

RESEÑA ANALÍTICA

Avances recientes en la determinación analítica del cisplatino y sus productos de hidrólisis

Yalexmi Ramos Rodríguez y Carlos Hernández Castro.

Departamento de Tecnologías de Tratamiento con Ozono, Centro de Investigaciones del Ozono, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Calle 230 esquina 15, Reparto Siboney, Playa, Apartado Postal 6412, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 27 de mayo de 2008. Aceptado: 18 de noviembre de 2008.

Palabras clave: cisplatino, productos de hidrólisis, métodos analíticos.
Key words: cisplatin, hydrolysis products, analytical methods.

RESUMEN. El cisplatino (*cis*-diaminodicloroplatino [II]) es un compuesto de coordinación ampliamente utilizado en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Tanto este medicamento como sus productos de hidrólisis poseen un gran efecto farmacológico pero también un gran impacto toxicológico y probablemente carcinogénico. En esta revisión se enfatizan los avances más importantes en los últimos años con relación al conocimiento anterior, tanto en las técnicas analíticas utilizadas para la detección y cuantificación del cisplatino y sus productos de hidrólisis, como en las diferentes matrices estudiadas. Se discuten las nuevas técnicas y las modificaciones que han surgido y desarrollado recientemente, fundamentalmente el uso combinado de técnicas de separación y detección de especies del platino y su impacto en la velocidad, sensibilidad y especificidad de la determinación analítica, con respecto a las que se utilizaban en el siglo pasado. Dentro de estas técnicas de separación las más empleadas son la Cromatografía Líquida de Alta Resolución y la Electroforesis Capilar, acopladas a métodos de detección como es el caso de la Espectrometría de Masas, Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente, la Espectrometría de Absorción Atómica y más recientemente, la Espectrometría de Movilidad de Iones con Onda Asimétrica de Alto Campo. Además, se destaca el auge creciente del estudio del cisplatino y sus productos de hidrólisis en nuevas matrices más complejas.

ABSTRACT. Cisplatin (*cis*-diaminedichloroplatinum [II]) is a coordination compound, used in the treatment of several solid tumors. Cisplatin and its hydrolysis products exhibit a great pharmacological effect but are very toxic and probably carcinogenic. The present review summarizes the most important advances in the last years in the techniques employed for the detection and quantification of cisplatin and its hydrolysis products and in the different matrixes studied. The new emerging techniques and their modifications recently developed, fundamentally the combined use of detection and separation techniques for the analysis of platinum species and their impact on the speed, sensitivity and specificity of the analytical determination, with regard to the techniques used in the last century are discussed. High-Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis, coupled with detection methods such as Mass Spectrometry, Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry, Atomic Absorption Spectrometry and more recently, High-Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry are the methods more employed. The analysis of cisplatin and its hydrolysis products in new and more complex matrixes is also presented.

INTRODUCCIÓN

El cisplatino (*cis*-diaminodicloroplatino [II]) (Fig. 1) es un compuesto de coordinación, inorgánico, sintetizado por primera vez por Peyrone en 1845 a partir del $K_2[PtCl_4]$ y amoníaco.¹ Sin embargo, no fue hasta 1965 que se descubre su actividad biológica, cuando se demostró su efecto inhibidor en la división celular de cepas de *Escherichia coli*.² Estudios posteriores demostraron el efecto citotóxico del cisplatino y el de otros análogos de segunda generación.³ Por su gran actividad quimioterapéutica, el cisplatino es actualmente utilizado en el tratamiento clínico de distintos tipos de cáncer, incluidos el de ovario, testículos, cabeza, cuello, vejiga, cervical, linfoma y melanoma.⁴ El tratamiento con este medicamento causa un gran número de reacciones adversas severas como es el caso de náuseas, emetogénesis, nefrotoxicidad, neurotoxicidad y mielotoxicidad.⁵ Muchos agentes antineoplásicos

son conocidos por ser citotóxicos, mutagénicos y teratogénicos.⁶ No obstante, la IARC (International Agency for Research on Cancer) incluye al cisplatino en el grupo 2A, en el que se encuentran aquellos medicamentos que, aunque no han sido totalmente confirmados, son probablemente carcinogénicos en humanos.⁷

El cisplatino es estable en una disolución de NaCl 0,9 % a 25 °C, durante al menos 24 h. Sin embargo, en disolución acuosa, se hidroliza fácilmente (Fig. 1), estableciéndose un equilibrio entre aproximadamente el 30 % del cisplatino inicial y los productos *cis*-[PtCl(H₂O)(NH₃)₂]⁺ (monoacuo cisplatino), *cis*-[Pt(H₂O)₂(NH₃)₂]²⁺ (diacuo cisplatino) y los complejos hidroxio *cis*-[PtCl(OH)(NH₃)₂] (pKa = 6,56),⁸ *cis*-[Pt(OH)₂(NH₃)₂] (pKa = 7,3) y *cis*-[Pt(OH)(H₂O)(NH₃)₂]⁺ (pKa = 5,6).⁹ Dicho equilibrio depende tanto de la concentración de iones Cl⁻ como del pH del medio.¹⁰⁻¹²

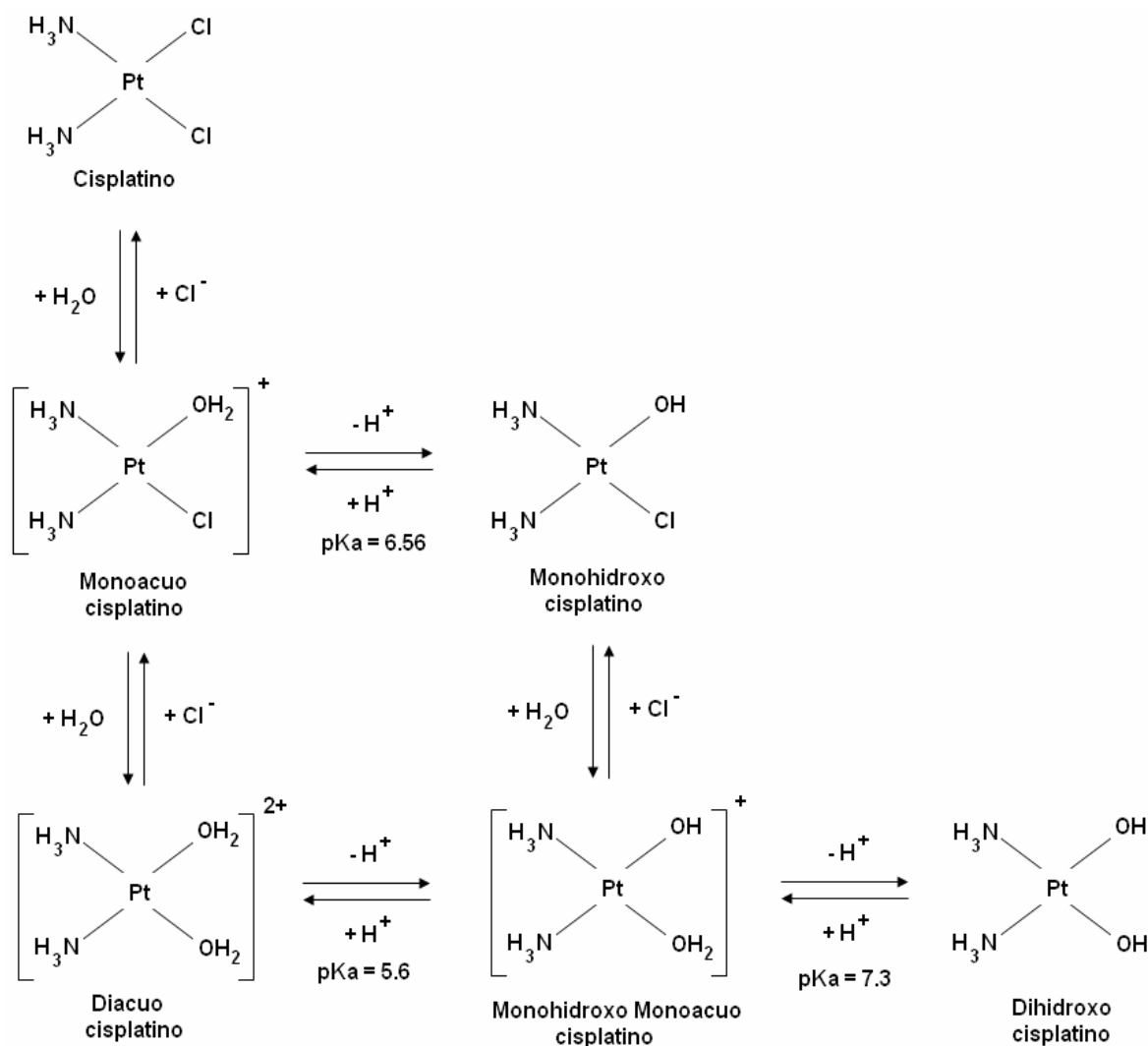


Fig. 1. Mecanismo de hidrólisis del cisplatino.

Hasta 2000 existían dos líneas fundamentales de investigación con respecto al cisplatino y sus productos de hidrólisis. La primera iba dirigida a la elucidación del mecanismo de acción del cisplatino,¹³⁻¹⁶ el cual aún no está completamente explicado. Generalmente, se acepta que este se hidroliza en la célula y son las especies hidratadas resultantes las que reaccionan con el ADN, inhibiendo los procesos de replicación y transcripción en aquella. Se cree que esta reacción es la responsable de la actividad antitumoral de los complejos del platino.^{15,16} De todos los productos de hidrólisis del cisplatino, los mayores efectos tóxicos se le atribuyen al complejo $\text{cis}[\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_2]^+$.¹⁷

De todo lo anterior, se desprende que, para realizar estudios farmacológicos y profundizar en el mecanismo de acción de este citostático, es necesaria la adecuada detección y cuantificación del cisplatino y sus productos de hidrólisis, lo que constituye la segunda línea de investigación, en matrices tan disímiles como suero,¹⁸ plasma,^{19,20} orina²⁰ y disoluciones acuosas modelo.^{10-12,21-25}

Las técnicas analíticas empleadas hasta ese momento para estos fines fueron la Difracción de Rayos-X,¹³ Resonancia Magnética Nuclear (¹H-NMR),¹³ Espectrometría de Masas-Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS),¹⁸ Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC),¹⁹ métodos voltamétricos²¹ y Espectrometría de Masas por Transformada de Fourier.²²

Se conocen algunos trabajos de revisión que incluyen la detección, separación e identificación de los complejos del platino, dentro de los cuales se incluye el cisplatino.²⁶⁻²⁹

El presente trabajo tuvo como objetivo analizar los avances recientes más importantes, tanto en las técnicas analíticas utilizadas para la detección y cuantificación del cisplatino y sus productos de hidrólisis como en las diferentes matrices donde tienen lugar estas determinaciones y destacar cómo la introducción de nuevas técnicas o sus modificaciones han desempeñado un papel fundamental en el incremento de la sensibilidad, velocidad y especificidad de dichas técnicas.

ASPECTOS ANALÍTICOS

Desde 2000 hasta la fecha, se ha seguido estudiando la presencia del cisplatino y sus productos de hidrólisis en suero, plasma, orina y disoluciones acuosas modelo.³⁰⁻³⁶ Un aspecto que llama mucho la atención es que en los últimos 10 años, se ha observado un interés marcado por el estudio de la presencia de pequeñas concentraciones de cisplatino y sus productos de hidrólisis en diferentes fuentes de agua, sobre todo, en las aguas residuales de hospitales.³⁷⁻³⁹

Esta preocupación generalizada por parte de los científicos se debe a que estudios clínicos han demostrado que aproximadamente el 28 % del cisplatino administrado a pacientes con cáncer (dosis entre 75 y 100 mg · m⁻²),

es eliminado por la orina.⁴⁰ Recientemente, se demostró que, además de este 28 % de cisplatino, se eliminaba un 40 % del complejo $\text{cis-}[\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_2]^+$.⁴¹

Basándose en los resultados de Vermorken y cols.⁴⁰ en 2000 se decidió estudiar el comportamiento de esta fracción intacta de cisplatino eliminada por la orina, simulando las condiciones de aguas residuales de hospitales, con una concentración de $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de iones Cl^- en el medio.⁴² Los estudios arrojaron que a las 48 h, el cisplatino era capaz de transformarse en un 42 % del complejo monoacuocisplatino y un 3 % del diacuocisplatino.

Esto demuestra que tanto el cisplatino como sus productos de hidrólisis constituyen una posible fuente de platino en el medio ambiente. A pesar de la fracción minoritaria que representan estas sustancias con respecto al platino que se emite, por ejemplo, en los procesos catalíticos vinculados al funcionamiento de los automóviles (concentraciones en el intervalo de 31 a $407 \text{ ng} \cdot \text{km}^{-1}$),⁴³ ellas poseen un mayor impacto toxicológico y carcinogénico que el platino inorgánico utilizado en los catalizadores.

Además del estudio de la presencia de estos complejos en aguas residuales de hospitales, a partir de 2000 se han estudiado diferentes modelos de sistemas biológicos.⁴⁴⁻⁴⁸ Esto está dado en gran medida por la poca información que existe con respecto al mecanismo de acción del cisplatino.

Antes de 2000, la mayoría de las técnicas analíticas reportadas para la cuantificación del cisplatino y sus productos de hidrólisis sólo eran capaces de determinar concentraciones de platino total y no podían ser utilizadas cuando se trabajaba con mezclas o matrices muy complejas.

En el presente siglo, los caminos se han dirigido a la búsqueda de nuevas variantes analíticas capaces de erradicar este problema. La solución resultó en combinar técnicas analíticas de separación (HPLC o Electroforesis Capilar) con métodos específicos de detección como es el caso de la Espectrometría de Absorción Atómica de Llama (FAAS),^{31,44} Espectrometría de Masas (MS),^{32,36,46} Espectrometría de Masas-Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS)³⁰ y más recientemente, la Espectrometría de Movilidad de Iones con Onda Asimétrica de Alto Campo (FAIMS).³³ Con el acoplamiento de estas técnicas, el análisis de mezclas de compuestos presentes en matrices complejas ya no constituye una dificultad insalvable.

Electroforesis Capilar

Hasta finales del siglo pasado, la Electroforesis Capilar era una técnica muy poco usada para el estudio del cisplatino y sus productos de hidrólisis. De hecho, el primer trabajo publicado en este sentido data de 1996, cuando se utilizó el dodecilsulfato de sodio (SDS) para la separación del cisplatino y sus productos de hidrólisis $\text{cis-}[\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_2]^+$ y $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ en disoluciones acuosas modelo.²³ En este estudio, se determinó que menos del 20 % del cisplatino inicial, se encontraba en equilibrio con sus productos de hidrólisis, resultado que no se corresponde con lo reportado, ya que los valores se encuentran en un 30 %, aproximadamente.¹⁰⁻¹²

Desde 2000 hasta la fecha, se observa un incremento en el empleo de la Electroforesis Capilar, sobre todo, en la elucidación del mecanismo de acción del cisplatino. Por ejemplo, en 2000, se utilizó por primera vez esta técnica para el estudio de la reacción del cisplatino con los nucleótidos adenosina 5'-monofosfato (AMP) y guanosina 5'-monofosfato (GMP). Con la ayuda de la

Espectrometría de Masas como método de detección se demostró que la reacción ocurría con el nitrógeno ubicado en la posición 7 de ambos nucleótidos,⁴⁹ lo que corroboró los resultados obtenidos en los estudios realizados mediante otras técnicas.^{14,15} Estos resultados abrieron nuevas puertas al empleo de la Electroforesis Capilar acoplada a la Espectrometría de Masas en el estudio de los complejos del platino empleados como antitumorales, y al conocimiento del mecanismo de acción del cisplatino, con el objetivo de disminuir los efectos tóxicos y las reacciones adversas de este medicamento y sus productos de hidrólisis. Esto se ha logrado en gran medida, con la introducción de citostáticos de nueva generación a partir de modificaciones estructurales realizadas al cisplatino.^{48,50-52}

En 2004, se empleó la Electroforesis Capilar para seguir la reacción del cisplatino con la albúmina presente en suero humano, utilizando sistemas modelo.⁴⁸ En este estudio, se obtuvo una constante de reacción de pseudo-primer orden, de $0,003 \text{ min}^{-1}$ a 37°C , entre el cisplatino y la albúmina.

Hasta 2004, este tipo de estudios se realizaba con el empleo de sistemas biológicos modelo. Sin embargo, en 2006, se detectó y cuantificó por primera vez la presencia del cisplatino y su producto principal de hidrólisis, el complejo $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})]^+$, en muestras biológicas reales, específicamente en suero.³⁵ Dada la complejidad de la matriz, se desarrolló y validó un nuevo método por Electroforesis Capilar para la determinación de estos compuestos con el empleo de un nuevo sistema electrolítico y un proceso previo de concentración de muestra. Esta nueva técnica no sólo permitió el estudio del cisplatino en muestras biológicas reales, sino que arrojó límites de detección de $2,0$ y $3,2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, los más bajos obtenidos hasta el momento por esta técnica para el cisplatino y el monoacuocisplatino, respectivamente.

El auge alcanzado por la Electroforesis Capilar en los últimos años para el estudio de los medicamentos antitumorales se debe a las grandes ventajas que presenta con respecto a la Cromatografía Líquida de Alta Resolución. La primera presenta un mayor poder de resolución para el caso de mezclas complejas de especies iónicas y no iónicas, emplea un menor tamaño de muestra y una preparación previa de ella mucho más sencilla, además de garantizar una mejor separación de las especies que se encuentran en equilibrio. Como requiere menores tiempos de análisis, la Electroforesis Capilar resulta una técnica muy útil para los estudios farmacocinéticos en los que estén involucrados los complejos del platino, ya que favorece la detección de los analitos presentes, antes de que se produzcan apreciables cambios químicos en el sistema.⁵³

Cromatografía Líquida de Alta Resolución

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) es una técnica analítica muy utilizada para el estudio del cisplatino y sus productos de hidrólisis, ya que brinda la posibilidad de analizar mezclas de compuestos de forma simultánea. Sin embargo, un aspecto muy importante que se debe tener en cuenta es la reacción química que pudiera tener lugar entre el cisplatino y sus productos de hidrólisis con los componentes de la fase móvil y que puedan dar lugar a interpretaciones ambiguas en los resultados. En la técnica de HPLC es muy común encontrar, en la composición de la fase móvil, la presencia del ion fosfato. Tal es el caso del uso de las disoluciones reguladoras de fosfato^{31,44} $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $0,01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e hidrógenofosfato de tetrabutilamonio⁴⁵ $1,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,

para el estudio del cisplatino y sus productos de hidrólisis en medio biológico. Sin embargo, existen reportes que plantean que los complejos del platino reaccionan con este ion.⁵⁴⁻⁵⁶ A pesar de esto, Verschraagen y col.^{31,44,45} no observaron evidencias de reacción de estos complejos con la fase móvil.

La interpretación ambigua de los resultados relacionados con la posibilidad de reacción entre los complejos del platino y la fase móvil es responsable de muchas conclusiones contradictorias referidas. Por ejemplo, Zhao y cols.⁵⁷ concluyeron que el $\text{cis-[Pt(NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ estaba presente en proporciones significativas, conjuntamente con el cisplatino y el $\text{cis-[Pt(NH}_3)_2\text{Cl(H}_2\text{O)}]^+$, cuando el primero se encontraba en disolución acuosa de carácter ácido. Estos resultados no están en correspondencia con los reportados anteriormente,¹⁰⁻¹² en los que solamente encontraron pequeñas concentraciones del $\text{cis-[Pt(NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ bajo las mismas condiciones experimentales. Andersson y cols.⁵⁸ reportaron que el tiempo de vida media de $\text{cis-[Pt(NH}_3)_2\text{Cl(H}_2\text{O)}]^+$, *in vivo* (en equilibrio con el $\text{cis-[Pt(NH}_3)_2\text{Cl(OH)}]$) era mayor que el del cisplatino a pesar de que se esperaba una mayor reactividad del complejo $\text{cis-[Pt(NH}_3)_2\text{Cl(H}_2\text{O)}]^+$, con los centros activos. Esto hace pensar que parte de las señales cromatográficas obtenidas puedan deberse a la formación de complejos del cisplatino y sus productos de hidrólisis con algún componente de la fase móvil. Todo esto indica que la selección de una correcta fase móvil es un aspecto muy importante a considerar cuando se estudia el cisplatino y sus productos de hidrólisis por HPLC.

En el trabajo de Verschraagen y cols.,⁴⁵ el pH de la fase móvil se ajustó a 3,5 con ácido o-fosfórico 85 %. Sin embargo, El-Khateeb y cols.,²⁵ teniendo en cuenta lo reportado sobre la posible reacción del cisplatino con el ion fosfato, obtuvieron favorables condiciones cromatográficas para el estudio de aquel y sus productos de hidrólisis, ajustando en este caso el pH de la fase móvil con ácido trifluórometansulfónico (ácido trifílico).

El metanol es otro disolvente muy usado en HPLC. Por esta razón, existen estudios reportados encaminados a determinar el posible grado de reacción de él con el cisplatino y sus productos de hidrólisis. El-Khateeb y cols.²⁵ demostraron, con el empleo de la Resonancia Magnética Nuclear ($^{15}\text{N-NMR}$), que a elevadas concentraciones [alrededor de un 66 % (v/v)], el metanol puede formar el complejo $\text{cis-[Pt(NH}_3)_2(\text{CH}_3\text{OH)(H}_2\text{O)}]^{2+}$, en concentraciones pequeñas, a partir del producto de hidrólisis del cisplatino $\text{cis-[Pt(NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, pero no reacciona con el cisplatino ni con el complejo $\text{cis-[Pt(NH}_3)_2\text{Cl(H}_2\text{O)}]^+$. No obstante, cuando se trabajó a concentraciones bajas de metanol [alrededor de un 5 % (v/v)], no se observaron evidencias de reacción de este disolvente con el cisplatino ni con los productos de hidrólisis mencionados anteriormente.

En la USP 30 se reporta una técnica analítica por HPLC para la determinación de cisplatino, tanto en materia prima como en inyectables, que emplea una fase móvil que contiene una mezcla de acetato de etilo, metanol, dimetilformamida y agua (25 : 16 : 5 : 5) y una columna L8.⁵⁹ Como se demuestra, no se utiliza ningún disolvente con el cual haya sido reportada la reacción del cisplatino.

En 2006 Lanjwani y col. reportaron un método por HPLC en fase reversa para la determinación indirecta de cisplatino, en muestras de suero y orina de pacientes tratados con este medicamento.³⁴ El método se basa en una previa derivatización del platino (II) con el reactivo

N,N-bis(salicileno)-1,2-propanodiamina ($\text{H}_2\text{SA}_2\text{pn}$) dando lugar a un complejo neutro y coloreado. Esta técnica presenta algunas desventajas. En primer lugar, la derivatización del cisplatino se traduce en un gasto adicional de reactivos y tiempo. Por otro lado, los autores plantean que la técnica es sensible y reproducible. Sin embargo, si se tiene en cuenta que la reacción tiene lugar entre el $\text{H}_2\text{SA}_2\text{pn}$ y el platino II, entonces es muy probable que los productos de hidrólisis del cisplatino (presentes también en la sangre y la orina), actúen como interferencias en la técnica y por tanto, la señal analítica que se obtiene no corresponda solamente al cisplatino presente en las muestras. Esta técnica tampoco reduce el tiempo de análisis, ya que el de retención (t_R) del pico cromatográfico correspondiente al cisplatino eluye a los 7,43 min. Este tiempo de retención es de los más elevados reportados, cuya magnitud está en el orden de los 7,3,³¹ 3,2⁴⁶ y 2,13 min.³⁶

Como se demuestra, la Cromatografía Líquida de Alta Resolución ha sido y es aún un arma muy potente a emplear en el estudio de los complejos del platino utilizados como antitumorales. Sin embargo, con el paso de los años, se observa una fuerte competencia entre esta técnica y la Electroforesis Capilar. Uno de los aspectos que hace más vulnerable a la Cromatografía Líquida es la gran reactividad de la fase móvil con los complejos del platino. En el caso de la Electroforesis Capilar este problema se reduce, ya que los disolventes orgánicos no se usan con mucha frecuencia en el sistema electrolítico. Sin embargo, sí es muy frecuente encontrar en este sistema disoluciones reguladoras, capaces de reaccionar con el cisplatino y sus productos de hidrólisis. A pesar de esta posibilidad, hasta el momento no se han realizado estudios sobre estas interacciones para esta técnica. Esto indica que deben realizarse aún más investigaciones antes de que la Electroforesis Capilar se convierta en una técnica de rutina para la determinación de los complejos de platino.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Absorción Atómica

La Espectrometría de Absorción Atómica es una de las técnicas más utilizadas para la determinación de trazas metálicas. Se basa en la medida de la radiación absorbida por un vapor atómico. Los átomos en fase vapor absorben aquellas radiaciones cuyas energías coinciden exactamente con sus transiciones electrónicas. Dado que las energías de transición son características para cada elemento, estos métodos son muy específicos. Inicialmente, la Espectrometría de Absorción Atómica era una técnica que se empleaba para determinar el contenido de platino total en diferentes matrices o medios. Sin embargo, para el caso del cisplatino, su uso se vio limitado, ya que no permitía un análisis simultáneo de este complejo y sus productos de hidrólisis.²² Este problema se resolvió con el acoplamiento de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución a dicha técnica.

En 2002, se reportó un método por HPLC en fase reversa acoplado a Espectrometría de Absorción Atómica de Llama, para el análisis del cisplatino y sus especies monohidratadas en plasma.³¹ Este acoplamiento permitió, no sólo el análisis del complejo $[\text{PtCl(NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ (estudiado anteriormente por Andersson y col.⁵⁸ usando esta misma técnica y el mismo fluido biológico), sino el análisis del cisplatino, ambos de forma simultánea, con límites de detección de 60 y 87,5 nmol · L⁻¹ (para el $[\text{PtCl(NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ y el cisplatino, respectivamente). Es-

tos límites de detección se encuentran dentro del intervalo reportado anteriormente para este tipo de técnica, por lo tanto, la novedad fundamental que aporta este trabajo es que garantiza un análisis conjunto del cisplatino y el complejo $[\text{PtCl}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})]^+$ presentes en plasma, en una única corrida, sin tratamiento previo de la muestra. Todo esto se traduce en un ahorro importante de reactivos y tiempo de análisis.

Como se explicó anteriormente, muchos estudios actuales se han llevado a cabo con el objetivo de poder disminuir los efectos tóxicos del cisplatino. En este sentido, se utilizó la técnica de HPLC acoplada a la Espectrometría de Absorción Atómica de Llama para estudiar la reacción del cisplatino con un nuevo agente quimioprotector, el BNP7787 (2,2'-ditiobis-etanosulfonato disódico) en medio biológico,⁴⁴ por la misma técnica y en las mismas condiciones reportadas anteriormente.³¹ Sólo se realizaron algunas modificaciones en la composición de la fase móvil con el objetivo de disminuir el tiempo de análisis. No obstante, en el artículo no se hace ninguna referencia a los tiempos de retención del cisplatino ni de sus productos de hidrólisis, por lo que no se sabe exactamente cuánto mejoró la técnica en ese sentido.

La Espectrometría de Absorción Atómica es una técnica con gran selectividad y especificidad, muy utilizada para el análisis de platino en muestras biológicas y ambientales. Sin embargo, presenta una gran desventaja y es el efecto de las interferencias espectroscópicas en la determinación analítica. Las especies moleculares oxidadas, formadas a partir del exceso de oxígeno en la disolución nebulizadora del equipo, constituyen las interferencias espectroscópicas más importantes en la determinación de platino. Un ejemplo de interferencia en la determinación del ^{194}Pt es la especie oxidada $^{178}\text{Hf}^{16}\text{O}$. La contribución de estas interferencias puede mitigarse sólo con procesos de tratamiento de la muestra muy complejos, lo que se traduce en un gasto significativo de tiempo y reactivos.⁶⁰

Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas

La Espectrometría de Masas es una técnica poderosa en la elucidación estructural tanto de biomoléculas como de compuestos volátiles y no volátiles. Muchas investigaciones se han dirigido al estudio de los complejos del platino por esta técnica. De acuerdo con los isótopos del platino (^{194}Pt , ^{195}Pt , ^{196}Pt) y los del cloro (^{35}Cl , ^{37}Cl) los espectros de masas de los complejos del platino exhiben *clusters* característicos que facilitan su identificación.

Cuando se está frente a matrices muy complejas, la Espectrometría de Masas no es una herramienta suficiente para identificar los compuestos presentes en la mezcla. En estos casos, el acoplamiento de la Cromatografía Líquida y la Espectrometría de Masas es una buena variante y una de las más utilizadas.

En 2003, Cui y Mester emplearon estas dos técnicas para el estudio del proceso de hidrólisis del cisplatino en disoluciones modelo.³² El estudio confirmó la formación de especies mono y dihidratadas a partir de una disolución de cisplatino $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, incubada durante 24 h. Este resultado no se corresponde con lo reportado por Heudi y cols. en el 1998,²⁴ ya que estos investigadores, bajo las mismas condiciones experimentales y con el empleo de la misma técnica, sólo detectaron la presencia de especies monohidratadas en equilibrio con el cisplatino.

Con el empleo simultáneo de estas dos técnicas, Townsend y col., en el 2003,⁴⁶ estudiaron los conjugados formados de la reacción del cisplatino con las proteínas glutatión (GSH), cisteinilglicina (Cys-Gly) y la N-acetilcisteína (NAC), con el objetivo de conocer más sobre el mecanismo de acción del cisplatino. El análisis por HPLC mostró tiempos de retención de 3,2; 4,2; 6,9 y 14 min para el cisplatino, Cys-Gly, GSH y NAC, respectivamente. Sin embargo, no se reportan los límites de detección para esta técnica.

Recientemente, estas técnicas fueron utilizadas, por separado, para determinar la cinética de degradación del cisplatino mediante la ozonización en disolución acuosa modelo a pH 9 inicial e identificar el principal producto de reacción.³⁶ Estos autores utilizaron condiciones cromatográficas similares a las reportadas por El-Khateeb y col. en 1999²⁵ con la diferencia de que en vez de ácido trifluórico, el pH de la fase móvil se ajustó con ácido metansulfónico y se utilizó una concentración de $0,05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de SDS. En estas nuevas condiciones cromatográficas se observó la formación de un solo producto principal de reacción, con un tiempo de retención de 16 min aproximadamente. El análisis por Espectrometría de Masas permitió identificar este producto de ozonización como el diaminodichlorodihidroxi cisplatino (IV).

Como se demuestra, la Espectrometría de Masas es una técnica muy útil no sólo para la cuantificación de los complejos del platino presentes en diferentes matrices, sino para la elucidación estructural de los productos de degradación de estos complejos.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución-Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente

La Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) es una técnica que se utiliza preferiblemente en el análisis de metales a nivel de trazas o en su cuantificación en matrices biológicas, en las que se dificulta la determinación mediante otros métodos.

Antes de 2000 no se había empleado el acoplamiento de estas dos técnicas para el estudio del cisplatino y sus productos de hidrólisis. El primer reporte proviene de 2001, cuando Haraguchi y cols. desarrollaron una metodología por HPLC/ICP-MS para el estudio del cisplatino y sus productos de hidrólisis mono y dihidratados en medio biológico.³⁰ Para esto emplearon una columna C18 recubierta con ácido propanosulfónico (3-[3-cloroamidopropil]-dimetilamonio) (CHAPS). Esta columna, utilizada con anterioridad para otras sustancias químicas,⁶¹ permite una rápida separación tanto de moléculas pequeñas como de moléculas grandes (por encima de los 10 000 Da). No obstante, la ventaja fundamental que brinda esta columna es que las proteínas no se adsorben en ella. Esto permite el estudio de un gran número de sustancias químicas presentes en medios biológicos sin tratamiento previo de la muestra, lo que se traduce en menos uso de equipamiento, menor tiempo de análisis y menos gastos de reactivos. Además, el hecho de que la muestra no sea sometida a un tratamiento previo al análisis evita la posible degradación o pérdida del(los) analito(s) objeto de estudio, garantizando un mayor recobrado de la técnica. Es por esto que, tanto las drogas orgánicas como las trazas de elementos, unidos o no a las proteínas pueden ser determinadas satisfactoriamente por inyección directa en esta columna, conjuntamente con una detección por ICP-MS.³⁰

Espectrometría de Movilidad de Iones con Onda Asimétrica de Alto Campo

La Espectrometría de Movilidad de Iones con Onda Asimétrica de Alto Campo (FAIMS) es una técnica muy novedosa que permite el análisis de iones en fase gaseosa. La separación de los iones por FAIMS se basa en la diferencia de movilidad del ion, cuando sobre él actúa un campo eléctrico alto (K_n) y un campo magnético de baja intensidad (K). Los pioneros en el uso de esta técnica, acoplada con la Espectrometría de Masas, fueron Guevremont y cols. entre los años 1998 y 2001,⁶²⁻⁶⁵ para la separación y determinación de iones.

Cui y Mester fueron los primeros que la utilizaron para estudiar el proceso de hidrólisis del cisplatino en 2003.³³ El hecho de que tanto el cisplatino como sus productos de hidrólisis tengan diferentes valores de relación K_n/K es lo que hace posible que puedan ser separados por FAIMS. En esta técnica, se usa comúnmente el nitrógeno como gas portador. Sin embargo, Cui y Mester demostraron que la mezcla de nitrógeno-helio aumentaba la sensibilidad y la selectividad del análisis (5 y 10 veces para el caso de los complejos dihidratados y el cisplatino respectivamente). De igual forma, demostraron que la mezcla de nitrógeno, helio y dióxido de carbono aumentaba la sensibilidad de las señales correspondientes a los complejos monohidratados y dihidratados (2,2 y 1,8 veces, respectivamente) comparándolo con el caso anterior (mezcla de nitrógeno y helio). Esto demuestra que la técnica de FAIMS-MS es simple, rápida y sensible para separar y detectar el cisplatino y sus productos de hidrólisis y no requiere una separación por Cromatografía Líquida previa al análisis por Espectrometría de Masas. Todo esto sin contar la reducción tan significativa que se obtiene en la relación señal/ruido (hasta 30 veces) comparándolo con un espectrómetro de masas convencional.

CONCLUSIONES

En los años recientes, se han logrado grandes avances en el empleo de técnicas analíticas capaces de estudiar al cisplatino y sus productos de hidrólisis. El acoplamiento de técnicas de separación como la Cromatografía Líquida de Alta Resolución y la Electroforesis Capilar con métodos específicos de detección como las Espectrometrías de Absorción Atómica, de Masas y de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente, permitieron lograr importantes resultados en la elucidación del mecanismo de acción de estos complejos, en su detección y cuantificación en diferentes matrices como suero, plasma, orina y disoluciones acuosas modelo. Se observa un marcado incremento en el interés por la determinación de bajas concentraciones de cisplatino y sus productos de hidrólisis en las aguas residuales de hospitales, debido al posible impacto toxicológico y carcinogénico de estos complejos del platino.

Conjuntamente con estos avances, se ha desarrollado un nuevo método analítico capaz de determinar iones en fase gaseosa, conocido como Espectrometría de Movilidad de Iones con Onda Asimétrica de Alto Campo. Todo este desarrollo analítico se traduce en un aumento de la sensibilidad y la especificidad, disminución del tratamiento previo de la muestra, menor tiempo de análisis y posibilidad de estudiar mezclas de complejos de forma simultánea.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Peyrone M. Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorur. *Ann. Chemie Pharm.*, **51**, 1-29, 1845.

2. Rosenberg B., Van Camp L. and Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, **205**, 698-699, 1965.
3. Rosenberg B., Van Camp L., Trosko J.E. and Mansour V.H. Platinum compounds: A new class of potent antitumour agents. *Nature*, **222**, 385-386, 1969.
4. Deseize B. and Madoulet C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **42**, 317-25, 2002.
5. Weiss R.B. New Cisplatin Analogue in development. *Drugs*, **46**, 360-377, 1993.
6. Merck & Co. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy. John Wiley & Sons, Indianapolis, 1999.
7. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Overall evaluations of carcinogenicity, Vol.7, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 60, 1987.
8. Andersson A., Hedenmalm H., Elfsson B. and Ehrson H. Determination of the acid dissociation constant for *cis*-diammineaqua-chloroplatinum (II) ion —a hydrolysis product of cisplatin. *J. Pharm. Sci.*, **83**, 859-62, 1994.
9. Berners-Price S.J., Frenkiel T.A., Frey U., Ranford J.D. and Sadler P.J. Hydrolysis products of cisplatin: pKa determinations via [1H, 15N] NMR Spectroscopy. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 789-91, 1992.
10. Miller S.E. and House D.A. The Hydrolysis Products of *cis*-Diamminedichloroplatinum (II). 1. The Kinetics of Formation and Anation of the *cis*-Diammine(aqua)chloroplatinum (II) Cation in Acidic Aqueous Solution. *Inorg. Chim. Acta*, **161**, 131-137, 1989.
11. Miller S.E. and House D.A. The Hydrolysis Products of *cis*-Dichlorodiammineplatinum (II). 2. The Kinetics of Formation and Anation of the *cis*-Diamminedi(aqua)platinum (II). Cation. *Inorg. Chim. Acta*, **166**, 189-197, 1989.
12. Miller S.E. and House D.A. The Hydrolysis Products of *cis*-Dichlorodiammineplatinum (II). 3. Hydrolysis Kinetics at Physiological pH. *Inorg. Chim. Acta*, **173**, 53-60, 1990.
13. Tajmir-Riahi H. A. Sugar interaction with biologically active *cis*-PtCl₂(NH₃)₂ (anticancer) and its inactive *trans* isomer. *Biophysical Chemistry*, **27**, 243-249, 1987.
14. Lippert B. Platinum Nucleobase Chemistry. *Prog. Inorg. Chem.*, **37**, 1-97, 1989.
15. Bancroft D.P., Lepre C.A. and Lippard S.J. 195Pt NMR Kinetic and Mechanistic Studies of *cis*- and *trans*-Diamminedichloroplatinum (II) Binding to DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 6860-6871, 1990.
16. Sundquist W.I. and Lippard S.J. The Coordination Chemistry of Platinum Anticancer Drugs and Related Compounds with DNA. *Coord. Chem. Rev.*, **100**, 293-322, 1990.
17. Jones M.M., Basinger M.A., Beaty J.A. and Holscher M.A. The relative nephrotoxicity of cisplatin, *cis*-[Pt(NH₃)₂(guanosine)₂]²⁺, and the hydrolysis product of cisplatin in the rat. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **29**, 29-32, 1991.
18. Dominici C., Alimonti A., Caroli S., Petrucci F. and Castello M.A. Chemotherapeutic agent Cisplatin monitoring in biological fluids by means of inductively-coupled plasma emission spectrometry (ICP-AES). *Clinica Chimica Acta*, **158**, 207-215, 1986.
19. Farrish H.H., Hsyu P.H., Pritchard J.F., Brouwer K.R. and Jarrett J. Validation of a liquid chromatography post-column derivatization assay for the determination of cisplatin in plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **12**, 265-271, 1994.
20. Drummer O.H., Proudfoot A., Howes L. and Louis W.J. High-performance liquid chromatographic determination of platinum (II) in plasma ultrafiltrate and urine: comparison with a flameless atomic absorption spectrometric method. *Clin. Chim. Acta*, **136**, 65-74, 1984.
21. Richmond W.N. and Baldwin R.P. Chloride-assisted electrochemical detection of *cis*-dichlorodiammineplatinum(II) after liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, **154**, 133-142, 1983.
22. Riley C.M., Weller R.R. and Eyler J.R. Fourier transform mass spectrometry of cisplatin and analogues. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **3**, 87-94, 1985.

23. Wenclawiak B.W. and Wollmann M. Separation of platinum(II) anti-tumour drugs by micellar electrokinetic capillary chromatography. **J. Chromatogr. A**, **724**, 317-326, 1996.
24. Heudi O., Cailleus A. and Allian P. Kinetic studies of the reactivity between cisplatin and its monoquo species with L-methionine. **J. Inorg. Biochem.**, **71**, 61, 1998.
25. El-Khateeb M., Appleton T.G., Charles B.G. and Gahan L.R. Development of HPLC Conditions for Valid Determination of Hydrolysis Products of Cisplatin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, **88**, 319-326, 1999.
26. Riley C.M. Bioanalysis of cisplatin analogues — a selective review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, **6**, 669-676, 1988.
27. De Waal W.A.J., Maessen F.J.M.J. and Kraak J.C. Analytical methodologies for the quantitation of platinum anti-cancer drugs and related compounds in biological media. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, **8**, 1-30, 1990.
28. Balcerzak M. Analytical Methods for the Determination of Platinum in Biological and Environmental Materials A Review. **Analyst**, **122**, 67-74, 1997.
29. Barefoot R.R. Speciation of platinum compounds: a review of recent applications in studies of platinum anticancer drugs. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, **751**, 205-211, 2001.
30. Haraguchi H., Ohshima T., Matsuura O. and Hasegawa T. Speciation of Drugs in Blood Serum by Surfactant-Mediated HPLC/ICP-MS with Direct Sample Injection. **Analytical Sciences**, **17**, 137-140, 2001.
31. Verschraagen M., van der Born K., Zwiers U. and Van der Vijgh W. Simultaneous determination of intact cisplatin and its metabolite monohydrated cisplatin in human plasma. **Journal of Chromatography B**, **772**, 273-281, 2002.
32. Cui M. and Mester Z. Electrospray ionization mass spectrometry coupled to liquid chromatography for detection of cisplatin and its hydrated complexes. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, **17**, 1517-1527, 2003.
33. Cui M., Ding L. and Mester Z. Separation of cisplatin and its Hydrolysis Products using Electrospray Ionization High-Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry Coupled with Ion Trap Mass Spectrometry. **Anal. Chem.**, **75**, 5847-5853, 2003.
34. Lanjwani S.N., Zhu R., Yar Khuhawar M. and Ding Z. High performance liquid chromatographic determination of platinum in blood and urine samples of cancer patients after administration of cisplatin drug using solvent extraction and *N,N'*-bis(salicylidene)-1,2-propanediamine as complexation reagent. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, **40**, 833-839, 2006.
35. Huang Z., Timerbaev A., Keppler B.K. and Hirokawa T. Determination of cisplatin and its hydrolytic metabolite in human serum by capillary electrophoresis techniques. **Journal of Chromatography A**, **1106**, 1-2, 75-79, 2006.
36. Hernández C., Ramos Y., Fernández L.A., Ledea O., Bataller M., Véliz E. and Besada V., Rosado A. Ozonation of Cisplatin in Aqueous solution at pH 9. **Ozone: Science & Engineering**, **30**, 189-196, 2008.
37. Kümmerer K., Erbe T., Gartscher S. and Brinker L. Emissions from hospitals into municipal wastewater. **Chemosphere**, **36**, 2437-2445, 1998.
38. Lenz K., Hann S., Koellensperger G., Stefanka Z., Stingeder G., Weissenbacher N., Mahnik S.N. and Fuerhacker M. Presence of cancerostatic platinum compounds in hospital wastewater and possible elimination by adsorption to activated sludge. **Science of the Total Environment**, **345**, 141-152, 2005.
39. Lenz K., Koellensperger G., Hann S., Stefanka Z., Stingeder G., Weissenbacher N., Mahnik S.N. and Fuerhacker M. Fate of cancerostatic platinum compounds in biological wastewater treatment of hospital effluents. **Chemosphere**, **69**, 1765-1774, 2007.
40. Vermorken V.B., Van der Vijgh W.J., Klein I., Hart A.A., Gall H.E. and Pinedo H.M. Pharmacokinetics of free and total platinum species after short-term infusion of cisplatin. **Cancer Treat. Rep.**, **68**, 503-513, 1984.
41. Hann S., Koellensperger G., Stefanka Z., Fuerhacker M., Mader R.M. and Buchberger W. Application of HPLC-ICP-MS to cisplatin speciation in aquatic media. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, **18**, 1391-1395, 2003.
42. Berners-Price S.J. and Appleton T.G. The chemistry of cisplatin in aqueous solution. In: Kelland LR, Farrell NP, editors. *Platinum based drugs in cancer therapy*. New Jersey, Humana Press, 3-35, 2000.
43. Moldovan M., Palacios M.A., Gomez M.M., Rauch S., McLeod C., Ma R., Carola S., Alimonti A. and Petrucci F. Environmental risk of particulate and soluble platinum group elements released from gasoline and diesel engine catalytic converters. **The Science of the Total Environment**, **296**, 199-208, 2002.
44. Verschraagen M., Kedde M.A., Hausheer F.H. and Van der Vijgh W. The chemical reactivity of BNP7787 and its metabolite mesna with the cytostatic agent cisplatin: comparison with the nucleophiles thiosulfate, DDTC, glutathione and its disulfide GSSG. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, **51**, 499-504, 2003.
45. Verschraagen M., Boven E., Ruijter R., van der Born K., Berkhof J., Hausheer F.H. and Van der Vijgh W. Pharmacokinetics and preliminary clinical data of the novel chemoprotectant BNP7787 and cisplatin and their metabolites. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, **74**, 157-169, 2003.
46. Townsend D.M., Marto J.A., Deng M., Macdonald T.J. and Hanigan M.H. Chromatography and Mass Spectrometry Characterization of the Nephrotoxic Biotransformation Products of Cisplatin. **Drug Metabolism and Disposition**, **23**, 705-713, 2003.
47. Timerbaev A.R., Aleksenko S.S., Polec-Pawlak K., Ruzik R., Semenova O., Hartinger Ch.G., Oszwaldowski S., Galanski M., Jarosz M. and Keppler B.K. Platinum metallodrug-protein binding studies by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry. Characterization of interactions between Pt (II) complexes and human serum albumin. **Electrophoresis**, **25**, 1988-1995, 2004.
48. Rudnev A.V., Aleksenko S.S., Semenova O., Hartinger Ch.G., Timerbaev A.R. and Keppler B.K. Determination of binding constants and stoichiometries for platinum anticancer drugs and serum transport proteins by capillary electrophoresis using the Hummel- Dreyer method. **J. Sep. Sci.**, **28**, 121-127, 2005.
49. Zenker A., Galanski M., Bereuter T.L., Keppler B.K. and Lindner W. Kinetics of binding properties of 5' -GMP with cisplatin under simulated physiological conditions by capillary electrophoresis. **J. Chromatogr. B.**, **745**, 211-219, 2000.
50. Küng A., Galanski M., Baumgartner C. and Keppler B.K. Reaction of (SP-4-2)-dichlorobis(2-hydroxyethylamine) platinum (II) with 5'- GMP under simulated physiological conditions. A CZE-ESI-MS study. **Inorg. Chim. Acta**, **339**, 9-13, 2002.
51. Strickmann D.B., Küng A. and Keppler B.K. Application of capillary electrophoresis-mass spectrometry for the investigation of the binding of oxaplatin to 5'- GMP in the presence of the sulphur-containing amino acid L-methionine. **Electrophoresis**, **23**, 74-80, 2002.
52. Küng A., Strickmann D.B., Galanski M. and Keppler B.K. Comparison of the binding behaviour of oxaplatin, cisplatin and analogues to 5'- GMP in the presence of sulphur-containing molecules by means of capillary and electrospray mass spectrometry. **J. Inorg. Biochem.**, **86**, 691-698, 2001.
53. Hartinger C.G., Timerbaev A.R. and Keppler B.K. Capillary electrophoresis in anti- cancer metallodrug research: Advances and future challenges. **Electrophoresis**, **24**, 2023-2037, 2003.
54. Appleton T.G., Berry R.D. and Hall J.R. 'Platinum Phosphate Blues'. A Comparison with 'Amide Blues'. **Inorg. Chim. Acta**, **64**, L229-L233, 1982.
55. Wood F.E., Hunt C.T. and Balch A.L. ¹⁹⁵Pt and ³¹P Nuclear Magnetic Resonance Studies of the Binding of the *cis*-Pt-(NH₃)₂²⁺ Moiety to Phosphate in Aqueous Solution. **Inorg. Chim. Acta**, **67**, L19-L20, 1982.

56. Appleton T.G., Berry R.D., Davis C.A., Hall J. R. and Kimlin H.A. Reactions of Platinum(II) Aqua Complexes. 1. Multinuclear (195Pt, 15N, and 31P) NMR Study of Reactions between the *cis*-Diamminediaquaplatinum (II) Cation and the Oxygen-Donor Ligands Hydroxide, Perchlorate, Nitrate, Sulfate, Phosphate, and Acetate. **Inorg. Chem.**, **23**, 3514-3521, 1984.
57. Zhao Z., Tepperman K., Dorsey J.G. and Elder R.C. Determination of Cisplatin and Some Possible Metabolites by Ion-Pairing Chromatography with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometric Detection. **J. Chromatog. Biomed. Applic.**, **615**, 83-89, 1993.
58. Andersson A., Fagerberg J., Lewensohn R. and Ehrsson H. Pharmacokinetics of cisplatin and its monohydrated complex in humans. **J. Pharm. Sci.**, **85**, 824-827, 1996.
59. Farmacopea de los Estados Unidos USP Edición 30. Rockville, Maryland. United States Pharmacopoeia Convention. 2007.
60. Simpson L.A., Thomsem M., Alloway B.J. and Parker A. A dynamic reaction cell (drc) solution to oxide-based interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) analysis of the noble metals. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, **16**, 1375-1380, 2001.
61. Umemura T., Kitaguchi R. and Haraguchi H. Counterionic detection by ICP-AES for determination of inorganic anions in water elution ion chromatography using a zwitterionic stationary phase. **Anal. Chem.**, **70**, 936-942, 1998.
62. Purves R.W., Guevremont R., Day S., Pipich C.W. and Matyjaszczyk M.S. Mass spectrometric characterization of a high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometer. **Rev. Sci. Instrum.**, **69**, 4094-4104, 1998.
63. Guevremont R. and Purves R.W. Atmospheric pressure ion focusing in a high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometer. **Rev. Sci. Instrum.**, **70**, 1370-1383, 1999.
64. Purves R.W. and Guevremont R. Electrospray ionization-high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry-mass spectrometry. **Anal. Chem.**, **71**, 2346-2357, 1999.
65. Guevremont R., Purves R.W., Barnett D.A. and Viehland L.A. Calculation of ion mobilities from electrospray ionization high-field asymmetric waveform ion mobility mass spectrometry data. **J. Chem. Phys.**, **114**, 10270-10277, 2001.