

# ESTUDIO DEL EFECTO MATRIZ PARA LA DETERMINACIÓN DE ANALITOS CON DIFERENTE GRADO DE POLARIDAD EN MUESTRAS BIOLÓGICAS COMPLEJAS MEDIANTE LC-MS/MS

Virginia Rodríguez Robledo<sup>1,2</sup>, Manuel Alfaro-Gómez<sup>2</sup>, Noemí Villaseca-González<sup>3</sup>,

M<sup>a</sup> del Rocío Fernández-Santos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química Analítica y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Farmacia, Campus Albacete. Universidad de Castilla-La Mancha. España

<sup>2</sup>SaBio IREC (Sanidad y Biotecnología) Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad de Castilla-La Mancha- Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (CSIC-UCLM-JCCM). España

<sup>3</sup>Departamento de Ciencias Médicas, Facultad de Farmacia, Campus Albacete. Universidad de Castilla-La Mancha. España  
Virginia.RRobledo@uclm.es

## Abstract

En el desarrollo metodológico analítico, el efecto de la matriz es un parámetro de calidad a estudiar durante el proceso de validación, sobre todo cuando se utilizan muestras biológicas complejas. Para metodologías basadas en el uso de LC-MS/MS, los efectos de la matriz pueden ser un problema importante, aumentando o suprimiendo la señal debido al efecto de los compuestos co-eluyentes presentes en la muestra. Esto afecta en gran medida a la eficacia de ionización y a la sensibilidad del método.

En este artículo se presentan algunos estudios del efecto matriz para la determinación de analitos con diferente grado de polaridad en muestras biológicas complejas mediante LC-MS/MS, como el alfa-tocoferol con características lipofílicas, las s-triazinas de polaridad media-baja y el 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina y 2'-desoxiguanosina con una polaridad media-alta. Además, se proponen algunas estrategias enfocadas a minimizar dicho efecto como son, el estudio del tratamiento de muestra, el uso de patrones marcados isotópicamente, la correcta optimización de los parámetros analíticos, o el uso de la adición estándar como método de calibración, entre otras.

## 1. Introducción

El fenómeno del efecto matriz fue descrito originalmente por Kebarle y Tang [1] a principios de los años 90, quienes demostraron, en un artículo publicado en la revista *Analytical Chemistry* la dependencia de la intensidad de la señal del electrospray sobre la concentración de otros analitos en la muestra analizada. En la última década, la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) acoplada a la detección con espectrometría de masas en tándem (MS/MS) ha ganado un gran protagonismo debido a que se ha demostrado que es una técnica muy potente para la determinación cuantitativa de fármacos y seguimiento de metabolitos en muestras biológicas complejas, entre otras aplicaciones. Sin embargo, esta popularización y la

percepción común de que la utilización de LC-MS/MS garantiza una gran selectividad en los resultados obtenidos, está, en los últimos años siendo cuestionada debido a algunos ejemplos en los que se advierte de falta de selectividad debido a la supresión o potenciación de iones causada por la matriz de la muestra y las interferencias de metabolitos [2]. Pero no sólo la selectividad puede verse comprometida, sino que, durante el desarrollo del método se debe evaluar y prestar mucha atención a disminuir, en la medida de lo posible, los efectos de la matriz, ya que pueden influir drásticamente en la reproducibilidad o la linealidad del análisis [3]. En este sentido, podemos decir que la gravedad de los efectos de la matriz depende directamente del rendimiento cromatográfico debido principalmente a la complejidad de las muestras y a las características de la instrumentación usada.

Por un lado, y en el contexto del bioanálisis cuantitativo de fármacos y metabolitos presentes en muestras biológicas complejas (suero, orina, tejidos, entre otros), el efecto matriz no siempre se ha estudiado ni se ha abordado suficientemente. En la Guía para la Industria sobre Validación de Métodos Bioanalíticos de la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU (FDA) publicada en el año 2001 [4], ya se indicaba claramente la necesidad de evaluar el efecto matriz durante el desarrollo y la validación de métodos LC-MS/MS: «para garantizar que la precisión, la selectividad y la sensibilidad no se vean comprometidas». Sin embargo, no se detallaban los procedimientos experimentales necesarios para evaluar el efecto matriz. Actualmente, ya aparecen descritos los experimentos y controles a realizar para demostrar la presencia o ausencia del efecto matriz en métodos bioanalíticos que requieran de una alta fiabilidad, como por ejemplo, aquellos que se usen para realizar estudios farmacocinéticos en humanos a largo plazo [5]. Por tanto, y dado que, desde el punto de vista de las directrices normativas, la validación de métodos basados en HPLC-UV y LC-MS tiene los mismos requisitos a día de hoy, se hace indispensable la evaluación del efecto matriz y de la eficacia de la HPLC

como una información esencial para la evaluación, optimización y posterior transferencia de métodos a otros espectrómetros de masas, convirtiéndose así en una parte obligatoria de la validación rutinaria de métodos LC-MS [6]. De hecho, en relación con la complejidad de las muestras analizadas, la selección del ion precursor y de, al menos, dos iones producto (iones cuantitativos y cualitativos respectivamente), así como la correcta y exhaustiva selección, estudio y evaluación de cada uno de los pasos del tratamiento de las muestras, son de especial relevancia y deben ser valorados adecuadamente [3]. En relación con esto, otra cuestión importante a tener en cuenta son las características de la instrumentación que será utilizada para el desarrollo de nuevas metodologías. Así pues, uno de los pasos esenciales en el desarrollo de métodos LC-MS es la selección del modo MS o MS/MS, o lo que es lo mismo, la elección del uso de un instrumento de cuadrupolo simple (Q) o de triple cuadrupolo (QQQ). Por un lado, para el análisis cuantitativo de rutina en el que las muestras no tienen un alto componente de matriz, o cuando la fragmentación no es esencial para la identificación, el uso de un instrumento de cuadrupolo simple sería una muy buena opción en cuanto al bajo coste y la obtención de una mayor señal del analito en el modo SIM en comparación con el MRM (SRM), en el que la señal está limitada por la fragmentación y las eficiencias de las transiciones [6]. Sin embargo, cuando el objetivo es analizar muestras complejas como son las muestras biológicas de baja pureza, el uso de un cuadrupolo simple puede causar supresión de señal, elevado ruido de fondo y otros efectos negativos de la matriz. En esta situación, sólo es posible aumentar la relación señal/ruido manteniendo simultáneamente un alto rendimiento mediante la implementación del modo SRM.

En el supuesto de que no se tuviera disponible un equipo con un triple cuadrupolo, un enfoque alternativo para aumentar la relación señal/ruido consistiría sin lugar a duda, en mejorar la calidad de la purificación y de la separación cromatográfica. En caso de que fueran viables, algunas alternativas a tener en cuenta serían el uso de métodos HPLC bidimensionales, o incluso la purificación fuera de línea del analito (especialmente en matrices biológicas complejas), con la consecuente reducción del efecto matriz, aumentando la eficacia de la ionización y, por tanto, la sensibilidad del método [6,7]. Otra estrategia a la que prestar especial atención en relación con la optimización del método cromatográfico, además del tratamiento de la muestra para la simplificación de sus componentes, es al uso de patrones internos marcados isotópicamente o bien los análogos estructurales [8-10] en el caso de que nos aseguremos que no están presentes en la matriz estudiada. No obstante, y dada la fuerte dependencia de la disponibilidad de los estándares internos y de si son capaces o no de minimizar los efectos de la matriz, el único método preciso para una adecuada cuantificación sería usar el método de la adición estándar teniendo en cuenta los inconvenientes que dicho método implica, ya

que se requiere de mucho trabajo y tiempo para llevarlo a cabo. Otra alternativa instrumental que podría ayudar a minimizar o incluso a eliminar el efecto matriz sería el uso de un equipo de UPLC, que ofrecería mejores resoluciones y picos más estrechos (mayor eficacia), dando lugar a menores co-eluciones de los interferentes durante la ionización, permitiendo así evitar el uso del método de adición estándar para la cuantificación, lo cual simplificaría el proceso sustancialmente [3].

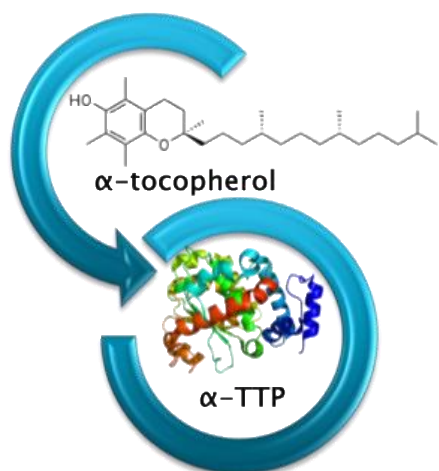
## 2. Estudios sobre el efecto matriz usando LC-MS/MS

Una vez abordada la problemática que el efecto matriz puede ocasionar en el desarrollo de nuevas metodologías analíticas instrumentales de separación acopladas con espectrometría de masas para el análisis de muestras complejas, y plantear así algunas de las estrategias más adecuadas para minimizar dicho efecto, a continuación, veremos algunos estudios realizados y los resultados de éstos. En las siguientes secciones se presentan tres estudios en los que se propone el desarrollo de una nueva metodología para la determinación de analitos con diferentes grados de polaridad en muestras biológicas complejas, usando para ello LC-MS/MS con un espectrómetro de masas con analizador QQQ.

Por tanto, en todos los casos la variable de la instrumentación se mantendría constante ya que se utiliza el mismo espectrómetro de masas. Sin embargo, en cada uno de los estudios se determinarán analitos o mezclas de compuestos con diferentes propiedades y características químicas, y serán analizados también en diferentes muestras biológicas con matrices de diferente complejidad. Se expondrán, en cada caso los resultados más destacables del proceso de validación en relación con el efecto matriz y las estrategias usadas para su minimización, en los casos en los que haya sido necesarias, dada su relevancia.

### 2.1. Determinación de alfa-tocoferol en sangre (suero y plasma) y en tejidos biológicos.

La vitamina E es una de las biomoléculas antioxidantes más estudiadas en los últimos años debido a su conocida bioactividad, así como a la complejidad química de su composición y de su metabolismo. Dicha complejidad viene dada porque está compuesta por una mezcla de dos familias de compuestos denominados tocoferoles y tocotrienoles. Cada una de estas familias presentan a su vez cuatro isómeros diferentes ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -), que se caracterizan por tener un anillo 6-cromanol metilado en diversos grados con una cadena lateral saturada C16 en posición 2, confiriéndoles a todos ellos una polaridad baja. Entre los diferentes isómeros, el alfa-tocoferol ( $\alpha$ -T) es el más conocido y estudiado, ya que es uno de los que posee una mayor actividad biológica debido a que es reconocido selectivamente por la proteína de transferencia de  $\alpha$ -T ( $\alpha$ -TTP) [11] (Figura 1).

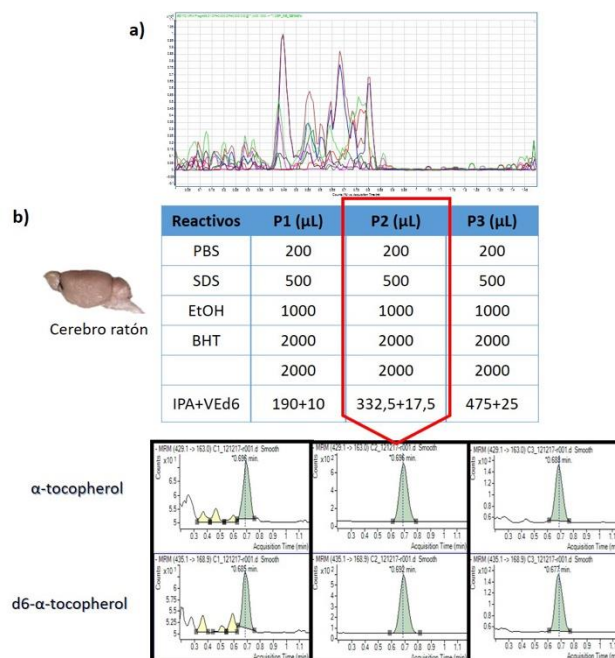


**Fig. 1.** Estructura química del  $\alpha$ -T y de la proteína  $\alpha$ -TTP.

Dado el interés que ha suscitado el  $\alpha$ -T en los últimos años, están siendo desarrollados y aplicados numerosos estudios para su cuantificación, principalmente mediante técnicas instrumentales de separación acopladas a espectrometría de masas, en diferentes tipos de muestras como son alimentarias, biológicas o de interés clínico o farmacéutico. En nuestro estudio, hemos desarrollado una metodología analítica para la determinación de  $\alpha$ -T en diferentes nanoemulsiones preparadas a partir de esta biomolécula, además de en muestras de suero y plasma sanguíneo tras su administración en ratones C57, usados como modelo animal *in vivo*. Tras la validación del método, se obtuvieron muy buenos resultados en cuanto a precisión, linealidad, límites de detección y cuantificación, e incluso efecto matriz tal y como se describe en la publicación de Villaseca-González *et al* [12]. Sin embargo, cuando el método se aplicó a tejidos biológicos tales como hígado, riñón, cerebro y pulmón de ratón, los resultados obtenidos fueron menos satisfactorios, afectando principalmente a parámetros como la linealidad y la sensibilidad. A modo de ejemplo, en la **Figura 2a**), se presenta el cromatograma obtenido para una muestra de tejido cerebral (un hemisferio) sometido al proceso completo de toma y tratamiento de muestra [12] y cuyo extracto fue dopado con 5 mg/L de  $\alpha$ -T antes del análisis mediante LC-MS/MS. Tal y como se puede ver en la figura no es posible, siguiendo el mismo procedimiento obtener una señal al tiempo de retención adecuado (0,7 min), distinguible del ruido ni para el analito ni para su patrón interno.

Con el fin de mejorar los resultados preliminares obtenidos, y dado que el método propuesto fue previamente optimizado y aplicado en muestras de suero y plasma sanguíneo, se hizo necesario continuar usando el patrón interno deuterado específico del analito a determinar ( $d_6$ - $\alpha$ -T), enfocando la estrategia de mejora en un estudio más pormenorizado de cada uno de los pasos tanto del tratamiento y pre-tratamiento de la muestra. Se partió de las condiciones iniciales de tratamiento de la muestra de plasma sanguíneo por ser una muestra más compleja que el suero, que consistían

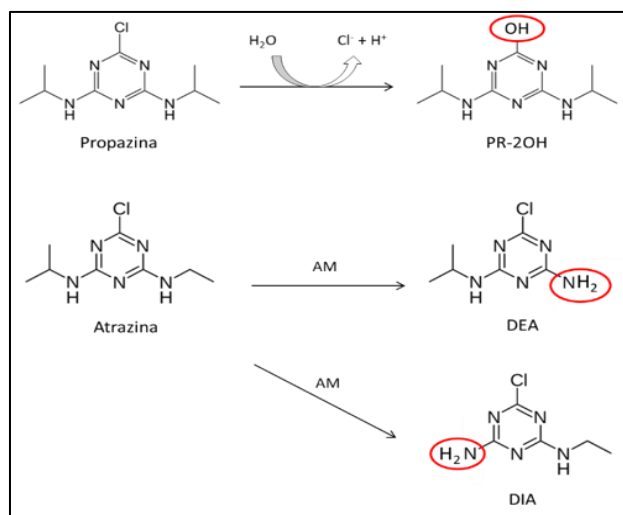
en disolver el tejido (0.2 g de tejido aproximadamente) inicialmente en 100  $\mu$ L de PBS, 250  $\mu$ L SDS (0.1 M en agua) y 500  $\mu$ L de etanol. A continuación, se realizó una extracción líquido-líquido con 1 mL BHT 0.5  $g L^{-1}$  en hexano (dos veces) para finalmente llevar los 2 mL de disolvente a sequedad con una corriente de  $N_2$  gas y reconstituir hasta un volumen de 100  $\mu$ L en isopropanol. Inicialmente se observó que los volúmenes tanto de SDS como de etanol y de BHT no eran suficientes para disolver el tejido y extraer mayoritariamente el analito en el pretratamiento y la extracción L-L, teniendo que aumentar los volúmenes al doble para todos los reactivos con respecto a las condiciones iniciales. Por otro lado, se identificó como crítico el volumen de reconstitución del extracto seco con isopropanol, obteniéndose mejores resultados cuando se utilizaba mayor volumen de disolvente para reconstituir dicho extracto [13]. Se estudiaron tres volúmenes de reconstitución partiendo de 200  $\mu$ L (prueba1, P1) que correspondía también al doble de volumen de extracto que el fijado para las muestras de plasma sanguíneo, además de 350 y 500  $\mu$ L como P2 y P3, respectivamente. Finalmente se seleccionó como volumen de extracto óptimo P2 porque nos permitió obtener señales claras e intensas de todas las transiciones tanto del analito ( $\alpha$ -T) como de su patrón interno ( $d_6$ - $\alpha$ -T), sin comprometer la sensibilidad frente a la selectividad del método (**Figura 2b**).



**Fig. 2.** a) Señal/Ruido (S/N) de una muestra de cerebro de ratón (un hemisferio) bajo las condiciones iniciales de tratamiento de muestras b) Señales de las transiciones para  $\alpha$ -T y  $d_6$ - $\alpha$ -T para el estudio sobre el efecto de la dilución en muestras de cerebro de ratón.

## 2.2. Determinación de pesticidas s-triazínicos clasificados como disruptores endocrinos en plasma seminal humano

Según la *U.S. Environmental Protection Agency* (EPA) los compuestos disruptores endocrinos (EDCs) se definen como “un agente exógeno que interfiere con la síntesis, secreción, transporte, metabolismo, unión, acción o eliminación de hormonas naturales presentes en el organismo y que son responsables de la homeostasis, reproducción y procesos de desarrollo” [14]. Estas sustancias, pueden alterar el funcionamiento normal del sistema hormonal y aumentar el riesgo de efectos adversos para la salud. Es por este motivo, que son considerados desde hace años por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una amenaza global para la salud pública [15], incrementándose significativamente el número de investigaciones científicas publicadas acerca de ellos. Dentro de la gran variedad de compuestos clasificados como disruptores endocrinos, este estudio se centra en una familia de pesticidas denominados s-triazinas, debido al amplio uso que actualmente se tienen como herbicidas, su elevada prevalencia dentro de la agricultura y su alta relación con la infertilidad masculina. Concretamente este trabajo prestó especial atención a tres productos de degradación de atrazina y propazina, ya que son considerados por la EPA como compuestos con una elevada capacidad de disruptores endocrinos. Tal y como se puede observar en la **Figura 3**, cada uno de ellos proviene de una ruta de degradación diferente.



**Fig 3.** Rutas de degradación de los metabolitos PR-2OH, DEA y DIA con la atrazina monooxigenasa (AM).

Hasta el momento, la mayoría de las publicaciones encontradas en bibliografía versaban sobre la determinación de compuestos triazínicos en muestras de agua, de alimentos o medioambientales. Sin embargo, eran muy escasos los trabajos en muestras biológicas como sangre u orina, y ninguna publicación proponía su determinación en plasma seminal, por lo que esta aplicación supone un gran reto analítico con un elevado

interés científico. Dado que el plasma seminal es una muestra biológica poco usada desde un punto de vista analítico, es necesario realizar estudios científicos de rigor que nos ayuden a ampliar nuestros conocimientos sobre dicho fluido con el fin de proponer nuevos procedimientos que nos permitan minimizar el efecto de su compleja matriz. Se seleccionaron para ello unas condiciones iniciales para el tratamiento de la muestra teniendo en cuenta varios artículos publicados previamente en los que se proponían la determinación y cuantificación de seis herbicidas mediante extracción en fase sólida (Solid Phase Extraction, SPE) en muestras de aguas naturales superficiales [16]. La cromatografía líquida es directamente aplicable tanto a s-triazinas como a sus productos de degradación, siendo la técnica más frecuentemente utilizada para su determinación. Sin embargo, al tratarse en nuestro caso de una muestra biológica con una matriz muy compleja, fue necesario realizar una etapa previa de tratamiento de muestra con el fin de minimizar el efecto matriz. Seleccionamos para ello las condiciones publicadas en varios artículos en los que trataban muestras de plasma seminal previa hidrólisis ácida [17] o enzimática [18] seguida de un proceso de SPE. Ambos tratamientos fueron estudiados con el fin de evaluar y seleccionar cuál de ellos proporcionaba extractos con menor efecto matriz. Como ya comentamos en la introducción, entre los métodos para minimizar el efecto de la matriz se encuentran el uso de estándar internos utilizando versiones del analito con isótopos estables o bien usando el método de adición estándar. Pero también es importante optimizar las etapas de la toma y preparación de la muestra para eliminar tantos compuestos interferentes como sea posible. Teniendo en cuenta esta información, se compararon la hidrólisis ácida vs enzimática seguida de un proceso de SPE. En ambas comparaciones, se evaluó tanto el proceso completo, como el proceso de SPE por separado.

- A) Hidrólisis ácida + SPE: centrifugación de 0,5 mL de plasma seminal a 16.000 g (10 min) y su posterior dilución hasta un volumen final de 2 mL con ácido fosfórico 5 % (v/v). El proceso SPE se llevó a cabo con cartuchos Bond Elut™ Plexa (30 mg, 1 mL): acondicionamiento con 1 mL de metanol y 1 mL H<sub>2</sub>O. Posteriormente se cargó la muestra (2 mL), se lavó dos veces con 300 µL de agua y finalmente se eluyó con acetonitrilo 20 % (v/v) en metanol hasta un volumen de 600 µL. El eluato se secó con N<sub>2</sub> gas y se reconstituyó con 1 mL de fase móvil. Mediante este tratamiento, los porcentajes de recuperación para los analitos no superaron el 35 % para el protocolo completo, mientras que realizando sólo el proceso de SPE, las recuperaciones obtenidas fueron: DIA 60,1 %; DEA 80,7 % y PR-2OH 90,9 %.
- B) Hidrólisis enzimática + SPE: centrifugación bajo las mismas condiciones que en el anterior caso (A). A los 0,5 mL de plasma seminal centrifugado, se añadieron 5 µL de enzima β-glucuronidasa, se mezcló mediante vortex y se incubó a 37 °C durante

12 horas. Tras la incubación, se realizó el proceso SPE con cartuchos Bond Elut™ C18 SPE (100 mg, 5 mm i.d.), acondicionados con 2,0 mL de etanol seguido de 2,0 mL de H<sub>2</sub>O. Se cargaron los 0,5 mL de muestra incubada y se lavó 3 veces con 7 mL de agua para finalmente realizar 3 eluciones consecutivas con 350 µL de acetona. El eluato se secó con N<sub>2</sub> gas y se reconstituyó con 1 mL de fase móvil. Mediante este tratamiento, se obtuvieron porcentajes de recuperación muy superiores al 100 % para los tres analitos con el protocolo completo, lo cual no se corresponde con la realidad y es una prueba del elevado efecto matriz que está presente en estas muestras. Sin embargo, con el proceso SPE por separado se obtuvieron resultados satisfactorios, entre el 89,2 y el 92,2 % de recuperación para los tres analitos.

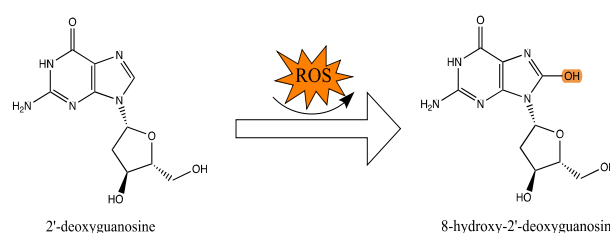
Por tanto, se podría concluir que en ambos casos se consigue optimizar el tratamiento de muestra realizando únicamente el proceso SPE, en concreto el del protocolo B es con el que se obtienen los mejores resultados, posiblemente debido a que los cartuchos Bond Elut™ C18, de menor polaridad que los Bond Elut™ Plexa, se adaptan mejor a la naturaleza de los analitos. A pesar de ello, y debido a los resultados que se obtienen, es conveniente seguir optimizando cada una de las etapas que componen el procedimiento completo con el fin de reducir ese efecto matriz generado por el tratamiento de hidrólisis enzimática para obtener mejores resultados.

### 2.3. Determinación de 8-OHdG y 2-dG en muestras de plasma seminal ovino.

El estrés oxidativo se produce en el organismo cuando hay un aumento de las especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), como el peróxido (-ROO) o el hidroxilo (-OH), que no puede ser compensado por los mecanismos de defensa antioxidantes. El nucleósido 2'-desoxiguanosina (2-dG) es el más susceptible al daño por estrés oxidativo en la molécula de DNA, ya que se oxida (**Figura 4**) dando lugar al aducto tóxico 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), lo cual afecta especialmente a los espermatozoides, que carecen del mecanismo completo para la reparación del DNA. Por este motivo, su determinación en plasma seminal presenta gran interés, ya que el mecanismo de defensa espermático es expulsar el aducto 8-OHdG al espacio extracelular.

Así pues, esta lesión ha sido ampliamente estudiada, y la determinación de la ratio 8-OHdG/2-dG ha sido establecida como uno de los biomarcadores más fiables de daño por estrés oxidativo en el DNA. Por ello, hay numerosos trabajos sobre la detección de estos compuestos en diferentes muestras biológicas, mediante diferentes técnicas [19-21]. Para hacer posible el análisis de esta muestra biológica mediante LC-MS/MS, el plasma seminal es sometido a un proceso de SPE ya que es una matriz biológica rica en azúcares,

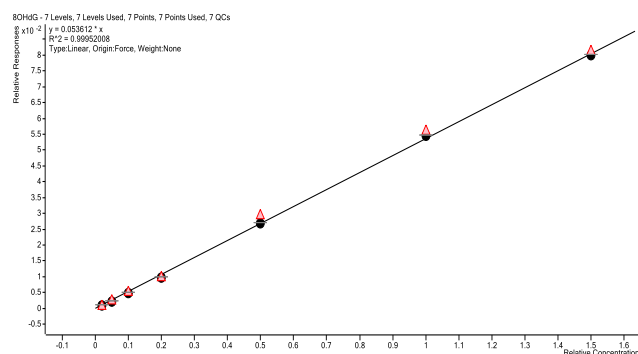
oligosacáridos, glicanos, lípidos, iones inorgánicos, pequeños metabolitos, DNA y RNA libre procedente de las células, microRNAs, péptidos y proteínas. Además a diferencia de otros medios biológicos, presenta un pH ligeramente alcalino, factor que puede afectar a la ionización de ciertos compuestos [22]. Aunque se probó un paso previo de hidrólisis enzimática siguiendo el protocolo B del apartado 2.2, este fue finalmente descartado debido a que no aportó buenos resultados, posiblemente porque los analitos se degradaban durante la incubación a 37 °C.



**Fig. 4.** Formación de 8-OHdG y 2-dG en presencia de altos niveles de ROS.

En este estudio se probaron tres tipos de cartuchos de extracción. El primer tipo, Bond Elut™ C18, mostró una muy baja capacidad de retención de los analitos de interés, posiblemente debido a su polaridad. Por ello, se propusieron los cartuchos -Diol (2-OH), de polaridad mucho mayor, que en principio se adapta mejor a las características de los analitos. Sin embargo, este cambio no aportó mejores resultados. Finalmente, se optó por unos cartuchos de polaridad intermedia, cartuchos Oasis® HLB (6.0 cc, 200 mg). Además, se introdujo un paso previo al proceso SPE que consiste en hacer una dilución 1:1 de la muestra de plasma seminal en un medio ligeramente ácido, ácido fórmico 0,1 % (v/v) en H<sub>2</sub>O, el cual, debido a la naturaleza química de los analitos, favorece que estos se encuentren en su forma neutra en lugar de ionizados, aumentando así su capacidad de retención. De esta manera, el procedimiento final para la extracción en fase sólida quedó así: (1) acondicionamiento del cartucho con 4,0 mL de acetonitrilo seguido de 4,0 mL de H<sub>2</sub>O ultrapura; (2) carga de la muestra de plasma seminal diluido; (3) lavado con 4 mL de agua para minimizar las interferencias de la matriz de plasma seminal; (5) elución de los analitos con 4.0 mL de una muestra 50:50 v/v ACN:H<sub>2</sub>O; (6) secado con corriente de N<sub>2</sub> gas hasta un volumen de 500 µL. Para evaluar la eficacia del proceso SPE, y como el efecto matriz afecta a la linealidad del proceso, se evaluaron dos muestras dopadas antes de la extracción SPE a diferentes concentraciones (250 ng mL<sup>-1</sup> y 750 ng mL<sup>-1</sup>) para cada analito. Los datos de recuperación obtenidos fueron satisfactorios, con porcentajes entre el 80 y el 106 %. Por último, también se llevó a cabo una comparación entre dos rectas de calibrado con 7 niveles entre 10 y 750 ng mL<sup>-1</sup>. En la **Figura 5**, se representan las curvas de calibración que corresponden, una con el extracto de

plasma seminal dopado con los analitos, mientras que la otra curva correspondía con disoluciones patrón de los analitos. Los resultados obtenidos fueron comparados mediante un test ANOVA de un factor, que mostró que no existían diferencias significativas entre ambas curvas.



**Fig. 5.** Comparación de las curvas de calibrado para 8-OHdG. Los puntos muestran los resultados en disoluciones patrón, mientras que los triángulos representan los resultados en muestras de plasma seminal.

### 3. Conclusiones

El artículo aborda la importancia que el estudio del efecto matriz tiene dentro del proceso de validación en un método analítico, principalmente cuando se aplica a muestras biológicas complejas utilizando LC-MS/MS. Para ello se incluyen tres estudios concretos, en los que se desarrollan y validan metodologías analíticas específicas, cada una de ellas con sus propios desafíos y soluciones. Los analitos estudiados se clasifican en lipofílicos (alfa-tocoferol), con polaridad media (pesticidas s-triazínicos) e hidrosolubles (8-OHdG y 2-dG). En todos los casos se usaron muestras biológicas complejas como, suero y plasma sanguíneo, tejidos de ratón C57 (hígado, riñón, cerebro y pulmón) o plasma seminal humano y ovino. En general, la optimización minuciosa del tratamiento de muestra y el uso de patrones internos deuterados mejoraron significativamente los resultados. Además, el presente artículo destaca la selección adecuada de la instrumentación analítica y el uso de la adición estándar como método de calibrado, como estrategias a tener en cuenta para minimizar el efecto matriz y por tanto mejorar la precisión y sensibilidad de los métodos analíticos que requieran de una alta fiabilidad, como son aquellos orientados a estudios clínicos o biofarmacéuticos.

### Agradecimientos

Queremos agradecer a las entidades financiadoras de los proyectos que nos han permitido desarrollar las diferentes investigaciones. Uno de ellos es el Proyecto Nacional PID2020-120281RB-I00 financiado por el Ministerio de Ciencia y Universidades MICIU/AEI/10.13039/501100011033 y por tanto FEDER/UE y por

los fondos de la Unión Europea Next Generation EU/PRTR. Además, queremos reconocer la ayuda de UCLM y su "Plan Propio de Investigación" (85 % cofinanciado por FEDER) en su modalidad de Proyectos de Investigación Aplicada con referencia 2022-GRIN-34227.

### Referencias

- [1] L. Tang, P. Kebarle, Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution, *Anal. Chem.* 65 (1993) 972A-986A. <https://doi.org/10.1021/ac00072a020>
- [2] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, and C.M. Chavez-Eng, Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019-3030. <https://doi.org/10.1021/ac020361s>
- [3] J.C. Van De Steene and W.E. Lambert., Comparison of Matrix Effects in HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS Analysis of Nine Basic Pharmaceuticals in Surface Waters, *J Am Soc Mass Spectrom* 19 (2008) 713-718. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2008.01.013>
- [4] Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Guidance for Industry on Bioanalytical Method Validation. *Fed. Regist.* 66 (100) (2001) 28526 (Docket No. 98D-1195).
- [5] Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. *Biopharmaceutics.* May 2018.
- [6] E. Rogatsky and D. Stein., Evaluation of Matrix Effect and Chromatography Efficiency: New Parameters for Validation of Method Development *J Am Soc Mass Spectrom* 16 (2005) 1757-1759. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2005.07.012>
- [7] I. Taverniers, M. De Loose, E. Van Bockstaele, Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends Anal. Chem.* 23(8) (2004) 535-552. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.04.001>
- [8] P.J. Taylor, Matrix Effects: The Achilles Heel of Quantitative High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray-Tandem Mass Spectrometry. *Clin. Biochem.* 38 (2005) 328-334. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2004.11.007>
- [9] M. Petrovic, M.D. Hernando, M.S. Diaz-Cruz, D. Barcelo, Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for the Analysis of Pharmaceutical Residues in Environmental Samples: A Review. *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.10.110>
- [10] B.K. Matuszewski, Standard Line Slopes as a measure of a Relative Matrix Effect in Quantitative HPLC-MS Bioanalysis. *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 830 (2006) 293-300. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.11.009>
- [11] R.R. Eitenmiller, J. Lee, Vitamin E, Food Chemistry, Composition and Analysis. Marcel Dekker Inc., (2004) New York. <https://doi.org/10.1201/9780203970140>

- [12] N. Villaseca-Gonzalez, et col., Ultrafast determination of vitamin E using LC-ESI-MS/MS for preclinical development of new nutraceutical formulations; *Bioanalysis* 10 (4) (2018) 215-227 <https://doi.org/10.4155/bio-2017-0095>
- [13] P. Yang, et col. Effect of sample dilution on matrix effects in pesticide analysis of several matrices by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63 (21) (2015) 5169-77 <https://doi.org/10.1021/jf505168v>
- [14] (EPA), U. S. E. P. A. "What is Endocrine Disruption?"
- [15] Bergman, A., et al. (2015). "Manufacturing doubt about endocrine disrupter science--A rebuttal of industry-sponsored critical comments on the UNEP/WHO report "State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012"." *Regul Toxicol Pharmacol* 73(3): 1007-1017. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.07.026>
- [16] Rodriguez-Gonzalez, N., Uzal-Varela, R., Gonzalez-Castro, M. J., Muniategui-Lorenzo, S., & Beceiro-Gonzalez, E. (2017). Reliable methods for determination of triazine herbicides and their degradation products in seawater and marine sediments using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environ Sci Pollut Res Int*, 24(8), 7764-7775. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8389-7>
- [17] Lam, P. M., et al. (2012). "Rapid measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in human biological matrices using ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Free Radic Biol Med* 52(10): 2057-2063. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.004>
- [18] Leon, Z., et al. (2010). "Solid-phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry analytical method for the determination of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone and its metabolites in both human urine and semen." *Anal Bioanal Chem* 398(2): 831-843. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3947-6>
- [19] Torres-Cuevas I, Aupi M, Asensi MA, Vento M, Ortega Á, Escobar J. 7,8-hydroxy-2'-deoxyguanosine/2'-deoxiguanosine ratio determined in hydrolysates of brain DNA by ultrachromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta* 2017;170:97-102. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.03.072>
- [20] Bláhová L, Janoš T, Mustieles V, Rodríguez-Carrillo A, Fernández MF, Bláha L. Rapid extraction and analysis of oxidative stress and DNA damage biomarker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in urine: Application to a study with pregnant women. *Int J Hyg Environ Health* 2023;250:114175. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2023.114175>
- [21] Wang C-J, Yang N-H, Chang C-C, Liou S-H, Lee H-L. Rapid and simple one-step membrane extraction for the determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human plasma by a combination of on-line solid phase extraction and LC-MS/MS. *J Chromatogr B* 2011;879:3538-43. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.09.038>
- [22] Samanta L, Parida R, Dias TR, Agarwal A. The enigmatic seminal plasma: a proteomics insight from ejaculation to fertilization. *Reprod Biol Endocrinol RBE* 2018;16:41. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0358-6>