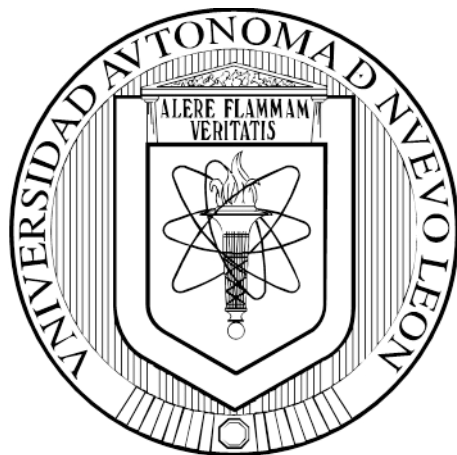


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN
DE METABOLITOS DEL TABACO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS**

POR

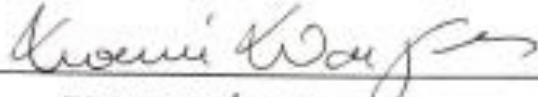
M.C. MAGDALENA ESCOBAR SAUCEDO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN QUÍMICA BIOMÉDICA**

SEPTIEMBRE, 2017

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA
DETERMINACIÓN DE METABOLITOS DEL TABACO EN MUESTRAS
BIOLÓGICAS.**

Aprobación de tesis:



DRA. NOEMÍ H. WAKSMAN MINSKY

Director de tesis



DR. JUAN RICARDO LUCIO GUTIÉRREZ

Co-Director de tesis



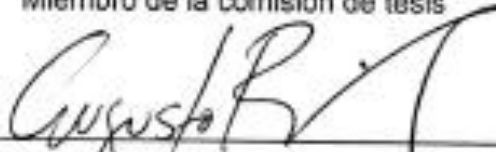
DRA. MA. DE LA LUZ SALAZAR CAVAZOS

Miembro de la comisión de tesis



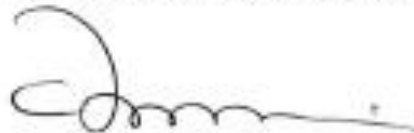
DRA. ROCÍO CASTRO RÍOS

Miembro de la comisión de tesis



DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ

Miembro de la comisión de tesis



DR. med. FELIPE ARTURO MORALES MARTÍNEZ

Subdirector de Estudios de Posgrado

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA
DETERMINACIÓN DE METABOLITOS DEL TABACO EN MUESTRAS
BIOLÓGICAS.**

Presentado por:

M.C. MAGDALENA ESCOBAR SAUCEDO

Este trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la Dra. Noemí H. Waksman Minsky y la coasesoría del Dr. Q. Juan Ricardo Lucio Gutiérrez.

FIRMAS

DIRECTOR


Dra. Noemí H. Waksman Minsky

CO-DIRECTOR


Dr. Q. Juan Ricardo Lucio Gutiérrez

The important thing is not to stop questioning.

Curiosity has its own reason for existing.

Albert Einstein

*Dedico este trabajo a mi esposo Joaquín Pérez
Villarreal, por que sin su apoyo, cariño y ánimos
durante todo el trayecto, esto no hubiese sido
posible.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme vivir cada uno de los momentos que hasta hoy he atesorado, por las pruebas que pone en mi camino y porque sé que de su mano nunca me ha soltado.

A mi esposo, gracias Joaquín por ser un pilar en mi vida, por exhortarme a seguir adelante, por apoyar mis locuras y aguantar mis malos ratos. La vida me ha dado a un hombre perfecto, gracias por compartir mi sueño y sobre todo por ser el combustible en mis días de lucha y ser mi descanso en mis días de dudas. Gracias por que tanto tu como Aquiles me hacen sentir muy especial y me hacen querer regresar a casa para cargar pilas para continuar siempre adelante.

A mis padres, porque desde pequeña me enseñaron a luchar por mis sueños, porque siempre me brindan su apoyo, aunque a veces no entiendan lo que hago. Gracias papá y mamá por confiar en mí, por creer y sobre todo por todo aquello que sacrificaron para que ahora sea quien soy.

A mi hermana Brenda, que desde pequeña fuiste mi meta a alcanzar, que cuando perdía el rumbo volteaba a verte y así orientarme, se que somos diferentes y a la vez tan iguales, gracias por apoyarme y estar siempre pendiente de tu pequeña hermana.

A mi hermana Mayela, tu apoyo hasta el día de hoy ha sido muy importante para mi, se que nos gustan cosas diferentes, que nos comportamos distinto, pero en el fondo nos parecemos tanto. Gracias por tus palabras de aliento, por ver lo que a mi se me dificultaba ver de mi, gracias por enseñarme y dejarme enseñarte a ti.

A mi familia adoptiva, Don Arturo García, Doña Juany Mata, Irene y Diana García Mata, el cuñis Jorge Luna y la pequeña Alejandra Luna García, por acogerme en su casa como un miembro más de su familia, por gozar con mis logros y acompañarme en los días malos.

A mi familia política, Don Joaquín, Omar, María, Lola, Claudia, Fernanda, Gerardo, Alejandra y Daniela, por su apoyo en estos años tanto moral como en el desarrollo de esta tesis, ya que casi desde que entré a esta familia me han visto inmersa en este proyecto.

A la Dra. Noemí Waksman por confiar en mi, por alentarme a no rendirme y sobre todo porque en este viaje descubrí que los límites solo existen mi mente y que estos se pueden romper si estamos realmente dispuestos a seguir adelante.

A la Dra. Ma. de la Luz Salazar, por su paciencia y por esa forma tan particular de enseñar, gracias por estar siempre presente y dispuesta a despejar mis dudas y sobre todo, por que me ha enseñado a ser firme pero amable en el trato con los alumnos.

Al Dr. Ricardo Lucio, por empezar este proyecto juntos, darme la oportunidad de crecer en forma profesional, por despejar mis dudas y sobre todo a buscar el lado bueno de las cosas.

A la Dra. Rocío Castro por su consejo y amistad durante ya más de 14 años, por todo lo que me ha enseñado, por su ejemplo y por brindarme ese recurso no renovable llamado tiempo. Muchas gracias por todo.

Al Dr. Augusto Rojas por confiar en mi, por apoyarme, por su manera tan rápida de analizar las cosas y siempre alentarme.

A Jonathan P. Meseguer, David Silva, Graciela Granados, Alejandra Fraga, Samantha Armijo, Cecilia Delgado, Omar Portillo, Juan Tamez, Héctor Salas por ser mi familia en el día a día, dentro y fuera del departamento, por las risas, los consejos, los regaños, las lágrimas y las palabras de aliento. Gracias por hacer más divertido este trayecto.

A todo el departamento de Química Analítica, gracias por esas explicaciones, las palabras de aliento, el oído presto a escuchar, las palmadas en la espalda, los abrazos y las nuevas perspectivas que me brindan cada vez que los necesito.

A quienes, sin saberlo ni imaginarlo, aportaron su granito de arena para que esta meta haya llegado a su término. Gracias a mis alumnos por sus palabras de aliento, a esos alumnos que después se convirtieron en compañeros del posgrado, es un honor verlos crecer y ser testigo de todo lo que han logrado.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XVI
LISTA DE ABREVIACIONES.....	XVIII
RESUMEN.....	XXI
CAPÍTULO 1	
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Historia del consumo del tabaco.....	1
1.2 Tabaquismo.....	3
1.3 Tabaco y su implicación en la salud.....	4
1.4 Situación en México.....	6
1.5 Marcadores biológicos.....	7
1.5.2 Características ideales de los marcadores biológicos del tabaco y las variables que influyen en su concentración. .	9
1.5.3 Nitrosaminas específicas del tabaco.....	11
1.6 Determinación del carcinógeno 4-(metilnitrosamino)-1-(3- piridil)-1- butanol (NNAL).....	13
1.6.1 Técnicas cromatográficas.....	14
1.6.2 Preparación de muestras.....	23
1.7 Justificación.....	35
1.8 Objetivo general.....	36
1.9 Objetivos específicos.....	36

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
2.1 Material, equipos y reactivos.	37
2.1.1 Material.....	38
2.1.2 Equipos.	40
2.1.3 Reactivos.....	41
2.2 Preparación de soluciones.....	42
2.2.1. Preparación de soluciones madres.	42
2.2.2 Preparación de soluciones estándares para optimización del programa de temperaturas del GC-MS.	43
2.2.3 Preparación de soluciones para evaluar la sensibilidad.	44
2.2.4 Preparación de soluciones para la validación del sistema cromatográfico.	45
2.2.5 Preparación de soluciones para la optimización de la extracción en fase sólida con cartuchos molecularmente impresos.....	45
2.2.6 Preparación de soluciones para la optimización de la microextracción en fase sólida.	46
2.2.7 Preparación de soluciones para la optimización de la extracción en fase sólida con cartuchos tC18.	47
2.2.8 Preparación de soluciones para la comparación de los métodos desarrollados.	49
2.2.9 Preparación de soluciones para la validación del método desarrollado.	49
2.3 Cromatografía de Gases-Masas (GC-MS).....	50
2.3.1 Establecimiento de las condiciones de separación cromatográfica y selección de columna.	50
2.3.2 Confirmación de la identidad de los analitos.	56
2.3.3 Establecimiento de los parámetros de adquisición de datos.	57
2.3.4 Validación del sistema cromatográfico.	58
2.4 Métodos de preparación de muestras.....	60
2.4.1 Extracción con polímeros molecularmente impresos.	60

2.4.2	Microextracción en fase sólida (SPME)	62
2.4.3	Extracción con cartuchos tC18	69
2.4.5	Selección del método de preparación de muestra.	72
2.4.6	Validación del método de preparación de muestra seleccionado.	73
2.4.7	Aplicación del método	74
 CAPÍTULO 3		
RESULTADOS.....		75
3.1	Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS)	75
3.1.2	Optimización de las condiciones de separación cromatográfica y selección de columna.	79
3.1.3	Establecimiento de los parámetros de adquisición de datos.	86
3.1.4	Selección de Columna Cromatográfica.	90
3.1.5	Validación del sistema cromatográfico.	97
3.2	Preparación de Muestras.....	101
3.2.1	Extracción con Polímeros Molecularmente Impresos... ..	102
3.2.2	Microextracción en fase sólida (SPME).....	104
3.2.3	Extracción en fase sólida con cartuchos tC18.....	112
3.3	Selección del método de extracción para la preparación de Muestras.....	118
3.4	Validación del método SPE-MIP para la determinación de NNAL.....	119
3.5	Aplicación del método SPE-MIP para la determinación de NNAL en muestras de orina	120
 CAPÍTULO 4		
DISCUSIÓN.....		124
4.1	Cromatografía de Gases-Masas (GC-MS).....	124
4.1.1	Establecimiento de las condiciones de separación cromatográfica.	125
4.1.2	Validación del sistema cromatográfico.	130
4.2	Métodos de Preparación de Muestra.	132

4.2.1 SPE-MIP.....	133
4.2.2 SPME	134
4.2.3 SPE-tC18	139
4.3 Selección del método de preparación de muestra.....	143
4.4 Validación del método SPE-MIP.....	144
4.5 Aplicación del método de SPE-MIP.....	146
CAPÍTULO 5	
CONCLUSIONES	147
PERSPECTIVAS	149
BIBLIOGRAFÍA.....	150

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Distribución de las 8 principales causas de defunción en el mundo.	4
Figura 2 Esquema de la formación de diversas TSNAs.....	12
Figura 3 Imagen donde se ejemplifica como calcular la simetría de un pico cromatográfico.	55
Figura 4 Montaje del Dispositivo de Extracción por HS-SPME.....	64
Figura 5 Espectro de masas de una solución estándar de NNAL de 25 µg mL ⁻¹ obtenido con el programa inicial de temperatura para la columna HP-5MS.	77
Figura 6 Espectro de masas de una solución estándar de iso-NNAL d3 de 25 µg mL ⁻¹ obtenido con el programa inicial de temperatura para la columna HP-5MS.	78
Figura 7 Desarrollo del programa de temperatura para la columna HP-5MS. Programa inicial.....	80
Figura 8 Desarrollo del programa de temperatura para la columna HP-5MS. Programa final.	81
Figura 9 Desarrollo del programa de temperatura para la columna DB-17. Programa inicial.	82
Figura 10 Desarrollo del programa de temperatura para la columna DB-17. Programa final.....	83

Figura 11 Desarrollo del programa de temperatura para la columna DB-1701. Programa inicial.	84
Figura 12 Desarrollo del programa de temperatura para la columna DB-1701. Programa final.....	85
Figura 13 Cromatograma obtenido con programa final de temperatura para la columna HP-5MS, adquisición de datos SIM.	87
Figura 14 Cromatograma obtenido con programa final de temperatura para la columna DB-17, adquisición de datos SIM.....	88
Figura 15 Cromatograma obtenido con programa final de temperatura para la columna DB-1701, adquisición de datos SIM.....	89
Figura 16 Cromatograma de extracto de orina adicionada a 15 ng mL^{-1} obtenido con la columna DB-1701	94
Figura 17 Cromatograma de extracto de orina adicionada a 15 ng mL^{-1} obtenido con la columna DB-17.	95
Figura 18 Curva de calibración de NNAL con regresión lineal.....	97
Figura 19 Curva de calibración con regresión polinomial de segundo grado.	98
Figura 20 Gráfica para el análisis de correlación entre las concentraciones para evaluar exactitud.	100
Figura 21 Cromatograma de una muestra de orina adicionada con $0.1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ del NNAL y del estándar interno obtenido con el método SPE-MIP descrito en la tabla 21.....	104
Figura 22 Selección de la fibra de SPME más adecuada.	105
Figura 23 Gráfica de coeficientes de las variables investigadas en la optimización de la extracción.....	110
Figura 24 Cromatograma de una muestra de orina adicionada con $4 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ del NNAL y $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ del estándar interno obtenido con el método HS-SPME descrito en la tabla 24.	111
Figura 25 Gráfica de coeficientes de las variables investigadas en la optimización de la extracción por SPE tC18.	114

Figura 26 Cromatograma de una muestra de orina adicionada con 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ del NNAL y del estándar interno obtenido con el método SPE-MIP descrito en la tabla 29.....	118
Figura 27 Cromatograma de muestra de orina de fumador extraída con el método de SPE-MIP.....	121
Figura 28 Cromatograma de muestra de orina de no fumador adicionada a 2 ng mL^{-1} extraída con el método de SPE-MIP.....	122

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Compilación de los estudios que analizan NNAL y NNAL-Glu.....	17
Tabla 2	Características de las columnas cromatográficas de interés para este trabajo.	51
Tabla 3	Condiciones iniciales para la columna HP-5MS.....	52
Tabla 4	Condiciones iniciales para la columna DB-17.....	53
Tabla 5	Condiciones iniciales para la columna DB-1701.....	53
Tabla 6	Condiciones de la SPE-MIP.....	61
Tabla 7	Condiciones de análisis por GC-MS.	63
Tabla 8	Condiciones de trabajo empleadas para la selección de fibra de SPME.....	65
Tabla 9	Experimentos propuestos para la optimización del proceso de extracción de acuerdo al diseño de Plackett - Burman.	67
Tabla 10	Experimentos iniciales para la optimización del proceso de desorción.....	68
Tabla 11	Experimentos propuestos para la optimización del proceso de extracción SPC-tC18 de acuerdo al diseño de Plackett -Burman.	70
Tabla 12	Ventanas de monitoreo para el modo SIM.....	86
Tabla 13	Resoluciones de los picos cromatográficos con las diferentes columnas.....	90

Tabla 14 Factores de asimetría del iso-NNAL-d3 y el NNAL con cada columna cromatográfica.	91
Tabla 15 Factor de asimetría para cada columna cromatográfica en cromatogramas obtenidos por SIM.	92
Tabla 16 Resultados de sensibilidad obtenidos (n=2).	93
Tabla 17 Condiciones cromatográficas para el análisis por GC-MS con la columna DB 17 y DB-17 MS.	96
Tabla 18 Precisión intradía (n=3).	99
Tabla 19 Valores de error absoluto y % de error relativo para la evaluación de la exactitud del método cromatográfico (n=3).	100
Tabla 20 Áreas obtenidas en el perfil de elución (n=2).	103
Tabla 21 Condiciones del método de SPE-MIP final.	103
Tabla 22 Diseño Simplex Secuencial Básico para la optimización de la desorción térmica de la fibra DVB-PDMS.	107
Tabla 23 Respuesta obtenidas de los experimentos del diseño factorial fraccionado para la optimización de la extracción de la SPME.	108
Tabla 24 Condiciones óptimas para el método de HS-SPME del NNAL.	111
Tabla 25 Respuesta obtenidas de los experimentos del diseño factorial fraccionado para la optimización de la extracción de la SPE tC18. .	113
Tabla 26 Condiciones óptimas para el método de SPE tC18 del NNAL.	115
Tabla 27 Comparación de áreas de NNAL con solución de lavado de diferente composición.	115
Tabla 28 Áreas obtenidas en el perfil de elución de SPE tC18 (n=2).	117
Tabla 29 Condiciones finales para el método de SPE tC18 del NNAL.	117
Tabla 30 Comparación de los métodos desarrollados (n=3).	119
Tabla 31 Datos obtenidos de la validación del método SPE-MIP desarrollado.	120
Tabla 32 Resultados del análisis de muestras de orina de fumador y no fumador adicionadas (n=2).	123

LISTA DE ABREVIACIONES

OMS	Organización Mundial de la Salud
HTA	Humo del tabaco ambiental
TSNA	Nitrosaminas específicas del tabaco
IARC	Agencia Internacional para la Investigación de Cáncer
NNK	Nitrosamina cetona derivada de la nicotina
NNA	Nitrosamina aldehído derivada de la nicotina
iso-NNAL	Iso- nitrosamina alcohol derivada de la nicotina
NNAL	Nitrosamina alcohol derivada de la nicotina
NAB	Nitrosamina de anabasina
NAT	Nitrosamina de anatabina
NNN	Nitrosamina de nornicotina
NNAL-Glu	Conjugado de nitrosamina alcohol derivada de la nicotina
GC-TEA	Cromatografía de gases con analizador de energía térmica
GC-MSD	Cromatografía de gases con detector de masas selectivas

GC-MS/MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem
HPLC-MS/MS	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem
µg	Microgramo
ng	Nanogramo
pg	Picogramo
mL	Mililitro
h	Hora
LLE	Extracción líquido-líquido
K_D	Constante de partición
µm	Micrómetro
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en fase sólida
DLLME	Microextracción líquido líquido dispersiva
MIP	Polímeros molecularmente impresos
C18	Octadecilsilano
C8	Octilsilano
MCX	Intercambiador catiónico fuerte
HS	<i>Headspace</i> , espacio de cabeza
GC/LRMS	Cromatografía de gases/espectrometría de masas de baja resolución
PDMS	Polidimetilsiloxano
DVB	Divinilbenceno
PA	Poliacrilato
CAR	Carboxeno

DER	Desviación estándar relativa
R^2	Coeficiente de determinación
°C	Grados Celsius
rpm	Revoluciones por minuto
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , Administración de Alimentos y Fármacos
EPA	Agencia de Protección Ambiental
iso-NNAL-d3	Isómero de la nitrosamina alcohol derivada de la nicotina deuterada
t_R	Tiempo de retención
w	Ancho de pico

RESUMEN

M.C. Magdalena Escobar Saucedo.

Fecha de graduación: Septiembre, 2017.

Universidad Autónoma de Nuevo León.
Facultad de Medicina.

Título del estudio: **DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE METABOLITOS DEL TABACO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.**

Número de páginas: 162

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias
con especialidad en Química Biomédica.

Área de estudio: Química Analítica

Propósito y Método de Estudio:

Los problemas relacionados al consumo de tabaco tienen un gran impacto en la salud de la población mundial, por lo que la búsqueda de marcadores adecuados para la determinación de factores de riesgos es un tópico de interés actual. El NNAL y sus conjugados han sido utilizados como marcadores del riesgo de sufrir afecciones pulmonares por el consumo del tabaco; sin embargo su determinación puede ser compleja ya que se requiere de métodos laboriosos de preparación de muestra además de equipos con detectores específicos y de alta resolución. El presente trabajo planteó el desarrollo y validación de un método analítico para la determinación del NNAL. Se estudió el comportamiento de técnicas como SPE con distintas fases adsorbentes, así como la SPME en su modalidad de *headspace* y el uso de cromatografía de gases-espectrometría de masas de baja resolución. Para la optimización de los métodos de extracción se empleó diseños de experimentos, tanto factorial fraccionado para determinar las variables de mayor influencia en el desempeño de cada una de las técnicas de preparación de muestras, así como el diseño simplex para optimizar las variables de mayor influencia. La selección del método se basó en el % de recuperación, la DER y la comparación de costos de los métodos. De los tres métodos de preparación de muestra desarrollados, el método HS-SPME tuvo baja sensibilidad, el método de SPE-tC18 que tuvo una recuperación de 130.3 % y un % DER del 10 % y finalmente el método SPE-MIP presentó una recuperación del 120 % con un 8.3 % de DER. Se seleccionó el método de SPE-MIP para preparación de muestras el cual presentó un comportamiento cuadrático, una precisión entre el 1.3 y el 8 % DER, una exactitud menor al 12 % y límite de detección de 0.7 ng mL⁻¹ y un límite de cuantificación de 2 ng mL⁻¹. No fue posible determinar NNAL en muestras de orina de fumadores.

Contribuciones y Conclusiones:

Se desarrollaron y optimizaron tres métodos de preparación de muestra para el análisis de NNAL en muestras de orina. El trabajo desarrollado aplicó por primera vez la SPME en modalidad HS al análisis de NNAL en muestras de orina. No fue posible detectar el NNAL en muestras de orina de fumadores cuando se empleó el SPE-MIP para la preparación de las muestras.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS



Dra. C. Noemí H. Waskmán Minsky

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN.

1.1. Historia del consumo del tabaco.

El tabaco es una planta de la familia de las solanáceas, originaria de América, donde su cultivo y uso se extendió durante siglos. El alcaloide principal contenido en las hojas del tabaco es la nicotina, cuya proporción en las hojas es muy variable según las clases de tabaco, por ejemplo el tabaco empleado para fumar suele contener un 3% de nicotina.

Nicotiana tabacum, la especie utilizada por los nativos en América Central y Sudamérica, no se encuentra de forma silvestre, sino sólo como

planta cultivada;¹ se caracteriza por ser una planta perenne, de hojas grandes y perfectamente aisladas, con abundante vena y semillas extremadamente pequeñas y numerosas.² Los análisis genéticos han mostrado que es un híbrido resultante del cruce de dos especies salvajes, *Nicotiana sylvestris* y *Nicotiana tomentosiformis*. La planta *Nicotiana rustica*, especie cultivada en Norteamérica, posee un mayor contenido en nicotina que la *N. tabacum*.

En América, el tabaco formó parte de las costumbres de la sociedad prehispánica, ya que el consumo de la hoja, estuvo ligado a prácticas rituales, sociales, culturales y así como también con fines curativos.^{2, 3}

Después del descubrimiento de América, el tabaco se introdujo en Europa, donde se difundió rápidamente por este continente y en Rusia, y llegó a China, Japón y la costa occidental de África en el siglo XVII, debido a que se creía que el tabaco era útil para curar eccemas, cefaleas, ceguera, dolor de muelas, tos e incluso asma crónico.³

En el siglo XVIII, el incremento de la demanda del tabaco por consumidores europeos, asiáticos, africanos y del medio Oriente, convirtió a la industria tabacalera en una actividad económica muy redituable, convirtiendo al tabaco en un fenómeno de gran importancia para la economía mundial.^{2, 3}

1.2 Tabaquismo.

El tabaquismo se considera un trastorno que implica un consumo perjudicial de tabaco, lo que conduce a problemas físicos o psicológicos, síndrome de dependencia y síndrome de abstinencia. La Organización Mundial de la Salud informó que cualquier cantidad consumida de tabaco puede tener efectos secundarios peligrosos.⁴

El tabaco es el único producto de consumo legal que puede dañar a todos los que se exponen a él y causar la muerte hasta 15 años antes de la esperanza de vida, en promedio, de alrededor del 50 % de las personas que lo utilizan voluntariamente. La Organización Mundial de la Salud, reportó en el 2008 que las muertes debidas al tabaco superaron los cinco millones de personas y de continuar con la misma tendencia, esta cifra aumentaría a más de ocho millones de defunciones para el año 2030.⁵ En la figura 1 se muestra la distribución de defunciones del año 2008, en la cual se puede observar que el tabaquismo es factor de predisposición a sufrir afecciones cardiacas, enfermedades cerebro-vasculares, enfermedad pulmonar entre otras.

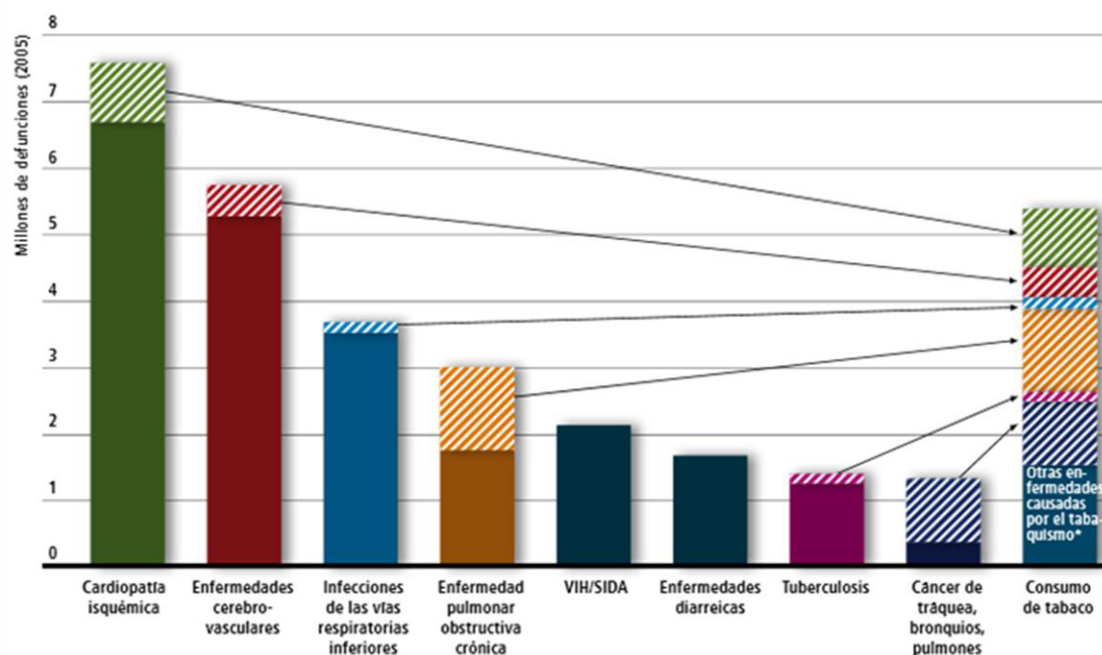


Figura 1 Distribución de las 8 principales causas de defunción en el mundo.⁵

1.3 Tabaco y su implicación en la salud.

Durante el siglo XVI empezó a considerarse al tabaco como una droga, lo que llevó a tomar medidas al respecto. En el año 1600 en China, el filósofo Fang, afirmó que fumar tabaco producía quemaduras en los pulmones. Así mismo, en el año 1620 el uso del tabaco se prohibió en Japón.³

En 1881 García Ramón, en su libro “El arte de fumar, tabacología universal” hace mención de que se tenía en cuenta el daño del tabaco, pero solo en los siguientes casos: “Ya lo hemos dicho, y volvemos a repetirlo: el

tabaco es peligroso cuando se abusa de él ó bien por una predisposición individual. Existe empero un caso en que su acción nociva es positiva e incontestable, y es durante la infancia y primera juventud. De los diez a los quince años, debe el hombre abstenerse del tabaco, pues en este periodo de la vida ejerce una influencia perjudicial en los órganos cerebrales”.⁶

Fue hasta el año de 1929 cuando Fritz Lickint publicó evidencia estadística que relaciona el cáncer pulmón y el tabaco; y en 1939 se presenta el primer estudio epidemiológico elaborado a nivel mundial al respecto.³

En 1956, la OMS declaró que el tabaco es la principal causa previsible o evitable de muerte precoz. Actualmente se relaciona al consumo de tabaco con más de 25 enfermedades y es el principal factor causante de cáncer de pulmón, esófago, laringe, boca, garganta, riñón, vejiga, páncreas, estómago y cérvix, así como de leucemia mieloide aguda.⁷ Es importante remarcar que las personas no fumadoras expuestas al humo de cigarro, fumadores pasivos o involuntarios, presentan efectos adversos en la salud más allá de sólo irritación en la conjuntiva ocular y tracto respiratorio superior. Se ha reportado que los niños expuestos al humo de segunda mano tienen un aumento del riesgo de síndrome de muerte súbita del lactante, infecciones respiratorias agudas y asma más grave, entre otras enfermedades. En el caso de los adultos no fumadores pueden desarrollar cáncer de pulmón, así como efectos inmediatos

en el sistema cardiovascular, que incluyen: hipertensión, arteriopatía coronaria, accidente cerebro-vascular e insuficiencia cardíaca congestiva.⁸

1.4 Situación en México.

En México durante el año 2010, según el reporte de Guerrero-López *et al.*, fallecieron alrededor de 60 mil personas, es decir 165 muertes por día, a causas atribuibles al tabaco.⁹ Según la Encuesta Nacional de Adicciones 2011, en nuestro país hay 17.3 millones de fumadores, lo que representa un 21.7 % de prevalencia del consumo activo de tabaco, siendo en promedio de 7 cigarrillos por día. En ese mismo año, se reportó una prevalencia de exposición al humo de tabaco ambiental (HTA) de 30.2 %, lo que se traduce a 12.5 millones de mexicanos, que nunca han fumado, están expuestos al HTA.¹⁰

El 25 % de las muertes debidas al consumo de tabaco se producen en las edades medias de la vida, lo cual ocasiona pérdidas de productividad laboral y elevados costos para el sector salud.^{5, 10}

1.5 Marcadores biológicos.

La mayor parte de los daños que causa el tabaco en la salud se ponen de manifiesto hasta varios años después del inicio del consumo; debido a lo cual, las investigaciones se han centrado en la búsqueda de marcadores biológicos de exposición al tabaco para poder estudiar y/o predecir efectos a la salud de los individuos fumadores así como no fumadores expuestos al HTA.

1.5.1 Definición e importancia de los marcadores biológicos.

Los marcadores biológicos, también llamados biomarcadores, son cualquier cambio medible, ya sea químico, fisiológico o morfológico, que refleja una interacción entre un sistema biológico y un peligro potencial; por ejemplo, el nivel de colinesterasa en sangre disminuye por la exposición a plaguicidas organofosforados. La respuesta medida puede ser funcional y fisiológica, bioquímica, a nivel celular o interacciones moleculares.¹¹ Los marcadores biológicos pueden clasificarse en tres grupos¹²:

- a) Biomarcadores de exposición: permiten la medición de la dosis interna de un compuesto tóxico o de sus metabolitos en fluidos del cuerpo o productos de excreción, mediante un análisis químico.
- b) Biomarcadores de susceptibilidad: sirven como indicadores de una sensibilidad particular de los individuos para el(los) efecto(s) de un xenobiótico o de un grupo de tales compuestos.
- c) Biomarcadores de efecto: también llamados de respuesta, son indicativos de cambios bioquímicos dentro de un organismo como resultado de la exposición a xenobióticos.

La importancia de la búsqueda de biomarcadores del tabaco se debe a que permiten conocer la prevalencia del consumo, estudiar el impacto de los nuevos tratamientos, verificar la exposición al humo de primera o segunda mano, así como para constatar si un tratamiento se cumple correctamente.¹³

1.5.2 Características ideales de los marcadores biológicos del tabaco y las variables que influyen en su concentración.

Dentro de los candidatos a ser biomarcadores del tabaco, se encuentran el monóxido de carbono en el aire espirado o productos de la combustión del tabaco, como la nicotina, cotinina, tiocianatos, anabasina, entre otros, cuya determinación se puede realizar en líquidos biológicos o en aire ambiental.

Las características ideales que debería cumplir un candidato para ser biomarcador son¹³:

1. Ser específico, es decir que el humo de tabaco sea su única fuente de producción.

2. Presentar aumento proporcional entre la concentración y el consumo del tabaco.
3. Ser cuantificable de manera sencilla, económica y sensible, empleando técnicas habituales.
4. Presentar correlación entre su concentración y la de otros compuestos del humo del tabaco.
5. Que exista una emisión similar del marcador por las distintas marcas de tabaco.

Aunque es deseable que los biomarcadores del tabaco presenten todas las características anteriores, es difícil conseguir una molécula que cumpla con todas las condiciones, por lo que las investigaciones se han centrado en la búsqueda y validación del uso de compuestos relacionados con el tabaco que presentan varias de las características mencionadas anteriormente.

La concentración en que se pueden encontrar los biomarcadores en los fumadores son influenciadas por factores como: el número de cigarrillos por día, el número de años de consumo, el nivel de monóxido de carbono en aire espirado (como medida indirecta de la profundidad de la inhalación de la calada) y las características idiosincráticas de cada fumador, es decir el número de bocanadas de aire inspirado por cigarrillo, el tiempo de retención de la inhalación, entre otras.

1.5.3 Nitrosaminas específicas del tabaco.

Las nitrosaminas específicas del tabaco (TSNA, por sus siglas en inglés) se generan durante la fermentación, el curado y el añejamiento de la hoja de tabaco; estas moléculas son buenas candidatas para ser biomarcadores del consumo de tabaco, ya que sólo se encuentran en los productos derivados de este.^{14, 15} Las TSNA son altamente cancerígenas y están clasificadas en los grupos 1 y 3 de la Agencia Internacional para la investigación de Cáncer (IARC).¹⁶ La formación de estos compuestos se lleva a cabo por la nitrosación de aminas terciarias como la nicotina, previa hidrólisis, o de aminas secundarias como: nornicotina, anabasina, anatabina, presentes en el tabaco, produciendo diferentes nitrosaminas, las cuales contienen en su estructura el grupo funcional nitroso unido al nitrógeno de la amina; en la Figura 2 se muestran las principales TSNA y su posterior metabolismo.^{15, 16}

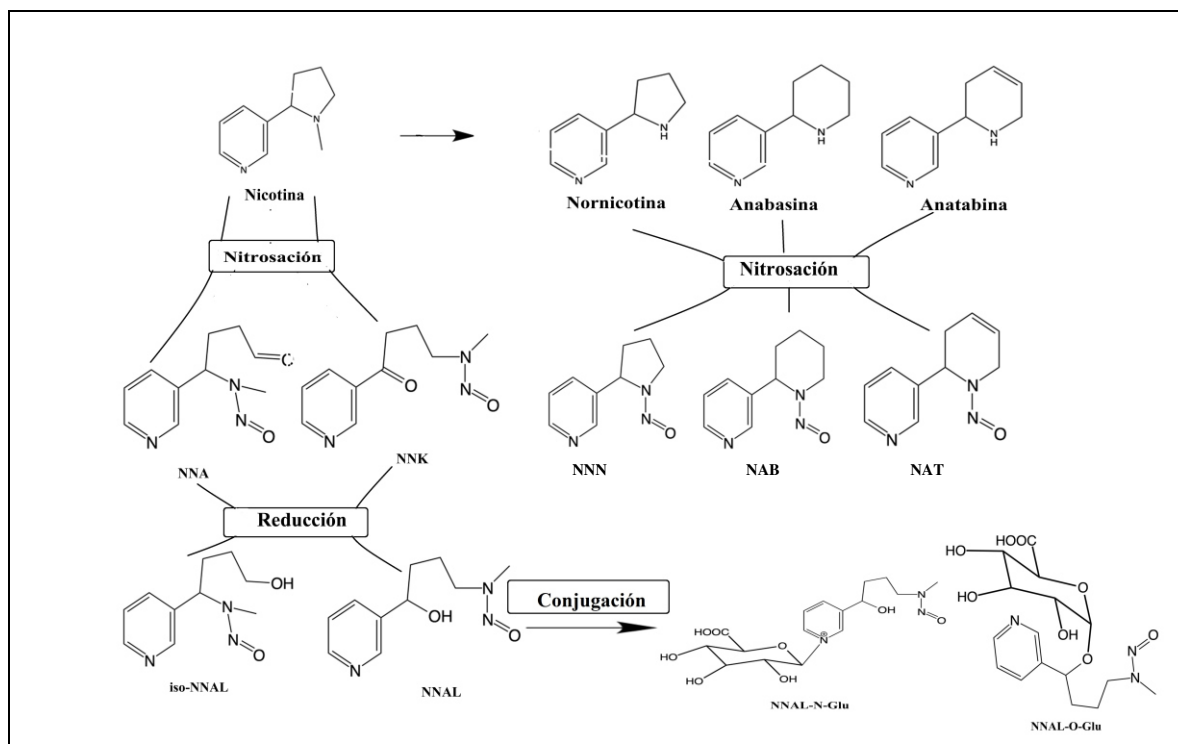


Figura 2 Esquema de la formación de diversas TSNA.¹⁷

La 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona, llamada también NNK, es la principal nitrosamina derivada de la nicotina. La NNK es un procarcinógeno que para ejercer efecto tumorigénico requiere activación metabólica, la cual puede ser por tres rutas principales: reducción del grupo carbonilo, N-oxidación y la α -hidroxilación del anillo de piridina.¹⁸ El producto de la reducción del grupo carbonilo es el 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol, también conocido como nitrosamina alcohol derivada de la nicotina (NNAL). El NNAL presenta niveles séricos muy bajos, ya que es un sustrato de la enzima glucuronosiltransferasa que lo transforma en conjugados del ácido glucorónico (NNAL-Glu), los cuales pueden formarse tanto en el grupo carbinol, para formar NNAL-O-Glu, como en el nitrógeno del anillo de piridina resultando

NNAL-N-Glu, ver estructuras en la Figura 2, siendo depurados rápidamente por el organismo mediante excreción por la orina.¹⁸⁻²⁰

1.6 Determinación del carcinógeno 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1- butanol (NNAL).

Para la determinación de NNAL en orina se han reportado diferentes métodos, los cuales involucran etapas de extracción, limpieza del extracto y análisis cromatográfico. En general, los métodos involucran el empleo de instrumental especializado de elevados costos.

1.6.1 Técnicas cromatográficas.

La tabla 1 presenta la evolución de los métodos analíticos en la determinación del NNAL; donde se puede observar que las técnicas cromatográficas empleadas para su análisis son: cromatografía de gases con analizador de energía térmica (GC-TEA), cromatografía de gases con detector de masas selectivas (GC-MSD), cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS) y la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS).

Cada una de estas técnicas presenta ventajas y limitaciones. La GC-TEA posee un detector altamente sensible para compuestos que poseen en su estructura grupos nitro (-NO₂) y/o nitroso (-NO).²¹ Las desventajas que presenta esta técnica son: la gran cantidad de volumen de muestra requerida y que los procesos de preparación de muestras son muy laboriosos y costosos;²² la mayoría de los laboratorios no podría justificar el uso de un detector tan especializado debido a que no tienen una aplicación regular y frecuente, además de que el detector no puede distinguir la coelución de compuestos nitrosos.²³ Al utilizar esta técnica cromatográfica con las primeras técnicas de preparación de muestras, se podía detectar de 0.23–1.00 µg de NNAL y de

0.57–6.50 μg de NNAL-Glu por orina de 24 horas²⁴ y en los últimos reportes utilizando esta técnica se detectaron de 0.018 ng mL^{-1} de NNAL.²⁵

La GC-MSD se ha utilizado poco para el análisis así como para la confirmación tanto del NNAL como del NNAL-Glu en muestras de orina. Carmella *et al.* en 1993 utilizaron un GC-MS-SIM empleando ionización química positiva, utilizando metano como reactivo de ionización, para la identificación del NNAL derivatizado.²⁴ Mientras Bernet *et al.* reportaron el uso de GC-HRMS para el análisis de NNAL y el método desarrollado presentó límites de detección de 0.6 pg mL^{-1} ;²⁶ esto debido a que la detección de HRMS agrega especificidad al análisis requiriendo que la señal registrada tenga la masa exacta, dentro de un intervalo estrecho, correspondiente al analito y la eliminación del ruido químico permite límites de detección del rango de picogramos.²⁷ Por otra parte, la GC-MS/MS es de gran utilidad para la elucidación estructural y el análisis cuantitativo, donde el primer analizador proporciona una separación de masa nominal del analito de la matriz y el ion seleccionado experimenta activación por colisión (CA) para formar fragmentos estructuralmente relevantes.²⁷ Sin embargo, a pesar de tener límites de detección mejores que GC-TEA, la GC-MS/MS se ha utilizado principalmente para la confirmación de los picos cromatográficos ya que los costos de adquisición del equipo son elevados.²⁸

Finalmente, tenemos el desarrollo de la HPLC-MS/MS, la aplicación de esta técnica ha encontrado una rápida aceptación en el análisis de NNAL en

muestras biológicas, debido a la necesidad del análisis de un mayor número de muestras y un tiempo de análisis menor. La HPLC-MS/MS requiere una preparación de muestra simple, la separación de los analitos se alcanza en un menor tiempo y posee buena sensibilidad y selectividad al operar en modo de monitoreo de reacción múltiple; sin embargo presenta la desventaja de la posible supresión iónica de las muestras que podría llevar a la mala cuantificación de las mismas.²⁹ Los límites de detección reportados con el uso de HPLC-MS/MS es 0.3 - 1.49 pg mL⁻¹ con técnicas de preparación de muestras menos laboriosas y menor cantidad de muestra utilizada.³⁰⁻³²

Tabla 1 Compilación de los estudios que analizan NNAL y NNAL-Glu.

TSNA analizada	Tipo de muestra	Método analítico	Volumen utilizado	Técnica de preparación de muestra	Comentarios	Referencia
NNAL ^a y NNAL-Glu ^c	Orina de 24 h	GC-TEA y confirmación por GC-MSD	100 mL	Extracción Líquido-Líquido, posterior limpieza por HPLC y Derivatización utilizando trimetilclorosilano	Determinaron NNAL-Glu obteniendo la forma libre por hidrólisis con β -glucoronidasa (5000 unidades e incubación de 16 h). Utilizaron d ₅ -NNAL y d ₅ -NNAL-Glu como estándar interno.	Carmella <i>et al.</i> , 1993. ²⁴
NNAL ^a y NNAL-Glu ^c	Orina de 24 h	GC-TEA	100 mL	Método desarrollado por Carmella <i>et al.</i> , 1993	Utilizaron iso-NNAL como estándar y 500000 U de β -glucoronidasa.	Hecht <i>et al.</i> , 1993. ³³
NNK ^d , NNAL ^a , NNAL-Glu ^c	Muestra aleatoria	GC-TEA	20 mL	Método de Carmella <i>et al.</i> , 1993, con pequeñas modificaciones.	Utilizaron iso-NNAL como estándar y un volumen menor de muestra.	Murphy <i>et al.</i> , 1994. ³⁴
NNAL ^a y NNAL-Glu ^c	Diferentes protocolos	GC-TEA	25 mL	Método de Carmella <i>et al.</i> , 1993, con pequeñas modificaciones.	Utilizaron iso-NNAL como estándar interno. Probaron tres tipos de β -glucoronidasa.(IX-A, H-1 y B-1) observando que el mejor rendimiento se obtuvo con la enzima IX-A.	Carmella <i>et al.</i> , 1995. ³⁵
NNAL total ^b y NNAL-Glu ^c	Orina de 24 h	GC-TEA	25 mL	Método desarrollado por Carmella <i>et al.</i> , 1995	El preservador de muestra utilizado fue sulfamato de amonio al 20 % en ácido sulfúrico 3.6 N.	Kresty <i>et al.</i> , 1996. ³⁶
NNAL ^a y NNAL-Glu	Muestra aleatoria	GC-TEA	20–25 mL	Método desarrollado por Carmella <i>et al.</i> , 1995.	Aplicación del método sin modificaciones.	Richie <i>et al.</i> , 1997. ³⁷
NNAL ^a y NNAL-Glu ^c	Orina de 24 h	GC-TEA	20–25 mL	Método desarrollado por Carmella <i>et al.</i> , 1995.	Utilizaron ácido ascórbico como preservador de muestras.	Taioli <i>et al.</i> , 1997. ³⁸

Tabla 1 Continuación

TSNA analizada	Tipo de muestra	Método analítico	Volumen utilizado	Técnica de preparación de muestra	Comentarios	Referencia
NNAL-Glu ^c	Muestra aleatoria	GC-TEA y confirmación por GC-MS/MS	50 mL	Método de Hecht <i>et al.</i> , 1993 con pequeñas modificaciones.	Utilizaron iso-NNAL como estándar interno y 25000 U de β -glucuronidasa. El análisis cromatográfico se realizó con una columna capilar DB-1701 (30 m x 0.32 mm x 0.25 μ m).	Parsons <i>et al.</i> , 1998. ³⁹
NNAL ^a y NNAL-Glu ^c	Orina de 24 h	GC-TEA y confirmación por GC-MS/MS	25 mL	Método de Carmella <i>et al.</i> , 1995 con pequeñas modificaciones.	Aplicaron el uso de columnas capilares como Parsons <i>et al.</i> , 1998.	Hecht <i>et al.</i> , 1999. ⁴⁰
NNAL ^a y NNAL-Glu ^c	Muestra aleatoria	GC-TEA	4 - 9 mL	Método de Carmella <i>et al.</i> , 1995 y Parsons <i>et al.</i> , 1998 con pequeñas modificaciones.	Utilizaron iso-NNAL como estándar interno y 10000 U de β -glucuronidasa.	Lackmann <i>et al.</i> , 1999. ⁴¹
NNAL ^a y NNAL-Glu ^c	Muestra aleatoria	GC-TEA	20 mL no fumadores y 5 mL para fumadores	Método de Carmella <i>et al.</i> , 1993, Hecht <i>et al.</i> , 1993 y Parsons <i>et al.</i> , 1998 con pequeñas modificaciones.	La purificación de las muestras se realizó con una columna Luna (de 4.6 x 250 mm de 5 μ m tamaño de partícula)	Anderson <i>et al.</i> , 2001. ⁴²
NNAL ^a y NNAL-Glu ^c	Muestra aleatoria	GC-TEA y confirmación por GC-MS/MS	20 mL	Método de Hecht <i>et al.</i> , 1993 y Parsons <i>et al.</i> , 1998 con pequeñas modificaciones.	Para la hidrólisis utilizaron 25000 unidades de β -glucuronidasa. La limpieza de los extractos se realizó por HPLC fase normal e inversa.	Hecht <i>et al.</i> , 2001. ⁴³

Tabla 1 Continuación

TSNA analizada	Tipo de muestra	Método analítico	Volumen utilizado	Técnica de preparación de muestra	Comentarios	Referencia
NNAL-O-Glu, NNAL ^a y NNAL-N-Glu	Muestra aleatoria	GC-TEA	10 mL	Extracción en fase sólida con cartuchos SepPakVac C18 de 2 g.	En la fracción 1 (metanol 10%) se eluyó el NNAL-Glu, que posteriormente se dividió en dos alícuotas tratadas con: hidróxido de sodio (NNAL-N-Glu) y la otra con β glucoronidasa (NNAL-N-Glu y NNAL-O-Glu). La fracción 1 contenía NNAL libre y se eluyó con metanol 50%. Se utilizó iso-NNAL como estándar interno.	Carmella <i>et al.</i> , 2002. ⁴⁴
NNAL ^a y NNAL-Glu ^c	Orina de 24 h	GC-TEA	No especificado	Método de Hecht <i>et al.</i> , 1999.	La limpieza de los extractos se realizó por HPLC fase normal e inversa.	Hecht <i>et al.</i> , 2002. ⁴⁵
NNAL total ^b	Muestra aleatoria	GC-TEA, se realizaron pruebas con GC-MS/MS	4.5 mL fumadores y 20 mL en no fumadores	Extracción líquido-líquido de la muestra acidificada. La limpieza por extracción líquido-líquido con soporte y se enriqueció por HPLC y se derivatizó.	Para la extracción líquido-líquido con soporte se utilizaron cartuchos Chem-Elute. Las condiciones de derivatización fueron: calentamiento a 50 °C por 1 h. Se encontró buena sensibilidad con GC-MS/MS.	Camella <i>et al.</i> , 2003. ²⁸
NNAL ^a y NNAL-Glu ^c	Orina 24 horas	HPLC-MS/MS	10 mL para NNAL y 5 mL para NNAL total	Extracción en un solo paso por extracción en fase sólida. De intercambio catiónico.	Utilizaron los cartuchos Oasis MCX de 60 mg. El estándar interno fue d ₃ -NNAL. No se requirió derivatización.	Byrd y Ogden, 2003. ²²
NNAL total ^b	Muestra aleatoria	GC-TEA	4.5 mL	Método de Carmella <i>et al.</i> , 1995, Hecht <i>et al.</i> , 1999.	Se realizó el seguimiento de diversos biomarcadores urinarios.	Murphy <i>et al.</i> , 2004. ⁴⁶

Tabla 1 Continuación

TSNA analizada	Tipo de muestra	Método analítico	Volumen utilizado	Técnica de preparación de muestra	Comentarios	Referencia
NNAL ^a y NNAL-Glu ^c	Muestra aleatoria	GC-MS de alta resolución	5 mL	Extracción líquido-líquido, en dos condiciones, limpieza por extracción en fase sólida, y derivatización con anhídrido del ácido heptafluorobutírico.	Utilizaron como estándar interno ¹³ C ₆ -NNAL. La hidrólisis del NNA-Glu la realizaron con 10000 unidades de β-glucoronidasa de <i>H. pomata</i> y con incubación de 48 h.	Bernet <i>et al.</i> , 2005. ²⁶
NNAL total ^b	Muestra aleatoria	HPLC-MS/MS	5 mL	Extracción en un solo paso por extracción en fase sólida, utilizando cartuchos con polímeros molecularmente impresos.	El estándar interno fue ¹³ C ₆ -NNAL. No se requirió derivatización. Para la hidrólisis realizaron estudios con la β glucoronidasa IX-A de <i>E. coli</i> y la H-1 de <i>H. pomata</i> , no encontraron diferencia significativa entre ambas.	Xia <i>et al.</i> , 2005. ⁴⁷
NNAL ^a y NNAL-Glu ^c	Muestra aleatoria	GC-TEA	No especificado	Método de Carmella <i>et al.</i> , 2003.	La limpieza del extracto lo realizaron por extracción en fase sólida de intercambio iónico y como estándar interno el 5-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-pentanol.	Hecht <i>et al.</i> , 2006. ⁴⁸
NNAL total ^b	Muestra aleatoria	GC-TEA	No especificado	Método de Hecht <i>et al.</i> , 1999 y Hecht <i>et al.</i> , 2001.	Utilizaron como estándar interno el C5-NNAL.	Stepanov <i>et al.</i> , 2006. ²⁵
NNAL ^a y NNAL total ^b	Orina 24 horas	HPLC-MS/MS	No especificado	Extracción en fase sólida utilizando cartuchos de intercambio catiónico.	Utilizaron d ₃ -NNAL como estándar interno.	Scherer <i>et al.</i> , 2007. ⁴⁹

Tabla 1 Continuación

TSNA analizada	Tipo de muestra	Método analítico	Volumen utilizado	Técnica de preparación de muestra	Comentarios	Referencia
NNAL total ^b	Muestra aleatoria	HPLC-MS/MS	No especificado	Método basado en Carmella <i>et al.</i> , 1995, Carmella <i>et al.</i> , 2003 y Carmella <i>et al.</i> , 2005.	Realizó estudios utilizando GC-TEA y HPLC-MS/MS	Hecht <i>et al.</i> , 2007. ⁵⁰
NNAL total ^b	Muestra aleatoria	HPLC-MS/MS	5 mL	Extracción Líquido-Líquido con variaciones de pH.	Se realizó derivatización con anhídrido hexanoico.	Jacob III <i>et al.</i> , 2008. ⁵¹
NNAL total ^b , NNN ^g total, NAB total ^e y NAT ^f	No especificado	HPLC-MS/MS	6 mL	Extracción en fase sólida con polímeros molecularmente impresos y Extracción en fase sólida de intercambio catiónico se realizó con la finalidad de enriquecer el extracto	Los estándares internos fueron los analitos de interés deuterados. La extracción en fase sólida.	Kavvadias <i>et al.</i> , 2009. ⁵²
NNAL ^a y NNAL total ^b	Muestra aleatoria	HPLC-MS/MS	5 mL	Extracción líquido con soporte y posteriormente una extracción líquido-líquido y el paso final extracción en fase sólida con polímeros molecularmente impresos	La extracción líquido con soporte se realizó en cartuchos ChemElute. Método cromatográfico por Xia <i>et al.</i> , 2005.	Ashley <i>et al.</i> , 2010. ⁵³
NNAL ^a y NNAL total ^b	Muestra aleatoria	HPLC-MS/MS	0.25 mL	Extracción líquido-líquido. Derivatización con acetonitrilo/ yoduro de n-propilo. Posterior purificación por extracción en fase sólida de intercambio catiónico.	Utilizaron d ₃ -NNAL como estándar interno. Se empleó un método de dilución isotópica estable en combinación con HPLC-MS/MS y empleo del monitoreo de reacciones múltiples.	Bhat <i>et al.</i> , 2011. ⁵⁴
NNAL ^a y NNAL-Glu ^c	Orina de 24 h	HPLC-MS/MS	1 mL	Extracción en línea con columnas capilares de microflujo con polímeros molecularmente impresos.	Para el análisis se ajustó el pH de la orina entre 5 y 7. Se realizó el análisis del NNAL total hidrolizando la muestra acondicionada con buffer de fosfatos pH 6.4 y 20000 unidades de β-glucoronidasa H-1 y se incubaron por 48 h.	Shah <i>et al.</i> , 2011. ⁵⁵

Tabla 1 Continuación

TSNA analizada	Tipo de muestra	Método analítico	Volumen utilizado	Técnica de preparación de muestra	Comentarios	Referencia
NNAL total ^b	Orina de 24 h	HPLC-MS/MS	5 mL	Método basado en Shah <i>et al.</i> , 2009.	Agregaron 5 mL de buffer de fosfatos 50 mM, ajustaron el pH a 6.3, adicionaron 2 ng del estándar interno y 10000 unidades de β-glucoronidasa en buffer de fosfatos pH 7.2.	Hou <i>et al.</i> , 2012. ⁵⁶
NNAL ^a , NNAL-O-Glu y NNAL-N-Glu	Muestra aleatoria	HPLC-MS/MS	10 mL	Extracción líquido-líquido, seguida de una extracción en fase sólida de intercambio catiónico.	Se analizaron los analitos sin hidrolizar. El estándar interno fue ¹³ C ₆ -NNAL. El método desarrollado se comparó con los métodos enzimáticos reportados por Shah <i>et al.</i> , 2009 y Hou <i>et al.</i> , 2012 y se observó una variación en los resultados de -8.39 % a 13.38 % para el NNAL y de -3.04 % a 21.54 % para el NNAL total.	Yao <i>et al.</i> , 2013. ³²
NNAL ^a , NNAL-O-Glu y NNAL-N-Glu	Muestra aleatoria	HPLC-MS/MS	180 μL	Extracción líquida con soporte (SLE) en formato de placa de 96 pozos, seguida por una extracción en fase sólida en formato de placa de 96 pozos. El tratamiento de los analitos se basó en una adaptación del procedimiento de Carmella <i>et al.</i> , 2002.	La determinación de los analitos se realizó dividiendo el volumen de muestra en 3 fracciones: 80 μL para NNAL libre, 60 μL para NNAL-N-Glu y 40 μL para NNAL total. Para la extracción líquido con soporte se utilizaron las placas de Isolute SLE+ y la para extracción en fase sólida se emplearon placas de Oasis MCX. El estándar interno utilizado fue ¹³ C ₆ -NNAL.	Carmella <i>et al.</i> , 2013. ⁵⁷

Nota: ^aNNAL: NNAL libre, ^bNNAL Total: NNAL libre + NNAL-Glu, ^cNNAL-Glu: NNAL-N-Glu + NNAL-O-Glu, ^dNNK: nitrosonicotina cetona, ^eNAB:nitrosoanabasina, ^fNAT: nitrosoanatabina, ^gNNN: nitrosonornicotina

1.6.2 Preparación de muestras.

La preparación de muestras consiste en convertir una muestra real a un formato que sea adecuado para el análisis por alguna separación analítica u otra técnica. Esta etapa del método analítico, consume alrededor del 80 % del tiempo total del análisis de una muestra,⁵⁸ siendo sus principales objetivos:

1. Favorecer la selectividad del método, mediante la remoción de interferencias potenciales presentes en la muestra.
2. Incrementar la concentración del analito y así potenciar la sensibilidad del ensayo.
3. Convertir el analito a una forma más adecuada para su detección o separación.
4. Proveer un método robusto y reproducible que sea independiente de las variaciones en la matriz de la muestra.

Se debe considerar que estas técnicas presenten: una mínima pérdida de muestra, una buena recuperación del analito de interés, una eficiente eliminación de compuestos no deseados, un fácil acoplamiento a las técnicas de análisis, ser de fácil aplicación y presentar el mínimo costo.⁵⁹

En la tabla 1, además de las técnicas cromatográficas empleadas para el análisis del NNAL, también se pueden observar las técnicas de preparación de muestras utilizadas para el análisis de NNAL y NNAL-Glu, así como comentarios de interés para cada uno de los procedimientos, siendo la extracción líquido-líquido, la extracción en fase sólida y la extracción en fase sólida utilizando polímeros molecularmente impresos las técnicas más utilizadas; por lo que vale la pena hacer una breve descripción de las mismas.

1.6.2.1 Extracción líquido-líquido.

La extracción líquido-líquido (LLE) ha sido la técnica de preparación de muestra predominante en el análisis de NNAL y NNAL-Glu. La LLE se basa en la transferencia de un analito de una muestra acuosa a un solvente inmiscible en agua, es decir, se basa en la relación de partición (K_D), lo que representa la razón de la distribución de una sustancia entre dos fases inmiscibles, en este caso una fase acuosa y una orgánica, cuando el sistema está en equilibrio y a una temperatura constante.⁶⁰ Es la forma más simple de la extracción y purificación de analitos a partir de muestras líquidas y ha sido ampliamente utilizada en el análisis de muestras biológicas. Dentro de las desventajas que presenta la LLE son la formación de emulsiones, múltiple manipulación de la muestra, puede consumir mucho tiempo así como el uso de grandes cantidades de solventes orgánicos potencialmente tóxicos, lo que conlleva a la producción de grandes volúmenes de residuos tóxicos.⁶¹

En los primeros reportes para la determinación del NNAL y NNAL-Glu se utilizó como principal técnica de extracción la LLE, tomando como modelo la metodología que reportó Carmella *et al.* en 1993,²⁴ la cual consistió en realizar una extracción líquido-líquido de la orina a pH neutro con acetato de etilo; esto con la finalidad de separar la fracción libre (contenida en la fase orgánica) de la fracción conjugada del NNAL (contenida en la fase acuosa). Posteriormente, la fase acuosa se sometió a un proceso de concentración seguido de una hidrólisis enzimática del NNAL-Glu, para lo cual se utilizó la enzima β -glucuronidasa tipo IX-A para liberar el NNAL del conjugado. Terminada la hidrólisis, se realizó una limpieza mediante dos procesos de partición. Para el primero, se acidificó la fase acuosa para provocar la ionización del NNAL y de esta manera asegurar su permanencia en la fase acuosa; mientras que en el segundo proceso de partición se neutralizó la fase acuosa, con lo cual el NNAL se convirtió en su forma no ionizada y se recuperó mediante una extracción con diclorometano. Tanto la fracción de acetato de etilo como la fracción de diclorometano fueron llevadas a sequedad, se reconstituyeron en agua y fueron purificadas mediante HPLC.

Las fracciones purificadas se derivatizaron con trimetilclorosilano, con la finalidad de producir un derivado de trimetilsiléter eter del alcohol secundario para su análisis por GC-TEA.²⁴

Este método de preparación de muestra fue utilizado como base para posteriores trabajos con la aplicación de pequeñas modificaciones, entre las que se pueden mencionar: cambio del estándar interno utilizado;^{33, 35, 38-43, 45, 46, 62} diferente cantidad de enzima requerida en el paso de hidrólisis;^{33, 62} menor cantidad de muestra;^{35, 37-43, 46, 62} diferente conservador de muestra;^{46, 62} así como modificaciones al paso de purificación por HPLC.²⁵

Con la finalidad de reducir los costos del tratamiento de muestra por LLE, esta se puede desarrollar empleando volúmenes pequeños de solventes orgánicos. En el 2008, Jacob *et al.* tomaron 5 mL de muestra de orina y realizaron extracciones empleando menos de 10 mL de los solventes orgánicos, utilizaron la agitación por vórtex para mejorar la eficiencia de extracción y ciclos de centrifugación - congelación de la fase acuosa para la eliminación de emulsiones y la separación de las fases. Este método también incluyó un proceso de derivatización con anhídrido hexanoico y 4-(dimetilamino) piridina, con la finalidad de convertir el grupo hidroxilo (moderadamente polar) en un grupo éster (relativamente no polar) y como consecuencia de esta modificación química se logró: aumentar la sensibilidad del método de HPLC-MS/MS debido a la disminución de la supresión iónica, aumentar la retención en la columna cromatográfica y separar eficientemente el analito y los compuestos interferentes mediante la extracción y el análisis cromatográfico.⁵¹

1.6.2.2 Extracción en fase sólida.

La extracción en fase sólida (SPE) es una técnica de partición del analito entre una fase sólida (en diversas presentaciones) y una fase líquida, que se puede aplicar para extraer analitos de baja o nula volatilidad, donde los analitos deben presentar una mayor afinidad por la fase extractante que por la matriz de la muestra. La retención puede deberse a interacciones no polares, polares o iónicas, que dependerán de las propiedades físico-químicas del analito y de la fase extractante.

Existe una amplia variedad de fases extractantes para SPE, entre las que podemos citar a las unidas químicamente a la sílica: C8, C18, intercambio iónico; materiales con más de un mecanismo de retención, también llamados de modo mixto, los inmunoabsorbentes y los polímeros molecularmente impresos.⁶¹ Algunas ventajas de la SPE sobre las extracciones y limpieza convencionales son: mayor reproducibilidad, empleo de menores volúmenes de solventes, rapidez, versatilidad, costos menores, posibilidad de automatización y obtención de extractos libres de interferencias.⁶³

Carmella *et al.* reportaron por primera vez en 1995 el uso de la SPE para el análisis del NNAL en orina,³⁵ ellos investigaron la posibilidad de sustituir el

paso de limpieza por HPLC por la limpieza por SPE en fase normal o fase inversa, pero los cromatogramas que obtuvieron no fueron aceptables para la cuantificación por GC-TEA. Posteriormente en el 2002, emplearon cartuchos Sep pack Vac C18 para la separación del NNAL libre y NNAL-Glu en muestras de orina, realizando la elución con metanol al 10 % para el NNAL-Glu y metanol al 50 % para el NNAL libre , obtuvieron coeficientes de variación menores al 10 % para cada uno de los analitos.⁴⁴

Byrd y Ogden en el 2003 reportaron un método, validado según los criterios de la FDA, para la determinación de NNAL y NNAL-Glu mediante SPE en cartuchos de intercambio catiónico Oasis MCX de 60 mg y el análisis por HPLC-MS/MS.²² Los volúmenes de muestra que analizaron fueron de 10 y 5 mL para la determinación del NNAL libre y del NNAL total, respectivamente. La concentración de NNAL-Glu la calcularon como la diferencia entre el NNAL total y el NNAL libre. Ellos observaron que al reducir los pasos de la preparación de las muestras, se logró disminuir el tiempo de análisis de las mismas y obtuvieron una recuperación del analito superior al 85 %.

En el 2005, Bernet *et al.*²⁶ cambiaron el proceso de limpieza mediante HPLC por una limpieza por SPE utilizando cartuchos Oasis HLB y posteriormente una derivatización con ácido heptafluorobutírico (HFBA) y el análisis por GC-MSHR; la recuperación promedio del método desarrollado fue de 97.5 % en un rango de 10 - 800 pg mL⁻¹.²⁶ Hecht *et al.*, en el 2006,⁴⁸ realizaron modificaciones al método desarrollado por Carmella *et al.*,²⁸ las cuales consistieron en la sustitución del paso de limpieza de HPLC por una SPE

de intercambio catiónico y posterior análisis por GC-TEA, con lo que simplificaron el paso de limpieza del extracto y evitaron el uso del HPLC para la realización de la limpieza. Este trabajo, fue adaptado en el 2007 para el análisis de los extractos por HPLC-MS/MS por Scherer *et al.*⁴⁹ y Hecht *et al.*⁵⁰.

1.6.2.3 Polímeros Molecularmente Impresos.

Los polímeros molecularmente impresos (MIP) son materiales extractantes utilizados en SPE, que no solo concentran a los analitos de interés, sino que también puede separarlos selectivamente en muestras reales. Los MIPs son polímeros sintéticos cuya principal ventaja es la posibilidad de preparar una fase extractante selectiva para un predeterminado analito o un grupo de analitos.⁶¹

En el 2005, Xia *et al.* reportaron la síntesis de una fase extractante diferente a las convencionales, que era preparada con una selectividad o memoria para una sola molécula o clase de moléculas, en este caso para el NNAL y su aplicación para el análisis de muestras de orina.⁴⁷ Ellos observaron que los resultados del método por HPLC-MS/MS aplicando el uso de esta tecnología fue lo suficientemente sensible para lograr la determinación de NNAL tanto en fumadores activos como en no fumadores expuestos a HTA.

Tomando como antecedente el trabajo de Xia *et al.*, en el 2009, Shah *et al.*, realizaron pequeñas modificaciones al método, las cuales consistieron en el uso de la centrífuga durante la elución de los analitos con lo cual se garantizó la uniformidad de la velocidad de elución y se redujo el 50% del tiempo empleado en el método original.⁶⁴ En ese mismo año, 2009, Kavvadias *et al.* reportaron el análisis simultáneo de cuatro TSNAs: NNAL, N-nitrosonor nicotina (NNN), N-nitrosoanabasina (NAB) y N-nitrosoanatabina (NAT) por HPLC-MS/MS; la preparación de las muestras consistió en un proceso de SPE con polímeros molecularmente impresos, analizando alícuotas de 6 mL de orina y realizando un enriquecimiento del extracto mediante SPE de intercambio catiónico.⁵² En el 2014, Xia *et al.* reportaron la comparación de la eficiencia de extracción de dos tipos de polímeros molecularmente impresos, uno específico para el NNAL y otro selectivo para TSNAs (NNN, NNK, NAB, NAT) elaborados por el mismo fabricante.³¹ Las recuperaciones obtenidas con los cartuchos NNAL-MIP fueron de 67.2, 53.0, 64.4, 52.6 y 52.6 % para el NNAL, NNN, NAT, NAB y NNK, respectivamente; mientras las recuperaciones obtenidas con los cartuchos TSNA-MIP fueron alrededor de 3 veces menor para el NNAL y 1.5 veces mayor para las demás nitrosaminas específicas del tabaco. Por lo que a pesar de utilizar cartuchos específicos, el NNAL presenta competencia por las otras nitrosaminas con quien comparte similitud en estructura, las cuales podemos observar en la Figura 2.

1.6.3 Nuevas Técnicas de Preparación de Muestra.

Actualmente, la tendencia en los métodos bioanalíticos es la búsqueda y desarrollo de nuevas tecnologías que permitan aumentar el número de muestras analizadas, así como disminuir la cantidad de muestra requerida, el tiempo y el costo por análisis, así como la cantidad de residuos generados. Las técnicas de preparación de muestras como la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) y la microextracción en fase sólida (SPME) presentan dics características y se presenta una breve descripción de cada una de ellas.

1.6.3.1 Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva.

La microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME), fue desarrollada en el año del 2006 por Assadi *et al.* La técnica de microextracción líquido-líquido está basada en un sistema de tres solventes en el cual el solvente de extracción y el solvente de dispersión son inyectados rápidamente en la muestra acuosa con ayuda de una jeringa. La mezcla obtenida es agitada y se forma una solución turbia (formada por el agua, el solvente de dispersión y el solvente de extracción). Después de una centrifugación, las partículas finas de

solvente de extracción son separadas. Se recupera el volumen de solvente de extracción con una microjeringa y se inyecta al sistema cromatográfico.^{65, 66}

Las principales ventajas de la DLLME es la simplicidad de su procedimiento, rapidez, bajo costo, altas recuperaciones, altos factores de enriquecimiento y es benévolo con el ambiente. Además presenta una amplia aplicación en el análisis de analitos trazas.⁶¹

El mecanismo de extracción se basa en el equilibrio del proceso de distribución del analito de interés entre la solución de la muestra y el solvente de extracción. Se aplica a compuestos con propiedades lipofílicas altas o moderadas. Para los compuestos con propiedades ácido-base, se puede incrementar el coeficiente de distribución mediante variaciones en el pH de la muestra, provocando que los analitos existan en su estado no iónico.⁶⁶

Al inicio, la DLLME sólo se realizaba con solventes más densos que el agua (en su mayoría solventes clorados), pero recientemente se han encontrado reportes de la aplicación de la técnica con solventes menos densos que el agua, ya que existe un gran número de estos solventes y además son menos tóxicos para el analista y el ambiente.^{67, 68}

La microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) se ha aplicado en la extracción de NNAL en cabello,³² pero no se ha probado en la matriz de orina.

1.6.3.2 Microextracción en Fase Sólida.

La microextracción en fase sólida (SPME) es una técnica desarrollada por Pawliszyn y dada a conocer a partir de 1990, que consiste en una pequeña cantidad de fase extractante dispersa sobre un soporte sólido. Una de las configuraciones del sistema de SPME consiste en una pequeña fibra de sílice fundida, normalmente recubierta de una fase polimérica, la cual está instalada sobre un soporte, obteniéndose un sistema semejante a una jeringa modificada.⁶⁹ Es un proceso de extracción no exhaustivo basado en el establecimiento del equilibrio de partición entre la matriz y la fase extractante; el proceso de extracción, purificación y concentración se realiza en un solo paso.

La modalidad de extracción puede realizarse por inmersión directa, es decir, que la fibra esté en contacto directo con la matriz de la muestra, o mediante el muestreo en el espacio de cabeza o *headspace* (HS) cuando la matriz de la muestra es muy compleja y los analitos de interés son volátiles o

medianamente volátiles. También las fases extractantes comercialmente disponibles presentan una amplia gama de polaridades, según las características del analito de interés. La SPME puede ser una opción para el análisis de NNAL en muestras de orina ya que este es un compuesto semivolátil y además existen fibras de una amplia gama de polaridad que pueden favorecer la extracción del NNAL y el uso de la modalidad de extracción por HS evita las complicaciones del manejo de la muestra.

1.7 Justificación.

El NNAL y sus conjugados han sido utilizados como marcadores del riesgo de sufrir afecciones pulmonares por el consumo del tabaco; sin embargo, su determinación puede ser compleja ya que se requiere de métodos laboriosos de preparación de muestra, además de equipos con detectores específicos y de alta resolución. Debido a lo anterior, el desarrollo de nuevos procedimientos para la determinación del NNAL es un tópico de interés actual.

El presente trabajo plantea el desarrollo y validación de un método analítico para la determinación del NNAL, utilizando diversas técnicas de preparación de muestra y el uso de cromatografía de gases-espectrometría de masas de baja resolución; haciendo accesible la determinación en laboratorios que no cuenten con equipos con detectores específicos y de alta resolución.

Este método permitirá desarrollar, en conjunto con trabajos sobre el estudio de las variantes genéticas de proteínas involucradas en el metabolismo y eliminación del NNAL, sistemas de detección y diagnóstico del riesgo a sufrir de afecciones por el consumo del tabaco mediante el establecimiento de perfiles toxicológicos y toxicogenéticos.

1.8 Objetivo general.

Desarrollar, optimizar y validar un método analítico para la determinación y cuantificación del NNAL libre y total en orina utilizando diferentes técnicas de preparación de muestra y cromatografía de gases/espectrometría de masas de baja resolución (GC/LRMS).

1.9 Objetivos específicos.

1. Desarrollar y validar el método, por cromatografía de gases/espectrometría de masas de baja resolución (GC/LRMS), para el análisis del NNAL.
2. Desarrollar y optimizar diferentes procedimientos de preparación de muestra para la determinación del NNAL en orina.
3. Seleccionar y validar el/los método(s) más adecuado para la determinación del NNAL libre.
4. Aplicar el método seleccionado al análisis de muestras de orina de voluntarios jóvenes para la determinación del NNAL libre.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material, equipos y reactivos.

En esta sección se enlistan los materiales, reactivos y equipos que se utilizaron en la realización de este trabajo.

2.1.1 Material.

Barras magnéticas.

Cartuchos para SPE

- a) SupelMIPTM NNAL, 25 mg de adsorbente, 10 mL, Supelco.
- b) Sep Packt C18, 1 g de adsorbente, 6 mL, 37-55 μm de tamaño de partícula, Waters.

Columnas cromatográficas:

- a) DB-17, 0.25 mm de diámetro interno, 30 m de longitud, 0.25 μm de espesor de fase, Agilent.
- b) DB-17MS, 0.25 mm de diámetro interno, 30 m de longitud, 0.25 μm de espesor de fase, Agilent.
- c) DB-1701, 0.25 mm de diámetro interno, 30 m de longitud, 0.25 μm de espesor de fase, Agilent.
- d) HP-5MS, 0.25 mm de diámetro interno, 30 m de longitud, 0.25 μm de espesor de fase, Agilent.

Cristalizadores.

Cronómetro.

Espátulas.

Fibras para SPME:

- a) Carboxen-Polidimetilsiloxano 75 μm , Supelco.
- b) Divinilbenceno-Polidimetilsiloxano (DVB-PDMS) de 65 μm , Supelco.
- c) Divinilbenceno-Carboxen-Polidimetilsiloxano (DVB-CAR-PDMS)
50-30 μm , Supelco.
- d) Poliacrilato 85 μm , Supelco.

Filtros Millex LCR con membrana de PTFE modificada, 0.45 μm , 13 mm diámetro, Millipore.

Jeringas de 1 mL sin aguja, desechables.

Jeringas de 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 μL , Agilent.

Matraces volumétricos de 1, 2, 5, 10, 100 y 250 mL.

Pinzas de tres dedos.

Pinzas para soporte.

Pipetas volumétricas de 1, 2, 5 y 10 mL.

Portafibras, Supelco.

Soporte universal.

Termómetro de -10 a 150°C.

Vasos de precipitados.

Viales de vidrio de 2 mL con tapón de rosca y septa de PTFE y silicón, Agilent.

Viales de vidrio de 15 mL con tapón de rosca y septa de PTFE y silicón.

Viales de vidrio ámbar de 40 mL con tapón de rosca y septa de PTFE y silicón.

2.1.2 Equipos.

Agitador tipo vortex, Modelo Maxi Mix II, Thermo Scientific.

Baño con temperatura controlada, Haake C1.

Baño de ultrasonido, Modelo 3510, Branson.

Bomba de vacío, Modelo 1HAB-25B-M100X, GAST Manufacturing.

Congelador -20 °C, Cool-Lab 120 V, Thermo Scientific.

Cromatógrafo de gases, Agilent 6890 N equipado con inyector split/ splitless y detector selectivo de masas 5973 inert.

Cromatógrafo de gases, Perkin Elmer Autosystem XL con inyector splits/splitless y detector de ionización de flama.

Estación de vacío para SPE con 24 posiciones, Sigma.

Placa de calentamiento y agitación, Corning, Modelo PC-420D.

2.1.3 Reactivos.

4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol (NNAL), $\geq 92\%$, Fluka.

4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol -1,2',3',4',5',6'- $^{13}\text{C}_6$ (NNAL- $^{13}\text{C}_6$),
grado estándar, Toronto Research Chemicals Inc.

4-(N-metil- d_3)-4-N-nitrosamino)-4-(3-piridil)-1-butanol (iso-NNAL deuterado),
grado estándar, Toronto Research Chemicals Inc.

Ácido fosfórico, ACS, $\geq 85\%$ p/p en Agua, Sigma Aldrich.

Agua Bidestilada Plus, Laboratorio Monterrey.

Metanol, para análisis de residuos orgánicos, $> 99.8\%$, UltraResi-
analyzed®, J.T. Baker

Diclorometano, para análisis de residuos de plaguicidas, Fluka®

Hidróxido de amonio, 28-30 % p/p, Halmek.

Tolueno, para análisis de residuos de plaguicidas acorde a la FDA, Fluka®

Fosfato de amonio monobásico, ACS, 98 %p/p, J. T. Baker.

Cloruro de sodio, Cultivo celular, ≥99 % p/p, Sigma.

Acetonitrilo, Grado Pesticida, Fischer Chemicals.

2.2 Preparación de soluciones.

2.2.1. Preparación de soluciones madres.

La solución madre del estándar analítico (NNAL) se preparó mediante la disolución de 10 mg del compuesto en metanol y posterior aforación a 10 mL,

cuya concentración final fue de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esta solución se separó en alícuotas de 1 mL, utilizando viales de vidrio de 2 mL nuevos con tapón de rosca y septa de PTFE y silicón. Se evaporó el solvente y se guardaron a -20°C hasta su uso.

La solución madre del estándar interno (iso-NNAL d3) se preparó disolviendo y aforando 1 mg del estándar con metanol hasta 1 mL; la concentración final fue de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. La solución concentrada del NNAL- $^{13}\text{C}_6$ se preparó disolviend o y aforando 0.25 mg del reactivo hasta 1 mL con metanol; la concentración final fue de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$. Las soluciones se almacenaron en viales de vidrio de 2 mL con tapón de rosca y septa de PTFE y silicón a 4°C .

2.2.2 Preparación de soluciones estándares para optimización del programa de temperaturas del GC-MS.

A partir de las soluciones madre se prepararon diluciones de los estándares individuales de cada compuesto, para lo cual se tomaron 25 μL de la solución stock y se aforó a 1 mL con metanol. También se preparó una mezcla del estándar analítico y estándar interno, cuya concentración final fue de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cada compuesto. Estas soluciones se emplearon para el establecimiento del método de GC-MS para cada columna cromatográfica.

2.2.3 Preparación de soluciones para evaluar la sensibilidad.

La curva de calibración utilizada para la evaluar la sensibilidad del sistema cromatográfico, estuvo constituida por estándares a 9 niveles de concentración: 1×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1×10^{-3} , 1×10^{-2} , 0.1, 0.5, 1, 5, 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ con una adición de 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ del estándar interno en metanol.

2.2.4 Preparación de soluciones para la validación del sistema cromatográfico.

Se manejó un intervalo de concentraciones de 0.05 a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para la evaluación de los parámetros de validación del sistema cromatográfico. La curva estuvo constituida por estándares a 9 niveles de concentración con una adición de 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ del estándar interno en metanol.

2.2.5 Preparación de soluciones para la optimización de la extracción en fase sólida con cartuchos molecularmente impresos.

Para establecer el perfil de elución, se prepararon soluciones de 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ del estándar analítico con una adición de 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ del estándar interno, en 5 mL de agua bidestilada y 5 mL de una solución amortiguadora de fosfato de amonio monobásico 50 mM a pH 6.40.

2.2.6 Preparación de soluciones para la optimización de la microextracción en fase sólida.

2.2.6.1 Preparación de soluciones para la selección de fibra y la optimización de la desorción.

Para la selección de la fibra de SPME y para la optimización de la desorción, se utilizó una solución estándar de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ del NNAL y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ del estándar interno, la cual se preparó por la adición de $40 \mu\text{L}$ de una solución estándar de NNAL de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $10 \mu\text{L}$ de una solución estándar de iso-NNAL-d3 de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ a 10 mL de una solución amortiguadora de fosfato de amonio diácido 50 mM y $\text{pH } 6.4$.

2.2.6.2 Preparación de soluciones para la optimización de la extracción

Para la optimización de la extracción se utilizó un volumen de 5 mL de una mezcla de orina de no fumadores adicionada a una concentración de 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NNAL y 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de iso-NNAL-d3 y ajustada a pH 6.4, mediante la adición de ácido fosfórico o hidróxido de amonio.

2.2.7 Preparación de soluciones para la optimización de la extracción en fase sólida con cartuchos tC18.

2.2.7.1 Preparación de soluciones para la optimización de la extracción.

Se prepararon soluciones con 5 mL de una mezcla de orina de no fumadores adicionada a una concentración de 0.1 mg mL^{-1} de NNAL y 0.1 mg mL^{-1} de iso-NNAL-d3, la orina se diluyó con 5 mL de una solución amortiguadora de fosfato de amonio monobásico 50 mM a pH 6.4.

2.2.7.2 Preparación de soluciones para el perfil de elución.

Se prepararon 5 mL de soluciones con una concentración de 0.1 mg mL^{-1} de NNAL y 0.1 mg mL^{-1} de iso-NNAL-d3, la cual se obtuvo mediante la adición de 50 μL de una solución estándar de NNAL de $10 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ y 50 μL de una solución estándar de iso-NNAL-d3 de $10 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$; previo al proceso de extracción la orina se diluyó con 5 mL de una solución amortiguadora de fosfato de amonio monobásico 50 mM a pH 6.4.

2.2.8 Preparación de soluciones para la comparación de los métodos desarrollados.

Las soluciones para la comparación de métodos se prepararon en 5 mL de una mezcla de orina de no fumadores adicionada a una concentración de $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NNAL y $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NNAL- $^{13}\text{C}_6$. previo al proceso de extracción la orina se diluyó con 5 mL de una solución amortiguadora de fosfato de amonio monobásico 50 mM a pH 6.4 y se centrifugó a 3500 rpm por 5 min.

2.2.9 Preparación de soluciones para la validación del método desarrollado.

Para preparar los estándares de las curvas de calibración se utilizaron alícuotas de 5 mL de una mezcla de orina de no fumadores. Cada curva de

calibración se realizó a 6 niveles de concentración en un intervalo de 2 a 25 ng mL⁻¹. A todas las solución estándar se adicionaron 50 ng de iso-NNAL-d3 como estándar interno y 5 mL de una solución amortiguadora de fosfato de amonio monobásico 50 mM a pH 6.4.

2.3 Cromatografía de Gases-Masas (GC-MS)

Se establecieron los programas de temperatura para el análisis por GC-MS para el NNAL utilizando como estándar interno el iso-NNAL-d3. En esta sección se probó el comportamiento de 4 columnas cromatográficas

2.3.1 Establecimiento de las condiciones de separación cromatográfica y selección de columna.

Para establecer los programas de temperatura para la separación cromatográfica de cada columna, se analizaron por inyección directa 1 μL de una solución estándar de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada compuesto, así como la mezcla de los mismos, en el cromatógrafo de gases utilizando las columnas indicadas en la tabla 2.

Tabla 2 Características de las columnas cromatográficas de interés para este trabajo.

Columna	Polaridad	Características	Composición de la fase
HP-5MS (Agilent)	No polar	30 m x 0.22 mm y 0.25 μm de espesor	5 % fenil – 95 % dimetilpolisiloxano
DB-1701 (J&W Scientific)	Baja a intermedia	30 m x 0.22 mm y 0.25 μm de espesor	14 % cianopropilfenil - 84 % dimetilpolisiloxano
DB- 17 (J&W Scientific)	Intermedia	30 m x 0.22 mm y 0.25 μm de espesor	50 % difenil- 50 % dimetilpolisiloxano
DB- 17 MS (J&W Scientific)	Intermedia	30 m x 0.22 mm y 0.25 μm de espesor	50 % difenil- 50 % dimetilpolisiloxano

2.3.1.1 Establecimiento del programa de temperatura.

Los programas iniciales de temperatura para cada columna se muestran en las tablas 3 a la 5, los cuales fueron establecidos de acuerdo a las referencias bibliográficas encontradas. Se determinaron las temperaturas a la cual eluyeron los analitos mediante cálculos, ya que se conocía el tiempo de

retención y el programa de cambio de temperatura. Posteriormente, se plantearon modificaciones a los programas de temperatura hasta obtener una separación adecuada entre el analito y el estándar interno, así como la mejor forma del pico cromatográfico.

Tabla 3 Condiciones iniciales para la columna HP-5MS

Gas acarreador		Helio
Flujo		0.8 mL min ⁻¹
Temperatura del inyector		230°C
Programa de temperatura	inicial	80°C mantener 2 min
	Rampa 1	10 °C min ⁻¹ hasta 160°C mantener 1 min.
	Rampa 2	2 °C min ⁻¹ hasta 200°C mantener 1 min.
	Rampa 3	20 °C min ⁻¹ hasta 260°C mantener 5 min.
Temperatura de la interfase		280°C
Temperatura del analizador		150°C
Temperatura de la fuente		230°C
Modo de adquisición de datos		Barrido completo de 50-350 m/z

Tabla 4 Condiciones iniciales para la columna DB-17.

Gas acarreador		Helio
Flujo		1 mL min ⁻¹
Temperatura del inyector		200°C
Programa de temperatura	inicial	80°C mantener 2 min
	Rampa 1	10 °C min ⁻¹ hasta 160°C mantener 1 min.
	Rampa 2	2 °C min ⁻¹ hasta 200°C mantener 1 min.
	Rampa 3	20 °C min ⁻¹ hasta 260°C mantener 5 min.
Temperatura de la interfase		260°C
Temperatura del analizador		150°C
Temperatura de la fuente		230°C
Modo de adquisición de datos		Barrido completo de 50-350 m/z

Tabla 5 Condiciones iniciales para la columna DB-1701

Gas acarreador		Helio
Flujo		1 mL min ⁻¹
Temperatura del inyector		225°C
Programa de temperatura	inicial	80°C mantener 1 min
	Rampa 1	20 °C min ⁻¹ hasta 180°C mantener 1 min.
	Rampa 2	2 °C min ⁻¹ hasta 210°C mantener 1 min.
	Rampa 3	20 °C min ⁻¹ hasta 260°C mantener 5 min.
Temperatura de la interfase		260°C
Temperatura del analizador		150°C
Temperatura de la fuente		230°C
Modo de adquisición de datos		Barrido completo de 50-350 m/z

Para evaluar la resolución cromatográfica (R_s),⁷⁰ se utilizó la ecuación 1:

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

t_{R2} = Tiempo de retención del compuesto más retenido.

t_{R1} = Tiempo de retención del compuesto menos retenido.

w_{b1} = Ancho del pico cromatográfico del compuesto menos retenido.

w_{b2} = Ancho del pico cromatográfico del compuesto más retenido.

2.3.1.2 Selección de columna

La selección de la columna se realizó tomando en cuenta tanto la asimetría de las señales cromatográficas y los límites de detección obtenidos de cada una de ellas. Esto se realizó con el programa de temperatura que permitió obtener las mejores condiciones para cada columna y el análisis por duplicado de una mezcla de los compuestos. Se seleccionó la columna que mostró el factor de simetría más cercano a la unidad y los menores límites de detección.

2.3.1.2.1 Cálculo de la asimetría de los picos cromatográficos.

En la figura 3 se muestra una representación de los elementos ha considerar en el cálculo del factor de asimetría (T).⁷¹ Se trazó una línea que corta el pico por su ápice y se obtuvo la altura del pico (h). Posteriormente, se determinó el 5 % de la altura y se midió el ancho a ese nivel, tanto de la parte frontal (a) como posterior (b) del pico cromatográfico.

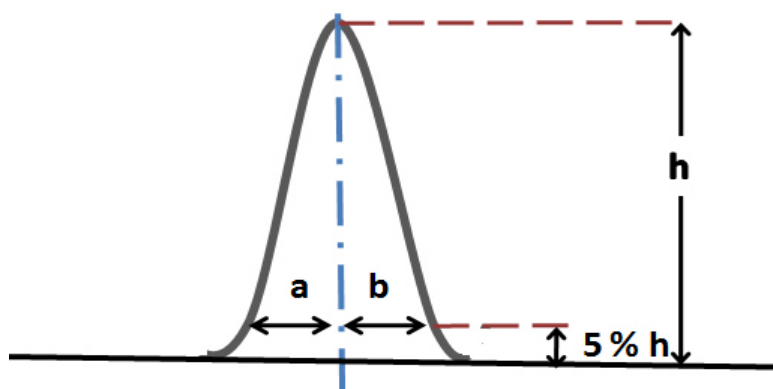


Figura 3 Imagen donde se ejemplifica como calcular la simetría de un pico cromatográfico.⁷²

Para este cálculo se empleó la ecuación 2:

$$T = \frac{(a + b)}{2a} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

a= ancho de la parte frontal del pico cromatográfico al 5 % de la altura

b= ancho de la parte posterior del pico cromatográfico al 5 % de la altura

El criterio de selección fue un T de 1 o el valor más cercano.

2.3.1.2.2 Límite de detección obtenido con cada columna cromatográfica.

Utilizando el programa de temperatura final para cada columna cromatográfica, se determinó cual era la concentración mínima detectada. Esta prueba se realizó mediante la inyección por duplicado de soluciones estándares de concentración decreciente.

2.3.2 Confirmación de la identidad de los analitos.

Para la asignación de la identidad de los picos cromatográficos en el análisis de mezclas de NNAL y del iso-NNAL d3, se analizaron soluciones de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada compuesto por separado. Los picos cromatográficos se identificaron por comparación de los tiempos de retención de los estándares y el análisis de los espectros de masas de cada pico cromatográfico. Se confirmó la

identificación mediante la comparación de los espectros de masas reportados en la literatura.

2.3.3 Establecimiento de los parámetros de adquisición de datos.

Con la finalidad de mejorar la sensibilidad y selectividad del método, una vez establecido el mejor programa de temperatura y seleccionada la columna cromatográfica para la separación, se cambió la modalidad de adquisición de datos de barrido completo (full scan) a monitoreo selectivo de iones (SIM). Para ello se establecieron, en base a los tiempos de retención, ventanas de adquisición de datos donde se monitorearon solamente los iones principales de cada compuesto.

2.3.4 Validación del sistema cromatográfico.

Para asegurar el comportamiento adecuado del sistema cromatográfico desarrollado para el análisis de NNAL, se evaluaron la linealidad, precisión, exactitud, límite de cuantificación y el límite de detección, empleado como base lo recomendado por la FDA.⁷³

2.3.4.1 Linealidad.

Se construyó una curva de calibración a 9 niveles de concentración, por triplicado, en un intervalo de concentración de 0.05 a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de regresión.

La aceptación de la linealidad se basó en la observación visual de la curva construida así como en un valor superior a 0.99 del coeficiente de determinación (r^2).

2.3.4.2 Precisión.

La precisión intradía del sistema cromatográfico se evaluó mediante el cálculo de la desviación estándar relativa (% DER) de la relación de las áreas de las señales del analito respecto al estándar interno de las soluciones estándares de nivel bajo, medio y alto analizados por triplicado, utilizando la ecuación 3. El criterio de aceptación fue una % DER menor al 10 %.

$$\% DER = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

s = Desviación estándar

\bar{x} = Media aritmética

2.3.4.3 Exactitud.

Se realizó un análisis de correlación por mínimos cuadrados para los valores de concentración predichos mediante el uso de la ecuación obtenida de la curva de calibración y la concentración real de las soluciones. La aceptación de la exactitud se basó en el valor superior a 0.99 del coeficiente de determinación (r^2). También se evaluó mediante el análisis del error relativo de la determinación de la concentración aplicando la ecuación obtenida. El error relativo se calculó aplicando la ecuación 4.

$$\% \text{ Error relativo} = \frac{\text{valor observado} - \text{valor esperado}}{\text{valor esperado}} \times 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

valor observado= Concentración obtenida mediante la ecuación de regresión.

valor esperado= Concentración nominal del estándar.

2.3.4.4 Límite de detección

Se realizó experimentalmente, mediante la inyección por duplicado de soluciones estándares de concentración decreciente. Se tomó como límite de detección la concentración más baja que nos diera señal analítica.

2.3.4.5 Límite de cuantificación

Se realizó experimentalmente, mediante la inyección por quintuplicado soluciones estándares de $1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de concentración. EL criterio de aceptación fue que la señal tuviera un % DER menor al 10 %.

2.4 Métodos de preparación de muestras.

2.4.1 Extracción con polímeros molecularmente impresos.

La SPE se realizó con cartuchos con polímeros molecularmente impresos de 25 mg y 10 mL de capacidad, utilizando una estación de vacío de 24 posiciones. Los cartuchos se acondicionaron utilizando 1 mL de diclorometano (DCM), 1 mL de metanol y 1 mL de agua bidestilada. Se utilizaron las condiciones recomendadas por el fabricante, las cuales se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6 Condiciones de la SPE-MIP.

Fase	Variable	Condición
Carga de muestra	Volumen de muestra	5 mL
	Velocidad de flujo	0.5 mL min ⁻¹
Lavado	Agua	2 porciones de 1 mL
	Vacío alto	10 min
	Tolueno	1 mL
	Tolueno:DCM (9:1 v/v)	1 mL
	Tolueno: DCM (4:1 v/v)	1 mL
	Vacío	2 min
Elución	DCM:Metanol (9:1 v/v)	2 porciones de 1 mL, aplicar vacío entre cada porción.
	Velocidad de flujo	0.2 mL min ⁻¹

2.4.1.1 Perfil de elución.

Para determinar el volumen de eluyente a ser colectado para recuperar la máxima cantidad de analito, se estableció el perfil de elución. Para ello con los cartuchos acondicionados, se extrajeron 5 mL de una solución de $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NNAL y del iso-NNAL-d3 a pH 6.4 y realizando la elución con 10 mL de una mezcla Diclorometano-Metanol (9:1). Se colectaron fracciones de 1 mL, se evaporaron con nitrógeno y se reconstituyó con 150 μL de metanol. Se analizaron con las condiciones presentadas en la tabla 17.

2.4.2 Microextracción en fase sólida (SPME)

Con el fin de establecer las mejores condiciones de extracción y desorción del NNAL, de la matriz de interés a la fibra y de la fibra al sistema analítico respectivamente, se estudiaron las variables que de acuerdo a la bibliografía pueden tener influencia sobre el comportamiento del sistema.

Durante el desarrollo de estas etapas se utilizó el GC-MS y el programa de temperatura mostrado en la Tabla 7.

Tabla 7 Condiciones de análisis por GC-MS.

Columna cromatográfica	DB-17 MS
Gas acarreador	Helio
Flujo	1 mL min ⁻¹
<u>Programa de temperaturas:</u>	
Inicial.	80 °C mantener 1 min
Rampa 1.	15 °C/min hasta 190 °C y mantener 25 minutos
Rampa 2.	10 °C/min hasta 240 °C y mantener 10 minutos
Rampa 3.	20 °C/min hasta 290 °C y mantener 7 minutos

La optimización se realizó en tres etapas: la selección de fibra para SPME, la optimización de la desorción y por último, la optimización de la extracción.

Antes de comenzar con los experimentos de optimización de la SPME, se acondicionaron las fibras según las recomendaciones del proveedor, las cuales fueron:

- a) 250 °C por 30 minutos para la fibra de DVB-PDMS de 65 µm.
- b) 270 °C por 60 minutos para la fibra de DVB-CAR-PDMS 50-30 µm.
- c) 280 °C por 60 minutos para la fibra de PA de 85 µm.

d) 300 °C por 60 minutos para la fibra de Carboxen-DVB de 85 µm.

Las extracciones se realizaron utilizando las condiciones de extracción que se muestran en la Tabla 8, en modalidad *headspace* y con agitación magnética a 500 revoluciones por minuto (rpm). El dispositivo de extracción se montó de acuerdo al diagrama que se muestra en la Figura 4, el cual consistió en un baño de agua colocado sobre una placa de calentamiento y agitación con temperatura regulada. Se introdujo una barra magnética al vial para mantener la muestra en agitación constante, posteriormente, éste se sumergió completamente en posición vertical en el baño de temperatura y transcurrido el tiempo de equilibrio, se perforó la septa con el portafibras de SPME, se fijó en la posición adecuada, para finalmente exponer la fibra y proceder a la extracción por el tiempo establecido. Al término del tiempo de extracción, la fibra se extrajo y se introdujo en el inyector para el análisis por GC.

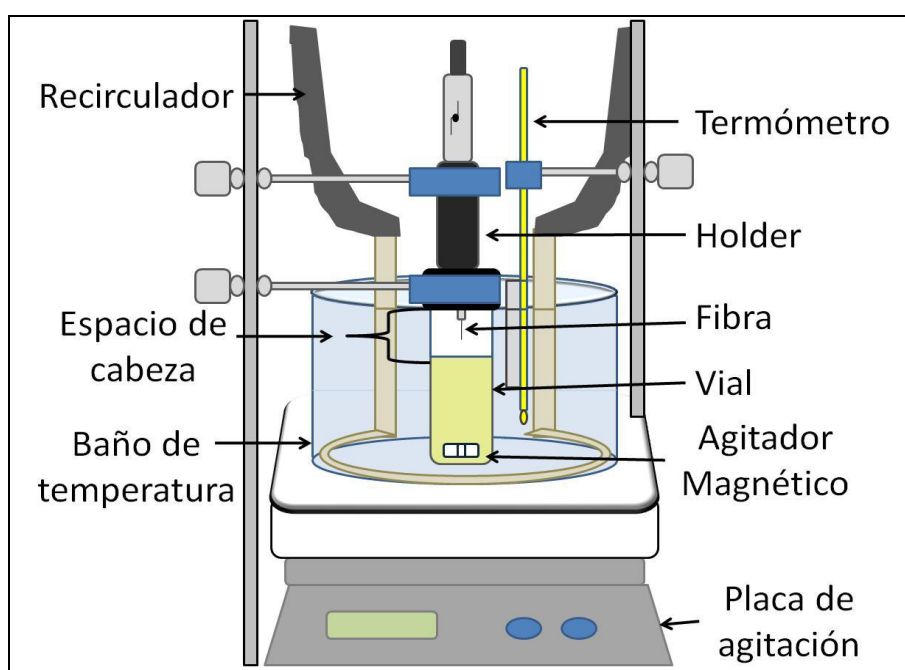


Figura 4 Montaje del Dispositivo de Extracción por HS-SPME.

Tabla 8 Condiciones de trabajo empleadas para la selección de fibra de SPME.

EXTRACCIÓN	TIEMPO DE EQUILIBRIO	10 MINUTOS
	Tiempo de extracción	60 minutos
	Temperatura de extracción	70 °C
	Adición de NaCl	0%
	Adición de ACN	0%
	Volumen de <i>headspace</i>	5 mL
Desorción	Temperatura del inyector	230 °C
	Apertura de la válvula de split	A los 5 minutos

2.4.2.1 Selección de la fibra para SPME.

Para la selección de la fibra más adecuada, se estudió el comportamiento de las fibras de, PA de 85 μm , DVB-PDMS de 65 μm , DVB-CAR-PDMS 50-30 μm y carboxen-PDMS de 85 μm . Se realizaron extracciones por triplicado, a partir de una solución de estándares a una concentración de 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para el NNAL y de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para el iso NNAL-d3. Las condiciones de extracción utilizadas fueron las indicadas en la Tabla 8.

Transcurrido el tiempo de extracción, se analizó por GC-MS según el programa de temperatura que se presenta en la tabla 17. La fibra de SPME se limpió en el GC-FID mediante su exposición en el inyector a 250 °C por 20 minutos, con lo cual la fibra quedó preparada para la siguiente extracción.

La selección de la fibra más adecuada se realizó comparando las áreas obtenidas y el % DER observada para el NNAL. Se seleccionó la fibra que mostró los valores menores de % DER y que no presentó analitos remanentes después de la limpieza.

2.4.2.2 Optimización de las condiciones de extracción.

Para el establecimiento de las condiciones óptimas para la extracción de los analitos de la fibra seleccionada, se realizó un diseño de experimentos de Plackett- Burman a dos niveles y completamente aleatorizado. Se empleó el software Modde v11.0 de Umetrics. En la tabla 9 se muestran los experimentos planteados.

Tabla 9 Experimentos propuestos para la optimización del proceso de extracción de acuerdo al diseño de Plackett - Burman.

Exp No	Tiempo de extracción (min)	Tiempo de equilibrio (min)	Temperatura de Extracción (°C)	Adición de NaCl (% p/v)	Adición solvente orgánico (5 %)	Volumen de muestra (mL)	Agitación (rpm)
1	60	10	50	5	ACN	5	700
2	60	30	50	0	MeOH	10	700
3	60	30	80	0	ACN	5	400
4	30	30	80	5	ACN	10	700
5	60	10	80	5	MeOH	10	400
6	30	30	50	5	MeOH	5	400
7	30	10	80	0	MeOH	5	700
8	30	10	50	0	ACN	10	400
9	45	20	65	2.5	ACN	8	550
10	45	20	65	2.5	ACN	8	550
11	45	20	65	2.5	ACN	8	550

Con los resultados obtenidos, se seleccionaron las variables que tienen una mayor influencia en la eficiencia de la extracción del NNAL. Las condiciones óptimas para dichas variables se establecieron utilizando la proyección de optimización del mismo programa.

2.4.2.3 Optimización de las condiciones de desorción.

La optimización de la etapa de desorción para la fibra de DVB-PDMS de 65 μm , se realizó mediante un diseño simplex secuencial básico de dos variables, donde inicialmente se plantearon 3 experimentos, los cuales se

presentan en la Tabla 10. En base a los resultados de la suma de áreas tanto del NNAL como del iso-NNAL-d3, se calcularon los siguientes experimentos en base a la ecuación 5.

$$V_n = 2\bar{V}_m - V_p \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

V_n es el nuevo valor de la variable

\bar{V}_m es el promedio de los valores de la variable en los experimentos que produjeron las mejores respuestas.

V_p es el valor de la variable en el experimento que produjo la peor respuesta.

Se plantearon como condiciones máximas una temperatura de 260 °C y un tiempo de 5 min.

Tabla 10 Experimentos iniciales para la optimización del proceso de desorción.

Experimento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	230	3
2	250	3
3	240	5

2.4.3 Extracción con cartuchos tC18

La SPE se realizó con cartuchos que contienen silica modificada con cadenas de hidrofóbicas de 18 carbonos, de 1 g de fase extractante y un volumen de 6 mL, utilizando una estación de vacío de 24 posiciones. Los cartuchos se acondicionaron utilizando 10 mL de metanol y 10 mL de agua bidestilada.

2.4.3.1 Optimización de la extracción.

Se planteó un diseño de experimentos de Plackett-Burman a dos niveles, completamente aleatorizado. Se empleó el software Modde v8.0 de Umetrics. En la tabla 11 se muestran los experimentos planteados. Previo a la elución de los analitos, se realizó un paso de secado del cartucho para eliminar el agua

remanente del cartucho, esto se realizó aplicando alto vacío por 2 min. La elución de los cartuchos se realizó con 5 mL de metanol al 100%. El eluato se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se reconstituyó en 150 μ L de Metanol para su análisis por GC-MS.

Tabla 11 Experimentos propuestos para la optimización del proceso de extracción SPC-tC18 de acuerdo al diseño de Plackett -Burman.

Exp. No	Velocidad de carga (mL/min)	% Metanol en la solución de lavado	Volumen de solvente de lavado (mL)	Velocidad de elución (mL/min)
1	0.5	5	2	0.2
2	5	5	2	2
3	0.5	20	2	2
4	5	20	2	0.2
5	0.5	5	6	2
6	5	5	6	0.2
7	0.5	20	6	0.2
8	5	20	6	2
9	2.75	12.5	4	1.1
10	2.75	12.5	4	1.1
11	2.75	12.5	4	1.1

Con los resultados obtenidos, se seleccionaron las variables que tienen una mayor influencia en la eficiencia de la extracción del NNAL. Las condiciones óptimas para dichas variables se establecieron utilizando la proyección de optimización del mismo programa.

2.4.3.2 Perfil de Elución.

Para determinar el volumen de eluyente a ser colectado para recuperar la máxima cantidad de analito, se estableció el perfil de elución. Para ello con los cartuchos acondicionados, se extrajeron 10 mL de una solución de $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NNAL y del iso-NNAL-d3 a pH 6.4. La extracción se realizó con las condiciones óptimas, el paso de elución del cartucho se realizó con 10 mL de metanol. Se colectaron fracciones de 1 mL, se evaporaron con nitrógeno y se reconstituyó con 150 μL de metanol. Se analizaron con las condiciones presentadas en la tabla 17.

2.4.5 Selección del método de preparación de muestra.

Para la selección del método para la determinación del NNAL libre y total, se evaluaron las diferentes metodologías desarrolladas en cuanto la eficiencia de extracción. También se evaluaron la desviación estándar relativa de los porcentajes de recuperación, así como el tiempo y el costo por análisis. Se seleccionó el método que diera los mejores % de recuperación con mayor precisión y menor tiempo y costo por análisis.

2.4.5.1 Eficiencia de extracción.

Para evaluar la eficiencia de extracción se determinó el porcentaje de recuperación de cada método. Se realizaron extracciones por triplicado de orina de no fumadores adicionada con 100 ng mL^{-1} y se calculó el porcentaje según la ecuación 6.

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\left(\frac{\text{área del analito}}{\text{área del estándar interno}} \right) \text{ en la muestra extraída}}{\left(\frac{\text{área del analito}}{\text{área del estándar interno}} \right) \text{ en el estándar}} \times 100$$

Ecuación 6

2.4.6 Validación del método de preparación de muestra seleccionado.

Para asegurar el comportamiento adecuado del método desarrollado para el análisis de NNAL, se evaluaron la linealidad, precisión, exactitud, límite de cuantificación y el límite de detección con base en lo recomendado por la FDA,⁷³ siguiendo un proceso semejante al descrito en la sección 2.3.4.1 a 2.3.4.5, utilizando las soluciones preparadas en la sección 2.2.9.

2.4.7 Aplicación del método

Se realizó el análisis de 2 muestras de orina de sujetos fumadores y de no fumadores adicionada a 2 ng mL^{-1} , la cual es la concentración correspondiente al límite de cuantificación del método desarrollado.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS)

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en el desarrollo del método cromatográfico.

3.1.1 Confirmación de la identidad de los analitos.

Con la finalidad de asignar las identidades de los picos cromatográficos obtenidos, se analizaron individualmente soluciones estándares de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ del NNAL e iso-NNAL d3, empleando las condiciones iniciales para cada columna cromatográfica, mencionadas en las tablas 3 a la 5. En las figuras 5 y 6 se muestran los espectros de masas obtenidos para cada compuesto en el rango de 50 a 350 m/z.

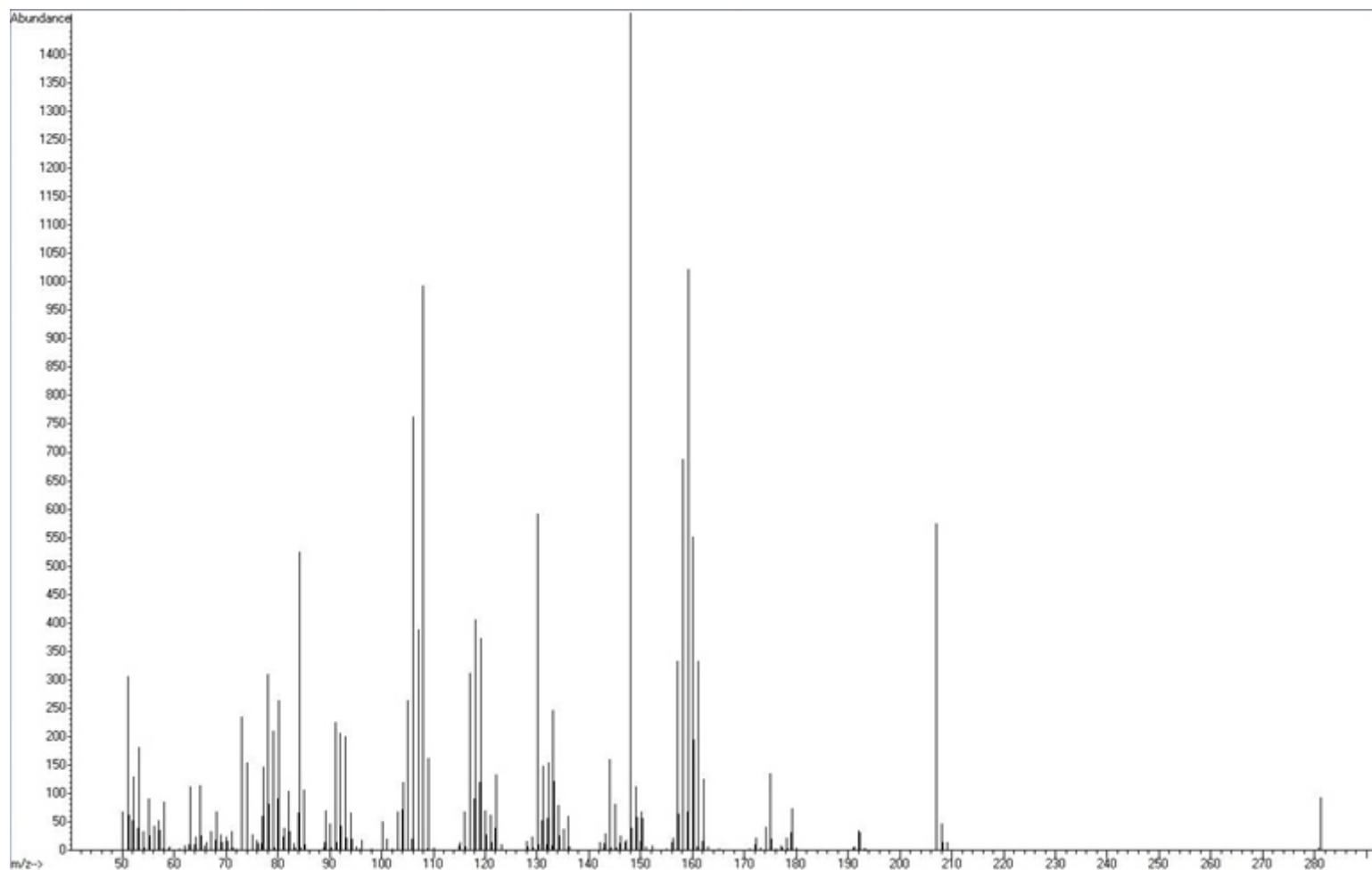


Figura 5 Espectro de masas de una solución estándar de NNAL de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ obtenido con el programa inicial de temperatura para la columna HP-5MS.

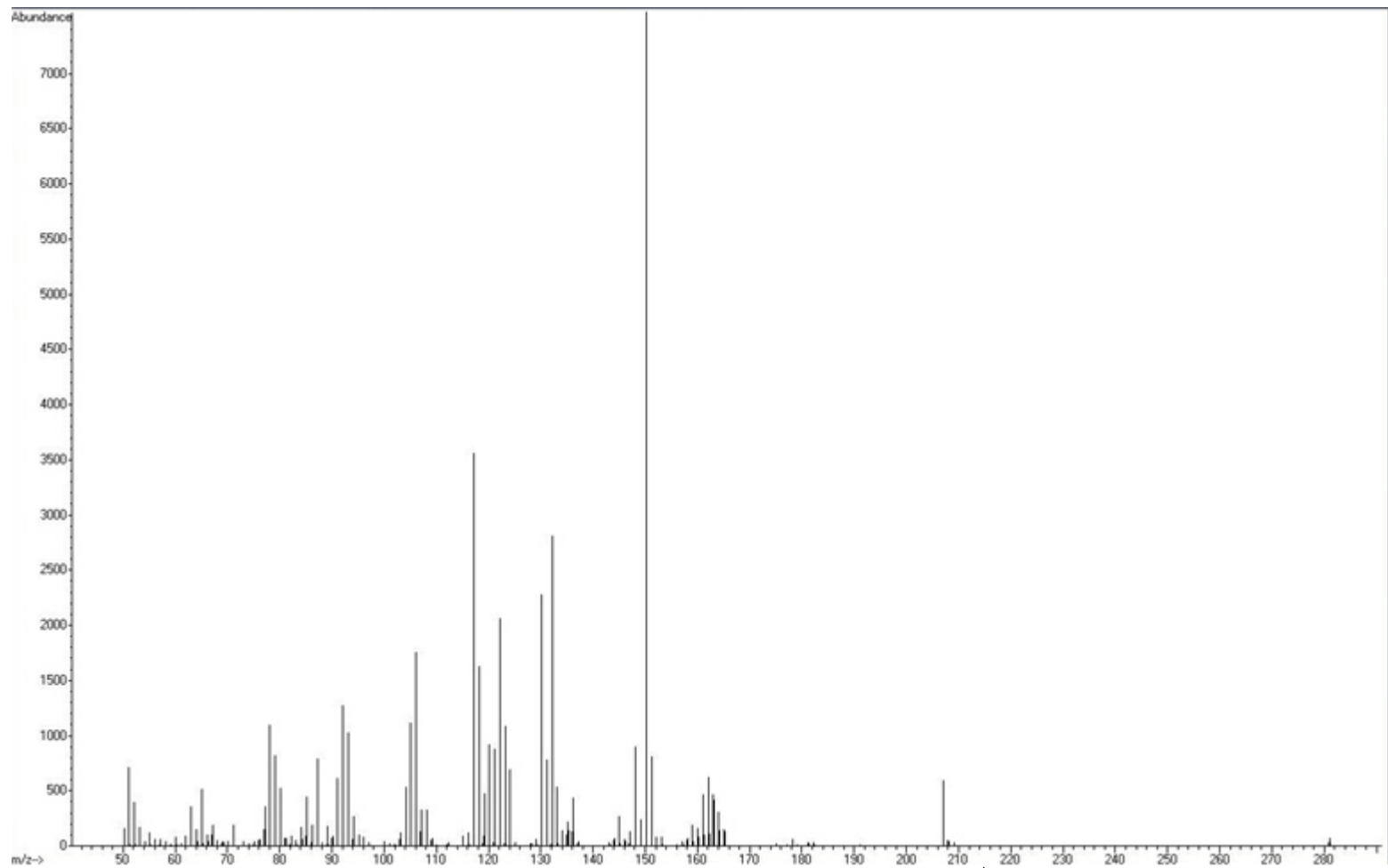


Figura 6 Espectro de masas de una solución estándar de iso-NNAL d3 de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ obtenido con el programa inicial de temperatura para la columna HP-5MS.

3.1.2 Optimización de las condiciones de separación cromatográfica y selección de columna.

Para la separación cromatográfica, se evaluaron diferentes columnas, para lo cual se partió de las condiciones iniciales propuestas en las tablas 3 a la 5. Se realizaron modificaciones a las rampas de temperatura con el fin de obtener una separación adecuada. En las figuras 7 a la 12 se muestran los cromatogramas obtenidos y el programa de temperatura utilizados. Las figuras 7 y 8 corresponden a la columna HP 5MS, las figuras 9 y 10 presentan los cromatogramas correspondientes a la columna DB 17 y finalmente, de la figura 11 y 12 a los cromatogramas obtenidos con la columna DB 1701.

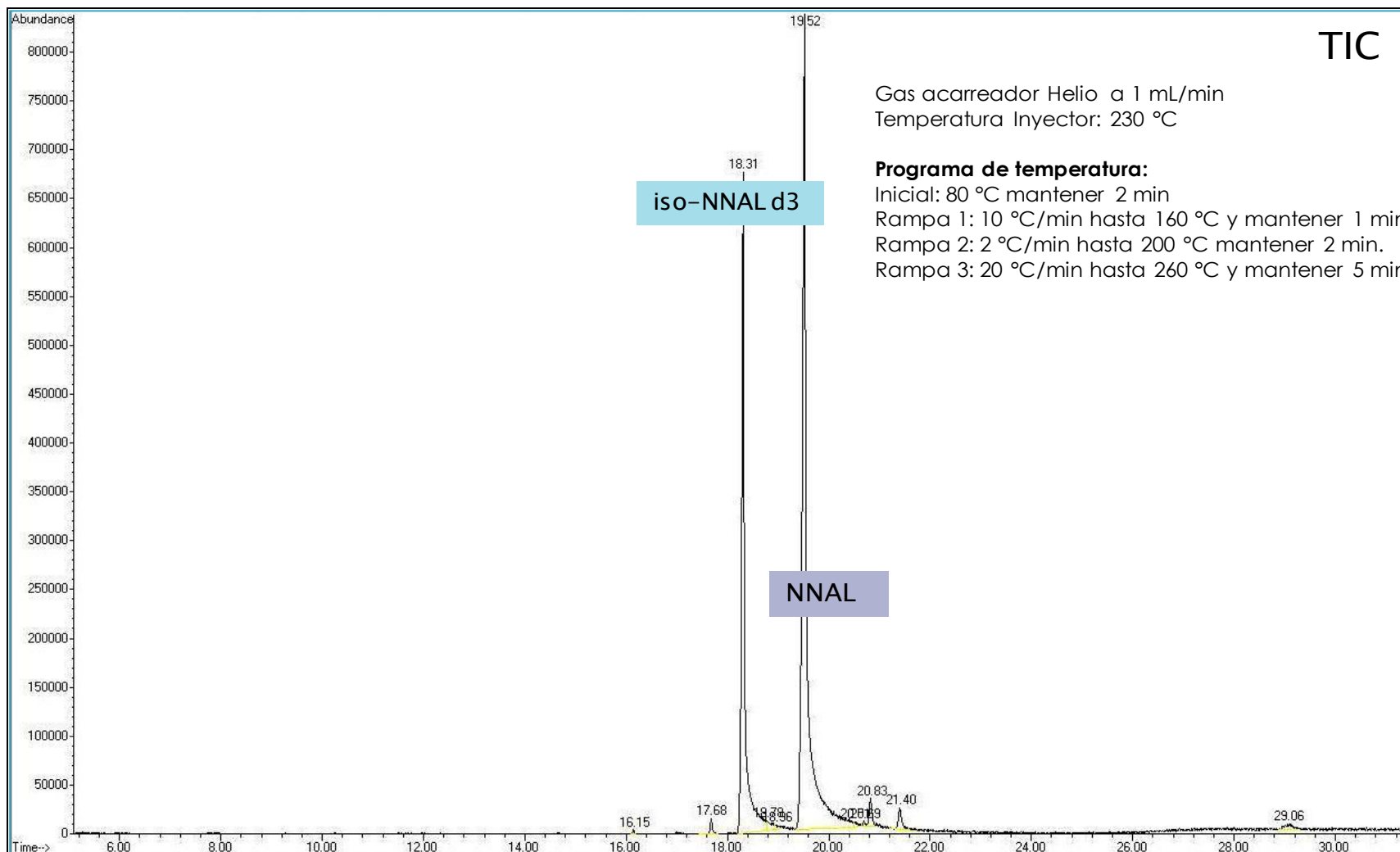


Figura 7 Desarrollo del programa de temperatura para la columna HP-5MS. Programa inicial.

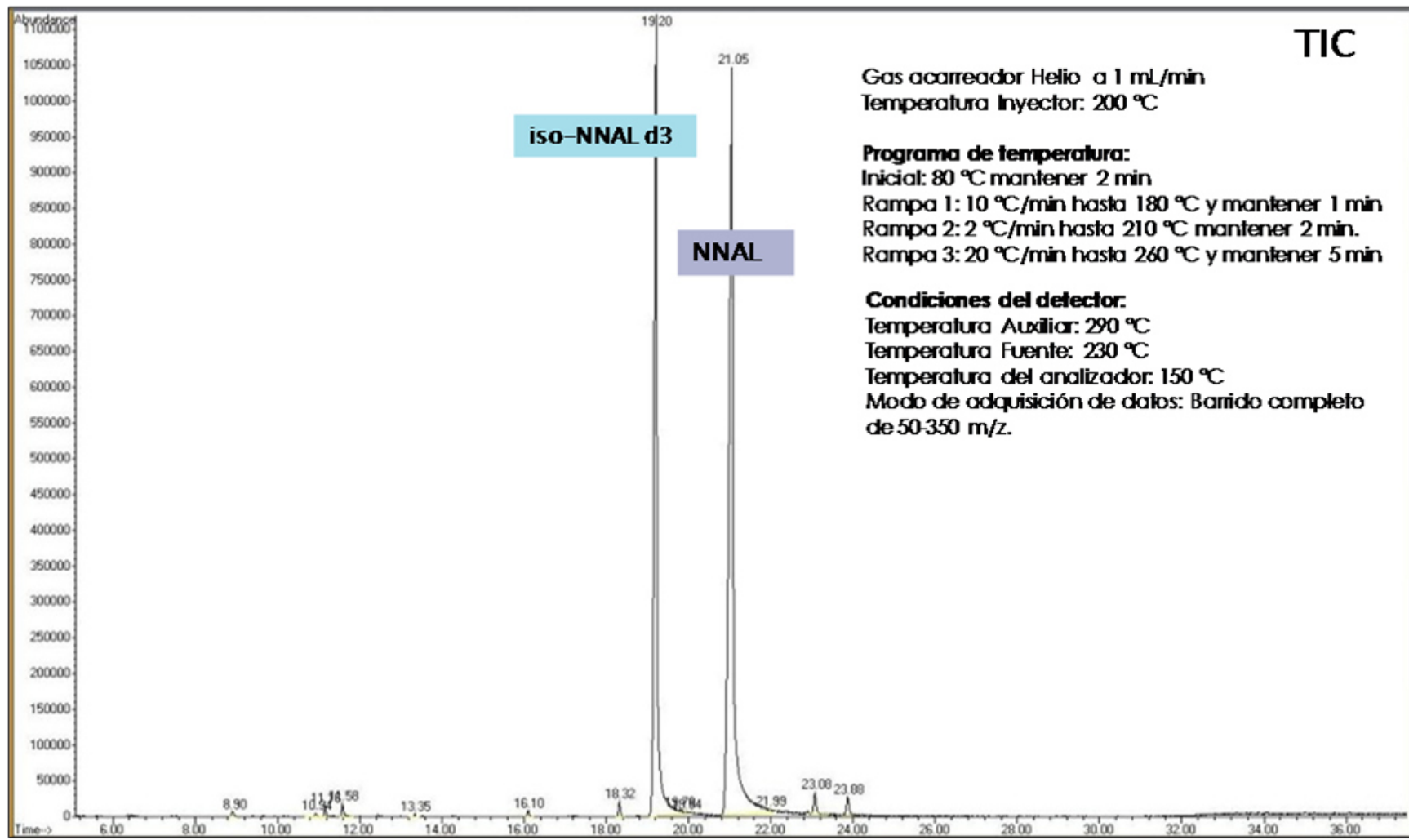


Figura 8 Desarrollo del programa de temperatura para la columna HP-5MS. Programa final.

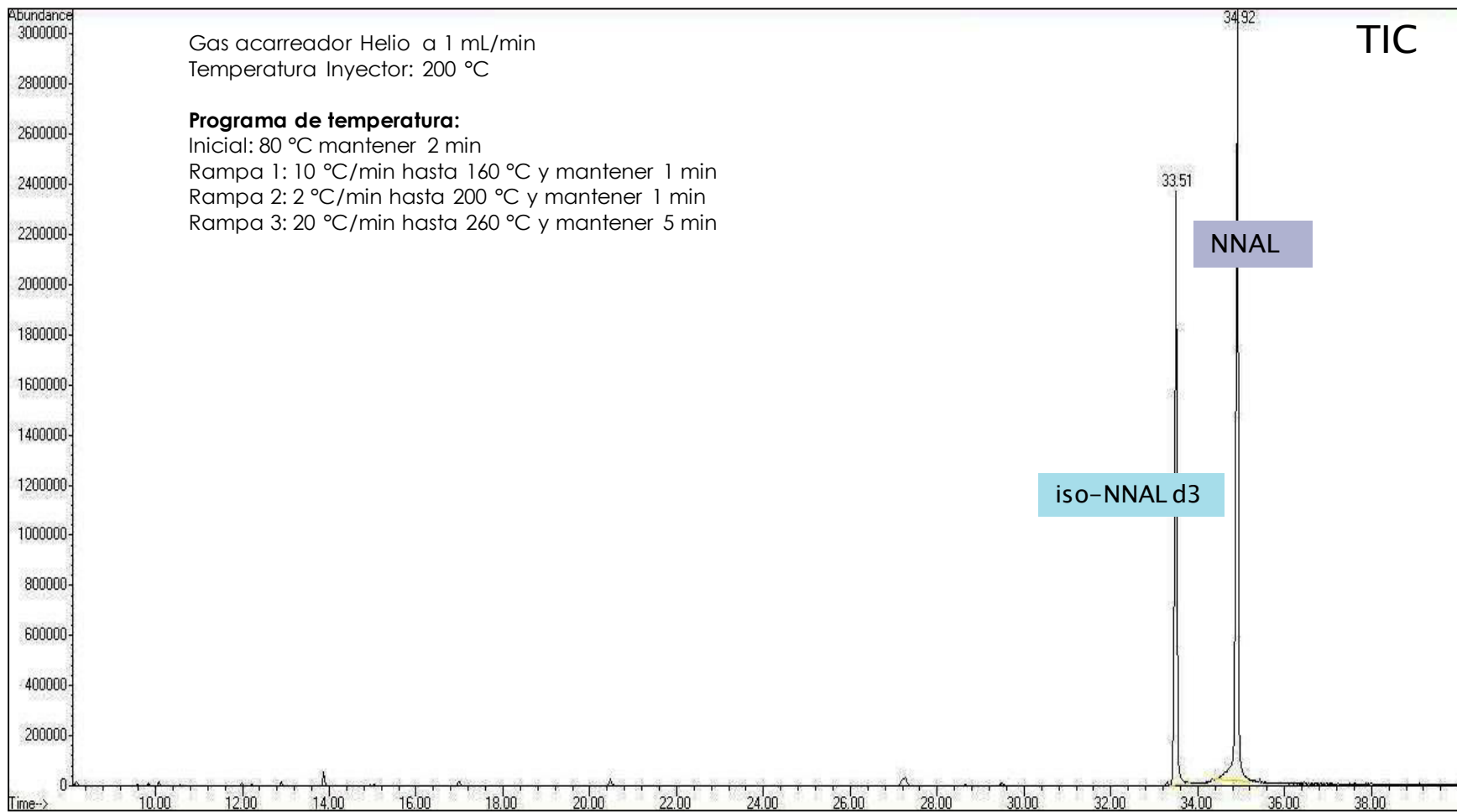


Figura 9 Desarrollo del programa de temperatura para la columna DB-17. Programa inicial.

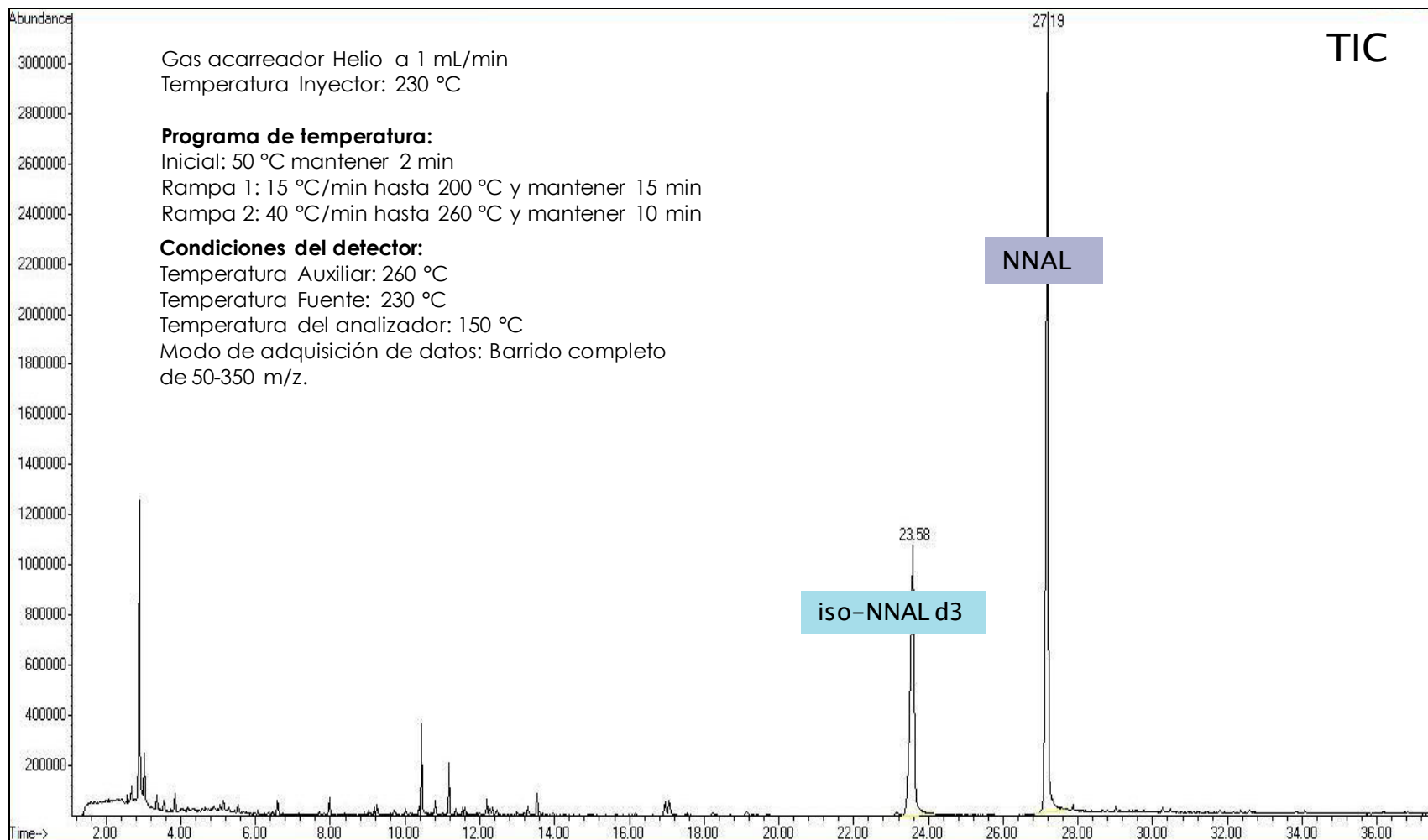


Figura 10 Desarrollo del programa de temperatura para la columna DB-17. Programa final.

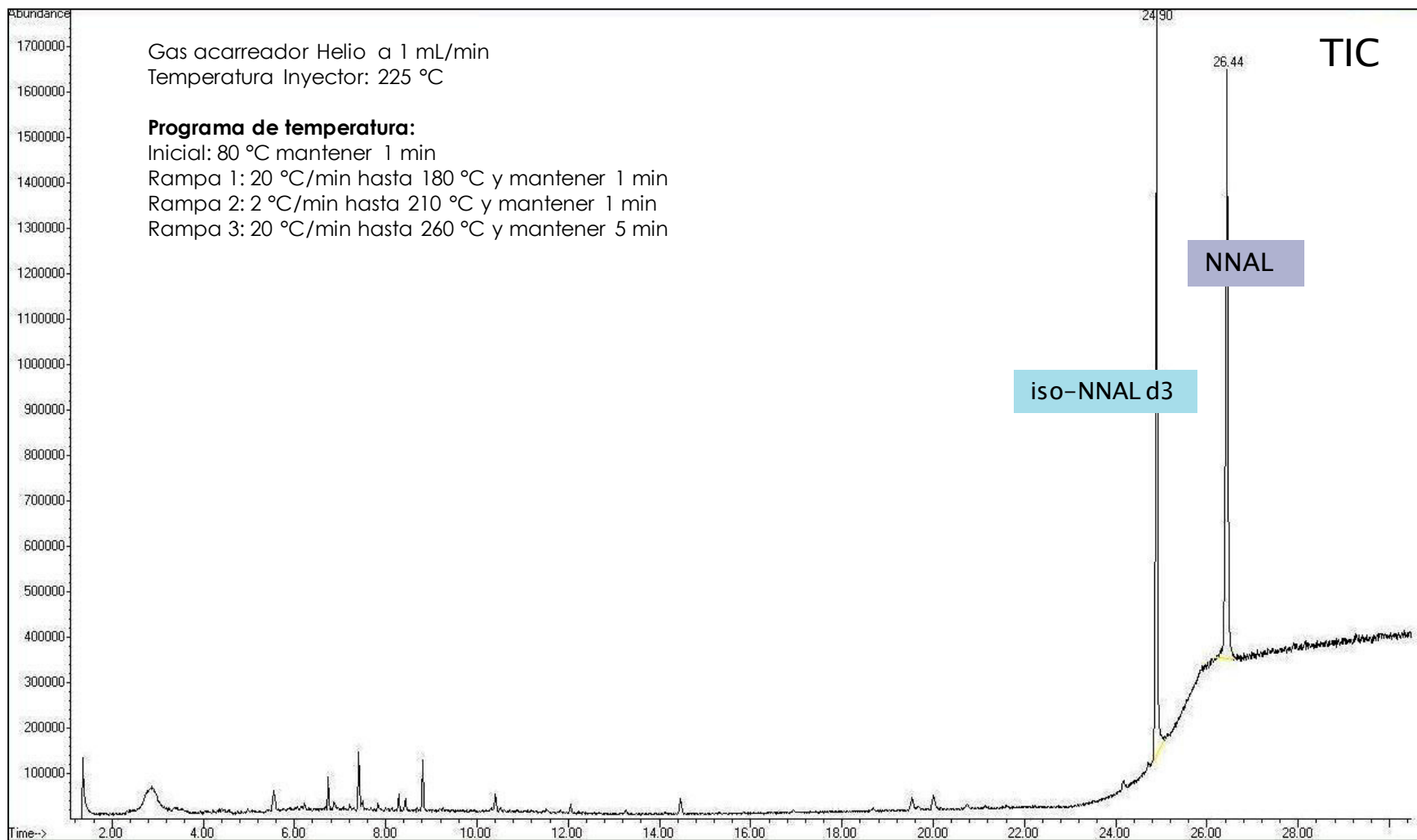


Figura 11 Desarrollo del programa de temperatura para la columna DB-1701. Programa inicial.

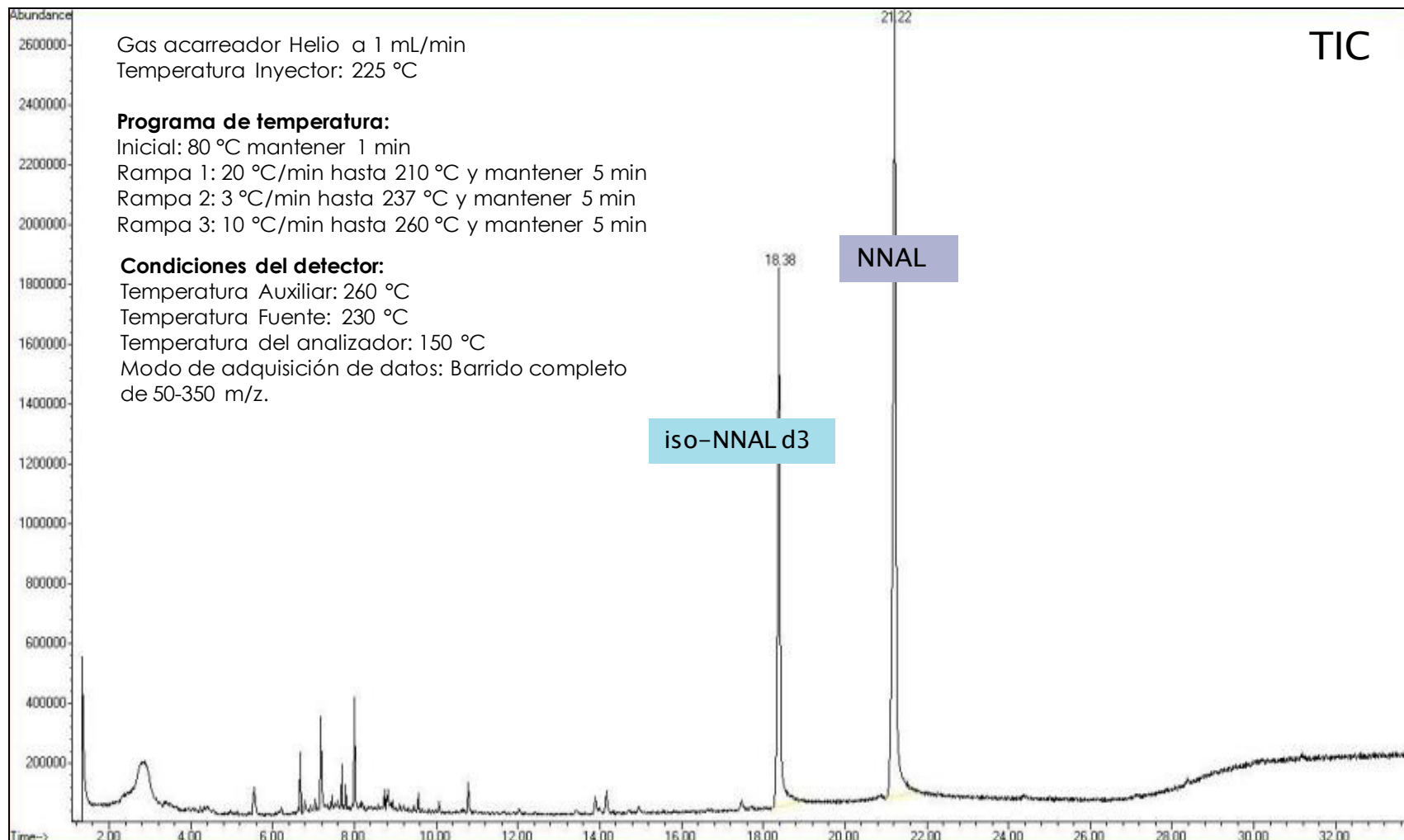


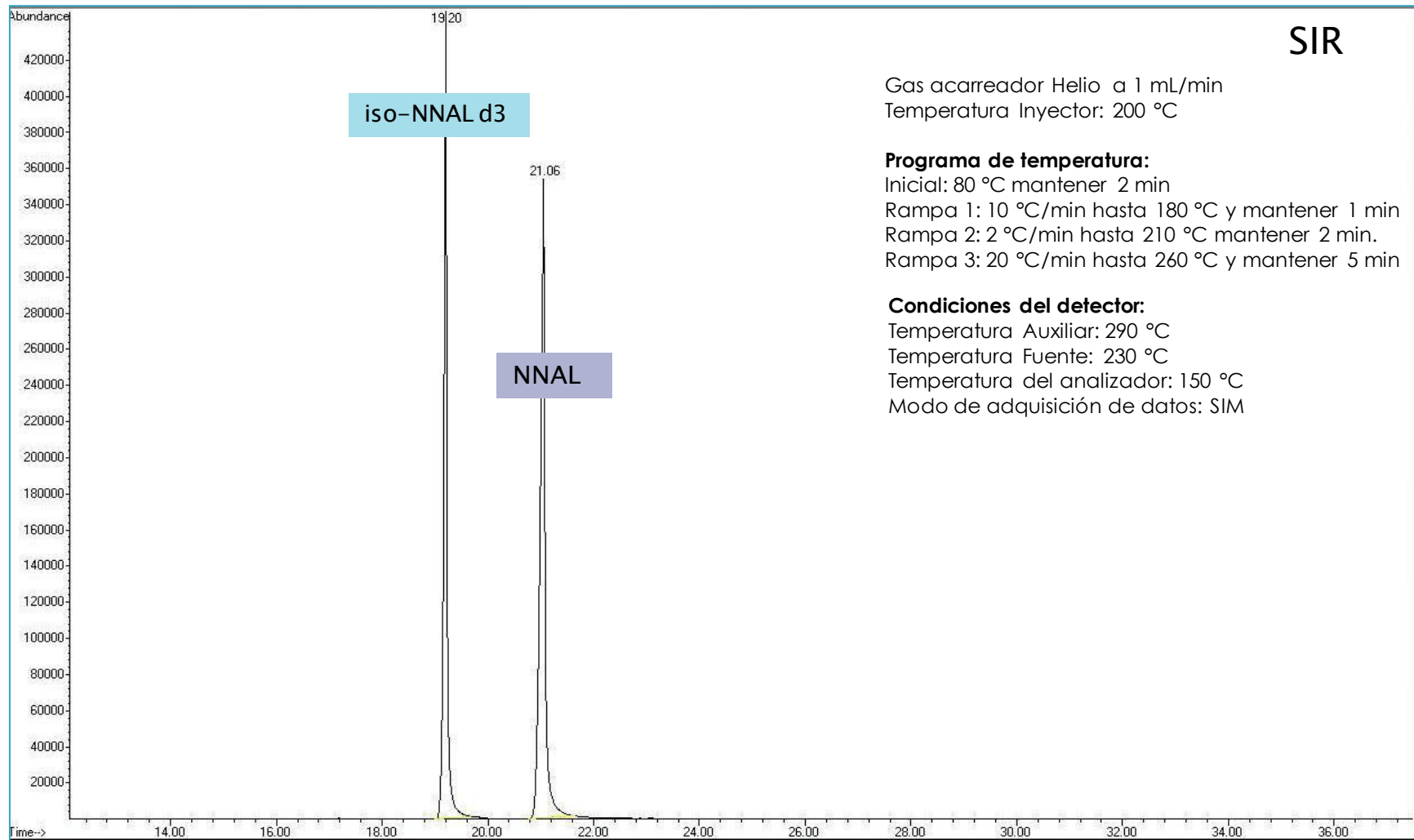
Figura 12 Desarrollo del programa de temperatura para la columna DB-1701. Programa final.

3.1.3 Establecimiento de los parámetros de adquisición de datos.

Mediante el análisis de los espectros de masas obtenidos, mostrados en las figuras 5 y 6, se determinaron los iones principales para cada compuesto, siendo los iones 148 y 108 m/z para el NNAL y los iones 150 y 117 para el iso-NNAL d3. Una vez obtenidas las mejores condiciones para la separación cromatográfica, se cambió la adquisición de datos de barrido completo a monitoreo de ión selectivo, con la finalidad de aumentar la sensibilidad del método cromatográfico desarrollado. Para ello se establecieron ventanas de adquisición de datos; los iones incluidos y el tiempo de monitoreo de cada ventana, se indica en la tabla 12. Los cromatogramas obtenidos mediante este modo de adquisición de datos, se muestran en las Figuras 13 a la 15.

Tabla 12 Ventanas de monitoreo para el modo SIM

Columna	Tiempo (min)	Iones monitoreados (m/z)	Compuesto
HP 5MS	5 - 20.5	150 y 117	iso-NNAL d3
	20.5- 37.5	148 y 108	NNAL
DB-1701	5 -20	150 y 117	iso-NNAL d3
	20 - 33	148 y 108	NNAL
DB-17 y DB-17MS	5 - 23.5	150 y 117	iso-NNAL d3
	23.5 - 37	148 y 108	NNAL



SIR

Gas acarreador Helio a 1 mL/min
Temperatura Inyector: 200 °C

Programa de temperatura:

Inicial: 80 °C mantener 2 min
Rampa 1: 10 °C/min hasta 180 °C y mantener 1 min
Rampa 2: 2 °C/min hasta 210 °C mantener 2 min.
Rampa 3: 20 °C/min hasta 260 °C y mantener 5 min

Condiciones del detector:

Temperatura Auxiliar: 290 °C
Temperatura Fuente: 230 °C
Temperatura del analizador: 150 °C
Modo de adquisición de datos: SIM

Figura 13 Cromatograma obtenido con programa final de temperatura para la columna HP-5MS, adquisición de datos SIM.

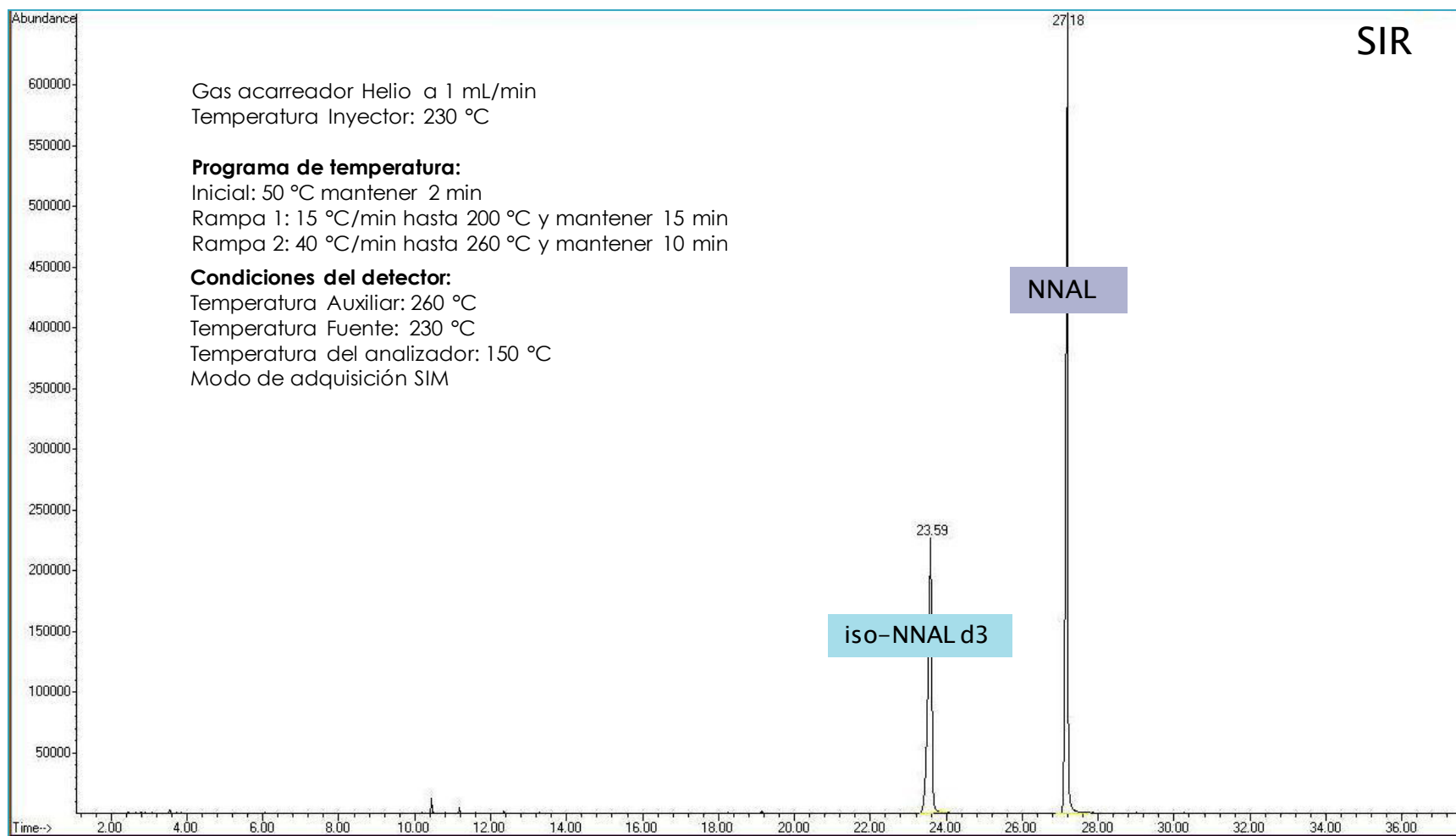


Figura 14 Cromatograma obtenido con programa final de temperatura para la columna DB-17, adquisición de datos SIM.

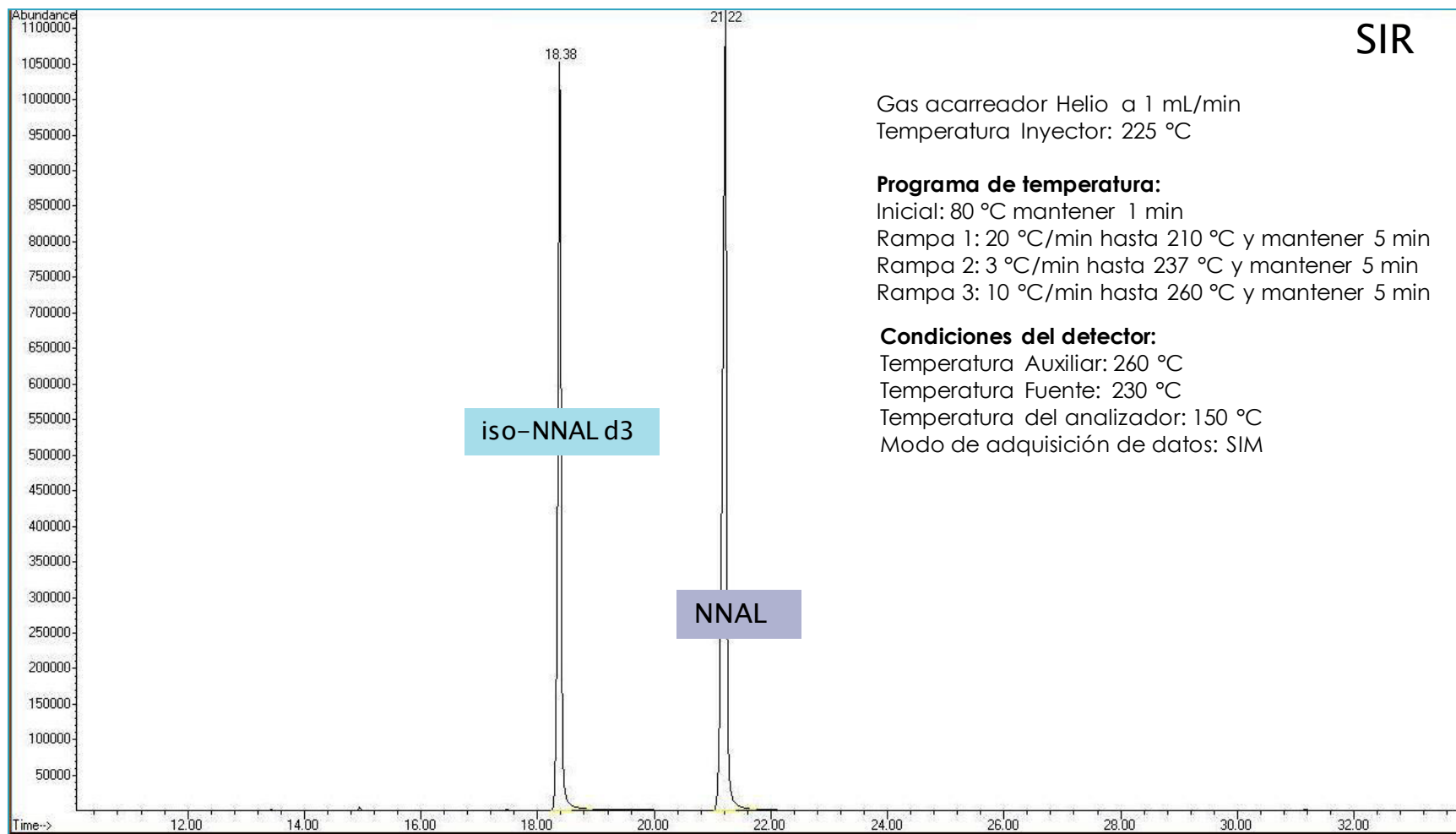


Figura 15 Cromatograma obtenido con programa final de temperatura para la columna DB-1701, adquisición de datos SIM.

3.1.4 Selección de Columna Cromatográfica.

3.1.4.1 Resolución de los picos cromatográficos.

Con los programas de temperatura finales para cada columna, se analizaron por duplicado soluciones estándares de la mezcla de NNAL e iso-NNAL-d3 con una concentración de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ para cada compuesto y se calculó la resolución de los picos cromatográficos del NNAL y del iso-NNAL-d3. Los resultados se muestran en la tabla 13.

Tabla 13 Resoluciones de los picos cromatográficos con las diferentes columnas.

Columna Cromatográfica	Resolución
HP-5MS	1.44
DB-17	6.00
DB-1701	3.33

3.1.4.2 Asimetría de los picos cromatográficos.

Con los programas de temperatura finales para cada columna, se analizaron por duplicado soluciones estándares de la mezcla de NNAL e iso-NNAL-d3 con una concentración de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ para cada compuesto y se calcularon los factores de asimetría de cada columna; los resultados se muestran en la tabla 14, donde se puede observar que la columna DB-1701 presenta los mejores factores de asimetría, es decir valores cercanos a la unidad.

Tabla 14 Factores de asimetría del iso-NNAL-d3 y el NNAL con cada columna cromatográfica.

Columna	iso-NNAL-d3				NNAL			
	a ^a	b ^a	w ^a	T _F	a ^a	b ^a	w ^a	T _F
HP 5 MS	4.25	6.5	10.75	1.27	7.75	10	17.75	1.14
DB-17	7.25	4	11.25	0.78	3.75	2.25	6	0.80
DB-1701	4.25	4.5	8.75	1.03	5.75	5.5	11.25	0.98

^aLas medidas están expresadas en mm.

Debido a que se cambió el modo de adquisición de datos, de barrido completo o full scan a monitoreo de iones únicos o SIM, se calcularon los factores de asimetría cuando se adquirieron los datos en modo SIM, los cuales se muestran en la tabla 15.

Tabla 15 Factor de asimetría para cada columna cromatográfica en cromatogramas obtenidos por SIM.

Columna	iso-NNAL-d3				NNAL			
	a ^a	b ^a	w ^a	T _F	a ^a	b ^a	w ^a	T _F
HP 5 MS	5.75	5.75	11.5	1.01	10	9	19	0.95
DB-17	7.25	3.25	10.5	0.72	3.5	1.5	5	0.71
DB-1701	4.5	4.25	8.75	0.97	7.25	4	11.25	0.78

Las columnas DB-17 y la DB-1701 presentaron un T_F menor a 1, lo cual indica que hay distorsión frontal de los picos cromatográficos, mientras que la columna HP-5MS da un T_F cercano a 1.

3.1.4.3 Límites de detección.

Los resultados obtenidos al realizar estas pruebas se muestran en la tabla 16, donde se puede observar que la mínima concentración detectada bajo el sistema de adquisición de datos SIM fue de 0.5 µg mL⁻¹ para las columnas HP-5MS y DB-17 mientras que para las columnas DB-1701 y DB-17MS fue de 0.001 µg mL⁻¹.

Tabla 16 Resultados de sensibilidad obtenidos (n=2).

Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Columna HP-5MS	Columna DB-1701	Columna DB-17	Columna DB-17MS
	Área	Área	Área	Área
1×10^{-5}	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
1×10^{-4}	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
1×10^{-3}	N.D.	2280	N.D.	1208
1×10^{-2}	N.D.	3035.5	N.D.	1221
0.1	N.D.	13805	N.D.	16318
0.5	3684	51924	2707	188052
1	11178.5	123474.5	9258.5	226243
5	135660	1056425.5	102103.5	N.R.
25	2659882	10573100	1062989	N.R.

N.D.= No detectado

N.R.= No realizado

3.1.4.4 Prueba preeliminar del desempeño de la columna con extractos de orina.

Con las columnas DB-1701 y la DB-17, se analizaron extractos de orina, obtenidos mediante extracción líquido-líquido y utilizando los programas finales para cada columna, en las figuras 16 y 17 se muestran los cromatogramas obtenidos.

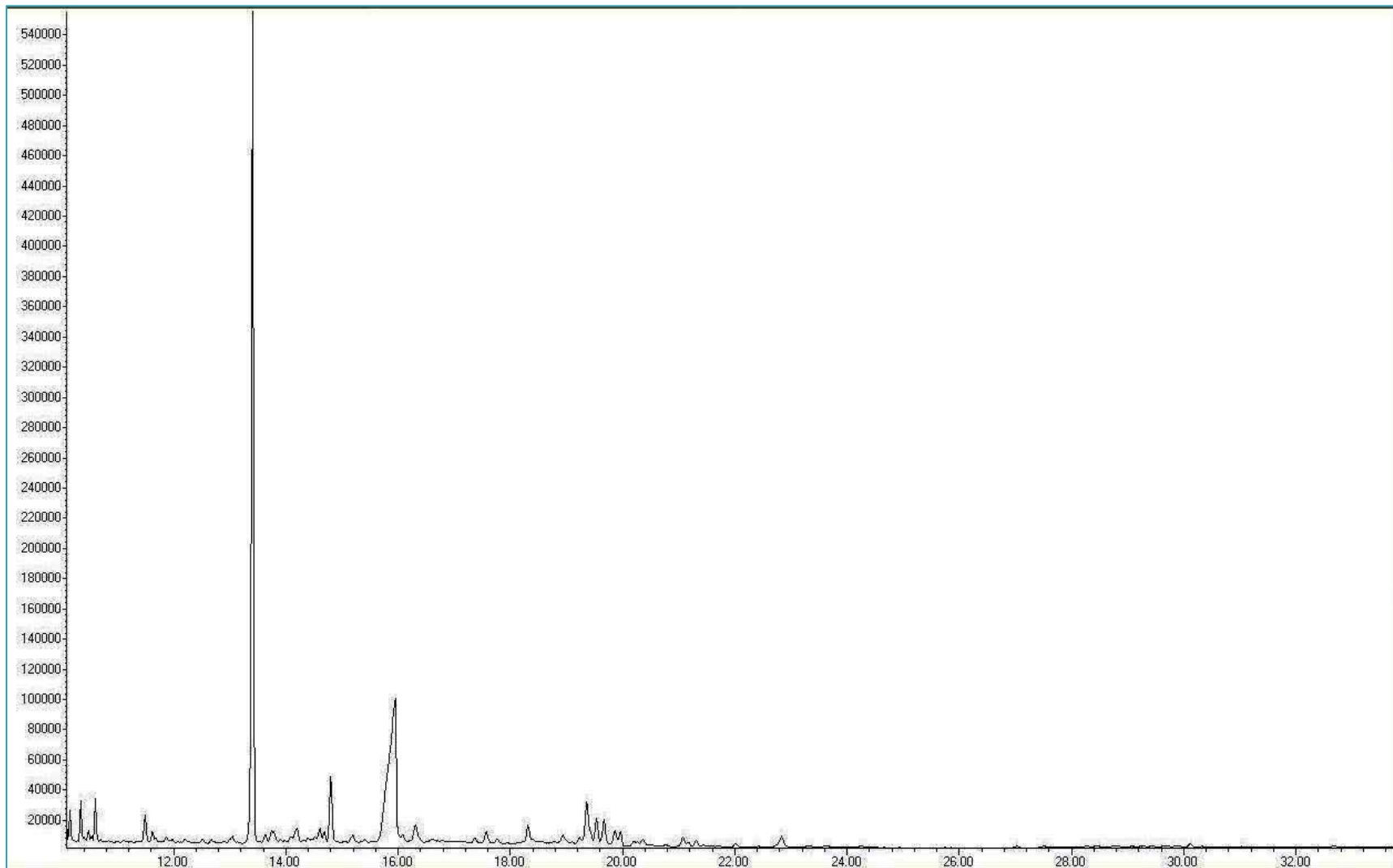


Figura 16 Cromatograma de extracto de orina adicionada a 15 ng mL^{-1} obtenido con la columna DB-1701

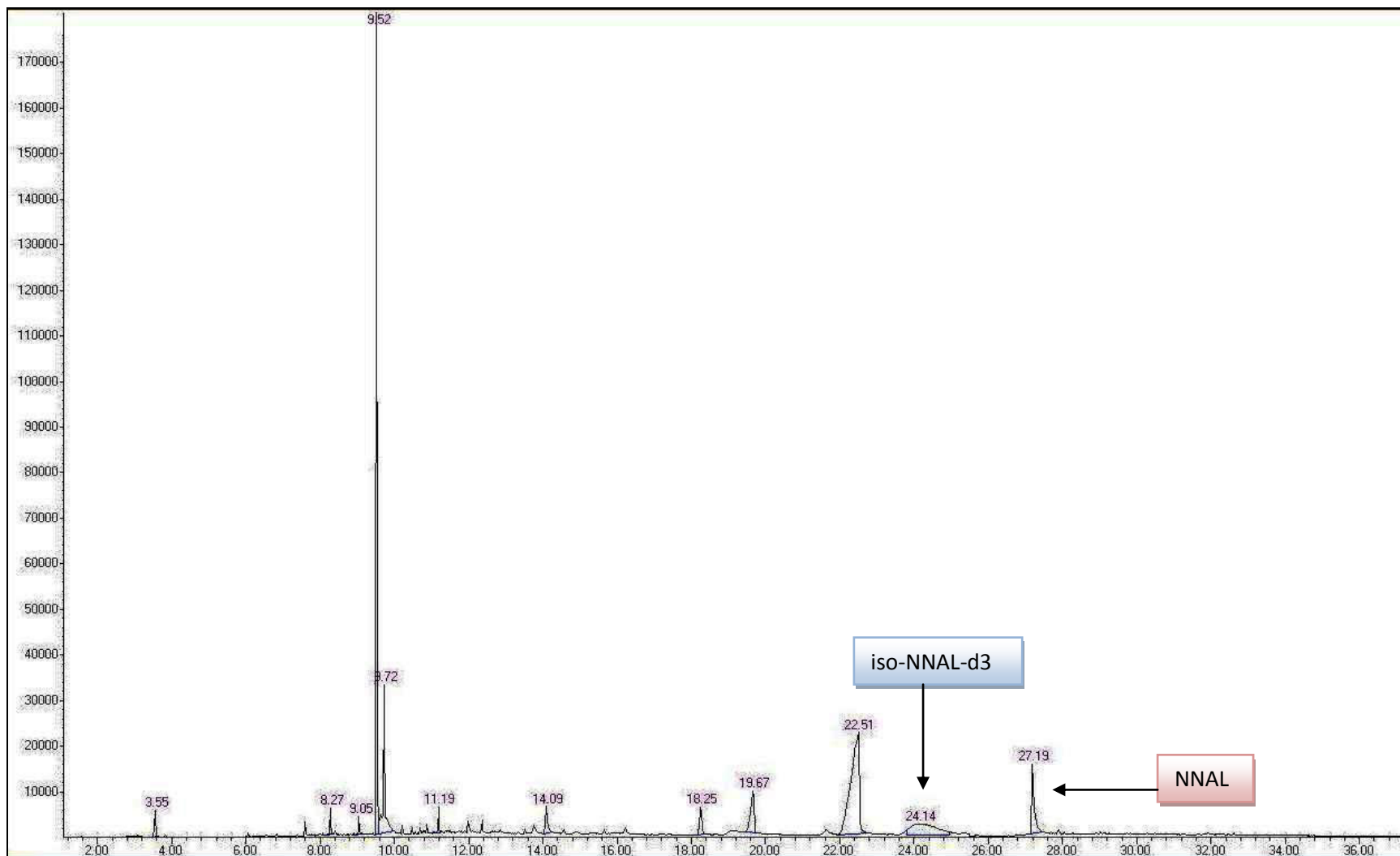


Figura 17 Cromatograma de extracto de orina adicionada a 15 ng mL^{-1} obtenido con la columna DB-17.

3.1.4.5 Modificaciones al programa de temperaturas para la columna DB-17.

Al utilizar la columna DB-17, se observó que las formas de los picos cromatográficos habían cambiado, por lo que se plantearon modificaciones para volver a ajustar las formas de los mismos; en la tabla 17 se muestra el programa de temperatura final para la columna.

Tabla 17 Condiciones cromatográficas para el análisis por GC-MS con la columna DB 17 y DB-17 MS.

Gas acarreador	Helio a 1 mL/min
Temperatura Inyector:	230 °C
Programa de temperatura:	
Inicial:	80 °C mantener 1 min
Rampa 1:	15 °C/min hasta 190 °C y mantener 12 min
Rampa 2:	10 °C/min hasta 240 °C y mantener 5 min
Rampa 3:	20 °C/min hasta 290 °C y mantener 7 min
Temperatura de la interfase	260 °C
Temperatura del analizador	150 °C
Temperatura de la fuente	230 °C
Adquisición	Monitoreo de ion selectivo (SIM)

3.1.5 Validación del sistema cromatográfico.

3.1.5.1 Linealidad.

Para validar el sistema cromatográfico se construyeron curvas de calibración con el método de estándar interno (9 niveles de concentración por triplicado), por lo que en la construcción de las mismas se graficó la relación de áreas del NNAL/iso NNAL d3. En la figura 18 se puede observar el tipo de curva obtenida, la cual al realizar la inspección visual no ajusta a una regresión lineal, además de que el coeficiente de determinación (r^2) fue inferior al 0.99, valor recomendado por la FDA.⁷³

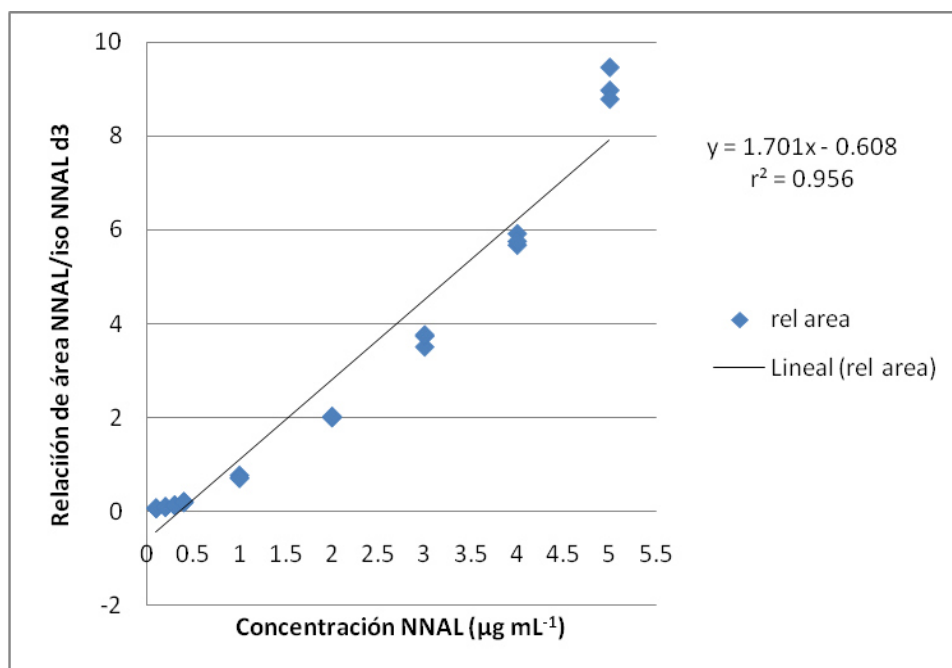


Figura 18 Curva de calibración de NNAL con regresión lineal.

Se realizó un análisis, donde se encontró que los datos presentaron buen ajuste a una ecuación de segundo grado ($r^2 = 0.997$), como se puede observar en la figura 19.

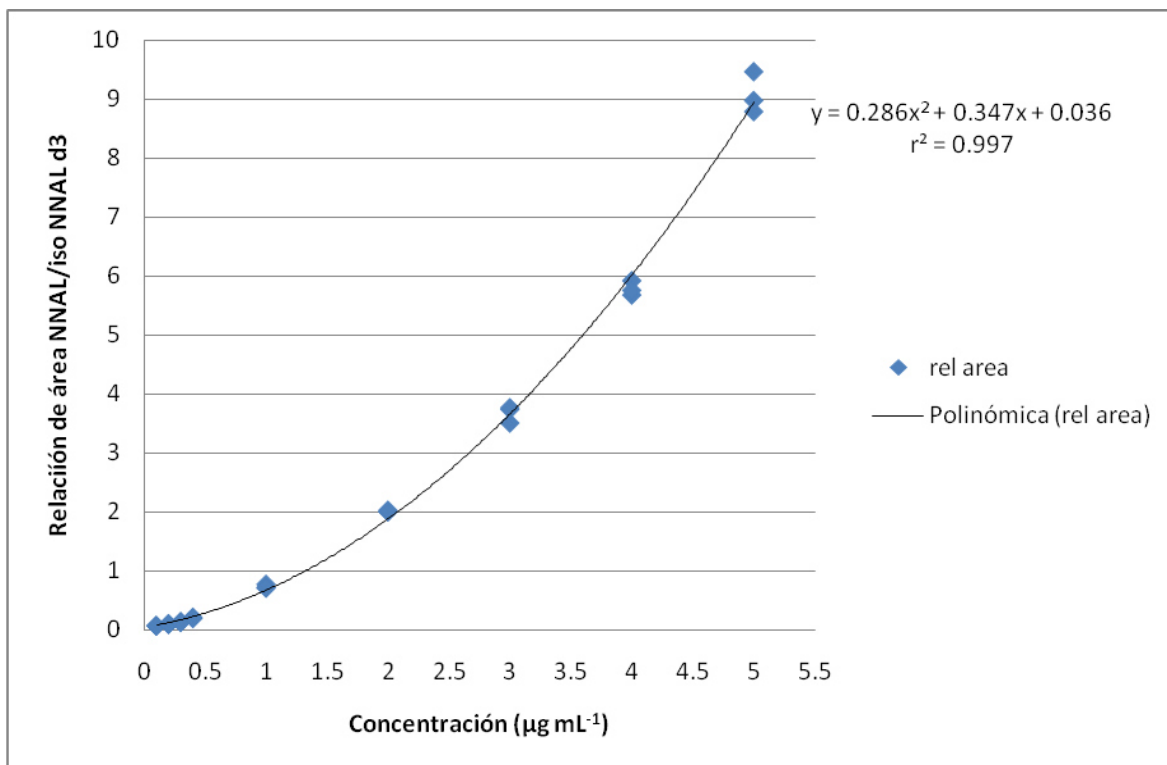


Figura 19 Curva de calibración con regresión polinomial de segundo grado.

3.1.5.2. Precisión.

Los resultados obtenidos para la evaluación de la precisión intradía, se muestran en la tabla 18, donde el % DER fue menor al 6 %.

Tabla 18 Precisión intradía (n=3).

Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Relación promedio	% DER
0.1	0.0638	5.90
1	0.7301	4.64
5	9.0660	3.85

3.1.5.3 Exactitud.

Con la finalidad de evaluar la exactitud del sistema, se realizó el cálculo de concentraciones utilizando la ecuación obtenida de la curva de calibración. Posteriormente se graficó la concentración nominal de los estándares de calibración y la concentración calculada para cada estándar aplicando la ecuación de la recta de la curva de calibración. La gráfica obtenida se muestra en la Figura 20, en la cual podemos observar un valor de r^2 de 0.998 y una pendiente con un valor de 1.006, un valor cercano a la unidad.

Además, se calculó el error relativo de cada nivel de concentración, cuyos resultados se muestran en la tabla 19.

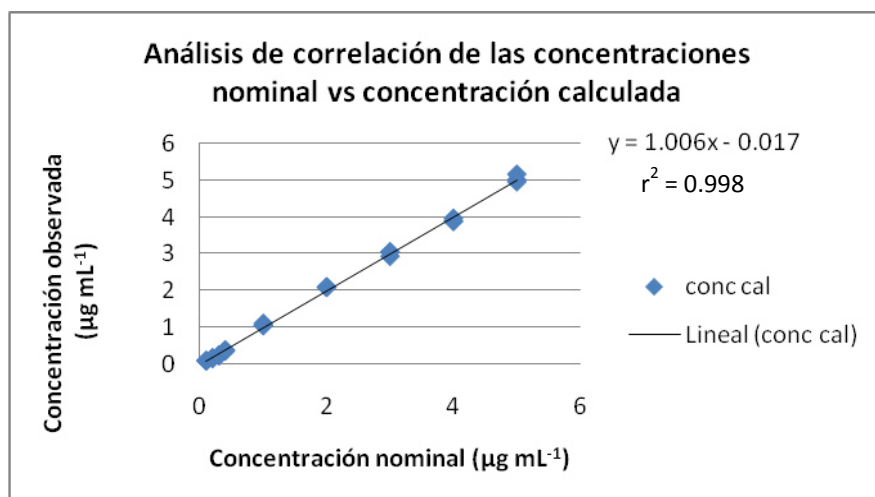


Figura 20 Gráfica para el análisis de correlación entre las concentraciones para evaluar exactitud.

Tabla 19 Valores de error absoluto y % de error relativo para la evaluación de la exactitud del método cromatográfico (n=3).

Concentración esperada (µg mL⁻¹)	Concentración promedio calculada (µg mL⁻¹)	Error absoluto promedio (µg mL⁻¹)	Error relativo (%)
0.1	0.09	0.01	14.66
0.2	0.15	0.05	22.52
0.3	0.23	0.07	23.58
0.4	0.36	0.04	8.94
1	1.06	0.06	6.48
2	2.09	0.09	4.40
3	3.01	0.05	1.82
4	3.91	0.09	2.16
5	5.04	0.07	1.47

3.1.6.4 Límite de detección y límite de cuantificación.

Para evaluar la sensibilidad del sistema cromatográfico, se determinaron experimentalmente los límites de detección y cuantificación. El límite de detección fue de $0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$, mientras el límite de cuantificación se estableció en $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ con un % DER de 18 %.

3.2 Preparación de Muestras

En esta sección se muestran los resultados obtenidos al desarrollar los distintos métodos para la preparación de muestra.

3.2.1 Extracción con Polímeros Molecularmente Impresos.

Se utilizaron cartuchos de extracción en fase sólida con polímeros molecularmente impresos de 25 mg de fase extractante y 10 mL de capacidad, se preparó el cartucho según lo descrito en la sección 2.4.1 y el procedimiento se realizó según lo descrito en la tabla 6 de la sección 2.4.1.1.

3.2.1.1 Perfil de elución.

Con la finalidad de determinar el volumen de elución a utilizar, se realizó el perfil de elución, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 20. Se decidió realizar la elución con un volumen de 4 mL de la mezcla Metanol:DCM (9:1 v/v) y para asegurar que el cartucho esté libre de analitos, se lavó con 4 mL del solvente de elución.

Tabla 20 Áreas obtenidas en el perfil de elución (n=2).

mL	Área NNAL	Área iso-NNAL d3
1	453753	3752225
2	618	5951
3	124	1232
4	79	586
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0

El método desarrollado de SPE-MIP para el análisis de NNAL se muestra en la

Tabla 21.

Tabla 21 Condiciones del método de SPE-MIP final.

Fase	Variable	Condición
Carga de muestra	Volumen de muestra	5 mL
	Velocidad de flujo	0.5 mL min ⁻¹
Lavado	Agua	2 porciones de 1 mL
	Vacío alto	10 min
	Tolueno	1 mL
	Tolueno:DCM (9:1 v/v)	1 mL
	Tolueno: DCM (4:1 v/v)	1 mL
	Vacío	2 min
Elución	DCM:Metanol (9:1 v/v)	4 porciones de 1 mL, aplicar vacío entre cada porción.
	Velocidad de flujo	0.2 mL min ⁻¹

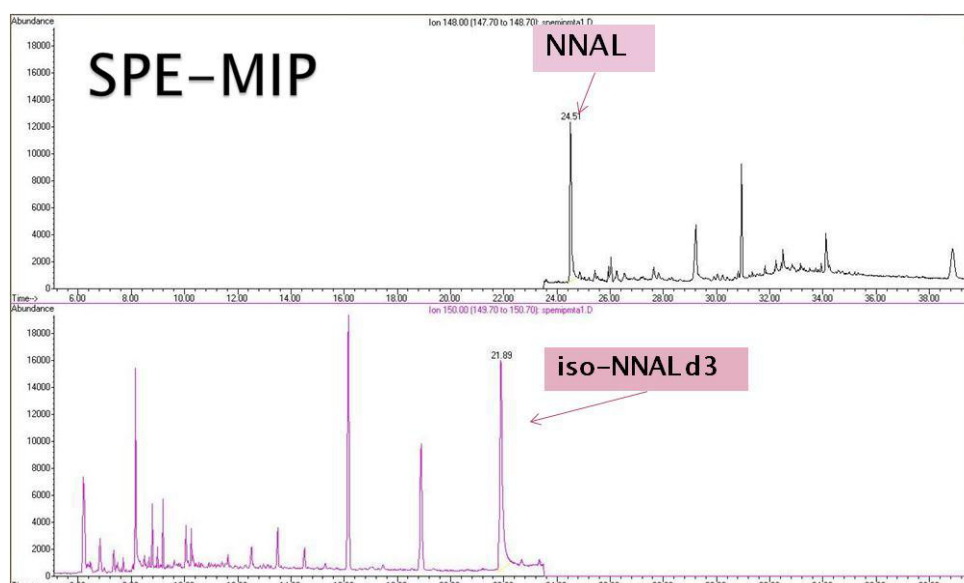


Figura 21 Cromatograma de una muestra de orina adicionada con $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ del NNAL y del estándar interno obtenido con el método SPE-MIP descrito en la tabla 21.

3.2.2 Microextracción en fase sólida (SPME).

Se utilizaron 4 fibras de extracción en fase sólida para compuestos volátiles y semivolátiles.

3.2.2.1 Selección de fibra.

Para seleccionar el recubrimiento más adecuado para la SPME, se probaron cuatro fibras disponibles comercialmente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 22, en donde se observa que las fibras DVB-CAR-PDMS y CARBOXEN-PDMS no extraen a los analitos.

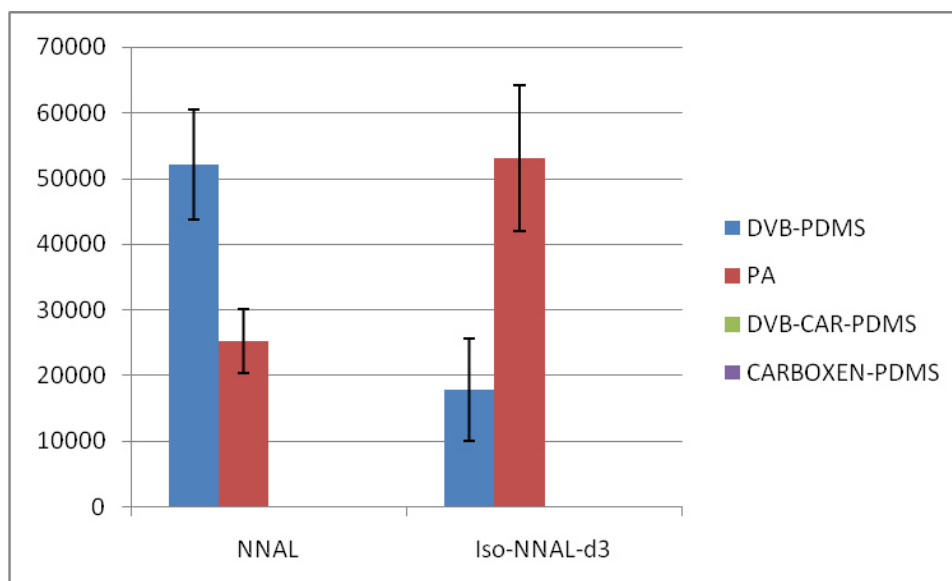


Figura 22 Selección de la fibra de SPME más adecuada.

También se puede observar que la fibra de PA extrajo mayormente al estándar interno, las áreas obtenidas con la fibra fueron de 25202 con un 31.03 % DER de para el NNAL y de 53059 con un 20.98 % DER de para el iso-NNAL-d3. Por otro lado, la fibra de DVB-PDMS extrajo tanto al NNAL como al iso-NNAL-d3 con áreas obtenidas de 52141 con un 16.07 % DER para el NNAL y de 17799 con un 21.32 % DER para el iso-NNAL-d3, siendo el NNAL el que mejor se extrajo.

3.2.2.2 Optimización del proceso de desorción.

En la tabla 22 se muestran los resultados obtenidos en cada uno de los experimentos planteados, se tomó como límite la temperatura de 260 °C ya que en esta temperatura se comenzó a observar que los picos cromatográficos cambiaban de forma. Además de la suma de áreas se consideró la relación de áreas obtenidas, las cuales fueron mayores a 250 °C por 3 minutos, por lo que se establecieron estas condiciones como óptimas.

Tabla 22 Diseño Simplex Secuencial Básico para la optimización de la desorción térmica de la fibra DVB-PDMS.

Experimento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Suma áreas
1	230	3	30395
2	250	3	88928
3	240	5	83800
4	260	5	165850
5	260	3	156003

3.2.2.3 Optimización del proceso de extracción

En la tabla 23 se muestran los resultados obtenidos en cada uno de los experimentos planteados en el diseño factorial fraccionado. Al examinar el ajuste de las variables en estudio y las respuestas obtenidas, mediante el uso de regresión lineal múltiple (MRL). El valor del porcentaje de variación explicada por el modelo matemático (R^2) fue de 0.938 y el valor de la varianza para la respuesta predicha mediante validación cruzada (Q^2) fue de -1.615. Para comprobar si este valor mejoraba, se realizó un análisis por ajuste de mínimos cuadrados parciales (PLS), donde se observó que el valor Q^2 presentó un aumento, por lo que se

Tabla 23 Respuesta obtenidas de los experimentos del diseño factorial fraccionado para la optimización de la extracción de la SPME.

Exp	Tiempo de extracción (min)	Tiempo de equilibrio (min)	Temperatura de Extracción (°C)	Adición de NaCl (%)	Adición de Solvente orgánico (5 %)	Volumen de muestra (mL)	Agitación (rpm)	Relación de áreas
1	60	10	60	5	Metanol	10	700	4.438
2	60	30	60	0	Acetonitrilo	5	700	1.844
3	60	30	80	0	Metanol	10	400	3.116
4	30	30	80	5	Metanol	5	700	1.95
5	60	10	80	5	Acetonitrilo	5	400	2.058
6	30	30	60	5	Acetonitrilo	10	400	2.228
7	30	10	80	0	Acetonitrilo	10	700	1.818
8	30	10	60	0	Metanol	5	400	1.989
9	45	20	70	2.5	Ninguno	8	550	2.972
10	45	20	70	2.5	Ninguno	8	550	2.876
11	45	20	70	2.5	Ninguno	8	550	2.224

realizó un análisis de descarte variable por variable para identificar cuál era la que presentó problemas en el ajuste del modelo. Se observó que al eliminar la variable de la agitación y volver a realizar el ajuste del modelo mediante MRL, se obtuvieron coeficientes aceptables. De lo anterior se obtuvo la ecuación 7.

$$\text{Relación de áreas} = 2.47506 + 0.433875(t \text{ Ext}) - 0.145625(t \text{ equilibrio}) - 0.194625(T^\circ \text{ ext}) + 0.238375(\text{Adición NaCl}) - 0.443125(\text{Adición Solvente Orgánico}) + 0.478862(\text{Volumen de muestra})$$

Ecuación 7

De esta ecuación podemos observar que el tiempo de equilibrio (t equilibrio), la temperatura de extracción (T° ext) y la adición de solvente orgánico presentan coeficientes negativos lo que indica que el sistema mejora la respuesta al disminuir el valor adoptado por cada variable. Mientras las variables tiempo de extracción (t Ext), adición de cloruro de sodio (adición NaCl) y el volumen de muestra presentaron un coeficiente positivo, es decir que la relación de áreas mejora al aumentar el valor adoptado por variable.

Del gráfico de coeficientes, presentado en la Figura 23a, se observó que las variables tiempo de extracción, adición de solvente orgánico y volumen de la muestra son las que tienen mayor significancia para optimizar la respuesta de acuerdo al valor presentado de los coeficientes observados en la ecuación 7 así como del intervalo de confianza.

Se realizó un análisis de gráficas de contorno de 2 variables a la vez donde se observa la tendencia de los valores de las variables y como se interrelacionan entre ellas. Y al utilizar la aplicación "Optimizer" del software, el cual trabaja con modelos simulados por medio de un diseño de experimento simplex, se obtuvieron las condiciones que se muestran en la tabla 24 como óptimas.

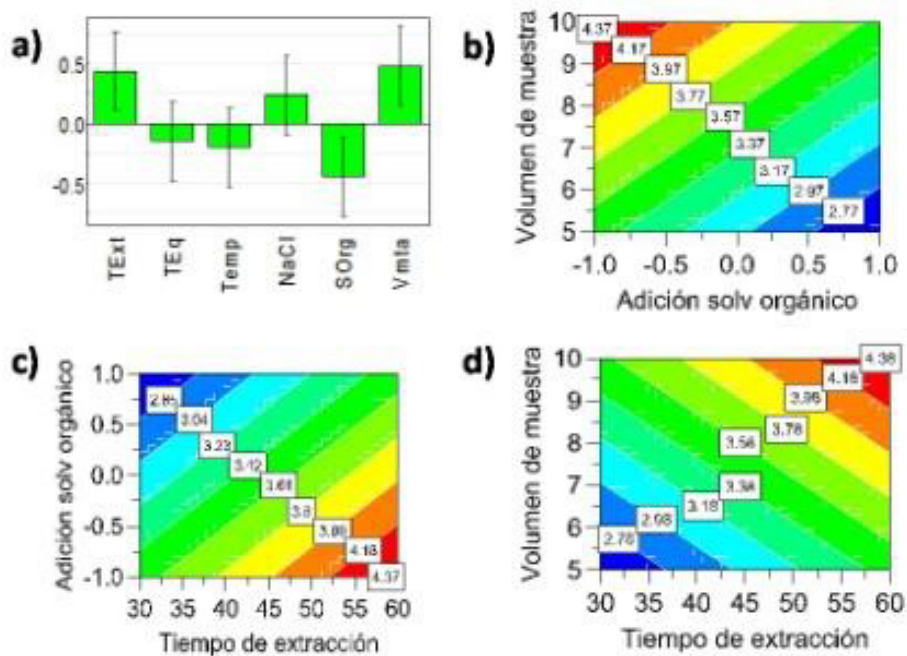


Figura 23 Gráfica de coeficientes de las variables investigadas en la optimización de la extracción. TExt=Tiempo de extracción, TEq= Tiempo de equilibrio, Temp= Temperatura de extracción, NaCl= Adición de cloruro de sodio, SOrg= Adición de solvente orgánico y Vmta= Volumen de la muestra.

Para corroborar el resultado obtenido mediante el "Optimizer" se realizó un análisis por triplicado de muestras de orina y se calculó la desviación estándar relativa (% DER), se obtuvo una relación de 4.40 con un 6.7 % DER, en la Figura 24 se muestra el cromatograma del análisis de una muestra de orina adicionada.

Tabla 24 Condiciones óptimas para el método de HS-SPME del NNAL.

EXTRACCIÓN	
Tiempo de equilibrio	10 minutos
Tiempo de extracción	60 minutos
Temperatura de extracción	60 °C
Adición de NaCl	5 %
Adición de solvente orgánico	Metanol 5 %
Volumen de <i>Headspace</i>	5 mL
Volumen de muestra	10 mL
Agitación	700 rpm
Desorción	
Temperatura	250 °C
Tiempo	3 minutos

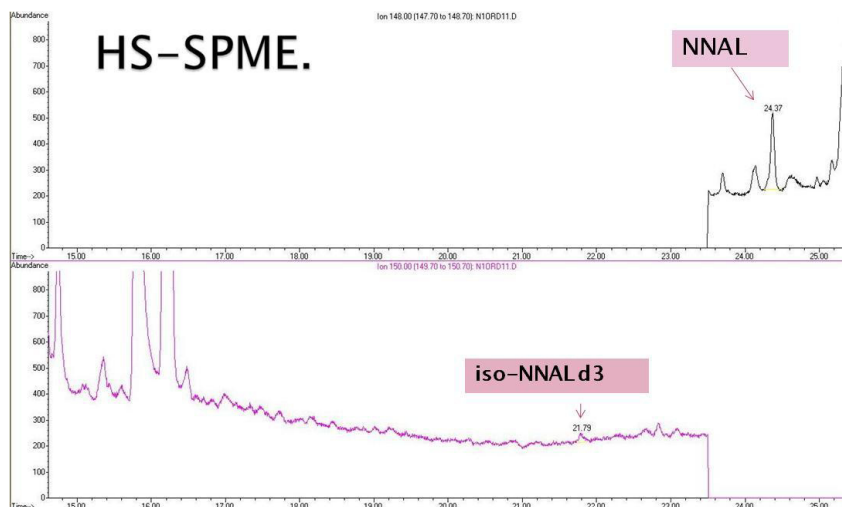


Figura 24 Cromatograma de una muestra de orina adicionada con $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ del NNAL y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ del estándar interno obtenido con el método HS-SPME descrito en la tabla 24.

3.2.3 Extracción en fase sólida con cartuchos tC18.

Se realizó la optimización del método de extracción utilizando cartuchos Sep Pack t C18 de 1g con capacidad de 6 mL. Se acondicionaron con 10 mL de metanol y 10 mL de agua bidestilada.

3.2.3.1 Optimización del método de extracción

En la tabla 25 se muestran los resultados obtenidos en cada uno de los experimentos planteados en el diseño factorial fraccionado. Al examinar el ajuste de las variables en estudio y las respuestas obtenidas, mediante el uso de regresión lineal múltiple (MRL), se observó que el porcentaje de la variación explicada por el modelo (R^2) de 0.809, al igual que la validez del modelo y la reproducibilidad, sin embargo el valor de Q^2 indica que el modelo no presenta una

buena predicción de nuevos datos de acuerdo a los resultados obtenidos en la validación cruzada ($Q^2 = 0.135$). Para comprobar si este valor mejoraba, se realizó un análisis por ajuste de mínimos cuadrados parciales (PLS). Se examinó el comportamiento de las variables, encontrando que la velocidad de carga y la velocidad de elución no eran correctamente descritas por el modelo. Al eliminar estas variables se obtuvieron coeficientes aceptables al repetir el ajuste del modelo mediante MRL; con el nuevo ajuste se obtuvo la ecuación 8.

$$\text{Área del NNAL} = 3406360 - 1199810(\% \text{ Metanol en la solución de lavado}) - 1180770(\text{Volumen solución de lavado})$$

Ecuación 8

Tabla 25 Respuesta obtenidas de los experimentos del diseño factorial fraccionado para la optimización de la extracción de la SPE tC18.

Exp. No	velocidad de carga (mL/min)	% Metanol en la solución de lavado	Volumen de solvente de lavado (mL)	Velocidad de elución (mL/min)	Área del NNAL
1	0.5	5	2	0.2	5005360
2	5	5	2	2	4804780
3	0.5	20	2	2	3632190
4	5	20	2	0.2	3929300
5	0.5	5	6	2	3763970
6	5	5	6	0.2	3873700
7	0.5	20	6	0.2	225738
8	5	20	6	2	62087
9	2.75	12.5	4	1.1	4534500
10	2.75	12.5	4	1.1	3694290
11	2.75	12.5	4	1.1	3944030

En el gráfico de coeficientes presentado en la Figura 25, se observó que las variables % de Metanol en la solución de lavado y el volumen de solución de lavado mostraron tener influencia en el desempeño de la extracción, se observó que la recuperación del analito aumentaba al disminuir las variables, lo cual se indica en la ecuación 8 donde los coeficientes de las variables son negativos. Se utilizó la aplicación Optimizer del software, el cual trabaja con modelos simulados empleando un diseño de experimento simplex, para ellos se cambiaron las condiciones límites para el porcentaje de metanol en la solución de lavado siendo el límite 1 % de metanol y se obtuvieron las condiciones que se muestran en la tabla 26 como óptimas.

Gráfica de coeficientes del diseño de experimentos para la optimización de la extracción por SPE tC18

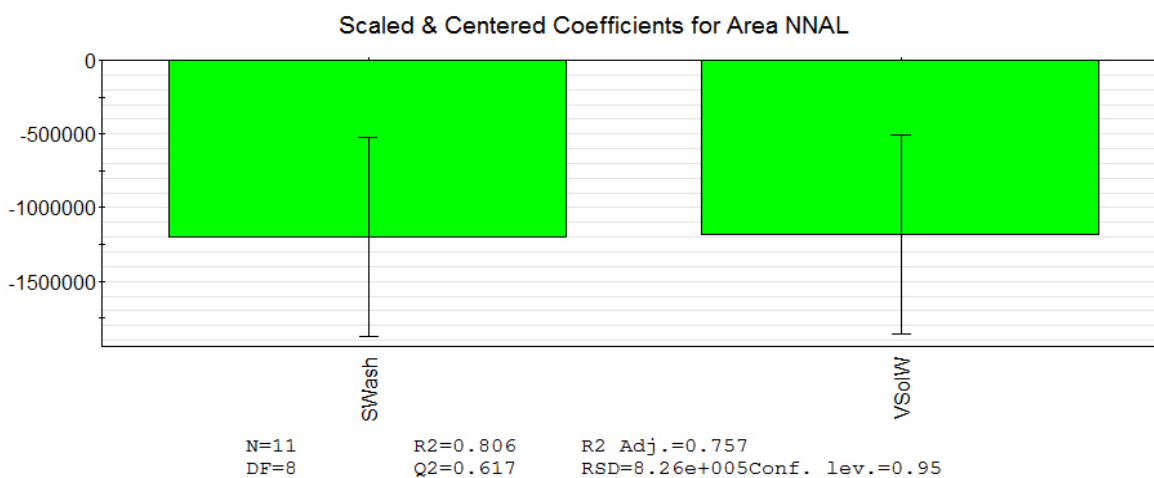


Figura 25 Gráfica de coeficientes de las variables investigadas en la optimización de la extracción por SPE tC18.

Tabla 26 Condiciones óptimas para el método de SPE tC18 del NNAL.

EXTRACCIÓN	
Velocidad de carga	3 mL min ⁻¹
% metanol en la solución de lavado	1 %
Volumen de solución de lavado	2 mL
Velocidad de elución	1 mL min ⁻¹

En la tabla 27 se muestran los resultados obtenidos con el método de extracción óptimo para SPE tC18; también se realizó un experimento con 5 % de metanol en la solución de lavado y se compararon los resultados obtenidos.

Tabla 27 Comparación de áreas de NNAL con solución de lavado de diferente composición.

	1 % MEOH	5 % MEOH
Réplica 1	4362509	4999695
Réplica 2	4792136	4855044
Réplica 3	4968351	4817562
Promedio	4707665.33	4890767.00
DE	270540.88	96177.99
%DER	5.75	1.97

Se realizaron pruebas de significancia para ver si existía diferencia entre los valores de área del NNAL, dando como resultado que los métodos no presentan una diferencia significativa, con un 95 % de confianza, en la precisión ni en el área de analito recuperada, por esta razón se seleccionó utilizar una solución de lavado que contenga 5 % de metanol.

3.2.3.2 Perfil de elución.

El perfil de elución que presentan tanto el analito como el estándar interno se muestra en la tabla 28. De acuerdo con estos resultados, en los experimentos subsecuentes se seleccionó eluir con 3 mL de metanol al 100 %.

Tabla 28 Áreas obtenidas en el perfil de elución de SPE tC18 (n=2).

Fracción (mL)	Área NNAL	Área iso-NNAL-d3
1	1197201	6601009.5
2	90188.5	691544
3	936	39917
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0

El método optimizado de SPE tC18 para la extracción de NNAL en orina se presenta en la tabla 29. Con este método se realizó una extracción por triplicado de muestra de orina de no fumador adicionada a 100 ng mL^{-1} y se obtuvo una desviación estándar relativa de 1.6 % de la relación de áreas del NNAL/iso-NNAL-d3; en la figura 26 se presenta el cromatograma obtenido.

Tabla 29 Condiciones finales para el método de SPE tC18 del NNAL.

EXTRACCIÓN	
Velocidad de carga	3 mL min^{-1}
% Metanol en la solución de lavado	5 %
Volumen de solución de lavado	2 mL
Secado	2 min a alto vacío
Elución	
Volumen	3 mL de metanol al 100 %
Velocidad de elución	1 mL min^{-1}

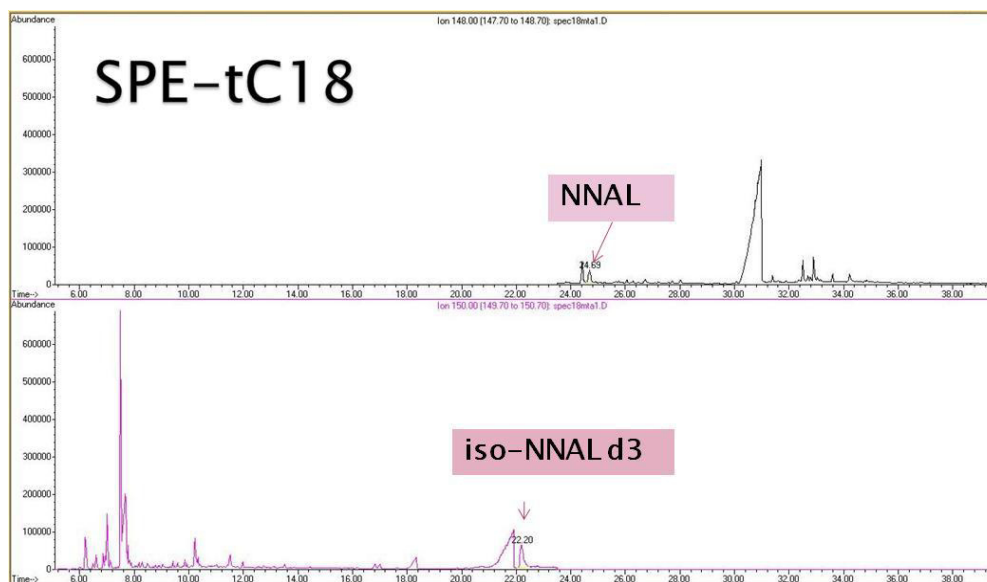


Figura 26 Cromatograma de una muestra de orina adicionada con $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ del NNAL y del estándar interno obtenido con el método SPE-MIP descrito en la tabla 29.

3.3 Selección del método de extracción para la preparación de Muestras

Debido a que el método desarrollado para la extracción del NNAL por HS-SPME mostró una baja recuperación, 40 veces menor a la observada con los

métodos de extracción en fase sólida, no se siguió trabajando con este método de preparación de muestra. En la tabla 30 se muestran los resultados de recuperación de los métodos de SPE-MIP y de SPE tC18 para el NNAL.

Tabla 30 Comparación de los métodos desarrollados (n=3).

Método	% Recuperación	%DER	Tiempo	Costo
SPE-MIP	120.0	8.3	120 min	+++++
SPE tC18	130.3	10.0	60 min	+++

3.4 Validación del método SPE-MIP para la determinación de NNAL

Se seleccionó el método de SPE-MIP como el que presentó mejor desempeño. Los resultados obtenidos de la validación del método por SPE-MIP para la determinación de NNAL en muestras de orina se muestran en la tabla 31.

Tabla 31 Datos obtenidos de la validación del método SPE-MIP desarrollado.

Parámetro	Resultados	
Linealidad	Regresión de segundo grado $y = -7 \times 10^{-5} x^2 + 0.010x + 0.004$ $r^2 = 0.994$	
Precisión intradía	2 ng mL ⁻¹ 10 ng mL ⁻¹ 25 ng mL ⁻¹	8 % DER 4.7 % DER 1.3 % DER
Exactitud	2 ng mL ⁻¹ 10 ng mL ⁻¹ 25 ng mL ⁻¹	11.9 % Error Relativo 9.3 % Error Relativo 5.8 % Error Relativo
Correlación entre concentración calculada y real	m= 1.040 r ² = 0.993	
Límite de detección	0.7 ng mL ⁻¹	
Límite de cuantificación	2 ng mL ⁻¹ , DER = 8 %.	

3.5 Aplicación del método SPE-MIP para la determinación de NNAL en muestras de orina

En la tabla 32 se muestran los resultados del análisis de dos muestras de orina de sujetos fumadores y de no fumadores adicionadas a 2 ng mL⁻¹.

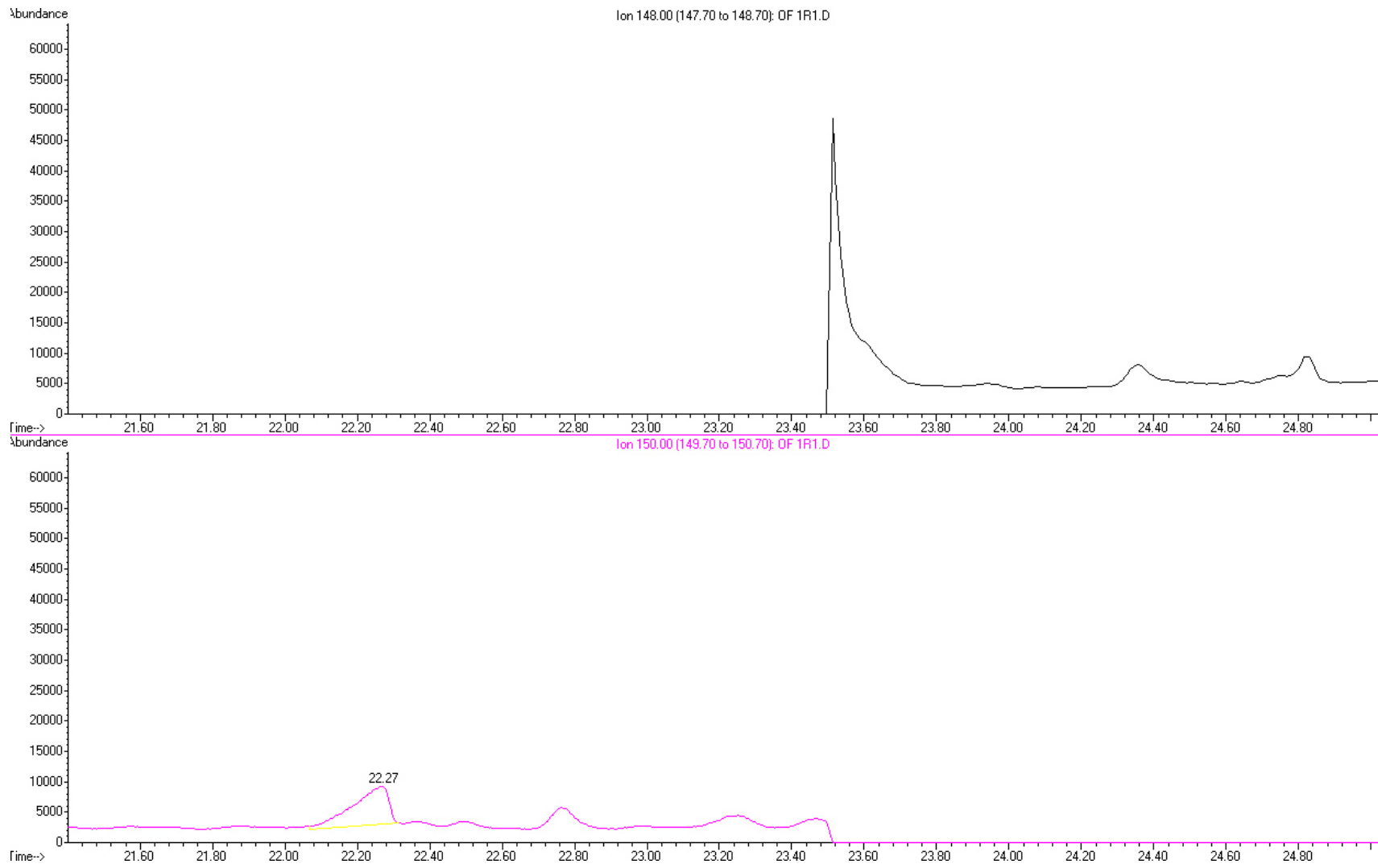


Figura 27 Cromatograma de mestra de orina de fumador extraída con el método de SPE-MIP.

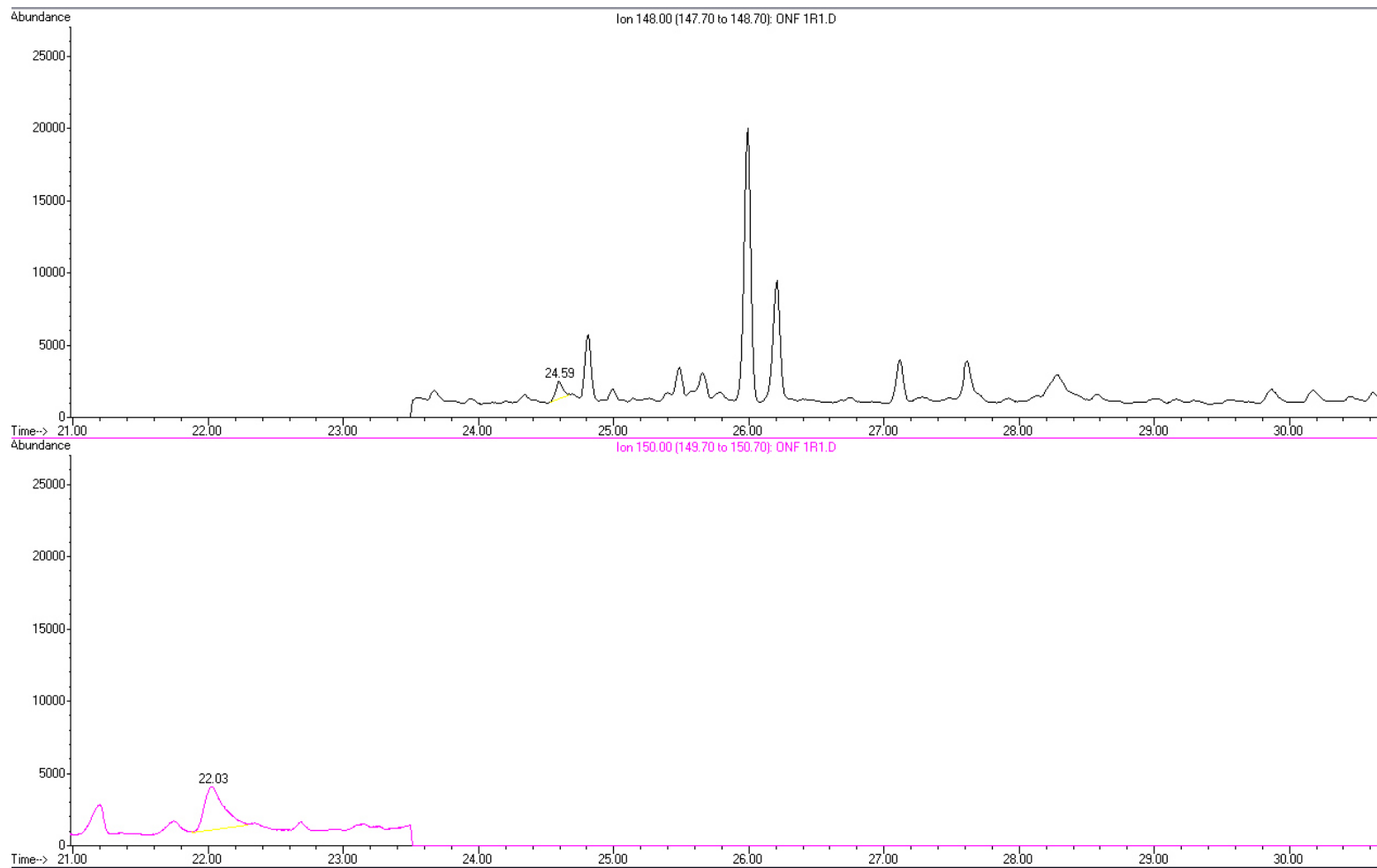


Figura 28 Cromatograma de muestra de orina de no fumador adicionada a 2 ng mL^{-1} extraída con el método de SPE-MIP.

Tabla 32 Resultados del análisis de muestras de orina de fumador y no fumador adicionadas (n=2).

Tipo de muestra	Concentración
Orina fumador	No detectado
Orina de no fumador adicionada	$2.20 \text{ ng mL}^{-1} \pm 0.24 \text{ ng mL}^{-1}$

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1 Cromatografía de Gases-Masas (GC-MS)

4.1.1 Establecimiento de las condiciones de separación cromatográfica.

Para obtener una separación satisfactoria de todos los analitos y el estándar interno se evaluó el comportamiento de cuatro columnas cromatográficas, las cuales se han reportado en diferentes referencias bibliográficas.^{26, 74} Para cada una fue necesario evaluar diferentes programas de temperatura hasta elegir aquel en el que las señales tanto del NNAL como del iso-NNAL-d3 presentaran tiempos de retención diferentes y no solapados, es decir, hasta obtener un cromatograma con buena resolución.

Para la identificación de los analitos, se realizaron inyecciones de los estándares individuales y se obtuvo el espectro de masas promedio, los cuales se muestran en las Figuras 5 y 6. Debido a que la versión de la biblioteca NIST con la que se cuenta en el software del equipo, no se encuentran los espectros de masas del NNAL e iso-NNAL-d3 se comparó con el espectro de masas reportado por Sleiman *et al.*,⁷⁵ siendo los espectros de masas obtenidos semejantes a lo reportado.

En las figuras 7 a la 12 se muestran los cromatogramas obtenidos con las diferentes columnas y las diversas modificaciones al programa de temperaturas. Para evaluar el desempeño de la columna HP-5MS, se comenzó a trabajar con el

programa de temperatura previamente reportado por Bernet *et al.*²⁶ y como puede observarse en el cromatograma mostrado en la figura 7, los picos cromatográficos no se encuentran resueltos ($R_s = 1.05$) y presentan una forma asimétrica. Con la finalidad de plantear las modificaciones pertinentes, se analizó el programa de temperaturas y se determinó que la elución de estos analitos se produce a una temperatura de 184 °C, con una velocidad de cambio de temperatura de 2 °C min⁻¹.

Se realizaron diferentes modificaciones del programa de temperatura, así como de la temperatura de la interfase, ya que el coleo puede ser ocasionado por una incompatibilidad de temperaturas, es decir que la temperatura final del programa de temperatura del horno este muy por debajo o muy por encima de la temperatura de la interfase. En la Figura 8 se muestra el cromatograma obtenido con el programa final de temperaturas presentado en la sección 3.1.2, en el cual se logró una mejor resolución de los analitos y se mejoró la forma de los picos cromatográficos; la resolución obtenida fue de 1.44.

Para evaluar el desempeño de la columna DB-17, se comenzó a trabajar con el programa de temperatura previamente reportado por Bernet *et al.*²⁶ En la Figura 9 se puede observar el cromatograma obtenido con este programa de temperatura, con el cual se logró una buena resolución ($R_s = 1.81$), pero los picos cromatográficos presentaron una forma asimétrica. Se probó otro programa de

temperatura reportado por Zhou *et al.*⁷⁴ quienes utilizaron una columna VF-17MS con características de polaridad idénticas a la de la columna utilizada y se obtuvo el cromatograma que se presenta en la figura 10, en el cual se logró una buena resolución de los picos de los analitos y una forma de pico cromatográfico simétrico.

Para la columna DB-1701, se comenzó a trabajar con el programa de temperatura previamente reportado por Hencht *et al.*⁴³ En la Figura 11 se muestra el cromatograma obtenido con este programa de temperatura, en el cual los picos cromatográficos presentaron una buena resolución ($R_s = 4.4$) pero fue difícil evaluar la asimetría de los picos, puesto que los analitos eluían en una parte de elevación de la línea base. Con la finalidad de plantear las modificaciones pertinentes, se analizó el programa de temperaturas y se determinó que la elución de estos analitos se produce a una temperatura de 210 °C, en un tiempo en que la corrida cromatográfica presenta temperatura isotérmica.

Se realizaron diferentes modificaciones a las rampas de temperatura propuestas inicialmente. En la Figura 12 se muestra el cromatograma con el programa final de temperaturas, en el cual se logró una resolución de los analitos adecuada y las formas de los picos cromatográficos se acercaron a lo deseado, es decir, picos simétricos.

Con la finalidad de mejorar la sensibilidad y selectividad del método desarrollado, una vez establecidas las condiciones óptimas de separación cromatográfica para cada columna, se cambió la modalidad de adquisición de datos de barrido completo (Full Scan) al modo de monitoreo selectivo de iones (SIM); para lo cual, se establecieron 2 ventanas de adquisición de datos, la cuales se muestran en tabla 12; en las figuras 13 a la 15 se pueden observar los cromatogramas obtenidos utilizando esta forma de adquisición de datos. Las pruebas de sensibilidad para cada columna, se obtuvieron mediante SIM ya que en Full Scan se obtuvieron valores mayores ya que al tener una mayor ventana de iones a analizar el tiempo de adquisición para cada uno es menor y la sensibilidad disminuye, caso contrario a SIM.

La selección de columna se basó, como se mencionó en el capítulo 2, en la resolución del cromatograma obtenido, ver Tabla 13, la forma de los picos cromatográficos, mostrado en las Tablas 14 y 15, así como en los límites de detección observados con cada columna, mostrados en la Tabla 16. Se pudo observar que la columna HP-5 MS presentó picos asimétricos y poco resueltos y un límite de detección de $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$, con la columna DB-17 se logró detectar hasta $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ y los picos cromatográficos obtenidos mostraron un poco de fronteo y finalmente, con la columna DB-1701 se determinó una sensibilidad de $0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$ y los picos cromatográficos fueron asimétricos. No obstante que la columna DB-1701 presentó los mejores factores de asimetría al utilizar la adquisición de datos mediante barrido completo, mostró un aumento considerable

de la línea base en la región de elución de los analitos, lo que podría interferir en la cuantificación de los mismos a niveles bajos de concentración.

Se realizaron pruebas preeliminares para evaluar la capacidad de la columna de resolver señales que pudieran coeluir con las señales de los analitos de interés, por lo cual se realizó una extracción líquido-líquido, utilizando diclorometano como fase extractante, de orina de fumador adicionada con NNAL. Se probó primero la columna DB-1701, pero debido al aumento en la línea base del cromatograma que esta columna presentó, mostrado en la Figura 16, no fue posible detectar la señal del analito; por esta razón se probó el comportamiento de la columna DB-17 con un extracto semejante y se logró observar señales de los analitos, aunque los picos cromatográficos obtenidos fueron anchos y coleados, lo cual se puede observar en la Figura 17, por lo que se modificó el programa de temperatura, el cual se presenta en la tabla 17.

A pesar de que las columnas DB-17 y DB-1701 han sido reportadas para el análisis de NNAL, no están diseñadas para efectuar cromatografías de un amplio rango de muestras de niveles traza ya que presentan una degradación del polímero de la fase estacionaria, debido al tipo de entrecruzamiento de la fase estacionaria, lo cual provoca que la línea base aumente al incrementar la temperatura de elución,⁷⁶ lo cual podría perjudicar al momento de realizar el análisis de muestras reales. Debido a que se trabajó con un cromatógrafo de

gases con espectrometría de masas, se recomienda el uso de columnas de bajo sangrado, es decir columnas MS, por lo que se realizaron pruebas con la columna DB-17MS la cual presenta una química de siloxanos específica y un proceso de desactivación superficial, lo cual conlleva a tener una mayor estabilidad y por lo tanto menor sangrado de la fase estacionaria a altas temperaturas. Se realizaron pruebas con la columna DB-17MS utilizando el programa establecido para la columna DB-17 en la tabla 17 y se realizó la prueba de sensibilidad, dando un resultado equiparable con la columna DB-1701 por lo que, esta columna se seleccionó para el desarrollo del método.

4.1.2 Validación del sistema cromatográfico.

Con la finalidad de validar el método cromatográfico desarrollado para la determinación de NNAL, se evaluaron los parámetros de linealidad, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación para el NNAL mediante la técnica de estándar interno.

Como puede verse en la figura 18, al graficar la curva de calibración se observa que la regresión no se comporta de manera lineal, en el trabajo reportado por Xia *et al.* en el 2005,⁷⁷ realizaron la evaluación de la linealidad con datos ponderados, aunque no mencionan el tipo de manejo que realizaron a los datos, en este trabajo, en la Figura 19, se observó que los datos ajustan en un modelo polinómico de segundo grado. Este tipo de comportamiento ya se ha observado en los métodos actuales para la determinación de nitrosaminas, compuestos volátiles, entre otros analitos, por técnicas cromatográficas y en el Método 8000D de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (U.S. EPA)⁷⁸ se menciona cómo evaluar los métodos cromatográficos que ajusten a regresiones polinómicas, para lo cual se indica que se debe trabajar con al menos 6 estándares de calibración.

En el caso de linealidad, el coeficiente de determinación (r^2) para el NNAL fue mayor al criterio de aceptación de un valor de 0.99. Para la precisión intradía se calculó el % DER de las señales obtenidas de estándares de concentraciones de 0.1, 1 y 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, que se muestran en la Tabla 18, los cuales se encontraron en un rango de 3.85 a 5.90 %, lo cual es aceptable porque se cumple el criterio de aceptación indicado en la sección 2.3.4.2. La exactitud fue buena, presentando porcentaje de error relativos, los cuales se muestran en la Tabla 19 y fueron menores al 24 %, por lo que son aceptables de acuerdo a lo establecido por la EPA en el método 8000 D (<30%). También se realizó un ensayo de correlación

entre la concentración nominal y la concentración calculada mediante la ecuación polinómica de segundo grado, representado en la Figura 20, donde se pudo observar una pendiente de 1.006 indicando que si existe una concordancia entre los datos.

Los límites de detección y cuantificación para el NNAL se determinaron experimentalmente utilizando las condiciones finales de análisis (tabla 17). El límite de detección del sistema se estableció en $0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$ y el límite de cuantificación en $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$, con un 18 % DER (n=4).

4.2 Métodos de Preparación de Muestra.

Se evaluaron distintos métodos de preparación de muestras, cuya aplicación al análisis de NNAL en diversas matrices se ha reportado anteriormente.

4.2.1 SPE-MIP.

Se aplicó el procedimiento reportado por el proveedor para el análisis del NNAL con cartuchos molecularmente impresos, específicos para el NNAL. En este estudio se logró la recuperación del NNAL así como del iso-NNAL-d3. Ya se ha observado anteriormente que los cartuchos pueden extraer nitrosaminas distintas al NNAL aun en el cartucho específico.⁵² En el perfil de elución, mostrado en la Tabla 20, observamos que aun es posible distinguir señales a 4 mL de elución, contrario a lo que indica el protocolo estándar de los cartuchos (2 mL). Lo que nos interesa es poder recuperar la mayor cantidad de masa de los analitos, por lo que se decidió recolectar 4 mL de eluato, llevarlo a sequedad y reconstituirlo en 150 μ L de metanol para su posterior análisis. Algo semejante lo observaron Yao *et al.* en el 2012, donde para mejorar la extracción del NNAL extrajeron 3 mL en lugar de los 2 mL recomendados por el fabricante.⁷⁹ También, Xia *et al.* en el 2005,⁷⁷ indican que en perfil de elución siguen apareciendo señales del analito hasta la octava fracción de 0.5 mL del solvente de elución, lo cual concuerda con lo observado en este trabajo. En la Tabla 21 se muestran las condiciones establecidas para la extracción mediante esta técnica y en la Figura 21 se muestra el cromatograma de una muestra de no fumador adicionada, donde se puede

observar que no hay interferentes de la matriz en los tiempos de retención cercanos a los analitos.

4.2.2 SPME

El reporte encontrado de la aplicación de la SPME para la determinación de TSNAs, ha sido de SPME en tubo acoplada en línea con un análisis por HPLC.⁸⁰ No se ha reportado anteriormente el uso de SPME por *headspace* para el análisis de NNAL en muestras de orina: esta modalidad de SPME se utiliza principalmente para la extracción de analitos volátiles y semivolátiles a partir de una fase de vapor en equilibrio con la muestra a extraer (ya sea gaseosa, líquida o sólida), además que proporciona la ventaja de evitar o minimizar el daño de la fibra por componentes de la matriz. Debido a la disponibilidad de una variedad de fibras de diferente polaridad, se preseleccionaron 4 tipos de fibras, disponibles comercialmente, recomendadas para el análisis de compuestos volátiles y semivolátiles.

Se probaron las fibras: PA, CARBOXEN-PDMS, DVB-PDMS Y CAR-DVB-PDMS. La fibra de DVB-CAR-PDMS, dado la mezcla de polímeros que presenta, se recomienda para el análisis de compuestos trazas; por otro lado, la fibra CARBOXEN-PDMS se sugiere para el análisis de gases y compuestos de bajo peso molecular, es ideal para el análisis de moléculas de dos a doce carbonos ya que moléculas más grandes de doce carbonos pueden ser altamente retenidas sobre la superficie de las partículas y difíciles de desorber.

Los resultados obtenidos en los experimentos de selección de la fibra de SPME más adecuada para la extracción del NNAL e iso-NNAL-d3 se muestran en la Figura 22, en donde se observa que las fibras DVB-CAR-PDMS y CARBOXEN-PDMS no extraen a los analitos.

La fibra de PA, recomendada para la extracción de compuestos polares, extrajo mejor al estándar interno que al NNAL y presentó mayor variación en los resultados, mientras que la fibra de DVB-PDMS, la cual se recomienda para el análisis de compuestos volátiles, aminas y compuestos aromáticos nitrados que son las características del NNAL, extrajo mayor cantidad del NNAL que del estándar interno y las variaciones observadas fueron menores que las obtenidas con la fibra de PA. En base a esto se continuó trabajando con la fibra DVB-PDMS para la optimización de la extracción y de la desorción.

En la tabla 22 se pueden observar los resultados obtenidos en cada uno de los experimentos planteados; se tomó como límite la temperatura 260 °C ya que en esta temperatura se comenzó a observar que los picos cromatográficos cambiaban de forma lo cual dificulta la integración de los analitos. De este experimento, se seleccionó la combinación que dio las mejores formas de las señales cromatográficas y los mejores resultados tanto de la suma de áreas del NNAL y del iso-NNAL-d3, así como de la relación de áreas obtenidas. Las condiciones que se establecieron como óptimas fue una temperatura de desorción de 250 °C por un tiempo de 3 minutos.

Para seleccionar las variables que pueden tener un efecto en la eficiencia de la extracción se realizó una búsqueda bibliográfica. Se empleó un diseño de experimentos de Plackett-Burman a dos niveles y completamente aleatorizado para observar los efectos de cada variable y seleccionar solamente las principales, ya que cabe resaltar que este tipo de diseño no permite un análisis completo de las interacciones que se presentan entre las variables.⁸¹ Los resultados se presentaron en la Tabla 23.

Mediante el uso de regresión lineal múltiple (MRL), se examinó el ajuste de las variables en estudio y las respuestas obtenidas; se observó que el porcentaje de la variación explicada por el modelo (r^2 0.938) ya que los valores deben de ser cercanos a 1, se consideró que existe un buen ajuste entre los factores y las

respuestas. Los experimentos con valores centrales de las variables, permitieron determinar que la validez y la reproducibilidad del modelo fueron satisfactorias. es bueno, al igual que la validez y la reproducibilidad del mismo; sin embargo, el valor de Q2 indica que el modelo no presentó una buena predicción de nuevos datos de acuerdo a los resultados obtenidos en la validación cruzada. Para comprobar si este valor mejoraba, se realizó un análisis por ajuste de mínimos cuadrados parciales (PLS), donde se observó que el valor Q2 presentó un aumento, sugiriendo la presencia de un problema entre la relación de las variables y la respuesta, por este motivo se realizó un análisis de descarte variable por variable hasta identificar cuál era la variable que presentó problemas en el ajuste del modelo. El análisis realizado sugirió que la variable de agitación era la que presentaba problemas de ajustes, por lo cual se eliminó dicha variable y se volvió a realizar el ajuste del modelo mediante MRL y se obtuvieron coeficientes aceptables.

Del diseño de experimentos, Figura 23 a, se encontró que las variables tiempo de extracción, adición de solvente orgánico y volumen de la muestra son las que tienen mayor significancia para optimizar la respuesta de acuerdo al valor presentado de los coeficientes así como del intervalo de confianza.

Debido a que la técnica SPME está basada en el equilibrio alcanzado entre las fases, se puede ver que a mayor tiempo de exposición entre el analito y la fibra

hay una mayor extracción; sin embargo, el llegar a las condiciones de equilibrio puede ser un proceso demasiado largo, por ello, se puede establecer un tiempo de extracción en un punto intermedio, el cual no comprometa la respuesta del analito ni la reproducibilidad del método. Probar un tiempo mayor de extracción podría reflejar una mayor respuesta del analito, pero como se trata de una técnica manual se podrían analizar un menor número de muestras si se aumentara el tiempo de extracción, por lo que el tiempo de 60 minutos fue el límite máximo para esta variable. Al ver el efecto de la temperatura de extracción, se ve que se requiere menor temperatura para mejorar la respuesta, esto debido a que a mayor temperatura se extrae mejor el estándar interno lo que provoca una menor relación de áreas. Por último, de los dos solventes orgánicos probados, el metanol tiene una influencia positiva en el comportamiento de la respuesta, lo que significa que es un buen solvente auxiliar para promover la migración del NNAL a la fase gaseosa.

Al realizar un análisis de gráficas de contorno con dos variables a la vez, las cuales se muestran en la Figura 23b a 23d, se puede observar la relación existente entre las dos variables y la respuesta deseada, donde las mayores relaciones de área se obtienen cuando el tiempo de extracción es el máximo, el solvente adicionado es metanol y el volumen de muestra es el máximo evaluado, lo cual se puede observar en la ecuación 7. Además, al utilizar la aplicación Optimizer del software, el cual emplea la ecuación construida para describir el modelo y un diseño de experimento simplex, para obtener una proyección de los

valores de las variables a los cuales la respuesta aumenta, resultó en las condiciones que se presentan en la tabla 24 como las óptimas para el proceso de HS-SPME.

Se aplicó el método optimizado a un análisis por triplicado de muestras de orina de no fumadores adicionada, en la Figura 24 se muestra un cromatograma de este análisis. Se observó que la relación de las señales de NNAL/ iso-NNAL-d3 promedio fue de 4.40 con un 6.7 % DER, lo cual concuerda con los datos obtenidos mediante la función "Optimizer".

4.2.3 SPE-tC18

La SPE es una técnica de preparación de las muestras con la cual se pueden llevar a cabo extracciones cuantitativas rápidas, fáciles de realizar y que pueden ser automatizadas, así como también, se reduce el empleo de disolventes y tiempo de laboratorio.⁸²

La SPE se utiliza para preparar muestras líquidas y extraer analitos semivolátiles o no volátiles. Esta técnica es excelente para la extracción de la muestra, la concentración y la limpieza de la misma.⁸²

Comercialmente se encuentran disponibles una amplia variedad de adsorbentes, por lo que seleccionar el producto más adecuado para cada aplicación y cada muestra es importante.

Los cartuchos tC18, son fases ligadas basadas en sílice que presentan un fuerte carácter hidrófobo con una química de unión trifuncional, la cual le da un mayor de estabilidad para la hidrólisis que la C18 convencional. Se utiliza para adsorber analitos incluso con hidrofobicidad débil de soluciones acuosas, como lo pueden ser fármacos y sus metabolitos en suero, plasma u orina, desalación de péptidos, compuestos orgánicos traza en muestras de agua medioambientales, ácidos orgánicos en bebidas.⁸³

En la Tabla 25 se presenta el diseño de experimentos planteado para la optimización de este método de preparación de muestra. Se analizaron las variables de velocidad de carga, composición del solvente de lavado, volumen de solvente de lavado y velocidad de elución. De los resultados obtenidos del diseño de experimentos, Figura 25 y ecuación 8, se observó que el rango de velocidades

probadas no tiene influencia en la recuperación del analito, mientras que la composición del solvente de lavado, así como el volumen del mismo tienen una influencia inversa, es decir al aumentar el contenido de metanol en la mezcla, se recuperaba menor cantidad de analito, lo mismo pasó con el volumen de solvente de lavado.

Los solventes utilizados en SPE se eligen de manera que sus propiedades de miscibilidad, viscosidad, el poder de solvatación, la pureza, volatilidad y su naturaleza cromofórica, es decir su comportamiento al ser irradiado por luz ultravioleta o visible, se integren para dar velocidad, simplicidad, limpieza efectiva de las muestras y la recuperación cuantitativa en los pasos relevantes del proceso⁸⁴. En este caso en particular, se partió de protocolos generales para el empleo de cartuchos C18, en donde se utiliza metanol como solvente de elución y una mezcla agua-metanol como solvente de lavado. El metanol utilizado durante el proceso fue metanol para el análisis de trazas que posee una mayor pureza y no interfiere en la cuantificación del NNAL.

Al realizar el diseño, se observó que a mayor concentración de metanol en el solvente de lavado se perdía señal del analito, lo cual coincide con lo reportado por Wang *et al.*, quienes observaron que al aumentar de un 10 % a un 20 % de metanol disminuía la recuperación de las TSNA's.⁸⁵ Estos mismos autores no observaron diferencia significativa en la recuperación de las TSNA's cuando se utilizó un contenido de metanol entre 2 y 10 % y ya que el metanol tiene un gran

poder de elución, se recomienda utilizar concentraciones altas del mismo para mejorar el poder de limpieza de la solución de lavado. En los experimentos de optimización, Tabla 27, se estudió la respuesta encontrada cuando la solución de lavado contenía 1 y 5 % de metanol, no encontramos diferencia significativa en la señal en estas condiciones, pero el extracto que se lavó con 5 % de metanol ensució menos el liner del equipo, lo cual asegura el comportamiento del cromatógrafo al inyectar varias muestras en un mismo liner, por esta razón se seleccionó un solvente de lavado con metanol al 5 %.

En el caso del volumen de solvente de lavado, se marcó como límite 2 mL, este valor está cercano al volumen de retención de 1.9 mL para los cartuchos utilizados

86 .

Al igual que lo observado en el procedimiento de SPE-MIP, el principal interés es recuperar la mayor cantidad de masa de los analitos, por lo que al analizar el perfil de elución mostrado en la Tabla 28, se decidió recolectar 3 mL de eluato y llevarlo a sequedad para su posterior recuperación.

El método de SPE para el NNAL final presentado en la Tabla 29, mostró una buena precisión (DER de 1.6 %) al analizar un triplicado de muestra de orina de no fumador adicionada a 100 ng mL^{-1} , el cromatograma correspondiente se puede observar en la Figura 26, donde se observa en tiempos muy cercanos a las señales del analito, picos intensos provenientes de la matriz de orina.

4.3 Selección del método de preparación de muestra.

Como se muestra en la tabla 30 los porcentajes de recuperación encontrados con los métodos son mayores al 100 % y las DER son menores al 10 %. La mejor recuperación se obtuvo con los cartuchos de SPE-MIP, pero presentan una mayor dispersión de los resultados.

La recuperación del NNAL concuerda con los reportes presentados por el fabricante, donde a concentraciones 100 pg mL^{-1} se obtienen recuperación del 87 %, así como indica que es posible obtener recuperaciones mayores al 90 % con el empleo de estándar interno y un análisis por HPLC-MS-MS.⁸⁷

4.4 Validación del método SPE-MIP.

Con la finalidad de validar el método desarrollado para la determinación de NNAL, se evaluaron los parámetros de linealidad, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación para el NNAL mediante la técnica de estándar interno, los resultados se presentan en la Tabla 31.

Al igual que en la evaluación de la linealidad del sistema cromatográfico, la curva de calibración tuvo un comportamiento de segundo grado, ver sección 4.1.2.

En el caso de linealidad, el coeficiente de determinación (r^2) para el NNAL fue mayor a 0.99. Para la precisión intradía se calculó el % DER de las señales obtenidas de estándares de concentraciones de 2, 10 y 25 ng mL⁻¹, los cuales se encontraron en un rango de 1.3 a 8 %. La exactitud fue buena, presentando porcentaje de error relativos menores al 11.9 %. Los valores obtenidos son aceptables de acuerdo a lo establecido por la EPA en el método 8080 D (<30%).

Los límites de detección y cuantificación para el NNAL se determinaron experimentalmente utilizando las condiciones finales de análisis (Tabla 21). El

límite de detección del método fue de 0.7 ng mL^{-1} y el límite de cuantificación se determinó en 2 ng mL^{-1} , con un 8 % DER ($n=3$). No se han encontrado reportes en la literatura en los que se emplee la SPE-MIP en combinación con la CG-MS para la determinación del NNAL. Los límites de detección obtenidos con este método son superiores a los reportados por Bernert *et al.* en el 2005,²⁶ que utilizaron un método de preparación de muestra que consistía en una combinación de LLE y SPE y posterior análisis con GC-HRMS donde el límite de detección fue de 0.6 pg mL^{-1} . La baja sensibilidad observada en el presente método concuerda con lo reportado por Ramirez *et al.* en el 2012,⁸⁸ quienes desarrollaron un método para la determinación de N-nitrosaminas en deposiciones de polvo dentro de hogares de fumadores, para realizar el análisis, compararon el desempeño de un GC-MS y sistema de GC en línea con detector quimioluminiscencia de nitrógeno (GCxGC NCD), en el cual descartaron el uso del GC-MS por la baja sensibilidad lograda por este sistema. Kim *et al.* en el 2005 compararon el desempeño de un método cromatográfico para la determinación de metanfetamina (MA) y anfetamina (AMP) en cabello humano mediante el uso de GC-LRMS y GC-HRMS, donde se observaron que los LOD para MA y AMP fueron 2.4-4.4 veces más bajos con HRMS que los obtenidos con LRMS, esto debido a la eliminación de señales de ruido de origen biológico.⁸⁹ El método desarrollado por Sleiman *et al.* en el 2009 para la determinación de TSNAs en humo de segunda mano mediante la filtración del aire a través de una membrana de celulosa y posterior extracción líquido-sólido y el análisis por cromatografía de gases con trampa de iones (GC-IT-MS)⁷⁵ donde el límite de detección alcanzado para el NNAL fue de 340 pg mL^{-1} , valor que es un

50 % menor al obtenido en el método desarrollado. El límite de detección alcanzado en el método de SPE-MIP-GC-MS, desarrollado en este trabajo, esta muy por encima al determinado en el primer reporte del empleo de SPE-MIP para el análisis de NNAL en muestras de orina,⁷⁷ en el cual se utilizó para el análisis la cromatografía de líquidos de alta resolución con ionización a presión atmosférica y un sistema de detección de masas en tandem (HPLC-API-MS/MS). para el que presentó un límite de detección de 1.7 pg mL^{-1} .

4.5 Aplicación del método de SPE-MIP.

Los cromatogramas de los dos tipos de muestras analizadas se presentaron en la Figuras 27 y 28. En la Tabla 32 se muestran los resultados de la cuantificación de estas muestras. La muestra de orina de no fumador adicionada ($n=2$) a 2 ng mL^{-1} a la cual se le determinó una concentración de $2.20 \pm 0.24 \text{ ng mL}^{-1}$. El segundo tipo de muestra fue orina de fumadores donde no fue posible detectar al analito, es decir la concentración está por debajo del límite de detección del método, el cual es de 0.7 ng mL^{-1} . Este resultado concuerda con lo reportado por Kavvadias *et al.* en el 2009,⁵² donde la concentración reportada fue de $152.5 \pm 132.1 \text{ pg mL}^{-1}$.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

Se desarrolló un método de cromatografía de gases-espectrometría de masas de baja resolución para el análisis de NNAL en muestras de orina.

De los tres métodos de preparación de muestra evaluados, el que mostró mejores resultado fue SPE-MIP ya que proporciona extractos más limpios y mejores valores de recuperación, esto posiblemente debido a la selectividad que posee la fase extractante utilizada en comparación con método de SPE tC18 que mostró

buenas recuperaciones pero los cromatogramas obtenidos mediante esta técnica de preparación de muestras presentaron señales de la matriz a tiempos de retención cercanos al NNAL que interfieren en la integración del mismo. Por último, el método de HS-SPME que obtuvo pobres recuperaciones.

La aplicación de una regresión de segundo grado fue adecuada para la descripción de los datos y permitió obtener resultados con una precisión y exactitud aceptables.

El método de SPE-MIP-GC/LRMS para el análisis de NNAL en muestras de orina que fue desarrollado no puede ser utilizado para la medición del analito en la matriz debido a que la sensibilidad alcanzada no permite la determinación de las concentraciones del NNAL esperadas en orina.

PERSPECTIVAS

Combinar técnicas de preparación de muestra para lograr una mayor limpieza de los extractos y de esta manera mejorar la sensibilidad del método.

Buscar reactivos derivatizantes para el NNAL para mejorar su volatilidad, estabilidad térmica o mejorar su detección.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 C. A. Jiménez R. and S. SolanoR., *Monografías NEUMOMADRID Volumen VII. Tabaquismo*. Madrid: NEUMOMADRID, 2004.
- 2 B. Moreno-Coutiño, Ana, Cutiño Bello, “*Nicotiana tabacum L.*, Usos y percepciones.” *Etnobiología*, vol. 10, no. 2, pp. 29–39, 2012.
- 3 F. V. L. S. Pascual Pastor, “Aspectos históricos, sociales y económicos del tabaco,” *Adicciones*, vol. 6, no. Supl 2, pp. 13–24, 2004.
- 4 V. T. M. E. Portuondo Maseda Ma. Teresa, Martínez Castellanos Teresa, Delgado Pacheco Juana, García Hernández Pascual, Gil Alonso Dolores, Mora Pardo José Antonio, Reina Sánchez Margarita, Sánchez Carrio Ana Ma., Ed., *Manual de Enfermería en Prevención y Rehabilitación Cardíaca*. Madrid: Asociación Española de Enfermería en Cardiología, 2009.
- 5 Organización Mundial de la Salud (OMS), “Informe OMS sobre la epidemia mundial de tabaquismo, 2008: plan de medidas MPOWER,” Francia, 2008.

- 6 L. García R., *Arte de Fumar*. Editorial MAXTOR, 2009.
- 7 National Cancer Institute at the National Institutes of Health, “National Cancer Institute at the National Institutes of Health.” [Online]. Available: <http://www.cancer.gov/espanol/recursos/hojas-informativas/tabaco/dejar-de-fumar>.
- 8 U.S. Department of Health and Human Services, “Children and Secondhand Smoke Exposure Excerpts from the Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke: A Report of the Surgeon General,” Atlanta, GA, 2007.
- 9 C. M. Guerrero-López, J. A. Muños-Hernández, M. C, B. S. De Miera-Juárez, L. M. Reynales-Shigematsu, and D. C, “Consumo de tabaco, mortalidad y política fiscal en México,” *Salud Publica Mex.*, vol. 55, no. 1, pp. 276–281, 2013.
- 10 Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz; Instituto Nacional de Salud Pública; Secretaría de Salud, “Encuesta Nacional de Adicciones 2011: Reporte de Tabaco,” INPRFM, México DF, México, 2012.
- 11 K. Strimbu and J. A. Tavel, “What are biomarkers?,” *Curr. Opin. HIV AIDS*, vol. 5, no. 6, pp. 463–6, Nov. 2010.
- 12 F. Gil and A. Pla, “Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure,” *J. Appl. Toxicol.*, vol. 255, no. January, pp. 245–255, 2001.

- 13 A. Pérez Trullén, C. Bartolomé, M. Barrueco, I. Herrero, and C. Jiménez, "Nuevas perspectivas en el diagnóstico y evolución del consumo de tabaco: marcadores de exposición," *Prev Tab*, vol. 8, no. 4, pp. 164–173, 2006.
- 14 Y. Xia, J. T. Bernert, R. B. Jain, D. L. Ashley, and J. L. Pirkle, "Tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) in smokers in the United States: NHANES 2007-2008.," *Biomarkers*, vol. 16, no. 2, pp. 112–9, Mar. 2011.
- 15 S. S. Hecht and D. Hoffmann, "Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke," *Carcinogenesis*, vol. 9, no. 6, pp. 875–884, Jun. 1988.
- 16 International Agency for Research on Cancer, *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Smokeless Tobacco and Some Tobacco-specific N -Nitrosamines*, vol. 89. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2007.
- 17 M. Escobar-Saucedo, N. Waskman Minsky, R. Lucio-Gutierrez, J. Ricardo Castro Ríos, M. de la L. Salazar-Cavazos, and A. Rojas Martínez, "Determinación del carcinógeno específico del tabaco 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol en orina: 20 años de evolución en los métodos de preparación de muestra.," *Química Hoy*, vol. 4, no. 2, pp. 42–53, 2014.
- 18 E. Schrader, K. Hirsch-Ernest, E. Scholz, G. F. Kahl, and H. Foth, "Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanonen (NNK) in primary cultures of rat alveolar type II cells," *Drug Metab. Dispos.*, vol. 28, no. 2, pp. 180–185, 2000.
- 19 Q. Ren, S. E. Murphy, and Z. Zheng, "O -Glucuronidation of the lung carcinogen 4- (methylnitrosamino) -1- (3-pyridyl) -1-butanol (NNAL) By human UDP-Glucuronosyltransferases 2B7 and 1A9," vol. 28, no. 11, pp. 1352–1360, 2000.

- 20 D. Wiener, D. R. Doerge, J. Fang, P. Upadhyaya, and P. Lazarus, "Characterization of n- glucuronidation of the lung carcinogen 4- (methylnitrosamino) -1- (3-pyridyl) -1-butanol (NNAL) in human liver: Importance of UDP-Glucuronosyltransferase 1A4," *Drug Metab. Dispos.*, vol. 32, no. 1, pp. 72–79, 2004.
- 21 K. a Shah and H. T. Karnes, "A review of the analysis of tobacco-specific nitrosamines in biological matrices.," *Crit. Rev. Toxicol.*, vol. 40, no. 4, pp. 305–327, Apr. 2010.
- 22 G. D. Byrd and M. W. Ogden, "Liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for the determination of the tobacco-specific nitrosamine metabolite NNAL in smokers' urine.," *J. Mass Spectrom.*, vol. 38, no. 1, pp. 98–107, Jan. 2003.
- 23 S. G. Carmella, X. Ming, N. Olvera, C. Brookmeyer, A. Yoder, and S. S. Hecht, "High throughput liquid and gas chromatography-tandem mass spectrometry assays for tobacco-specific nitrosamine and polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites associated with lung cancer in smokers.," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 26, no. 8, pp. 1209–17, Aug. 2013.
- 24 S. G. Carmella, S. Akerkar, and S. S. Hecht, "Metabolites of the Tobacco-specific Nitrosamine 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in Smokers' Urine," *Cancer Res.*, vol. 53, no. 4, pp. 721–724, Feb. 1993.
- 25 I. Stepanov, S. S. Hecht, G. Duca, and I. Mardari, "Uptake of the tobacco-specific lung carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by Moldovan children.," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 15, no. 1, pp. 7–11, Jan. 2006.
- 26 J. T. Bernert, R. B. Jain, J. L. Pirkle, L. Wang, B. B. Miller, and E. J. Sampson, "Urinary tobacco-specific nitrosamines and 4-aminobiphenyl hemoglobin adducts measured in smokers of either regular or light cigarettes.," *Nicotine Tob. Res.*, vol. 7, no. 5, pp. 729–38, Oct. 2005.

- 27 R. D. Voyksner, J. R. Hass, and M. M. Bursey, "Comparison of Gas Chromatography / High-Resolution Mass Spectrometry and Mass Spectrometry / Mass Spectrometry for Detection of Polychlorinated Biphenyls and Tetrachlorodibenzofuran," *Anal. Chem.*, vol. 55, pp. 744–749, 1983.
- 28 S. G. Carmella, S. Han, A. Fristad, Y. Yang, and S. S. Hecht, "Analysis of Total 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanol (NNAL) in Human Urine," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 12, no. 11, pp. 1257–1261, Nov. 2003.
- 29 R. Van Orden, "Advantages and Disadvantages of High-end Mass Spectrometry in a Toxicology Lab," *Advantages and disadvantages of High-end mass spectrometry in a Toxicology lab.*, 2013. [Online]. Available: http://www.chem.agilent.com/Library/slidepresentation/Public/Advantages_disadvantages_of_High-end_MS_in_Toxicology_Lab.pdf.
- 30 H. Hou, Z. Xiaotao, T. Yongfeng, T. Gangling, L. Yulan, and H. Qingyuan, "Development of a method for the determination of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in urine of nonsmokers and smokers using liquid chromatography/tandem mass spectrometry.," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 63, pp. 17–22, Apr. 2012.
- 31 B. Xia, Y. Xia, J. Wong, K. J. Nicodemus, M. Xu, J. Lee, T. Guillot, and J. Li, "Quantitative analysis of five tobacco-specific N-nitrosamines in urine by liquid chromatography-atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry.," *Biomed. Chromatogr.*, vol. 28, no. 3, pp. 375–84, Mar. 2014.
- 32 L. Yao, S. Zheng, Y. Guan, J. Yang, B. Liu, W. Wang, and X. Zhu, "Development of a rapid method for the simultaneous separation and determination of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol and its N- and O-glucuronides in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.," *Anal. Chim. Acta*, vol. 788, pp. 61–7, Jul. 2013.

- 33 S. S. Hecht, S. G. Carmella, S. E. Murphy, S. Akerkar, K. D. Brunnemann, and D. Hoffmann, "A tobacco-specific lung carcinogen in urine of men exposed to cigarette smoke.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 329, no. 21, pp. 1543–1546, 1993.
- 34 S. Murphy, S. Carmella, A. Idris, and D. Hoffmann, "Uptake and metabolism of carcinogenic levels of tobacco-specific nitrosamines by Sudanese snuff dippers," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 3, no. 5, pp. 423–428, Jul. 1994.
- 35 S. Carmella, S. Akerkar, J. J. Richie, and S. Hecht, "Intraindividual and interindividual differences in metabolites of the tobacco-specific lung carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in smokers' urine," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 4, no. 6, pp. 635–642, Sep. 1995.
- 36 L. A. Kresty, S. G. Carmella, A. Borukhova, S. A. Akerkar, R. Gopalakrishnan, R. E. Harris, G. D. Stoner, and S. S. Hecht, "Metabolites of a tobacco-specific nitrosamine , urine of smokeless tobacco users: relationship between urinary biomarkers and oral leukoplakia .," *Cancer Epidemiol. biomarkers Prev.*, vol. 5, pp. 521–525, 1996.
- 37 J. J. Richie, S. Carmella, J. Muscat, D. Scott, S. Akerkar, and S. Hecht, "Differences in the urinary metabolites of the tobacco-specific lung carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in black and white smokers," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 6, no. 10, pp. 783–790, Oct. 1997.
- 38 E. Taioli, S. Garbers, H. Bradlow, S. Carmella, S. Akerkar, and S. Hecht, "Effects of indole-3-carbinol on the metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in smokers," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 6, no. 7, pp. 517–522, Jul. 1997.

- 39 W. D. Parsons, S. G. Carmella, S. Akerkar, L. E. Bonilla, and S. S. Hecht, "A metabolite of the tobacco-specific lung carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in the urine of hospital workers exposed to environmental tobacco smoke.," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 7, no. 3, pp. 257–60, Mar. 1998.
- 40 S. S. Hecht, S. G. Carmella, M. Chen, J. F. D. Koch, A. T. Miller, S. E. Murphy, J. A. Jensen, C. L. Zimmerman, and D. K. Hatsukami, "Quantitation of Urinary Metabolites of a Tobacco-specific Lung Carcinogen after Smoking Cessation Quantitation of Urinary Metabolites of a Tobacco-specific Lung Carcinogen after," pp. 590–596, 1999.
- 41 G. M. Lackmann, U. Salzberger, U. Töllner, M. Chen, S. G. Carmella, and S. S. Hecht, "Metabolites of a tobacco-specific carcinogen in urine from newborns.," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 91, no. 5, pp. 459–65, Mar. 1999.
- 42 K. E. Anderson, S. G. Carmella, M. Ye, R. L. Bliss, C. Le, L. Murphy, and S. S. Hecht, "Metabolites of a Tobacco- Specific Lung Carcinogen in Nonsmoking Women Exposed to Environmental Tobacco Smoke," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 93, no. 5, pp. 5–8, 2001.
- 43 S. S. Hecht, M. Ye, S. G. Carmella, A. Fredrickson, J. L. Adgate, I. A. Greaves, T. R. Church, A. D. Ryan, S. J. Mongin, and K. Sexton, "Metabolites of a Tobacco-specific Lung Carcinogen in the Urine of Elementary School-aged Children," *Cancer Epidemiol. biomarkers Prev.*, vol. 10, pp. 1109–1116, 2001.
- 44 S. G. Carmella, K. Le, P. Upadhyaya, and S. S. Hecht, "Analysis of N - and O -Glucuronides of 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) in Human Urine," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 15, no. 4, pp. 545–550, Apr. 2002.

- 45 S. S. Hecht, S. G. Carmella, M. Ye, K. Le, J. A. Jensen, C. L. Zimmerman, and D. K. Hatsukami, "Quantitation of Metabolites of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone after Cessation of Smokeless Tobacco Use," *Cancer Res.*, vol. 62, pp. 129–134, 2002.
- 46 S. E. Murphy, C. A. Link, J. Jensen, C. Le, S. S. Puumala, S. S. Hecht, S. G. Carmella, L. Losey, and D. K. Hatsukami, "A Comparison of Urinary Biomarkers of Tobacco and Carcinogen Exposure in Smokers," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 13, no. 10, pp. 1617–1623, Oct. 2004.
- 47 Y. Xia, J. E. McGuffey, S. Bhattacharyya, B. Sellergren, E. Yilmaz, L. Wang, and J. T. Bernert, "Analysis of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in urine by extraction on a molecularly imprinted polymer column and liquid chromatography/atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 23, pp. 7639–45, Dec. 2005.
- 48 S. S. Hecht, S. G. Carmella, K.-A. Le, S. E. Murphy, A. J. Boettcher, C. Le, J. Koopmeiners, L. An, and D. J. Hennrikus, "4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol and its glucuronides in the urine of infants exposed to environmental tobacco smoke," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 15, no. 5, pp. 988–92, May 2006.
- 49 G. Scherer, J. Engl, M. Urban, G. Gilch, D. Janket, and K. Riedel, "Relationship between machine-derived smoke yields and biomarkers in cigarette smokers in Germany," *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 47, no. 2, pp. 171–183, 2007.
- 50 S. S. Hecht, S. G. Carmella, S. E. Murphy, W. T. Riley, C. Le, X. Luo, M. Mooney, and D. K. Hatsukami, "Similar exposure to a tobacco-specific carcinogen in smokeless tobacco users and cigarette smokers," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 16, no. 8, pp. 1567–72, Aug. 2007.

- 51 P. Jacob, C. Havel, D.-H. Lee, L. Yu, M. D. Eisner, and N. L. Benowitz, "Subpicogram per milliliter determination of the tobacco-specific carcinogen metabolite 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in human urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry.," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 21, pp. 8115–21, Nov. 2008.
- 52 D. Kavvadias, G. Scherer, M. Urban, F. Cheung, G. Errington, J. Shepperd, and M. McEwan, "Simultaneous determination of four tobacco-specific N-nitrosamines (TSNA) in human urine.," *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 877, no. 11–12, pp. 1185–92, Apr. 2009.
- 53 D. L. Ashley, R. J. O'Connor, J. T. Bernert, C. H. Watson, G. M. Polzin, R. B. Jain, D. Hammond, D. K. Hatsukami, G. A. Giovino, K. M. Cummings, A. McNeill, L. Shahab, B. King, G. T. Fong, L. Zhang, Y. Xia, X. Yan, and J. M. McCraw, "Effect of differing levels of tobacco-specific nitrosamines in cigarette smoke on the levels of biomarkers in smokers.," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 19, no. 6, pp. 1389–98, Jun. 2010.
- 54 S. H. Bhat, S. L. Gelhaus, C. Mesaros, A. Vachani, and I. A. Blair, "A new liquid chromatography / mass spectrometry method for 4- (methylnitrosamino) -1- (3-pyridyl) -1-butanol (NNAL) in urine," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 25, no. September 2010, pp. 115–121, 2011.
- 55 K. A. Shah, M. C. Peoples, M. S. Halquist, S. C. Rutan, and H. T. Karnes, "Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Microfluidic direct injection method for analysis of urinary imprinted polymers coupled on-line with LC – MS / MS," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 54, no. 2, pp. 368–378, 2011.
- 56 H. Hou, X. Zhang, Y. Tian, G. Tang, Y. Liu, and Q. Hu, "Development of a method for the determination of 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in urine of nonsmokers and smokers using liquid chromatography/tandem mass spectrometry," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 63, pp. 17–22, 2012.

- 57 S. G. Carmella, X. Ming, N. Olvera, C. Brookmeyer, A. Yoder, and S. S. Hecht, "High Throughput Liquid and Gas Chromatography – Tandem Mass Spectrometry Assays for Tobacco-Specific Nitrosamine and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolites Associated with Lung Cancer in Smokers," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 26, pp. 1209–1217, 2013.
- 58 R. M. Smith, "Before the injection — modern methods of sample preparation for separation techniques," *J. Chromatogr. A*, vol. 1000, pp. 3–27, 2003.
- 59 H. Kataoka, "New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 22, no. 4, pp. 232–244, 2003.
- 60 IUPAC, *Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book")*. Oxford, 2006.
- 61 L. Nováková and H. Vlcková, "A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation.," *Anal. Chim. Acta*, vol. 656, no. 1–2, pp. 8–35, Dec. 2009.
- 62 K. E. Anderson, J. Kliris, L. Murphy, S. G. Carmella, S. Han, C. Link, R. L. Bliss, S. Puumala, S. E. Murphy, and S. S. Hecht, "Metabolites of a Tobacco-Specific Lung Carcinogen in Nonsmoking Casino Patrons," *Cancer Epidemiol. biomarkers Prev.*, vol. 12, pp. 1544–1546, 2003.
- 63 C. Yagüe, S. Bayarri, R. Lázaro, P. Conchello, A. Ariño, and A. Herrera, "Multiresidue Determination of Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in Milk by Gas Chromatography with Electron-Capture Detection after Extraction by Matrix Solid-Phase Dispersion," *J. AOAC Int.*, vol. 84, no. 5, pp. 1561–1568, 2001.

- 64 K. A. Shah, M. S. Halquist, and H. T. Karnes, "A modified method for the determination of tobacco specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in human urine by solid phase extraction using a molecularly imprinted polymer and liquid chromatography tandem mass spectrometry," *J. Chromatogr. B*, vol. 877, no. 14, pp. 1575–1582, 2009.
- 65 M. Rezaee, Y. Assadi, M.-R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, and S. Berijani, "Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction.," *J. Chromatogr. A*, vol. 1116, no. 1–2, pp. 1–9, May 2006.
- 66 Q.-H. Wu, M.-Y. Zhang, X.-H. Zang, G.-H. Xi, and Z. Wang, "Developments of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Technique," *Chinese J. Anal. Chem.*, vol. 37, no. 2, pp. 161–168, Feb. 2009.
- 67 T. Tolcha, Y. Merdassa, and N. Megersa, "Low-density extraction solvent based solvent-terminated dispersive liquid-liquid microextraction for quantitative determination of ionizable pesticides in environmental waters.," *J. Sep. Sci.*, vol. 36, no. 6, pp. 1119–27, Mar. 2013.
- 68 M. A. Farajzadeh, S. E. Seyedi, M. S. Shalamzari, and M. Bamorowat, "Dispersive liquid-liquid microextraction using extraction solvent lighter than water.," *J. Sep. Sci.*, vol. 32, no. 18, pp. 3191–200, Sep. 2009.
- 69 M. E. Pitarch Arquimbau, "Desarrollo de metodología analítica para la determinación de plaguicidas organofosforados y organoclorados en muestras biológicas humanas." Universitat Jaume I, 13-Feb-2004.
- 70 "peak resolution in chromatography, R_s ," in *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, Research Triangle Park, NC: IUPAC.

- 71 "Chromatography/ Physical Test," in *USP 37 NF 32*, Baltimore, Maryland, USA: United Book Press, Inc., 2014.
- 72 "resource-centerchromatography-calculationssystem-suitability-calculations | <https://www.separations.us.tosohbioscience.com>." [Online]. Available: <https://www.separations.us.tosohbioscience.com/service--support/technical-support/resource-center/chromatography-calculations/system-suitability-calculations>. [Accessed: 04-Jul-2017].
- 73 Food And Drug Administration, "Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation," *U.S. Department of Health and Human Services*, 2013. [Online]. Available: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm368107.pdf>. [Accessed: 08-Jun-2015].
- 74 J. Zhou, R. Bai, and Y. Zhu, "Determination of four tobacco-specific nitrosamines in mainstream cigarette smoke by gas chromatography / ion trap mass spectrometry," *Rapid Communication Mass Spectrom.*, vol. 21, pp. 4086–4092, 2007.
- 75 M. Sleiman, R. L. Maddalena, L. a Gundel, and H. Destailats, "Rapid and sensitive gas chromatography-ion-trap tandem mass spectrometry method for the determination of tobacco-specific N-nitrosamines in secondhand smoke.," *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, no. 45, pp. 7899–7905, Nov. 2009.
- 76 Agilent, "GC y GC/MS," 2014.
- 77 Y. Xia, J. E. McGuffey, S. Bhattacharyya, E. Yilmaz, L. Wang, and J. T. Bernert, "Analysis of the Tobacco-Specific Nitrosamine 4- (Methylnitrosamino) -1- (3-pyridyl) -1-butanol in Urine by Extraction on a Molecularly Imprinted Polymer Column and Liquid Chromatography / Atmospheric Pressure Ionization Tandem Mass Spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 23, pp. 7639–7645, 2005.

- 78 EPA, "Method 8000D Determinative chromatographic separations," 2014.
- 79 L. Yao, J. Yang, Y. Guan, B. Liu, S. Zheng, W. Wang, X. Zhu, and Z. Zhang, "Development, validation, and application of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in human hair.," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 404, no. 8, pp. 2259–66, Nov. 2012.
- 80 W. M. Mullett, K. Levsen, R. Borlak, J. Wu, and J. Pawliszyn, "Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled with HPLC for the Determination of N-Nitrosamines in Cell Cultures," *Anal. Chem.*, vol. 74, no. 7, pp. 1695–1701, 2002.
- 81 "Diseños de Plackett-Burman." [Online]. Available: <http://support.minitab.com/es-mx/minitab/17/topic-library/modeling-statistics/doe/factorial-designs/plackett-burman-designs/>. [Accessed: 13-Jan-2016].
- 82 Sulpelco, "Bulletin 910, Guide to Solid Phase Extraction," Sigma-Aldrich Co., 1998, p. 12.
- 83 Waters, "Sep Pack." [Online]. Available: http://www.waters.com/waters/es_ES/Sep-Pak-SPE/nav.htm?cid=513158&locale=es_ES. [Accessed: 23-Jun-2016].
- 84 N. J. K. Simpson, Ed., *Solid-Phase Extraction. Principles, techniques, and Applications*. New York, N.Y., USA: Marcel Dekker, 2000.

- 85 L. Wang, C. Yang, Q. Zhang, S. Wang, H. Lang, S. Zhang, W. Zhao, and J. Zhang, "SPE-HPLC-MS/MS method for the trace analysis of tobacco-specific *N*-nitrosamines and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol in rabbit plasma using tetraazacalix[2]arene[2]triazine-modified silica as a sorbent," *J. Sep. Sci.*, vol. 36, no. 16, pp. 2664–2671, Aug. 2013.
- 86 Waters, "Sep-Pak Cartridges. Pioneering a Revolution in Modern Sample Preparation." Waters, p. 14, 2013.
- 87 O. Shimelis, A.-K. Wilhborg, C. Aurand, and A. Trinh, "Trace Level Analysis of NNAL in Urine Using SupelMIP™ SPE – NNAL and LC-MS-MS," *Reporter US Volume 25*. [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/reporter-us/trace-level-analysis.html>. [Accessed: 23-Jun-2016].
- 88 N. Ramírez, M. Z. Ozel, A. C. Lewis, R. M. Marcé, F. Borrull, and J. F. Hamilton, "Determination of nicotine and *N*-nitrosamines in house dust by pressurized liquid extraction and comprehensive gas chromatography--nitrogen chemiluminiscence detection.," *J. Chromatogr. A*, vol. 1219, pp. 180–7, Jan. 2012.
- 89 J. Y. Kim, S. I. Suh, M. K. In, and B. C. Chung, "Gas Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometric Method for Determination of Methamphetamine and its Major Metabolite Amphetamine in Human Hair," *J. Anal. Toxicol.*, vol. 29, no. August, pp. 370–375, 2005.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Magdalena Escobar Saucedo

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Química Biomédica

Tesis: **DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE METABOLITOS DEL TABACO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.**

Área de estudio: **Química Analítica.**

Biografía:

Nacida en Monterrey Nuevo León el día 1 de Julio de 1983, hija de Manuel Escobar Martínez y Francisca Saucedo Cruz.

Estudios realizados:

Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Químico Farmacéutico Biólogo en 2005.

Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Maestro en Ciencias con Orientación en Química Biomédica en 2009.

Experiencia profesional.

Personal profesional no docente de Tiempo Completo de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 2008 a la fecha.

*The whole of science is nothing more than a
refinement of everyday thinking.*

Albert Einstein