



Desarrollo de un método UHPLC-MS/MS para la determinación de biomarcadores de exposición a contaminantes atmosféricos en orina

Máster interuniversitario en Técnicas Cromatográficas Aplicadas
Universitat Rovira i Virgili
Curso académico 2022-2023

Andrés Esteban Miranda

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Tutorizado por:

Noelia Ramírez González, Óscar Castro Serrano (Tutores profesionales)
Eva Pocurull Aixala (Tutora académica)

Grupo de investigación: Toxicology & Environmental Metabolomics (TEM),
Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV)



Tarragona, 21 de junio de 2023

SUMARIO

Resumen.....	3
1. Introducción	4
1.1 Problemática medioambiental.....	4
1.2 Selección de compuestos	6
1.3 Selección de técnicas	9
1.3.1 <i>Preparación de orina.....</i>	9
1.3.2 <i>Determinación de los biomarcadores de exposición.....</i>	10
2. Objetivos	11
3. Desarrollo experimental.....	12
3.1 Productos químicos, reactivos y soluciones patrón	12
3.2 Recogida y conservación de las muestras de orina	12
3.3 Preparación de la muestra	13
3.3.1 <i>QuEChERS.....</i>	14
3.3.2 <i>Captiva.....</i>	15
3.3.3 <i>β-Glucuronidasa/arilsulfatasa</i>	16
3.4 Análisis UHPLC-MS/MS	16
3.5 Garantía y control de calidad (QA/QC)	17
4. Resultados y discusión.....	18
4.1 Condiciones de determinación cromatográficas	18
4.1.1 <i>Optimización de las condiciones experimentales MS/MS.....</i>	18
4.1.2 <i>Optimización de las condiciones experimentales UHPLC.....</i>	19
4.2 Condiciones de determinación de preparación de la muestra	27
4.2.1 <i>Parámetros de evaluación de las técnicas de preparación.....</i>	27
4.2.2 <i>QuEChERS.....</i>	28
4.2.3 <i>CAPTIVA.....</i>	31
4.2.4 <i>β-Glucuronidasa/arilsulfatasa</i>	32
4.3 Parámetros de calidad del método.....	34
4.4 Perspectivas para el desarrollo futuro del método	36
5. Conclusiones	37
Referencias	38
ANEXOS.....	41

Resumen

La proximidad del área urbana del Camp de Tarragona a los diversos polígonos industriales de la región requiere la implementación de medidas de seguridad extremadamente estrictas. Con el paso de los años y el aumento de la conciencia ambiental por parte de las autoridades y la población, se han desarrollado una serie de medidas de seguridad, destacando la monitorización de contaminantes atmosféricos derivados de las actividades industriales en la zona.

El objetivo de este trabajo de fin de máster es contribuir a la determinación de biomarcadores derivados de contaminantes atmosféricos. Por lo tanto, se ha desarrollado un método analítico para la identificación de biomarcadores de exposición a contaminantes atmosféricos en muestras de orina utilizando cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS).

Este método analítico ha permitido identificar 12 biomarcadores, entre los que se incluyen 8 biomarcadores de exposición a contaminantes ambientales de la familia BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos), 3 biomarcadores derivados de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y un derivado de hidrocarburos clorados. Estos biomarcadores proporcionan información relevante sobre la exposición de los individuos a los contaminantes atmosféricos y su impacto en la salud.

Se ha realizado la optimización cromatográfica evaluando la separación y resolución obtenida en fase normal HILIC y en fase reversa C18. A la vez que se han determinado las transiciones experimentales propias de la fragmentación de cada biomarcador.

El tratamiento de muestra aplicado en la determinación de los biomarcadores fue optimizado mediante la elección de técnicas de preparación de muestra respaldadas bibliográficamente. En la parte experimental se trataron muestras en orina sintética mediante filtros Captiva y QuEChERS. En esta segunda técnica además se aplicó una etapa de *clean up* mediante dispersive Solid Phase Extraction (d-SPE).

Se evaluó el efecto de la enzima β -Glucuronidasa/arilsulfatasa con el propósito de utilizarla para liberar los biomarcadores de exposición que estaban conjugados con grupos glucurónido y sulfatasa, y así ver si cuantificando las formas desconjugadas, ahora liberadas, junto con las formas libres se obtenían límites de detección inferiores y/o picos con una mayor resolución.

1. Introducción

1.1 Problemática medioambiental

El Camp de Tarragona es el nombre que recibe el área metropolitana alrededor de las ciudades de Tarragona y Reus, comprendiendo en su territorio a más de 500.000 personas. Este elevado número de habitantes coexiste junto a la mayor concentración de industria química del sur de Europa [1], agrupadas mayoritariamente en el *Poligon Químic Nord* y *Poligon Químic Sud*, Fig. 1, situación que obliga a establecer unas estrictas medidas de seguridad para garantizar la calidad del medioambiente (aire, agua, etc.), preservar la salud de las personas, de las zonas agrícolas en caso de fugas, accidentes, explosiones, etc. y controlar la actividad y producción industrial.

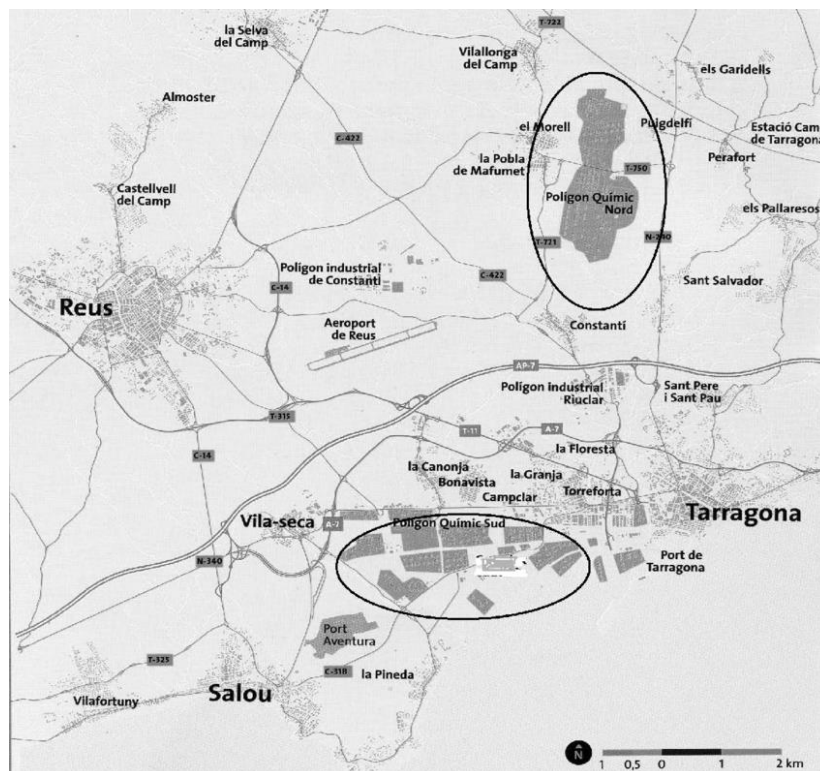


Figura 1. Mapa aéreo del Camp de Tarragona [2].

El complejo petroquímico de Tarragona tuvo sus inicios en la década de 1960. La elección de su ubicación se debió a la topografía adecuada, la accesibilidad del petróleo por el puerto de la ciudad y la abundancia de agua del río Ebro. En un principio, se construyó el Parque Industrial Sud, que actualmente abarca una extensión de 720 hectáreas. En poco tiempo, grandes empresas como Industrias Químicas Asociadas (IQA), con capital de ERT, Cepsa, Shell y Hoechst, junto con Dow y BASF, se establecieron en esta zona. Durante la siguiente década, en paralelo a los "Planes de Desarrollo" impulsados por la autarquía española, se construyó el Parque Industrial Norte, con una extensión menor de 600 hectáreas. En este lugar se instaló la refinería pública Enpetrol, actualmente conocida como Repsol, lo que consolidó el complejo petroquímico. Posteriormente, el complejo se destacó en la producción de etileno, siendo el único productor de óxido de etileno en la Península Ibérica.

Según los datos oficiales del departamento de Medio Ambiente y Sostenibilidad de la Generalitat de Catalunya, la producción global en la zona alcanza los 21 millones de

toneladas al año, lo que lo posiciona como líder en el sector en el sur de Europa [3]. Debido al considerable volumen de producción y la cercanía a áreas urbanas, se ha reconocido la necesidad de implementar medidas para controlar los niveles de contaminantes en todo el territorio circundante.

En los últimos años, se han puesto en marcha diversos planes para la protección y cuidado del medio ambiente y las personas: proyecto de regeneración de aguas residuales urbanas, un sistema de control y monitorización de olores, que era una de las principales preocupaciones de los residentes cercanos a los polígonos [4]. Y entre todas estas iniciativas, destaca la monitorización de la calidad del aire. En 2015 se estableció la *Taula de la Qualitat de l'Aire del Camp de Tarragona* con el propósito de intercambiar información sobre la calidad del aire y los efectos de las emisiones de la industria química en la salud de las personas, así como mejorar la vigilancia e investigación del impacto en la salud humana de los principales contaminantes provenientes de la petroquímica. Esta mesa está compuesta por diversas entidades, incluyendo administraciones gubernamentales a nivel estatal y municipal, instituciones académicas como la *Universitat Rovira i Virgili*, organizaciones ecologistas, sindicatos, asociaciones empresariales como la Asociación Empresarial Química de Tarragona (AEQT) y comunidades locales.

Desde el año 2018, se lleva a cabo anualmente el estudio "Observatorio de la Calidad del Aire del Camp de Tarragona" [5]. Este estudio forma parte de un proyecto integrado en la *Taula de la Qualitat de l'Aire del Camp de Tarragona*, impulsado por Repsol con el apoyo de l'AEQT. El Instituto Cerdà coordina el proyecto, y cuenta con la contribución técnica de la *Universitat Rovira i Virgili*, así como la participación de otras entidades públicas y privadas. El objetivo principal de este estudio es recopilar datos sobre la evolución de las emisiones de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) en la zona que abarca los polígonos industriales químicos y poblaciones colindantes. Para llevar a cabo esta monitorización, se establecieron más de 20 puntos de muestreo durante un año, incluyendo a las localidades de: El Morell, La Pobla de Mafumet, Constantí, Tarragona, Reus, Alcover, Valls, Campclar, Torreforta, El Serrallo, La Pineda, Vila-seca, Bonavista, La Canonja, Prades, Barcelona, Lleida, Girona, etc., una mezcla de pueblos y ciudades colindantes a complejos industriales químicos y las grandes urbes de Cataluña.

En el informe más reciente del *Institut Cerdà* [5], las concentraciones de benceno se mantienen por debajo de los límites establecidos en las zonas de emisión según el Real Decreto 102/2011 [6]. Al comparar las concentraciones medias anuales de compuestos orgánicos volátiles (VOCs), benceno y 1,3-butadieno con mediciones anteriores, se observa una disminución de la concentración a medida que avanza el tiempo. Esta tendencia descendente en las concentraciones de contaminantes atmosféricos a lo largo de los años es un indicador positivo del efecto de las medidas implementadas para mejorar la calidad del aire. La implementación de estas medidas, junto a regulaciones estrictas, tecnologías más limpias y conciencia ambiental, han contribuido a la reducción de las emisiones y, en consecuencia, a la disminución de la contaminación atmosférica.

En España la regulación sobre calidad del aire, viene definida por distintas leyes: la Ley 34/2007 de 15 de noviembre, de calidad del aire y protección de la atmósfera establece un valor límite anual de 5 microgramos por metro cúbico ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) para el benceno en el aire ambiente [7]. Otras leyes encargadas de establecer los valores límites de emisión son el Real Decreto 102/2011 [6] y el Real Decreto 815/2013 [8]. Estas leyes son el

resultado de la implementación de la Directiva 2008/50/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, la cual establece estándares de calidad del aire ambiente y objetivos a largo plazo para la reducción de la contaminación atmosférica en la Unión Europea [9].

Aunque el Informe sobre la Calidad del Aire del Camp de Tarragona puede proporcionar información relevante sobre la evolución de la calidad del aire en la zona, es fundamental considerar la presencia de otros contaminantes. La regulación actual puede resultar insuficiente, ya que, aunque se aplica a un grupo amplio de compuestos, como a óxidos de azufre, óxidos de nitrógeno, compuestos orgánicos volátiles, hidrocarburos aromáticos policíclicos, metales, partículas en suspensión, etc. no abarca todos los contaminantes presentes en el aire que también representan potencialmente riesgos para la salud humana y el medio ambiente.

Para poder asegurar que los niveles de exposición son mínimos y no representan un peligro para la salud humana y ambiental a lo largo del tiempo sería necesario ampliar la lista de contaminantes regulados en aquellas zonas de mayor exposición, como el *Camp de Tarragona*.

1.2 Selección de compuestos

A partir de las necesidades de la zona y a los datos públicos de valores de concentración monitorizados anualmente en los diferentes puntos, se ha confeccionado una lista de compuestos de alto valor para su análisis y futura monitorización, ver *Tabla 1*.

Este estudio busca implementar un análisis rápido y eficiente en orina de un grupo de compuestos que pueda cubrir un amplio número de precursores contaminantes en los que haya niveles de producción altos en el Camp de Tarragona. Estos precursores son contaminantes atmosféricos, pero una vez entran en contacto directo con el cuerpo humano se metabolizan en otros compuestos, por lo que es necesario determinar el producto de degradación. Posteriormente, el cuerpo humano mediante el aparato excretor es el responsable de eliminarlos del cuerpo.

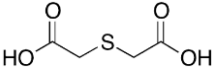
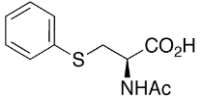
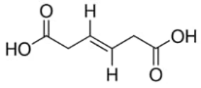
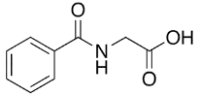
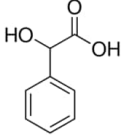
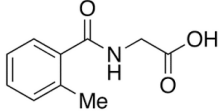
Originalmente, la lista de candidatos integraba potencialmente un número superior a 60 compuestos, por lo que un análisis simultáneo de compuestos de naturaleza tan variada complicaba el proceso de desarrollar un método que anexe a todos. Se decidió aplicar una serie de filtros para la selección de biomarcadores ambientales, los cuales son:

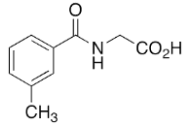
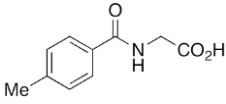
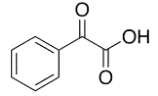
- Deben ser compuestos presentes en orina
- Posibilidad de ser analizados mediante UHPLC-MS/MS-ESI-
- Comercialmente disponibles para su adquisición
- Idealmente cada contaminante debe estar asociado a un único biomarcador

Estos 4 requisitos redujeron considerablemente el número de compuestos candidatos, conformando una lista final con 12 biomarcadores que provienen de 9 contaminantes de amplia naturaleza química. En la *Tabla 1* se recoge toda la información de interés en cuanto a las propiedades químicas de los biomarcadores, familia de compuestos e información toxicológica y cancerígena de los contaminantes de los que derivan.

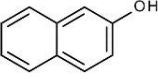
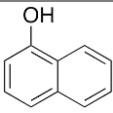
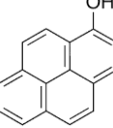
En el *Anexo 1* se muestra un glosario con las definiciones de los términos incluidos en la *Tabla 1*. En el *Anexo 2* se recogen las concentraciones a la cual se han detectado los biomarcadores objetivo en orina en población no expuesta a contaminación.

Tabla 1. Biomarcadores de exposición a contaminantes atmosféricos analizados. Agrupados por familia de compuestos.

Biomarcador	Información	Estructura	Tiempo de vida medio en orina ($t_{1/2}$) [Ref.]	Precursor	Cáncer		No-cáncer	
					Clasificación IARC	Inhalation Unit Risk ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) ⁻¹	Inhalation Chronic Reference Concentration (RfC) (mg/m^3)	Otros
Biomarcadores de compuestos orgánicos volátiles (VOCs)								
Ácido 2,2'-tiodiacético (TGA)	Número CAS: 123-93-3 Fórmula molecular: $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4\text{S}$ Peso molecular: 150,16 g/mol Log P: -1,16		N.D.	1,2-Dicloroetano (Organoclorado)	2B	$2,60 \times 10^{-5}$	$7,00 \times 10^{-3}$	RfCs: $7,00 \times 10^{-2}$ RfCt: N.D.
Ácido S-fenilmercaptúrico (SPMA)	Número CAS: 4775-80-8 Fórmula molecular: $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{S}$ Peso molecular: 239,29 g/mol Log P: 1,16		9,1 h [10]	Benceno (BTEX)	1	$7,80 \times 10^{-6}$	$3,00 \times 10^{-2}$	RfCs: $8,00 \times 10^{-2}$ RfCt: $1,92 \times 10^{-2}$
Ácido trans, trans-muconico (TTMU)	Número CAS: 3588-17-8 Fórmula molecular: $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4$ Peso molecular: 142,11 g/mol Log P: -0,20		5,0 h [10, 11]					
Ácido hipúrico (HA)	Número CAS: 495-69-2 Fórmula molecular: $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_3$ Peso molecular: 179,17 g/mol Log P: 0,46		2-3 h [12]	Tolueno (BTEX)	3	N.D.	5,00	RfCs: 5,00 RfCt: N.D.
Ácido mandélico (MA)	Número CAS: 90-64-2 Fórmula molecular: $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ Peso molecular: 152,15 g/mol Log P: 0,57		2,1 h [13]	Etilbenceno (BTEX)	2B	$2,50 \times 10^{-6}$	1,00	RfCs: 9,00 RfCt: 8,67
Ácido 2-metilhipúrico (2-MHA)	Número CAS: 42013-20-7 Fórmula molecular: $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_3$ Peso molecular: 193,2 g/mol Log P: 1,01		N.D.	o-xileno (BTEX)	3	N.D.	$1,00 \times 10^{-1}$	RfCs: N.D. RfCt: N.D.

Ácido 3-metilhipúrico (3-MHA)	Número CAS: 27115-49-7 Fórmula molecular: C ₁₀ H ₁₁ NO ₃ Peso molecular: 193,2 g/mol Log P: 1,01		N.D.	m-p xileno (BTEX)	3	N.D.	1,00 × 10 ⁻¹	RfCs: N.D. RfCt: N.D.
Ácido 4-metilhipúrico (4-MHA)	Número CAS: 217115-50-0 Fórmula molecular: C ₁₀ H ₁₁ NO ₃ Peso molecular: 193,2 g/mol Log P: 1,01		N.D.					
Ácido fenilgloxílico (PGA)	Número CAS: 611-73-4 Fórmula molecular: C ₈ H ₆ O ₃ Peso molecular: 150,13 g/mol Log P: 1,20		8,1 h [13]	Estireno (BTEX)	2A	N.D.	1,00	RfCs: N.D. RfCt: 3,00

Biomarcadores de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)

2-naftol (2-OHNaph)	Número CAS: 135-19-3 Fórmula molecular: C ₁₀ H ₈ O Peso molecular: 144,17 g/mol Log P: 2,69		2,5 h [14]	Naftaleno (PAHs)	2B	3,40 × 10 ⁻⁵	3,00 × 10 ⁻³	RfCs: N.D. RfCt: N.D.
1-naftol (1-OHNaph)	Número CAS: 90-15-3 Fórmula molecular: C ₁₀ H ₈ O Peso molecular: 144,17 g/mol Log P: 2,69		4,3 h [14]					
1-hidroxipireno (1-OHPy)	Número CAS: 5315-79-7 Fórmula molecular: C ₁₆ H ₁₀ O Peso molecular: 218,25 g/mol Log P: 4,45		3,9 h [14]	Pireno (PAHs)	3	N.D.	N.D.	RfCs: N.D. RfCt: N.D.

El número CAS, la fórmula y el peso molecular han sido obtenidos consultando la página de información de cada biomarcador en PubChem. Log P de cada metabolito ha sido obtenido de la base de datos ChemSpider. La información toxicológica procede de las fichas de seguridad proporcionadas por el distribuidor.

1.3 Selección de técnicas

1.3.1 Preparación de orina

La orina es una matriz biológica no invasiva que se obtiene fácilmente y de manera no dolorosa mediante la micción, lo que la hace especialmente útil en estudios de seguimiento o monitorización. Como matriz biológica, se trata de una matriz compleja, en la cual los biomarcadores de exposición están presentes en concentraciones muy bajas en relación con otros componentes. Se compone mayoritariamente de agua, llegando a representar hasta un 95% del total. El siguiente compuesto que se encuentra en mayor medida es la urea, con un 2%, que es el principal producto terminal del metabolismo de las proteínas en mamíferos. En el resto de los componentes que completan la composición de la orina, se engloban una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos, donde dentro de este pequeño porcentaje se sitúan en una todavía más pequeña fracción los biomarcadores de exposición [15]. Esto plantea el desafío de conseguir una etapa de preparación de muestra en la que se puedan eliminar selectivamente los diferentes interferentes presentes en la orina sin comprometer la detección de los biomarcadores de interés, consiguiendo así purificar la muestra de sustancias indeseables, obteniendo una muestra más limpia.

Tal y como respalda la bibliografía, existen multitud de métodos estudiados para la preparación de muestra a la hora de extraer biomarcadores en orina y determinarlos mediante UHPLC. Entre estas técnicas se encuentran Liquid-Liquid Extraction (LLE) Dilute & Shoot, QuEChERS, Solid-Phase Extraction (SPE) y Captiva, entre otras [16, 17, 18, 19]. En el caso de los biomarcadores seleccionados, la gran mayoría de ellos se analiza mediante LC-espectrometría de masas en tándem (normalmente con triple cuadrupolo, QqQ) en modo de ionización negativo (ESI-) y la técnica de preparación de muestra es SPE.

Da-Hye Kim et al., [16], describe la preparación de orina mediante SPE, evaluando 3 sorbentes. Uno de los sorbentes que utiliza son los filtros Captiva, que están cobrando fuerte importancia en el uso de extracciones en muestras biológicas. En el caso de los 12 biomarcadores escogidos para la determinación no existe actualmente bibliografía específica. Aun así, son numerosas las fuentes que respaldan el uso de Captiva como técnica de extracción de compuestos en orina [17, 18, 19], por lo que es interesante evaluar la eficiencia de esta técnica en los biomarcadores seleccionados.

Los filtros CAPTIVA ND son cartuchos de extracción en fase sólida desarrollados por Agilent Technologies. Estos filtros contienen una membrana la cual es capaz de retener proteínas, fosfolípidos, tensioactivos supresores de iones y lípidos mediante una combinación de exclusión por tamaño e interacciones hidrofóbicas con la cadena alifática larga de los lípidos [20]. Gracias a sus características de retención, su simpleza y el menor volumen de reactivos que necesita es utilizada mayoritariamente en aplicaciones que impliquen limpieza en plasma y orina.

La utilización de estos filtros como técnica de extracción eliminará gran parte de los interferentes mencionados, se obtendrá un extracto más limpio, que tendrá un menor efecto matriz, con lo que teóricamente los resultados en orina real deben ser similares a los obtenidos inyectando patrones en orina sintética y por lo tanto esto ayudaría en el proceso, simplificando la calibración.

El método QuEChERS destaca por su simplicidad, rapidez, bajo costo, eficacia, robustez y seguridad, características que componen sus siglas. Este método se basa en una combinación de extracción líquido-líquido donde se adicionan sales inorgánicas que provocan la migración de las sustancias de interés (*salting-out*) entre fases. El principio detrás del *salting out* se basa en la disminución de la solubilidad de las sustancias en la solución acuosa debido al aumento de la concentración de las sales. Cuando se agregan las sales, los iones presentes interfieren en las interacciones soluto-solvente, reduciendo la capacidad del disolvente para mantener las moléculas de la sustancia en solución. Como resultado, las moléculas o partículas de la sustancia migran de la fase acuosa a la fase orgánica. En este trabajo, se realizará posteriormente una etapa de *clean up* mediante dispersión de fase sólida (d-SPE). Se emplea una fase sólida dispersa en la muestra o sorbente, en este caso ZSEP y PSA. Este sorbente se mezcla con la muestra, permitiendo la adsorción selectiva de los interferentes.

1.3.2 Determinación de los biomarcadores de exposición

La determinación se realizará mediante UHPLC-MS/MS. Esta técnica es extremadamente sensible, lo que permite la detección y cuantificación de compuestos presentes en concentraciones muy bajas en la orina, como en el caso de biomarcadores. La técnica permite la identificación y cuantificación de compuestos específicos utilizando múltiples reacciones de ionización y transiciones de masa, lo que reduce la interferencia de otros componentes presentes en la matriz. Además, aporta el valor añadido de requerir volúmenes de muestra pequeños lo que es una ventaja cuando se trabaja con matriz biológica, ya que, aunque sea no invasiva y tenga fácil obtención, a menudo se dispone de volúmenes limitados. Todas estas ventajas, condensadas en un método cromatográfico con tiempos de análisis muy cortos, hará que el método pueda ser aplicado a un gran número de muestras en poco tiempo y con gran sensibilidad y selectividad.

En la determinación de biomarcadores de exposición a contaminantes atmosféricos, es muy importante conocer que cuando nos vemos expuestos a diferentes contaminantes, estos pueden degradarse en nuestro organismo. El benceno, por ejemplo, se degrada mediante el sistema enzimático del citocromo P450 en el hígado, específicamente por la acción de la enzima CYP2E1 (citocromo P450 2E1) [21, 22]. En esta vía metabólica, el benceno es convertido en varios metabolitos a medida que se degrada y elimina del cuerpo, convirtiéndose en SPMA o TTMU entre otros. El mismo proceso puede suceder para otros contaminantes. A su vez, estos derivados son metabolizados a través de la vía del ácido glucurónico, proceso descrito en [23], y/o la vía del sulfato. En estas vías, se agregan grupos glucurónidos o sulfatos al metabolito, lo que aumenta su solubilidad en agua y facilita la eliminación a través de la orina. Para poder analizar los biomarcadores que han sido transformados en el producto glucuronizado o sulfatado, será necesario hidrolizarlos enzimáticamente con β -glucuronidasa/arilsulfatasa. Esta combinación de ambas enzimas tiene la capacidad de hidrolizar y catalizar la reacción de desglucuronidación (rotura de los enlaces glucurónidos) y desulfatación en compuestos orgánicos y así detectar, junto a los metabolitos libres, aquellos que se hayan desconjugado. Autores como Hongxuan Kuang et al., [24], han demostrado la efectividad de la adición de esta combinación de enzimas, en este caso para la determinación simultánea en orina de 31 VOCs.

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es el desarrollo de una metodología analítica para el análisis de biomarcadores de exposición a contaminantes en orina mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas. Con este fin, se llevará a cabo el desarrollo de un método analítico, evaluando diversas técnicas de preparación de muestras, QuEChERS y CAPTIVA, y análisis mediante cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS).

Los objetivos específicos en términos de desarrollo del método son:

- ✓ Adquisición de conocimientos relacionados con la metabolómica, principalmente en orina.
- ✓ Planificación, estudio y desarrollo de las técnicas de preparación de muestra.
- ✓ Estudio y desarrollo de las condiciones cromatográficas. Elección de la fase de la columna UHPLC, fase móvil, parámetros cromatográficos y de detección de biomarcadores.

Los objetivos específicos con respecto a la aplicación de las habilidades adquiridas en el máster son:

- ✓ Demostrar la adquisición de capacidad analítica y resolutive, diseñando y llevando a cabo los planes de trabajo establecidos.
- ✓ Desarrollar un enfoque de interpretación de datos cromatográficos para identificar y caracterizar de manera precisa y confiable los compuestos presentes en una muestra.

3. Desarrollo experimental

3.1 Productos químicos, reactivos y soluciones patrón

Los estándares analíticos del ácido 2,2-tiodiacético (TGA), ácido fenilmercaptúrico (SPMA), ácido trans, trans-mucónico (TTMU), ácido hipúrico (HA), ácido mandélico (MA), ácido 2-metilhipúrico (2-MHA), ácido 3-metilhipúrico (3-MHA), ácido 4-metilhipúrico (4-MHA), ácido fenilglioxílico (PGA), 1-hidroxipireno (1-OHPy), 1-naftol (1-OHNaph), 2-naftol (2-OHNaph), y clotianidina-d₃ (Clot-d₃) se adquirieron de Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). La pureza química de todos los analitos es superior al 95%. La orina sintética “*Sigmatix Urine Diluent*”, los sorbentes para *clean up* y la enzima β-glucuronidasa/arisulfatasa de *Helix pomatia* también se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

Metanol (MeOH), acetonitrilo (ACN) y H₂O, todos de pureza LC-MS, así como las sales QuEChERS fueron suministrados por Scharlab (Sentmenat, Barcelona). Los reactivos ácido fórmico (FA) y acetato de amonio (NH₄Ac) ambos de pureza ≥99.0% se compraron a Carlo Erba Reagents (Sabadell, Barcelona). Los filtros Captiva fueron obtenidos de Agilent Technologies (California, EUA).

Cada estándar analítico se disolvió en MeOH, para obtener soluciones patrón a concentraciones de 2000 mg L⁻¹. Las soluciones patrón se diluyeron para obtener soluciones menos concentradas a 100 mg L⁻¹ y a partir de estas se preparaba, siempre que fuese necesario, la solución individual de trabajo a 1 mg L⁻¹.

Se preparó una solución *mix* de trabajo mezclando volúmenes apropiados de cada solución patrón individual en MeOH a una concentración final de 10 mg L⁻¹ partiendo de las soluciones individuales de 100 mg L⁻¹.

Con el fin de realizar múltiples optimizaciones, se prepararon soluciones patrón para calibrado en diferentes medios, entre los que se incluyen ACN, H₂O, orina sintética y orina real, todos dentro del rango de 1-100 µg L⁻¹.

Todas las soluciones patrón, soluciones de trabajo, estándares de calibración y muestras de control de calidad se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

3.2 Recogida y conservación de las muestras de orina

Para el desarrollo del método, se utiliza un *mix* de orina de adultos sanos, residentes en Tarragona y no expuestos al humo de tabaco en sus hogares. Esta orina, se centrifugó y guardó a -80 °C hasta su posterior utilización.

Los experimentos de rendimiento de la enzima β-Glucuronidasa/arisulfatasa se realizaron con una mezcla de la primera orina del día de 5 niños y 5 niñas de 9 a 11 años, expuestos al humo de tabaco en el hogar, como control positivo de la presencia en orina de la mayoría de los metabolitos estudiados. Estas muestras forman parte del proyecto “ECHOES: *Epigenetic and metabolic alterations associated to early childhood exposure to air pollution and its role in later life chronic disease*” financiado por la Fundación La Caixa (LCF/PR/SR19/52540002) cuya investigadora principal es la Dra. Noelia Ramírez.

Las muestras se recogieron en cajas refrigeradas y se transportaron al laboratorio. Una vez en el laboratorio, se realizó un urianálisis a cada una (leucocitos, nitritos, proteína, pH, sangre, densidad, cetona y glucosa) y luego se dividieron en alícuotas de 1 mL y se almacenaron en tubos criogénicos a -80 °C hasta su posterior procesado.

3.3 Preparación de la muestra

La preparación de la muestra se realizó mediante QuEChERS y Captiva, dopando a una concentración final de 50 µg L⁻¹ la *Sigmatix Urine Diluent*, medio utilizado para la evaluación de las técnicas, a partir de las soluciones individuales a 1 mg L⁻¹ de los biomarcadores. La muestra de orina sintética se almacenó -20 °C hasta su procesado.

Para comparar que técnica de preparación ofrece mejores resultados en el tratamiento de la muestra, se evaluarán los valores de recuperación (%R) y efecto matriz (%ME) obtenidos en la extracción con orina sintética, relacionados mediante la recuperación aparente (%Rec. apa).

Trabajar en primer momento con orina sintética permite disponer de una matriz limpia de otros analitos, en la cual los biomarcadores sí estarán presentes ya que son añadidos a la matriz. Una vez optimizado el proceso de preparación, se evaluará el uso de orina sintética comparado con orina real, donde la matriz será más compleja ya que habrá un mayor número de interferentes y no es seguro que se encuentren los biomarcadores, ya sea por falta de exposición al contaminante, por degradación o porque el compuesto está en concentraciones inferiores al límite de detección del método.

La recuperación aparente se refiere a la fracción de la sustancia objetivo que se recupera específicamente en la etapa de preparación de muestra. %R en un análisis químico se refiere a la medida en la que se puede recuperar una sustancia específica de una muestra a lo largo del proceso de análisis. Se utiliza para evaluar la eficiencia del método de análisis y determinar si se pueden obtener resultados precisos y confiables. Varios factores pueden afectar la recuperación en un análisis químico, como las interacciones químicas, las pérdidas durante la manipulación de la muestra y la presencia de impurezas o interferencias, entre otros. %R se calculó a partir de la fórmula descrita en la Eq.1 y Eq.2:

$$Eq. 1: \%R = \left(\frac{\text{Concentración teórica} - \text{concentración spike al inicio}}{\text{concentración teórica}} \right) * 100$$

$$Eq. 2: \%R = \% \text{ Valor Rec. apa} - \% ME$$

El efecto matriz (%ME) se refiere a las interferencias causadas por los componentes adicionales presentes en la muestra, que pueden afectar a la detección de los analitos de interés. Esto puede llevar a una disminución de la sensibilidad, precisión y exactitud de los resultados. %ME se calculó a partir de la fórmula descrita en la Eq.3:

$$Eq. 3: \%ME = \% \text{ Valor de señal absoluta} - \% \text{ Valor de señal teórico (100\%)}$$

Un valor de efecto matriz positivo indica un aumento de señal cuando se analiza el analito en la matriz. Mientras que un valor negativo implica que la señal ha disminuido, por lo que se encuentra suprimida por la matriz.

3.3.1 QuEChERS

La muestra de orina se descongela en un baño de hielo. Una vez descongelada, se añade en un tubo Falcon de 15 mL para centrifuga 1 mL de orina y 1 mL de ACN junto a 50 μL de clotianidina- d_3 a una concentración de 1 mg L^{-1} , que actúa como surrogate y QA/QC. Se agita el tubo durante 1 minuto en un vórtex. Una vez finalizada la agitación, se añaden 0,50 g de sales QuEChERS del método CEN y se vuelve a agitar durante otro minuto de forma vigorosa. Una vez mezclado, los tubos se centrifugan durante 5 minutos, a 3500 rpm y 4°C (Fig. 2).

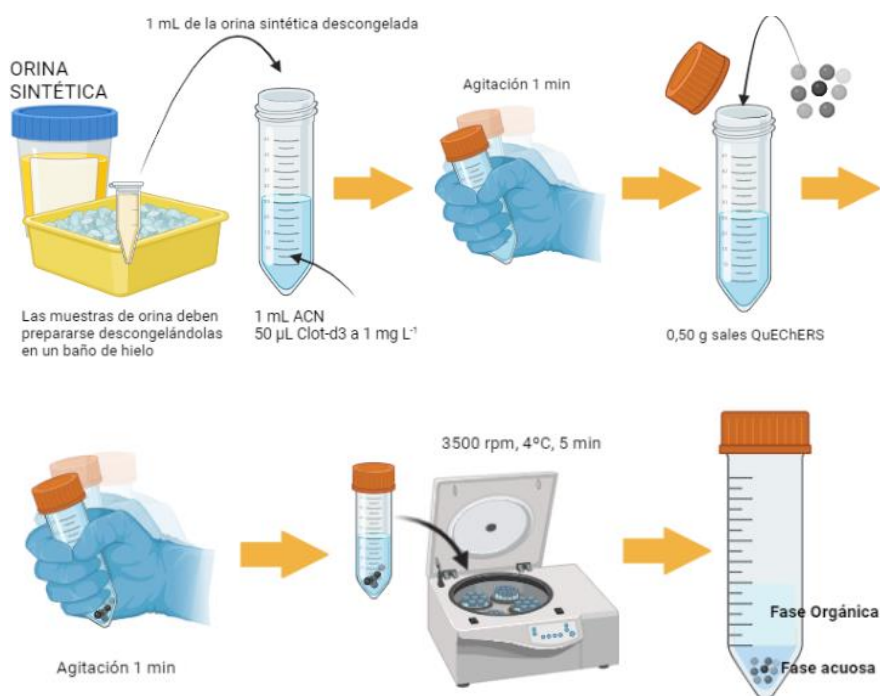


Figura 2. Procedimiento de preparación de la muestra mediante QuEChERS

Se recupera la fase orgánica, recogiendo 800 μL del sobrenadante. Dado que se realizaron pruebas con y sin etapa de limpieza (*clean up*), el procedimiento de extracción se llevó a cabo de manera diferente. Para el proceso sin *clean up*, el procedimiento acaba en este punto. En el caso de incluir *clean up*, se añade el sobrenadante en otro tubo que contiene 20 mg de sorbente (PSA o ZSEP) (Fig. 3). El tubo se agita vigorosamente utilizando el vórtex para asegurar una buena interacción entre los analitos y el sorbente. Una vez agitado, los tubos se centrifugan de nuevo durante 5 minutos, a 3500 rpm y 4°C .



Figura 3. Procedimiento de *clean up* de la muestra mediante d-SPE

El sobrenadante se recupera con una micropipeta y se filtra utilizando una micro jeringa y filtros de nylon de 0,22 μm (Fig. 4). Finalmente, se toma una alícuota de 100 μL de los extractos, con o sin *clean up*, y se deposita en otro vial con un *insert* de 100 μL de capacidad, que se conserva a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis.

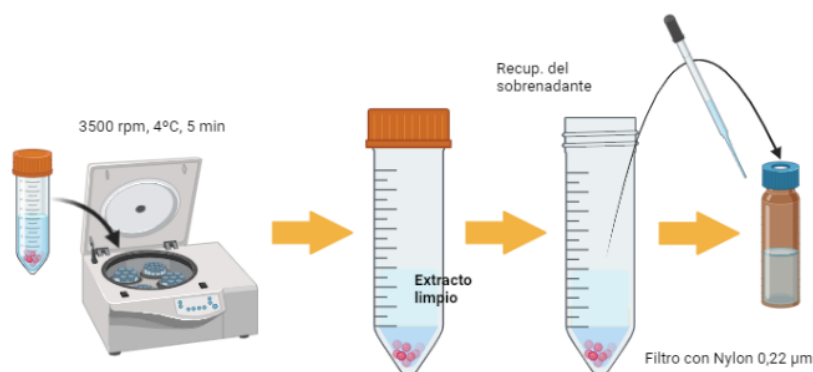


Figura 4. Recuperación del sobrenadante limpio y filtrado de la muestra en un vial cromatográfico.

3.3.2 Captiva

La muestra de orina se descongela en un baño de hielo. Una vez descongelada, 1 mL de la orina se deposita en un tubo Eppendorf y se añaden 50 μL de la solución de clotianidina- d_3 a 1 mg L^{-1} . El tubo Eppendorf se mezcla vigorosamente en un vórtex durante 10 - 20 segundos, y luego se centrifuga a 3500 rpm, 5 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para conseguir la homogeneidad de la muestra. Una vez centrifugado, se recogen 900 μL de sobrenadante y se transfieren a un filtro Captiva. Para inducir el paso de la orina a través del filtro, se utiliza filtración por fuerza centrífuga. El filtro se coloca dentro de un tubo Falcon de 15 mL y, al centrifugar (1 min, 3500 rpm, 4°C), se obliga a que la orina pase a través del filtro, lo que permite extraer la muestra y retener parte de la matriz. La orina filtrada queda recogida en el fondo del tubo Falcon. Se toman 95 μL de la orina filtrada y se agregan a un vial que contiene un insert con capacidad para 100 μL . Se añaden 5 μL de MeOH para completar el volumen final de 100 μL con un 5% de MeOH. Todos los extractos se almacenaron congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. En la Fig. 5, se muestra gráficamente el procedimiento.

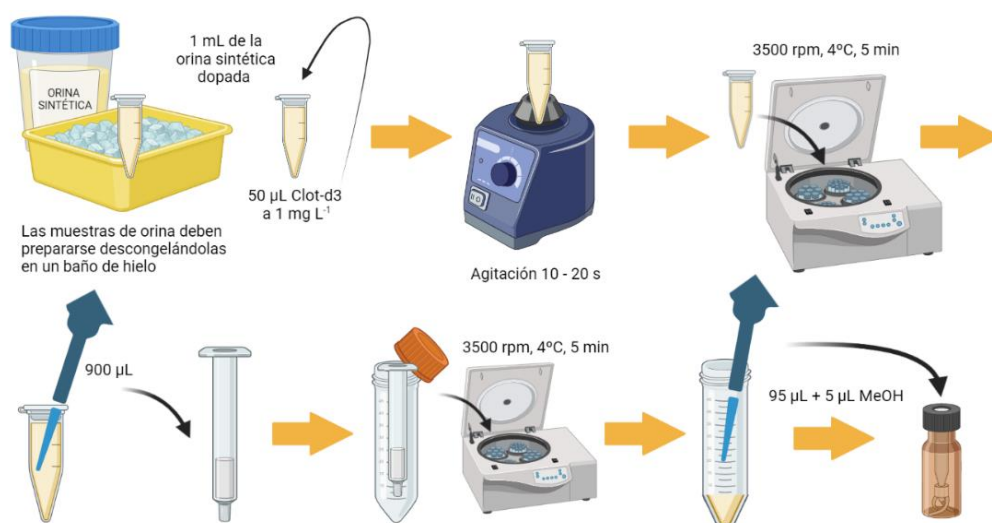


Figura 5. Procedimiento de preparación de la muestra mediante Captiva

3.3.3 β -Glucuronidasa/arilsulfatasa

La mezcla preparada a partir de la orina recolectada se dividió en 3 grupos: en el primero de ellos no se añadió enzima ni se incubó, de esta manera este grupo servirá como blanco y no habría ningún efecto de desconjugación. En el siguiente grupo la muestra será incubada *overnight* a 37 °C sin adición de enzima. En el último grupo se añadirán 10 μ L de β -glucuronidasa/arilsulfatasa a ≥ 2000 unidades/ mL por cada 1 mL de orina y se dejará incubar la orina *overnight* a 37 °C. Esta prueba permite conocer la influencia de la enzima en las condiciones evaluadas en el proceso de desglucuronización y desulfatación de los biomarcadores conjugados y además si el efecto de la incubación tiene un factor positivo o negativo sobre las condiciones cromatográficas en cuanto a resolución de los picos.

Experimentalmente, se mezclan 500 μ L de cada una de las orinas y se lleva a la centrifuga. Posteriormente, se cogen 1,5 mL de la orina y se traspasan a un tubo Eppendorf, donde se realiza la adición de 15 μ L de enzima para conseguir 2000 unidades mL⁻¹ y 75 μ L de surrogate a 1 mg L⁻¹ para dopar la muestra a 50 μ g mL⁻¹. El Eppendorf se introduce en la incubadora a 37 °C y se deja incubar *overnight*.

Una vez incubada la muestra, se retira de la incubadora y se realiza el procedimiento de preparación de la muestra con el método Captiva.

3.4 Análisis UHPLC-MS/MS

El análisis cromatográfico se llevó a cabo utilizando un Agilent UHPLC System 1290 Infinity II, acoplado a un detector de triple cuadrupolo Agilent 6490 (California, EUA). Se realizaron análisis con dos tipos diferentes de columnas, cuyos parámetros cromatográficos se encuentran definidos seguidamente: a) Acquity HILIC (150 x 2,1 mm X 1,7 μ m) fases móviles de H₂O 0,1% NH₄Ac (fase A) y ACN 0,1% HCOOH (fase B), con un programa de gradiente del siguiente modo: Se comenzó con 0% A durante 2,0 min, se aumentó a 50% A hasta llegar al minuto 6. Luego la fase A disminuyó al 0% en 0,20 min. El *post-run* se fijó en 2,30 minutos. Flujo de 0,450 mL min⁻¹. b) Phenomenex Kinetex C18 (100 x 2,1 mm X 1,7 μ m), fases móviles de H₂O 0,1% HCOOH (fase A) y MeOH (fase B). El programa de gradiente fue: Se comenzó con un 5% B, que aumentó hasta 50% a los 3 minutos. Continuó aumentando hasta el 80% a minuto 5. Alcanzó el 100% B a los 10 minutos y volvió en 0,50 minutos a las condiciones iniciales. El *post-run* se fijó en 1,5 minutos. Flujo de 0,3 mL min⁻¹. En ambos casos la columna se mantuvo a 35 °C y el volumen de inyección fue de 5 μ L.

En cuanto a los parámetros del triple cuadrupolo (QqQ), la fuente utilizada fue una fuente de electrospray ESI en modo negativo. Tanto la fuente como los cuadrupolos se fijaron a 250°C y 150°C, respectivamente. El resto de los parámetros asociados a la fuente se encuentran recogidos en la *Tabla S2* del *Anexo 3*. La adquisición de datos se realizó en modo MRM, (*Multiple Reaction Monitoring*) en un rango de masas de 50-500 m/z. Las transiciones de cada uno de los compuestos, así como los tiempos de retención y las energías de colisión se encuentran recogidas en la *Tabla S3* del *Anexo 4*.

3.5 Garantía y control de calidad (QA/QC)

La clotianidina-d₃ ha sido utilizada como surrogate en la preparación de muestras antes del análisis cromatográfico. Su adición tiene múltiples funciones importantes:

- **Reproducibilidad:** El surrogate se agrega para evaluar y monitorear la consistencia de los resultados en diferentes análisis, permitiendo evaluar la precisión y variabilidad del método.
- **Extracción y purificación:** El surrogate se utiliza como indicador de la eficiencia de la extracción o purificación, verificando la efectividad de los métodos empleados.
- **Control de calidad:** El surrogate se agrega a las muestras o estándares para evaluar la eficiencia del proceso de separación y detección, asegurando la fiabilidad y correcto funcionamiento del sistema de cromatografía.

Las cuantificaciones realizadas se llevaron a cabo a partir de la integración de los picos de la transición cuantificadora de cada uno de los metabolitos e introduciendo el valor de área obtenido en la recta de calibrado correspondiente. Como medida de confirmación de que el pico integrado corresponde al biomarcador, se utilizó el tiempo de retención y la ratio obtenida entre la señal de la transición cuantificadora y la cualificadora como criterios de confirmación.

Otra medida fue la adición de patrones a concentración conocida en las secuencias realizadas, que servían de muestras de control asegurando el funcionamiento del sistema de cromatografía. En caso de que el procedimiento fuese correcto, el patrón al cuantificarse debía dar la concentración a la cual se ha adicionado. En caso de disminución o aumento de la señal, se podría aplicar un factor de corrección a las muestras evaluadas.

Otro parámetro de calidad fue la comprobación a través de blancos de columna entre sets de muestras para ver que no existía efecto memoria.

4. Resultados y discusión

4.1 Condiciones de determinación cromatográficas

4.1.1 Optimización de las condiciones experimentales MS/MS

Para poder identificar las transiciones características de cada uno de los biomarcadores ambientales fue necesario inyectarlos 1 a 1 en una columna ciega a concentración de 1 mg L⁻¹ en MeOH.

Para realizar la optimización, se utilizaron los parámetros de la fuente de ionización establecidos en el método desarrollado por el grupo TEM para la determinación de contaminantes derivados del humo del tabaco en pulseras de silicona. El número de iones encontrados por compuesto fue muy bajo, resultando en que en algunos compuestos no se obtenía ninguna transición característica o aquellas obtenidas tenían una respuesta muy baja para ser una inyección realizada en solvente puro a 1 mg L⁻¹. Se modificaron los parámetros de la fuente de ionización, realizando ligeras modificaciones a los parámetros utilizados en Caballero-Casero et al., [17]. Esta información está recogida en la *Tabla S2* del *Anexo 3*.

Se detectaron en la gran mayoría de compuestos 3, 4 y hasta 5 transiciones características. En la *Tabla 4* están recogidos los parámetros finales. Se eligieron como transiciones de cuantificación y cualificación a la primera y segunda transición más abundante, respectivamente. Ejemplos mostrados en *Anexo 5*.

La *Tabla 2* muestra las condiciones experimentales aplicadas en UHPLC C18 ESI-.

Tabla 2. *Parámetros de optimización MS para la determinación de biomarcadores. Condiciones C18 ESI-*

NEGATIVE MODE				
Biomarcadores	Masa nominal	Transiciones	CE	tR
TGA	150 Da	Q 149 → 105 q 149 → 61	8 8	1,46
TTMU	142 Da	Q 141 → 97 q -	4 -	2,41
MA	152 Da	Q 151 → 107 q -	4 -	2,65
HA	179 Da	Q 178 → 134 q 178 → 77	8 20	2,89
PGA	150 Da	Q 149 → 77 q 149 → 105	4 4	3,02
2-MHA	193 Da	Q 192 → 91 q 192 → 148	12 8	3,20
3-MHA	193 Da	Q 192 → 148 (q) 192 → 91	8 16	3,70

Clot-d₃	252 Da	Q 251 → 251 q 251 → 170	0 30	3,40
4-MHA	193 Da	Q 192 → 148 q 192 → 91	8 20	3,70
SPMA	239 Da	Q 238 → 109 q 238 → 211	4 8	4,32
2-OHNaph	144 Da	Q 143 → 143 q 143 → 115	0 10	4,99
1-OHNaph	144 Da	Q 143 → 143 q 143 → 115	0 10	5,10
1-OHPy	218 Da	Q 217 → 189 q 217 → 216	40 32	6,24

Donde “Q” representa la transición m/z más abundante detectada por el sistema MS/MS que servirá como transición cuantificadora y “q” es la siguiente transición m/z más abundante, que será aquella transición cualificadora. En la columna a la derecha de las transiciones se indica la Collision Energy (eV) obtenida en columna ciega obtenida para cada transición.

El uso de las transiciones obtenidas experimentalmente queda respaldado por las transiciones bibliográficas de los biomarcadores. En la *Tabla S3* del *Anexo 4* se incluyen también las transiciones obtenidas a partir de la bibliografía en comparación a las obtenidas experimentalmente.

4.1.2 Optimización de las condiciones experimentales UHPLC

a) Columna HILIC

Al optimizar las condiciones de separación utilizando la columna HILIC, no se encontró bibliografía previa específica para los biomarcadores seleccionados como punto de partida. Por lo tanto, para la separación de los compuestos se probaron diferentes gradientes, partiendo de procedimientos ya establecidos por el grupo de investigación.

El *Gradiente 1 HILIC* proviene de un estudio propio del grupo de investigación TEM que implicaba la determinación de contaminantes derivados del humo del tabaco en pulseras de silicona, con muy buenos resultados incluso a muy bajas concentraciones.

La fase móvil está compuesta por H₂O 0,1% NH₄Ac (fase A) y por ACN 0,1% HCOOH (fase B). Se establece a un flujo constante de 0,450 mL min⁻¹, volumen de inyección de 5 µL y temperatura de la columna a 35 °C. La rampa de gradiente está indicada en la *Tabla 3*, junto al resto de gradientes evaluados.

Los resultados obtenidos revelan que las condiciones de separación empleadas en el gradiente cromatográfico no son adecuadas para los compuestos analizados en este estudio. MA, 1-OHNaph y 2-OHNaph no fueron detectados en MRM a alta concentración (1 y 10 mg L⁻¹). SPMA, PGA, TGA presentan picos muy anchos y desdoblados. Tampoco se logró la separación entre los picos de aquellos compuestos isómeros como el 2/3/4-MHA, que coelúan.

Se decidió realizar un cambio completo en el gradiente en lugar de intentar mejorar la separación cromatográfica. El nuevo gradiente, *Gradiente 2 HILIC*, procede también de

condiciones ya establecidas por el grupo de investigación, esta vez en la determinación de neurotransmisores en orina. La composición de la fase móvil, la temperatura de la columna y el flujo se mantienen en las mismas condiciones. El programa de gradiente está indicado en la *Tabla 3*. La *Fig. 6* es el resultado de la aplicación del *Gradiente 2 HILIC* a la misma muestra de 1 mg L⁻¹.

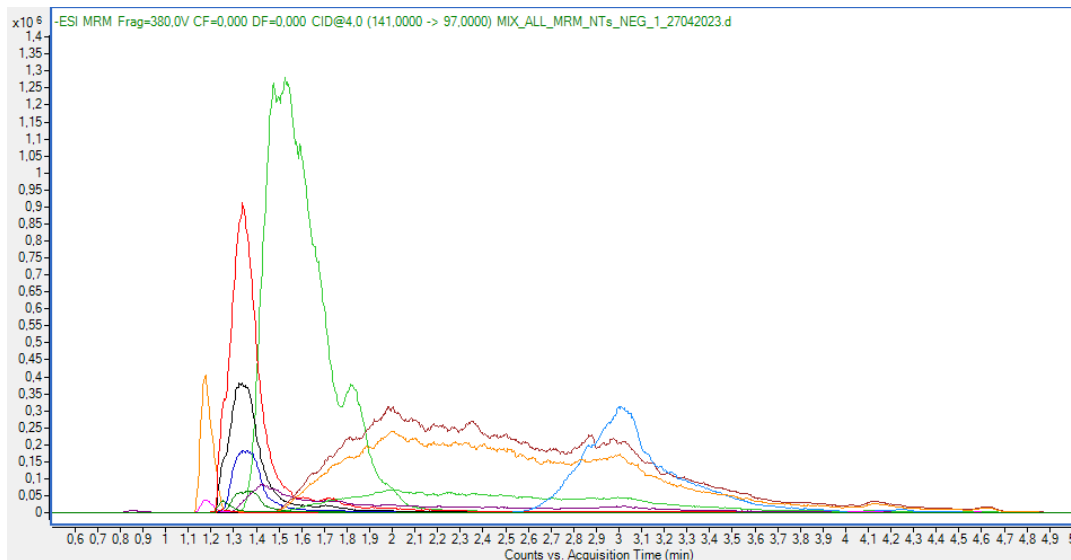


Figura 6. MRM correspondiente a las transiciones de cuantificación de los biomarcadores en el 2º gradiente

En este nuevo gradiente, los picos tienen mayor resolución y es posible identificar a todos los compuestos a 1 mg L⁻¹. Pese a ello tiene limitaciones, muchos compuestos únicamente pueden ser identificados mediante una única transición, otros coeluyen, como PGA y TGA, aunque pueden ser identificados mediante una transición de masas característica. Otra limitación es que no es posible distinguir entre isómeros, por lo que deben ser cuantificados conjuntamente, es el caso de 2/3/4-MHA y 1/2-OHNaph, tal y como se muestra en la *Fig. 7*.

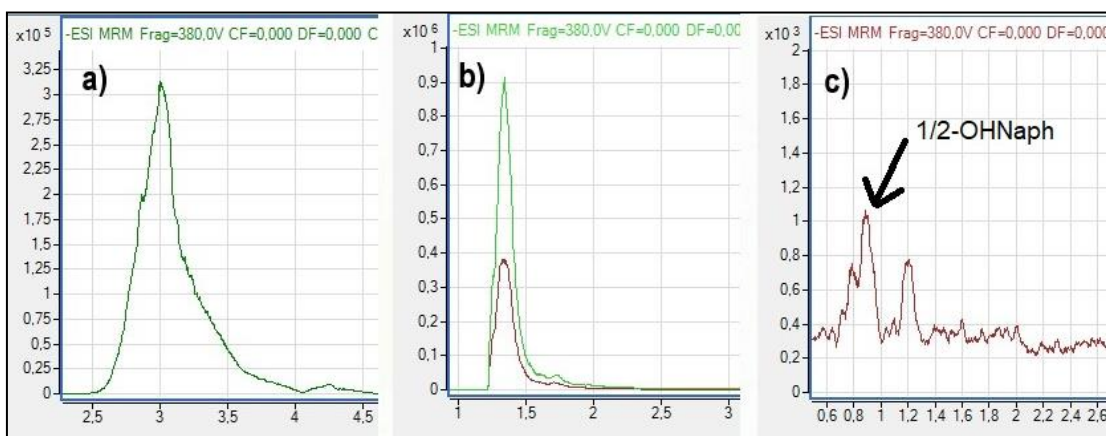


Figura 7. Limitaciones Gradiente 2 HILIC. a) Transición m/z 149 \rightarrow 77 característica de PGA que permite diferenciarlo de TGA. b) 2/3/4-MHA coeluyendo. Transición m/z 192 \rightarrow 91 en rojo, transición m/z 192 \rightarrow 148 en verde. c) 1/2-OHNaph coeluyendo.

Pese a las limitaciones, como han sido detectados todos los compuestos, se realizaron diferentes ajustes en el gradiente de elución para conseguir la separación de aquellos compuestos isómeros, estas modificaciones corresponden al *Gradiente 3 HILIC*, recogidas también en la *Tabla 3*.

En estas condiciones evaluadas la separación entre compuestos no mejoró. Las parejas de compuestos PGA y TGA, 2/3/4-MHA y 1/2-OHNaph continúan coeluyendo. La definición del resto de picos es peor respecto al *Gradiente 2 HILIC*. Se descartaron los cambios aplicados.

Tabla 3. Gradientes utilizados en el desarrollo de la separación cromatográfica. Condiciones HILIC

Tiempo (min)	Gradiente 1		Tiempo (min)	Gradiente 2		Tiempo (min)	Gradiente 3	
	Fase A	Fase B		Fase A	Fase B		Fase A	Fase B
0,00	5%	95%	0,00	0%	100%	0,00	0%	100%
1,50	5%	95%	2,00	0%	100%	2,00	0%	100%
1,55	30%	70%	6,00	50%	50%	3,00	30%	70%
2,80	30%	70%	6,20	0%	100%	6,00	50%	50%
5,00	40%	60%	9,50	0%	100%	6,20	0%	100%
5,10	5%	95%				9,50	0%	100%
10,00	5%	95%						

La *Tabla 4*. Recoge los tiempos de retención obtenidos en las condiciones finales utilizadas para la separación de los biomarcadores en HILIC, *Gradiente 2 HILIC*.

Tabla 4. Tiempos de retención de los biomarcadores en condiciones Gradiente 2 HILIC

Biomarcadores	tR (min)
1/2-OHNaph	0,87
1-OHPy	1,18
TTMU	1,32
MA	1,37
2/3/4-MHA	1,49
HA	1,51
SPMA	1,82
TGA	3,03
PGA	3,04

b) Columna C18

Para llevar a cabo la separación de los biomarcadores ambientales en fase reversa, se tomó como punto de partida el método utilizado por Covaci et al., [19], para la identificación de contaminantes emergentes en orina, al cual se le realizaron algunas modificaciones. Uno de los cambios fue la elección de la fase móvil.

En el artículo citado, se utiliza una fase móvil acuosa de H₂O con 5 mM de NH₄Ac para favorecer la ionización de los compuestos que se ionizan en forma negativa. Experimentalmente se evaluó el efecto de esta fase móvil en los biomarcadores, y se comparó la resolución y la respuesta contra H₂O con 0,1% FA.

La adición de ácidos, como el FA, puede suprimir la ionización en modo negativo, los compuestos débilmente ácidos pueden no formar [M-H]⁻ en condiciones ácidas.

Experimentalmente se ha observado que al utilizar H₂O con 5 mM de NH₄Ac la señal de 1-OHNaph, 2-OHNaph y 1-OHPy aumenta en comparación a la obtenida al utilizar H₂O con 0,1% FA. En cambio, el resto de biomarcadores ve disminuida su señal.

En la Fig. 8 se muestra el MRM correspondiente a las transiciones cuantificadoras de 1-OHNaph, 2-OHNaph y 1-OHPy. En azul se muestra la fase móvil H₂O con 5 mM de NH₄Ac, en verde H₂O con 0,1% FA.

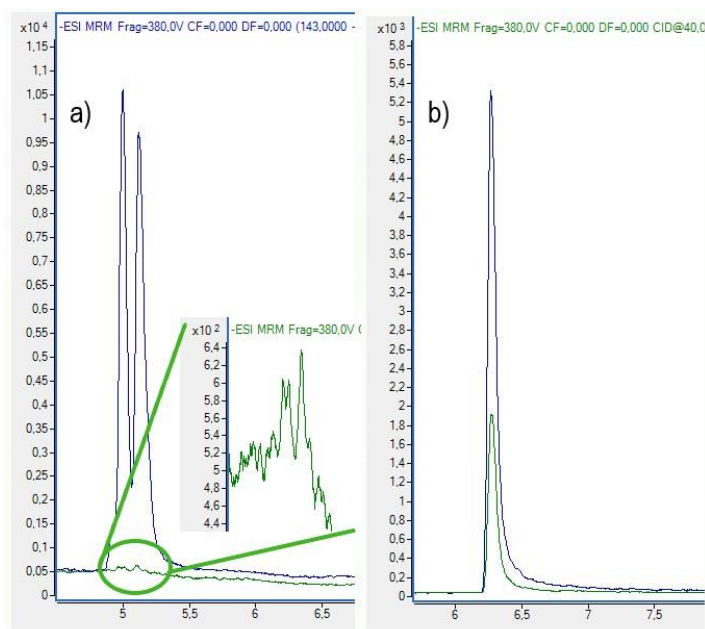


Figura 8. a) MRM transición m/z 143 → 143. El pico de izquierda corresponde a 2-OHNaph, el pico de la derecha a 1-OHNaph b) MRM transición m/z 217 → 189, corresponde a 1-OHPy.

En la Fig. 9 se muestran algunos MRM del resto de biomarcadores que ven aumentada su señal cuando en la fase móvil se ha agregado 0,1% FA. La definición del pico no varía, estando perfectamente definidos independientemente del aditivo de la fase móvil.

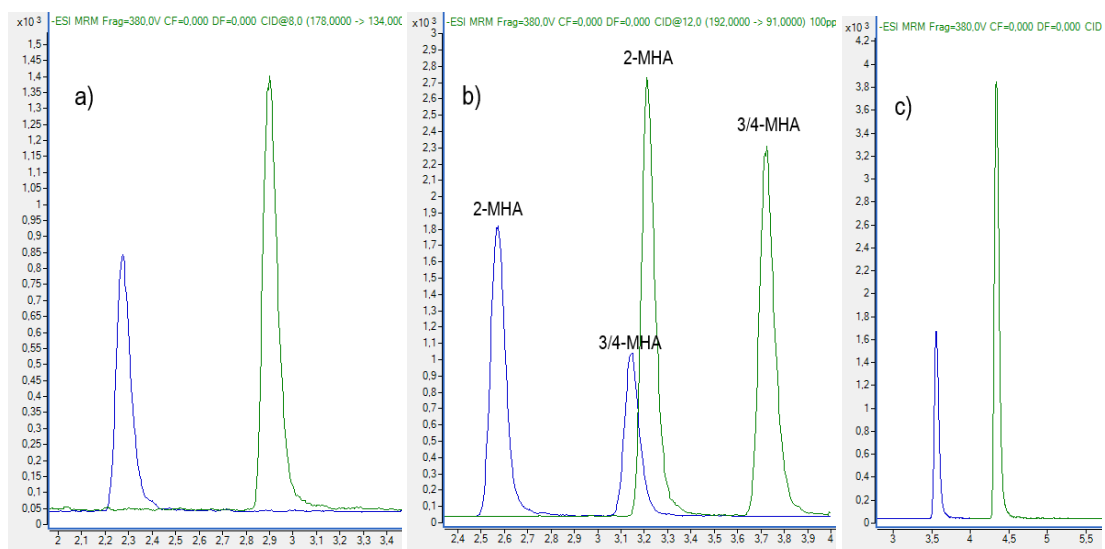


Figura 9. Comparativa entre los aditivos añadidos a la fase acuosa. a) HA b) 2-MHA y 3/4-MHA c) SPMA

Debido a que la mayoría de biomarcadores tiene un mayor factor respuesta en H₂O con 0,1% FA se decidió optar por esta fase móvil como la fase acuosa del método.

Una vez escogida la fase móvil y los aditivos se optimizó el gradiente de separación. El gradiente inicial, *Gradiente 1 C18*, fue escogido a partir de la bibliografía [19], la fase móvil se estableció a un flujo constante de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, el volumen de inyección a $5 \mu\text{L}$ y la temperatura de la columna a $35 \text{ }^\circ\text{C}$. El gradiente de separación se muestra en la *Tabla 5*.

A diferencia de lo que ocurría en condiciones HILIC, ha sido posible identificar todos los compuestos y poder separarlos. La definición de pico es buena, consiguiendo la separación entre los isómeros 2-MHA y 3/4-MHA, y entre 1-OHNaph y 2-OHNaph como se muestra en el XIC de la *Fig. 10*.

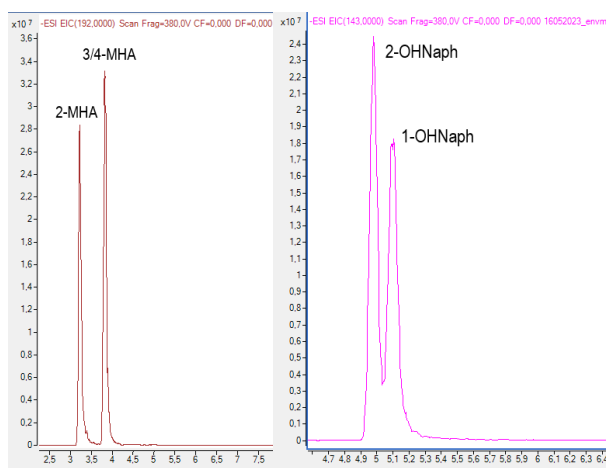


Figura 10. Separación cromatográfica de los isómeros 2-MHA de 3/4-MHA y 1-OHNaph de 2-OHNaph. Patrón 10 mg L^{-1}

Se intentó mejorar la separación los picos, *Gradiente 2 C18*. Se disminuyó la fuerza de elución de la fase móvil en los primeros minutos, reduciendo B a 1 % y manteniéndolo 3 minutos. El cromatograma representado por el XIC de las transiciones cuantificadoras de la *Fig. 11* muestra el resultado del cambio. Este resultado no es satisfactorio. El tiempo de retención aumenta en todos los compuestos debido a una disminución en la fuerza de elución de la fase móvil, lo que resulta en una mayor separación entre los picos, pero en este gradiente empeora la definición de los primeros picos, obteniendo picos desdoblados y mal definidos a alta concentración, 10 mg L^{-1} .

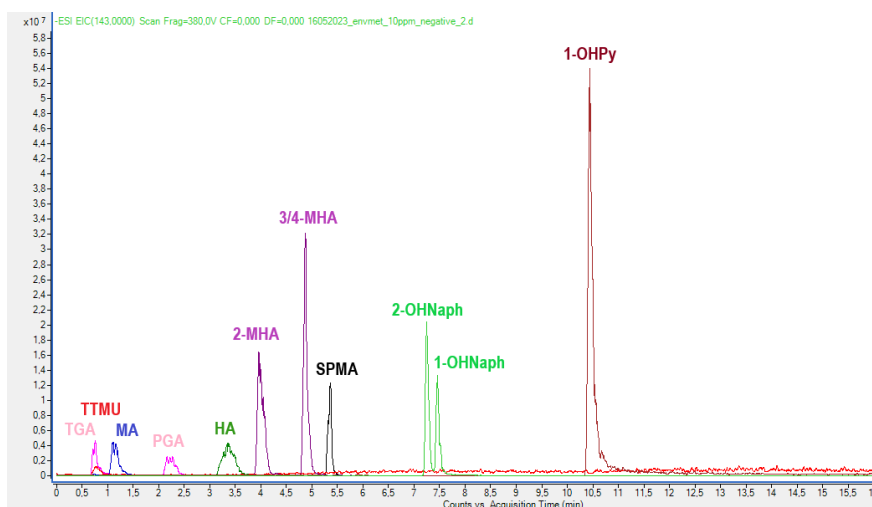


Figura 11. XIC correspondiente al *Gradiente 2 C18*. Patrón 10 mg L^{-1}

En un último intento por mejorar la optimización cromatográfica se decidió acortar el tiempo de análisis, del primer gradiente evaluado. Este nuevo cambio se denomina *Gradiente 3 C18*. El último de los compuestos objetivo (1-OHPy) eluye en el *Gradiente 1 C18* a 6,24 minutos, por lo que se decidió mantener la misma rampa hasta el minuto 5 y una vez pasado ese tiempo aumentar de forma más pronunciada el %B.

El MRM de la *Fig. 12* corresponde al cromatograma con el *Gradiente 3 C18*. Con esta rampa, se ha acortado el tiempo de análisis. Los tiempos de retención de los biomarcadores no se han visto modificados.

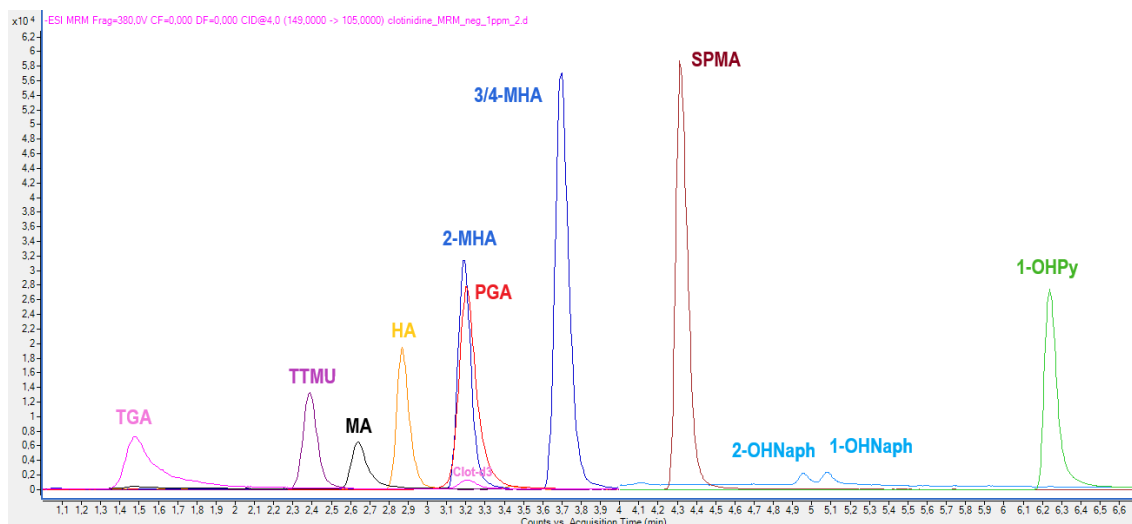


Figura 12. Cromatograma MRM del *Gradiente 3 C18*, condiciones finales. Patrón 10 mg L⁻¹

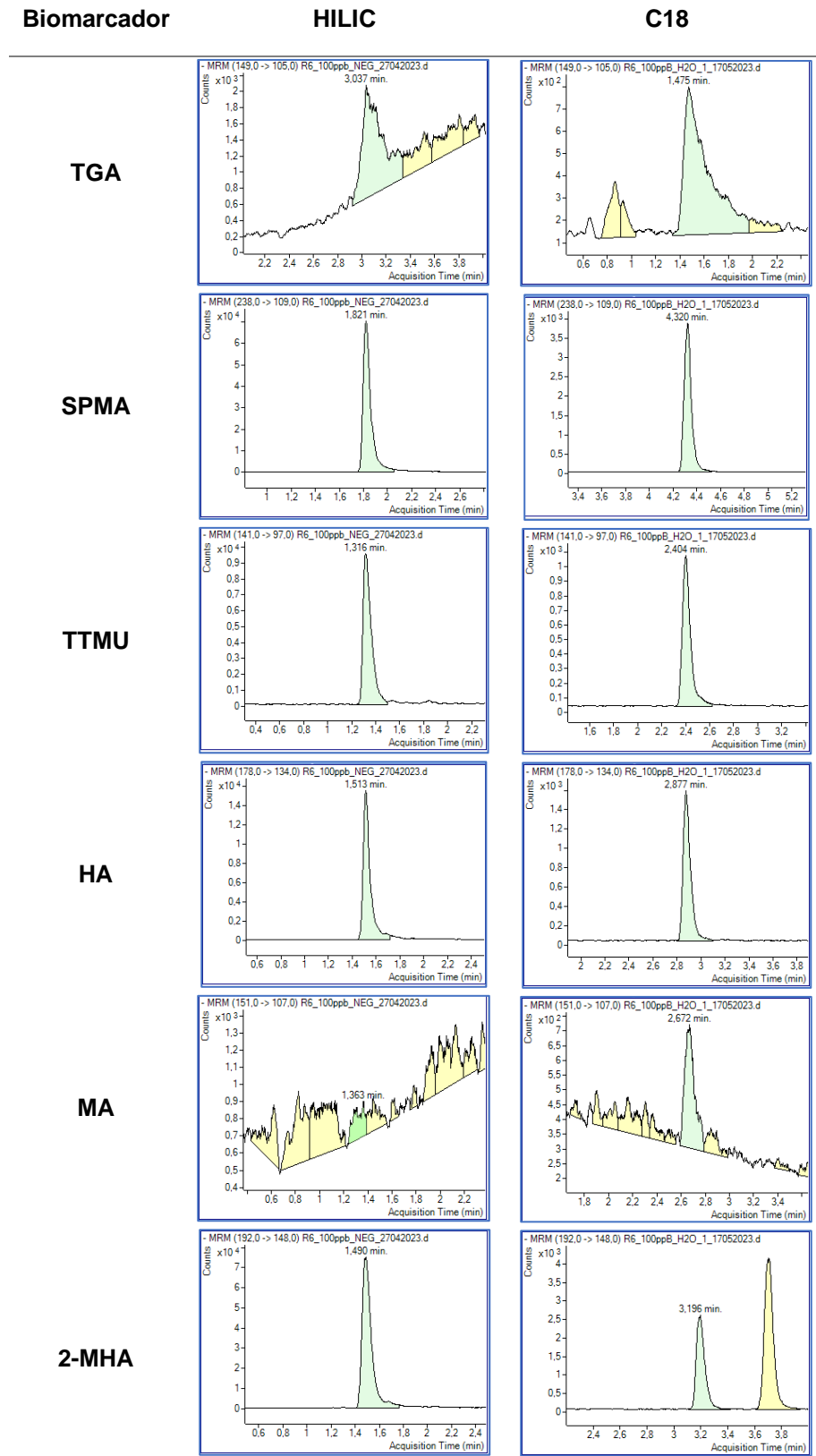
En la *Tabla 5*. se muestran los 3 gradientes evaluados en la optimización de la separación cromatográfica en C18.

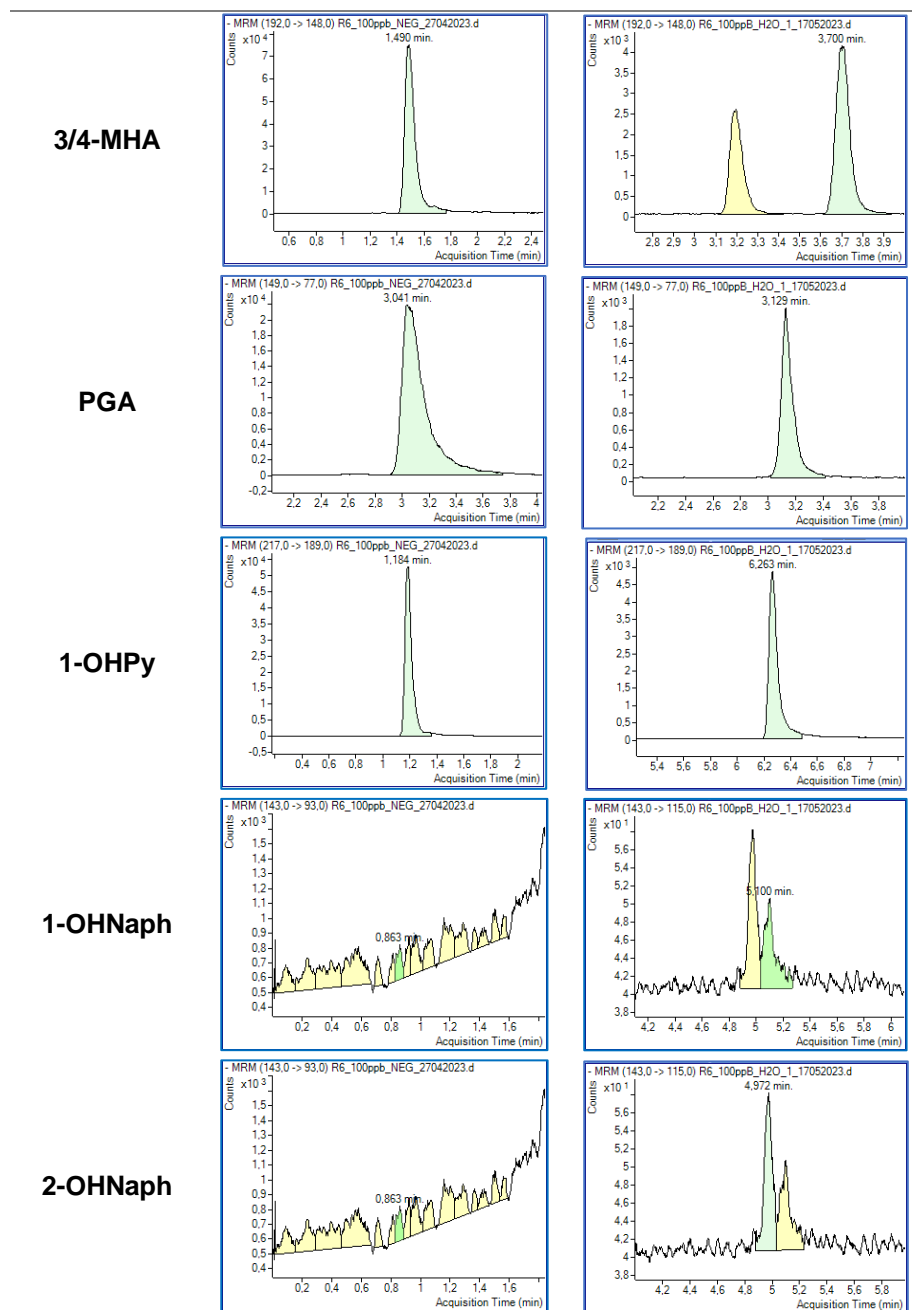
Tabla 5. Gradientes utilizados en el desarrollo de la separación cromatográfica. Condiciones C18.

Tiempo (min)	Gradiente 1		Tiempo (min)	Gradiente 2		Tiempo (min)	Gradiente 3	
	Fase A	Fase B		Fase A	Fase B		Fase A	Fase B
0,00	95%	5%	0,00	99%	1%	0,00	95%	5%
3,00	50%	50%	2,00	99%	1%	3,00	50%	50%
5,00	20%	80%	5,00	50%	50%	5,00	20%	80%
16,00	0%	100%	16,00	0%	100%	10,00	0%	100%
16,50	95%	5%	16,50	99%	1%	10,50	95%	5%
18,00	95%	5%	18,00	99%	1%	12,00	95%	5%

En la *Tabla 6*. se muestran los picos resultantes para cada uno de los compuestos en HILIC y en C18 a 100 µg L⁻¹ en el gradiente optimizado para cada modo.

Tabla 6. Cromatogramas individuales de los biomarcadores en H₂O a 100 µg L⁻¹ en HILIC y C18





El área de integración correspondiente a la señal del compuesto está marcada en color verde.

La fase escogida para la determinación de los biomarcadores fue C18. Mediante la utilización de fase reversa C18, se consiguen picos con mayor resolución, detectando todos los compuestos incluso a concentraciones bajas. Es posible la separación cromatográfica entre los biomarcadores, lo que permite la determinación por separado de 2-MHA y 3/4-MHA y 1-OHNaph de 2-OHNaph. Además, la transición de cualificación también puede ser detectada y cuantificada incluso a bajas concentraciones, manteniendo la ratio de fragmentación tanto a alta como a baja concentración. Por estos resultados experimentales C18 es escogida en vez de HILIC como fase para la determinación de biomarcadores de exposición en orina.

4.2 Condiciones de determinación de preparación de la muestra

Previo al inicio de la parte experimental relativa a la extracción de los compuestos, se realizó un estudio bibliográfico del cual se extrajeron las técnicas más habituales para la determinación de estos compuestos en orina. Tal y como se ha comentado en la introducción, la extracción líquido-líquido (LLE), Dilute & Shoot, QuEChERS, Solid-Phase Extraction (SPE) y Captiva, destacan por su amplio uso. En el caso de la extracción líquido-líquido, esta fue descartada debido a la posible formación de emulsiones, la baja cinética de extracción y el volumen y precio de los solventes. En cuanto a Dilute & Shoot, presenta las ventajas de tener una aplicación rápida y sencilla, el consumo de disolvente es relativamente bajo y se diluye la matriz. Pero, a la hora de plantear el procedimiento surgieron los primeros problemas. Si bien es cierto que al diluir la muestra de orina se diluyen los compuestos que forman la matriz, esto aumentará los límites de detección del método ya que también se diluyen los metabolitos de interés, aumentando el riesgo de perder los biomarcadores de interés que se encuentran a concentraciones muy bajas, factor que limita que la muestra no pueda diluirse en exceso. En el otro extremo, una muestra poco diluida comportaría inyectar en el cromatógrafo una muestra muy sucia, disminuyendo la vida útil del equipo, de la columna, pudiendo ocasionar la aparición de efecto memoria, etc.

Estas hipótesis planteadas a la hora de desarrollar la extracción quedan respaldadas por la bibliografía, en Plassman et al., [25], donde se analizan contaminantes atmosféricos en orina, la muestra es diluida añadiendo un 10% de MeOH al sobrenadante obtenido del proceso de centrifugación. En este caso, una gran fracción de compuestos no pudo ser detectada a ninguno de los niveles a los que doparon las muestras debido al gran efecto matriz. Otras fuentes, donde la matriz es orina, reportan también problemas en la detección de compuestos, incluso cuando han sido poco diluidos. En el artículo de Da-Hye Kim et al., [16], realizan una dilución 1:1 v/v orina:ACN, pese a haber diluido poco no llegan a detectar ni siquiera la mitad de sus compuestos objetivo, por lo que se espera que esta tendencia se agrave cuanto más diluida esté la muestra, detectando un menor número de analitos.

Ante estos motivos, se eligieron QuEChERS y CAPTIVA como las técnicas a evaluar durante el desarrollo del método.

4.2.1 Parámetros de evaluación de las técnicas de preparación

Como se ha explicado previamente en la presentación de la elección de técnicas de preparación de muestra, se evaluará la eficiencia de estas técnicas en términos de recuperación y efecto matriz. Para poder evaluar estos términos fue necesario construir rectas de calibrado en el medio adecuado. El rango de las rectas fue de 1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$. En el caso de QuEChERS, al estar los biomarcadores en ACN, se construyeron rectas de calibrado utilizando ese mismo solvente, mientras que en el caso de Captiva las rectas se construyeron en H₂O 5% MeOH, que son las condiciones iniciales de la fase móvil. El gradiente de separación utilizado para la evaluación es el *Gradiente 3 C18*.

Respecto a la recta de calibrado en H₂O 5% MeOH, en el caso de TGA, 2-OHNaph y 1-OHNaph no ha sido posible detectar los compuestos a menos de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. En el caso de MA a menos de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. El resto de los compuestos han sido detectados en el rango evaluado, con un R² superior a 0,99.

En el caso de las rectas en ACN, TGA, 2-OHNaph, 1-OHNaph y MA presentan también problemas de detección a menos de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. El resto de compuestos sí han sido detectados en el rango evaluado. El R^2 de las rectas en ACN es inferior al obtenido en las rectas de calibrado en H_2O 5% MeOH.

Los valores obtenidos de área de cada una de las inyecciones se cuantificaron introduciendo el valor de área del analito obtenido como respuesta en la ecuación de la recta correspondiente. Al disponer de 5 réplicas por cada inyección, el procedimiento se repitió por quintuplicado, se obtuvo la media de las réplicas y se cuantificó la desviación estándar relativa de los valores de concentración (%RSD).

4.2.2 QuEChERS

Antes de iniciar experimentalmente la preparación de la muestra se planificaron bibliográficamente las diferentes variables experimentales del procedimiento, detalladas en la siguiente lista:

1. Cantidad de muestra
2. Proporción muestra: solvente de extracción
3. Tipo de sales y cantidad
4. Tipo y cantidad de fase sólida dispersa

Estas variables se seleccionaron y ajustaron para asegurar una extracción eficiente y reproducible, maximizando la recuperación de los compuestos de interés y minimizando cualquier posible interferencia o contaminación durante el proceso.

Cabe recalcar que en el caso de QuEChERS los biomarcadores quedan retenidos en la fase orgánica, lo que implicará que, a la hora de realizar la cuantificación de los biomarcadores mediante rectas de calibrado, estas deban prepararse en el solvente utilizado para la preparación de muestra, que es el acetonitrilo.

Se consultó la bibliografía, específicamente el estudio de Baduel et al., [18]. En el artículo se detalla que una relación de 1:1 entre el volumen de muestra y el disolvente ACN es efectiva. Por lo tanto, respecto al primer y segundo punto de la lista de variables, se decidió utilizar 1 mL de orina en relación 1:1 v/v con el ACN.

La 3ª variable, el tipo de sales y la cantidad utilizada en la extracción, fue también un parámetro establecido por el método consultado. En el estudio de Baduel et al., [18], se utiliza un *mix* de 1,5 gramos de sales (1,2 gramos de MgSO_4 y 0,3 gramos de NaCl) por cada 3 gramos de muestra biológica animal (leche de vaca). Dado que el método que se está desarrollando utiliza 1 mL de muestra, la cantidad de sales a agregar es de 0,5 gramos. El tipo de sales son las validadas por la *European Committee for standardization (CEN)* como el método estándar EN 15662 [26].

La 4ª variable es la optimización del proceso de *clean up*, en la que se evaluaron tres tipos de variantes. En el primer grupo, las muestras no recibieron limpieza adicional, por lo que después de la extracción, se filtraron utilizando filtros de nylon de 0,22 μm y se almacenaron en viales. En el siguiente grupo, se utilizó PSA (*Primary Secondary Amine*) como sorbente, se trata de un sorbente de intercambio aniónico débil utilizado para extraer ácidos fuertes y compuestos poliacídicos de muestras acuosas. El tercer y último grupo lo conforman aquellas réplicas en las cuales el sorbente utilizado es ZSEP. El sorbente está compuesto por partículas de sílice recubiertas con una capa de dióxido

de zirconio. El material de dióxido de zirconio ha demostrado ser un buen adsorbente para ácidos carboxílicos derivados de ácidos grasos debido a las interacciones ácido-base de Lewis, como por ejemplo para la cuantificación de residuos de plaguicidas en distintos aceites vegetales [27].

Una vez escogido el tipo de sorbente, se determinó la cantidad de sorbente en 20 mg, cantidad respaldada por la literatura, Plassmann et al., [25]. En el artículo mencionado, se utilizan 125 mg de PSA por cada 5 mL de sobrenadante. En nuestro caso, el sobrenadante destinado al proceso de limpieza es de 800 μL , por lo tanto, la cantidad de sorbente requerida para mantener la proporción es 0,20 mg.

Experimentalmente, se evaluaron %R y %ME del proceso de extracción por QuEChERS sin *clean up*, con PSA y con ZSEP. Se realizaron las extracciones por quintuplicado por cada uno de los experimentos. Es decir, hay 5 réplicas destinadas a evaluar %R en PSA, otras 5 en Z-SEP y 5 más sin recibir *clean up*, y la misma cantidad para evaluar %ME (un total de 30 extracciones).

En aquellas réplicas destinadas a evaluar el %R, la adición de los biomarcadores se realizó al principio del procedimiento de preparación de muestra. En el caso de %ME se adicionaron al final de la extracción. Por otra parte, para los blancos de muestra se seleccionó una alícuota sin dopar. En todas las réplicas se añadió el *surrogate* a $50 \mu\text{g L}^{-1}$. El procedimiento se muestra de manera esquematizada en la Fig. 13.

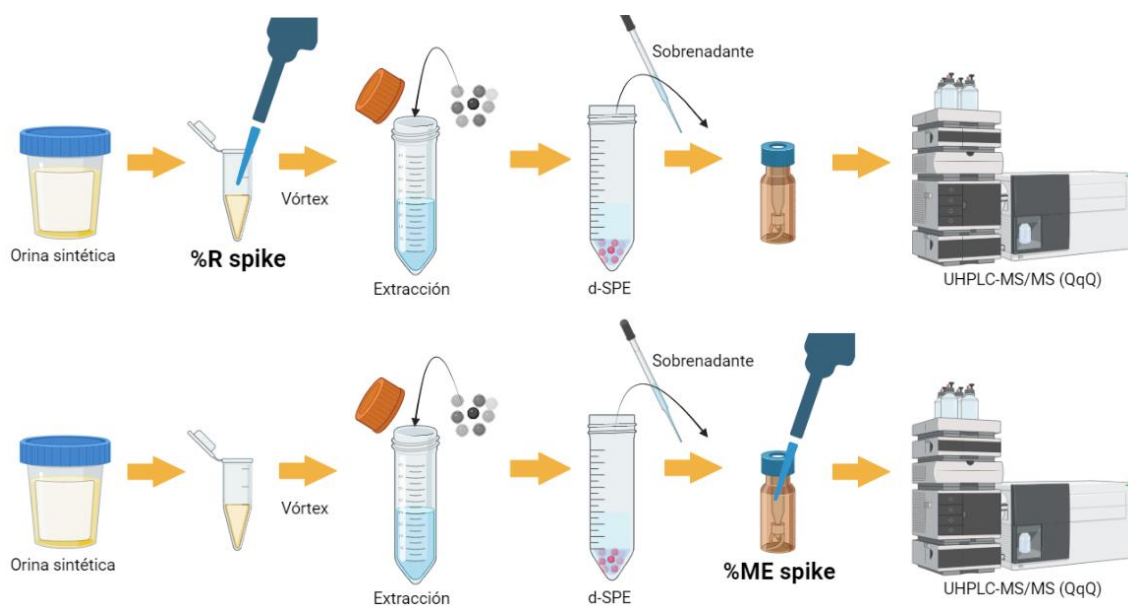


Figura 13. Procedimiento de adición de los biomarcadores a la muestra para la evaluación de %R y %ME

Los resultados obtenidos a partir de la cuantificación en la recta de calibrado se muestran en la *Tabla S4 del Anexo 6*. Las *Fig. 14* y *15* muestran de forma gráfica los valores de %R y %ME respectivamente obtenidos para cada uno de los biomarcadores.

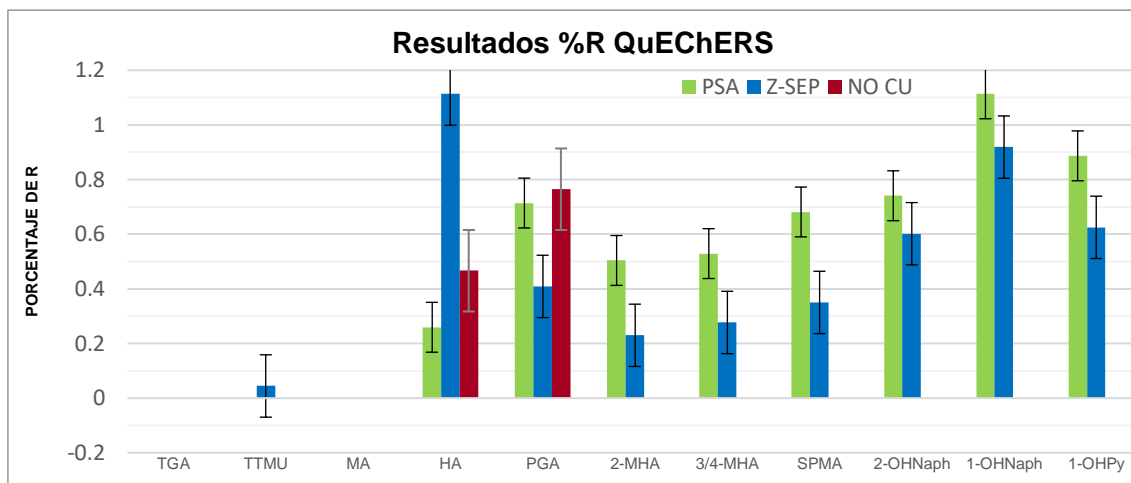


Figura 14. Resultados del procedimiento de extracción QuEChERS. Valores de %R

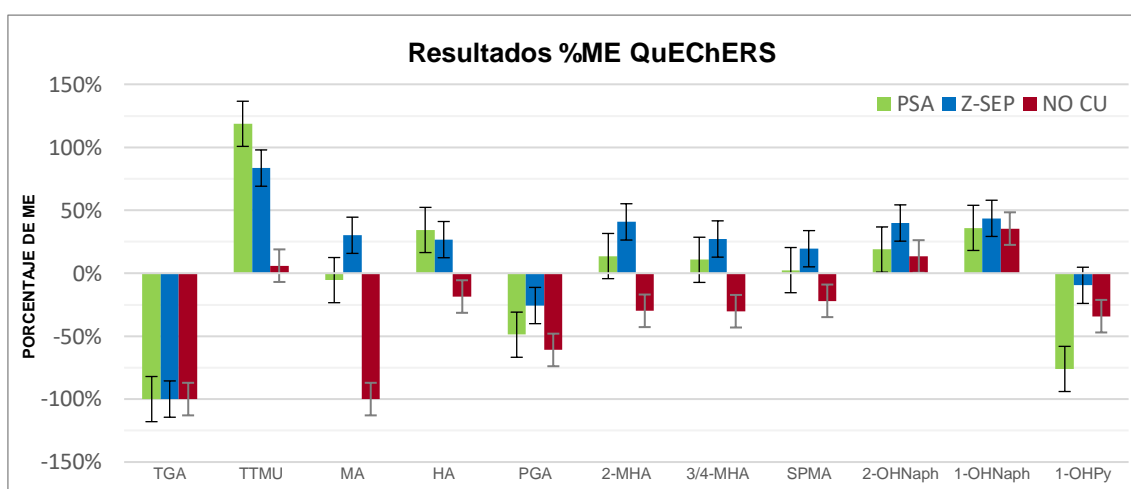


Figura 15. Resultados del procedimiento de extracción QuEChERS. Valores de %ME

Los resultados en términos de recuperación son bajos tanto en PSA, ZSEP y no realizando *clean up*. No realizar etapa de *clean up* provoca que la recuperación de 10 de los 12 metabolitos sea nula. La inclusión de d-SPE mejora drásticamente esos valores, pudiendo detectar 9 de 12. En los metabolitos detectados, el rango de recuperación se sitúa en 23-111% para ZSEP y 26-111% para PSA, aunque la mayoría de ellos no supera el 60%.

Una de las posibles causas por las que no se obtiene buena recuperación podría ser debido a la baja migración de los biomarcadores hacia la fase orgánica. Aquellos compuestos con un valor log P mayor, 2-OHNaph, 1-OHNaph y 1-OHPy, son los que muestran mejores datos. Además, compuestos como TTMU y MA, que tienen un 4 y 0% de recuperación respectivamente, pero ven aumentada su señal cuando se evalúa el efecto matriz, deben estar quedándose retenidos por el sorbente.

En cuanto al %ME, aquellas muestras que sí han recibido *clean up* muestran unos valores pequeños. Si bien es cierto que TGA y TTMU se ven muy afectadas por el ME, esto podría explicarse a partir del tiempo de elución, ya que eluyen a tiempo muy cercano al tiempo muerto, junto a los compuestos que no se han retenido en la columna, y esto provocaría supresión de la señal en el caso de TGA y aumento de señal para

TTMU. El resto de los compuestos se sitúa en -49-36% en el caso de PSA, a excepción de 1-OHPy, donde el valor de supresión es del 76% y, -26-44% en ZSEP.

En aquellas muestras que no han sido tratadas con etapa de *clean up*, el valor de efecto matriz está entre -61-35%, a excepción de TGA y MA donde es de -100%, lo que demuestra que una limpieza de la muestra ayuda a reducir el %ME en cada biomarcador.

Debido a las bajas recuperaciones generales y gran efecto matriz en algunos casos como TGA, TTMU y MA, el uso de QuEChERS en las condiciones de tratamiento propuestas no es óptimo en ninguna de las 3 variables evaluadas para la determinación de los biomarcadores.

4.2.3 CAPTIVA

Para el procedimiento de preparación de la muestra con filtros Captiva se ha adaptado el método utilizado por Caballero-Casero et al., [17], en muestras de orina, que a su vez es una adaptación del método utilizado por Baduel et al., [18], en muestras de pescados y leche.

Para evaluar la recuperación y el efecto matriz en Captiva se realizó un quintuplicado por cada una de las muestras. De manera que, hay 5 réplicas destinadas a evaluar %R y otras 5 para evaluar %ME. Dando un total de 10 extracciones.

En este caso los biomarcadores se encuentran en la fase acuosa, por lo que la cuantificación se realizó mediante rectas de calibrado usando como solvente H₂O LC-MS dopada a concentraciones conocidas.

Los resultados obtenidos a partir de la cuantificación en la recta de calibrado se muestran en la *Tabla S4* del Anexo 6. La *Fig. 16* muestra de forma gráfica los valores de %R y %ME:

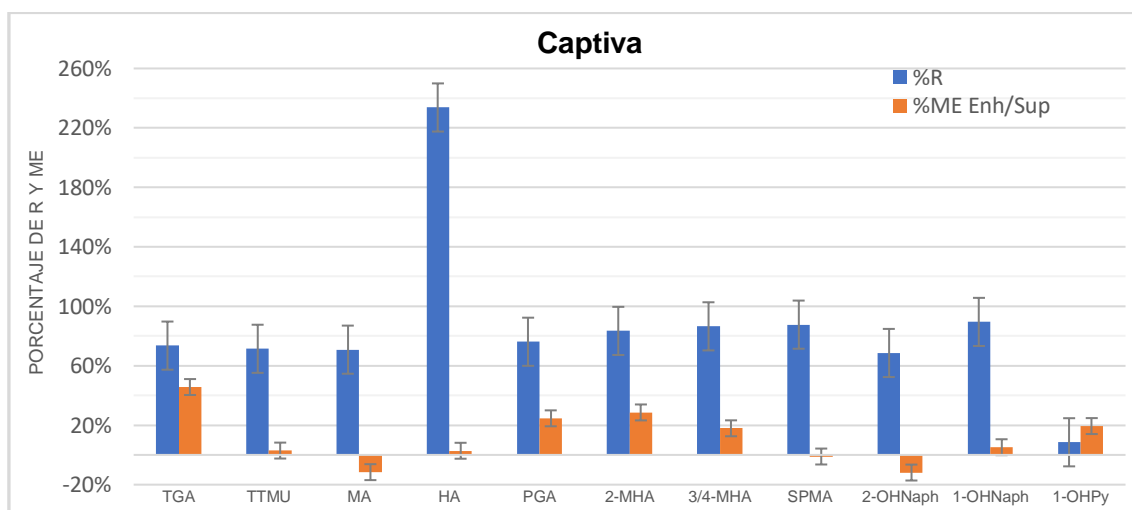


Figura 16. Gráfica con los valores de %R y %ME obtenidos para cada uno de los biomarcadores

Los resultados obtenidos mediante extracción por filtros Captiva arrojan valores muy positivos en comparación a los obtenidos mediante QuEChERS. Mediante Captiva han podido ser identificados los 12 biomarcadores, en valores de recuperación que se sitúan entre el 62-89%, excepto en el caso de HA y 1-OHPy.

En el caso de HA, el gran valor de 242% podría deberse a una interferencia. En el caso del 1-OHPy el valor de recuperación es muy bajo, 9%. Debido a que su factor respuesta es muy alto, como se ha podido ver experimentalmente, se ha decidido no modificar el proceso de preparación de muestra, ya que su cuantificación no se verá gravemente afectada en el rango de concentración establecido para la calibración.

En términos de efecto matriz, de igual forma que ocurría en QuEChERS, el compuesto más afectado es TGA, probablemente por su cercanía al tiempo muerto de la columna. El resto de los compuestos tiene un %ME situado entre -12-29%, valores bajos en lo relativo a cromatografía de líquidos.

En conclusión, los resultados respecto a la evaluación del %ME y %R son mejores en Captiva, consiguiendo además detectar todos y cada uno de los compuestos. Por estos motivos, Captiva fue seleccionada como etapa de preparación de muestra para la determinación de los biomarcadores en UHPLC-MS/MS.

4.2.4 β -Glucuronidasa/arilsulfatasa

Como se ha comentado con anterioridad, “los experimentos de rendimiento de la enzima β -Glucuronidasa/arilsulfatasa se realizaron con una mezcla de la primera orina del día de 5 niños y 5 niñas de 9 a 11 años, expuestos al humo de tabaco en el hogar, como control positivo de la presencia en orina de la mayoría de los metabolitos estudiados.”

La recta de calibrado se realizó a partir de orinas de adulto que no estaban expuestos al humo del tabaco. Se prepararon añadiendo los biomarcadores en el rango de calibrado, 1-10-50-75-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ y el surrogate a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ en todos ellos.

En cuanto a los parámetros de calidad de la recta, todos los compuestos han sido detectados en el rango de concentración evaluados, a excepción de 2-OHNaph y 1-OHNaph, debido a la falta de sensibilidad de esos compuestos. R^2 es superior a 0,98 en todos los compuestos a excepción de MA (0,9759), y 1-OHNaph (0,9569).

Los resultados obtenidos mediante la adición de la enzima en las condiciones mencionadas en muestras de orina de niños expuestos a contaminación se muestran en la Fig. 17.

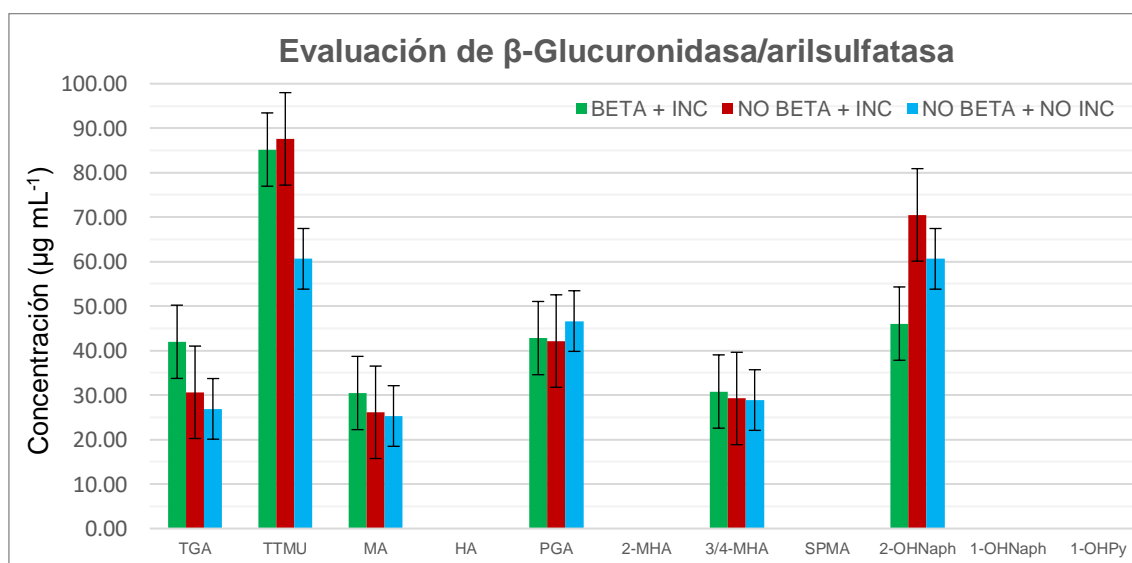


Figura 17. Cuantificación de la evaluación de la adición de β -Glucuronidasa/arilsulfatasa

En esta gráfica se puede comprobar como no existe una tendencia única respecto a la cuantificación de los biomarcadores cuando se desconjugan los enlaces glucurónidos. Los biomarcadores TGA, TTMU, MA y 3/4-MHA ven aumentada la concentración cuando se incuba o se adiciona la enzima y se incuba. Contrariamente, PGA ve disminuida la cuantificación en esos casos. En el caso de 2-OHNaph, los mejores resultados se consiguen cuando se incuba la muestra, y los peores cuando se ha adicionado la enzima.

El resto de biomarcadores han sido detectados en la muestra, pero se encuentran fuera de los límites de detección, por lo que no es posible dar un valor de concentración. SPMA, HA, 2-MHA y 1-OHPy se encuentran por debajo del límite de detección y 1-OHNaph se encuentra por encima del límite de detección.

En la *Fig. 18* se muestran los cromatogramas solapados de las transiciones de cuantificación de diferentes biomarcadores. El cromatograma en azul pertenece al grupo de muestras que no ha recibido tratamiento, en rojo cuando únicamente ha habido incubación, y el verde para aquellas donde se ha adicionado la enzima y se ha incubado.

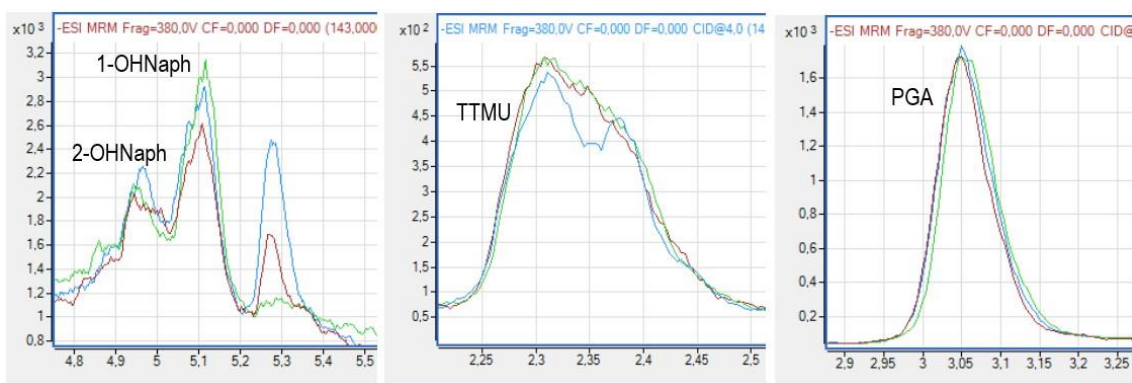


Figura 18. Evaluación de la adición de β -Glucuronidasa/arilsulfatasa

En los cromatogramas se puede ver de forma gráfica los datos mostrados en el gráfico de barras de la *Fig. 17*. La primera imagen pertenece a los biomarcadores 2-OHNaph y 1-OHNaph. En el caso de 2-OHNaph, el área es mayor cuando la muestra ha sido únicamente incubada, mientras que cuando se le ha adicionado enzima ese valor ha disminuido. 1-OHNaph se ve favorecido por la incubación y por la adición de enzima.

Ocurre lo mismo con TTMU, el proceso de incubación y el de incubación + adición de enzima favorecen a la cuantificación, dado que se está produciendo la desglucuronización de la fracción del biomarcador que se encuentra conjugada. En este caso no hay diferencias significativas entre solo incubar o incubar y agregar enzima.

En la última imagen, perteneciente a la transición de cuantificación de PGA, la señal se ve empeorada cuando se realiza la adición de la enzima y/o se incuba la muestra.

En cuanto a la forma de los picos, se mantiene igual en los 3 sets de muestras, aunque parece que en el caso del 2-OHNaph ayuda a definirlo. Debido a los resultados obtenidos, la adición ni mejora ni empeora sustancialmente la definición del pico ni la cuantificación, por lo que no ayuda a detectar aquellos compuestos como SPMA, HA, 2-MHA y 1-OHPy, que si están presentes en la muestra.

Debido a esto, se puede concluir que en el caso concreto de los biomarcadores evaluados la adición de β -Glucuronidasa/arilsulfatasa en las condiciones establecidas

no tiene un efecto significativo que respalde la adición o no de la enzima en la preparación de la muestra. Sería necesario realizar más pruebas variando el tiempo de incubación, la cantidad de enzima añadida (N.º de unidades mL⁻¹), etc.

4.3 Parámetros de calidad del método

Límites de detección instrumentales

Se investigó el rendimiento analítico del método estableciendo el rango lineal de cada compuesto, los límites de detección (LOD) y los límites de cuantificación (LOQ).

Los límites de detección instrumentales se evaluaron en H₂O al 5 % de MeOH y en ACN, debido a que el solvente utilizado para Captiva es orina al 5 % de MeOH y en QuEChERS el solvente al que migran los analitos es ACN. Se prepararon soluciones concentradas a 1-5-10-25-100-500 ng L⁻¹ y 1-5-10-25-50-100 µg L⁻¹ en H₂O 5% MeOH y 1-10-100 ng L⁻¹ y 1-10-100 µg L⁻¹ en ACN. Resultados en la *Tabla 7*.

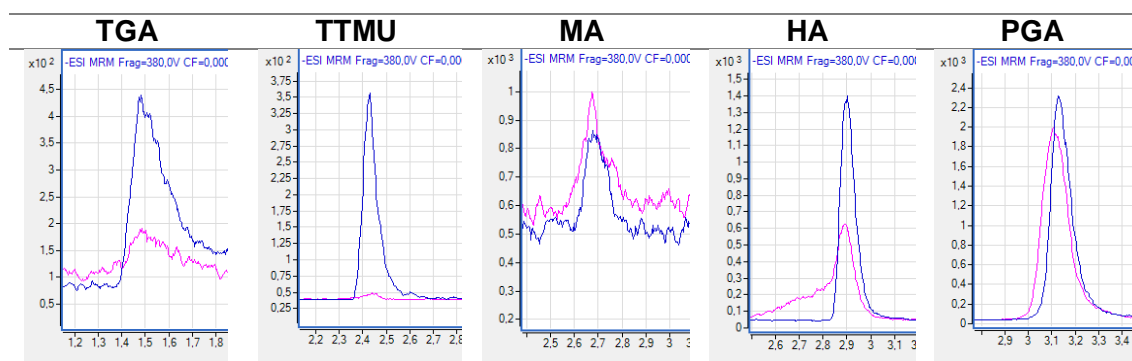
Tabla 7. Límites de detección instrumentales

Biomarcadores	LODs H ₂ O	LODs ACN
TGA	50 ng L ⁻¹	10 µg L ⁻¹
TTMU	100 ng L ⁻¹	10 µg L ⁻¹
MA	1 µg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹
HA	50 ng L ⁻¹	10 µg L ⁻¹
PGA	50 ng L ⁻¹	1 µg L ⁻¹
2-MHA	10 ng L ⁻¹	100 ng L ⁻¹
3/4-MHA	10 ng L ⁻¹	100 ng L ⁻¹
SPMA	50 ng L ⁻¹	100 ng L ⁻¹
2-OHNaph	1 µg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹
1-OHNaph	1 µg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹
1-OHPy	100 ng L ⁻¹	1 µg L ⁻¹

Evaluación del solvente del vial

Se llevó a cabo una comparación entre la inyección de los analitos en ACN y en H₂O al 5% de MeOH en fase reversa C18. El objetivo de esta comparación fue evaluar si existían diferencias significativas en la forma de los picos de los biomarcadores entre ambos solventes.

En la *Fig. 19* se muestran los resultados. En azul está representado el cromatograma de la muestra de los biomarcadores en H₂O, mientras que en rosa los biomarcadores estaban en ACN.



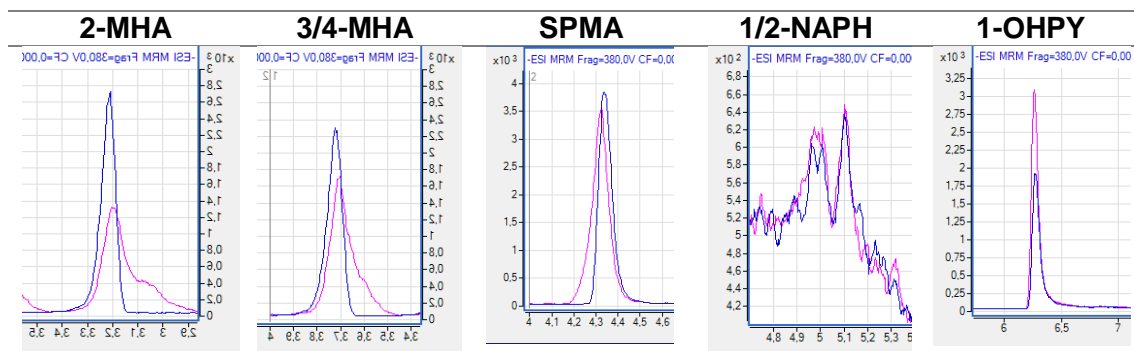


Figura 19. Variación de la forma de los picos en función del disolvente de inyección. Concentración de inyección a $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

Se encontraron diferencias significativas entre la inyección en ACN y en H_2O 5% MeOH, obteniendo una mejor definición y altura de pico cuando el solvente es el mismo que la fase móvil inicial (en el caso de C18, la fase móvil es H_2O 0.1% HCOOH (fase A) y MeOH (fase B)), a excepción de MA, 1-OHPy, 1-OHNaph y 2-OHNaph. Esto explicaría el hecho de que los límites instrumentales en ACN sean más altos, y R^2 de las rectas en ACN sea menor.

Comparabilidad entre matrices

Se realizaron rectas de calibrado en orina sintética y orina real para comparar si las rectas obtenidas en cada matriz resultaban equivalentes entre ellas, simplificando el procedimiento de calibrado o si la matriz modifica la respuesta. En la Fig.20 se muestran algunos ejemplos. El rango de linealidad se estudió entre $1\text{-}100 \mu\text{g L}^{-1}$.

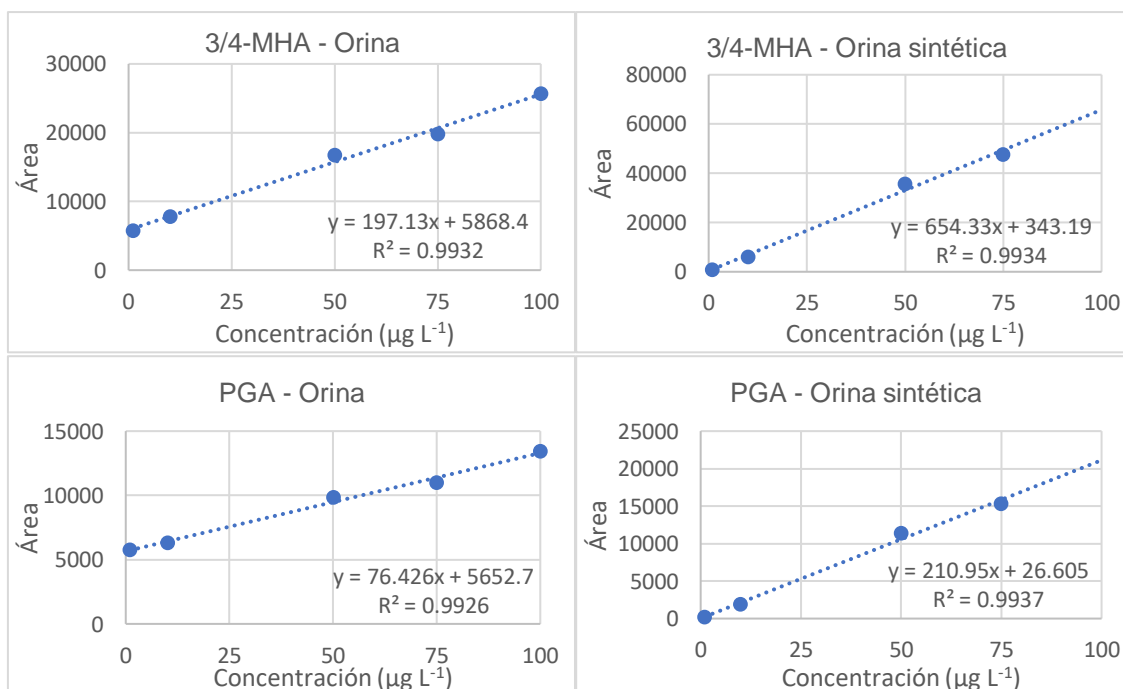


Figura 20. Comparativa de pendiente y ordenada de rectas. 3/4-MHA y TGA en orina y orina sintética

Las rectas realizadas en orina sintética y orina real no son comparables ya que no tienen una relación definida entre sí como es el caso de no tener pendientes equivalentes. Esto implica que sea necesaria la calibración mediante rectas de orina real, ya que la matriz compleja de la orina provoca mayor %ME, lo que afectará también a la recuperación final de los biomarcadores.

4.4 Perspectivas para el desarrollo futuro del método

Después de obtener resultados favorables de recuperación en la orina sintética mediante la extracción con Captiva, se probó a realizar rectas en orina real y cuantificar muestras reales. Una vez elaboradas las rectas, los resultados arrojaron que no eran comparables, teniendo las rectas de orina real unas pendientes mucho menores, indicativo de un mayor efecto matriz. Este percance llevó a redefinir el plan de trabajo.

En primer lugar, para continuar con el desarrollo del método se deberían volver a realizar de nuevo las extracciones con orina real y evaluar el efecto matriz y la recuperación de los metabolitos. Una vez obtenidos esos parámetros, sería posible cuantificar los analitos en las respectivas rectas de calibración y aplicar el %R y %ME para conocer la cantidad real de cada metabolito en muestra.

Otra alternativa posible sería implementar la técnica de "*matrix match calibration*" para la cuantificación en muestras de orina real. Al utilizar Captiva para la extracción, la muestra solo pasa a través de un filtro lo que explicaría el valor tan dispar de efecto matriz obtenido en muestras reales comparadas con orina sintética. Debido al buen resultado obtenido en términos de recuperación en todos los compuestos mediante orina sintética, se podría valorar evitar la repetición de los experimentos de optimización con orina real optando por aplicar *matrix match calibration*, que consiste en preparar una serie de estándares de calibración en la misma matriz que en la que se encuentran los analitos de interés en la muestra real. Al utilizar la misma matriz, los efectos de la matriz en la respuesta del instrumento se tienen en cuenta durante la calibración.

En segundo término, se realizaría la validación del método. Para validar el método en las condiciones reales de análisis será necesario realizar un blanco con orina para conocer la concentración de los metabolitos en muestra y posteriormente en esa misma muestra realizar la recta de calibrado en el rango de concentración esperada de los metabolitos en muestra real. En caso de que el compuesto no esté en la orina, el límite de detección (LOD) será el límite instrumental determinado de forma experimental, y el límite de cuantificación (LOQ) será el punto de concentración más baja de la recta de calibrado mediante *matrix match calibration*. Si el compuesto sí está en la orina utilizada para la validación, el LOD será la señal obtenida en el blanco más tres veces la desviación estándar obtenida en las inyecciones realizadas por triplicado, como mínimo. El LOQ sería el punto de concentración más baja de la recta de calibrado mediante *matrix match calibration*. Finalmente, se evaluaría la repetibilidad ("*intra-day*") y la reproducibilidad ("*inter-day*").

Una vez desarrollado completamente y validado, el método se aplicará a una cohorte pediátrica de un gran número de muestras, separadas en tres grupos en función de la exposición. El primer grupo lo integrarán aquellas muestras procedentes de orina de niños entre 8-10 años no expuestos a la contaminación, en el segundo grupo las de aquellos que son residentes en el Polígono Sud y en el tercer grupo los que residen en el Polígono Norte. De esta manera, se dispondrá de un gran número de muestras, un método optimizado y validado, que podría arrojar datos fiables y veraces sobre los niveles de exposición a los que se ven afectadas personas de corta edad en función de la ubicación geográfica donde residen.

5. Conclusiones

En este trabajo se ha desarrollado parcialmente un método analítico para la determinación de biomarcadores de exposición a contaminantes atmosféricos en muestras de orina utilizando HPLC-MS/MS.

Se evaluó la separación de los biomarcadores en fase normal HILIC y fase reversa C18. En ambas se partió de un método bibliográfico y se fueron realizando modificaciones hasta conseguir la optimización de la fase móvil y sus aditivos, el gradiente de separación y los parámetros de la fuente de ionización. El método ha demostrado ser rápido, sensible y selectivo para la determinación de biomarcadores. Se obtiene una separación cromatográfica en 10 minutos, con picos definidos y con gran resolución.

En cuanto a las técnicas de tratamiento de muestra, se ha desarrollado una comparativa bibliográfica Liquid-Liquid Extraction, Dilute & Shoot, QuEChERS, Solid-Phase Extraction (SPE) y Captiva, permitiendo escoger la técnica más adecuada para la determinación de los biomarcadores. Experimentalmente se planificó la preparación de muestras de orina sintética dopada con los biomarcadores mediante QuEChERS y Captiva. El método QuEChERS integró una etapa de limpieza evaluando la extracción mediante los sorbentes ZSEP y PSA. Los resultados obtenidos mostraron que Captiva tenía valores mayores de %R y menores en %ME comparados con QuEChERS en sus distintas variantes evaluadas, factor por el cual fue seleccionada como la técnica de preparación de muestra del método.

Mediante muestras de orina real se ha podido examinar el efecto de la enzima β -Glucuronidasa/arilsulfatasa en el proceso de desglucuronización y desulfatación de los biomarcadores conjugados. En las condiciones en las cuales se realizaron los experimentos, no ha podido determinarse que la adición o no de la enzima ayude en el proceso de determinación de los biomarcadores objetivo, ya que no mejora ni la definición de los picos ni la cuantificación.

Se ha comprobado experimentalmente como el solvente en el cual se encuentran los biomarcadores almacenados en el vial influye en la definición de los picos y en los límites de detección, concluyendo que cuando el medio en el que se encuentran es el mismo que las condiciones iniciales del gradiente de separación, tanto la definición como los límites mejoran.

Referencias

- [1] Industrias de El Camp de Tarragona (De Generalitat de Catalunya). (2016, 11 julio). *Medio Ambiente y Sostenibilidad*. Recuperado 27 de abril de 2023, de https://mediambient.gencat.cat/es/05_ambits_dactuacio/atmosfera/qualitat_de_laire/qa-camp-tgn/industries/
- [2] Espluga, Josep & Farré, Jordi & Gonzalo-Iglesia, Juan-Luis & López, Jan & Prades, Ana. (2014). Espluga Trenc, Josep; Farré Coma, Jordi; Gonzalo Iglesias, Jan y Prades López, Ana (2014). «Factores que inhiben la movilización social: el caso del área petroquímica de Tarragona». *Revista Española de Investigaciones Sociológicas*, 146: 191-216.
- [3] Medio ambiente | AEQT. (2023, 5 mayo). AEQT | *Associació Empresarial Química de Tarragona*. <https://www.aeqtonline.com/es/medio-ambiente/>
- [4] Generalitat de Catalunya. (2016, 11 julio). *Indústries del Camp de Tarragona. Departament de Medi Ambient i Sostenibilitat*. https://mediambient.gencat.cat/ca/05_ambits_dactuacio/atmosfera/qualitat_de_laire/qa-camp-tgn/industries/
- [5] Borrull, F., & Vallecillos, L. (2022). Informe-Observatori sobre la qualitat de l'aire al Camp de Tarragona. *Institut Cerdà*. Recuperado de: <https://www.icerda.org/observatori-aire-tarragona/es/publicaciones>
- [6] Real Decreto 102/2011, de 28 de enero, relativo a la mejora de la calidad del aire, Real Decreto n.º 102/2011 (2011, 29 de enero) (España). *Boletín Oficial del Estado*, (25). <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2011-1645>
- [7] Ley 34/2007, de 15 de noviembre, de calidad del aire y protección de la atmósfera, Ley n.º 34/2007 (2007, 16 de noviembre) (España). *Boletín Oficial del Estado*, (275). <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2007-19744>
- [8] Real Decreto 815/2013, de 18 de octubre, por el que se aprueba el Reglamento de emisiones industriales y de desarrollo de la Ley 16/2002, de 1 de julio, de prevención y control integrados de la contaminación, Real Decreto n.º 815/2013 (2013, 19 de octubre) (España). *Boletín Oficial del Estado*, (251). <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2013-10949>
- [9] DOUE-L-2008-81053 Directiva 2008/50/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de mayo de 2008, relativa a la calidad del aire ambiente y a una atmósfera más limpia en Europa. (2008, 11 de junio). *BOE.es - Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado*. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2008-81053>
- [10] Boogaard, P. J., & van Sittert, N. J. (1995). Biological Monitoring of Exposure to Benzene: A Comparison between S-Phenylmercapturic Acid, Trans, Trans-Muconic Acid, and Phenol. *Occupational and Environmental Medicine*, 52(9), 611–620. <http://www.jstor.org/stable/27730407>

- [11] Inoue, O., Seiji, K., Nakatsuka, H., Watanabe, T., Yin, S. N., Li, G. L., Cai, S. X., Jin, C., & Ikeda, M. (1989). Urinary t,t-muconic acid as an indicator of exposure to benzene. *British journal of industrial medicine*, 46(2), 122–127. <https://doi.org/10.1136/oem.46.2.122>
- [12] Yadav A, Basu A, Chakarbarti A. Method for estimation of hippuric acid as a biomarker of toluene exposure in urine by high-performance liquid chromatography after extraction with ethyl acetate. *Environ Dis* 2019; 4:17-22
- [13] Shi, CY., Chua, SC., Lee, BL. *et al.* Kinetics of styrene urinary metabolites: a study in a low-level occupational exposure setting in Singapore. *Int. Arch Occup Environ Health* 65, 319–323 (1994). <https://doi.org/10.1007/BF00405696>
- [14] Li, Z., Romanoff, L., Bartell, S., Pittman, E. N., Trinidad, D. A., McClean, M., Webster, T. F., & Sjödin, A. (2012). Excretion profiles and half-lives of ten urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites after dietary exposure. *Chemical research in toxicology*, 25(7), 1452–1461. <https://doi.org/10.1021/tx300108e>
- [15] Sarigul, N., Korkmaz, F., & Kurultak, İ. (2019). A New Artificial Urine Protocol to Better Imitate Human Urine. *Scientific reports*, 9(1), 20159. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56693-4>
- [16] Kim, D.-H., Jeong, Y., Belova, L., Roggeman, M., Fernández, S. F., Poma, G., Remy, S., Verheyen, V. J., Schoeters, G., van Nuijs, A. L. N., & Covaci, A. (2022). Comprehensive investigation of persistent and mobile chemicals and per- and polyfluoroalkyl substances in urine of Flemish adolescents using a suspect screening approach. *Environmental Pollution*, 312, 119972. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119972>
- [17] Caballero-Casero, N., Castro, G., Bastiaensen, M., Gys, C., van Larebeke, N., Schoeters, G., & Covaci, A. (2021). Identification of chemicals of emerging concern in urine of Flemish adolescents using a new suspect screening workflow for LC-QTOF-MS. *Chemosphere*, 280, 130683. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130683>
- [18] Baduel, C., Mueller, J. F., Tsai, H., & Gomez Ramos, M. J. (2015). Development of sample extraction and clean-up strategies for target and non-target analysis of environmental contaminants in biological matrices. *Journal of Chromatography A*, 1426, 33–47. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.11.040>
- [19] Roggeman, M., Belova, L., Fernández, S. F., Kim, D. H., Jeong, Y., Poma, G., Remy, S., Verheyen, V. J., Schoeters, G., van Nuijs, A. L. N., & Covaci, A. (2022). Comprehensive suspect screening for the identification of contaminants of emerging concern in urine of Flemish adolescents by liquid chromatography high-resolution mass spectrometry. *Environmental Research*, 214(March). <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114105>

- [20] Agilent Technologies. (2018/2019). Catálogo fundamental de cromatografía y espectroscopia Agilent. Productos de preparación de muestras para cromatografía, 96-105 <https://www.agilent.com/cs/library/catalogs/public/catalog-sample-preparation-5994-0114es-es-agilent.pdf>
- [21] Bernauer, U., Vieth, B., Ellrich, R., Heinrich-Hirsch, B., Jänig, G. R., & Gundert-Remy, U. (1999). CYP2E1-dependent benzene toxicity: the role of extrahepatic benzene metabolism. *Archives of toxicology*, 73(4-5), 189–196. <https://doi.org/10.1007/s002040050605>
- [22] Gut, I., Nedelcheva, V., Soucek, P., Stopka, P., & Tichavská, B. (1996). Cytochromes P450 in benzene metabolism and involvement of their metabolites and reactive oxygen species in toxicity. *Environmental health perspectives*, 104 Suppl 6(Suppl 6), 1211–1218. <https://doi.org/10.1289/ehp.961041211>
- [23] Yang, G., Ge, S., Singh, R., Basu, S., Shatzer, K., Zen, M., Liu, J., Tu, Y., Zhang, C., Wei, J., Shi, J., Zhu, L., Liu, Z., Wang, Y., Gao, S., & Hu, M. (2017). Glucuronidation: driving factors and their impact on glucuronide disposition. *Drug metabolism reviews*, 49(2), 105–138. <https://doi.org/10.1080/03602532.2017.1293682>
- [24] Kuang, H., Li, Y., Jiang, W., Wu, P., Tan, J., Zhang, H., Pang, Q., Ma, S., An, T., & Fan, R. (2019). Simultaneous determination of urinary 31 metabolites of VOCs, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, and trans-3'-hydroxycotinine by UPLC-MS/MS: ¹³C- and ¹⁵N-labeled isotoped internal standards are more effective on reduction of matrix effect. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 411(29), 7841–7855. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02202-5>
- [25] Plassmann, M. M., Brack, W., & Krauss, M. (2015). Extending analysis of environmental pollutants in human urine towards screening for suspected compounds. *Journal of chromatography. A*, 1394, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.03.040>
- [26] European Committee for standardization (CEN). (2019). Alimentos de origen vegetal. Determinación de residuos de plaguicidas utilizando GC-MS y/o LC-MS/MS seguido de extracción/división de acetonitrilo y método de purificación dispersiva SPE-QuEChERS. (UNE-EN 15662:2019)
- [27] Parrilla Vázquez, P., Hakme, E., Uclés, S., Cutillas, V., Martínez Galera, M., Mughari, A. R., & Fernández-Alba, A. R. (2016). Large multiresidue analysis of pesticides in edible vegetable oils by using efficient solid-phase extraction sorbents based on quick, easy, cheap, effective, rugged and safe methodology followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, 1463, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.08.008>

ANEXOS

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N.º 1	Glosario de términos utilizados en la Tabla 1.	42
Anexo N.º 2	Concentración normal en orina de los biomarcadores	43
Anexo N.º 3	Condiciones de ionización	43
Anexo N.º 4	Datos experimentales de la optimización cromatográfica	44
Anexo N.º 5	Transiciones experimentales Optimizer	45
Anexo N.º 6	Tablas de resultados preparación de la muestra	46

Anexo N.º 1 Glosario de términos utilizados en la Tabla 1.

- Tiempo de vida medio en orina: Período de tiempo necesario para que una determinada sustancia o compuesto sea eliminado por completo del cuerpo a través del sistema urinario.
- Clasificación IARC: Clasificación de agentes cancerígenos realizada por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés). La IARC es una agencia especializada de la Organización Mundial de la Salud (OMS) encargada de evaluar la evidencia científica sobre la capacidad de sustancias, mezclas, exposiciones ocupacionales y factores ambientales para causar cáncer en los seres humanos. Información Obtenida mediante consulta en la página web de la International Agency for Research on Cancer (IARC). <https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications/>
 - Grupo 1: Agentes carcinógenos para los seres humanos
 - Grupo 2A: Probablemente carcinógenos para los seres humanos: En esta categoría se encuentran los agentes con evidencia limitada en humanos, pero suficiente en animales para considerar que pueden causar cáncer en los seres humanos.
 - Grupo 2B: Posiblemente carcinógenos para los seres humanos: Esta categoría incluye agentes que tienen evidencia limitada en humanos y en animales de laboratorio.
 - Grupo 3: No clasificables como carcinógenos para los seres humanos
 - Grupo 4: Probablemente no carcinógenos para los seres humanos
- Inhalation Unit Risk ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)⁻¹: Estimación del aumento en el riesgo de desarrollar efectos adversos para la salud por cada microgramo de la sustancia por metro cúbico de aire inhalado. Se utiliza para evaluar la carcinogenicidad de sustancias químicas.
- Inhalation Chronic Reference Concentration (RfC) (mg/m^3). Concentración máxima a la cual se espera que una persona pueda estar expuesta durante un período prolongado (generalmente durante la vida) sin experimentar efectos adversos significativos en la salud, como daño crónico a los órganos o sistemas.
- Inhalation Subchronic Reference Concentration (RfCs) (mg/m^3). Concentración de una sustancia química en el aire que se considera segura para la exposición subcrónica a corto plazo. Durante la exposición subcrónica, el organismo puede estar expuesto repetidamente a la sustancia o factor ambiental a lo largo de ese período, generalmente a dosis bajas o moderadas. Se utiliza como guía para establecer límites de exposición ocupacional y ambiental, y para tomar decisiones de gestión del riesgo.
- Inhalation Short-term Reference Concentration (RfCt) (mg/m^3). Concentración de una sustancia química en el aire que se considera segura para la exposición a corto plazo por inhalación. Es un valor de referencia utilizado en la evaluación de riesgos y la regulación de la calidad del aire.

Los valores de Inhalation Unit Risk, RfC, Rfcs y RfCt fueron obtenidos mediante consulta de la base de datos The Risk Assessment Information System (RAIS). rais.ornl.gov

- N.D.: No disponible

Anexo N.º 2 Concentración normal en orina de los biomarcadores

Tabla S1. Niveles de concentración de los biomarcadores analizados en orina en personas no expuestas

Biomarcadores	Niveles NO Exposición ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinina)
TGA	N.D.
TTMU	0.03 +/- 0.016
MA	0.063 (0.053 - 1.746)
HA	217 (28-610)
PGA	0.019 (0.015 - 0.024)
2-MHA	7.0 +/- 1.5
3-MHA	N.D.
4-MHA	N.D.
SPMA	N.D.
2-OHNaph	0.00183
1-OHNaph	0.00117
1-OHPy	0.000115 - 0.000230

Los valores han sido obtenidos a partir de las direcciones web correspondientes a cada uno de los biomarcadores en la Human Metabolome Database (HMDB) en orina.

La normalización de las concentraciones de biomarcadores mediante la creatinina permite comparar los resultados entre diferentes muestras y diferentes individuos. Al ajustar las concentraciones de biomarcadores en función de la creatinina, se tienen en cuenta las diferencias en la ingesta de líquidos, el flujo urinario y otros factores que podrían afectar la concentración de los biomarcadores en la orina y se obtiene una medida más fiable de la exposición relativa a los contaminantes atmosféricos.

Anexo N.º 3 Condiciones de ionización

Tabla S2. Condiciones de la fuente de ionización del método cromatográfico optimizado

Parámetro	WristBands	Caballero-Casero et al., [17], ESI-	Método optimizado
Sheath Gas Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	350	400	250
Sheath Gas flow (L/min)	11	11	12
Capillary Voltage (V)	1500	4000	3000
Nozzle Voltage (V)	1500	500	500
Fragmentor (V)	380	300	380
Nebulizer (psi)	35	35	30
Drying gas flow (L/min)	15	12	12
Gas Temperature (C)	270	250	250
Adquisición QqQ			
Rango de masas (m/z)	50 - 500	-	50 - 500
Collision Energy (eV)	Según compuesto	Según compuesto	Según compuesto
Cell Accelerator Voltage (V)	5	-	5
Cycle/s	-	-	4,39
Ms/cycle	500	-	227,8

Anexo N.º 4 Datos experimentales de la optimización cromatográfica

Tabla S3. Condiciones experimentales de la optimización de los parámetros cromatográficos

Biomarcadores	tR HILIC	tR C18	Masa nominal	Transiciones Bibliográficas	CE	Transiciones Experimentales	CE
TGA	3,029	1,46	150 Da	Q 149 → 105	-10	Q 149 → 105	-8
				q 149 → 61	-10	q 149 → 61	-8
TTMU	1,316	2,41	142 Da	Q 141 → 53	-10	Q 141 → 97	-4
				q 141 → 97	-10	q -	-
MA	1,374	2,65	152 Da	Q 151 → 107	-	Q 151 → 107	-4
				q -	-	q -	-
HA	1,513	2,89	179 Da	Q 178 → 134	-10	Q 178 → 134	-8
				q 178 → 77	-16	q 178 → 77	-20
PGA	3,041	3,02	150 Da	Q 149 → 77	-10	Q 149 → 77	-4
				q 149 → 105	-10	q 149 → 105	-4
2-MHA	1,490	3,20	193 Da	Q 192 → 91	-10	Q 192 → 91	-12
				q 192 → 148	-15	q 192 → 148	-8
3-MHA	1,490	3,70	193 Da	Q 192 → 148	-10	Q 192 → 148	-8
				q 192 → 91	-15	q 192 → 91	-16
4-MHA	1,490	3,70	193 Da	Q 192 → 148	-10	Q 192 → 148	-8
				q 192 → 91	-15	q 192 → 91	-20
SPMA	1,821	4,32	239 Da	Q 238 → 109	-4	Q 238 → 109	-4
				q -	-	q 238 → 211	-8
2-OHNaph	0,848	4,99	144 Da	Q 143 → 115	-	Q 143 → 143	0
				q -	-	q 143 → 115	-8
1-OHNaph	0,848	5,10	144 Da	Q 143 → 115	-	Q 143 → 143	0
				q -	-	q 143 → 115	-8
1-OHPy	1,184	6,24	218 Da	Q 217 → 189	-	Q 217 → 189	-40
				q -	-	q 217 → 216	-32
Clot-d3	-	3,40	252 Da	Q 251 → 170	-	Q 251 → 251	0
				q 251 → 130	-	q 251 → 170	30

Q: transición cuantitativa; q: transición cualitativa

Anexo N.º 5 Transiciones experimentales *Optimizer*

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
Mandelic acid	C8H8O3	152.05	P1-B5

Method Name

D:\MassHunter\Methods\THS_scanNEG2.m

Polarity Negative **Ion Source** AJS ESI

Precursor Ion	Fragmentor
151.04	380

Product Ion	Collision Energy	Abundance
107	4	20001

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
2-MHA	C10H11NO3	193.07	P1-B6

Method Name

D:\MassHunter\Methods\THS_scanNEG2.m

Polarity Negative **Ion Source** AJS ESI

Precursor Ion	Fragmentor
192.06	380

Product Ion	Collision Energy	Abundance
91.1	12	230666
148.1	8	206432
146.2	20	4310
62.2	8	836

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
PGA	C8H6O3	150.03	P1-B9

Method Name

D:\MassHunter\Methods\THS_scanNEG2.m

Polarity Negative **Ion Source** AJS ESI

Precursor Ion	Fragmentor
149.02	380

Product Ion	Collision Energy	Abundance
77.1	4	309776
104.9	4	11878

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
1-OH-pyrene	C16H10O	218.07	P1-C1

Method Name

D:\MassHunter\Methods\THS_scanNEG2.m

Polarity Negative **Ion Source** AJS ESI

Precursor Ion	Fragmentor
217.06	380

Product Ion	Collision Energy	Abundance
189.1	40	453406
215.8	32	65396
165	44	156

Figura S1. Valores obtenidos de transición en *Optimizer* mediante condiciones “Método optimizado”

Anexo N.º 6 Tablas de resultados preparación de la muestra

Tabla S4. Resultados del procedimiento de extracción QuEChERS.

Biomarcadores	PSA		Z-SEP		NO CU	
	%R (%RSD)	%ME Enh/Sup (%RSD)	%R (%RSD)	%ME Enh/Sup (%RSD)	%R (%RSD)	%ME Enh/Sup (%RSD)
TGA	<LOD	-100% (0)	<LOD	-100% (0)	<LOD	-100% (0)
TTMU	<LOD	119% (17)	4% (12)	83% (18)	<LOD	6% (9)
MA	<LOD	-6% (16)	<LOD	30% (14)	<LOD	-100% (0)
HA	26% (5)	34% (9)	111% (40)	27% (10)	47% (7)	-19% (11)
PGA	71% (2)	-49% (4)	41% (5)	-26% (11)	76% (9)	-61% (8)
2-MHA	50% (9)	14% (10)	23% (21)	41% (18)	<LOD	-30% (11)
3/4-MHA	53% (7)	11% (12)	28% (15)	27% (17)	<LOD	-30% (15)
SPMA	68% (7)	2% (12)	35% (15)	19% (17)	<LOD	-22% (17)
2-OHNaph	74% (16)	19% (16)	60% (8)	40% (17)	<LOD	13% (21)
1-OHNaph	111% (31)	36% (15)	92% (15)	44% (40)	<LOD	35% (13)
1-OHPy	89% (1)	-76% (2)	63% (7)	-10% (11)	<LOD	-34% (15)

N = 5. <LOD: Valor inferior al límite de detección. %ME: Enh > 0 %, Sup < 0%

Tabla S5. Resultados del procedimiento de extracción Captiva.

Biomarcadores	%R (%RSD)	%ME (%RSD)
TGA	74% (8)	46% (11)
TTMU	71% (7)	3% (13)
MA	71% (7)	-12% (12)
HA	234% (16)	3% (4)
PGA	76% (4)	25% (7)
2-MHA	83% (5)	29% (6)
3/4-MHA	87% (5)	18% (6)
SPMA	88% (5)	-1% (6)
2-OHNaph	69% (10)	-12% (14)
1-OHNaph	89% (10)	5% (13)
1-OHPy	9% (13)	19% (6)

N = 5. %ME Enh > 0 %, Sup < 0%