in validation, test and real water samples using the proposed methodology and U-PLS/RBL.

	CBZ	OFL	PX
Validation samples			
LOD range (min-max)	4-7	3-6	2-4
RMSEP	2	3	2
REP	7	10	7
Test samples^a			
LOD range (min-max)	4-7	4-6	3-4
RMSEP	2	3	2
REP	7	9	7
Tap water (Venado Tuerto city)			
LOD range (min-max) ^b	0.16-0.22	0.07-0.09	0.05-0.06
LOD range (min-max) ^c	0.31- 0.44	0.14-0.18	0.10-0.13
RMSEP	0.03	0.07	0.03
REP	6	11	10
Underground water (Santa Rosa city)			
LOD range (min-max) ^b	0.13-0.18	0.05-0.07	0.04-0.05
LOD range (min-max) ^c	0.28-0.42	0.12-0.16	0.09-0.13
RMSEP	0.04	0.04	0.03
REP	9	10	6
Underground water (Funes city)			
LOD range (min-max) ^b	0.25-0.31	0.11-0.14	0.04-0.05
LOD range (min-max) ^c	0.43-0.57	0.17-0.21	0.13-0.17
RMSEP	0.03	0.04	0.05
REP	8	9	12
River water (Paraná River)			
LOD range (min-max) ^d	5-7	5-7	3-5
LOD range (min-max) ^c	0.1- 0.2	0.1- 0.2	0.05-0.08
RMSEP	1	2	2
REP	8	9	6

LOD, limit of detection calculated according to ref. 29; RMSEP, root-mean-square error of prediction; REP, relative error of prediction; Values for LOD and RMSEP are given in ng mL⁻¹. Values of REP are giving in %. The real samples results refer to the original water samples before SPE.

^a Fifteen samples containing IBU, DICLO, SAL and FLU as interferences. ^b Pre-concentration factor = 125. ^c Pre-concentration factor = 50. ^d Sample without pre-concentration.

Fig. 5A illustrates the excellent predictions corresponding to the application of UPLS/RBL to the test samples, and Fig. 5B displays the corresponding EJC tests which denote the suitable accuracy of applied methodology. The analytical performance of this algorithm applied to test samples is appreciated from the statistical results shown in Table 2. The latter ones are encouraging, taking into account that the simultaneous determination of three analytes is easily and rapidly performed in complex matrices. Regarding the experimental time involved in each determination, considering that the geometry of the photoreactor allows the simultaneous irradiation of four solutions, with an irradiation time equivalent to 5 minutes per sample, and that the EPIFM measurement is performed in about 5 minutes, a throughput of about 6 samples per hour is achieved.

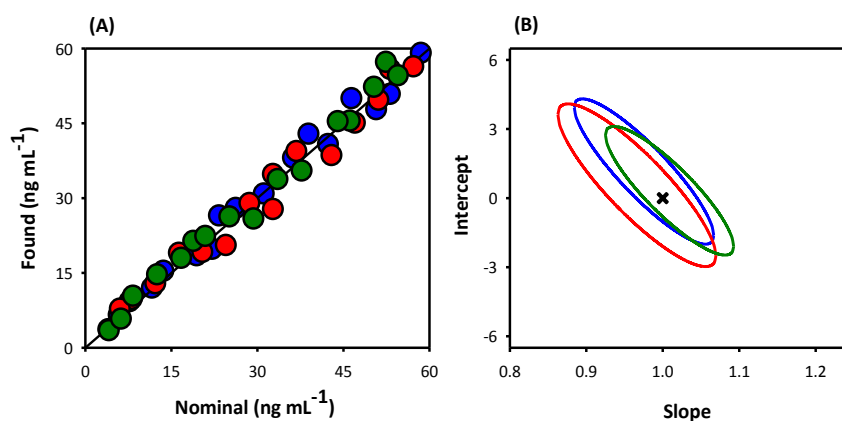


Figure 5. (A) Plot for CBZ (blue), OFL (red) and PX (green) predicted concentrations by UPLS/RBL in samples containing potential interferences, as a function of the nominal values (the solid line is the perfect fit). (B) Elliptical joint regions (at 95% confidence level) for the slope and intercept of the regression of the corresponding data. The black point marks the theoretical (intercept = 0, slope = 1) point.

3.2.3. Real water samples

With the purpose of testing the present method in real samples and demonstrating its ability to overcome the interference from background constituents, waters from different origins were analyzed. Taking into account that CBZ is an anticonvulsant drug widely used in chronic diseases, it is not surprising that it is

detected with a higher frequency than antibiotics and analgesics which are, in general, occasionally consumed. In fact, it is well known that CBZ is one of the most frequently detected drugs in water environments all over the world [30]. Due to the fact that CBZ is recalcitrant to various wastewater treatment processes, it is considered as a hydrologic tracer of wastewaters [8]. The incomplete CBZ removal when employing on-site wastewater treatments results in a high probability of groundwater, surface water and, finally, drinking water contamination [10]. In a very recent review, it was pointed out that CBZ is one of the six pharmaceuticals most often found in finished drinking waters, with levels as high as 0.6 ng mL^{-1} [11]. CBZ concentration values around 0.15 ng mL^{-1} were detected in a municipal wastewater influent located in Waco (Texas, USA) [10]. A multiresidue analysis of both human and veterinary pharmaceuticals in surface and treated waters from different sites in Catalonia (North East of Spain) revealed values ranged from 2×10^{-3} to 0.16 ng mL^{-1} for CBZ, and up to 0.31 and 0.25 ng mL^{-1} for OFL and PX, respectively [31]. As recently reported, CBZ concentrations up to 0.30 ng mL^{-1} have been detected in Serbian waters, and this level was similar to those found in other European regions [30]. Similarly, values ranging from 0.22 to 0.80 ng mL^{-1} were reported for OFL and other related antibiotics. CBZ and OFL were found at concentrations up to 1.2 and 0.58 ng mL^{-1} , respectively, in sewage treatment plant effluents of several European countries, although higher levels of the former (until 6.3 ng mL^{-1}) were detected in Germany and Switzerland [32]. OFL and other two fluoroquinolones have been found in hospital wastewaters (at concentrations ranging from approximately 0.06 - 120 ng mL^{-1}), in wastewater treatment plant effluents (2×10^{-3} - 0.58 ng mL^{-1}) and in surface waters (5×10^{-3} - 1.30 ng mL^{-1}) throughout the world, including the United States, Italy, Switzerland, Finland, Sweden, Germany, China, and Australia [4]. OFL was one of the three most reported fluoroquinolone antibiotics in Chinese surface waters, with concentrations up to 5.1 ng mL^{-1} [6].

As can be concluded, the studied analytes are generally detected in a range of concentrations in the order of part- and sub-part-per-billions. Therefore, the sensitivity of the present method was improved using a pre-concentration step, by applying C18 membrane-SPE. It is necessary to point out that the selection of C18 membranes is based on our excellent experience with this solid-support as extractor of low-polarity compounds, such as the studied analytes [15]. These membranes are easily and rapidly conditioned, decreasing the operator effort. Because the selectivity is provided by the

chemometric tool, the complete physical separation of target analytes from the matrix constituents is not required, as in traditional extraction techniques.

Because the polarity of the molecules plays a crucial role to achieve efficient extraction in the C18 membrane, the working pH was selected on the base of the pK_a values of the target compounds. The latter pK_a values (2.3 and 13.99 for CBZ [33], 6.05 and 8.11 for OFL [34], and 1.81 and 5.12 for PX [35]) suggest that the uncharged species for CBZ, OFL and PX prevail in the pH 3-13, 7, and 3, respectively. In principle, the selection of an optimal pH for the simultaneous retention of the three analytes is not possible. However, a test carried out extracting 250 mL of synthetic aqueous samples at pH 3.5, 5.0 and 7.0 containing 0.30 ng mL^{-1} of each analyte demonstrated recoveries nearly 100% for the three compounds in all cases. This result can be justified considering the small concentration of analytes in the samples, combined with the strong extraction power of the C18 membranes. Therefore, the pH of real samples, which was almost neutral in all cases, was not adjusted before the corresponding treatment.

A recovery study was carried out by spiking four different types of water samples with the three analytes, in duplicate, at two different concentration levels, following the treatment indicated in the experimental section. A typical EEPFM and the corresponding contour plot of a spiked underground water sample after the preconcentration step are shown in Fig. 3C. The strong interference produced by matrix constituents is evident. However, the physical removal of these interferences is not necessary when using an appropriate second-order calibration methodology, highlighting the value of the chemometric approach.

When U-PLS/RBL was applied to real samples, in addition to the number of latent variables estimated for the calibration set, the introduction of the RBL procedure with two unexpected components was required in most cases. Adding more unexpected components did not improve the fit, indicating that U-PLS/RBL adequately models the profiles of the interferences using two principal components.

The recovery values, summarized in Table 3, are statistically comparable to those provided by an LC-MS reference method when a paired Student *t*-test is applied at a 95% confidence level [36]. The experimental *t*-coefficients for the U-PLS/RBL approach for CBZ ($t = 0.74$), OFL ($t = 0.35$) and PX ($t = 1.02$) favorably compare with the tabulated

value for $n - 1$ degrees of freedom [$t_{\text{crit}(0.05,7)} = 2.36$], suggesting that foreign compounds which may be present in the studied samples do not produce a significant interference in our analysis. Finally, the good analytical performance for the selected algorithm can be appreciated from the statistical results shown in Table 2. These results indicate that the REP is not significantly affected by the fact that real samples are being studied. Besides, LODs reflect the benefits of the preconcentration, and the possibility of determining the studied analytes at sub-part-per-billion levels. It should be noted that an SPE employing a larger sample volume would allow to decrease the LOD even more.

In Table 4, a comparison with selected methods for the determination of the studied compounds in water samples is performed. The great advantage of the proposed approach is that it allows the determination of the analytes using very simple equipment and without involving significant amounts of organic solvents. As a consequence, the experimental time and the errors associated with multiple experimental steps are substantially diminished, working at the same time under the green chemistry principles.

Table 3. Recovery study of CBZ, OFL and PX for spiked water samples using U-PLS/RBL algorithm and LC-MS method.

Sample	CBZ			OFL			PX		
	Taken	U-PLS/RBL	LC-MS	Taken	U-PLS/RBL	LC-MS	Taken	U-PLS/RBL	LC-MS
Tap water ^b	0.23	0.24 (0.01) [104]	0.20 (0.01) [87]	0.29	0.29 (0.01) [100]	0.28 (0.01) [97]	0.17	0.16 (0.04) [94]	0.17 (0.01) [100]
	0.49	0.54 (0.02) [110]	0.60 (0.01) [122]	0.72	0.81 (0.04) [113]	0.79 (0.04) [110]	0.42	0.38 (0.01) [90]	0.56 (0.02) [133]
Underground water ^c	0.20	0.17 (0.01) [85]	0.23 (0.01) [115]	0.16	0.18 (0.02) [113]	0.19 (0.01) [119]	0.13	0.15 (0.03) [115]	0.12 (0.01) [92]
	0.34	0.39 (0.01) [115]	0.35 (0.01) [103]	0.36	0.39 (0.06) [108]	0.38 (0.02) [106]	0.34	0.36 (0.02) [106]	0.27 (0.01) [79]
Underground water ^d	0.08	0.08 (0.01) [100]	0.10 (0.01) [125]	0.21	0.21 (0.04) [100]	0.21 (0.01) [100]	0.46	0.42 (0.01) [91]	0.43 (0.02) [93]
	0.29	0.24 (0.08) [83]	0.28 (0.01) [97]	0.92	0.9 (0.1) [98]	1.00 (0.01) [109]	0.63	0.53 (0.03) [84]	0.59 (0.02) [94]
River water ^e	13.7	14 (2) [102]	13.6 (0.1) [99]	6.14	6.1 (0.3) [99]	6.0 (0.3) [98]	10.5	11.8 (2.3) [112]	10.1 (0.4) [96]
	0.68	0.75 (0.09) [110]	0.78 (0.01) [115]	1.02	1.0 (0.2) [98]	1.1 (0.1) [108]	0.84	1.0 (0.2) [119]	0.83 (0.03) [99]

^a Concentrations are given in ng mL⁻¹, standard deviations (mean of two determinations) are given between parentheses, and recoveries (between square brackets) are given in %.

^b Venado Tuerto city; ^c Santa Rosa city; ^d Funes city; ^e Paraná River.

Table 4. Analytical performance of selected methods recently reported for emerging contaminants in natural waters.

Pre-treatment	Method	Compounds	Other	Medium	LOD ^a	RSD, REP, REC ^b	Sample	Ref
SPE (Oasis HLB cartridges)	LC-MS/MS	CBZ, OFL, PX	Horm, pharm	Organic	1×10 ⁻³ - 2.5×10 ⁻³	REC = 76.9-93.4	WW	37
SPE (HLB cartridges)	LC-MS/MS	OFL	A	Organic	2.8×10 ⁻³ - 6.6×10 ⁻³	REC = 75-112	RW, WWI, WWE	38
SPE (Oasis HLB cartridges)	UHPLC-MS/MS	CBZ	Pharm	Organic	2.85×10 ⁻³	RSD = 2.2, REC = 99.3	RW	39
SPME (silica fiber- polymeric phase)	LC-DAD	CBZ, PX	NSAI	Organic	2.6-3	RSD = 4.6-8, REC = 71.6-119.0	RW	40
SPME (PDS/DVB/ polyacrylate)	LC-DAD-MCR-ALS	CBZ, PX	NSAI	Organic	LOQ = 10-20	REC = 72-119.3	RW, WW	41
SPE (Oasis HLB cartridges)	UHPLC-QTOF-MS	OFL	A	Organic	0.4		WWE, WWI, WW, RW	42
SPE (Oasis HLB cartridges)	UHPLC-MS/MS	OFLO	A	Organic	3.8×10 ⁻³	RDS = 3-25, REC = 33-142	RW	43
On-line SPE (Strata-X column)	LC-MS/MS	CBZ	OP	Organic	0.7-1×10 ⁻³		TW, RW	44
SPE (Strata-X column)	EC-LIF	OFLO	A	Organic	0.9×10 ⁻³	RDS = 2.6-9.8, REC = 100.6-106.6	UW, TW	45
TF-SPME	LC-MS/MS	CBZ	Pharm	Organic	2×10 ⁻³	RSD = 14, REC = 83.7	WW	46
SPE (Oasis HLB cartridges)	UHPLC-QqLIT-MS/MS	CBZ, OFL, PX	Pharm	Organic	0.1×10 ⁻³ - 4.6×10 ⁻³	RSD = 1.5-15.9, REC = 40-124	DW, RSW, RW, SW, WWE, WWI	31
MPs (PDS/MWCN)	CLC	OFLO	A	Organic	0.48	RSD = 5.9, REC = 112	MW	47

Table 4 (cont.). Analytical performance of selected methods recently reported for emerging contaminants in natural waters.

Pre-treatment	Method	Compounds	Other	Medium	LOD ^a	RSD, REP, REC ^b	Sample	Ref
SPME (modified silica gel)	LC-UV	CBZ	Pharm	Organic	2.36	REC = 65.6	EW	48
SPE (Oasis HLB cartridges)	GC-MS	CBZ	Pharm	Organic	8×10 ⁻³	REC = 92.0, RSD = 6.3	RW	49
SPE (C18 membranes)	EEPIF-MCR-ALS	CBZ		Aqueous	0.1-2	REC = 78-117, REP = 2-7	TW, RW, UW	15
SPE (Oasis HLB cartridges)	UHPLC-QqLIT-MS/MS	CBZ, OFL, PX	Pharm	Organic	0.2×10 ⁻³ - 2.4×10 ⁻³	RSD = 2.5-15.9, REC = 56-124	DW, RW, WE	30
SPE (Oasis HLB cartridges)	LC-TOF-MS	CBZ, OFL	EP	Organic	LOQ = 2.5×10 ⁻³ - 3.1×10 ⁻³	RSD = 1-15, REC = 30-128	RW, WW	13
SPE (C18 membranes)	EEPIF-U-PLS/RBL	CBZ, OFL, PX		Aqueous	0.04-0.3	REP = 6-12, REC = 83-119	TW, RW, UW	This work

^a For comparison, concentration units were unified to ng mL⁻¹; ^b Relative standard deviation (RSD), Relative error of prediction (REP), and recovery (REC), all in %. A, antibiotics; CLC, capillary liquid chromatography; DAD, diode array detection; DVB, divinylbenzene; DW, drinking water; EC, electrophoresis capillary; EP, emerging pollutants; EW, environmental water; GC, gas chromatography; HLB, hydrophilic-lipophilic balance; Horm, hormones; LC, liquid chromatography; LIF, laser induced fluorescence detection; MPs, surface-functionalized magnetic particles; MS, mass spectrometry; MS/MS, tandem mass spectrometry; MWCN, multi-walled carbon nanotubes; MW, mineral water; NSA, non-steroidal anti-inflammatory; OP, organic pollutants; Pharm, pharmaceuticals; PDS, polydimethylsiloxane; QqLIT, quadrupole linear ion trap tandem mass spectrometry; QTOF, hybrid quadrupole time-of-flight; RSW, reservoir water; RW, river water; SPE, solid-phase extraction; SPME, solid-phase microextraction; SW, sea water; TF, thin film; TOF, electrospray time-of-flight; TW, tap water; UHPLC, ultra-high-performance liquid chromatography; UV, ultraviolet detection; UW, underground water; WW, Wastewater; WWE, wastewater effluent; WWI, wastewater influent.

4. Conclusions

A sustainable photoinduced fluorescence method, suitable for the simultaneous determination of CBZ, OFL and PX at trace levels without the need of chromatographic separation, has been developed. The method is assisted by second-order chemometric analysis and representing a new example of the power of coupling the partial least-squares algorithm with residual bilinearization for the resolution of very complex systems. The beauty of this procedure is that it achieves an outstanding selectivity avoiding the use of toxic organic solvents, a fact which is essential for the environmental safety. In addition, the method is fast, allowing a sample throughput of about 6 samples per hour. On the basis of the obtained results, one can assert that the proposed method favorably compares with more sophisticated approaches.

References

- [1] C. Mahugo-Santana, Z. Sosa-Ferrera, M.E. Torres-Padrón, J.J. Santana-Rodríguez, "Application of new approaches to liquid-phase microextraction for the determination of emerging pollutants", *Trac-Trend Anal. Chem.* 30 (2011) 731-748.
- [2] S.D. Richardson, T.A. Ternes, "Water analysis: Emerging contaminants and current issues", *Anal. Chem.* 86 (2014) 2813-2848.
- [3] M. Stuart, D. Lapworth, E. Crane, A. Hart, "Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater", *Sci. Total Environ.* 416 (2012) 1-21.
- [4] K.H. Wammer, A.R. Korte, R.A. Lundeen, J.E. Sundberg, K. McNeill, W.A. Arnold, "Direct photochemistry of three fluoroquinolone antibacterials: Norfloxacin, ofloxacin, and enrofloxacin", *Water Res.* 47 (2013) 439-448.
- [5] R. Meffe, I. de Bustamante, "Emerging organic contaminants in surface water and groundwater: A first overview of the situation in Italy", *Sci. Total Environ.* 481 (2014) 280-295.
- [6] Q. Bu, B. Wang, J. Huang, S. Deng, G. Yu, "Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment in China: A review", *J. Hazard. Mater.* 262 (2013) 189-211.
- [7] E. Vulliet, C. Cren-Olivé, "Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption", *Environ. Pollut.* 159 (2011) 2929-2934.

- [8] M. Clara, B. Strenn, N. Kreuzinger, "Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: Investigations on the behaviour of carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration", *Water Res.* 38 (2004) 947-954.
- [9] E. Estévez, M.C. Cabrera, A. Molina-Díaz, J. Robles-Molina, M.P. Palacios-Díaz, "Screening of emerging contaminants and priority substances (2008/105/EC) in reclaimed water for irrigation and groundwater in a volcanic aquifer (Gran Canaria, Canary Islands, Spain)", *Sci. Total Environ.* 433 (2012) 538-546.
- [10] B. Du, A.E. Price, W.C. Scott, L.A. Kristofco, A.J. Ramirez, C.K. Chambliss, J.C. Yelderman, B.W. Brooks, "Comparison of contaminants of emerging concern removal, discharge, and water quality hazards among centralized and on-site wastewater treatment system effluents receiving common wastewater influent", *Sci. Total Environ.* 466-467 (2014) 976-984.
- [11] C. Postigo, S.D. Richardson, "Transformation of pharmaceuticals during oxidation/disinfection processes in drinking water treatment", *J. Hazard. Mater.* 279 (2014) 461-475.
- [12] D. Fatta, A. Achilleos, A. Nikolaou, S. Meriç, "Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater", *Trac-Trend Anal. Chem.* 26 (2007) 515-533.
- [13] J. Robles-Molina, F.J. Lara-Ortega, B. Gilbert-López, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, "Multi-residue method for the determination of over 400 priority and emerging pollutants in water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry", *J. Chromatogr. A* 1350 (2014) 30-43.
- [14] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, "The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices", *Trac-Trend Anal. Chem.* 50 (2013) 78-84.
- [15] V.A. Lozano, G.M. Escandar, "Second-order advantage with excitation-emission photoinduced fluorimetry for the determination of the antiepileptic carbamazepine in environmental waters", *Anal. Chim. Acta* 782 (2013) 37-45.
- [16] A.C. Olivieri, "Analytical advantages of multivariate data processing. One, two, three, infinity?", *Anal. Chem.* 80 (2008) 5713-5720.
- [17] R. Tauler, "Multivariate curve resolution applied to second order data", *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 30 (1995) 133-146.

- [18] R. Bro, "PARAFAC. Tutorial and applications", *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 38 (1997) 149-171.
- [19] J. Öhman, P. Geladi, S. Wold, "Residual bilinearization. Part 2: Application to HPLC-diode array data and comparison with rank annihilation factor analysis", *J. Chemom.* 4 (1990) 135-146.
- [20] 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.
- [21] MATLAB 7.10, 2010, The MathWorks Inc., Natick, MA, USA.
- [22] 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.
- [23] <http://www.iquir-conicet.gov.ar/descargas/mvc2.rar>, last accessed September 2014.
- [24] G.M. Escandar, "Spectrofluorimetric determination of piroxicam in the presence and absence of β -cyclodextrin", *Analyst* 124 (1999) 587-591.
- [25] H.M. Abdel-Wadood, "Spectrofluorimetric method for determination of some oxicams using potassium bromate", *Bull. Pharm. Sci.* 31 (2008) 169-181.
- [26] A.C. Olivieri, G.M. Escandar, A. Muñoz de la Peña, "Second-order and higher-order multivariate calibration methods applied to non-multilinear data using different algorithms", *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 607-617.
- [27] A.C. Olivieri, G.M. Escandar, "Practical three-way calibration", Elsevier, Waltham, USA, 2014.
- [28] A.V. González, M.A. Herrador, A.G. Asuero, "Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays", *Talanta* 48 (1999) 729-736.
- [29] F. Allegrini, A.C. Olivieri, "IUPAC-consistent approach to the limit of detection in partial least-squares calibration", *Anal. Chem.* 86 (2014) 7858-7866.
- [30] M. Petrović, B. Škrbić, J. Živančev, L. Ferrando Climent, D. Barceló, "Determination of 81 pharmaceutical drugs by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with hybrid triple quadrupole-linear ion trap in different types of water in Serbia", *Sci. Total Environ.* 468-469 (2014) 415-428.
- [31] M. Gros, S. Rodríguez-Mozaz, D. Barceló, "Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of

- their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry”, *J. Chromatogr. A* 1248 (2012) 104-121.
- [32] R. Andreozzi, M. Raffaele, P. Nicklas, “Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment”, *Chemosphere* 50 (2003) 1319-1330.
- [33] P. Punyapalakul, T. Sitthisorn, “Removal of ciprofloxacin and carbamazepine by adsorption on functionalized mesoporous silicates”, *World Acad. Sci. Eng. Technol.* 69 (2010) 546-550.
- [34] E. Hapeshi, A. Achilleos, M.I. Vasquez, C. Michael, N.P. Xekoukoulotakis, D. Mantzavinos, D. Kassinos, “Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry”, *Water Res.* 44 (2010) 1737-1746.
- [35] G.M. Escandar, A.J. Bystol, A.D. Campiglia, “Spectrofluorimetric method for the determination of piroxicam and pyridoxine”, *Anal. Chim. Acta* 466 (2002) 275-283.
- [36] W.P. Gardiner, “Statistical Analysis Methods for Chemists: A Software-Based Approach”, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1997, pp. 64.
- [37] A.Y.C. Lin, T.H. Yu, C.F. Lin, “Pharmaceutical contamination in residential, industrial, and agricultural waste streams: Risk to aqueous environments in Taiwan”, *Chemosphere* 74 (2008) 131-141.
- [38] Y. Xiao, H. Chang, A. Jia, J. Hu, “Trace analysis of quinolone and fluoroquinolone antibiotics from wastewaters by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry”, *J. Chromatogr. A* 1214 (2008) 100-108.
- [39] J.M. Conley, S.J. Symes, S.A. Kindelberger, S.M. Richards, “Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of a broad mixture of pharmaceuticals in surface water”, *J. Chromatogr. A* 1185 (2008) 206-215.
- [40] L. Vera-Candioti, M.D. Gil García, M. Martínez Galera, H.C. Goicoechea, “Chemometric assisted solid-phase microextraction for the determination of anti-inflammatory and antiepileptic drugs in river water by liquid chromatography-diode array detection,” *J. Chromatogr. A* 1211 (2008) 22-32.
- [41] M.D. Gil García, F. Cañada Cañada, M.J. Culzoni, L. Vera-Candioti, G.G. Siano, H.C. Goicoechea, M. Martínez Galera, “Chemometric tools improving the

- determination of anti-inflammatory and antiepileptic drugs in river and wastewater by solid-phase microextraction and liquid chromatography diode array detection”, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5489-5496.
- [42] M. Ibáñez, C. Guerrero, J.V. Sancho, F. Hernández, “Screening of antibiotics in surface and wastewater samples by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry”, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2529-2539.
- [43] F. Tamtam, F. Mercier, J. Eurin, M. Chevreuil, B. Le Bot, “Ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry performance evaluation for analysis of antibiotics in natural waters”, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 1709-1718.
- [44] A. Garcia-Ac, P.A. Segura, L. Viglino, A. Fürtös, C. Gagnon, M. Prévost, S. Sauvé, “Online solid-phase extraction of large-volume injections coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the quantitation and confirmation of 14 selected trace organic contaminants in drinking and surface water”, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8518-8527.
- [45] M. Lombardo-Agüí, L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, C. Cruces-Blanco, “Sensitive determination of fluoroquinolone residues in waters by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection”, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 1551-1557.
- [46] O.P. Togunde, E. Cudjoe, K.D. Oakes, F.S. Mirnaghi, M.R. Servos, J. Pawliszyn, “Determination of selected pharmaceutical residues in wastewater using an automated open bed solid phase microextraction system”, *J. Chromatogr. A* 1262 (2012) 34-42.
- [47] S. Xu, C. Jiang, Y. Lin, L. Jia, “Magnetic nanoparticles modified with polydimethylsiloxane and multi-walled carbon nanotubes for solid-phase extraction of fluoroquinolones”, *Microchim. Acta* 179 (2012) 257-264.
- [48] T.H. Lim, L. Hu, C. Yang, C. He, H.K. Lee, “Membrane assisted micro-solid phase extraction of pharmaceuticals with amino and urea-grafted silica gel”, *J. Chromatogr. A* 1316 (2013) 8-14.
- [49] N. Stamatis, V. Triantafyllidis, D. Hela, I. Konstantinou, “Occurrence and distribution of selected pharmaceutical compounds on sewage-impacted section of River Acheloos, Western Greece”, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 93 (2013) 1602-1619.

Supplementary Material

Calibration with second-order multivariate models

The PARAFAC model

In the PARAFAC model, the second-order data for the I_{cal} training matrices, each of them as a $J \times K$ matrix $\mathbf{X}_{i,\text{cal}}$ (J and K are the number of data points in each dimension), are joined with the unknown sample matrix \mathbf{X}_u into a three-way data array \mathbf{X} , whose dimensions are $[(I_{\text{cal}} + 1) \times J \times K]$. If the array \mathbf{X} is trilinear, each responsive component can be explained in terms of three vectors \mathbf{a}_n , \mathbf{b}_n and \mathbf{c}_n , which collect the relative concentrations $[(I_{\text{cal}} + 1) \times 1]$ for component n , and the profiles in both modes ($J \times 1$) and ($K \times 1$) respectively. The PARAFAC model [1] can be defined as:

$$X_{ijk} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} + E_{ijk} \quad (1)$$

in which N is the total number of responsive components, a_{in} is the relative concentration of component n in the i th sample, and b_{jn} and c_{kn} are the intensities at the j and k variables, respectively. The values of E_{ijk} are the elements of the matrix array \mathbf{E} , which contains the variation not captured by the model. The column vectors \mathbf{a}_n , \mathbf{b}_n and \mathbf{c}_n are collected into the corresponding score matrix \mathbf{A} and loading matrices \mathbf{B} and \mathbf{C} .

The decomposition of \mathbf{X} by Eq. (1), usually accomplished through an alternating least-squares minimization scheme [2, 3], retrieves the profiles in both data dimensions (\mathbf{B} and \mathbf{C}) and relative concentrations (\mathbf{A}) of individual components in the $(I_{\text{cal}} + 1)$ mixtures, whether they are chemically known or not, constituting the basis of the second-order advantage.

Some relevant issues concerning the application of PARAFAC model to the calibration of three-way data have to be considered:

- *Initialization of the algorithm*: Different strategies to manage this step include the use of vectors given by GRAM (generalized rank annihilation method) [4], known spectral profiles of pure components, or loadings giving the best fit after a small

number of PARAFAC runs with a few iterations. These alternatives can be found in Bro's PARAFAC package [5].

- *Determination of the number of responsive components*: Several methods can be applied to estimate the number of responsive components (N). CORCONDIA, a useful diagnostic tool which considers the PARAFAC internal parameter known as core consistency [6], involves the study of the structural model based on the data and the estimated parameters of gradually augmented models. If the addition of more components does not considerably improve the fit, the model could be considered as suitable, and the core consistency parameter significantly drops from a value of ca. 50. The evaluation of the PARAFAC residual error, i.e. the standard deviation of the elements of the array \mathbf{E} in Eq. (1), which decreases with increasing N until it stabilizes at a value compatible with the instrumental noise, can be considered as another useful technique. N can be established as the smallest number of components for which the residual error is not statistically different than the instrumental noise.

- *Restriction of the least-squares fit*: With the aim of obtaining physically interpretable profiles, the alternating least-squares PARAFAC fitting can be constrained by several available restrictions. For instance, non-negativity restrictions in all three modes allow the fit to converge to the minimum with physical meaning from the several minima which may exist for linearly dependent systems.

- *Identification of specific components*: The estimated profiles retrieved by the model have to be compared with those for standard solutions of the analytes of interest in order to identify the chemical components under investigation, since the order in which they are sorted can be different between samples, i.e. it depends on their contribution to the overall spectral variance.

- *Calibration of the model to obtain absolute concentrations in unknown samples*: Due to the fact that the three-way array decomposition provides relative values (\mathbf{A}), absolute analyte concentrations can only be obtained after calibration. Calibration is carried out by regression of the set of standards with known analyte concentrations (contained in an $I_{\text{cal}} \times 1$ vector \mathbf{y}), and regression of the first I_{cal} elements of column \mathbf{a}_n against \mathbf{y} (provided they correspond to the I_{cal} samples):

$$k = \mathbf{y}^+ \times [a_{1,n} \mid \dots \mid a_{I_{\text{cal}},n}] \quad (2)$$

in which '+' implies taking the pseudo-inverse. Then, for each test sample, the unknown relative concentration of n has to be converted to absolute by division of the last element of column \mathbf{a}_n [$a_{(I_{cal}+1)n}$] by the slope of the calibration graph k :

$$y_u = a_{(I_{cal}+1)n} / k \quad (3)$$

The MCR-ALS model

In this multivariate method, an augmented data matrix is created from the test data matrices and the calibration data matrices. The matrices are of size $J \times K$, where J is the number of excitation wavelengths (number of rows of each data matrix) and K the number of emission wavelengths (number of columns of each data matrix). Augmentation can be performed either column-wise or row-wise, depending on the type of experiment being analyzed and also on the presence of severe overlapping in one of the data modes [7,8]. In the presently studied case, the augmentation was implemented in both directions because of spectral overlapping between the analytes (CBZ, OFL and PX) and interferences are observed in the excitation and emission spectra. However, the results for column-wise augmentation were slightly better, possibly due to the better selectivity achieved through the excitation spectra. In the column augmentation mode, the bilinear decomposition of the augmented matrix is performed according to the expression:

$$\mathbf{D} = \mathbf{C} \mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad (4)$$

where the rows of \mathbf{D} contain the excitation spectra measured (K wavelengths) for different samples at several emission wavelengths (J wavelengths), the columns of \mathbf{C} contain the emission profiles of the intervening species, the columns of \mathbf{S} their related spectra, and \mathbf{E} is a matrix of residuals not fitted by the model. The sizes of these matrices are \mathbf{D} , $J(I_{cal} + 1) \times K$, \mathbf{C} , $J(I_{cal} + 1) \times N$, \mathbf{S} , $K \times N$, \mathbf{E} , $J(I_{cal} + 1) \times K$ (N is the number of responsive components). As can be seen, \mathbf{D} contains data for the I_{cal} calibration samples and for a given test sample. Decomposition of \mathbf{D} is achieved by iterative least-squares minimization of the Frobenius norm of \mathbf{E} , under suitable constraining conditions, i.e., non-negativity in the spectral profiles.

In the case of samples containing uncalibrated interferences, a useful additional restriction is the so-called correspondence among species and samples. The latter one provides information as to the presence or absence of each analyte in each sample (for example, uncalibrated interferences are present in the unknown samples, but absent in the calibration samples). However, in this work this constraint was not applied.

MCR-ALS requires initialization with parameters as close as possible to the final results. For example, the species spectra can be supplied, as obtained from either pure analyte standards or from the analysis of the so-called 'purest' spectra [9-11], a multivariate algorithm which extracts pure component spectra from a series of spectra of mixtures of varying composition [9]. In the present work, the latter option was applied. The number of components was estimated from the plot of singular values as a function of a trial number of components, locating a number for which the plot stabilizes. The latter number was initially employed for MCR-ALS analysis, and was afterwards refined (increased or decreased) until an appropriate solution was found, with an acceptable least-squares fit and physically recognizable profiles.

After MCR-ALS decomposition of \mathbf{D} , concentration information contained in \mathbf{C} can be used for quantitative predictions, by first defining the analyte concentration score as the area under the profile for the i th. sample:

$$a(i,n) = \sum_{j=1+(i-1)J}^{iJ} C(j,n) \quad (5)$$

where $a(i,n)$ is the score for the analyte n in the sample i , and $C(j,n)$ is the element of the analyte profile in the augmented mode. The scores are employed to build a pseudo-univariate calibration graph against the analyte concentrations, predicting the concentration in the test samples by interpolation of the test sample score, as discussed above for PARAFAC.

The U-PLS/RBL model

In U-PLS, the second-order data are unfolded into vectors before PLS is applied [12]. The information of concentration is employed in the calibration step in order to obtain a set of loadings \mathbf{P} and weight loadings \mathbf{W} (both of size $JK \times A$, where J is the number of data points in the first data dimension, K is the number of data points in the second data dimension and A is the number of latent factors), as well as regression coefficients \mathbf{v} (size $A \times 1$). They are estimated from I_{cal} calibration data matrices $\mathbf{X}_{c,i}$, which are first vectorized into $JK \times 1$ vectors, and calibration concentrations \mathbf{y} (size $I_{cal} \times 1$).

The optimum number of latent variables (A) to model the calibration set is usually selected by leave-one-out cross-validation [13]. This implies calculating the ratios $F(A) = \text{PRESS}(A < A^*) / \text{PRESS}(A)$, where $\text{PRESS} = \sum (c_{i,act} - c_{i,pred})^2$, A is a trial number of factors, A^* corresponds to the minimum PRESS, and $c_{i,act}$ and $c_{i,pred}$ are the actual and predicted concentrations for the i th sample left out from the calibration during cross-validation, respectively. The number of factors leading to a probability of less than 75% that $F > 1$ is selected.

In the absence of interferences in the test sample, \mathbf{v} could be employed to estimate the analyte concentration:

$$y_u = \mathbf{t}_u^T \mathbf{v} \tag{6}$$

in which \mathbf{t}_u is the test sample score, obtained by projection of the unfolded data for the test sample $\text{vec}(\mathbf{X}_u)$ onto the space of the A latent factors:

$$\mathbf{t}_u = (\mathbf{W}^T \mathbf{P})^{-1} \mathbf{W}^T \text{vec}(\mathbf{X}_u) \tag{7}$$

where $\text{vec}(\cdot)$ is the unfolding operator.

When unexpected interferences occur in X_u , then the sample scores given by Eq. (7) are not suitable for analyte prediction using Eq. (6). In this case, the residuals of the U-PLS prediction step [s_p , see Eq. (8)] will be abnormally large in comparison with the typical instrumental noise:

$$\begin{aligned} s_p &= \|\mathbf{e}_p\| / (JK-A)^{1/2} = \|\text{vec}(\mathbf{X}_u) - \mathbf{P} (\mathbf{W}^T \mathbf{P})^{-1} \mathbf{W}^T \text{vec}(\mathbf{X}_u)\| / (JK-A)^{1/2} = \\ &= \|\text{vec}(\mathbf{X}_u) - \mathbf{P} \mathbf{t}_u\| / (JK-A)^{1/2} \end{aligned} \tag{8}$$

in which $|| \cdot ||$ indicates the Euclidean norm.

Therefore, a separate procedure called residual bilinearization can be implemented. This procedure is based on principal component analysis (PCA) to model the unexpected effects [14,15] and is usually carried out by singular value decomposition (SVD). RBL aims at minimizing the norm of the residual vector \mathbf{e}_u , computed while fitting the sample data to the sum of the relevant contributions:

$$\text{vec}(\mathbf{X}_u) = \mathbf{P} \mathbf{t}_u + \text{vec}[\mathbf{B}_{\text{unx}} \mathbf{G}_{\text{unx}} (\mathbf{C}_{\text{unx}})^T] + \mathbf{e}_u \quad (9)$$

in which \mathbf{B}_{unx} and \mathbf{C}_{unx} are matrices containing the first left and right eigenvectors of \mathbf{E}_p , and \mathbf{G}_{unx} is a diagonal matrix containing its singular values, as obtained from SVD analysis:

$$\mathbf{B}_{\text{unx}} \mathbf{G}_{\text{unx}} (\mathbf{C}_{\text{unx}})^T = \text{SVD}(\mathbf{E}_p) \quad (10)$$

in which \mathbf{E}_p is the $J \times K$ matrix obtained after reshaping the $JK \times 1$ \mathbf{e}_p vector of Eq. (8) and SVD indicates taking the first principal components.

During this procedure, \mathbf{P} is kept constant at the calibration values, and \mathbf{t}_u is varied until $|| \mathbf{e}_u ||$ is minimized in Eq. (9) using a Gauss-Newton procedure. Then, the analyte concentrations are provided by Eq. (6), by introducing the final \mathbf{t}_u vector found by the RBL procedure.

It should be noticed that for a number of interferences larger than one, the profiles provided by the SVD analysis of \mathbf{E}_p no longer resemble the true interferent profiles, due to the fact that the principal components are restricted to be orthonormal.

The aim which guides the RBL procedure is the minimization of the residual error s_u to a level compatible with the noise present in the measured signals [16], with s_u given by:

$$s_u = || \mathbf{e}_u || / [(J - N_{\text{RBL}})(K - N_{\text{RBL}} - A)]^{1/2} \quad (11)$$

in which N_{RBL} is the number of RBL components and A the number of calibration PLS factors.

References

- [1] S. Leurgans, R.T. Ross, "Multilinear models: applications in spectroscopy", *Statist. Sci.* 7 (1992) 289-319.
- [2] R. Bro, "PARAFAC. Tutorial and applications", *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 38 (1997) 149-171.
- [3] P. Paatero, "A weighted non-negative least squares algorithm for three-way 'PARAFAC' factor analysis", *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 38 (1997) 223-242.
- [4] E. Sanchez, B.R. Kowalski, "Generalized rank annihilation factor analysis", *Anal. Chem.* 58 (1986) 496-499.
- [5] <http://www.models.kvl.dk/source/>
- [6] R. Bro, H.A.L. Kiers, "A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models", *J. Chemom.* 17 (2003) 274-286.
- [7] M.J. Culzoni, H.C. Goicoechea, G.A. Ibañez, V.A. Lozano, N.R. Marsili, A.C. Olivieri, A.P. Pagani, "Second-order advantage from kinetic-spectroscopic data matrices in the presence of extreme spectral overlapping. A multivariate curve resolution-Alternating least-squares approach", *Anal. Chim. Acta* 614 (2008) 46-57.
- [8] A. De Juan, E. Casassas, R. Tauler, in R.A. Meyers (Ed.), "Encyclopedia of Analytical Chemistry", John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, (2000), p. 9800.
- [9] W. Windig, J. Guilment, "Interactive self-modeling mixture analysis", *Anal. Chem.* 63 (1991) 1425-1432.
- [10] W. Windig, D.A. Stephenson, "Self-modeling mixture analysis of second-derivative near-infrared spectral data using the SIMPLISMA approach", *Anal. Chem.* 64 (1992) 2735-2742.
- [11] W. Windig, C.E. Heckler, "Self-modeling mixture analysis of categorized pyrolysis mass spectral data with the SIMPLISMA approach", *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 14 (1992) 195-206.
- [12] S. Wold, P. Geladi, K. Esbensen, J. Öhman, "Multi-way principal components- and PLS-analysis", *J. Chemometr.* 1 (1987) 41-56.
- [13] 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.

- [14] J. Öhman, P. Geladi, S. Wold, "Residual bilinearization. Part 1: Theory and algorithms", *J. Chemometr.* 4 (1990) 79-90.
- [15] 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. Chemometr.* 19 (2005) 253-265.
- [16] S.A. Bortolato, J.A. Arancibia, G.M. Escandar, "Chemometrics-assisted excitation-emission fluorescence spectroscopy on nylon membranes. Simultaneous determination of benzo[a]pyrene and dibenz[a,h]anthracene at parts-per-trillion levels in the presence of the remaining EPA PAH priority pollutants as interferences", *Anal. Chem.* 80 (2008) 8276-8286.

III.3.3. Discusión del artículo científico 7

Irradiación de las disoluciones

En primer lugar se optimizaron las condiciones idóneas para la formación de los fotoproductos fluorescentes a partir de los analitos de interés. Tradicionalmente se han empleado como sistemas PIF fuentes de irradiación externa con objeto de modificar las propiedades luminiscentes de compuestos que presentan un bajo rendimiento cuántico, aunque también existen en la bibliografía numerosos trabajos en los que se lleva a cabo la irradiación de forma *on-line*. Un dispositivo de irradiación externo utiliza con frecuencia una lámpara UV de elevada intensidad situada en una cámara protegida de la luz externa. La muestra a tratar se coloca en una cubeta de cuarzo con las cuatro caras transparentes, situada en una posición fija con respecto a la lámpara, y es irradiada durante un tiempo previamente optimizado. En nuestro caso, el dispositivo empleado fue un reactor fabricado en el laboratorio, el cual se optimizó para la irradiación de la CBZ en un trabajo anterior, y cuyo esquema se muestra en la Figura III.3.

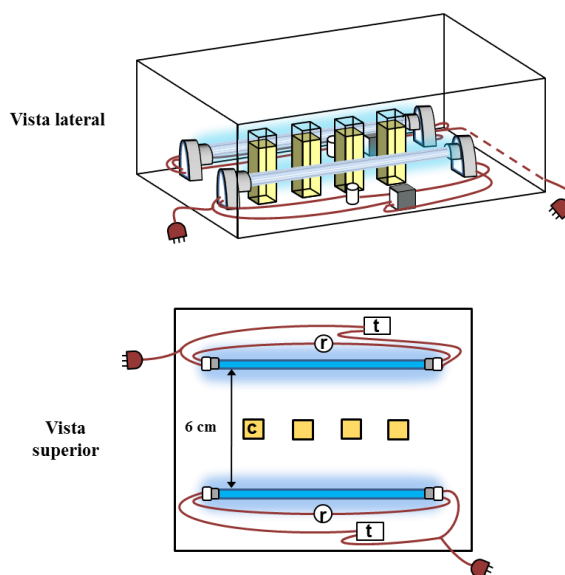


Figura III.3. Esquema del fotoreactor empleado, donde *t* es el transformador, *r* es la resistencia y *C* la cubeta que contiene la muestra (referencia 15 del artículo).

Dicho reactor está constituido por dos lámparas de radiación UV de 4 W cada una, colocadas a una distancia de 6 cm, y entre las que se colocan las cubetas que contienen las disoluciones a analizar, las cuales se irradian durante un tiempo total de 20 min. En el mismo trabajo se optimizaron las condiciones físico-químicas óptimas para la obtención de fotoproductos fluorescentes por parte de la CBZ, las cuales consistieron en fijar el pH del medio en ácido, concretamente con HCl 2 M.

Puesto que, como de los tres analitos objeto de análisis la CBZ da lugar a la formación de fotoproductos menos fluorescentes, para el análisis conjunto de los tres compuestos se mantuvieron las condiciones optimadas para este analito, con el objetivo de no perder sensibilidad en su determinación.

Tratamiento de las señales analíticas

Las matrices de excitación-emisión registradas a las disoluciones irradiadas se utilizaron como señales analíticas de segundo orden y se procesaron con varios algoritmos (PARAFAC, MCR-ALS y U-PLS). En el caso de los analitos que forman los fotoproductos más fluorescentes (OFL y PX), los dos proporcionaron buenas correlaciones entre la señal analítica y la concentración en la etapa del calibrado. Sin embargo, en el caso de la CBZ, solamente el algoritmo U-PLS proporcionó buenos resultados. La dificultad en el análisis de este compuesto radica en el gran solapamiento existente entre su espectro de emisión y el del PX, junto con la gran diferencia entre las señales fluorescentes medidas, ya que el o los fotoproductos formados a partir de éste presentan un rendimiento cuántico de fluorescencia mucho mayor que en el caso de la CBZ.

La razón por la cual solo el algoritmo U-PLS es capaz de “superar” esta dificultad y modelar correctamente las señales de todos los analitos, incluida la CBZ, puede ser debido a su forma de operar ya que, a diferencia de PARAFAC y MCR-ALS, U-PLS convierte las variables originales (matrices de datos y concentración) en variables latentes, para alcanzar una mayor correlación entre ambas.

El número de factores óptimo, estimado según el método de validación cruzada, fue de cuatro para la CBZ y la OFL, y tres para el PX. Al parecer, debido a las relativamente altas intensidades de señales PX, U-PLS no requiere un

componente adicional para modelar la señal de fondo, al contrario de lo que sucede con los otros dos compuestos.

Una vez seleccionado el algoritmo de trabajo y optimizados los factores para el análisis de cada compuesto, la metodología establecida se validó mediante el análisis de muestras *test*, que contenían cantidades aleatorias y conocidas de cada uno de los contaminantes, tanto en ausencia como en presencia de potenciales interferentes que pueden estar presentes en las muestras de agua reales. En este segundo caso, puesto que U-PLS no presenta la ventaja de segundo orden, es necesario acoplarla a la rutina RBL para que modele las señales de los compuestos que no han sido incluidos en la etapa de calibración.

Análisis de aguas superficiales

Puesto que, como se ha explicado en esta Memoria, actualmente la técnica LC-MS es la más relevante en la determinación de contaminantes en muestras ambientales, nos pareció oportuno realizar una comparación entre los resultados obtenidos en el análisis de muestras de agua reales contaminadas con los analitos de interés empleando el método desarrollado, y aquellos obtenidos mediante el análisis de CBZ, PX y OFLO con esta técnica, concretamente utilizando un analizador QTOF. En ambos casos fue necesario realizar una preconcentración previa de los analitos antes de su irradiación y análisis, para lo que se empleó la técnica SPE con membranas C18.

Los resultados obtenidos mostraron que, si bien es verdad que ambos métodos no pueden competir en cuanto a sensibilidad, las recuperaciones obtenidas en ambos casos fueron muy aceptables, al igual que los valores de desviación estándar, los cuales nos indicaron la similitud en cuanto a la repetitividad de ambas metodologías. Esto pone de manifiesto que el método propuesto se presenta como una gran alternativa, sencilla y rápida, para el análisis de estos contaminantes en muestras ambientales.

CONCLUSIONES

El trabajo experimental llevado a cabo en esta Tesis Doctoral, nos ha permitido obtener las siguientes conclusiones:

1. Se ha comprobado que PLS es un excelente algoritmo de calibración de primer orden para la resolución de la mezcla sencilla compuesta por los fármacos CPT-11 y SN-38, basada en las diferencias entre sus espectros de emisión. El método optimizado ha sido aplicado a muestras biológicas utilizando un sistema adecuado de extracción y limpieza de la muestra. El cloroformo ha demostrado ser un disolvente extractante apropiado para ambos compuestos, lográndose porcentajes de recuperación próximos al 100% en ambos casos.
2. Se ha abordado la resolución de una mezcla compleja constituida por un analito muy poco fluorescente, la talidomida, y otro altamente fluorescente, el CPT-11, en muestras de orina, la cual presenta una señal de fondo que solapa con la del primer compuesto. Con este fin, se han empleado varios algoritmos quimiométricos de segundo orden (PARAFAC, N-PLS/RBL y U-PLS/RBL) encontrándose que tanto N-PLS/RBL como U-PLS/RBL proporcionaron buenos resultados para la determinación de CPT-11. En cambio, las recuperaciones obtenidas en el análisis de la talidomida fueron considerablemente peores. Únicamente PARAFAC consiguió la completa resolución de la mezcla, proporcionando buenas recuperaciones para ambos compuestos en todas las muestras analizadas.
3. La utilización de dos detectores en serie, DAD y fluorescente, acoplados a electroforesis capilar, ha permitido el análisis simultáneo de algunos de los fármacos quimioterápicos más empleados en el tratamiento de cáncer de colon, junto con algunos de sus metabolitos activos. Estos compuestos han podido determinarse en los niveles en los que son excretados por vía urinaria en una sola inyección. La técnica de extracción SS-LLE ha demostrado ser muy útil en el análisis de éstos compuestos en fluidos biológicos, ofreciendo buenas recuperaciones de los analitos de interés y facilitando la manipulación de la muestra.
4. Se ha desarrollado una metodología sensible para la determinación de los compuestos α -dicarbonílicos en muestras de orina, previa derivatización a

derivados pteridínicos altamente fluorescentes. Para su aplicación a muestras de orina, el procedimiento de extracción optimizado, llevado a cabo con cartuchos poliméricos ISOLUTE ENV+, permitió la separación de las pteridinas existentes en la matriz, evitando así interferencias en el análisis de los derivados. En las muestras analizadas en el laboratorio, las relaciones de compuestos α -dicarbonílicos/creatinina encontradas en la orina de hombres y mujeres jóvenes y sanos es similar, encontrándose valores significativamente más elevados en orina de pacientes diabéticos. El método propuesto puede aplicarse en análisis de rutina de muestras de orina para determinar el nivel de los biomarcadores y su implicación en la diabetes.

5. Se ha propuesto un método cromatográfico simple y sensible para el análisis de los compuestos α -dicarbonílicos en muestras de vino. La reacción de derivatización llevada a cabo con DDP en medio alcalino permite obtener derivados lumazínicos muy fluorescentes con un tiempo de calentamiento de tan solo 30 min. La separación de los derivados formados se consigue de forma más eficiente, y con menor consumo de disolvente, empleando una columna de núcleo sólido. Los niveles de compuestos α -dicarbonílicos determinados en las muestras de vino están en concordancia con los valores encontrados en la bibliografía.
6. Las reacciones entre los compuestos α -dicarbonílicos y ambos reactivos derivatizantes estudiados nos han permitido llevar a cabo la reacción en condiciones menos drásticas y en menor tiempo que con otros reactivos previamente descritos en la bibliografía. De los dos reactivos derivatizantes utilizados, el DDP permite completar la reacción en 30 min, frente a los 60 min necesarios con el TRI. Sin embargo, el uso de éste último da lugar a la formación de derivados más fluorescentes, por lo que la sensibilidad que aporta a los métodos desarrollados es mayor. El empleo de β -mercaptoetanol ha demostrado ser eficaz para evitar, en gran medida, la degradación de ambos reactivos en las condiciones de reacción, facilitando así la optimización de la separación cromatográfica de los derivados formados en ambos casos.
7. Se ha desarrollado un procedimiento analítico basado en la cromatografía líquida de ultra eficacia acoplada a la espectrometría de masas con analizador de triple cuadrupolo para la rápida determinación (cuantificación y confirmación) de

plaguicidas en aguas. Además, la aplicación de una etapa de preconcentración SPE *on-line* (acoplamiento SPE-LC) permite mejorar los límites de cuantificación alcanzándose valores del orden de unos pocos ng L^{-1} , además de disminuir considerablemente los tiempos de análisis y el consumo de disolventes. La posibilidad de inyectar directamente muestras acuosas en el sistema permite disminuir el tratamiento de la muestra y, en consecuencia, los posibles errores y pérdidas asociadas a este proceso. Además, la sensibilidad que aporta la detección por MS/MS contribuye a reducir el volumen de muestra necesario para el análisis.

8. El algoritmo U-PLS acoplado a la rutina RBL demostró ser muy útil en la resolución de la mezcla compuesta por los contaminantes CBZ, OFL y PX, previa irradiación de los analitos para la obtención de sus fotoproductos fluorescentes. La preconcentración de los compuestos utilizando membranas apolares C18 permitió desarrollar una metodología sensible para la determinación de los mismos en muestras reales de aguas, y en presencia de potenciales interferencias.
9. En el trabajo experimental realizado en la presente Tesis Doctoral se ha puesto de manifiesto la capacidad resolutoria de los algoritmos quimiométricos de primer y segundo orden en la resolución de mezclas complejas en matrices biológicas y ambientales, por lo que resultan una alternativa muy útil e interesante al empleo de técnicas separativas, con capacidad suficiente para la lograr la resolución de los analitos de interés en presencia de potenciales interferencias. La disponibilidad de varios algoritmos que permiten extraer información relevante de cada muestra y cuantificar los analitos aún en presencia de interferencias no modeladas, permite seleccionar en cada caso aquel que resuelva de forma más satisfactoria el sistema en estudio.

CONCLUSIONS

According with the experimental work performed in the present Doctoral Thesis, we can conclude the following:

1. PLS has proved to be an excellent first-order algorithm for the resolution of the mixture consisting of CPT-11 and SN-38, based on the difference between their emission spectra. The optimized methodology has been applied to the biological samples by using an adequate extraction and cleanup procedure. Chloroform has been a suitable extracting solvent for both compounds, achieving recoveries close to 100% in both cases.
2. The resolution of a mixture of two analytes with different fluorescence quantum yields, such as thalidomide (little fluorescence) and CPT-11 (highly fluorescence), in human urine samples has been carried out. Moreover, urine presents a background signal which overlap with the fluorescence signal from thalidomide. In order to resolve this complex mixture, several second-order algorithms such as PARAFAC, N-PLS and U-PLS have been applied. Both N-PLS/RBL and U-PLS/RBL algorithms provided good results for CPT-11 determination. However, only PARAFAC achieved good recoveries in the analysis of both compounds in the urine samples analyzed.
3. The use of DAD and fluorimetric detectors in serie, coupled to capillary electrophoresis have allowed the simultaneous analysis of some chemotherapeutic drugs mostly employed in the treatment of colorectal cancer, along with some of its active metabolites. These compounds have been determined at levels that are excreted by urinary tract, in a single injection. SS-LLE has proven to be a very useful extraction technique in the analysis of these compounds in biological fluids, due to its good recoveries provided and easily handling.
4. A sensitive method to determine α -dicarbonyl compounds in human urine, previous derivatization to highly fluorescent pteridinic derivatives has been developed. An extraction SPE procedure was carried out by employing ISOLUTE ENV+ polymer cartridge, allowing the separation of the pteridines containing in the urine samples and, thus, avoiding their interference in the determination of the target compounds. The α -dicarbonyl/CREA ratios founds in the urine samples analyzed appears similar in young healthy women and men, and only in diabetic

volunteers, significantly higher ratios were obtained. The proposed method can be applied in routine urine analysis to determine the level of these biomarkers and their involvement in diabetes.

5. A simple and sensitive chromatographic method with fluorimetric detection to the analysis of α -dicarbonyl compounds in wine has been proposed. The derivatization reaction carried out with DDP in alkaline medium allows to obtain fluorescent lumazinic derivatives in just 30 min. A core-shell column of low size particle provided the best separation efficiency and lowest solvent consumption in the separation of the derivatives. The level of α -dicarbonyl compounds analyzed in several wines are in accordance with the values found in the literature.
6. The reactions between the α -dicarbonyl compounds and both derivatizing reagents used have allowed to carry out the reaction in less drastic conditions and in a shorter time than with other reagents previously described in the literature. TRI needs 60 min to complete the derivatives formation, while by using DDP the reaction time is only 30 min. However, the pteridinic derivatives former are higher fluorescent than lumazinic derivatives, so the sensitivity achieves with TRI reagent is greater. The use of β -mercaptoethanol has proven to be effective to avoid the degradation of both reagents in the reaction conditions.
7. An analytical procedure based on the ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to mass spectrometry using triple quadrupole for rapid determination (quantification and confirmation) of pesticides in water has been developed. The use of on-line SPE preconcentration of the target compounds allows to improve the quantification limits reaching values on the order of a few ng L^{-1} , as well as reduce the analysis time and the solvent consumption significantly. The possibility of inject the aqueous samples directly in the system allows to reduce the sample treatment and, consequently, the possible errors and losses associated with this process. In addition, the high sensitivity that provides the MS/MS detector contributes to reduce the volume of sample needed for the analysis.

8. The U-PLS algorithm coupled to the RBL routine was a very useful tool to analyze simultaneously the emerging pollutants CBZ, OFL and PX, previous irradiation of the analytes until the formation of their fluorescent photoproducts. The preconcentration of the analytes by using apolar membranes C18 allowed to develop a sensitive method for their determination in water in the presence of potential interferences.

9. In the experimental work carried out in this Thesis, the efficiency of the first-order and second-order algorithms in the resolution complex mixtures in biological and environmental matrices has been demonstrated. For that reason, they are a very useful and interesting alternative to the separation techniques in the analysis of compounds of interest in the presence of potential interferences. The availability of several algorithms which extract relevant information from each sample and quantify the analytes even in the presence of not modeled interferences, allow to select the most appropriate in each case.