

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO  
DE COMPOSTELA

Facultade de Química

**Optimización de metodoloxías  
en cromatografía líquida -  
espectrometría de masas en  
tándem para la determinación  
de etilglucurónido en cabelo**



Curso 2024/25

Alumno/a: Luis Ángel Alonso Fernández

*Antonio Moreda Piñeiro*, titor e docente do *Departamento de Química Analítica, Nutrición e Bromatoloxía*, e *Pamela Cabarcos Fernández*, cotitor e docente do *Departamento de Ciencias Forenses, Anatomía Patolóxica, Ginecología y Obstetricia y Pediatría*, autorizan a presentación do Traballo de Fin de Grao do alumno *Luis Ángel Alonso Fernández* na convocatoria de *xullo* do curso 2024-2025, o cal foi realizado baixo a súa dirección nos *laboratorios GETEE da USC*.

E para que así conste asinamos o presente informe en Santiago de Compostela o 24 de xuño de 2025.

Firmado por MOREDA PIÑEIRO  
ANTONIO - \*\*\*9315\*\* el día  
24/06/2025 con un  
certificado emitido por AC  
FNMT Usuarios

CABARCOS  
FERNANDEZ  
PAMELA -  
32697195G

Firmado digitalmente por  
CABARCOS FERNANDEZ PAMELA -  
32697195G  
Nombre de reconocimiento (DN):  
c=ES,  
serialNumber=IDCES-32697195G,  
givenName=PAMELA,  
sn=CABARCOS FERNANDEZ,  
cn=CABARCOS FERNANDEZ PAMELA  
- 32697195G  
Fecha: 2025.06.24 14:08:15 +02'00'

# ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	1
<b>1. Introducción</b> .....	2
<b>1.1. Absorción y metabolismo del alcohol</b> .....	2
<i>1.1.1. Fase I: Alcohol deshidrogenasa, MEOS y catalasa</i> .....	3
<i>1.1.2. Fase II: Reacciones de conjugación</i> .....	3
<i>1.1.3. Fase III: Transportadores</i> .....	4
<b>1.2. Marcadores de consumo de alcohol</b> .....	4
<b>1.3. El etilgucurónido (EtG) como marcador de consumo</b> .....	5
<i>1.3.1. Descubrimiento del EtG y primeras detecciones</i> .....	6
<b>1.4. El pelo como matriz biológica</b> .....	7
<i>1.4.1 Vías de acumulación del hEtG</i> .....	7
<i>1.4.2 Factores que afectan a la acumulación del EtG en el cabello</i> .....	8
<b>1.5. Estado del arte del análisis del hEtG</b> .....	9
<i>1.5.1 Descontaminación del pelo</i> .....	9
<i>1.5.2 Extracción del hEtG</i> .....	10
<i>1.5.3 Métodos cromatográficos</i> .....	11
<b>2. Objetivos</b> .....	12
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	12
<b>3.1. Reactivos y material</b> .....	12
<b>3.2. Aparatos e instrumentos</b> .....	13
<b>3.3. Muestras de pelo</b> .....	13
<b>3.4. Extracción del hEtG</b> .....	14
<b>3.5. Análisis mediante LC-MS/MS</b> .....	14
<b>3.6. Protocolos de SPE</b> .....	15
<i>3.6.1. Protocolo Base</i> .....	15
<i>3.6.2. Protocolo de Oppolzer et al. <sup>[23]</sup></i> .....	16

3.6.3. <i>Protocolo de Cabarcos et al.</i> <sup>[20]</sup> .....	16
<b>4. Resultados y discusión</b> .....	16
4.1. <b>Optimización de la composición del tampón</b> .....	17
4.2. <b>Optimización de la concentración de tampón</b> .....	18
4.3. <b>Optimización del pH de la fase acuosa</b> .....	20
4.4. <b>Optimización de la temperatura de la columna</b> .....	22
4.5. <b>Optimización del programa cromatográfico</b> .....	24
4.6. <b>Calibración y límite de detección (LOD)</b> .....	25
4.7. <b>Comparativa de protocolos de SPE</b> .....	27
4.8. <b>Aplicación a una muestra real</b> .....	31
<b>5. Conclusiones</b> .....	33
<b>6. Bibliografía</b> .....	34
<b>Anexo I</b> .....	41
<b>Anexo II</b> .....	44

## Resumen

### Español

El alcohol es uno de los causantes de problemas en el ámbito doméstico, legal, laboral y económico por lo que estudio de los marcadores directos de alcoholismo se ha convertido en una tarea de vital importancia. Es en este ámbito donde destaca el análisis del etilglucurónido en cabello (hEtG), una matriz que ha ganado un gran interés en los últimos años gracias a la gran ventana de detección que ofrece. La LC-MS/MS se ha impuesto actualmente como la técnica de preferencia para el análisis del hEtG donde la HILIC (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) tiene un papel fundamental. En este Trabajo de Fin de Grado se ha estudiado el efecto de la composición, concentración y pH de la fase móvil, así como el efecto de la temperatura de la columna junto a distintos programas cromatográficos, consiguiendo así optimizar un método cromatográfico que emplea HILIC para la determinación de hEtG con un LOD 2,64 pg/mg, cumpliendo con los requisitos de la *Society of Hair Testing* (SoHT). Además, se ha evaluado el impacto que tienen distintos protocolos y cartuchos SPE en la señal analítica.

### Galego

O alcohol é un dos responsables de problemas no ámbito doméstico, legal, laboral e económico polo que o estudio dos marcadores directos de alcoholismo converteuse nunha tarefa de vital importancia. Neste ámbito é onde destaca o análise de etilglucurónido en cabelo (hEtG), unha matriz que gañou un gran interés nos últimos anos grazas á gran ventá analítica que ofrece. A LC-MS/MS impúxose hoxe en día como a técnica de preferencia para a análise do EtG donde a HILIC (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) ten un papel fundamental. Neste Traballo de Fin de Grado estudouse o efecto da composición, concentración e pH da fase móvil, así como o efecto da temperatura da columna xunto a distintos programas cromatográficos, conseguindo así optimizar un método cromatográfico que emprega HILIC para a determinación de hEtG cun LOD 2,64 pg/mg, cumprindo cos requisitos da *Society of Hair Testing* (SoHT). Ademáis, evalúase o efecto que teñen distintos protocolos e cartuchos de SPE no sinal analítico.

### Inglés

Alcohol is a cause of problems in domestic, legal, workplace and economic spheres, so investigating direct alcohol markers is an important task. In this area, analysis

of hair ethyl glucuronide (hEtG) is of particular interest, as this matrix has a large detection window and has gained interest in recent years. LC-MS/MS is now the preferred technique for EtG analysis, with HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography) playing a fundamental role. The current Degree Project has studied the effects of the composition, concentration and pH of the mobile phase, as well as the effect of column temperature, in conjunction with different chromatographic methods. Thus, an HILIC-based chromatographic method for determining hEtG was optimised, achieving a LOQ of 2,64 pg/mg, meeting the *Society of Hair Testing* (SoHT) requirements. Additionally, the impact of various SPE protocols and cartridges on the analytical signal was evaluated.

## **1. Introducción**

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el etanol, también llamado alcohol etílico o simplemente alcohol, es una sustancia tóxica, psicoactiva y capaz de producir dependencia, causante de 1 de cada 11 muertes en el continente europeo y 1 de cada 4 muertes entre jóvenes de entre 19 y 24 años <sup>[1]</sup>.

Además de su implicación en más de 200 enfermedades diferentes, entre las que se encuentran 7 tipos de cáncer, el alcohol también puede desencadenar o agravar problemas en los ámbitos doméstico, legal, laboral e incluso económico <sup>[1]</sup>. Todo esto constituye para la OMS un problema en crecimiento que se ve agravado por el aumento tanto del porcentaje de población que consume alcohol como de la cantidad ingerida per cápita y por la reducción en la edad con la que se inicia el consumo <sup>[2]</sup>.

### **1.1. Absorción y metabolismo del alcohol**

La vía de entrada del etanol en nuestro cuerpo es prácticamente siempre a través de la vía oral, por lo que el sistema digestivo será el principal encargado de su absorción <sup>[3]</sup>. De todo el alcohol ingerido un 20% será absorbido por el estómago mientras que la porción superior del intestino delgado se encargará del 80% restante <sup>[4]</sup>. A partir de aquí un 5% será eliminado del cuerpo a través de la piel, minoritariamente, y de los pulmones y riñones de forma mayoritaria <sup>[5]</sup>, mientras que el 95% restante será metabolizado a través de distintas rutas enzimáticas; agrupadas en fase I, fase II y fase III, y que son las responsables de eliminar cualquier tipo de sustancia, tanto endógena como exógena, de nuestro organismo <sup>[6]</sup>.

### *1.1.1. Fase I: Alcohol deshidrogenasa, MEOS y catalasa*

La fase I agrupa todas aquellas reacciones enzimáticas que desenmascaran o añaden un grupo funcional a una molécula a través de reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis [7]. En el caso del etanol, la reacción mayoritaria es la oxidación a acetaldehído llevada a cabo por los enzimas alcohol deshidrogenasa (ADH), catalasa y el sistema microsomal oxidativo del etanol (MEOS)<sup>[3]</sup>. La ADH se encuentra mayoritariamente en el hígado, aunque también en otros órganos como los riñones, pulmones y mucosa gástrica [7], y su función es oxidar el etanol, pero también otros alcoholes, a acetaldehído empleando como cofactor nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) [3]. Es un enzima dimerico codificado por siete genes lo que da lugar a cinco clases diferentes de enzimas (I a V) donde, además, en las ADH de clase II y III, existen distintas isoenzimas, lo que contribuye a que existan diferencias en la capacidad de metabolizar alcohol en diferentes poblaciones [8].

El MEOS es un “sistema enzimático miembro de la familia de los citocromos microsomales P450” (CYP450) [3]. Esta familia está compuesta por 60 miembros diferentes, aunque solo 10 parecen ser relevantes en el metabolismo de drogas [7], y se encuentran en diversos tejidos y órganos, siendo el hígado y el intestino delgado los que más aportan en el proceso de metabolismo y eliminación de drogas por esta vía [6]. La oxidación del etanol a través de este sistema produce de nuevo acetaldehído, aunque esta vez se emplea oxígeno molecular como sustrato y nicotina adenina dinucleótido fosfato (NADP) como cofactor [6]. El MEOS es inducido en situaciones tanto de consumo crónico como agudo de alcohol ya que, debido a su mayor constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) en comparación con la ADH, presenta un mayor límite de saturación [3].

El enzima catalasa se encuentra en diferentes órganos, destacando su presencia en el hígado, donde su función principal es degradar el peróxido de hidrógeno [3]. Este sistema también es capaz de oxidar etanol, pero su papel es mínimo en el grueso del metabolismo oxidativo del alcohol [8].

### *1.1.2. Fase II: Reacciones de conjugación*

La fase II agrupa todas aquellas reacciones de conjugación que enlazan la droga o un metabolito de la fase I con otra molécula para incrementar su polaridad, mejorando así su excreción, cesar su actividad farmacológica o proteger al organismo de su reactividad [7]. Estas reacciones de conjugación pueden ser sulfonaciones, acetilaciones,

metilaciones, conjugación con glutatión, etc. [7] Sin embargo, la que más destaca en el metabolismo de drogas es la glucuronidación, siendo responsable de la conjugación de entre el 40% y el 70% de todos los compuestos, tanto exógenos como endógenos, de nuestro organismo [6]. La glucuronidación es una reacción catalizada por enzimas UDP-glucuronosiltransferasas (UGTs) y que conjuga una molécula, en este caso de etanol, con una molécula de ácido UDP-glucurónico dando como producto final el etilglucurónido (EtG). [9]. Se conocen 4 familias de UGTs hasta el momento [6], algunas de las cuales contienen distintas isoenzimas, aunque esto no es relevante en la cinética de producción de EtG ya que, debido a que son varias las responsables en su producción, las diferencias se compensan unas con otras [9]. Las UGTs aparecen en el retículo endoplásmico de las células de multitud de órganos, pero, al igual que ocurría con el MEOS, destaca su presencia en las células hepáticas y del intestino delgado [6].

### 1.1.3. Fase III: Transportadores

La fase III engloba a aquellas proteínas transportadoras de droga transmembrana divididas en dos superfamilias: los transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) y los transportadores de solutos SLC (*Solute Carrier*). Aparecen de nuevo en el hígado y tienen un papel importante en la excreción de drogas en la orina, pero su acción se centra en aquellas moléculas de gran tamaño y/o ionizadas [6], por lo que su papel en la eliminación del etanol es prácticamente inexistente.

## 1.2. Marcadores de consumo de alcohol

Determinar el consumo de alcohol de una persona puede tener grandes impactos en acciones legales futuras; como puede ser la retirada del permiso de conducir, o en decisiones sobre su salud; como puede ser la aptitud del paciente para recibir un trasplante hepático [10]. Debido a esto es de vital importancia el desarrollo de marcadores de alcoholismo capaces de distinguir un consumo responsable de uno crónico y de detectar dicho consumo dentro de una amplia ventana de tiempo [10].

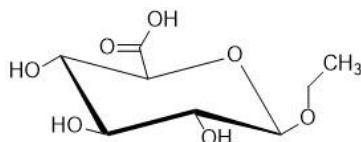
Estos marcadores se pueden clasificar en marcadores de rasgo; “marcadores bioquímicos capaces de identificar personas con una predisposición genética al abuso del alcohol” [11], y marcadores de estado; “biomarcadores que proporcionan información sobre los patrones de consumo recientes y a largo plazo” [11], dentro de los cuales podemos encontrarnos marcadores directos e indirectos [11].

Los marcadores de estado indirectos son aquellos que miden algún cambio en la sangre o en plasma producido por un consumo excesivo de alcohol <sup>[12]</sup> como pueden ser los niveles de alanina aminotransferasas (ALAT) o los niveles de  $\gamma$ -glutamilttransferasa (GGT) <sup>[10]</sup>. El estudio de este tipo de marcadores tiene la ventaja de tener un uso muy extendido y ser relativamente económicos, no obstante, son poco específicos y sensibles a la hora de detectar el consumo de alcohol, pudiendo verse afectados por factores como el sexo, la edad u otras comorbilidades no relacionadas con el alcoholismo <sup>[10]</sup>.

Los marcadores de estado directos son el propio etanol y sus productos del metabolismo no oxidativo, como el EtG, por lo que solo están presentes si se ha producido consumo de alguna bebida alcohólica <sup>[12]</sup>. Estos marcadores pueden estudiarse en matrices tradicionales como pueden ser la sangre o la orina, pero tienen la desventaja de poseer una ventana analítica de detección muy pequeña <sup>[10]</sup> permitiendo solamente determinar un consumo muy reciente <sup>[11]</sup>. No obstante, el cabello actúa como un reservorio de estos metabolitos <sup>[10]</sup>, ofreciendo una ventana de detección más amplia <sup>[11]</sup> que puede ser de meses hasta incluso años en función de la longitud del cabello disponible <sup>[10]</sup>. Es por este motivo que la detección de EtG en el cabello (hEtG) se ha establecido en los últimos años como uno de los marcadores de consumo de alcohol a largo plazo más fiables <sup>[2]</sup>.

### 1.3. El etilglucurónido (EtG) como marcador de consumo

El etilglucurónido ( $\beta$ -D-etilglucurónido) es un marcador de estado directo fruto del metabolismo no oxidativo resultado de la conjugación del etanol con una molécula de ácido UDP-glucurónico en un proceso catalizado por UDP-glucotransferasas (UGTs). Es una molécula muy polar ( $\log P = -1,8$  <sup>[13]</sup>), ácida ( $pK_a = 3,45$  <sup>[13]</sup>), estable <sup>[10]</sup> y con un peso molecular de 222 g/mol. La eliminación del etanol a través del metabolismo no oxidativo representa un 0,2% de todo el alcohol ingerido <sup>[12]</sup> y su principal vía de eliminación es a través de la orina, pudiendo detectarse hasta 3 o 5 días después de eliminarse el alcohol del organismo, aunque pequeñas trazas pueden acumularse en el pelo <sup>[11]</sup>.



**Figura 1:** Estructura del  $\beta$ -D-etilglucurónido

### *1.3.1. Descubrimiento del EtG y primeras detecciones*

El proceso de conjugación con el ácido glucurónico era conocido ya desde el 1885 cuando Thierfelder y von Mering describieron la formación de conjugados con alcoholes terciarios en un estudio realizado con conejos <sup>[14]</sup>. No obstante, se considera el trabajo de Neubauer en 1901 como la primera descripción de la eliminación del etanol a través de su conjugación con el ácido glucurónico <sup>[12], [14]</sup>, aunque también mencionó la formación de conjugados de otras moléculas <sup>[14]</sup>, haciendo un estudio en la orina de perros y conejos <sup>[9]</sup>.

En el 1952 Kamil et al. realizarían de nuevo en conejos un estudio de la producción de EtG en orina a medida que se proporcionaban dosis crecientes de etanol <sup>[12]</sup>, siendo además los primeros en aislar el EtG en forma de triacetil metil éster <sup>[14]</sup>. En su estudio demostraron que la cantidad de etanol conjugado, es decir, de EtG en la orina, aumentaba conforme las dosis de etanol aumentaban indicando una posible saturación del metabolismo oxidativo de esta sustancia <sup>[9]</sup>. Los mismos autores repitieron el mismo experimento, pero esta vez administrando también disulfiram, un medicamento inhibidor de la ADH, observando un gran aumento de las concentraciones de ácido glucurónico en la orina, fruto de la hidrólisis del EtG <sup>[9]</sup>. Estos estudios eran muy laboriosos ya que, antes del avance en las técnicas cromatográficas de separación, la identificación de este compuesto se efectuaba mediante medidas de su punto de fusión <sup>[12]</sup>.

La primera detección en el ser humano se produciría en 1967 aunque, curiosamente, estos investigadores estaban investigando la producción de EtG en ratas mediante el uso de cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), pero decidieron añadir una muestra de orina de una persona que reportaba un elevado consumo de alcohol, siendo esta la primera detección del EtG en un humano <sup>[9]</sup>.

Como podemos ver los primeros ensayos se realizaron empleando orina sin embargo estaban muy limitados por la baja sensibilidad de los equipos cromatográficos de la época, pero con la mejoras desarrolladas a partir de los años 1990 el análisis del EtG como marcador del alcoholismo comenzaría a ganar popularidad <sup>[12]</sup>. Otro desarrollo importante ha sido la comercialización a partir del 1997 del EtG-d5, una forma deuterada del EtG que debido a que posee las mismas características fisicoquímicas, exceptuando el peso molecular, se convirtió en el estándar de patrón interno <sup>[14]</sup>.

Cabe resaltar que, para encontrar el primer desarrollo de un método de detección del EtG en pelo, debemos avanzar hasta el año 2000 donde Skopp et al. validarían un método basado en GC-MS con metilglucurónido como patrón interno [2]. Finalmente, es a partir de esta época cuando se comienza a abandonar las técnicas de GC y se impone la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para el estudio del EtG tanto en pelo como en otras matrices biológicas [11].

#### **1.4. El pelo como matriz biológica**

El pelo se ha establecido como una de las matrices biológicas de mayor interés a la hora de realizar análisis toxicológicos sobre diversas sustancias de abuso [9] siendo muy atractiva su aplicación en el caso del EtG debido, principalmente, a que permite aumentar su ventana analítica de detección [9], [12].

El pelo consiste en una fibra proteica formada por células queratinizadas con un alto grado de empaquetamiento que se disponen en tres estructuras que son, de más interna a externa, médula, córtex y cutícula, siendo esta última la estructura más susceptible a dañarse [2]. Sus funciones principales son de protección y termorregulación del cuerpo, pero, además, nos permite conocer con detalle el historial de consumo crónico de una sustancia de abuso por parte de un individuo [15].

##### *1.4.1 Vías de acumulación del hEtG*

En el caso del EtG, este se encuentra a pH fisiológico en su forma aniónica lo que, en combinación con su alta polaridad, hacen que su incorporación al cabello se produzca en pequeñas cantidades [11], [15], debido a que la melanina contenida en el cabello presenta mayor afinidad por compuestos hidrofóbicos y básicos (pKa 8-10) [11].

Las vías principales de incorporación de EtG en el cabello podrían ser a través de las glándulas sebáceas, las glándulas sudoríparas o la sangre [11]. Las glándulas sebáceas parecen tener un papel irrelevante en la acumulación de este compuesto debido a su alta polaridad [11]. Algunos autores afirman que la incorporación a través del sudor es la principal [11], no obstante, no se ha encontrado una gran eficiencia en su incorporación debido a la alta variabilidad de su concentración en el sudor en comparación con los niveles en sangre [15]. Sumado a esto, experimentos en ratas, que no presentan glándulas sudoríparas, sí presentan acumulación de EtG en el pelo a través de la sangre [11]. Por tanto, parece ser que la sangre es la vía principal de incorporación del EtG; resultando en un acumulación en las estructuras más internas del cabello, mientras que el sudor da como

resultado una deposición más periférica en las capas externas que son susceptibles a dañarse [2].

#### *1.4.2 Factores que afectan a la acumulación del EtG en el cabello*

Los hábitos de consumo de etanol pueden afectar a la incorporación del EtG en el pelo debido a diferencias en el tiempo de exposición con el EtG presente en la sangre [10]. Sumado a esto veremos a continuación otros factores que pueden afectar a la acumulación y estabilidad del hEtG.

El índice de masa corporal (IMC) tiene relación con una mayor concentración de alcohol en sangre, debido a la poca afinidad del etanol por los tejidos lípidicos, que tiene como consecuencia mayores niveles de hEtG [2]. Las diferencias metabólicas provocadas por el género o las diferencias genóticas entre etnias parecen no influir en la acumulación del EtG en pelo, aunque Salomone et al. observaron cierta influencia de la edad que puede ser explicada por múltiples factores [2].

Muchos marcadores de consumo de alcohol étílico son afectados por enfermedades hepáticas, no obstante, el hEtG parece no verse afectado siendo esta una gran ventaja a la hora de monitorizar pacientes en lista de espera para trasplantes hepáticos [2]. Una patología que podría tener cierto impacto es el síndrome de Gilbert, una enfermedad hepática que provoca una deficiencia de UGTs [10], aunque parece no afectar a la producción de EtG [2]. A diferencia de las enfermedades hepáticas, las patologías renales pueden provocar mayores concentraciones en sangre del EtG, resultando en una mayor acumulación en cabello debido a que la mayor vía de eliminación es a través del sistema renal [2].

En cuanto a su estabilidad en el cabello, otras drogas, como la cocaína, se depositan mejor en aquellos cabellos más pigmentados con un alto contenido en melanina [10]. El EtG al ser ácido y polar no se ve afectado por el contenido de melanina en pelo [2], además, al ser un compuesto poco volátil es poco probable que se produzca una contaminación externa como podría ocurrir con otras drogas como la cocaína [9].

No obstante, los tratamientos cosméticos, como la decoloración o el teñido, pueden dar como resultado menores concentraciones de hEtG de las esperadas debido al daño que se produce en la estructura del pelo [2]. Sumado a esto, productos cosméticos con un alto contenido en etanol [2] pueden contener EtG [10] dando como resultado falsos positivos [2] y siendo necesaria su consideración a la hora de interpretar los resultados [10].

Así mismo, la frecuencia de lavado del cabello, debido a la hidrofiliidad del EtG, puede ser la causa de falsos negativos, aunque este efecto debe ser estudiado más en profundidad [2].

Por último, tenemos el efecto de la radiación solar sobre el cabello. Aquel cabello más claro o canoso suele encontrarse más fino y dañado, por lo que la acción de la luz solar puede debilitar su estructura facilitando la posterior extracción del hEtG, pudiendo dar como resultado concentraciones mayores a lo esperado [2]. En cuanto al cabello oscuro, el alto contenido en melanina puede estimular la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) causando la fotodegradación del EtG, lo que reduciría la concentración de hEtG [2].

### **1.5. Estado del arte del análisis del hEtG**

Los métodos analíticos típicos para el análisis del hEtG están basados en GC-MS, GC-MS/MS y LC-MS/MS [2] aunque, potencialmente, se podrían usar también enzimoinmunoensayos (EIA) cuya efectividad ya ha sido testada en el estudio del EtG en orina y humor vítreo [10].

De todos estas técnicas, hoy en día se ha impuesto la LC-MS/MS debido a que el tiempo de análisis es menor y no es necesario realizar una derivatización de nuestro analito [11], aunque los métodos desarrollados a partir de 2010 que emplean GC garantizan una gran sensibilidad. También cabe mencionar que las técnicas de GC son más precisas, económicas y con un menor impacto medioambiental [2].

Cada una de estas técnicas también tiene su propio protocolo de preparación de la muestra que consiste en la descontaminación y extracción del hEtG, usualmente una purificación empleando extracción en fase sólida (*Solid Phase Extraction*, SPE) y la evaporación y reconstitución del analito en un disolvente adecuado a GC o LC [2]. En el caso de emplear GC sería necesario realizar una derivatización posterior a la SPE [2].

En la Tabla 1 del Anexo I podemos ver un resumen con las principales características de los métodos de determinación de hEtG propuestos hasta la fecha.

#### *1.5.1 Descontaminación del pelo*

Aunque la posibilidad de contaminación externa es poco probable [9], es necesario realizar una descontaminación previa de la muestra de pelo a analizar para asegurarnos

que no se producen falsos positivos y mejorar el resultado analítico al reducir el efecto matriz y el ruido de fondo [32].

Cada laboratorio tiene sus propios procedimientos y difieren mucho entre ellos en cuanto a disolvente empleado, volumen utilizado y número de lavados, lo que puede generar resultados muy dispares entre ellos [2]. Distintas investigaciones con respecto al impacto que puede tener el protocolo de descontaminación se han llevado a cabo, pero aún no se han obtenido conclusiones claras sobre ello [2].

Recientemente, en 2020, Müller et al. realizaron un estudio monitorizando las concentraciones de EtG en las distintas soluciones de lavado de un protocolo de rutina, llegando a la conclusión de que emplear disoluciones acuosas es lo más efectivo a la hora de eliminar el EtG externo, de acuerdo con las recomendaciones de la *Society of Hair Testing* (SoHT) [32].

#### 1.5.2 Extracción del hEtG

En cuanto al método de extracción lo más común es la incubación y/o ultrasonicación en un disolvente adecuado para la extracción [2]. Bossers et al. estudiaron el efecto del disolvente llegando a la conclusión de que el agua es el que mejor extracción ofrece [2] debido a que el EtG es altamente polar.

Con respecto a la homogenización de la muestra, se recurre a cortar el pelo en pequeños fragmentos con tijeras o pulverizarlo mediante la acción de un molino de bolas, con la intención de mejorar la extracción del analito [10]. Mueller et al. evaluaron seis factores diferentes; tamaño de partícula, disolvente de extracción, relación muestra/disolvente, temperatura y tiempo de incubación, con la intención de averiguar el efecto que tenían distintos pretratamientos de la muestra [33]. Los factores de más importantes resultaron ser el disolvente de extracción [33], viéndose favorecida el agua y confirmando las observaciones de Bossers et al., y la temperatura de incubación, viéndose favorecida la extracción tras incubar a 60 °C [33]. A la hora de evaluar el efecto del tamaño de partícula, se obtuvieron mejores resultados con el pelo pulverizado [33] debido al mayor área superficial de extracción disponible.

Otras alternativas propuestas han sido la extracción asistida por microondas estudiada por Álvarez et al. [18], el empleo del reactivo M3<sup>®</sup> propuesto por Groff et al. [28], la extracción líquido-líquido propuesta por Bakdash et al. [11] y, más recientemente, el uso de la técnica

de *Micro Extraction by Packed Sorbent* (MEPS) por parte de Odoardi et al. <sup>[31]</sup> todas ellas con resultados satisfactorios.

En cuanto a la purificación del extracto, la mayoría de laboratorios emplean SPE <sup>[10]</sup> siendo los adsorbentes más empleados OASIS MAX, Isolute NH<sub>2</sub> y Cleenscreen EtG, aunque no existe demasiada bibliografía que analice el impacto de este factor <sup>[2]</sup>. Cabe destacar que no todos los laboratorios realizan una etapa de purificación o solo realizan una filtración como se puede ver en la Tabla 1 (Anexo I).

Finalmente, todos los métodos emplean una evaporación y una reconstitución del analito en un disolvente adecuado para la inyección en GC o LC <sup>[10]</sup>.

### 1.5.3 Métodos cromatográficos

Como ya hemos mencionado anteriormente, las técnicas de LC-MS/MS se han impuesto actualmente sobre aquellas basadas en GC debido al menor tiempo de análisis y a la ausencia de necesidad de derivatizar el EtG <sup>[11]</sup>. La ionización del compuesto en el espectrómetro de masas se produce normalmente por ionización por electrospray (ESI) en modo negativo <sup>[2]</sup>. Las transiciones típicamente empleadas a la hora de cuantificar el EtG y EtG-d<sub>5</sub> son 221 → 75 y 226 → 75 respectivamente <sup>[11]</sup>.

Comúnmente la parte de cromatografía líquida se realiza en fase reversa (RPLC) <sup>[2]</sup> lo que requiere el uso de fases móviles con alto contenido en agua para conseguir la retención del EtG <sup>[11]</sup>. Este tipo de fases móviles no son óptimas para la ionización en la ESI lo que puede resultar en la pérdida de sensibilidad del equipo <sup>[11]</sup>. Una de las opciones para solucionar este problema es la adición de acetonitrilo post-columna para mejorar la ionización en la ESI <sup>[11]</sup>. Otra opción para mejorar la retención e ionización del EtG es la sustitución de la RPLC por una cromatografía líquida de interacción hidrofílica (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, HILIC), que emplean fases móviles con un alto contenido orgánico <sup>[10]</sup>, y cuya polaridad debe ser similar a la del compuesto eluido para permitir el equilibrio con la fase estacionaria, la cual no debe retener permanentemente el analito <sup>[11]</sup>. Las columnas de carbono grafitizado poroso también se han empleado con este propósito <sup>[10]</sup>.

En cuanto a las fases móviles, la mayor parte de los métodos emplean eluciones en modo gradiente, que proveen de una mejor resolución de las bandas cromatográficas, con acetonitrilo y disoluciones acuosas modificadas con ácido fórmico. El flujo de estas

fases oscila entre los 0,2 y 0,4 ml/min y los tiempos de análisis van desde los 20 minutos hasta los 5 minutos <sup>[10]</sup>.

## 2. Objetivos

El objetivo principal que se busca con la elaboración de este Trabajo de Fin de Grado es el desarrollo y optimización de un método de detección de hEtG empleando LC-MS/MS para su posterior aplicación a casos reales. Además, se compararán distintos procedimientos de SPE.

Para ello se seguirá el siguiente plan de trabajo:

- 1) Revisión bibliográfica del estado del arte del hEtG
- 2) Optimización de los parámetros de adquisición del espectrómetro de masas
- 3) Optimización de la separación cromatográfica empleando una columna de HILIC
- 4) Calibrado y estimación del límite de detección (LOD) del método
- 5) Comparación de múltiples procedimientos SPE
- 6) Aplicación a una muestra de cabello real

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Reactivos y material

- Ácido fórmico EMSURE® ACS, Reag para análisis 98-100% de Merck (Darmstad, Alemania)
- Formiato amónico  $\geq 99,0\%$  para MS de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU)
- Acetato amónico 98% de Panreac (Barcelona, España)
- Etil- $\beta$ -D-glucurónido 1mg/ml (Merck)
- Etil- $\beta$ -D-glucurónido-D5 1mg/ml (Merck)
- Metanol hypergrade para LC-MS (Merck)
- n-Hexano  $\geq 98,0\%$  para GC-MS (Merck)
- Amoníaco 30% de Panreac
- Ciclohexano ACS, Reag para análisis  $\geq 99,5\%$  (Merck)
- Acetonitrilo hypergrade para LC-MS (Merck)
- Agua ultrapura obtenida con un sistema MilliQ-A10 de Millipore (Bedford, MA, EEUU)

- Cartuchos Copure MAX 60mg/3ml de Biocomma (Guangdong, China)
- Cartuchos OASIS MAX 150mg/6ml de Waters (Milford, MA, Estados Unidos)
- Filtros de jeringa Branchia SFMC-122-100 (0,22 µm, ø 13 mm) de Labbox Labware (Barcelona, España)

### **3.2. Aparatos e instrumentos**

- Espectrómetro de masas 3200 Q TRAP LC-MS/MS (ABSciex, Concord, Canada) equipado con una bomba cromatográfica binaria Flexar FX15 UHPLC (PerkinElmer, Waltham, MA, USA), un automuestreador Flexar UHPLC (PerkinElmer), software Analyst 1.6 (ABSciex) para control y adquisición de datos, y software MultiQuant 2.1 (ABSciex) para procesamiento de datos.
- Horno para columna GECKO 2000 (control de temperatura de 30 a 80 °C) de Amchro GmbH (Hattersheim, Alemania)
- Columna Infinity Lab Poroshell 120 HILIC (2.7 mm, 2.10 × 100 mm) de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EEUU)
- pHmetro Basic 20 de Crison (Barcelona, España)
- Baño de ultrasonidos Ultrasonic 3 L (frecuencia 50/80 kHz, 220 W) de Ovan (Barcelona, España)
- Centrifugadora Laborcentrifugen 2K15 de Sigma (Osterode, Alemania) equipado con un rotor de ángulo fijo 12072.
- Balanza analítica BP1215 de Mettler Toledo (Columbus, OH, EEUU)
- Manifold Mildford de Waters (Milford, MA, EEUU)
- Evaporador VLM EC 1 de Köhler (Andernach, Alemania)
- Balanza analítica Mettler Toledo New Classic MF (Columbus, OH, EEUU)
- Molino de bolas MM2 de 150-1800 vibraciones/minuto de Retsch (Haan, Alemania)

### **3.3. Muestras de pelo**

Las muestras con contenido en EtG proceden de casos judiciales analizadas en el Servicio de Toxicología Forense (Instituto de Ciencias Forenses de Santiago de Compostela) las cuales, tras su custodia durante un año, son destruidas o anonimizadas

con fines de investigación. Las muestras se cortaron de la región posterior del vértice de la cabeza, lo más cerca posible del cuero cabelludo, identificándose la sección proximal.

Para evitar la posible contaminación externa y la interferencia del sebo en el análisis, todas las muestras se lavaron con jabón líquido de pH neutro (Tween™ 20, Panreac®) y agua desionizada. Tras secado en un horno a 40 °C, se cortaron en trozos de aproximadamente 5 mm de longitud. Las muestras se pulverizaron en un molino vibratorio de bolas durante 20 minutos a una potencia del 50% ( $\approx$  900 vibraciones/minuto). Finalmente, se prepararon muestras compuestas (*pool*) sobre las cuales se llevaron a cabo los análisis.

### **3.4. Extracción del hEtG**

Para cada muestra se tomaron 100 mg del pulverizado a los que se les añadió 2 ml de agua. Tras homogeneizar la solución en un agitador vórtex, se sumergieron en un baño de ultrasonidos a temperatura ambiente durante 2 horas a 40 kHz (50 W) con el objetivo de extraer el analito. Finalizada la extracción se realizó una centrifugación durante 10 minutos a 13 000 RPM, el sobrenadante se separó, filtró y se añadieron 30  $\mu$ l de EtG-d5 con una concentración de 500  $\mu$ g/l (100  $\mu$ g/l en el reconstituido) como patrón interno.

Este extracto fue sometido a una SPE siguiendo el procedimiento publicado por Oppolzer et al. [23], que describiremos posteriormente. Finalmente se realizó una evaporación a 40 °C bajo corriente de nitrógeno y la muestra se reconstituyó en 150  $\mu$ l de acetonitrilo.

### **3.5. Análisis mediante LC-MS/MS**

20  $\mu$ l de la muestra fueron inyectados en el equipo de LC-MS/MS donde se emplearon una fase móvil A, una disolución 10 mM de formiato amónico a pH 3,85, y una fase móvil B, compuesta por acetonitrilo. Se realizó una elución en gradiente empleando las siguientes condiciones: 0-3,0 min, 2% A, 200  $\mu$ l/min de flujo; 3,0-6,0 min, 40% A, 400  $\mu$ l/min de flujo y 6,0-20,0 min, 2% A, 200  $\mu$ l/min de flujo.

La fragmentación de los compuestos en el espectrómetro de masas se realizó a través de ionización en electrospray en modo negativo. Las condiciones fueron: 10,0 psi de gas cortina, 30 psi de gas nebulizador y de gas auxiliar y configuración media en el gas de colisión. Los parámetros óptimos para la fragmentación del analito y su patrón interno se pueden ver en la Tabla 1.

Para el EtG se emplearon las transiciones 221,1 → 74,8, como ion cuantificador, y 221,1 → 85,0 como ion calificador. En el caso del EtG-d5 se emplearon las transiciones 226,0 → 74,8, como ion cuantificador, y 226,0 → 84,7 como ion calificador. En el Anexo II se pueden observar los espectros de masas obtenidos en Q1 y en Q3 tanto del EtG (Figuras 1-2, Anexo II) como del EtG-d5 (Figuras 4-5, Anexo II).

**Tabla 1:** Parámetros optimizados para la fragmentación del EtG y EtG-d5

Compuesto	DP/V	EP/V	CE/V	CXP/V
<b>EtG</b>	-42,0	-10,0	-25,0	-5,0
<b>EtG-d5</b>	-42,0	-2,0	-25,0	-5,0

**DP:** *Declustering Potential* / Potencial de fragmentación

**EP:** *Entrance Potential* / Potencial de entrada

**CE:** *Collision Energy* / Energía de colisión

**CXP:** *Collision Cell Exit Potential* / Potencial de salida de la celda de colisión

### 3.6. Protocolos de SPE

Se compararon tres protocolos de SPE empleando como muestra una mezcla de patrones de EtG y EtG-d5 con una concentración de 100 µg/l. También se compararon dos cartuchos de SPE distintos, los Copure MAX y los OASIS Max.

Para la muestra real se emplearon los cartuchos Copure MAX y el protocolo sugerido por Oppolzer et al.<sup>[23]</sup>.

A continuación, detallaremos las condiciones de cada uno de los protocolos.

#### 3.6.1. Protocolo Base

Se emplearon los cartuchos Copure MAX previamente acondicionados con 2 ml de metanol y 2 ml de agua. La muestra se basifica previamente mediante la adición de 1 ml de NH<sub>3</sub> 5% y se carga en el cartucho

A continuación, se realiza un lavado con 1 ml de NH<sub>3</sub> 5% y se aplica un vacío durante unos 10 minutos. Finalmente, se añaden 2 ml de una mezcla ácido fórmico/metanol al 2% (2:98) y se aplica de nuevo un vacío durante 10 minutos para asegurarnos que se produce la elución del analito.

### 3.6.2. *Protocolo de Oppolzer et al.* [23]

En este protocolo se emplearon los cartuchos Copure MAX y se compararon con los OASIS MAX. También se empleó para el tratamiento de la muestra real donde se emplearon exclusivamente los cartuchos Copure MAX.

Los cartuchos son previamente acondicionados con 2 ml de metanol seguidos de 2 ml de agua y posteriormente la muestra es cargada. A continuación, se realiza un lavado empleando sucesivamente 1 ml de NH<sub>3</sub> 5%, 1 ml de agua, 1 ml de metanol y 1 ml de n-hexano. Luego se aplica un vacío durante 10 minutos para secar los cartuchos.

Finalmente, se añaden 2 ml de una mezcla ácido fórmico/metanol al 2% (2:98) y se aplica de nuevo un vacío durante 10 minutos para asegurarnos que se produce la elución del analito.

### 3.6.3. *Protocolo de Cabarcos et al.* [20]

Se emplearon los cartuchos Copure MAX previamente acondicionados con 2 ml de metanol seguidos de 2 ml de agua y posteriormente se carga la muestra. A continuación, se realiza un lavado con 2 ml de ciclohexano y se aplica un vacío durante 5 minutos para secar los cartuchos.

Finalmente, se añaden 2 ml de una mezcla ácido fórmico/metanol al 2% (2:98) y se aplica de nuevo un vacío durante 5 minutos para asegurarnos que se produce la elución del analito.

## 4. **Resultados y discusión**

En primer lugar, se realizó la optimización del método cromatográfico para después comparar los distintos procedimientos de SPE y realizar finalmente la aplicación a una muestra real de cabello.

Es importante tener en cuenta que el mecanismo de retención compuestos polares en HILIC se basa en la partición de los analitos desde la parte orgánica de la fase móvil a una capa de agua retenida sobre una fase estacionaria polar [34], en nuestro caso de sílice (SiO<sub>2</sub>), lo que se conoce como partición hidrofílica.

Además, la fase estacionaria no actúa solamente como los cimientos de la capa de agua, sino que participa activamente en la retención mediante adsorción superficial, donde intervienen interacciones polares específicas; como los puentes de hidrógeno y las

interacciones dipolo-dipolo, e interacciones no específicas como son las fuerzas de van der Waals. Debemos recalcar que, en caso de que el analito y la fase estacionaria se encuentren cargados, en la retención intervendrán también interacciones electrostáticas tanto atractivas como repulsivas <sup>[35]</sup>. Estas repulsiones, no implican directamente la no retención de nuestro compuesto, ya que las moléculas pueden evitarlas en función de la orientación que adopten a la hora de interactuar con la fase estacionaria <sup>[36]</sup>, pero si afectan negativamente al proceso.

Por tanto, modificando las características de la fase móvil seremos capaces de influir en los procesos de partición hidrofílica y adsorción superficial afectando en definitiva a la retención de nuestro analito. Las características que podemos alterar son: la concentración y composición del tampón en la fase acuosa, el pH, el porcentaje de fase orgánica inicial y la temperatura.

A continuación, se mostrarán y discutirán los resultados obtenidos en los distintos experimentos de optimización.

#### **4.1. Optimización de la composición del tampón**

En la mayoría de los métodos que emplean HILIC se emplea como sal con efecto tampón el formiato o acetato amónicos <sup>[37]</sup>, por lo que inicialmente se realizaron pruebas con ambas sales.

Se probaron dos fases móviles acuosas, una de acetato amónico 5 mM (pH=6,44) y otra de formiato amónico 10 mM (pH=6,77), pero con ninguna de ellas se consiguió retención, eluyendo el analito en el volumen muerto de la columna.

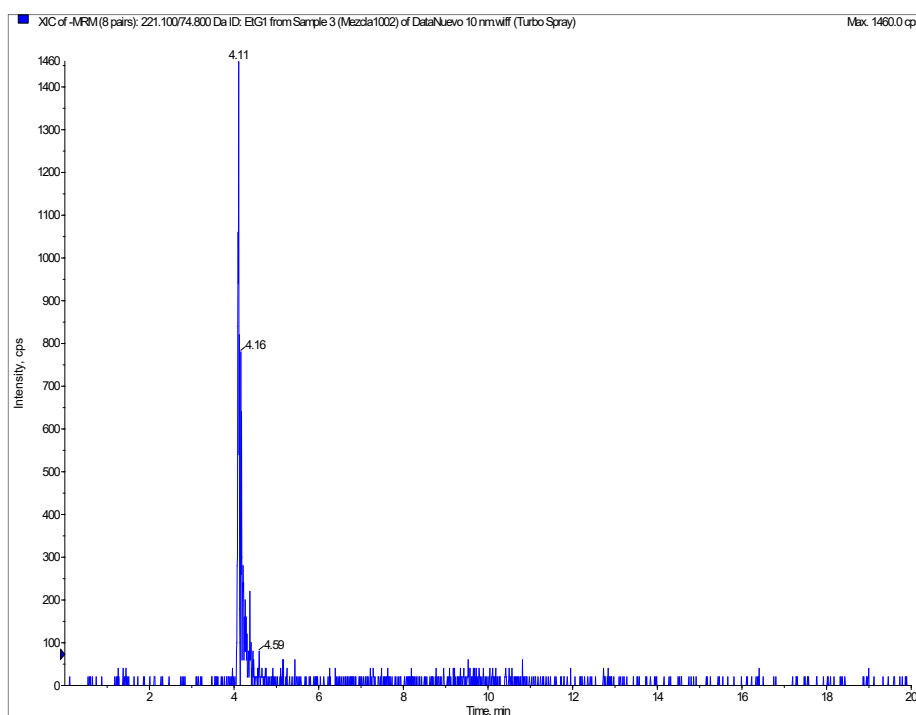
La formación de la capa de agua encargada de la retención en la columna está directamente relacionada con la entalpía de solvatación de los iones que componen la sal empleada como sistema tampón, ya que constituye una medida de la capacidad que tienen de arrastrar moléculas de agua a la superficie de la fase estacionaria <sup>[34]</sup>. La diferencia en las sales empleadas se encuentra en el anión y, debido a que el anión acetato posee una menor entalpía de solvatación <sup>[34]</sup>, esperaríamos que este generase una mayor capa de agua y, por ende, reteniendo el analito.

No obstante, como ya hemos mencionado anteriormente, el pH tiene un papel fundamental en las interacciones analito-fase estacionaria y en este experimento el pH de ambas fases móviles provoca la total ionización del EtG y EtG-d5 ( $pK_a=3,45$  <sup>[13]</sup>) y de

los grupos silanol ( $pK_a=3,8-4,2$  [38]), lo que genera repulsiones electrostáticas que impiden la retención.

El ácido acético, el ácido conjugado del anión acetato, tiene un  $pK_a=4,55$  [43] mientras que el ácido fórmico, el ácido conjugado del anión formiato, tiene un  $pK_a=3,75$  [43]. Esto implica que podremos alcanzar menores pH con el formiato amónico, reduciendo de este modo dichas repulsiones electrostáticas y consiguiendo una mejora en la retención.

Por este motivo, se decidió repetir el experimento empleando una fase móvil acuosa de formiato amónico 10 mM (pH ajustado a 3,78). De este modo, se consigue la retención del analito (Figura 1).



*Figura 1: Cromatograma para la transición cuantificadora obtenido con una fase móvil acuosa de formiato amónico 10 mM en agua (pH=3,78)*

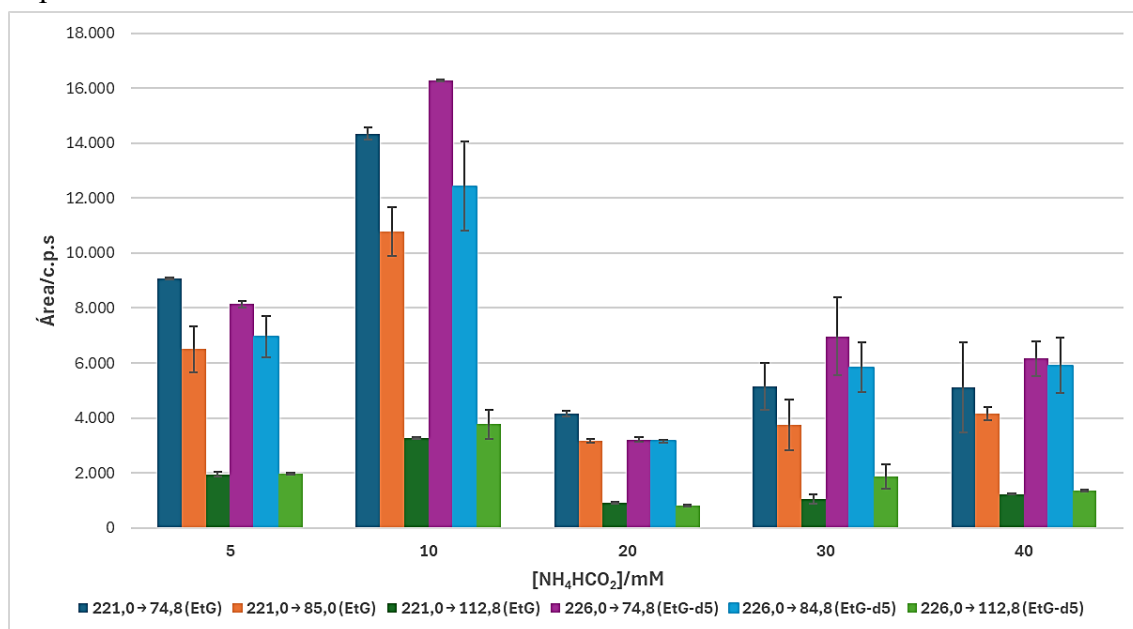
#### **4.2. Optimización de la concentración de tampón**

Se realizaron pruebas con cinco fases móviles con concentraciones de formiato amónico de 5, 10, 20, 30 y 40 mM. A estas fases móviles se les añadieron 30  $\mu$ l de ácido fórmico ya que sin él el pH oscila entre 6,4 y 7,2 (Tabla 2) lo que genera repulsiones que, como hemos visto en el punto anterior, impiden la retención de nuestro analito.

**Tabla 2:** Concentración de sal y pH de las fases móviles (V=100 ml) antes (pH inicial) y después (pH final) de la adición de ácido fórmico

$[\text{NH}_4\text{HCO}_2]/\text{mM}$	pH inicial	pH final
5	7,24	3,73
10	7,14	3,85
20	6,56	4,12
30	6,63	4,36
40	6,38	4,37

En la Figura 2 observamos como para una concentración de 10 mM (pH=3,85) obtenemos las mayores áreas. Una mayor concentración del tampón se relaciona con una mayor separación entre la fase orgánica (acetonitrilo) y la fase acuosa lo que da como resultado un mayor grosor de la capa de agua <sup>[34]</sup> incrementando la retención nuestro analito. No obstante, concentraciones extremadamente altas de tampón pueden afectar a la sensibilidad del espectrómetro de masas debido a la formación de cristales en los conos de entrada al equipo, explicando el descenso de señal observado para concentraciones superiores a 10 mM.



**Figura 2:** Áreas (n=2) para las distintas transiciones del EtG y EtG-d5 en función de la concentración de formiato amónico en la fase acuosa.

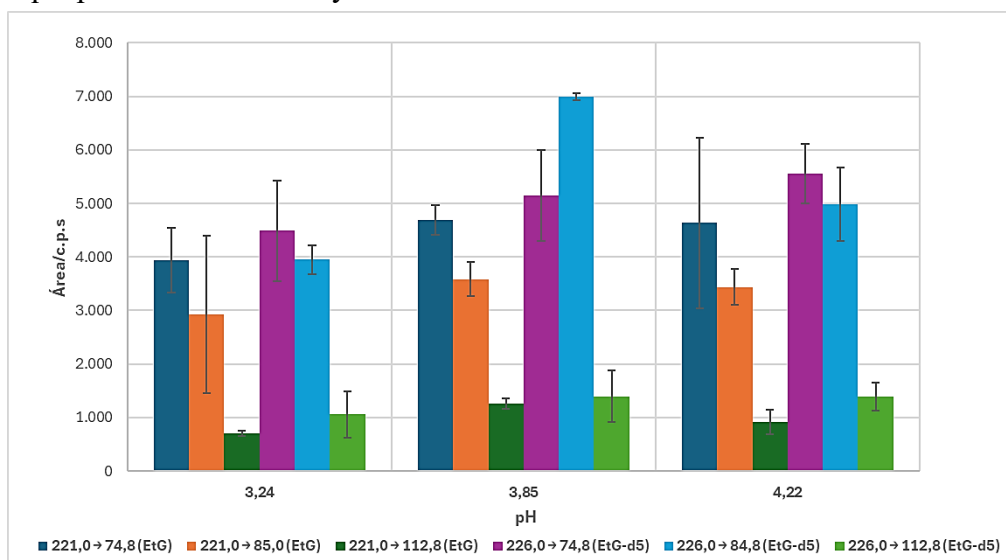
Como ya hemos mencionado, a estos pH tanto el analito, y su patrón interno, como la fase estacionaria se encuentran ionizados negativamente debido a su acidez, lo que implica la existencia de interacciones electrostáticas de repulsión. Al emplear una sal con

efecto tampón, los cationes se situarán sobre las cargas negativas de la fase estacionaria, apantallando sus cargas negativas y reduciendo la repulsión electrostática con el analito, un efecto que es proporcional a la concentración de tampón [34].

En conclusión, con una concentración de formiato amónico 5 mM no conseguimos formar una capa de agua lo suficientemente gruesa. A concentraciones superiores, aumentamos el grosor de esta capa de agua a la vez que minimizamos la repulsión electrostática entre el analito y la fase estacionaria, aunque esto afecta negativamente a la sensibilidad del espectrómetro de masas. Por tanto, a una concentración 10 mM obtenemos los mejores resultados debido al equilibrio entre todos estos factores.

### 4.3. Optimización del pH de la fase acuosa

Una vez optimizada la concentración de formiato amónico necesaria, procedemos a evaluar el efecto que puede tener el cambio en el pH. Para ello empleamos tres fases móviles una con pH 3,85, resultado del anterior apartado; otra con pH 3,24, para reducir la ionización de la fase estacionaria y el analito; y otra con pH 4,22, para observar el efecto que podría tener una mayor ionización.



**Figura 3:** Áreas ( $n=2$ ) para las distintas transiciones del EtG y EtG-d5 en función del pH de la fase acuosa.

En la Figura 3 se observa una ligera reducción de las áreas para el pH 3,24 en comparación con el pH 3,85 mientras que al comparar con el pH 4,22 las diferencias son mínimas, excepto para el patrón interno donde vemos que la señal es más intensa a pH 3,85. Además, con este pH vemos que las desviaciones típicas se reducen en comparación con las otras situaciones.

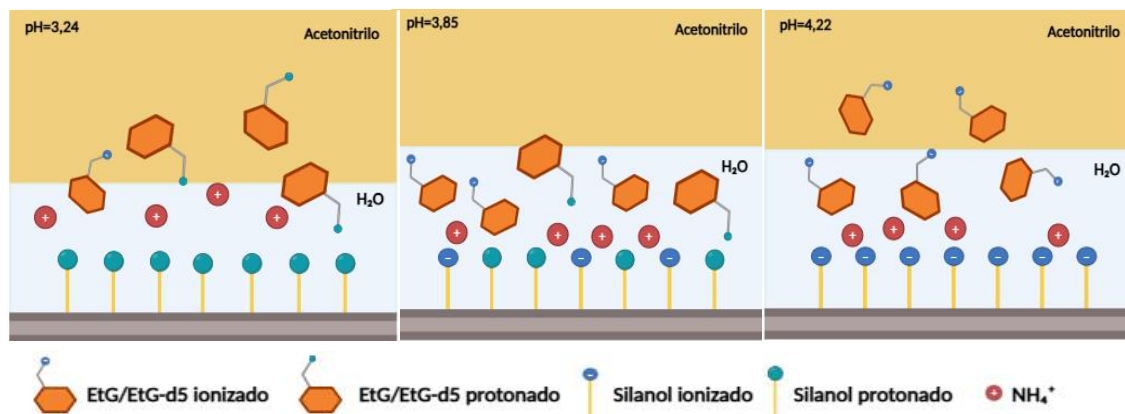
El pH afecta principalmente al estado de ionización del grupo carboxilo (-COOH) de nuestro analito, y su patrón interno, y de los grupos silanol (-SiOH) presentes en la fase estacionaria. Para ácidos débiles, como es nuestro caso, la retención disminuye a medida que aumenta el pH, debido a que todos estos grupos estarán cargados negativamente, resultando en repulsiones electrostáticas. Además, los cambios en la ionización de los grupos silanol puede resultar también en una alteración del grosor de la capa de agua <sup>[36]</sup>, afectando al mecanismo de partición hidrofílica.

En nuestro caso, a pH 4,22 (Figura 4) esperamos tener un alto grado de ionización tanto del EtG y EtG-d5 como de la fase estacionaria lo que resulta en interacciones electrostáticas repulsivas y en un aumento del grosor de la capa de agua. Esto a priori favorece la partición del analito a la capa de agua y por ende su retención, no obstante, los cationes del tampón no son capaces de apantallar totalmente las cargas negativas, siendo este el factor determinante en la reducción de la retención del compuesto, debido a la afectación del mecanismo de adsorción superficial.

En el otro extremo tenemos el pH 3,24 (Figura 4), donde en esta situación los grupos silanol estarán relativamente protonados al igual que en el EtG y el EtG-d5. Esta protonación reduce las repulsiones coulumbianas mejorando la adsorción, no obstante, el grosor de la capa de agua será menor y por tanto la partición hidrofílica se verá afectada negativamente. Esto se refleja en menores áreas para cada transición evaluada (Figura 3).

Por último, tenemos la situación intermedia a pH 3,85 (Figura 4) donde obtenemos los mejores resultados en cuanto a áreas para cada transición y a su respectiva desviación estándar. En este caso los grupos silanol se encuentran parcialmente protonados al igual que el EtG y EtG-d5. Por tanto, tendremos un equilibrio entre los procesos de partición hidrofílica y adsorción superficial a la fase estacionaria. La relativa ionización de los grupos silanol genera una mayor capa de agua que favorece la partición hidrofílica del analito mientras que la concentración de cationes procedentes de la disociación de la sal es la suficiente como para apantallar las cargas negativas de los grupos silanol, limitando

las repulsiones electrostáticas y beneficiando a la adsorción superficial del analito a la fase estacionaria.



**Figura 4:** Representación gráfica simplificada de lo que ocurre en el proceso de retención a distintos pH. Creado con <https://BioRender.com>.

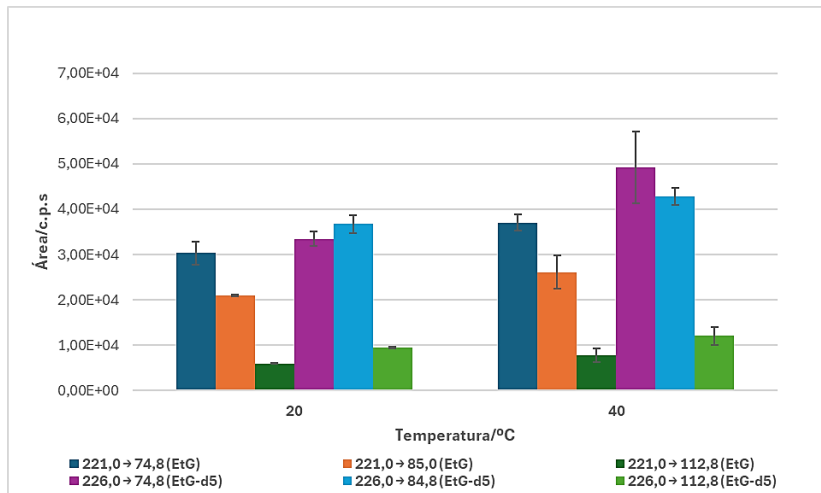
En conclusión, alterando el pH conseguimos favorecer los mecanismos de partición hidrofílica, al aumentar el pH, o de adsorción superficial, al reducir el pH, llegando a una solución de compromiso entre ambos procesos a pH 3,85 que maximiza la retención de nuestro analito.

#### 4.4. Optimización de la temperatura de la columna

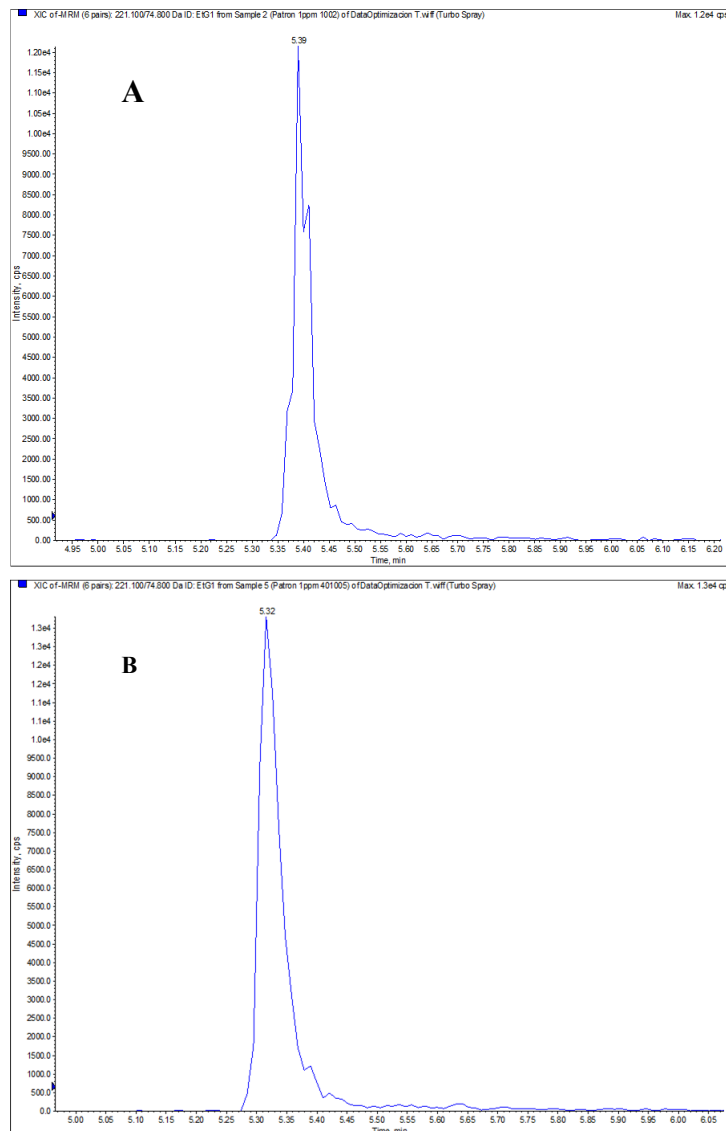
Tras haber optimizado la composición, concentración y pH de la fase móvil acuosa, estudiamos el efecto que tiene la temperatura en la retención. Para ello comparamos dos temperaturas, 20°C y 40°C.

En la Figura 5 podemos ver como a una temperatura de 40°C se produce un ligero incremento en las áreas para cada transición, aunque también se produce un ligero aumento de las desviaciones estándar, por lo que podríamos considerar que el aumento de temperatura afecta negativamente a nuestro método cromatográfico.

Sin embargo, si observamos los cromatogramas obtenidos (Figura 6) podemos ver una reducción en la cola de la banda cromatográfica en conjunto con una ligera reducción del ancho de dicha banda. Esto resulta ventajoso a efectos de cuantificar nuestro analito.



**Figura 5:** Áreas ( $n=2$ ) para las distintas transiciones del EtG y EtG-d5 en función de la temperatura de la columna cromatográfica.



**Figura 6:** Cromatogramas de la transición cuantificadora del EtG a dos temperaturas diferentes; **A:**  $T=20^{\circ}\text{C}$  y **B:**  $T=40^{\circ}\text{C}$

La temperatura de la columna tiene un efecto directo sobre la fase móvil,

reduciendo su viscosidad y aumentando la difusión del analito en esta <sup>[39]</sup> lo que explica la reducción en el ancho de la banda cromatográfica cuando aumentamos la temperatura a 40 °C.

Otro efecto relevante de la temperatura es sobre la energía libre de Gibbs de retención que consta de un término entálpico y otro entrópico <sup>[39]</sup>. La entalpía de retención hace referencia al proceso de transferencia del analito desde la fase móvil a la capa de agua retenida sobre la fase estacionaria. Este proceso es exotérmico cuando el proceso predominante en la retención es la partición hidrofílica mientras que es endotérmico cuando la retención está determinada por la formación de un par iónico <sup>[36]</sup>.

En este experimento observamos una reducción del tiempo de retención con el aumento en la temperatura, lo que nos indica que la retención está mediada por un proceso exotérmico, la partición hidrofílica, que es lo esperable ya que debido al grupo ácido del EtG y EtG-d5 no podrán formar pares iónicos con los grupos silanol de la fase estacionaria. Esto explica la reducción de la cola cromatográfica y del tiempo de retención ya que conseguimos reducir la retención de los compuestos a la columna.

El término entrópico hace referencia a los cambios conformacionales que puede tener una molécula en disolución <sup>[40]</sup> y que tienen distinta retención. Esto es relevante para moléculas como la glucosa que en disolución experimentan mutarrotación dando lugar a la aparición de tautómeros <sup>[40]</sup>. Debido a que el EtG y el EtG-d5 no experimentan mutarrotación, este término no será relevante en la retención en función de la temperatura.

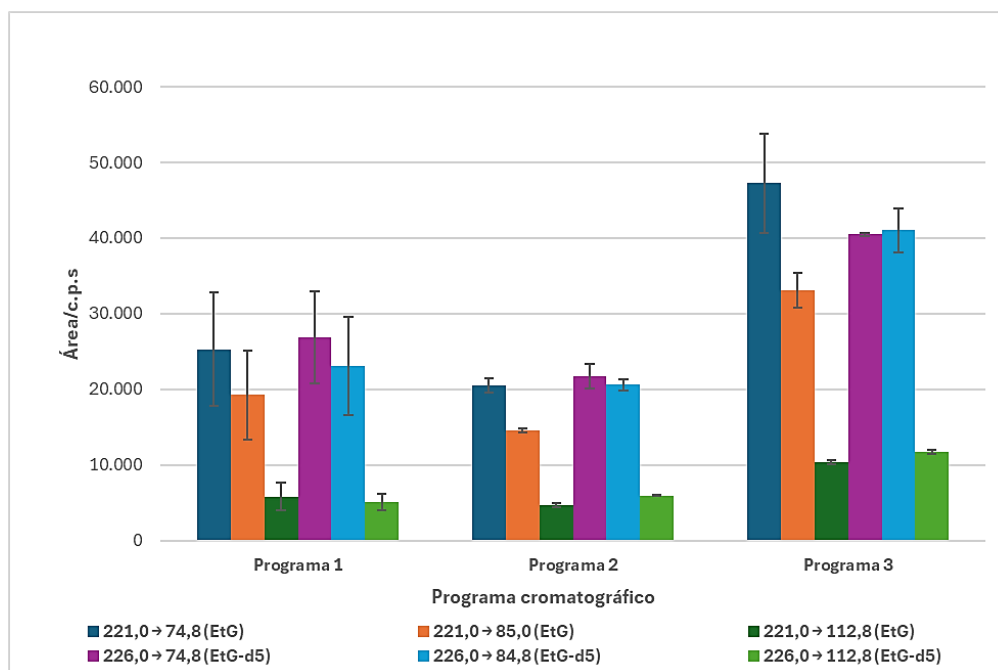
#### 4.5. Optimización del programa cromatográfico

Una vez optimizadas las condiciones de la fase móvil y la temperatura a la que tendrá lugar la separación cromatográfica, estudiamos el efecto que pueden tener distintos programas cromatográficos descritos en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Programas cromatográficos comparados

Tiempo/min	Programa 1		Programa 2		Programa 3	
	Flujo/ $\mu\text{l min}^{-1}$	%A	Flujo/ $\mu\text{l min}^{-1}$	%A	Flujo/ $\mu\text{l min}^{-1}$	%A
0 $\rightarrow$ 3,0	200	2	200	5	200	2
3,0 $\rightarrow$ 6,0	500	40	500	40	400	40
6,0 $\rightarrow$ 20,0	200	2	200	5	200	2

En la Figura 7 podemos observar los resultados obtenidos para los tres programas comparados.



**Figura 7:** Áreas ( $n=2$ ) para las distintas transiciones del EtG y EtG-d5 tras la aplicación de distintos programas cromatográficos.

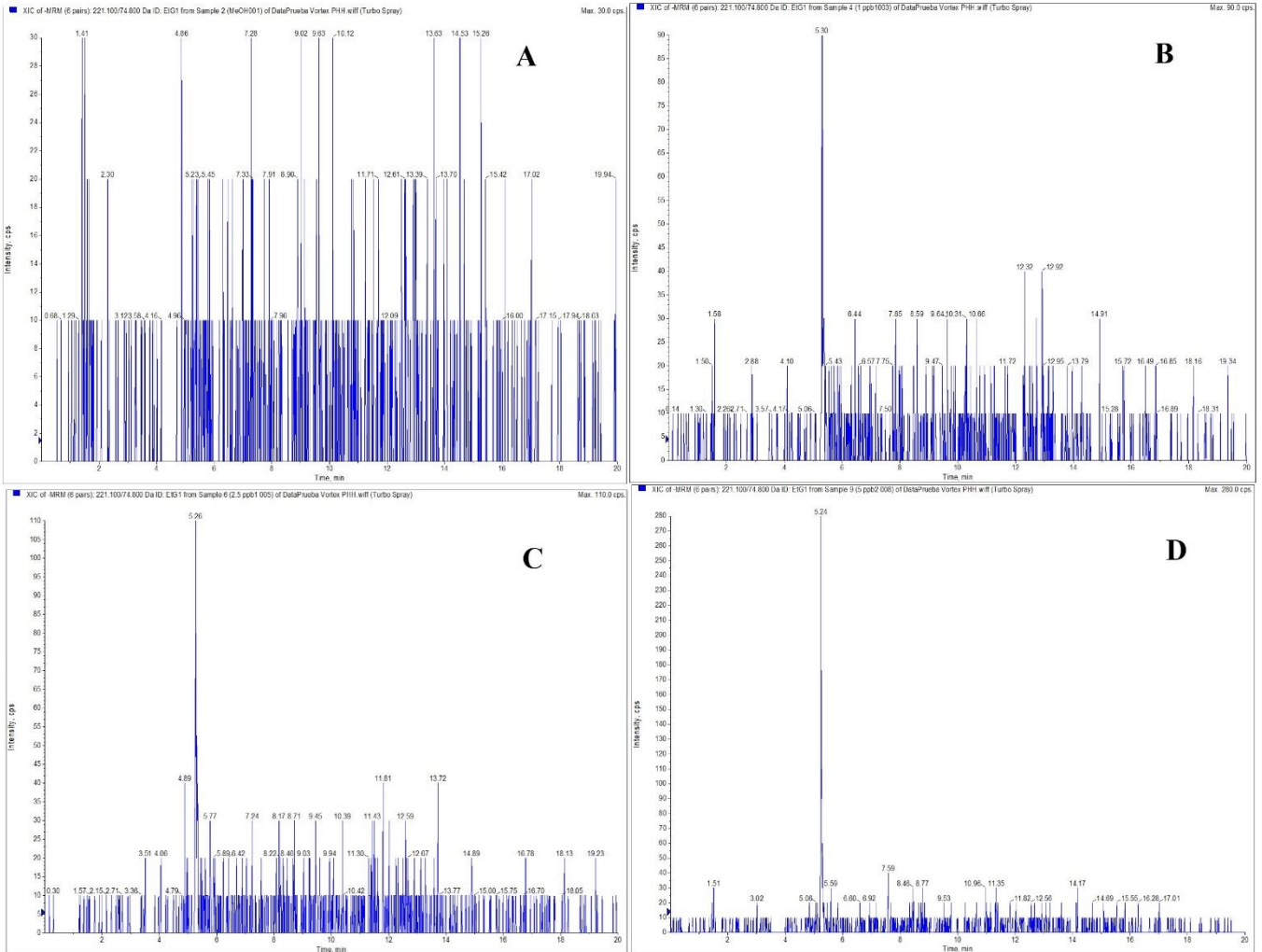
Los programas 1 y 2 (Tabla 3) comparan el efecto que tiene un porcentaje inicial de fase acuosa diferente, con la intención de aumentar el tamaño de la capa de agua encargada de la retención. No obstante, podemos ver que no hay grandes diferencias entre ambos programas en cuanto a áreas se refiere (Figura 7) lo que puede ser debido a que con un 2-3% la capa de agua ya es capaz de formarse<sup>[36]</sup> y un mayor porcentaje de agua no implica directamente una mejora en su formación.

Con los programas 2 y 3 (Tabla 3) tratamos de observar el efecto que tiene un menor flujo en la etapa de elución del analito. Vemos una gran mejora con el programa 3 (Figura 7) ya que con flujos altos podemos provocar que no todo el analito eluya a la vez debido a que no damos tiempo a que ocurra el proceso de transferencia de materia desde la fase estacionaria a la fase móvil en una misma banda.

#### 4.6. Calibración y límite de detección (LOD)

Una vez optimizada la separación cromatográfica realizamos una estimación inicial del LOD inyectando patrones de cada vez menor concentración. En la Figura 9 podemos observar los cromatogramas obtenidos. Vemos que para una concentración de 1  $\mu\text{g/l}$  (Figura 8B) ya conseguimos distinguir la señal del ruido por lo que a simple vista

podríamos determinar que este es el LOD. No obstante, esta señal no siempre aparecía y variaba en función de la sensibilidad del equipo, siendo mucho más reproducible la señal correspondiente a 2,5 µg/l (Figura 8C). Por tanto, inicialmente podemos afirmar que el LOD de nuestro método se encontrará entre 1 y 2,5 µg/l.



**Figura 8:** Cromatogramas de la transición cuantificadora obtenidos con un patrón de EtG de concentración **A:** 0 µg/l; **B:** 1 µg/l; **C:** 2,5 µg/l y **D:** 5 µg/l.

Además, durante el transcurso de esta investigación se realizaron rectas de calibrado en siete días diferentes obteniendo la siguiente pendiente media ( $\mu$ ) en función de las áreas de las bandas cromatográficas para la transición cuantificadora:

$$\mu = 51,5 \pm 15,4 \frac{\mu g}{l}$$

Otra forma de calcular el LOD consiste inyectar 11 blancos y calcular la desviación estándar ( $\sigma$ ) en las áreas obtenidas para luego aplicar la Ecuación 1. Con este método también podemos calcular el límite de cuantificación (LOQ, *Limit Of Quantification*) siguiendo la Ecuación 2.

$$LOD = \frac{3 \sigma}{\mu} \quad (1)$$

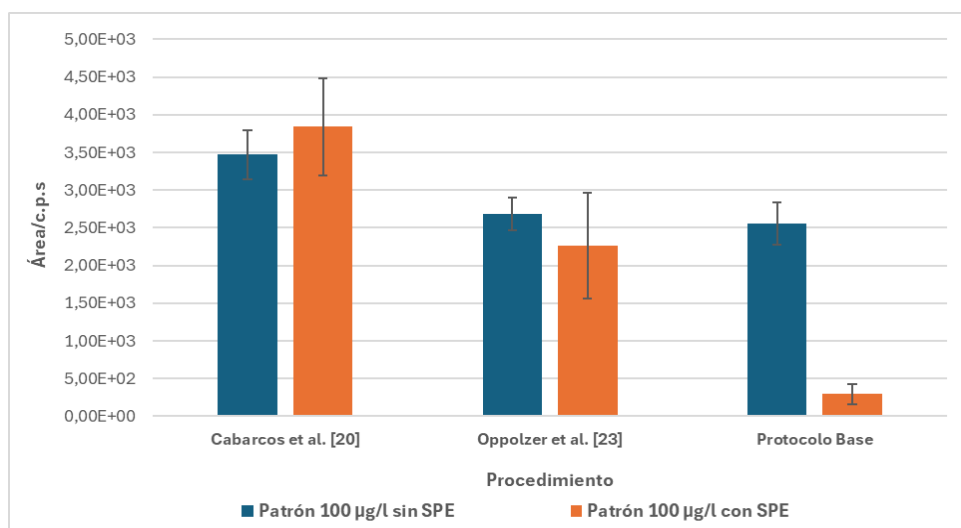
$$LOQ = \frac{10 \sigma}{\mu} \quad (2)$$

Con esto concluimos que el método posee un LOD = 1,76 µg/l y un LOQ = 5,86 µg/l que si lo referimos a la masa de pelo analizada obtenemos un LOD = 2,64 pg/mg y un LOQ = 8,79 pg/mg.

La SoHT establece unas concentraciones umbral de hEtG ≤ 5 pg/mg para considerar a una persona abstemia, de > 5 pg/mg para considerarla consumidora social, y ≥ 30 pg/mg para aquellas que realizan un consumo crónico excesivo [44]. Por tanto, el método desarrollado, es capaz de detectar concentraciones asociadas al no consumo de alcohol y es capaz de distinguir el consumo crónico del social. Posibles mejoras en la sensibilidad del procedimiento pasarían por incrementar la masa de muestra para llevar a cabo la extracción o bien reducir el volumen de fase móvil para reconstituir el extracto.

#### 4.7. Comparativa de protocolos de SPE

Durante esta investigación también se realizó un estudio para comparar el efecto que pueden tener los distintos protocolos de SPE, descritos anteriormente, en el resultado final del análisis empleando un patrón de EtG y EtG-d5 con una concentración de 100 µg/l y los cartuchos Copure MAX. En la Figura 9 podemos ver el resultado de este experimento.



**Figura 9:** Áreas (n=3) para la transición cuantificadora de un estándar de concentración 100 µg/l (sin SPE) y del mismo estándar tras un procedimiento SPE.

También se ha realizado una estimación cuantitativa del efecto matriz empleando la Ecuación 3 donde consideramos que no tiene implicaciones significativas en el proceso si obtenemos un resultado igual a  $100 \pm 20\%$ .

$$Efecto\ matriz = \frac{\text{Área}_{est\acute{a}ndar\ CON\ SPE}}{\text{Área}_{est\acute{a}ndar\ SIN\ SPE}} \times 100 \quad (3)$$

Lo primero que salta a la vista es que el protocolo Base no ofrece resultados satisfactorios y la señal detectada es mínima (Figura 9) en comparación con un patrón de la misma concentración. Al aplicar la Ecuación 3 obtenemos un resultado de  $11,5 \pm 5,3\%$  lo que demuestra claramente que este protocolo afecta al resultado analítico.

La principal diferencia entre este procedimiento y los demás es que la muestra es previamente basificada con  $\text{NH}_3$  5%. Los cartuchos Copure MAX son cartuchos de intercambio aniónico de modo mixto por lo que contienen dos grupos funcionales que provocan la retención del analito. Estos son grupos amonio cuaternarios aromáticos cargados positivamente y grupos fenilo hidrofóbicos<sup>[41]</sup>. Debido a la polaridad de nuestro analito, el principal responsable en la retención será el grupo amonio que interactúa con el grupo ácido carboxílico del EtG.

Inicialmente podríamos pensar que al alcalinizar la muestra conseguiríamos asegurar la desprotonación de este ácido, mejorando la retención en el cartucho, pero con este experimento se demuestra que realmente tiene un efecto contraproducente. Esto probablemente sea debido a que tiene lugar alguna interferencia en el intercambio aniónico que se produce en los grupos amonio cuaternarios, aunque no se ha encontrado bibliografía que justifique estos hechos.

Si observar los resultados obtenidos con los protocolos de Cabarcos et al.<sup>[20]</sup> y Oppolzer et al.<sup>[23]</sup> (Figura 9) vemos que se consigue con éxito la purificación de nuestro analito. En el caso del protocolo de Cabarcos et al.<sup>[20]</sup> vemos que aparece un efecto matriz potenciador con un resultado de  $110,8 \pm 18,6\%$  mientras que en el protocolo de Oppolzer et al.<sup>[23]</sup> aparece un efecto matriz supresor con un resultado de  $84,5 \pm 26,1\%$  por lo que, en principio, este último procedimiento tendría un mayor impacto en la señal analítica, aunque pueda encontrarse dentro de nuestro requerimientos.

Como podemos ver, las diferencias entre ambos procedimientos son pequeñas (Figura 9) por lo que podemos llegar a plantearnos si realmente existen diferencias en los

resultados obtenidos por cada uno de ellos. Para corroborarlo primero realizamos una prueba C de Cochran que nos permitirá determinar si las muestras analizadas presentan homocedasticidad, es decir, si sus varianzas son iguales con un nivel de confianza del 95,0%. Obtenemos un Valor-P de 0,93 que al ser superior a 0,05 (Valor-P > 0,05) podemos aceptar la hipótesis nula y afirmar que las varianzas son iguales.

Con este resultado, procedemos a realizar un análisis de varianza (ANOVA) para verificar la similitud en los resultados de ambos protocolos SPE. Los resultados (Tabla 4) ofrecen un Valor-P > 0,05 por lo que podemos afirmar, con un nivel de confianza del 95%, que los resultados obtenidos por ambos protocolos son idénticos y ninguno de los dos protocolos empleados durante la SPE afecta a la señal analítica.

**Tabla 4:** Resultados del ANOVA de dos protocolos SPE

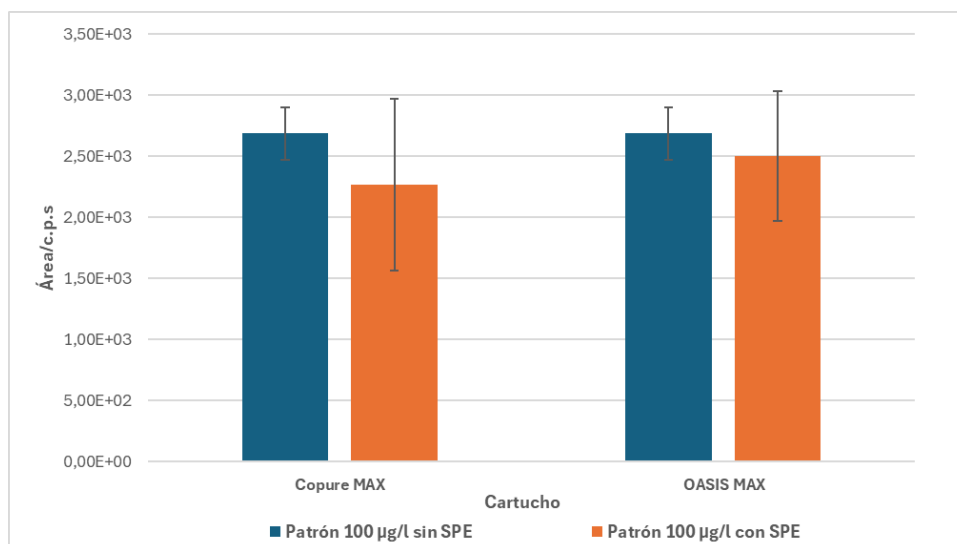
<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>GL*</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>Entre-grupos</b>	$2,97369 \cdot 10^6$	1	$2,97369 \cdot 10^6$	6,72	0,0809
<b>Intra-grupos</b>	$1,32703 \cdot 10^6$	3	442342		
<b>Total</b>	$4,30071 \cdot 10^6$	4			

\*GL: Grados de libertad

Sumado a este estudio, realizamos una comparativa entre los cartuchos OASIS MAX y Copure MAX que son equivalentes entre sí <sup>[42]</sup> y presentan en su matriz polimérica los mismos grupos funcionales encargados de la retención. En la Figura 10 se pueden ver los resultados de este experimento.

Aplicando la Ecuación 4 obtenemos un efecto matriz de  $84,5 \pm 26,1\%$  para el cartucho Copure MAX, y de  $93,2 \pm 19,7\%$  para el cartucho OASIS MAX. Con este resultado podríamos suponer no hay grandes diferencias en el resultado analítico en función de la casa comercial. Para corroborarlo seguiremos el proceso comentado en el experimento anterior de comparación de protocolos SPE.

Primero realizamos una prueba C de Cochran para comprobar la homocedasticidad de las muestras y obteniendo un Valor-P de 0,82 que al ser superior al 0,05 (valor-P > 0,05) podemos afirmar con un nivel de confianza del 95% que las varianzas son iguales. Posteriormente realizamos un ANOVA cuyos resultados se recogen en la Tabla 5.



**Figura 10:** Áreas ( $n=3$ ) para la transición cuantificadora del EtG de un estándar de 100 µg/l (sin SPE) y un estándar de la misma concentración tras SPE con cartucho Copure MAX y OASIS MAX siguiendo el procedimiento de Oppolzer et al. [23]

**Tabla 5:** Resultados del ANOVA de dos cartuchos de SPE

Fuente	Suma de Cuadrados	GL*	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre-grupos	54377,6	1	54377,6	0,14	0,7433
Intra-grupos	771038	2	385519		
<b>Total</b>	<b>825415</b>	<b>3</b>			

\*GL: Grados de libertad

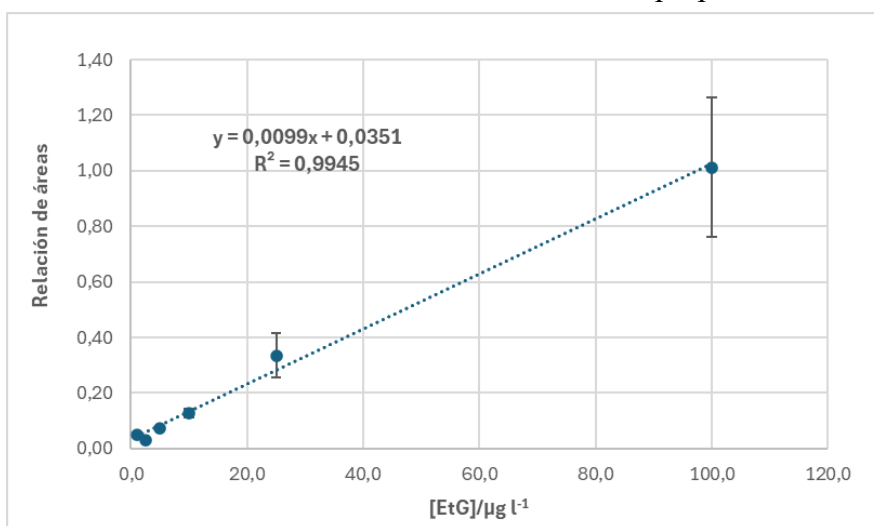
De nuevo, obtenemos un Valor-P > 0,05 (Tabla 5) por lo que podemos afirmar con un nivel de confianza del 95% que los resultados obtenidos con ambos cartuchos son idénticos y no afectan al resultado analítico.

En conclusión, estos experimentos nos muestran que los protocolos de SPE diseñados por Cabarcos et al. [20] y Oppolzer et al. [23] producen resultados satisfactorios

y equivalentes. Además, el empleo de un cartucho de distinta casa comercial, pero mismo adsorbente y protocolo aplicado, no produjo efectos en la señal analítica. Por último, el protocolo Base no consiguió retener el analito en el adsorbente, siendo necesaria su revisión y optimización en posteriores investigaciones.

#### 4.8. Aplicación a una muestra real

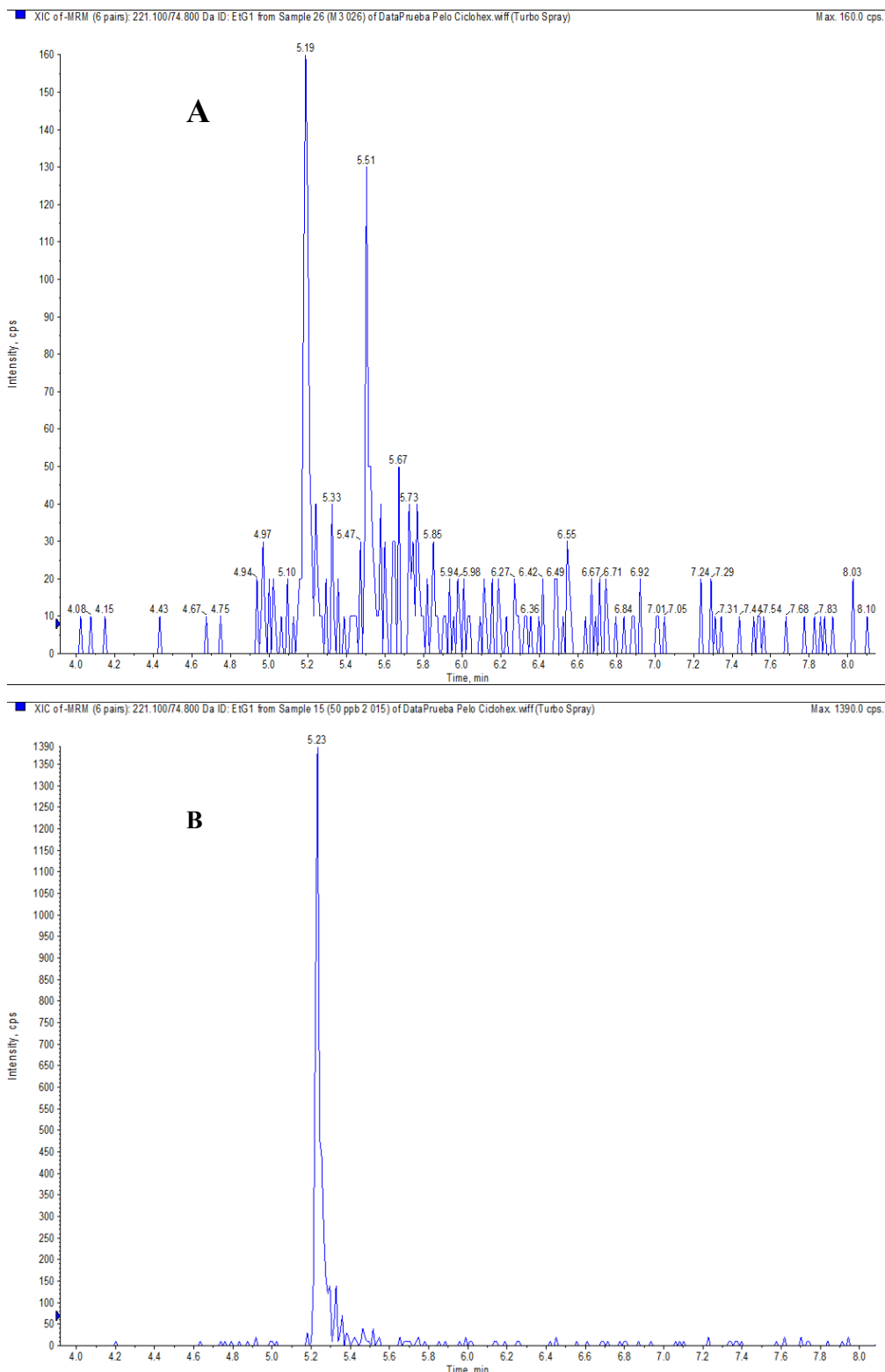
Tras verificar la sensibilidad del método analítico, lo aplicamos a una muestra de pelo obtenida mediante mezcla de muestras de consumidores crónicos de alcohol proporcionada por el Departamento de Toxicología Forense del Instituto de Ciencias Forenses. Se siguieron los procedimientos de extracción y el protocolo SPE de Oppolzer et al. [23], ambos detallados en la sección de Materiales y Métodos. En la Figura 11 podemos observar una recta de calibrado elaborada con este propósito.



**Figura 11:** Recta de calibrado donde se muestra la relación de áreas cromatográficas para la primera transición del EtG y EtG-d5 frente a la concentración de EtG.

En la Figura 12 observamos los cromatogramas de una de las réplicas de la muestra real y de un patrón de concentración similar. Vemos como la señal de la muestra es muy inferior a la del patrón por lo que existe un efecto matriz supresor que deberá ser evaluado en futuras investigaciones.

La muestra de pelo dio como resultado una concentración de EtG de  $42,9 \pm 5,1$  pg/mg lo que tiene concordancia con el hecho de que provenía de personas que mantenían un consumo crónico de alcohol.



**Figura 12:** Cromatogramas de la transición cuantificadora del EtG. **A:** Muestra real. **B:** Patrón de 50 µg/l

## **5. Conclusiones**

### **Español**

1. La cromatografía líquida en tándem con la espectrometría de masas, y más concretamente con el empleo de HILIC, constituye una técnica adecuada para el estudio del etilglucurónido en pelo (hEtG).
2. Se ha desarrollado un método con un LOD de 2,64 pg/mg que permite diferenciar entre personas abstemias (niveles de hEtG < 5 pg/mg), personas con un consumo social de alcohol (niveles de hEtG > 5 pg/mg) y personas con consumo crónico (niveles de hEtG ≥ 30 pg/mg).
3. El protocolo de SPE seguido, así como la casa comercial del cartucho, no afectan al resultado analítico.

### **Galego**

1. A cromatografía líquida en tándem coa espectrometría de masas, e máis concretamente coa aplicación de HILIC, constitúe unha técnica adecuada para o estudio do etilglucurónico no cabelo (hEtG).
2. Obtívose un método cun LOD 2,64 pg/mg o que permite diferenciar entre persoas abstencionistas (niveis de hEtG < 5 pg/mg), persoas con consumo social de alcol (niveis de hEtG > 5 pg/mg) e persoas con consumo crónico (niveis de hEtG ≥ 30 pg/mg).
3. O protocolo SPE seguido, así como a casa comercial do cartucho, non afectan ao resultado analítica.

### **Inglés**

1. Liquid chromatography with tandem mass spectrometry, especially with the use of HILIC, makes an optimal analytical technique for the analysis of hair ethyl glucuronide (hEtG)
2. We developed an analytical method with a LOD 2,64 pg/mg which allows the discrimination between abstainers (hEtG levels below 5 pg/mg), social drinkers (hEtG levels above 5 pg/mg), and chronic drinkers (hEtG levels at or above 30 pg/mg).
3. The SPE protocol followed, as well as the cartridge's manufacturer, doesn't affect the analytical result.

## 6. Bibliografía

- [1] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. *Alcohol use*. Sitio web. Disponible en: <https://www.who.int/europe/news-room/fact-sheets/item/alcohol-use>. [Consulta: 08-02-2025]
- [2] BIONDI, A., FRENI, F., CARELLI, C., MORETTI, M. y MORINI, L. Ethyl glucuronide hair testing: A review. *Forensic Science International*. En línea. Vol.300 (2019), pp. 106-119. ISSN 0379-0738. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.05.004>. [Consulta: 12-02-2025]
- [3] ARAGÓN, C., MIQUEL, M., CORREA, M. Y SANCHIS-SEGURA, C. Alcohol y metabolismo humano. *Adicciones*. En línea. Vol.14 (2002), nº5, pp. 23-42. ISSN 0214-4840. Disponible en: <https://doi.org/10.20882/adicciones.541>. [Consulta: 12-02-2025]
- [4] DINIS-OLIVEIRA, R.J. Oxidative and Non-Oxidative Metabolomics of Ethanol. *Current Drug Metabolism*. En línea. Vol.17 (2016), nº4, pp. 327-335. DOI 10.2174/1389200217666160125113806. Disponible en: <https://doi.org/10.2174/1389200217666160125113806>. [Consulta: 12-02-2025]
- [5] MAENHOUT, T.M., DE BUYZERE, M.L. Y DELANGHE, J.R. Non-oxidative ethanol metabolites as a measure of alcohol intake. *Clinica Chimica Acta*. En línea. Vol. 415 (2013), pp. 322-329. DOI 10.1016/j.cca.2012.11.014 Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2012.11.014>. [Consulta: 12-02-2025]
- [6] ALMAZROO, O.A., KOWSER MIAH, M. y VENKATARAMANAN, R. Drug Metabolism in the Liver. *Clinics in Liver Disease*. En línea. Vol.21 (2017), nº1, pp. 1-20. DOI 10.1016/j.cld.2016.08.001 Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cld.2016.08.001> . [Consulta: 12-02-2025]
- [7] KING, R.S. Biotransformations in Drug Metabolism. En: NASSAR, A.F., HOLLENBERG, P.F., SCANTINA, J., KANTI MANNA, S. Y ZENG, S. *Drug Metabolism Handbook: concepts and applications in cancer research*, pp 17-39. 2º edición. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. ISBN 9781119851011
- [8] CABALLERÍA, J. Current Concepts in Alcohol Metabolism. *Annals of Hepatology*. En línea. Vol.2 (2003), nº2, pp. 60-68. DOI 10.1016/S1665-2681(19)32143-X. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/s1665-2681\(19\)32143-x](https://doi.org/10.1016/s1665-2681(19)32143-x) [Consulta: 12-02-2025]

- [9] PALMER, R.B. A review of the use of ethyl glucuronide as a marker for ethanol consumption in forensic and clinical medicine. *Seminars in Diagnostic Pathology*. En línea. Vol.26 (2009), nº1, pp. 18-27. DOI 10.1053/j.semdp.2008.12.005. Disponible en: <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2008.12.005>. [Consulta: 12-02-2025]
- [10] CRUNELLE, C.L., YEGLES, M., VAN NUIJS, A.L.N., COVACI, A., DE DONCKER, M., et al., Hair ethyl glucuronide levels as a marker for alcohol use and abuse: A review on the current state of the art. *Drug and Alcohol Dependence*. En línea. Vol.134 (2014), pp. 1-11. DOI 10.1016/j.drugalcdep.2013.10.008. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2013.10.008>. [Consulta: 02-03-2025]
- [11] CABARCOS, P., ÁLVAREZ, I, TABERNERO, M.J. y BERMEJO, A.M. Determination of direct alcohol markers: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. En línea. Vol.407 (2015), nº17, pp. 4907-4925. DOI 10.1007/s00216-015-8701-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8701-7>. [Consulta: 02-03-2025]
- [12] JONES, A.W. Brief history of the alcohol biomarkers CDT, EtG, EtS, 5-HTOL, and PEth. *Drug Testing and Analysis*. En línea. Vol.16 (2024), nº6, pp. 570-587. DOI 10.1002/dta.3584. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/dta.3584>. [Consulta: 02-03-2025]
- [13] DRUGBANK. *Metabolite Ethyl glucuornide*. En línea. Disponible en: <https://go.drugbank.com/metabolites/DBMET00585>. [Consulta: 02-03-2025]
- [14] WURST, F.M. y METZGER, J. The Ethanol Conjugate Ethyl Glucuronide Is a Useful Marker of Recent Alcohol Consumption. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. En línea. Vol.26 (2002), nº7, pp. 1114-1119. DOI 10.1111/j.1530-0277.2002.tb02646.x. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2002.tb02646.x>. [Consulta: 03-03-2025]
- [15] KINTZ, P., SALOMONE, A. y VINCENTI, M. *Hair Analysis in Clinical and Forensic Toxicology*. Ebook. Londres: Academic Press, 2015. DOI 10.1093/occmed/kqw143. Disponible en: <https://shorturl.at/3BT7o>. [Consulta: 19-04-2025]
- [16] JANDA, I., WEINMANN, W., KUEHNLE, T., LAHODE, M. y ALT, A. Determination of ethyl glucuronide in human hair by SPE and LC-MS/MS. *Forensic*

*Science International*. En línea. Vol.128 (2002), nº1-2 , pp. 59-65. DOI 10.1016/s0379-0738(02)00163-9. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(02\)00163-9](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(02)00163-9). [Consulta: 30-04-2025]

[17] MORINI, L., POLITI, L., GROPPA, A., STRAMESI, C. y POLETTINI, A. Determination of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*. En línea. Vol.41 (2006), nº1, pp. 34-42. DOI 10.1002/jms.943. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jms.943>. [Consulta: 30-04-2025]

[18] ÁLVAREZ, I., BERMEJO, A.M., TABERNERO, M.J., FERNÁNDEZ, P., CABARCOS, P., et al. Microwave-assisted extraction: a simple and faster method for the determination of ethyl glucuronide in hair by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. En línea. Vol.393 (2009), pp. 1345-1350. DOI 10.1007/s00216-008-2546-2. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2546-2>. [Consulta: 30-04-2025]

[19] CONCHEIRO, M., CRUZ, A., MON, M., DE CASTRO, A., QUINTELA, O., et al. Ethylglucuronide Determination in Urine and Hair from Alcohol Withdrawal Patients. *Journal of Analytical Toxicology*. En línea. Vol.33 (2009), nº3, pp. 155-161. DOI 10.1093/jat/33.3.155. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/jat/33.3.155>. [Consulta: 30-04-2025]

[20] CABARCOS, P., HASSAN, H.M., TABERNERO, M.J. y SCOTT, K.S. Analysis of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography-electrospray ionization–tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). *Journal of Applied Toxicology*. En línea. Vol.33 (2013), nº7, pp. 638-643. DOI 10.1002/jat.1791. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jat.1791> [Consulta: 15-05-2025]

[21] PIRRO, V., DI CORCIA, D., SEGANTI, F., SALOMONE, A. y VINCENTI, M. Determination of ethyl glucuronide levels in hair for the assessment of alcohol abstinence. *Forensic Science International*. En línea. Vol.232 (2013), nº1-3, pp. 229-236. DOI 10.1016/j.forsciint.2013.07.024. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.07.024>. [Consulta: 30-04-2025]

[22] YALDIZ, F., DAGLIOGLU, N., HILAL, A., KETEN, A. y GÜLMEN. M.K. Determination of ethyl glucuronide in human hair by hydrophilic interaction liquid

chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Forensic and Legal Medicine*. En línea. Vol.20 (2013), n°7, pp. 799-802. DOI 10.1016/j.jflm.2013.06.013. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2013.06.013> [Consulta: 30-04-2025]

[23] OPPOLZER, D., BARROSO, M., PASSARINHA, L. y GALLARDO, E. Determination of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl esters in hair samples. *Biomedical Chromatography*. En línea. Vol.31 (2017), n°4, pp. e3858. DOI 10.1002/bmc.3858. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/bmc.3858>. [Consulta: 15-05-2025]

[24] LENDOIRO, E., DE CASTRO, A., JIMÉNEZ-MORIGOSA, C., GÓMEZ-FRAGUELA, X.A., LÓPEZ-RIVADULLA, M., et al. Usefulness of hair analysis and psychological tests for identification of alcohol and drugs of abuse consumption in driving license regranting. *Forensic Science International*. En línea. Vol.286 (2018), pp. 239-244. DOI 10.1016/j.forsciint.2018.03.023. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.03.023>. [Consulta: 30-04-2025]

[25] PALUMBO, D., FAIS, P., CALÌ, A., LUSARDI, M., BERTOL, E., et al. Novel zwitterionic HILIC stationary phase for the determination of ethyl glucuronide in human hair by LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*. En línea. Vol.1100-1101 (2018), pp. 33-38. DOI 10.1016/j.jchromb.2018.09.027. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.09.027>. [Consulta: 30-04-2025]

[26] KIM, Y.G., HWANG, J., CHOI, H. y LEE, S. Development of a Column-Switching HPLC-MS/MS Method and Clinical Application for Determination of Ethyl Glucuronide in Hair in Conjunction with AUDIT for Detecting High-Risk Alcohol Consumption. *Pharmaceutics*. En línea. Vol.10 (2018), n°3, pp. 84. DOI 10.3390/pharmaceutics10030084. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030084>. [Consulta: 30-04-2025]

[27] MALACA, S., MASTROBATTISTA, L., MORTALI, C., GIORGETTI, R. y ZAAMI, S. Improvement of hair testing for Ethylglucuronide by supported liquid extraction and ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. En línea. Vol.174 (2019), pp. 707-710. DOI 10.1016/j.jpba.2019.07.005. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.07.005>. [Consulta: 30-04-2025]

- [28] GROFF, E., LUCCHIARI, M., STOCCHERO, G., DONINI, F. y MARCHIO, G.M. Comparison of two method for the extraction of ethylglucuronide from hair. *Drug Testing and Analysis*. En línea. Vol.16 (2024), n°1, pp. 65-70. DOI 10.1002/dta.3516. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/dta.3516> [Consulta: 01-05-2025]
- [29] SHIN, D.W., KIM, S.Y., SUH, S.I. y KIM, J.Y. Simultaneous determination of ethyl glucuronide, cocaine, cocaethylene, and benzoylecgonine in hair by using LC–MS/MS. *Journal of Analytical Science and Technology*. En línea. Vol.15 (2024), n°8. DOI 10.1186/s40543-023-00412-2. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s40543-023-00412-2>. [Consulta: 30-04-2025]
- [30] VANDELLI, D., PALAZZOLI, F., VERRI, P., CASTAGNETTI, V., PROFETA, C., et al. A novel method for the simultaneous determination of drugs of abuse, ethyl glucuronide and synthetic opioids in human hair through a single digestion, purification and analysis in LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*. En línea. Vol.1246 (2024), pp.124269. DOI 10.1016/j.jchromb.2024.124269. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2024.124269> [Consulta: 30-04-2025]
- [31] ODOARDI, S., MESTRIA, S., VALENTINI, V., BIOSA, G. y ROSSI, S.S. Rapid and Effective Determination of Ethyl Glucuronide in Hair by Micro Extraction by Packed Sorbent (MEPS) and LC-MS/MS. *Drug Testing and Analysis*. En línea. (2024). DOI 10.1002/dta.3824. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/dta.3824> [Consulta: 01-05-2025]
- [32] MÜLLER, A., y IWERSEN-BERGMANN, S. Determination of ethyl glucuronide in human hair samples: Decontamination vs. extraction. *Drug Testing and Analysis*. En línea. Vol.12 (2020), n°7, pp. 948-956. DOI 10.1002/dta.2791. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/dta.2791> [Consulta: 01-05-2025]
- [33] MUELLER, A., JUNGEN, H., IWERSEN-BERGMANN, S., RADUENZ, L., LEZIUS, S., et al. Determination of ethyl glucuronide in human hair samples: A multivariate analysis of the impact of extraction conditions on quantitative results. *Forensic Science International*. En línea. Vol.271 (2017), pp. 43-48. DOI 10.1016/j.forsciint.2016.12.011. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.12.011> [Consulta: 01-05-2025]

- [34] AL-TANNAK, N.F., BAWAZEER, S. Y WATSON, D.G. Exploring the Effect of Buffer Strength on the Retention Time of Weak Acids, Neutral and Weak Bases in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) Mode. *Current Analytical Chemistry*. En línea. Vol.15 (2019), n°1, pp. 34-46. DOI 10.2174/1573411014666180806152818. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2174/1573411014666180806152818>. [Consulta: 05-06-2025]
- [35] GUO, Y. y BARAN, D. Hydrophilic Partitioning or Surface Adsorption? A Quantitative Assessment of Retention Mechanisms for Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC). *Molecules*. En línea. Vol.28 (2023), n°18, pp. 6459. DOI 10.2174/1573411014666180806152818. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2174/1573411014666180806152818>. [Consulta: 05-06-2025]
- [36] GRECO, G. y LETZEL, T. Main Interactions and Influences of the Chromatographic Parameters in HILIC Separations. *Journal of Chromatographic Science*. En línea. Vol.51 (2013), n°7, pp. 684-693. DOI 10.1093/chromsci/bmt015. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmt015>. [Consulta: 05-06-2025]
- [37] McCALLEY, D. V. Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. En línea. Vol.1523 (2017), pp. 49-71. DOI 10.1016/j.chroma.2017.06.026. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.06.026>. [Consulta: 05-06-2025]
- [38] TAYLOR, T. *The LCGC Blog: Silica for HPLC Stationary Phases – A Five Minute Guide*. En línea. Disponible en: <https://shorturl.at/1CAVr>. [Consulta: 05-06-2025]
- [39] JANDERA, P. y JANÁS, P. Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography, A review. *Analytica Chimica Acta*. En línea. Vol.967 (2017), pp. 12-32. DOI 10.1016/j.aca.2017.01.060. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.060> [Consulta: 05-06-2025]
- [40] HAO, Z., XIAO, B. y WENG, N. Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *Journal of Separation Science*. En línea. Vol.31 (2008), n°9, pp. 1449-1464. DOI 0.1002/jssc.200700624. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jssc.200700624>. [Consulta: 05-06-2025]

[41] BIOCOTMA. *Solid Phase Extraction*. En línea. Disponible en: <https://shorturl.at/GVIK7>. [Consulta: 05-06-2025]

[42] BIOCOTMA. *Copure® MAX Mixed-mode Anion Exchange*. En línea. Disponible en: <https://shorturl.at/g7m8i>. [Consulta: 05-06-2025]

[43] NIH. *Pubchem*. Sitio web. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> [Consulta: 09-06-2025]

[44] SOCIETY OF HAIR TESTING. 2019 Consensus for the use of alcohol markers in hair for supporting the assessment of abstinence and chronic alcohol consumption. En línea. Disponible en: [https://www.soht.org/images/pdf/Alcohol%20consensus\\_final\\_aug19.pdf](https://www.soht.org/images/pdf/Alcohol%20consensus_final_aug19.pdf) [Consulta: 09-06-2025]

## Anexo I

**Tabla 1:** Resumen de las características de los métodos consultados durante la búsqueda bibliográfica (hasta 30/04/2025)

Autor	Técnica	Descontaminación	Método de extracción	Método de purificación	Columna	Fase móvil	Intervalo de linealidad/ pg mg <sup>-1</sup>	LOD/ pg mg <sup>-1</sup>	LOQ/ pg mg <sup>-1</sup>
<b>I. Janda et al. (2002)</b> <sup>[16]</sup>	HPLC-MS/MS	Metanol + Acetona	Ultrasonicación (3h, 50°C)	SPE: ISOLUTE NH <sub>2</sub> (Aminopropilo)	Fenil-Hexilo	Agua con 1% Acetonitrilo+ 0,1% Ácido fórmico	25 – 2 000	51	102
<b>L. Morini et al. (2006)</b> <sup>[17]</sup>	HPLC-MS/MS	1. Diclorometano 2. Metanol	Incubación (25 °C una noche) + Ultrasonicación (2h)	-----	C18	A: 0,1% Ácido fórmico/Agua B: Acetonitrilo	3 – 2 000	2	3
<b>I. Álvarez et al. (2009)</b> <sup>[18]</sup>	GC-MS	1. Solución Twenn <sup>TM</sup> 2. Agua	Extracción asistida por microondas (11 min, 110 °C)	-----	-----	-----	300 – 10 000	100	300
<b>M. Concheiro et al. (2009)</b> <sup>[19]</sup>	HPLC-MS/MS	1. Diclorometano 2. Metanol	Ultrasonicación (2h) + Incubación (una noche)	Filtración	Carbono grafitizado poroso	A: 0,1% Ácido fórmico/Agua B: Acetonitrilo	50 – 5 000	25	50
<b>P. Cabarcos et al. (2012)</b> <sup>[20]</sup>	HPLC-MS/MS	1. Agua 2. Diclorometano	Ultrasonicación (15 min)	SPE: Oasis MAX	C18	A: Ácido Fórmico B: Acetonitrilo	20 – 2 500	10	20

<b>V. Pirro et al. (2013)</b> <sup>[21]</sup>	UHPLC-MS/MS	1. Diclorometano 2. Metanol	Incubación (15h) + Ultrasonificación (90 min)	-----	C18	A: Ácido Fórmico 5 mM/Agua B: Ácido fórmico/Acetonitrilo 5 mM	1 - 10	0,5	1
<b>F. Yaldiz et al. (2013)</b> <sup>[22]</sup>	HPLC-MS/MS	Agua	Ultrasonificación (15 min)	Filtración	HILIC	A: Acetato amónico 1mM/Agua B: Acetonitrilo	5 – 2 000	0,05	0,18
<b>D. Oppolzer et al. (2016)</b> <sup>[23]</sup>	HPLC-MS/MS	1. Agua 2. Metanol 3. Acetona 4. Diclorometano	Ultrasonificación (2h)	SPE: Oasis MAX	C18	A: 0,1% Ácido fórmico/Agua B: 0,1% Ácido fórmico/Acetonitrilo	3 - 500	---	3
<b>E. Lendoiro et al. (2018)</b> <sup>[24]</sup>	UHPLC-MS/MS	Diclorometano	Ultrasonificación (2h)	SPE: Clean Screen EtG - UCT	Carbono grafitizado poroso	A: 0,1% Ácido fórmico/Agua B: 0,1% Ácido fórmico/Acetonitrilo	-----	---	5
<b>D. Palumbo et al. (2018)</b> <sup>[25]</sup>	HPLC-MS/MS	Metanol	Incubación (una noche) + Ultrasonificación (2h, 50°C)	-----	HILIC	A: Acetato amónico 20 mM/Agua B: Acetonitrilo	5 - 100	1,4	4,5
<b>Y.G. Kim et al. (2018)</b> <sup>[26]</sup>	HPLC-MS/MS	1. Metanol 2. Agua 3. Metanol	Incubación (15h, 4°C)	Filtración	C18 + HILIC	A: Formiato amónico 20 mM + 0,05% Hidróxido amónico en agua B: Acetonitrilo	5 - 5 000	5	5

<b>S. Malaca et al. (2019)</b> <sup>[27]</sup>	UHPLC -MS/MS	-----	Ultrasonificación (2h)	SLE: Novum	C18	A: 0,1% Ácido fórmico/Agua B: 0,1% Ácido fórmico/Acetonitrilo	5 – 100	1,5	5
<b>E. Groff et al. (2023)</b> <sup>[28]</sup>	UHPLC -MS/MS	1. Metanol 2. Éter dietílico	Reactivo M3® Ultrasonificación (2h)	-----	C18	A: 0,1% Ácido fórmico/Agua B: 0,1% Ácido fórmico/Acetonitrilo	5 - 300	---	5
<b>D.W. Shin et al. (2024)</b> <sup>[29]</sup>	HPLC- MS/MS	1. Metanol 2. Agua Por duplicado	Ultrasonificación (1h)	SPE: Oasis MAX	C18	A: 0,1% Ácido acético/Agua B: Acetonitrilo	7 - 700	2	7
<b>D. Vandelli et al. (2024)</b> <sup>[30]</sup>	UHPLC -MS/MS	1. Acetona 2. n-Hexano	Ultrasonificación (45 min) + Incubación (una noche, 45°C)	SPE: Clean Screen® EtG Extraction Columns	Bifenilo	A: 0,1% Ácido fórmico/Agua B: 0,1% Ácido fórmico/Metanol	2,5 - 200	1	2,5
<b>S. Odoardi et al. (2024)</b> <sup>[31]</sup>	UHPLC -MS/MS	Diclorometano	Incubación (una noche, 40°C) + Ultrasonificación (2h)	MEPS: Sorbente SAX	Raptor Etg/EtS	A: 0,1% Ácido fórmico/Agua B: 0,1% Ácido fórmico/Metanol	5 – 50	3	5

**SPE:** *Solid Phase Extraction* / Extracción en fase sólida

**SLE:** *Supported Liquid Extraction* / Extracción líquida soportada

**MEPS:** *Micro Extraction by Packed Sorbent* / Microextracción por sorbente empacado

## Anexo II

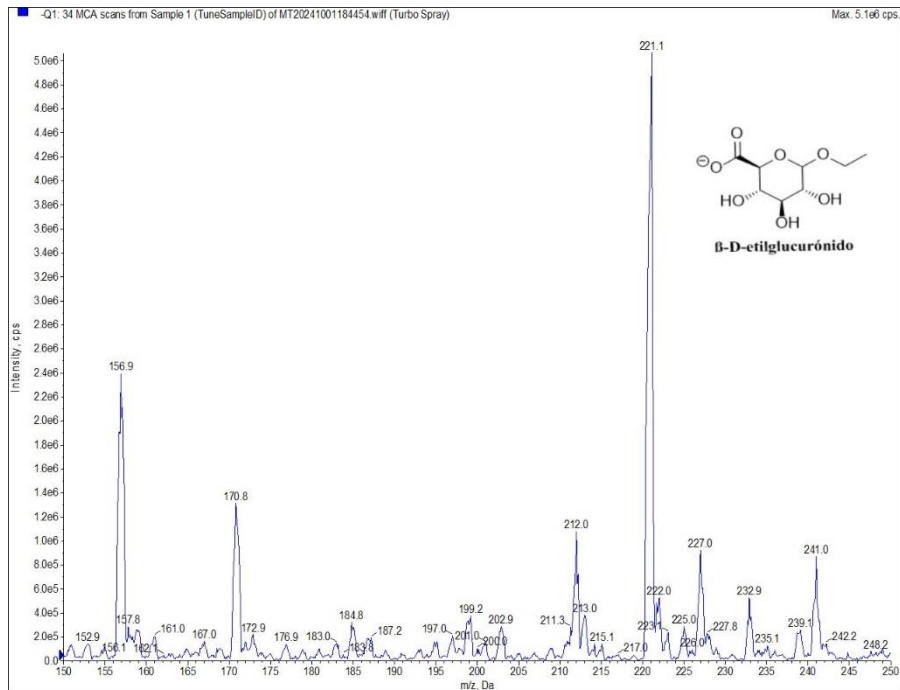


Figura 1: Espectro de masas en Q1 del  $\beta$ -D-etilglucurónico

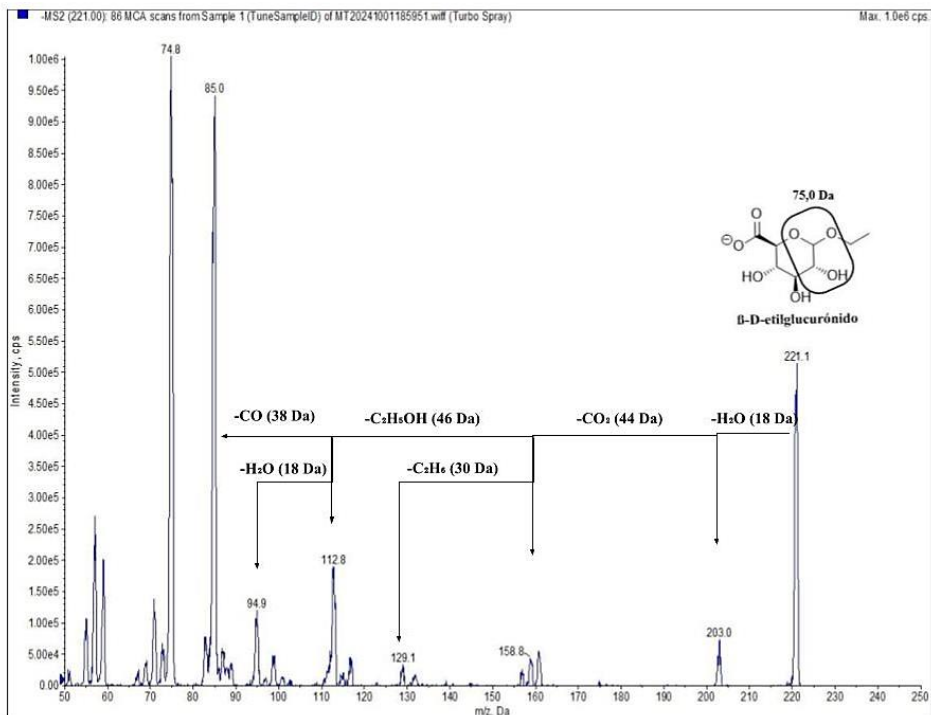
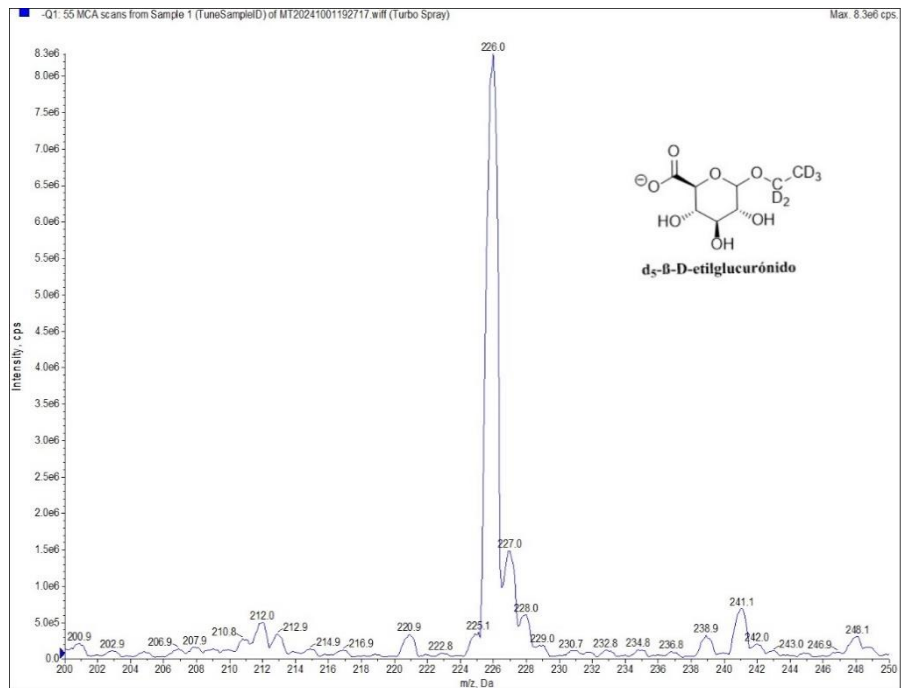
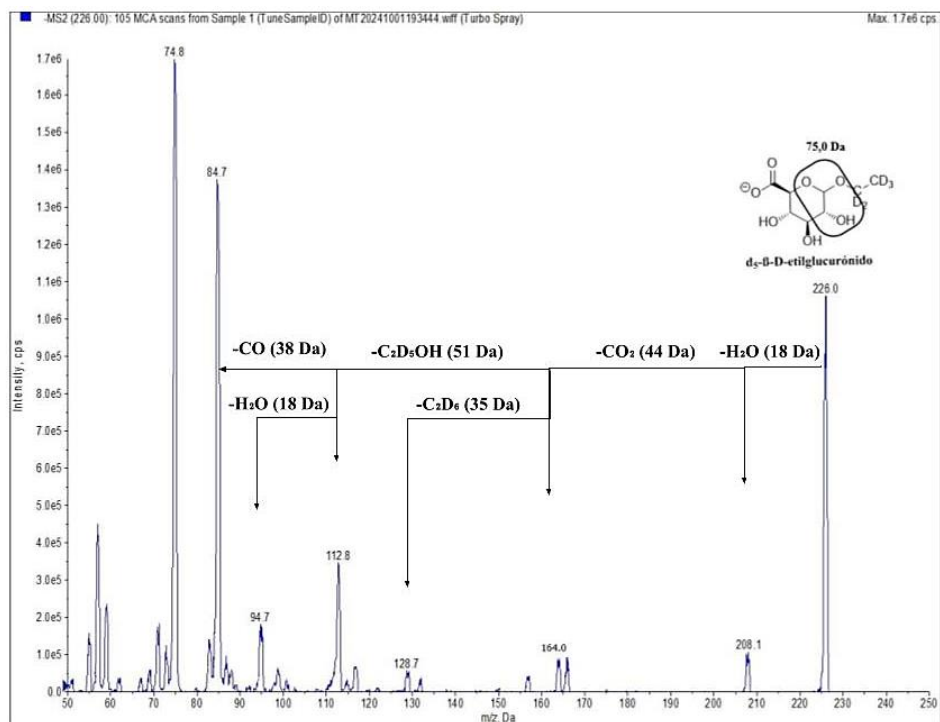


Figura 2: Espectro de masas en Q3 del  $\beta$ -D-etilglucurónico



**Figura 3:** Espectro de masas en Q1 del β- D-etilglucurónico-D5



**Figura 4:** Espectro de masas en Q3 del β- D-etilglucurónico-D5