

Aplicación de Diseños de Experimentos en la Optimización de un Método por Microextracción en fase Sólida-Espacio de Cabeza para la Determinación del 4- Metilnitrosamino) -1-(3-Piridil)-1-Butanol (NNAL) en Muestras de Orina.

Magdalena Escobar-Saucedo^a, Noemí Waksman Minsky^a, Ma. de la Luz Salazar-Cavazos^a, Rocío Castro Ríos^a, Augusto Rojas Martínez^b, J. Ricardo Lucio-Gutiérrez^{a*}

^aUniversidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Medicina, Departamento de Química Analítica, CP 64460, Monterrey, Nuevo León, México.

^bTecnológico de Monterrey, School of Medicine and Health Sciences. Monterrey, Mexico.

*jrlucio@yahoo.com

Resumen

Se desarrolló un método de microextracción en fase sólida modalidad headspace (HS-SPME) seguido de un análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas para la determinación de NNAL en muestras de orina. Se probaron cuatro fibras comerciales para el desarrollo del método de SPME, se observó que la fibra de Divinilbenceno-Polidimetilsiloxano de 65 µm presentó un mejor desempeño de extracción. Los parámetros que afectan el desempeño del proceso de la SPME fueron evaluados con la ayuda de diseños de experimentos, tanto Plackett- Burman (PB) así como Diseños Simplex. Las variables estudiadas del proceso de extracción fueron el volumen de muestra, adición de sal, adición de solvente orgánico, velocidad de agitación, temperatura de extracción, tiempo de extracción y tiempo de pre-equilibrio. Las variables que presentaron influencia en el proceso de extracción fueron el tiempo de extracción, el volumen de muestra y la adición de metanol como solvente orgánico. El método desarrollado presentó un 6.7 % DER, por lo que la precisión mostrada es aceptable.

Palabras Clave: GC-MS, NNAL, SPME, orina, tabaco.

Abstract

A gas chromatography-mass spectrometry headspace-solid phase microextraction (HS-SPME-GC-MS) method was developed for the NNAL determination in urine samples. Four commercial fibers were tested for the development of the SPME method, it was observed that the 65 µm divinylbenzene-polydimethylsiloxane (DVB-PDMS) fiber showed a better extraction performance. The parameters that affect the performance of the SPME process were evaluated with the aid of experimental designs, both Plackett-Burman (PB) and Simplex Designs. The studied variables of the extraction process were sample volume, salt addition, organic solvent addition, stirring speed, extraction temperature, extraction time and pre-equilibrium time. The variables that influenced the extraction process were extraction time, sample volume and addition of methanol as organic solvent. The developed method presented acceptable precision with a 6.7% DER.

Key words: GC-MS, NNAL, SPME, urine, tobacco.

1. Introducción.

El uso del tabaco es un problema prioritario tanto en los países desarrollados como en vías de desarrollo. Actualmente se conoce que el tabaco es el único producto de consumo legal que puede dañar a todos los que se exponen a él y disminuye en 15 años la esperanza de vida. 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[1].

En México en el año de 2010, fallecieron alrededor de 60 mil personas a causas atribuibles al tabaco [2]. Según la Encuesta Nacional de Adicciones 2011, en México hay 17.3 millones de fumadores, lo que representa un 21.7 % de prevalencia del consumo activo de tabaco, así mismo, 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 y que están expuestos al HTA y los efectos de est[3].

Alrededor del 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[1], [3]. 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, en los últimos años las investigaciones se han centrado en la búsqueda de marcadores biológicos de exposición al tabaco. Los cuales permiten conocer la prevalencia del consumo del tabaco, verificar la exposición al humo de primera o segunda mano, así como constatar si un tratamiento se cumple correctamente[4].

Dentro de los candidatos a ser empleados como marcadores biológicos de exposición al tabaco, se encuentran las nitrosaminas específicas del tabaco (TSNA, por sus siglas en inglés), las cuales se generan durante la fermentación, el curado y el añejamiento de la hoja de tabaco; y su única fuente son los productos de tabaco[5], [6]. Las TSNA son altamente cancerígenas y están clasificadas en los grupos 1 o 3 de la Agencia Internacional para la investigación de Cáncer (IARC)[7]. La formación de estos compuestos se lleva a cabo por la nitrosación, ya sea de, amins terciarias previa hidrólisis como la nicotina o amins secundarias



como: nornicotina, anabasina, anatabina, presentes en el tabaco, produciendo diferentes nitrosaminas[6], [7].

La principal nitrosamina derivada de la nicotina es la 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona, llamada también NNK cuya estructura se muestra en la Figura 1. La NNK es un procarcinógeno que requiere activación metabólica para ejercer su efecto tumorigeno, mediante cualquiera de las siguientes tres rutas: reducción del grupo carbonilo, N-oxidación o la α -hidroxilación del anillo de piridina[8]. 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 o NNAL, en la Figura 1 se muestra su estructura. El NNAL libre presenta niveles séricos muy bajos, ya que es un sustrato de la enzima UDP-glucosil transferasa que lo transforma en conjugados del ácido glucurónico (NNAL-Glu), los cuales pueden formarse tanto en el grupo carbinol del NNAL (NNAL-O-Glu) como en el Nitrógeno del anillo de piridina (NNAL-N-Glu), siendo depurados rápidamente por el organismo mediante excreción por la orina-[8][10].

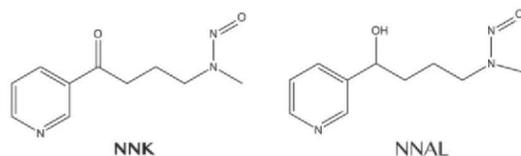


Figura 1.- Estructura del NNK y del NNAL.

Para la determinación de NNAL en orina se han reportado diferentes métodos, los cuales involucran etapas de extracción, limpieza del extracto y análisis cromatográfico. Las técnicas de preparación de muestras más utilizadas para el análisis de NNAL y sus conjugados son: la extracción líquido-líquido (LLE), la extracción en fase sólida (SPE) y la extracción en fase sólida utilizando polímeros molecularmente impresos (MIP-SPE). Cada una de estas técnicas presenta características de interés, así como desventajas. La LLE 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, requiere múltiple manipulación de la muestra, puede consumir mucho tiempo y utiliza grandes cantidades de solventes orgánicos potencialmente tóxicos, lo que conlleva a la producción de grandes volúmenes de residuos tóxicos [11]. La SPE presenta algunas ventajas sobre las extracciones convencionales y limpieza son: mayor reproducibilidad, empleo de menores volúmenes de solventes, rapidez, versatilidad, costos menores, posibilidad de automatización y obtención de extractos libres de interferencias[12]. Por otro lado, los polímeros molecularmente impresos (MIP) son materiales sintéticos cuya principal ventaja es la posibilidad de preparar una fase extractante selectiva para la extracción de un predeterminado analito o un grupo de analitos en muestras complejas[11]. Otra técnica de preparación de muestra es la microextracción en fase sólida (SPME), la cual es un proceso de extracción no exhaustivo basado en el establecimiento del equilibrio de partición entre la

matriz y la fase extractante. En esta técnica el proceso de extracción, purificación y concentración se realiza en un solo paso y surge por la tendencia al desarrollo de nuevas tecnologías que permitan aumentar el número de muestras analizadas, así como disminuir la cantidad de muestra requerida, el tiempo de análisis, el costo por análisis y la cantidad de residuos generados por los métodos bioanalíticos actuales. Se ha encontrado solo un reporte de la aplicación de la SPME para la determinación de TSNAs, donde se utilizó la modalidad de SPME en tubo acoplada en línea con un análisis por HPLC [13]. No se ha reportado anteriormente el uso de SPME por headspace para el análisis de NNAL en muestras de orina, por lo que aprovechando la existencia de fibras de una amplia gama de polaridades y dada la naturaleza semivolátil del NNAL, se plantea que la SPME podría ser una alternativa para realizar la determinación de este analito. Debido a que la orina es una matriz compleja para las fibras de SPME, la modalidad de extracción por espacio de cabeza (HS) parece ser la alternativa conveniente.

Las técnicas cromatográficas empleadas para el análisis del NNAL son: cromatografía de gases con analizador de energía térmica (GC-TEA)[14]-[15], cromatografía de gases con detector de masas selectivas (GC-MSD)[16], cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS)[17] y la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS)[18]. 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) [14]. 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 [19]; 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[15]. 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, donde se han reportado límites de detección de 0.6 pg mL⁻¹[16],[20]; mientras que la GC-MS/MS, a pesar de tener límites de detección mejores que GC-TEA, se ha utilizado principalmente para la confirmación de los picos cromatográficos ya que los costos de adquisición del equipo son elevados[17]. 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 que permite la determinación de un mayor número de muestras y la separación de los analitos se alcanza en un menor tiempo. Además, la HPLC-MS/MS requiere una preparación de muestra simple y, al operar en modo de monitoreo de reacción múltiple, posee buena sensibilidad y selectividad. Sin embargo, presenta la desventaja de la posible supresión iónica de las muestras que podría llevar a la mala cuantificación de las mismas[18].



En el presente trabajo se desarrolló un método de microextracción en fase sólida en modalidad de espacio de cabeza (HS-SPME) para la determinación del 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol (NNAL) y posterior análisis mediante el empleo de un cromatógrafo de gases acoplado con un detector de masas selectivas de baja resolución, con el objetivo de proponer un método accesible a la mayoría de los laboratorios.

2. Parte experimental.

2.1 Equipos

Las muestras de orina y las soluciones madre de los estándares se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un congelador Cool-Lab 120 V, de Thermo Scientific. Para homogenizar las soluciones de trabajo, se utilizó un agitador tipo vortex, Modelo Maxi Mix II de ThermoScientific.. El baño con temperatura controlada, Haake C1, se utilizó para montar el dispositivo de extracción para realizar la HS-SPME, también se se empleó una placa de calentamiento y agitación, Corning, Modelo PC-420D para mantener la agitación constante durante la HS-SPME. Para los diseños de experimentos, se utilizó un equipo de cómputo con el programa Modde v8.0 de Umetrics. Para el análisis cromatográfico se utilizó un cromatógrafo de gases, Agilent 6890 N equipado con inyector split/ splitless y detector selectivo de masas 5973 inert. La separación se realizó con una columna Agilent DB-17MS de 0.25 mm de diámetro interno y 30 m de longitud con un espesor de fase de 0.25 μm . El equipo cuenta con un PC con el software Chemstation para realizar la integración y manejo de datos cromatográficos.

2.2 Reactivos y Materiales

Como estándar analítico se empleó el 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanol (NNAL), $\geq 92\%$ de Fluka. El estándar interno consistió de 4-(N-metil-d3)-4-N-nitrosamino)-4-(3-piridil)-1-butanol (iso-NNAL-d3), grado estándar de Toronto Research Chemicas Inc. Para la preparación de un buffer pH 6.4 se utilizó ácido fosfórico 85 % p/p, Grado ACS de Sigma Aldrich; hidróxido de amonio 28- 30 % p/p marca Halmeck y agua bidestilada plus, obtenida de Laboratorio Monterrey. Como solventes de trabajo se utilizaron el metanol $> 99.8\%$, UltraResi-analized® de J.T.Baker; acetonitrilo, grado pesticida de Fisher Chemicals. Se utilizaron viales de vidrio de 15 mL con tapón de rosca y septa de PTFE y silicón, agitadores magnéticos de 1 cm de longitud, termómetro de -10 a $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, jeringas de 10, 25, 50, 100, 250 y 500 μL , marca Agilent y material de vidrio diverso. Las fibras para SPME que se probaron fueron: Carboxen-Polidimetilsiloxano 75 μm , Divinilbenceno-Polidimetilsiloxano (DVB-PDMS) de 65 μm y Divinilbenceno-Carboxen- Polidimetilsiloxano (DVB-CAR-PDMS) 50-30 μm y Poliácrlato 85 μm , de Supelco. Además se utilizó un portafibras para inyección manual de Supelco.

2.3 Preparación de estándares.

Se preparó una solución madre del estándar analítico (NNAL) y una solución madre del estándar interno (iso-NNAL d3), ambas en metanol y con una concentración final de 1 mg mL^{-1} . A partir de la solución madre de cada estándar se preparó, para cada compuesto, una solución intermedia en metanol a una concentración de $10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. disponible en línea:

Las soluciones se almacenaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Para la evaluación de los parámetros de validación del sistema cromatográfico, de la solución intermedia se prepararon 9 estándares con concentraciones de 0.05 a $5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ con una adición de $0.1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ del estándar interno en metanol.

2.4 Preparación de muestra

Para la selección de la fibra de SPME y para la optimización de la desorción, se utilizó una solución estándar preparada por la adición a 10 mL de una solución de fosfato de amonio diácido 50 mM y pH 6.4, 40 μL de una solución estándar de NNAL de 1 mg mL^{-1} y 10 μL de una solución estándar de iso-NNAL-d3 de 1 mg mL^{-1} , para obtener una concentración final de $4\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ y $1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. Para la optimización de la extracción se utilizó orina de no fumadores ajustada a pH 6.4, mediante la adición de ácido fosfórico 15 M e hidróxido de amonio 15 M, adicionada a una concentración de $4\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ de NNAL y $1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ de iso-NNAL-d3.

2.5 Análisis Cromatográfico.

Se aplicó un programa de temperaturas en el horno de la columna, como se describe a continuación: la temperatura inicial fue de $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo por 1 minuto, posteriormente se incrementó la temperatura a $15\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo por 12 minutos, después se aumentó hasta $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ y se mantuvo por 5 min y finalmente se incrementó la temperatura a $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta $290\text{ }^{\circ}\text{C}$ y mantuvo por 7 minutos. Como gas acarreador se usó helio a un flujo de 1 mL min^{-1} . La adquisición de los datos se realizó en modo de monitoreo de ion selectivo (SIM); haciendo un seguimiento de los iones 148 y 108 m/z para el NNAL y los iones 117 y 150 m/z para el iso-NNAL-d3. Para validar el sistema cromatográfico se siguió las recomendaciones del método 8000D de la EPA[21], y se evaluó:

Linealidad.

Se construyó una curva de calibración a 9 niveles de concentración en un intervalo de concentración de 0.05 a $5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, por triplicado. 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).

Precisión. Ecuación 1 La precisión intradía del sistema cromatográfico se evaluó mediante el cálculo de la desviación estándar relativa (% DER) de la relación de las áreas de de los estándares bajo, medio y alto analizados por triplicado, utilizando la ecuación 1. El criterio de aceptación fue una % DER menor al 10 %.

$$\% \text{ DER} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:
s= Desviación estándar
x= Media aritmética

Exactitud.

Para establecer la exactitud, se realizó un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados para la concentración calculada frente la concentración real. La aceptación de la exactitud se basó en el valor del coeficiente de determinación (r^2) superior a 0.99 y el valor de la pendiente cercano a 1. 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 2.

Ecuación 2

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

Límite de detección y Límite de cuantificación

Se realizaron experimentalmente: para el límite de detección se inyectaron por duplicado soluciones estándares de concentración decreciente y se estableció como la concentración más baja que nos diera señal analítica. En el caso de límite de cuantificación se inyectó por quintuplicado soluciones de $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$ y se determinó el %DER el cual debería ser menor a un 20 %.

2.6 Microextracción en Fase Sólida

2.6.1 Selección de Fibra

Antes de comenzar con los experimentos de optimización de la SPME, se acondicionaron las fibras según las recomendaciones del proveedor[22].

En la selección de la fibra de SPME y la optimización de las condiciones para la desorción, se utilizó una solución estándar preparada en fosfato de amonio diácido 50 mM y pH 6.4, a una concentración de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ y de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NNAL e iso-NNAL-d3, respectivamente. En función de las recomendaciones del fabricante y los reportes en la literatura, se establecieron unas condiciones de partida para comparar el desempeño de las fibras. Las extracciones ($n= 3$) se realizaron a 70°C en modalidad *headspace* y con agitación magnética a 500 revoluciones por minuto (rpm). Se extrajeron 10 mL de muestra con 5 mL de headspace, sin adición de sal o solvente orgánico. El dispositivo de extracción se montó de acuerdo al diagrama que se muestra en la Figura 2. Se introdujo una barra magnética al vial para mantener la muestra en agitación constante; posteriormente, el vial se sumergió completamente, en posición vertical, en el baño de temperatura y se perforó la septa con el portafibras de SPME. Una vez fijada la posición adecuada para la extracción y transcurrido el tiempo de equilibrio, se expuso la fibra por el tiempo de extracción establecido. Al término de la extracción, la fibra fue retraída en el portafibras; para posteriormente exponerla en el inyector del CG, donde se lleva a cabo la desorción a una temperatura de 230°C por 5 minutos.

Utilizando las condiciones anteriores, se seleccionó la fibra que presentó las mayores áreas, los menores valores de % DER y la ausencia de analitos remanentes después de efectuar la limpieza. Una vez seleccionada la fibra, se deben optimizar las condiciones de extracción y desorción.

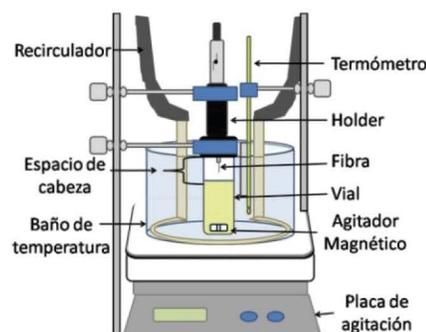


Figura 2.- Montaje del Dispositivo de Extracción por HS-SPME

2.6.2 Optimización del proceso de desorción.

Con la fibra seleccionada, la optimización de la etapa de desorción se realizó mediante un diseño simplex secuencial básico. Dos variables fueron consideradas: temperatura y tiempo de desorción; lo cual originó 3 experimentos de partida, que se presentan en la Tabla 1. Como respuesta se utilizó la suma y la relación de las áreas del NNAL e iso-NNAL-d3. Los nuevos experimentos a realizar durante la optimización, se calcularon aplicando la ecuación 1:

- 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.

Tabla 1 Experimentos iniciales para la optimización del proceso de desorción.

Experimento	Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Tiempo (min)
1	230	3
2	250	3
3	240	5

Se plantearon como condiciones máximas una temperatura de 260°C y un tiempo de 5 min. El diseño se detuvo cuando las nuevas condiciones calculadas presentaron un comportamiento cíclico. Las condiciones de desorción óptimas fueron aquellas que proporcionaron la mayor suma de las áreas del NNAL y del iso-NNAL-d3, la mayor relación de áreas y que además se presentará la mejor forma de los picos cromatográficos en la inspección visual del cromatograma.

2.6.3 Optimización del proceso de extracción.

En esta fase del proceso de la SPME, se utilizó orina de no fumadores ajustada a pH 6.4 y adicionada a una concentración de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NNAL y $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de iso-NNAL-d3. Para el establecimiento de las condiciones óptimas de extracción, primero se aplicó un diseño de Plackett- Burman (PB) de dos niveles y con tres puntos centrales para identificar las variables que influyen en el proceso y posteriormente un diseño simplex para la optimización. Para generar los diseños fue utilizado el programa Modde v11.0 de Umetrics.

Las variables investigadas en el diseño de PB fueron siete: tiempo y temperatura de extracción, tiempo de equilibrio del HS, adición de sal y modificador orgánico (metanol o acetonitrilo), volumen de muestra y velocidad de agitación. Como respuesta se utilizó la relación de áreas del NNAL e iso-NNAL-d3. En la tabla 2 se muestran los experimentos planteados. Utilizando las variables que afectan significativamente la respuesta, las condiciones óptimas se establecieron utilizando la función “optimizer” del programa que, utilizando un diseño tipo simplex, estima la respuesta obtenida a partir de proyecciones de las variables[23]. Para verificar la validez de los resultados obtenidos con los diseños experimentales, se realizaron experimentos por triplicado empleando las condiciones elegidas como óptimas; la respuesta obtenida experimentalmente y la obtenida con el programa deben de ser semejantes.

3 Resultados y discusión.

3.1 Validación del sistema cromatográfico.

Para la validación del sistema cromatográfico se construyeron curvas de calibración con el método de estándar interno, graficando concentración de los estándares vs la relación de áreas del NNAL/iso NNAL d3. La curva construida, no ajusta a una regresión lineal, además de que el coeficiente de determinación (R^2) obtenido fue de 0.956. Al analizar las respuestas del sistema cromatográfico se observó un comportamiento cuadrático de las mismas, este tipo de comportamiento ya se ha observado en los métodos actuales y en el Método 8000D de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (U.S. EPA)[21] se menciona como 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. Se encontró que los datos presentaron buen ajuste a una ecuación de segundo grado ($R^2= 0.997$). La precisión se evaluó con estándares de 0.1, 1 y 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ con valores de 5.90, 4.64 y 3.85 % DER, respectivamente. La curva de recálculo para la evaluación de la exactitud tuvo una regresión lineal con un R^2 de 0.998 y el error estándar relativo fue menor a 24 %. El método fue preciso y exacto, ya que la EPA en el método 8000 D establece un criterio de %DER <30%. 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 Método HS-SPME

3.2.1 Selección de la fibra de SPME.

Siguiendo la metodología descrita en la sección 2.6.1 se comparó el desempeño de las fibras de diferente polaridad disponibles comercialmente, en función de las áreas obtenidas de los analitos. Hasta donde es de nuestro conocimiento, no se ha reportado anteriormente el uso de SPME por Headspace para el análisis de NNAL en muestras de orina. Dada las características fisicoquímicas del NNAL, se probaron las fibras recomendadas para el análisis de compuestos volátiles y semivolátiles: PA, CARBOXEN-PDMS, DVB-PDMS Y CAR-DVB-PDMS. Se escogió la modalidad HS-SPME, ya que proporciona la ventaja de evitar o minimizar el daño de la fibra por componentes de la matriz. Los resultados

obtenidos se muestran en la Figura 3. Se observa que la fibra de DVB-PDMS tiende a obtener mayores áreas para el NNAL respecto al iso-NNAL-d3, mientras la fibra de PA presenta un comportamiento inverso, teniendo mayores áreas para el iso-NNAL-d3. Con la fibra de DVB-PDMS se obtuvieron valores de DER de 16.07% y 21.32% para el NNAL e iso-NNAL-d3, respectivamente. Para la fibra de PA los valores de DER fueron de 31.03% para el NNAL y de 20.98% para el iso-NNAL-d3. Estos porcentajes sugieren que las condiciones de extracción deben de ser optimizadas para la fibra seleccionada. La figura 3 también muestra que las fibras DVB-CAR-PDMS y CARBOXEN-PDMS no extrajeron los analitos en las condiciones ensayadas. El que estas dos fibras no extrajeran los analitos es algo que puede explicarse dada la mezcla de polímeros que presentan en su constitución. Si bien estas fibras están pensadas para el análisis de compuestos a nivel de trazas, las moléculas grandes pueden ser altamente retenidas sobre las superficies y difíciles de desorber.

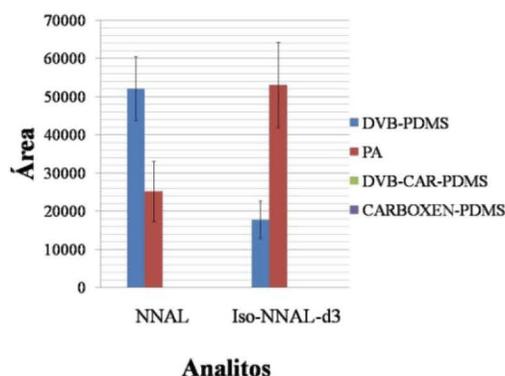


Figura 3.- Representación gráfica del proceso de selección de fibra para el análisis del NNAL, las fibras DVB-CAR-PDMS y CARBOXEN-PDMS no presentaron recuperación del analito y del estándar interno.(n=3)

La fibra de PA está recomendada para la extracción de compuestos polares, quizás esta sea la razón por la que extrajo mejor al estándar interno que al NNAL; también presentó mayor variación en las áreas. La fibra de DVB-PDMS es recomendada para el análisis de compuestos volátiles, aminas y compuestos aromáticos nitrados, lo cual coincide con las características del NNAL; probablemente por ello extrajo mayor cantidad del NNAL que del estándar interno. Así mismo, las variaciones observadas fueron menores para esta fibra que las obtenidas con la fibra de PA. En base a todo lo anterior, se continuó trabajando con la fibra DVB-PDMS.

3.2.2 Optimización del proceso de desorción.

Durante la optimización del proceso de extracción y desorción, se buscó alcanzar las mejores condiciones para maximizar la respuesta. En el caso de la desorción, se establecieron valores mínimos y máximos que podrían adoptar las variables en estudio, para que los experimentos estén dentro de un tiempo razonable y que la temperatura máxima fuera compatible con la soportada por la fibra de DVB-PDMS. Esto es necesario ya que el diseño simplex secuencial básico es un proceso matemático de optimización, que puede

calcular condiciones fuera de las posibilidades experimentales. Por ejemplo, se puede dañar la fibra a temperaturas mayores de 270 °C. Así, la temperatura y el tiempo de desorción se establecieron de 230 a 260 °C y de 3 a 5 minutos, respectivamente. En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en cada uno de los experimentos planteados por el diseño simplex. Después de efectuar el experimento 5, el cálculo de las nuevas condiciones de desorción, generaba valores de las variables por encima de los límites máximos establecidos. A temperaturas superiores de 260 °C se observó que las señales cromatográficas presentaban una degradación en su calidad, lo cual dificulta la integración de los picos cromatográficos y por tanto la obtención de áreas confiables. El experimento 2 fue el único que cumplió las condiciones impuestas, por lo que la temperatura y el tiempo de desorción se establecieron en 250 °C por 3 minutos.

Tabla 2.- Experimentos planteados para la optimización de la desorción y las respuestas obtenidas.

Experimento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Suma áreas	Relación de áreas
1	230	3	30395	0.9744
2	250	3	88928	1.5356
3	240	5	83800	1.2027
4	260	5	165850	0.3893
5	260	3	156003	0.1977

3.2.3 Optimización del proceso de extracción.

Se efectuaron los experimentos planteados por el diseño de PB, que se presentan en la tabla 3. La última columna muestra la variable de respuesta que consistió en la relación de áreas. Aquí se consideró la relación de áreas ya que a mayor relación, mayor respuesta de NNAL se obtenía y una menor señal del iso-NNAL. Una vez efectuados los experimentos y obtenidas las respuestas, estas fueron ingresadas al programa Modde. Se realizó la construcción del modelo matemático, que describe la relación entre los factores y la variable de respuesta, aplicando regresión lineal múltiple (MLR). El valor del porcentaje de variación explicada por el modelo matemático (R^2) fue de 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. Sin embargo, el valor de la varianza para la respuesta predicha mediante validación cruzada (Q^2) fue de -1.615 indicando que el modelo no presenta una buena predicción de nuevos datos. Los resultados obtenidos por MLR son influidos notablemente por efectos no lineales que pudieran presentar las variables. Así, con los mismos datos, se construyó otro modelo utilizando mínimos cuadrados parciales (PLS), ya que esta regresión soporta ligeras desviaciones de la linealidad. Como era de esperarse, el valor de Q^2 mejoró notoriamente. En estas condiciones es necesario eliminar del modelo matemático la variable que afecta negativamente el valor

de Q^2 , en especial si se desea utilizarlo posteriormente en la optimización. Al eliminar la variable de la agitación, se obtuvieron coeficientes R^2 y Q^2 aceptables; incluso con MLR. El modelo matemático construido mediante MLR y descartando la variable se presenta en la ecuación 4.

Tabla 3 Experimentos propuestos para la optimización del proceso de extracción de acuerdo al diseño de Plackett y Burman y las respuestas obtenidas.

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

Ecuación 4

$$\text{Relación de áreas} = 2.47506 + 0.433875(\text{tiempo de extracción}) - 0.145625(\text{tiempo de equilibrio}) - 0.194625(\text{temperatura de extracción}) + 0.238375(\text{Adición de cloruro de sodio}) - 0.443125(\text{Adición de Solvente Orgánico}) + 0.478862(\text{Volumen de muestra})$$

En la figura 4a se presenta el gráfico de coeficientes proporcionado por el programa. Este gráfico permite visualizar las variables con mayor relevancia para predecir la variable de respuesta y también si son estadísticamente significativas. Cabe mencionar que el diseño de PB no permite un análisis completo de las interacciones que se presentan entre las variables (factores)[24]. Se observó que las variables tiempo de extracción, adición de solvente orgánico y volumen de muestra no sólo son significativas para la predicción de la respuesta (los intervalos de confianza no cruzan el valor de cero), también presentan los valores de coeficiente más grandes. Por lo tanto, estas son las variables del proceso de extracción que deben optimizarse.

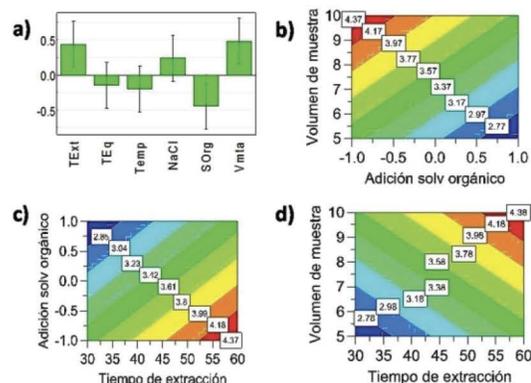


Figura 4 Gráfica de coeficientes de las variables investigadas en la optimización de la extracción. TExt=Tiempo de extracción, TEq=Tiempo de equilibrio, Temp= Temperatura de extracción, NaCl= Adición de cloruro de sodio, SOrg= Adición de solvente orgánico (-1 = Metanol, +1 = acetonitrilo) y Vmta= Volumen de la muestra.

La función “optimizer” utiliza como base el modelo matemático previamente construido, para predecir la respuesta que se obtendría con ciertos valores de los factores escogidos como relevantes. El valor que toman los factores es proporcionado por un método simplex que optimiza una función de deseabilidad global, que combina la deseabilidad individual de cada respuesta [23]. Al aplicar este algoritmo con el objetivo de incrementar la respuesta, se obtuvieron como óptimas las condiciones que se muestran en la Tabla 4. El valor de la agitación, que no fue correctamente descrita por el modelo, y de los factores que no resultaron relevantes para la respuesta, se establecieron a conveniencia del analista.

Las condiciones establecidas como óptimas, fueron congruentes con los resultados sugeridos por el diseño de PB. A partir del gráfico de coeficientes (figura 4a), se puede ver que a mayor tiempo de extracción hubo una mayor respuesta. Esto es coherente con los principios de la SPME; sin embargo, el llegar a las condiciones de equilibrio puede ser un proceso demasiado largo. Por ello, desde un inicio, el tiempo de extracción fue acotado a 60 minutos. Las figuras 4b a 4d muestran los gráficos de contorno con dos factores a la vez; el color rojo indica una mayor respuesta y en azul una menor respuesta en los valores elegidos para cada factor. Estos gráficos concordaron con los resultados de la optimización; para obtener mayor respuesta, el solvente orgánico debe ser metanol, con un volumen de muestra de 10 mL y 60 minutos de extracción.

Tabla 4.- Condiciones de 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

Para comprobar que las condiciones encontradas como óptimas por el diseño experimental son realmente adecuadas para el análisis de muestras de orina, se realizó un análisis por triplicado de muestras adicionadas con los analitos y utilizando las condiciones señaladas en la Tabla 4. La respuesta obtenida de manera experimental fue aceptable, al ser cercana con la respuesta predicha por la función “optimizer”. Así mismo, se calculó la desviación estándar relativa (% DER) de las extracciones efectuadas y se obtuvo una variación del 6.7 %, la cual se consideró aceptable.

4 Conclusiones.

Se desarrolló un método de extracción por HS-SPME para el análisis de NNAL en muestras de orina humana. Este trabajo presenta una primera aproximación al empleo de esta técnica para el análisis de este tipo de

nitrosaminas en muestras biológicas. Hasta el momento no se han encontrado informes del uso de la modalidad de espacio de cabeza por esta técnica de extracción para el análisis de NNAL.

5 Referencias.

1. Organización Mundial de la Salud (OMS), “Informe OMS sobre la epidemia mundial de tabaquismo, 2008: plan de medidas MPOWER,” Francia, 2008.
2. 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.*, 2013, vol. 55, no. 1, pp. 276–281.
3. 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.
4. 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*, 2006, vol. 8, no. 4, pp. 164–173.
5. 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*, 2011, vol. 16, no. 2, pp. 112–119.
6. S. S. Hecht and D. Hoffmann, “Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke,” *Carcinogenesis*, 1988, vol. 9, no. 6, pp. 875–884.
7. 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.
8. E. Schrader, K. Hirsch-Ernest, E. Scholz, G. F. Kahl, and H. Foth, “Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in primary cultures of rat alveolar type II cells,” *Drug Metab. Dispos.*, 2000, vol. 28, no. 2, pp. 180–185.
9. 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,” *Drug Metab. Dispos.*, 2000, vol. 28, no. 11, pp. 1352–1360.
10. 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.*, 2004, vol. 32, no. 1, pp. 72–79.
11. L. Nováková and H. Vlcková, “A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation,” *Anal. Chim. Acta*, 2009, vol. 656, no. 1–2, pp. 8–35.
12. 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.*, 2001, vol. 84, no. 5, pp. 1561–1568.

13. 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.*, 2002, vol. 74, no. 7, pp. 1695–1701.
14. K. a Shah and H. T. Karnes, "A review of the analysis of tobacco-specific nitrosamines in biological matrices.," *Crit. Rev. Toxicol.*, 2010, vol. 40, no. 4, pp. 305–327.
15. 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.*, 2013, vol. 26, no. 8, pp. 1209–1217.
16. 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.*, 2005, vol. 7, no. 5, pp. 729–738.
17. 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.*, 2003, vol. 12, no. 11, pp. 1257–1261.
18. 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.
19. 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.*, 2003, vol. 38, no. 1, pp. 98–107.
20. S. G. Carmella, S. Akerkar, and S. S. Hecht, "Metabolites of the Tobacco-specific Nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-butanone in Smokers' Urine," *Cancer Res.*, 1993, vol. 53, pp. 721–724.
21. "METHOD 8000D - DETERMINATIVE CHROMATOGRAPHIC SEPARATIONS - 8000d.pdf." [Online]. Available: <http://www3.epa.gov/epawaste/hazard/testmethod/s/sw846/pdfs/8000d.pdf>. [Accessed: 15-Jan-2016].
22. "SPME StableFlex™ fiber assortment kit for use with manual holder | Sigma-Aldrich." [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/57550u?lang=es®ion=MX>. [Accessed: 17-Aug-2017].
23. "Analysis advisor, Modde." Umetrics, 2015.
24. "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].