

## Microextracción dispersiva líquido-líquido para la determinación de glioxal y metilglioxal en orina humana mediante cromatografía líquida y detección fluorescente

J. Marín<sup>1</sup>, N. Campillo, P. Viñas, M. Hernández-Córdoba

<sup>1</sup> Javier Marín García, Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Murcia, CP 30100 Murcia, España, e-mail: jmg78@um.es

Los niveles altos de azúcar en sangre generalmente van asociados a procesos de glicación con formación de los llamados productos finales de glicación avanzada (AGEs), que aparecen como resultado de reacciones de los grupos amino de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos con azúcares reductores. Los  $\alpha$ -oxoaldehídos, tales como glioxal (Gly) y metilglioxal (MGly), están involucrados en los procesos de glicación no enzimática de las proteínas. Estos compuestos  $\alpha$ -dicarbonílicos son más reactivos que los azúcares de los que proceden, promoviendo la reacción con proteínas que conducen a la formación de AGEs [1]. Tanto los  $\alpha$ -oxoaldehídos como los AGEs han sido relacionados con complicaciones diabéticas, ineficiencia en los mecanismos de eliminación y otros desórdenes relacionados con la edad como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer o el Parkinson [2,3].

Los compuestos  $\alpha$ -dicarbonílicos más simples, Gly y MGly, son considerados glicotoxinas [4]. Debido a que la incidencia de diabetes está aumentando en la población mundial, principalmente en los países desarrollados [5], resulta de gran interés la disponibilidad de métodos analíticos, sensibles y selectivos, para la monitorización de Gly y MGly.

La evaluación de biomarcadores para el control clínico rutinario de pacientes generalmente se lleva a cabo en orina, ya que esta muestra puede recogerse fácilmente y, si se compara con otras muestras biológicas, presenta una matriz más simple. Además, se ha demostrado que el análisis de orina recogida por la mañana proporciona resultados muy fiables en el control de pacientes [6]. Es por ello que en la literatura se muestran diferentes métodos para la determinación de Gly y MGly en orina, siendo la cromatografía líquida (LC) la técnica más usada, aunque también se han propuesto algunos métodos basados en cromatografía de gases (GC) [7,8].

Se han acoplado diversos detectores a LC usando diferentes agentes derivatizantes, por ejemplo, para lograr el adecuado cromóforo, fluoróforo o derivado para su determinación mediante espectrometría de masas (MS). Así, Gly y MGly se han determinado en orina mediante LC acoplada a un detector de fluorescencia (FLD) utilizando diferentes agentes derivatizantes como: 2,3-diaminonaftaleno (DAN) [9], 5,6-diamino-2,4-hidroxipirimidina (DDP) [10,11], 6-hidroxi-2,4,5-triaminopirimidina (TRI) [1,12] y 4-metoxi-o-fenilendiamina (4MPD) [13]. Además, MGly se ha determinado en orina mediante LC y detección ultravioleta utilizando 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) como reactivo derivatizante.

Gly y MGly también han sido objeto de estudio en otras muestras biológicas como tejidos, células, plasma y sangre, mediante LC, transformándolos previamente en sus correspondientes derivados de la quinoxalina por reacción de 1,2-diamino-4,5-dimetoxibenceno (DDB) [15,16], 1,2-diaminobenceno [4,17,18] y DAN [19-22].

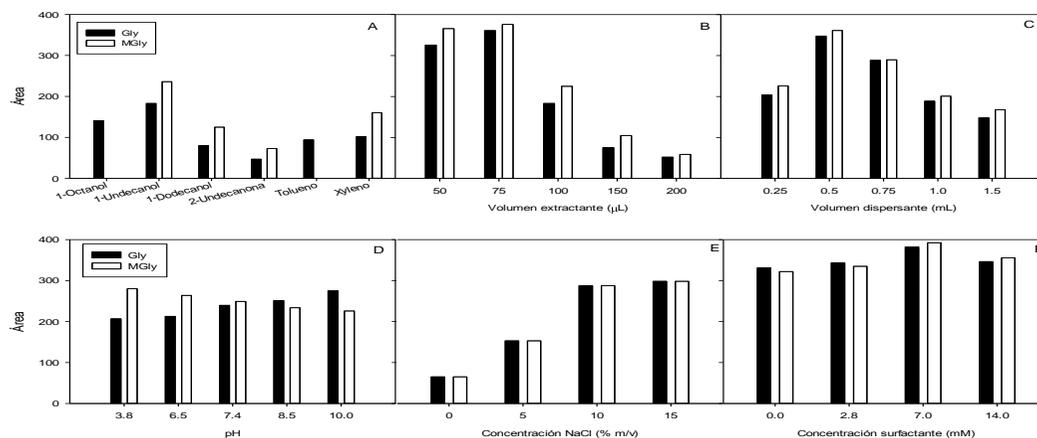
La complejidad de las muestras biológicas obliga a incluir diferentes etapas en el tratamiento de las muestras con el fin de simplificar la matriz y obtener extractos enriquecidos con los analitos. La etapa de preparación de muestra resulta de gran importancia dentro del proceso analítico global. A menudo, es necesario extraer los compuestos bajo análisis en un medio que sea compatible con la instrumentación a emplear, y además, puede ser necesario preconcentrarlos de modo que se incremente la sensibilidad de la técnica analítica. La extracción selectiva de los analitos se basa en las diferencias entre sus propiedades físicas y químicas (peso molecular, carga, solubilidad en agua, polaridad o diferencias de volatilidad).

En este sentido, para la determinación de Gly y MGly en orina, se han utilizado tanto extracción líquido-líquido (LLE) [14] como extracción en fase sólida (SPE) [1]. Estas técnicas de extracción tradicionales no cumplen los principios de la química analítica verde (QAV), ya que consumen mucho tiempo y requieren grandes cantidades de reactivos, que suelen ser caros, generan muchos residuos y la muestra puede sufrir contaminación. Aunque la bibliografía muestra algunas aplicaciones de LLE empleando volúmenes de disolventes orgánicos bajos [8,9], estos procedimientos no llegan a ser considerados como técnicas de microextracción.

Las técnicas de extracción y preconcentración miniaturizadas han impulsado enormemente las etapas de preparación de muestra atendiendo a los principios de la QAV, consiguiendo extracciones muy eficientes y usando cantidades muy bajas de disolventes orgánicos. En este sentido, la extracción por adsorción mediante barras agitadoras (SBSE) ha sido aplicada para la cuantificación de Gly y MGly en muestras de orina [9]. Las técnicas de microextracción en fase líquida (LPME) generalmente resultan interesantes alternativas al presentar menor coste en su aplicación, buena robustez y sobre todo menor tiempo para alcanzar el equilibrio de extracción.

Entre los diferentes tipos de técnicas de LPME, destaca la microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) por la simplicidad en su aplicación y los excelentes factores de preconcentración alcanzados para diferentes analitos y desde distintas matrices de muestra. DLLME fue descrita por primera vez por Rezaee y Berijani en 2006, y consiste en la generación de microunidades de volumen de fase aceptora en el seno de la fase dadora, a fin de aumentar la superficie de contacto entre ambas fases y con ello reducir el tiempo de transferencia. En esta técnica, se inyecta una mezcla de un disolvente extractante (inmiscible en la fase dadora) y un disolvente dispersante (miscible en las fases dadora y aceptora) en una muestra acuosa. Al quedarse desprovisto el disolvente extractante del agente dispersante por su solubilidad en la fase dadora, se provoca la formación de microgotas de fase aceptora inmiscibles con la dadora. Esto permite una transferencia de fases muy rápida ya que la superficie de contacto es infinitamente superior a aquellos casos en donde la fase aceptora se encuentra confinada, por lo que se consigue la extracción casi instantáneamente [23,24].

En este estudio se utiliza DLLME para preconcentrar Gly y MGly en orina humana, una vez sometidos los analitos a una etapa previa de derivatización con DAN para convertirlos en especies fluorescentes, para su análisis mediante LC-FLD. Se estudiaron los diversos factores que afectan a la eficiencia de extracción mediante DLLME: naturaleza de los agentes extractante y dispersante, sus volúmenes, pH y fuerza iónica de la fase dadora y concentración de agente surfactante. La Figura 1 muestra los resultados obtenidos, que condujeron a la selección de las condiciones indicadas en la Tabla 1.



**Fig. 1.** Influencia de: (A) naturaleza del disolvente extractante, (B) volumen de 1-undecanol, (C) volumen de etanol, (D) pH, (E) concentración salina y (F) concentración de Triton X-114

<b>Tabla 1.</b> Condiciones seleccionadas para DLLME	
Agente extractante	1-Undecanol, 75 µL
Agente dispersante	Etanol, 500 µL
pH	10
Concentración NaCl, % m/v	10
Concentración surfactante, mM	0,07

Para la separación de los compuestos derivatizados por LC se empleó como fase móvil una mezcla metanol:agua en modo gradiente, con una velocidad de flujo de 1 mL/min. En el programa de elución, se mantuvo la proporción 65:35 durante 9,5 minutos, pasando a 80:20 en 1 min, proporción mantenida durante 3,5 min, para seguidamente recuperar las condiciones iniciales en 1 min. Como fase estacionaria, se empleó una columna C-18 ODS de dimensiones 15 cm x 4,6 mm; 5 µm d.i. Las longitudes de onda seleccionadas en el detector fueron 267 y 503 nm para la excitación y emisión, respectivamente.

La derivatización se llevó a cabo por adición de 50 µL de DAN (0,5 % m/v, preparado en dimetilsulfóxido), a 10 mL de disolución acuosa o 2,5 mL de muestra, conteniendo 3,4-hexanodiona como estándar interno, siendo las mezclas incubadas durante 24 h a 4 °C y en la oscuridad.

Las muestras de orina fueron homogeneizadas por inmersión directa de una sonda de ultrasonidos durante 1 min, a 50% de amplitud y 0,5 ciclos/s antes de proceder a la etapa de derivatización; tras la que se diluían a un volumen de 10 mL con agua conteniendo NaCl 10% m/v y Triton X-114 0,07 M, para proceder al ajuste del pH hasta 10 por adición de 0,5 mL de disolución reguladora Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M. Seguidamente, se inyectaba de forma vigorosa la mezcla conteniendo 75 µL de 1-undecanol y 500 µL de etanol, a los 10 mL de la muestra. Una vez agitada la mezcla durante unos segundos, se sometía a centrifugación durante 3 min a 3000 rpm, recuperando la fase extractante en la parte superior de la mezcla, e inyectándose 20 µL en el sistema LC-FLD. Bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas los derivados de Gly, MGly y 3,4 hexanodiona fueron eluidos con tiempos de retención de 6,74; 9,07 y 13,32 min, respectivamente.

La representación de la relación entre área obtenida para Gly y MGly, a seis niveles de concentración comprendidos entre 0,1 y 25 ng/mL, y la del estándar interno, frente a la

concentración del analito, mostró un excelente grado de linealidad dentro del intervalo de concentración estudiado. Los límites de detección calculados según el criterio de relación señal/ruido igual a 3, fueron 13 y 43 ng/L para Gly y MGly, respectivamente. La exactitud del método se estudió a través de estudios de recuperación sobre muestras de orina previamente fortificadas, encontrándose valores de recuperación en los intervalos 88-92% y 93-103% para Gly y MGly, respectivamente. El método desarrollado se aplicó al análisis de doce muestras reales de orina y los contenidos encontrados estuvieron entre 1,1 y 28,4 ng/mL para Gly y entre 15,8 y 217 ng/mL para MGly.

#### BIBLIOGRAFÍA:

- [1] M.C. Hurtado-Sánchez, A. Espinosa-Mansilla, M.I. Rodríguez-Cáceres, E. Martín-Tornero, I. Durán-Merás, Development of a method for the determination of advanced glycation end products precursors by liquid chromatography and its application in human urine samples, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 2575-2584.
- [2] J.L.J.M. Scheijen, C.G. Schalkwijk, Quantification of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in blood and plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: evaluation of blood specimen, *Clin. Chem. Lab. Med.* 52 (2014) 85-91.
- [3] M. Daglia, A. Amoroso, D. Rossi, D. Mascherpa, G. Maga, Identification and quantification of  $\alpha$ -dicarbonyl compounds in balsamic and traditional balsamic vinegars and their cytotoxicity against human cells, *J. Food Compos. Anal.* 31 (201) 67-74.
- [4] Y.K. Shiryayeva, V.V. Krylin, V.N. Titov, Chromatographic determination of methyl glyoxal in blood plasma as the test for glycototoxicity and accumulation of glycation end-products, *Bull. Exp. Biol. Med.* 153 (2012) 114-117.
- [5] Wealth Health Organization, WHO, <http://www.who.int/features/factfiles/diabetes/en/>. Last accessed January 2016.
- [6] T. Cvetkovic, P. Vlahovic, D. Dordevic, L. Zvezdanovic, D. Pavlovic, G. Kocic, D. Sokolovic, The significance of urinary markers in the evaluation of diabetic nephropathy, *J. Med. Biochem.* 27 (2008) 376-382.
- [7] A. Lapolla, R. Flamini, T. Tonus, D. Fedele, A. Senesi, R. Reitano, E. Marotta, G. Pace, R. Seraglia, P. Traldi, An effective derivatization method for quantitative determination of glyoxal and methylglyoxal in plasma samples by gas chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 876-878.
- [8] L.A. Zardari, M.Y. Khuhawar, A.J. Laghari, Capillary GC analysis of glyoxal and methylglyoxal in the serum and urine of diabetic patients after use of 2,3-diamino-2,3-dimethylbutane as derivatizing reagent, *Chromatographia* 70 (2009) 891-897.
- [9] N.R. Neng, C.A.A. Cordeiro, A.P. Freire, J.M.F. Nogueira, Determination of glyoxal and methylglyoxal in environmental and biological matrices by stir bar sorptive extraction with *in-situ* derivatization, *J. Chromatogr. A* 1169 (2007) 47-52.
- [10] A. Espinosa-Mansilla, I. Durán-Merás, F. Cañada Cañada, M. Prado Márquez, High-performance liquid chromatographic determination of glyoxal and methylglyoxal in urine by prederivatization to lumazinic rings using in serial fast scan fluorimetric and diode array detectors, *Anal. Biochem.* 371 (2007) 82-91.
- [11] K. Akira, Y. Matsumoto, T. Hashimoto, Determination of urinary glyoxal and methylglyoxal by high-performance liquid chromatography, *Clin. Chem. Lab. Med.* 42 (2004) 147-153.

- [12] A. Espinosa-Mansilla, I. Durán-Merás, F. Salinas, High-performance liquid chromatographic–fluorometric determination of glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl in urine by prederivatization to pteridinic rings, *Anal. Biochem.* 255 (1998) 263–273.
- [13] A. Gómez Ojeda, K. Wrobel, A.R. Corrales Escobosa, M.E. Garay-Sevilla, K. Wrobel, High-performance liquid chromatography determination of glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl in urine using 4-methoxy-o-phenylenediamine as derivatizing reagent, *Anal. Biochem.* 449 (2014) 52–58.
- [14] Y. Deng, P.H. Yu, Simultaneous determination of formaldehyde and methylglyoxal in urine: involvement of semicarbazide-sensitive amine oxidase-mediated deamination in diabetic complications, *J. Chromatogr. Sci.* 37 (1999) 317–322.
- [15] A.C. McLellan, S.A. Phillips, P.J. Thornalley, The assay of methylglyoxal in biological systems by derivatization with 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene, *Anal. Biochem.* 206 (1992) 17–23.
- [16] I. Nemet, L. Varga-Defterdarovic, Z. Turk, Preparation and quantification of methylglyoxal in human plasma using reverse-phase high-performance liquid chromatography, *Clin. Biochem.* 37 (2004) 875–881.
- [17] C. Cordeiro, A. Ponces Freire, Methylglyoxal assay in cells as 2-methylquinoxaline using 1,2-diaminobenzene as derivatizing reagent, *Anal. Biochem.* 234 (1996) 221–224.
- [18] E.W. Randell, S. Vasdev, V. Gill, Measurement of methylglyoxal in rat tissues by electrospray ionization mass spectrometry and liquid chromatography, *J. Pharm. Toxicol. Methods* 51 (2005) 153–157.
- [19] H. Odani, T. Shinzato, Y. Matsumoto, J. Usami, K. Maeda, Increase in three  $\alpha,\beta$ -dicarbonyl compound levels in human uremic plasma: specific *in vivo* determination of intermediates in advanced Maillard reaction, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 256 (1999) 89–93.
- [20] Y. Han, E. Randell, S. Vasdev, V. Gill, V. Gadag, L.A. Newhook, M. Grant, D. Hagerty, Plasma methylglyoxal and glyoxal are elevated and related to early membrane alteration in young, complication-free patients with Type 1 diabetes, *Mol. Cell Biochem.* 305 (2007) 123–131.
- [21] C. Hess, B. Stratmann, W. Quester, D. Tschoepe, B. Madea, F. Musshoff, Clinical and forensic examinations of glycaemic marker methylglyoxal by means of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Int. J. Legal Med.* 127 (2013) 385–393.
- [22] S.J. Chen, C. Aikawa, T. Matsui, Quantitative analysis of methylglyoxal, glyoxal and free advanced glycation end-products in the plasma of wistar rats during the oral glucose tolerance test, *Biol. Pharm. Bull.* 38 (2015) 1–4.
- [23] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction, *J. Chromatogr. A*, 1116 (2006) 1–9.
- [24] P. Viñas, N. Campillo, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, Dispersive liquid–liquid microextraction in food analysis. A critical review. *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 2067–2099.