



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica,
Nutrición y Bromatología

**DESARROLLO DE COMBINACIONES
DE TÉCNICAS DE TRATAMIENTO DE
MUESTRA Y PROCESADO DE DATOS
PARA LA SIMPLIFICACIÓN DE
MÉTODOS ANALÍTICOS**

*DEVELOPMENT OF COMBINATIONS OF
SAMPLE TREATMENT AND DATA
PROCESSING TECHNIQUES FOR THE
SIMPLIFICATION OF ANALYTICAL
METHODS*

ANA PÉREZ ANTÓN

2016



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

**DESARROLLO DE COMBINACIONES DE
TÉCNICAS DE TRATAMIENTO DE
MUESTRA Y PROCESADO DE DATOS
PARA LA SIMPLIFICACIÓN DE
MÉTODOS ANALÍTICOS**

*DEVELOPMENT OF COMBINATIONS OF
SAMPLE TREATMENT AND DATA PROCESSING
TECHNIQUES FOR THE SIMPLIFICATION OF
ANALYTICAL METHODS*

ANA PÉREZ ANTÓN

2016



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

**DESARROLLO DE COMBINACIONES DE
TÉCNICAS DE TRATAMIENTO DE MUESTRA Y
PROCESADO DE DATOS PARA LA
SIMPLIFICACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS**
*DEVELOPMENT OF COMBINATIONS OF SAMPLE
TREATMENT AND DATA PROCESSING TECHNIQUES FOR
THE SIMPLIFICATION OF ANALYTICAL METHODS*

Memoria que para optar al Grado de Doctor por la Universidad de
Salamanca presenta la licenciada Ana Pérez Antón.

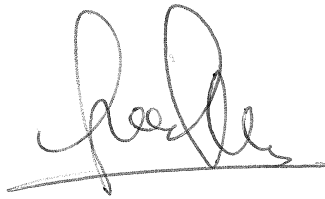
Salamanca, 7 de septiembre de 2016

A handwritten signature in blue ink that reads 'Ana Pérez Antón'.

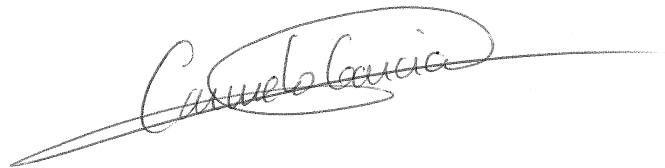
Fdo.: Ana Pérez Antón

D. José Luis Pérez Pavón, Catedrático de Química Analítica de la Universidad de Salamanca, y D. Carmelo García Pinto, Profesor Titular de Química Analítica de la Universidad de Salamanca, ambos directores del trabajo *“Desarrollo de combinaciones de técnicas de tratamiento de muestra y procesado de datos para la simplificación de métodos analíticos”*, realizado por la licenciada Ana Pérez Antón para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, autorizan la presentación del mismo al considerar que se han alcanzado los objetivos inicialmente previstos.

Salamanca, 7 de septiembre de 2016



Fdo.: José Luis Pérez Pavón



Fdo.: Carmelo García Pinto

Deseo expresar mi agradecimiento al Ministerio de Educación por la concesión de una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU, AP2010-0207), al Ministerio de Ciencia e Innovación por la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador (FPI, BES-2011-047848) y por la ayuda adicional otorgada dentro del programa FPU (EST13/00852) para la realización de una estancia breve en un centro de investigación extranjero.

El trabajo realizado ha sido financiado por los proyectos: CTQ2010-17514/BQU, Ministerio de Ciencia e Innovación, CTQ2013-47993/BQU, Ministerio de Economía y Competitividad y SA162U14 y Grupo de Excelencia GR87, Junta de Castilla y León.

El proyecto SILEP (*Supelco Ionic Evaluation Program*) de la casa comercial Supelco a través de Sigma-Aldrich proporcionó las columnas de líquidos iónicos con las que se realizó parte del trabajo recogido en esta memoria.

Además, el trabajo ha sido apoyado por la Convocatoria Doctor TCUE para el apoyo a la finalización de Tesis Doctorales relacionadas con necesidades empresariales, en el marco del Plan TCUE 2015-2017 de la Universidad de Salamanca, cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y la Junta de Castilla y León.

Me gustaría dedicar unas palabras de agradecimiento en primer lugar a los directores de este trabajo, José Luis Pérez Pavón y Carmelo García Pinto, gracias por brindarme la oportunidad de trabajar en vuestro grupo de investigación y confiar en mí para realizar esta tesis con vosotros. Pepe, gracias por tu resolución, empuje y por la seguridad de tu apoyo. Carmelo, siempre serás “mi profesor”, gracias por acompañarme desde mis primeros días en la Universidad.

A Miguel del Nogal Sánchez y Ana María Casas Ferreira, sin quienes una grandísima parte de esta tesis no habría sido posible. Me habéis enseñado mucho y habéis hecho lo indecible para que el trabajo saliese adelante. Quiero agradecer también al resto de miembros del grupo de investigación su gran ayuda y sus consejos.

A todos los miembros del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, por haber sido tan acogedores siempre, por vuestro interés, preocupación, ánimo y cariño. Y como jefe de departamento en mis años de tesis quiero dedicar un especial agradecimiento a Bernardo, gracias por tu preocupación y tu sonrisa tranquilizadora.

Gracias al Dr. Sven Bauman con quien realicé mi estancia de investigación en el centro alemán UFZ en Leipzig por darme la oportunidad de pasar en el laboratorio de Metabolómica tres meses en los que aprendí mucho y viví una experiencia muy enriquecedora.

A todos mis compañeros de laboratorio tanto a los que estaban cuando empecé con la beca de colaboración y me fui reencontrando más adelante como a los que han entrado a lo largo de estos seis años y se

han ido y a los que aún siguen por aquí, a todos vosotros, muchas gracias por compartir conmigo tantos momentos, por vuestros ánimos, vuestra ayuda y vuestra amistad. Habéis sido tantos, he aprendido tanto de cada uno de vosotros y me habéis hecho tanto bien que sin decir vuestro nombre, todos sabéis lo que individualmente quiero deciros en este momento.

Mi recuerdo agradecido también a todos los voluntarios que me han proporcionado muestras para este trabajo.

Y no quiero, ni puedo, olvidarme de todos los que desde fuera, familia y amigos, habéis estado tan cerca, me habéis apoyado tanto y me habéis acompañado todos estos años.

A todos vosotros, ¡gracias!

SIGLAS Y ACRÓNIMOS / ACRONYMS

AAIL	Líquido iónico basado en un aminoácido <i>Amino acid ionic liquid</i>
AcEt	Acetato de etilo <i>Ethyl acetate</i>
ANN	Redes neuronales artificiales <i>Artificial neural network</i>
ANOVA	Análisis de la varianza <i>Analysis of variance</i>
DA	Análisis discriminante <i>Discriminant analysis</i>
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva <i>Dispersive liquid-liquid microextraction</i>
DPS	Mancha de plasma seco <i>Dried plasma spot</i>
DUS	Mancha de orina seca <i>Dried urine spot</i>
μ -ECD	Micro-detector de captura electrónica <i>Micro-electron capture detector</i>
EtOH	Etanol <i>Ethanol</i>
FAME	Ésteres metílicos de ácidos grasos <i>Fatty acid methyl esters</i>
GC	Cromatografía de gases <i>Gas chromatography</i>

GCxGC	Cromatografía multidimensional <i>Comprehensive two dimensional gas chromatography</i>
HCA	Agrupamiento jerárquico <i>Hierarchical cluster analysis</i>
HF-LPME	Microextracción mediante una membrana porosa <i>Hollow fiber liquid-phase microextraction</i>
HILIC	Cromatografía líquida de interacción hidrofílica <i>Hydrophilic interaction liquid chromatography</i>
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución <i>High performance liquid chromatography</i>
HS	Generación de espacio de cabeza <i>Headspace sampling</i>
HTPE	Altura equivalente de un plato teórico <i>Height equivalent to a theoretical plate</i>
IL	Líquido iónico <i>Ionic liquid</i>
IMS	Espectrometría de movilidad iónica <i>Ion- mobility spectrometry</i>
KNN	Método de los k vecinos más próximos <i>k-nearest neighbors algorithm</i>
LLE	Extracción líquido-líquido <i>Liquid-liquid extraction</i>
LOD	Límite de detección <i>Limit of detection</i>
LOQ	Límite de cuantificación <i>Limit of quantification</i>

LPME	Microextracción en fase líquida <i>Liquid-phase microextraction</i>
LVI	Inyección de grandes volúmenes de muestra <i>Large volumen injection</i>
MAE	Extracción con disolventes asistida por microondas <i>Microwave assisted extraction</i>
MALDI	Desorción/ionización mediante láser asistida por una matriz <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MeOH	Metanol <i>Methanol</i>
MEPS	Microextracción con sorbentes empaquetados <i>Microextraction by packed sorbent</i>
MIMS	Introducción a través de membrana en espectrometría de masas <i>Membrane introduction mass spectrometry</i>
MIP	Polímero de impresión molecular <i>Molecularly imprinted polymer</i>
MIRS	Espectroscopía en el infrarrojo medio <i>Mid-infrared spectroscopy</i>
MLR	Regresión lineal múltiple <i>Multiple linear regression</i>
MMC	Cromatografía de modo mixto <i>Mixed-mode chromatography</i>
MS	Espectrometría de masas <i>Mass spectrometry</i>
MWCNT	Nanotubos de carbono con varias paredes <i>Multi-walled carbon nanotubes</i>

NIRS	Espectroscopía en el infrarrojo cercano <i>Near-infrared spectroscopy</i>
P&T	Purga y trampa <i>Purge and trap</i>
PAHs	Hidrocarburos policíclicos aromáticos <i>Polycyclic aromatic hydrocarbons</i>
PBDE	Polibromodifenil éteres <i>Polybrominated diphenyl ethers</i>
PCA	Análisis de componentes principales <i>Principal component analysis</i>
PCA	Pentacloroanisol <i>Pentachloroanisole</i>
PCB	Policlorobifenilo <i>Polychlorinated biphenyl</i>
PCR	Regresión por componentes principales <i>Principal component regression</i>
PCs	Componentes principales <i>Principal components</i>
PLS	Regresión por mínimos cuadrados parciales <i>Partial least squares regression</i>
PPN	Valor predictivo negativo <i>Negative predictive value</i>
PPV	Valor predictivo positivo <i>Positive predictive value</i>
PTR-MS	Espectrometría de masas de reacción de transferencia de protones <i>Proton transfer reaction mass spectrometry</i>

PTV	Inyector de temperatura programada <i>Programmed temperature vaporizer</i>
QDA	Análisis discriminante cuadrático <i>Quadratic discriminant analysis</i>
q-MS	Espectrómetro de masas cuadrupolar <i>Quadrupole mass spectrometer</i>
RAM	Material de acceso restringido <i>Restricted Access material</i>
RSD	Desviación estándar relativa <i>Relative standard deviation</i>
SBSE	Extracción por adsorción en barra agitadora <i>Stir bar sorptive extraction</i>
SDME	Microextracción en una gota <i>Single-drop microextraction</i>
SHS	Generación de espacio de cabeza estático <i>Static headspace sampling</i>
SIFT-MS	Tubo de selección de iones con flujo y detección por espectrometría de masas <i>Selected-ion flow-tube mass spectrometry</i>
SIM	Seguimiento de iones seleccionados <i>Selected ion monitoring</i>
SIMCA	Modelado independiente de clases <i>Soft independent modelling of class analogies</i>
SPE	Extracción en fase sólida <i>Solid-phase extraction</i>
SPME	Microextracción en fase sólida <i>Solid-phase microextraction</i>

SVM	Modelo de las muestras apoyadas en la frontera <i>Support vector machines</i>
SVs	Vectores soportados <i>Support vectors</i>
TBA	2,4,6-tribromoanisol <i>2,4,6-tribromoanisole</i>
TCA	2,4,6-tricloroanisol <i>2,4,6-trichloroanisole</i>
TeCA	1,2,4,5-tetracloroanisol <i>1,2,4,5-tetrachloroanisole</i>
UAE	Extracción asistida por ultrasonidos <i>Ultrasound assisted extraction</i>
UTE	Utilización de la eficiencia teórica <i>Use of the theoretical efficiency</i>
VOCs	Compuestos orgánicos volátiles <i>Volatile organic compounds</i>

ÍNDICE

SIGLAS Y ACRÓNIMOS / ACRONYMS

I. OBJETO	1
II. INTRODUCCIÓN	7
1. TÉCNICAS DE PRETRATAMIENTO DE MUESTRA	9
1.1. Microextracción con sorbentes empaquetados	9
1.2. Generación de espacio de cabeza	16
2. INYECTOR DE TEMPERATURA PROGRAMADA	26
2.1. Modos de inyección permitidos por el PTV	27
2.1.1. Inyección <i>split</i> y <i>splitless</i>	28
2.1.2. Inyección <i>solvent vent</i>	30
3. FASES ESTACIONARIAS DE LÍQUIDOS IÓNICOS	36
3.1. Pretratamiento de muestra	38
3.2. Sistemas de detección	39
3.3. Técnicas de separación	41
4. OLFATOMETRÍA ELECTRÓNICA BASADA EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS	48
4.1. Olfatometría electrónica	49
4.1.1. Equipos basados en sensores de gases	49
4.1.2. Equipos basados en espectrometría de masas	52
5. TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS	57
5.1. Técnicas de reconocimiento de pautas	61
5.1.1. Análisis de componentes principales	61

5.1.2.K-vecinos más próximos	65
5.1.3.Modelado independiente de clases	66
5.1.4.Análisis discriminante	69
5.1.5.Modelo de las muestras apoyadas en la frontera	74
5.2. Calibración	80
5.2.1.Calibración univariante	80
5.2.2.Regresión por mínimos cuadrados parciales	85
5.2.2.1. PLS1	86
5.2.3.Validación de los modelos	87
5.2.4.Transferencia de calibrados	89
5.3. Diseño experimental de selección y optimización de variables	92
6. BIBLIOGRAFÍA	96

III. CONFIGURACIONES INSTRUMENTALES 133

1. JERINGA DE MICROEXTRACCIÓN CON SORBENTES EMPAQUETADOS Y CROMATÓGRAFO DE GASES CON INYECTOR DE TEMPERATURA PROGRAMADA Y MICRO-DETECTOR DE CAPTURA ELECTRÓNICA ...	136
1.1. Jeringa manual de microextracción con sorbentes empaquetados	136
1.2. Sistema de introducción de muestras	137
1.3. Inyector de temperatura programada	137
1.4. Cromatógrafo de gases	139
1.5. Micro-detector de captura electrónica	140
1.6. Esquema de la configuración instrumental	141

2.	GENERADOR DE ESPACIO DE CABEZA ACOPLADO A UN CROMATÓGRAFO DE GASES CON INYECTOR DE TEMPERATURA PROGRAMADA Y ESPECTRÓMETRO DE MASAS CUADRUPOLAR	143
2.1.	Generador de espacio de cabeza	143
2.2.	Inyector de temperatura programada	143
2.3.	Cromatógrafo de gases	144
2.4.	Espectrómetro de masas	144
2.5.	Esquema de la configuración instrumental	145
IV.	MICROEXTRACCIÓN CON SORBENTES EMPAQUETADOS Y CROMATOGRAFÍA DE GASES CON FASES ESTACIONARIAS DE LÍQUIDOS IÓNICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE HALOANISOLES EN VINOS	147
1.	INTRODUCCIÓN	149
2.	OBJETIVO	153
3.	PARTE EXPERIMENTAL	154
3.1.	Materiales, disoluciones estándar y muestras	154
3.2.	Instrumentación MEPS-PTV-GC- μ ECD	155
3.2.1.	Microextracción con sorbentes empaquetados ...	155
3.2.2.	Sistema de inyección de muestras líquidas	157
3.2.3.	Inyector de temperatura programada	157
3.2.4.	Cromatógrafo de gases	158
3.2.5.	Columnas de líquidos iónicos	158
3.2.6.	Micro-detector de captura electrónica	160
3.2.7.	Análisis de datos	160
3.2.8.	Método optimizado MEPS-PTV-GC- μ ECD	161
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	162

4.1. Variables que afectan al proceso de microextracción con sorbentes empaquetados	162
4.1.1. Sorbente empaquetado	162
4.1.2. Disolvente de elución	162
4.1.3. Volumen de muestra	164
4.1.4. Velocidad de aspiración y descarga	166
4.1.5. Disolución de lavado	167
4.1.6. Volumen de elución	169
4.1.7. Efecto de memoria del proceso MEPS	172
4.2. Variables que afectan al sistema PTV-GC- μ ECD	175
4.2.1. Condiciones del inyector de líquidos	175
4.2.2. Condiciones del inyector de temperatura programada	177
4.2.3. Condiciones de la separación cromatográfica	179
4.2.4. Condiciones del micro-detector de captura electrónica	186
4.3. Señales obtenidas con las condiciones óptimas de MEPS-PTV-GC- μ ECD	187
4.4. Efecto de matriz	190
4.5. Evaluación del método analítico optimizado	190
5. CONCLUSIONES	195
6. BIBLIOGRAFÍA	197
<i>PUBLISHED ARTICLE</i> Journal of Chromatography A 1260 (2012) 200-205	353
V. GENERACIÓN DE ESPACIO DE CABEZA ACOPLADA A CROMATOGRAFÍA DE GASES Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ENDÓGENOS EN ORINA. ALDEHÍDOS COMO POSIBLES MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO	205

1. INTRODUCCIÓN	207
2. OBJETIVO	210
3. PARTE EXPERIMENTAL	211
3.1. Materiales, disoluciones estándar y muestras	211
3.2. Preparación de muestra	211
3.3. Medida de la creatinina	212
3.4. Instrumentación HS-PTV-GC-MS	212
3.4.1. Generador de espacio de cabeza	212
3.4.2. Inyector de temperatura programada	213
3.4.3. Cromatógrafo de gases	214
3.4.4. Espectrómetro de masas	214
3.4.5. Análisis de datos	216
3.4.6. Método optimizado HS-PTV-GC-MS	216
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	217
4.1. Variables que afectan a la generación de espacio de cabeza	217
4.1.1. Fuerza iónica	217
4.1.2. pH	218
4.1.3. Volumen de muestra y tiempo y temperatura de equilibrado	219
4.2. Variables que afectan al sistema PTV-GC-MS	223
4.2.1. Condiciones del inyector de temperatura programada	223
4.2.2. Condiciones del horno cromatográfico	226
4.2.3. Condiciones del espectrómetro de masas	227
4.3. Señales obtenidas con las condiciones óptimas de HS- PTV-GC-MS	228
4.4. Efecto de matriz	229
4.5. Efecto de memoria	231

4.6. Evaluación del método analítico optimizado	231
4.7. Aplicación del método a muestras de orina	234
5. CONCLUSIONES	237
6. BIBLIOGRAFÍA	238
<i>PUBLISHED ARTICLE</i> Journal of Chromatography A 1367 (2014) 9-15	359

VI. UTILIZACIÓN DE UNA NARIZ ELECTRÓNICA BASADA EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA DETERMINACIÓN RÁPIDA DE POSIBLES BIOMARCADORES VOLÁTILES DE CÁNCER DE PULMÓN EN ORINA	245
1. INTRODUCCIÓN	247
2. OBJETIVO	249
3. PARTE EXPERIMENTAL	251
3.1. Materiales, disoluciones estándar y muestras	251
3.2. Preparación de muestra	252
3.3. Medida de la creatinina	252
3.4. Instrumentación utilizada en el método de cribado HS-PTV-MS	253
3.4.1. Generador de espacio de cabeza	253
3.4.2. Inyector de temperatura programada	254
3.4.3. Interfaz entre el PTV y el MS	254
3.4.4. Espectrómetro de masas	255
3.5. Instrumentación utilizada para el método de confirmación HS-PTV-GC-MS	255
3.5.1. Cromatógrafo de gases	255
3.5.2. Espectrómetro de masas	256
3.6. Análisis de datos	257
3.7. Métodos optimizados HS-PTV-MS y HS-PTV-GC-MS	257

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	259
4.1.	Variables que afectan a la generación de espacio de cabeza	259
4.2.	Variables que afectan al sistema PTV-(GC)-MS	260
4.2.1.	Condiciones del inyector de temperatura programada	260
4.2.2.	Condiciones de la separación cromatográfica	262
4.2.3.	Condiciones del espectrómetro de masas	263
4.3.	Señales obtenidas con los métodos optimizados	264
4.4.	Evaluación de los métodos analíticos optimizados	266
4.4.1.	Método de confirmación HS-PTV-GC-MS	266
4.4.2.	Método de cribado HS-PTV-MS	270
4.5.	Aplicación del método propuesto a muestras de orina	273
5.	CONCLUSIONES	279
6.	BIBLIOGRAFÍA	281
	<i>PUBLISHED ARTICLE</i> Analytical and Bioanalytical Chemistry 408 (2016) 5239-5246	367
VII.	UTILIZACIÓN DE UNA NARIZ ELECTRÓNICA BASADA EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y TÉCNICAS DE RECONOCIMIENTO DE PAUTAS PARA EL ANÁLISIS DE VOLÁTILES EN MUESTRAS DE SALIVA	285
1.	INTRODUCCIÓN	287
2.	OBJETIVO	290
3.	PARTE EXPERIMENTAL	291
3.1.	Muestras	291
3.2.	Instrumentación HS-PTV-MS	292
3.2.1.	Preparación de muestra	292
3.2.2.	Generador de espacio de cabeza	292

3.2.3. Inyector de temperatura programada	293
3.2.4. Cromatógrafo de gases	294
3.2.5. Espectrómetro de masas	294
3.2.6. Análisis de datos	295
3.2.7. Método optimizado HS-PTV-MS	295
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	297
4.1. Estudio de las señales obtenidas	297
4.2. Análisis de componentes principales	299
4.3. Modelado independiente de clases	300
4.4. K-vecinos más próximos	302
4.5. Análisis discriminante	303
4.6. Modelo de las muestras apoyadas en la frontera	307
4.7. Resumen de los resultados obtenidos con las diferentes técnicas de reconocimiento de pautas	309
5. CONCLUSIONES	312
6. BIBLIOGRAFÍA	313
<i>PUBLISHED ARTICLE</i> Talanta 160 (2016) 21-27	375
VIII. CONCLUSIONES	319
VERSIÓN RESUMIDA EN INGLÉS / SUMMARY IN ENGLISH ..	327
Apéndice: MENCIÓN “DOCTORADO INTERNACIONAL”	387

I. OBJETO

El objeto general de esta memoria es el desarrollo de metodologías analíticas encaminadas a conseguir una reducción significativa del esfuerzo necesario para llevar a cabo la etapa de tratamiento de muestra con el fin de minimizar costes y tiempo y reducir los errores asociados a esta etapa del proceso analítico.

La Tesis consta de dos partes dedicadas ambas a la puesta a punto de metodologías que cumplan las características anteriormente descritas pero que difieren en el tipo de matriz de estudio, dedicándose la primera parte a matrices alimentarias y la segunda a matrices biológicas.

La primera parte, por tanto, está dedicada a la puesta a punto de una metodología de análisis para la detección de contaminantes en muestras alimenticias, concretamente haloansoles en vinos, basada en el acoplamiento de la técnica de microextracción con sorbentes empaquetados (MEPS) con cromatografía de gases (GC) con fases estacionarias de líquidos iónicos (IL) y detección mediante captura electrónica (ECD).

En esta primera parte, los objetivos concretos son dos:

1. El estudio de las posibilidades que ofrece la nueva técnica de microextracción con sorbentes empaquetados (MEPS).
2. El estudio de las ventajas que puedan tener las nuevas fases estacionarias de líquidos iónicos para la determinación de compuestos relativamente polares como son los haloansoles.

En esta primera parte se plantean dos hipótesis:

- La primera, que la técnica de microextracción MEPS permite separar los haloansoles del vino, preconcentrarlos mediante el paso sucesivo de la matriz a través de los cartuchos propios de esta técnica y extraerlos posteriormente con una pequeña cantidad de disolvente orgánico.
- La segunda, que las nuevas fases estacionarias de líquidos iónicos, más polares que las convencionales, permiten la separación adecuada de compuestos con una polaridad intermedia como son los haloansoles y que, en función del líquido iónico que constituya la fase estacionaria, las características cromatográficas serán diferentes.

La segunda parte de la Tesis, se centra en el desarrollo de metodologías rápidas y eficaces para la determinación y cuantificación de compuestos que se han descrito como posibles biomarcadores en matrices biológicas. Se utiliza como técnica de pretratamiento de muestra la generación de espacio de cabeza (HS) acoplada a un inyector de temperatura programada (PTV) y la detección se lleva a cabo mediante espectrometría de masas (MS). En esta parte, además de la puesta a punto de métodos cromatográficos, se propone la utilización de metodologías sin separación cromatográfica en las que se generan señales de tipo perfil que se tratan quimiométricamente.

En esta segunda parte de la memoria, los objetivos concretos son:

1. El desarrollo de una serie de metodologías analíticas rápidas, sensibles y eficaces que puedan ser aplicables a la determinación y cuantificación de biomarcadores en muestras biológicas:
 - Acoplamiento de un generador de espacio de cabeza con un inyector de temperatura programada para el análisis cromatográfico y la detección mediante espectrometría de masas de muestras de orina.
 - Utilización de una nariz electrónica basada en el acoplamiento de un generador de espacio de cabeza con un inyector de temperatura programada y un espectrómetro de masas para la obtención de señales de perfil de muestras de orina y saliva.
2. Comparar muestras de individuos sanos y muestras de individuos enfermos para conocer la posible existencia de diferencias en los niveles de concentración de estos compuestos o en las señales de perfil que puedan permitir la clasificación de las muestras analizadas.

En esta segunda parte se plantean tres hipótesis:

- La primera, que la técnica de espacio de cabeza (HS) es adecuada para la determinación de compuestos volátiles en muestras biológicas (orina y saliva) reduciendo el tratamiento al que debe someterse la muestra y eliminando muchos compuestos

interferentes no volátiles que presentan estos tipos de matrices. Además, la inclusión en la configuración instrumental de un inyector de temperatura programada (PTV) que permite la inyección en el modo de purga de disolvente (*solvent vent*) aumentará la sensibilidad de la metodología con inyección convencional.

- La segunda, que el tratamiento quimiométrico de las señales tipo perfil obtenidas con metodologías no separativas, permite extraer información cualitativa y cuantitativa sobre los distintos compuestos objeto de estudio.
- La tercera, que existen diferencias significativas en los niveles de concentración de los compuestos descritos como biomarcadores o en las señales de perfil de las muestras de individuos sanos e individuos enfermos.

II. INTRODUCCIÓN

1. TÉCNICAS DE PRETRATAMIENTO DE MUESTRA

1.1. Microextracción con sorbentes empaquetados

La microextracción con sorbentes empaquetados (MEPS) es una técnica de preparación de muestra de reciente desarrollo basada en la miniaturización y automatización del proceso de extracción en fase sólida convencional (SPE). Esta técnica fue desarrollada y patentada por el grupo de Mohamed Abdel-Rehim en 2004 [1,2].

Se trata de una técnica de preparación de muestras líquidas y tiene como objetivo la extracción de compuestos de interés contenidos en las mismas. Esta nueva técnica requiere la utilización de un dispositivo consistente en una jeringa provista de un cartucho que contiene una cierta cantidad de sorbente (entre 0.5 y 4 mg). El cartucho se sitúa en el extremo de la aguja que conecta con el tubo de la jeringa. De esta manera, las muestras aspiradas a través de la jeringa tienen que atravesar el cartucho que contiene el sorbente y en el que quedan retenidos los compuestos de interés. La aguja se fija a la jeringa con una tuerca de cierre, como se puede observar en la figura 1.

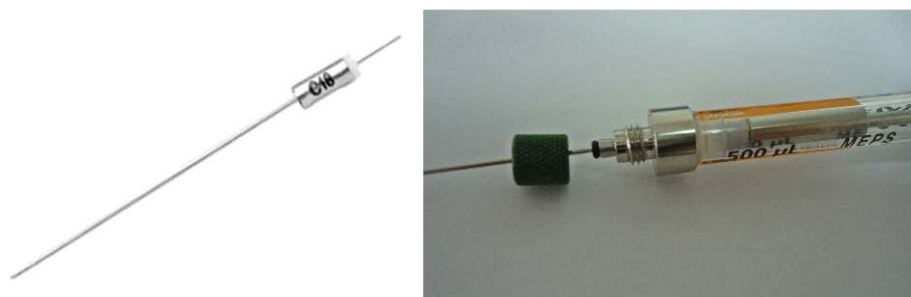


Figura 1: Cartucho C_{18} y tuerca de cierre para la fijación de la aguja

Los materiales más comunes utilizados como sorbentes son sílice, C_{18} , C_8 , C_2 (estos tres con una base de sílice) o intercambiadores fuertes de cationes, aunque también pueden utilizarse materiales poliméricos, materiales de acceso restringido (RAMs) o polímeros de impresión molecular (MIPs). Para conseguir una preconcentración de los analitos de interés es necesario seleccionar el sorbente adecuado de acuerdo a las características de los mismos. Tanto el tamaño del cartucho como el de las partículas del material sorbente deben ser lo más pequeños posible para aumentar la velocidad de transferencia de los analitos desde la muestra líquida a la fase sólida. En la figura 2 se muestra la disposición del sorbente.

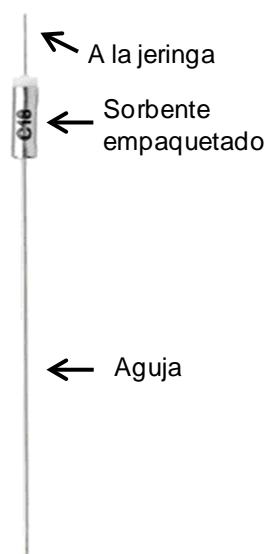


Figura 2: *Cartucho de MEPS*

La separación se realiza mediante una serie de aspiraciones y expulsiones consecutivas de la muestra líquida a través del cartucho previamente acondicionado, consiguiéndose la retención de los analitos en el sorbente empaquetado. El cartucho se lava entonces con agua

ultrapura u otra disolución de lavado para eliminar interferencias y, a continuación, se lleva a cabo una etapa de secado. Posteriormente, la elución de los analitos se efectúa con una pequeña cantidad de disolvente orgánico que se hace pasar a través de la jeringa y puede ser inyectada directamente en un sistema de análisis, si el instrumento está automatizado, o depositada en un vial de muestreo en caso de tratarse de un dispositivo manual. El esquema del proceso se muestra en la figura 3.

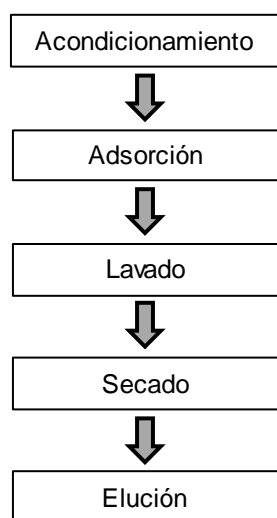


Figura 3: Esquema de un proceso de extracción mediante MEPS

Existen dos modalidades de trabajo en MEPS que se diferencian en la etapa de extracción de la muestra [3]. En una de ellas, la muestra se pasa por el cartucho una vez y se desecha, esta operación se repite con diferentes alícuotas de muestra hasta coger el volumen total. Esta modalidad se conoce con el nombre de *extract-discard*. En la otra modalidad existente, *multiple draw-eject*, un volumen fijo de muestra se deposita en un vial y se realizan múltiples tomas y eluciones de la misma siempre del mismo vial. Esta segunda modalidad es muy

interesante cuando el objetivo es extraer la mayor cantidad posible de analitos de volúmenes muy pequeños de muestra, siendo muy útil su aplicación en bioanálisis [4-6].

Ambas modalidades de microextracción con sorbentes empaquetados se pueden realizar mediante dos formas de trabajo diferentes: manual y automática [7]. En la primera, el desplazamiento del émbolo es automático, pero las diferentes etapas del proceso de extracción se llevan a cabo de forma manual. El volumen total de eluyente se lleva a un vial y desde ahí una parte se inyecta en el sistema de análisis. En la segunda, la jeringa MEPS con el cartucho forma parte de un sistema de inyección automática, por lo que tanto el desplazamiento del émbolo como las diferentes etapas del proceso se llevan a cabo de forma automática y todo el eluyente es inyectado en el sistema de análisis. Los cartuchos son los mismos para ambas formas de trabajo, existiendo diferentes puntas y grosores de aguja en función de si el acoplamiento del MEPS automático es a un cromatógrafo de gases o de líquidos.

La principal ventaja de la forma automática de trabajo es que todo el extracto se inyecta en el cromatógrafo, mientras que en la manual solo se inyectará una pequeña parte. Además, trabajando de forma automática los volúmenes que se utilizan para eluir los compuestos son mucho más pequeños que los permitidos con el émbolo digital de la modalidad manual. La desventaja principal del procedimiento automático es su elevado coste. Por otra parte, el procedimiento manual tiene una ventaja muy importante, que es la posibilidad de tomar la muestra *in situ* [8] y posteriormente, en el laboratorio, realizar la elución de los analitos.

Esta técnica MEPS surge a partir de los intentos de agilizar y hacer

más eficientes las ya existentes. En especial, el desarrollo de técnicas más rápidas de tratamiento de muestra resulta interesante debido a que la mayor parte del tiempo total de análisis se invierte en los procesos previos a la propia identificación y cuantificación de los compuestos de interés. La extracción en fase sólida (SPE) así como la microextracción en fase sólida (SPME) reemplazaron en poco tiempo a otras técnicas de extracción que consumían mayor cantidad de disolventes como los procesos de extracción líquido-líquido (LLE). La microextracción con sorbentes empaquetados (MEPS) pretende mejorar algunos aspectos de estas dos primeras metodologías.

El principio en el que se basa la microextracción con sorbentes empaquetados, el mismo que SPE, es la diferente interacción de los analitos entre una fase sólida, que es el sorbente, y una líquida, que es la muestra. En este caso, la elución de los analitos retenidos se realiza mediante unos pocos microlitros de un solvente orgánico como, por ejemplo, metanol, diclorometano o acetato de etilo. Frente a la extracción en fase sólida convencional, la metodología MEPS reduce significativamente el tiempo necesario para preparar e inyectar las muestras, puede combinarse con inyectores automáticos de cromatografía de líquidos y de gases (la etapa de extracción e inyección se efectúan en línea usando la misma jeringa) y se puede trabajar en un margen de volúmenes de muestra desde unos pocos microlitros hasta varios mililitros. Al igual que en SPE, se conseguiría, además de una extracción de los compuestos de interés presentes en la muestra, una preconcentración de los mismos, si bien en esta modalidad la cantidad de disolvente orgánico con la que se lleva a cabo la elución de los compuestos es generalmente bastante menor [8].

Además, la pequeña cantidad de sorbente que se encuentra dentro del cartucho de MEPS puede limpiarse de una manera fácil y efectiva entre muestras para reducir el riesgo de contaminación entre ellas (efecto memoria) utilizando pequeños volúmenes de disolventes. Los cartuchos de MEPS pueden ser reutilizados un gran número de veces, siempre que se optimicen las condiciones de limpieza [4]. Es por todo esto que esta nueva técnica es más ecológica y económica que muchos otros métodos de preconcentración. De acuerdo con la Química Analítica “verde” [9,10], utiliza pequeñas cantidades de productos químicos peligrosos y reduce los costes energéticos y los desechos.

En cuanto a las aplicaciones de esta técnica, la microextracción con sorbentes empaquetados se ha utilizado principalmente en bioanálisis [11,12] en matrices tales como plasma humano, sangre, orina o saliva, siendo muy importante para este tipo de muestras la función de MEPS de eliminar los componentes interferentes de la matriz y de aislar y concentrar selectivamente los analitos de interés [4,13,14]. Se ha utilizado para el análisis en plasma de diferentes fármacos como anestésicos locales [1], antidepresivos [4], β -bloqueadores usados para tratar trastornos del ritmo cardiaco [15] y antipsicóticos [5,16] (estos últimos también en orina y saliva) así como compuestos opioides [13] y aminas biogénicas [6].

Se ha extendido el uso de esta técnica para explorar el perfil metabólico de la orina [17] y se han propuesto aplicaciones para la detección en esta matriz de compuestos endógenos como la carnitina y otras acilcarnitinas [14], leucotrieno B₄ [18] y catecolaminas [19], estas últimas tanto en orina como en sangre utilizando métodos innovadores

de recogida de muestra como son las manchas de plasma y orina secas, más conocidos por sus nombres en inglés: *dried plasma spots (DPSs)* y *dried urine spots (DUSs)*. En orina, además de compuestos endógenos, se ha utilizado la técnica MEPS para el análisis de antidepresivos [20], parabenos [21] y drogas como la ketamina y sus metabolitos mayoritarios [22], estos últimos también medidos en plasma.

La orina y el plasma son las matrices más utilizadas en bioanálisis. En menor medida también se han propuesto metodologías de análisis para saliva y esputos en las que se incluye una etapa de microextracción con sorbentes empaquetados, concretamente, para el análisis de cannabinoides [23] y antidepresivos [24] en saliva y de fármacos contra las infecciones pulmonares en esputos [25].

También se ha utilizado esta técnica para el análisis de muestras medioambientales, principalmente de aguas. En este caso las aplicaciones incluyen: contaminantes orgánicos prioritarios [26], compuestos policíclicos [2,27], aminas aromáticas [28], clorobencenos [29], ácidos haloacéticos [30], disruptores endocrinos como parabenos, triclosán y metil triclosán [31], fluoroquinolonas [32] y medicamentos antiinflamatorios no esteroideos [33]. También se ha estudiado por medio de esta técnica la presencia de bromodifeniléteres (PBDE), utilizados como retardantes de llama, en lodos de depuradora [34], así como la de clorobencenos en suelos [35].

No son tan numerosos, sin embargo, los estudios en el campo del análisis de alimentos y estos se centran principalmente en el análisis de bebidas como vino, cerveza y otras bebidas alcohólicas, matrices en las que se ha estudiado recientemente el contenido de benzodiazepinas [36]

en *grappa*, prenilchalcona en cerveza [37], etil carbamato [38], derivados furánicos [39] y ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos [40] en vinos y ácido L-ascórbico en diferentes bebidas sin alcohol [41]. Existe también alguna aplicación en otros alimentos como la miel [42] y la carne de cerdo [43].

También se ha utilizado la técnica MEPS para el estudio de aminas aromáticas provenientes de tintes azoicos de textiles [44].

1.2. Generación de espacio de cabeza

La generación de espacio de cabeza (HS) es una técnica utilizada para la separación de los compuestos volátiles de una muestra. Se denomina espacio de cabeza a la fase gaseosa en contacto con la muestra (líquida o sólida). Puede acoplarse a diversas técnicas analíticas de separación y medida, pero se ha utilizado principalmente acoplada a cromatografía de gases (GC), debido a que ésta es una técnica muy apropiada para el análisis de muestras gaseosas [45].

El procedimiento de generación del espacio de cabeza puede llevarse a cabo de forma estática y dinámica.

En HS estático (SHS) la muestra se introduce en un vial dejando un volumen libre sobre ella. El vial se cierra herméticamente y se introduce en un horno, de modo que los volátiles se separan de la matriz y al cabo de un tiempo se establece el equilibrio entre ambas fases. Una vez alcanzado el equilibrio, una porción de los volátiles generados se inyecta en el cromatógrafo de gases.

A partir de esta modalidad, a la que también se ha denominado HS “en un paso”, se han desarrollado diversas modificaciones, entre las que puede citarse la inclusión de trampas de adsorción o de trampas que contienen un disolvente orgánico, cuyo propósito es separar los analitos volátiles de interés del resto de los compuestos de la fase gaseosa.

En 1989 Pawliszyn y su grupo de investigación introdujeron la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) [46,47]. Una fibra de sílice fundida, cuya superficie externa está recubierta con una fase estacionaria inmovilizada, se introduce en el vial que contiene la muestra. Al cabo de un tiempo los volátiles quedan adsorbidos en la fibra, ésta se introduce en la cámara de vaporización del inyector del cromatógrafo de gases y los analitos son transferidos a la columna cromatográfica por desorción térmica. La fibra puede sumergirse en el líquido o permanecer en el espacio de cabeza sobre la muestra líquida o sólida. En el caso en que esta técnica se utilice para extraer los volátiles del espacio de cabeza de la muestra se denomina HS-SPME. Este acoplamiento se utilizó por primera vez en 1993 [48] y desde entonces ha sido empleado para resolver numerosos problemas analíticos.

La modalidad SHS también se ha utilizado combinada con microextracción en fase líquida [49] en la que una gota de disolvente orgánico en la punta de una microjeringa se sitúa suspendida sobre la muestra durante el proceso de generación de espacio de cabeza, de manera que se establece un equilibrio de distribución de los analíticos entre la fase gaseosa y el disolvente orgánico. Finalmente, el disolvente con los analitos preconcentrados se inyecta en el cromatógrafo de gases para proceder a su análisis.

El modo de generación de espacio de cabeza continuo o dinámico fue sugerido por primera vez en 1962 por Swinnerton y colaboradores [50,51]. Bellar y Lichtenberg [52] desarrollaron la técnica y la denominaron Purga y Trampa (P&T). En esta modalidad no se establece el equilibrio entre las dos fases del vial, sino que la separación de los volátiles se lleva a cabo retirando continuamente la fase gaseosa, hasta que todos los analitos volátiles han sido extraídos de la muestra. Se utiliza un flujo de gas inerte sobre la muestra sólida o líquida, o bien se hace burbujear el gas a través de la muestra líquida. Los volátiles purgados están diluidos en el gas extractante y es necesario focalizarlos en una trampa antes de introducirlos en la columna cromatográfica. Esta focalización puede hacerse mediante trampa fría, aunque generalmente se ha utilizado un cartucho empaquetado con un material adsorbente, a partir del cual los volátiles se transfieren a la columna cromatográfica por desorción térmica.

La generación de espacio de cabeza en ambas modalidades, permite analizar los compuestos volátiles de una muestra sin interferencias de los compuestos no volátiles de la matriz. Se trata de un proceso de extracción sencillo, que minimiza la etapa de pretratamiento de la muestra, reduciendo considerablemente los errores asociados a la misma, el tiempo y el coste del análisis.

El método HS estático es la alternativa más sencilla, con mayor grado de automatización y la más rápida. El acoplamiento de esta modalidad estática presentaba, a veces, la desventaja del ancho de banda inicial cuando se introducían volúmenes grandes de muestra para aumentar la sensibilidad. Se han descrito algunas modificaciones en las que se

reduce este problema mediante técnicas de enfoque criogénico [45], con las que se consiguen niveles de sensibilidad del mismo orden que los obtenidos con las técnicas de P&T y HS-SPME.

La sensibilidad de la metodología HS-GC depende, además del detector, de la capacidad de la columna cromatográfica [53].

El espacio de cabeza está constituido por una muestra gaseosa más o menos diluida. El problema que se plantea al introducir la muestra en el cromatógrafo de gases es cómo introducir el mayor volumen de muestra posible, para alcanzar los niveles de sensibilidad deseados y, además, hacerlo de forma rápida para reducir el ancho de banda inicial del cromatograma.

En el libro publicado por el grupo de investigación de Bruno Kolb [45] se describen algunas técnicas que se han empleado para solucionar los problemas planteados. Se trata de técnicas de enriquecimiento por trampa criogénica. Con estas técnicas se consigue la preconcentración de los analitos y su posterior introducción rápida en la columna cromatográfica.

Los primeros dispositivos consistían en trampas con forma de U, fabricadas con metal o vidrio, que se introducían en un baño de nitrógeno líquido o argón. Una vez conseguida la condensación de los analitos en el interior del tubo, el líquido criogénico era retirado manualmente del baño antes de que la trampa fuera calentada, en la mayoría de los casos eléctricamente, para conseguir la evaporación de los analitos condensados. Posteriormente, surgen algunos avances para evitar la eliminación manual del líquido criogénico. En lugar de un baño

se utiliza un tubo de teflón que rodea la trampa en forma de U y un flujo de agua caliente desplaza al nitrógeno líquido una vez finalizada la preconcentración de los compuestos.

Más adelante surgen trampas en las que el enfriamiento se consigue mediante una corriente de gas y la posterior vaporización de los analitos sustituyendo el flujo de gas frío por uno de gas caliente. Con el fin de evitar la corriente de gas caliente necesaria para conseguir la vaporización, surge la idea de introducir el dispositivo en el interior del cromatógrafo de gases, de modo que, una vez que el flujo de gas frío deja de circular, la trampa adquiere rápidamente la temperatura del horno del GC.

Esta estrategia se ha llevado a cabo, principalmente, enfriando la parte inicial de la columna cromatográfica mediante una corriente de nitrógeno gas (previamente enfriado en el exterior del cromatógrafo), que se hace circular a través de un tubo de teflón que rodea la parte inicial de la columna. También se han utilizado flujos de N₂ líquido o CO₂ líquido. La muestra condensa en cabeza de columna y posteriormente se aumenta progresivamente la temperatura para que el disolvente eluya rápidamente, mientras que los analitos, con mayor punto de ebullición, permanecen en una banda estrecha.

Este sistema tiene algunas limitaciones. En primer lugar, el flujo a través de la región enfriada está limitado por el flujo en columna. En segundo lugar, el atrapamiento en cabeza de columna a baja temperatura no retiene únicamente los analitos, sino que también se atrapan impurezas o materiales indeseables, por lo que frecuentemente hay que cortar secciones de columna para eliminar este material

interferente. Por último, cuando la preconcentración se produce a temperaturas bajo cero pueden producirse problemas de bloqueo del flujo en columnas capilares por congelación de agua [54-56].

Una alternativa es el uso de pre-columnas, que consisten en una sección de columna cromatográfica desactivada que se conecta a la parte inicial de la columna en la que se va a realizar la separación de los compuestos. Estos dispositivos son más fácilmente reemplazables, aunque requieren una conexión apropiada a la columna cromatográfica.

Además del bloqueo del flujo en columna por formación de hielo, la presencia de agua en GC puede dar lugar a distorsión de la forma de pico, particularmente de aquellos compuestos con menor tiempo de retención que eluyen junto con el agua. Para resolverlo se han desarrollado diversas técnicas para eliminar el exceso de vapor de agua antes de introducir la muestra en la columna cromatográfica. En la técnica de HS dinámico se utilizan membranas semipermeables y condensadores de reflujo. Cuando se utiliza HS estático, el volumen de vapor de agua generado es menor y suele eliminarse mediante adsorción química selectiva sobre una sal inerte higroscópica [53].

El principal problema de las trampas criogénicas utilizadas es que suelen ser de fabricación manual y requieren una alta cualificación para ser manejadas de forma adecuada. Esto pone de manifiesto la necesidad de dispositivos comerciales y fácilmente automatizables que sean capaces de solucionar los problemas del acoplamiento HS-GC, para conseguir niveles de sensibilidad apropiados para el análisis de trazas sin comprometer la resolución de la zona inicial del cromatograma.

Una posible alternativa es la utilización de los dispositivos comerciales denominados inyectores de temperatura programada (*Programmed temperature vaporizers*, PTVs). Tanto la descripción de estos inyectores como las peculiaridades de su acoplamiento con la técnica de espacio de cabeza, se detallarán en el siguiente apartado de la introducción de esta memoria. De manera resumida, estos dispositivos permiten modalidades de inyección en las que la temperatura se puede programar, reteniéndose en un primer momento los analitos en el inyector mediante la programación de una temperatura baja y produciéndose posteriormente, con la selección de una rampa rápida de calentamiento del cuerpo del inyector, el paso de los compuestos a la columna cromatográfica en un tiempo breve. Esta modalidad de inyección, ha sido muy utilizada en los últimos años en combinación con la técnica de espacio de cabeza y es la metodología elegida en tres de los trabajos que se describen en esta memoria. Se ha utilizado tanto para esquemas instrumentales que contemplan la separación cromatográfica de los volátiles generados en espacio de cabeza, como para las propuestas metodológicas que no incluyen etapa cromatográfica y que estudian las señales de tipo perfil de los volátiles generados con esta misma técnica.

En cuanto al aumento de la velocidad a la que se realiza la inyección una solución son los nuevos acoplamientos que existen para esta técnica, consistentes en jeringas termostataadas. Estas jeringas sustituyen a las largas líneas de transferencia de níquel que conectaban el horno de generación de espacio de cabeza y el inyector del cromatógrafo y permiten la inyección rápida del volumen de espacio de cabeza seleccionado.

La generación de espacio de cabeza es ya una técnica de pretratamiento de muestra muy asentada y son innumerables las aplicaciones en las que se propone su utilización; en muchos casos combinada con otras técnicas como la microextracción en fase sólida. Las primeras propuestas se basaron en el análisis de contaminantes en muestras ambientales como los trabajos de Pawlinzyn y colaboradores en los que se analizan compuestos orgánicos volátiles [47,48]. También se ha propuesto el acoplamiento con técnicas de microextracción en fase líquida para el estudio de contaminantes orgánicos como los trihalometanos en este caso en aguas de consumo [49]. Algunas de las aplicaciones más recientes de la técnica de espacio de cabeza en este mismo campo se centran en el análisis de contaminantes orgánicos y fármacos [57-60] en muestras de agua, de suelo [61] y en sedimentos marinos [62] donde se ha propuesto el análisis de restos de gas mostaza *in situ* mediante el uso de muestreadores portátiles. También se ha propuesto el uso de esta técnica para el estudio de la contaminación por hidrocarburos en arena de playa [63].

Esta técnica de pretratamiento ha sido utilizada también en el análisis de muestras alimentarias como zumos [64], miel [65], fruta [66], productos cárnicos como salchichas [67], patatas fritas [68] y aceites. En este último alimento se han propuesto aplicaciones tanto para su caracterización [69] como para la detección de adulteraciones como la de filbertona en aceites de oliva mediante el estudio de señales de perfil obtenidas sin separación cromatográfica [70]. Se han descrito también aplicaciones para el análisis de surfactantes en muestras textiles [71].

Especial interés se ha prestado recientemente a esta técnica en el campo del bioanálisis donde se aprovechan algunas de las características de esta técnica que la hace muy ventajosa frente a otras técnicas de pretratamiento de muestra. Por un lado, la técnica permite el análisis de compuestos volátiles eliminando interferentes no volátiles de la matriz, en matrices tan complejas como las biológicas (plasma, orina o saliva). Por otro lado, el tratamiento de muestra es mínimo y se reduce, muchas veces, a la introducción de la misma en un vial de muestra y su posterior cierre hermético.

Así, se han propuesto métodos que utilizan la técnica de espacio de cabeza acoplada a cromatografía de gases para el análisis de compuestos como ácidos haloacéticos [72], trihalometanos [73], compuestos de organoestánicos [74] y metilestaño [75] en muestras de orina. Los dos últimos utilizan la estrategia HS-SPME.

Además, se han llevado a cabo trabajos que utilizan la técnica de espacio de cabeza con microextracción en fase sólida acoplada a técnicas de separación cromatográfica con el objetivo de conocer el contenido en metabolitos volátiles en la orina de individuos sanos y de enfermos y estudiar, de esta manera, las diferencias existentes en algunos compuestos que podrían ser considerados potenciales biomarcadores de diferentes enfermedades [76-80]. Algunas aplicaciones, además, incluyen el acoplamiento de la técnica HS con sistemas de inyección de la muestra en frío [81].

Dentro del campo del bioanálisis existen otras aplicaciones que exploran las posibilidades del acoplamiento directo de esta técnica con un detector de espectrometría de masas para el análisis no separativo de

muestras de saliva y la determinación semi-cuantitativa de biomarcadores relacionados con el cáncer de pulmón en esta matriz [82,83]. En uno de ellos [83] se incorpora un inyector de temperatura programada (PTV) entre el generador de espacio de cabeza (HS) y el espectrómetro de masas cuadrupolar (qMS) para mejorar la sensibilidad.

En esta memoria se propondrán tres metodologías que utilizan esta técnica de tratamiento de muestra para el estudio de biomarcadores de estrés oxidativo y cáncer tanto en muestras de orinas como en muestras de saliva.

2. INYECTOR DE TEMPERATURA PROGRAMADA

En este apartado se detallarán los aspectos relacionados con la inyección de la muestra en el sistema de análisis. El inyector utilizado en todas las metodologías propuestas en esta memoria es un inyector de temperatura programada (PTV).

El concepto de introducción de muestra a temperatura programada fue descrito por K. Abel en 1964 [84] y en 1979 Vogt y colaboradores presentaron por primera vez un inyector de temperatura programada (*Programmed Temperature Vaporizer, PTV*) [85,86].

A principios de los ochenta, los grupos de Poy [87] y Schomburg [88] exploraron las posibilidades de la inyección en frío y desarrollaron algunos dispositivos.

A partir de este momento, diversos autores han realizado estudios metodológicos sobre el uso de la inyección con PTV. El elevado número de publicaciones sobre este tipo de inyección pone de manifiesto su interés y potencial para la introducción de muestras en cromatografía de gases (GC), como puede verse en la revisión bibliográfica realizada por Engewald y colaboradores ya en 1999 [89].

Un inyector de temperatura programada consta de los mismos elementos que un inyector tradicional, pero está equipado con un sistema de enfriamiento y calentamiento muy eficiente (figura 4) gracias al cual la temperatura del inyector se puede controlar durante la inyección de la muestra. Esta característica hace que el PTV permita una gran variedad de modos de inyección [90], incluyendo aquellos que se

consideran como clásicos:

- Inyección en caliente con división de muestra (*hot split*).
- Inyección en frío con división de muestra (*cold split*).
- Inyección en caliente sin división de muestra (*hot splitless*).
- Inyección en frío sin división de muestra (*cold splitless*).
- Inyección con purga de disolvente (*solvent vent*).

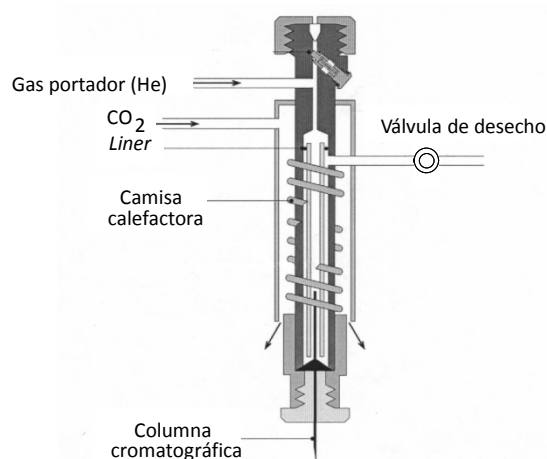


Figura 4: Inyector de temperatura programada (PTV)

2.1. Modos de inyección permitidos por el PTV

Además de programar la rampa de temperaturas en el cuerpo del inyector, concretamente en la cámara de vaporización o *liner*, el PTV permite seleccionar distintos modos de inyección. La diferencia entre estos modos de inyección radica en el tiempo que permanece abierta la válvula de desecho (también denominada válvula de *split*) y el flujo de gas portador que circula a través de ella, factores ambos que determinan el volumen de muestra inyectado en la columna cromatográfica.

2.1.1. Inyección *split* y *splitless*

En el modo de inyección *split*, la válvula de desecho está abierta durante todo el proceso. Una porción de los volátiles que llegan al inyector pasa a la columna cromatográfica, mientras que el resto se elimina a través de la válvula de desecho. La fracción de muestra que entra en columna viene fijada por la relación de división o relación de *split* y está determinada por el flujo de gas portador que circula en la columna y el flujo a través de la válvula de desecho [91]. La relación de división suele oscilar de 1:10 a 1:6000 y el volumen de muestra inyectado en columna es $\leq 1\mu\text{l}$.

Esta técnica tiene el inconveniente de que el volumen de muestra inyectado en columna es muy pequeño, por lo que no es apropiada para el análisis a nivel de trazas, aunque es muy útil cuando los analitos constituyen más del 0.1% de la muestra. Los volátiles circulan a gran velocidad en el *liner*, arrastrados por el flujo de gas portador, por lo que la inyección es rápida y el ancho de banda inicial pequeño.

En el modo de inyección *splitless*, la válvula de desecho está cerrada durante el tiempo de transferencia de la muestra al PTV y desde el PTV al GC, por lo que los analitos pasan a la columna cromatográfica sin división de muestra. Una vez transcurrido este tiempo, denominado tiempo de *splitless*, la válvula de desecho se abre y a través de ella circula un flujo rápido de gas portador, denominado flujo de limpieza, que prepara el *liner* para la próxima inyección.

Con este modo de inyección se introduce en la columna cromatográfica la mayor parte de la muestra, por lo que se consiguen mejores límites de detección que con el modo de inyección *split*.

El control programado de la temperatura permite seleccionar la temperatura del inyector durante el tiempo de inyección, por lo que, de manera general, se puede considerar que la introducción de la muestra se puede realizar en frío o en caliente.

La primera etapa es común en ambas modalidades de introducción de muestra. Sin embargo, la transferencia de la muestra del PTV al GC será distinta en función de que se trate de una inyección en caliente o en frío. En un proceso de introducción de muestra en caliente el inyector se mantiene a alta temperatura (superior a 200 °C) durante el tiempo de análisis, por lo que no se produce retención de los analitos en el *liner*. Cuando los analitos son inyectados, lo atraviesan, pasando a la columna del cromatógrafo de gases según el modo de inyección seleccionado.

Una de las principales ventajas del PTV respecto a los inyectores convencionales son los modos de inyección en frío. En estos casos, el inyector se encuentra a baja temperatura en el momento en el que la muestra es introducida en el dispositivo y, una vez finalizado este proceso, se calienta progresivamente controlando la evaporación de compuestos con distintos puntos de ebullición. Con esta técnica se elimina la discriminación debida a las diferencias en los puntos de ebullición de los analitos [87-90,92] que tiene lugar en las cámaras de vaporización (*liners*) convencionales. Por otro lado, la degradación térmica aparece en menor proporción, ya que los compuestos no reciben un choque brusco de temperatura y sólo es necesario calentarlos a la menor temperatura requerida para que sean transferidos a la columna cromatográfica [90,92].

2.1.2. Inyección *solvent vent*

Otra ventaja del PTV es que permite la inyección de grandes volúmenes de muestra (*Large Volume Injection, LVI*) [85,86] debido a la eliminación o purga del disolvente a baja temperatura, antes de transferir la muestra a la columna cromatográfica. Con este dispositivo es posible introducir en el sistema cromatográfico volúmenes de muestra superiores a 100 μL . Esto supone una importante ventaja, ya que se consigue mejorar significativamente la sensibilidad del método analítico respecto a los inyectores convencionales, en los que se introducen volúmenes de muestra de, como máximo, 1 a 2 μL [55,92]. Este modo de inyección se conoce con el nombre de purga de disolvente o *solvent vent* y combina la inyección en frío con la vaporización controlada del disolvente.

En condiciones generales, el PTV se programa de modo que el *liner* esté a una temperatura ligeramente inferior al punto de ebullición del disolvente cuando la muestra es inyectada. Durante este proceso, la válvula de desecho está abierta, de modo que el disolvente se elimina mientras que los analitos, de mayor punto de ebullición, permanecen retenidos en el *liner*. El tiempo durante el cual la válvula de desecho permanece abierta se denomina "tiempo de purga". Una vez que ha terminado la transferencia de la muestra, la válvula se cierra y el *liner* se calienta rápidamente transfiriendo los analitos a la columna cromatográfica en el modo *splitless*. Al cabo de un tiempo, suficiente para que todos los analitos hayan sido transferidos a la columna cromatográfica, la válvula de desecho se abre nuevamente y el flujo de gas portador que circula a través del *liner* arrastra los posibles restos de

analitos que pudieran quedar, preparándolo para una nueva inyección (figura 5).

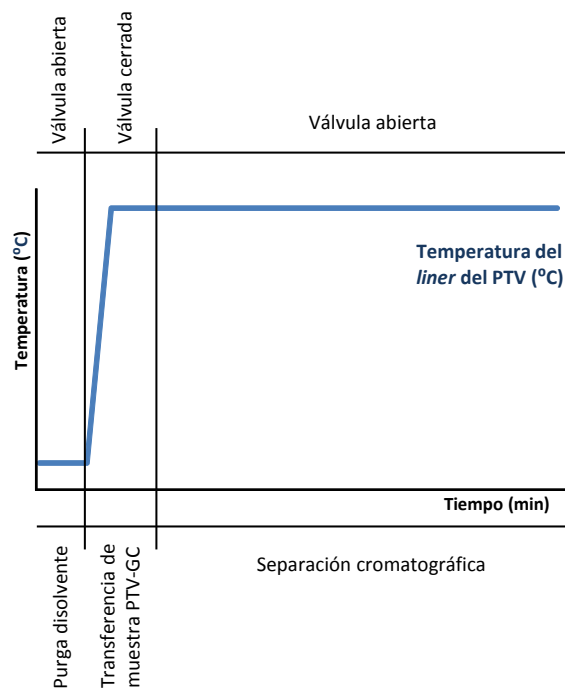


Figura 5: Esquema del modo de inyección *solvent vent*

De manera general, la finalidad de la purga es la eliminación del disolvente a baja temperatura, por lo que es necesario que el punto de ebullición de los analitos sea mayor que el del disolvente. Cuanto mayor sea esta diferencia mejor funcionará este modo de inyección [93]. Sin embargo, el modo de inyección *solvent vent* también puede ser aplicado incluso con analitos de “bajo punto” de ebullición (inferior al del disolvente). En este caso, se consiguen buenos resultados tanto de sensibilidad como de reproducibilidad utilizando *liners* empacados con adsorbentes apropiados que retengan los analitos durante el proceso de purga del disolvente [94]. Se han utilizado *liners* con diferentes

materiales de relleno. En los primeros estudios realizados por Herraiz [95] y colaboradores se utilizaron Tenax-TA® y lana de vidrio. Más adelante se estudiaron otras alternativas como el politetrafluoroetileno y la poliimida [96]. Hoy día existen liners empaquetados comercialmente disponibles con diferentes tipos de rellenos, tanto de sílice (lana de vidrio o lana de cuarzo) como polímeros orgánicos, como Tenax-TA®, polidimetilsiloxano, Carbotrap® B y Carbotrap® C. A pesar de sus ventajas, hay que tener en cuenta, también que en algunas ocasiones estos rellenos pueden tener efectos negativos, tales como degradación de los compuestos, retención excesiva o irreversible de los analitos como consecuencia de su afinidad con el material de relleno, problemas de contaminación cruzada (*carry over*) y limitaciones en cuanto a la temperatura de trabajo [97]. Como alternativa también existen *liners* vacíos con diferentes configuraciones: recto convencional, con configuración en zig-zag o recto con muesca, utilizándose fundamentalmente para el análisis de compuestos poco volátiles que no se eliminan al purgar el disolvente.

A partir del modo de inyección *solvent vent* han surgido nuevas modificaciones, cuya finalidad es la de posibilitar la inyección de volúmenes de muestra incluso mayores.

Una posibilidad es la de repetir varias veces la inyección de la muestra, mediante un proceso denominado inyección múltiple [98]. En este caso la evaporación del disolvente se produce varias veces consecutivamente y al final de las inyecciones, el PTV se calienta hasta la temperatura requerida para que todos los analitos pasen a la columna cromatográfica.

En cuanto a las aplicaciones de este dispositivo, las ventajas del PTV, junto a la disponibilidad comercial de este tipo de inyectoras, han hecho que sea altamente atractivo para el análisis de compuestos a nivel de trazas. Su uso para la inyección de muestras líquidas se ha aplicado en la determinación de especies de interés sanitario, ambiental y alimentario, tales como cannabinoides en fluidos biológicos [99], fenoles [100], compuestos polibromados [101], hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) [102,103], aldehídos [104], pesticidas [55,93,105] y fármacos [106], entre otros. Tradicionalmente se ha utilizado para la inyección de muestras líquidas, aplicación en la que, como se ha descrito previamente, aporta nuevas posibilidades respecto a los inyectores convencionales. Sin embargo, se han aprovechado las ventajas que presenta este tipo de inyectores en distintas configuraciones instrumentales proponiéndose otros acoplamientos.

En un artículo publicado en 1993 por J. Efer y colaboradores, se utilizaba la configuración HS-PTV para la determinación de Ethepon (ácido 2-cloroetilfosfónico), un regulador del crecimiento de plantas, en agua de consumo. El HS utilizado tenía un sistema de inyección manual, de forma que los volátiles se extraían del vial mediante una jeringa y posteriormente se inyectaban en el *liner* del PTV [107]. Más recientemente, la configuración HS-PTV-GC automatizada se ha utilizado para la determinación de monóxido de carbono en filetes de atún [108] y benceno, tolueno, etilbenceno y xileno en aceite de oliva [109]. Nuestro grupo de investigación ha adquirido una amplia experiencia en la utilización de este acoplamiento [29,33,70,94,110-116]. En relación con el acoplamiento HS dinámico con un PTV, se ha utilizado para la determinación de compuestos organoestánicos [117] y

compuestos halogenados volátiles [118] en muestras acuosas.

En el caso de matrices ambientales, como el agua o los suelos y matrices biológicas como la orina o la saliva, el principal componente del espacio de cabeza es el vapor de agua. En estos casos es muy útil el uso de *liners* empacados con Tenax-TA®, un polímero hidrofóbico especialmente diseñado para retener compuestos orgánicos, mientras el vapor de agua se elimina por la válvula de desecho.

Combinando el uso de estos *liners* rellenos y el modo de inyección *solvent vent*, se resuelven, además del acoplamiento HS-PTV que se ha comentado, los problemas del acoplamiento HS-GC, ya que aporta las ventajas de la inyección en frío (focalización de los compuestos en el inyector y rápida transferencia de los mismos a la columna cromatográfica) y además da lugar a mejores niveles de sensibilidad, gracias a la eliminación del disolvente antes de la introducción de los analitos en la columna [70,110-112].

Se ha explorado, también, la posibilidad de utilizar este tipo de dispositivos en narices electrónicas basadas en el acoplamiento de un generador de espacio de cabeza y un espectrómetro de masas con el fin de aumentar la sensibilidad de la técnica mediante el modo de inyección *solvent vent* [83].

Se han propuesto otras aplicaciones con inyectores PTV, como la posibilidad de utilizarlos como mecanismo de preparación de muestra, mediante la combinación con técnicas de microextracción o con procesos de derivatización, simplificando así esta etapa y consiguiendo el acoplamiento en línea de GC con los procesos de pretratamiento de la

muestra [119,120].

En aplicaciones que incluyen una etapa de termodesorción como la extracción mediante barra agitadora (SBSE), resulta útil aprovechar, posteriormente, las ventajas de la focalización de los compuestos que permite el modo de inyección *solvent vent* de un PTV [121-123].

3. FASES ESTACIONARIAS DE LÍQUIDOS IÓNICOS

La investigación con líquidos iónicos es una de las áreas de estudio de mayor crecimiento en los últimos años. El amplio número de usos y aplicaciones que se pueden dar a estos líquidos iónicos ha hecho que se les haya encontrado utilidad en campos muy diferentes dentro de la química y otras ciencias afines.

El término “líquidos iónicos” hace referencia a un tipo de sales orgánicas que tienen un bajo punto de fusión. Gracias a esta propiedad se mantienen líquidas en un amplio intervalo de temperaturas en lugar de formar cristales. Su composición química consiste en cationes orgánicos asociados con aniones que pueden ser inorgánicos u orgánicos. Los cationes orgánicos más habituales en este tipo de compuestos contienen nitrógeno o fósforo [124]. Algunos de los cationes más utilizados se muestran a continuación (figura 6):

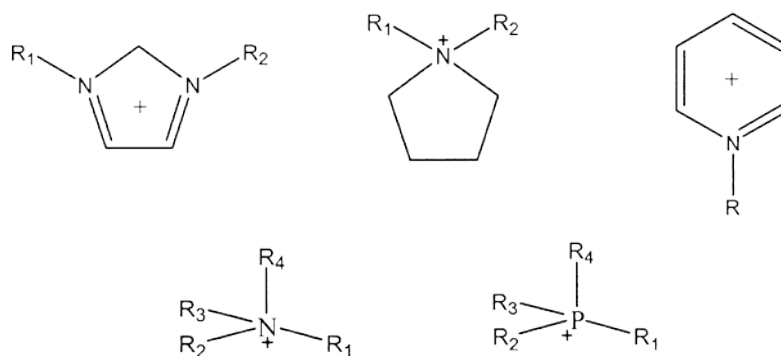


Figura 6: Cationes más comúnmente utilizados en la síntesis de líquidos iónicos

Las cadenas alquílicas (R) más usadas son: metil, etil, propil, butil, hexil, octil y decil. Los aniones (figura 7) pueden ser inorgánicos, como Cl^- , BF_4^- y PF_6^- , pero normalmente consisten en aniones orgánicos como

trifluoroetanoato $[\text{CF}_3\text{CO}_2]^-$, trifluorometilsulfonato $[\text{CF}_3\text{SO}_3]^-$ y bis[(trifluorometil)sulfonyl]imida $[\text{N}(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2]^-$ [125].

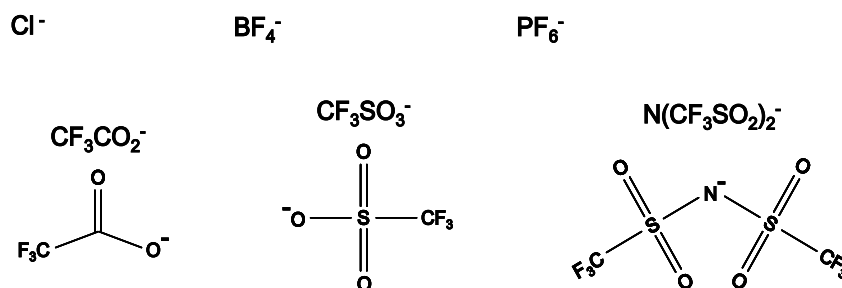


Figura 7: Aniones más comúnmente utilizados para la síntesis de líquidos iónicos

Estos líquidos iónicos presentan características especiales [125], alta estabilidad frente a la temperatura (siendo estables hasta los 300 °C), baja volatilidad, capacidad para conducir la electricidad, amplio rango de viscosidades y capacidad de solubilizar una gran variedad de moléculas muy diferentes. Todas estas propiedades, junto con el hecho de que pueden ser sintetizados de manera que sean inmiscibles tanto en agua como en disolventes orgánicos no polares, les confieren numerosas utilidades en campos muy diferentes dentro de la química. Concretamente, en química analítica los líquidos iónicos pueden utilizarse como disolventes de extracción en técnicas de preparación de muestra, como aditivos para las fases móviles en cromatografía de líquidos, como modificadores de la pared de los capilares de electroforesis y como sensores. En el campo de la cromatografía destaca su utilización como fases estacionarias tanto en columnas de cromatografía líquida, como en columnas capilares de cromatografía de gases.

3.1. Pretratamiento de muestra

En el conjunto de etapas del proceso analítico, la preparación de la muestra juega un papel determinante en la calidad de los resultados obtenidos. En esta etapa se incluye la eliminación de interferencias y la preconcentración de los analitos. Los líquidos iónicos han sido utilizados tanto en extracción líquido-líquido como en extracción en fase sólida.

En extracción líquido-líquido, se ha propuesto la utilización de líquidos iónicos para la extracción y determinación de iones metálicos de disoluciones acuosas [126], pequeñas moléculas orgánicas [127] y especies de interés biológico [128]. También se han utilizado líquidos iónicos combinados con técnicas de extracción asistida por microondas (MAE) [129] y asistida por ultrasonidos (UAE) [130].

En extracción en fase sólida los líquidos iónicos se han utilizado para modificar los materiales clásicos de SPE y aumentar la selectividad. Estos materiales modificados se han utilizado para la extracción de ácidos orgánicos, aminas, aldehídos en aerosoles y productos farmacéuticos en aguas [131].

También se han propuesto aplicaciones con líquidos iónicos en algunas de las metodologías de microextracción desarrolladas para reducir el volumen de disolventes orgánicos y los largos tiempos de trabajo requeridos con los procedimientos de extracción referidos anteriormente. Así, se han utilizado líquidos iónicos como extractantes en microextracción en fase líquida (LPME) [132], en las modalidades de microextracción en fase líquida mediante membrana porosa (HF-LPME) [133], en microextracción en una sola gota (SDME) [134] y en

microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) [135]. Los líquidos iónicos también se han utilizado para mejorar las diferentes modalidades de microextracción en fase sólida (SPME) pudiendo ser empleados como extractantes, recubriendo la fase sólida [136], o como disolventes de desorción [137].

Se ha propuesto la utilización de los líquidos iónicos también en nuevos métodos de extracción en fase sólida, como los que utilizan nanopartículas magnéticas, donde los líquidos iónicos son utilizados como recubrimiento de esas nanopartículas superficialmente porosas (*core-shell*) [138].

3.2. Sistemas de detección

Los líquidos iónicos también han sido utilizados en sistemas de detección con aplicaciones en espectrometría de masas, electroquímica, espectroscopia y en diferentes tipos de sensores.

En espectrometría de masas, las singulares propiedades de los líquidos iónicos (baja volatilidad y amplio rango de solubilidad frente a diferentes tipos de compuestos) los convierten en compuestos idóneos para su utilización como matrices en la técnica de desorción/ionización mediante láser asistida por una matriz (MALDI-MS). Las matrices de líquidos iónicos presentan mayor homogeneidad que las matrices sólidas y son más resistentes al alto vacío de la espectrometría [139].

La ionización por electrospray es uno de los métodos más sensibles para la detección de aniones. Sin embargo, la detección en modo negativo presenta serios problemas debido al bajo peso molecular de muchos de ellos. La sensibilidad y selectividad de este método se ve

muy favorecida por la formación de complejos cargados positivamente. Éstos resultan de la unión entre un anión y un líquido iónico dicatiónico utilizado como agente de vinculación [139].

Debido a las propiedades intrínsecas de los líquidos iónicos (su alta conductividad eléctrica y baja volatilidad), son muchas las aplicaciones de estos compuestos en el campo de la electroquímica. La conductividad de los líquidos iónicos se ve afectada por la estructura tanto de sus cationes como de sus aniones, por lo que sus valores varían entre 0.1 y 18 mS cm⁻¹ [140]. Estos valores son, sin embargo, mucho menores que los de disoluciones acuosas convencionales, los cuales superan en muchos casos los 500 mS cm⁻¹. Además, los líquidos iónicos presentan una ventana de potencial electroquímico entre 4 y 5 voltios, límites similares a los de los electrolitos orgánicos y bastante mayores que los de electrolitos acuosos [140], y pueden utilizarse para fabricar electrodos [141]. Entre ellos destacan los diseñados con nanotubos de carbono con varias paredes (MWCNT) y diferentes líquidos iónicos [142,143]. Este tipo de electrodo tiene mayor sensibilidad y estabilidad que otros electrodos basados en nanotubos de carbono.

Cuando se utilizan líquidos iónicos como electrolitos, sus disoluciones son más estables a elevados potenciales que las disoluciones acuosas. En este sentido, algunos líquidos iónicos tricatiónicos, aquellos con estructura lineal que presentan una flexibilidad estructural muy elevada, son especialmente útiles debido a sus ventajas como electrohumectantes [144].

En espectroscopia los líquidos iónicos han sido utilizados ampliamente como disolventes debido a su capacidad para disolver una

gran variedad de compuestos. En espectroscopia de infrarrojo (IR) y Raman los líquidos iónicos, en especial los quirales, realizan además de esta función, la de selectores quirales [145]. En espectroscopia de fluorescencia, los líquidos iónicos basados en 1-metilimidazolio y clorometil metil éter parecen afectar a las propiedades del estado excitado modificando así las señales fluorescentes de compuestos como el naproxeno y análogos [146].

Finalmente, los líquidos iónicos se han utilizado en la fabricación de diferentes tipos de sensores. En sensores electroquímicos los líquidos iónicos funcionan como electrolito no volátil en sensores de gases y permiten eliminar las membranas que generalmente se necesitan en las configuraciones convencionales para separar la muestra del electrolito y puede utilizarse incluso en condiciones muy extremas de temperatura [147]. Además, minimiza el agua absorbida de forma que el funcionamiento del sensor está menos afectado por la humedad. La elevada viscosidad, sin embargo, hace que estos sensores tengan respuestas lentas y reacciones redox irreversibles [148].

En los sensores ópticos, los líquidos iónicos actúan como modificadores de la matriz del sensor o como recubrimiento de dispositivos colorimétricos, facilitando la preconcentración de los analitos y su transporte a los electrodos [149].

3.3. Técnicas de separación

La utilización de líquidos iónicos en técnicas de separación abarca tanto la electroforesis capilar como las cromatografías líquida y de gases.

En electroforesis capilar, los líquidos iónicos se han utilizado para

modificar las propiedades de la pared de los capilares de sílice que habitualmente se utilizan en las separaciones electroforéticas. Se ha propuesto la utilización de líquidos iónicos que se unen por medio de enlaces covalentes a las paredes de los capilares invirtiendo el flujo electroosmótico [150]. Esta inversión permite la separación de compuestos fuertemente retenidos por los capilares de sílice fundida sin modificar mejorando en algunos casos la reproducibilidad gracias a estas uniones. Esta metodología ha sido utilizada para la separación de proteínas ácidas y básicas [151] y de derivados bioactivos de flavonas [152].

Además de su extenso uso como modificadores de la pared de los capilares, los líquidos iónicos se han utilizado también como aditivos del tampón de separación. De este modo permiten la separación de pequeños aniones orgánicos e inorgánicos, ya que su adición reduce significativamente el flujo electroosmótico [153]. En electroforesis capilar en medios no acuosos los líquidos iónicos se han usado como modificadores de la disolución tampón debido a su buena conductividad eléctrica sustituyendo a los modificadores orgánicos convencionales [154]. También se emplean con esta función en electroforesis capilar micelar [150] en la que además se pueden usar como tensoactivos [155].

En cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se utilizan, habitualmente, fases estacionarias con gel de sílice como soporte sólido. Este soporte presenta grupos silanol residuales en su superficie que afectan a la separación y, de forma general, se bloquean con la adición de aminas. Una alternativa a estos compuestos son los líquidos iónicos

aceptores de protones [156].

También en cromatografía líquida, los líquidos iónicos actúan como modificadores orgánicos de la fase móvil. La selectividad de esta fase se ve condicionada por las propiedades ácido-base de estos líquidos, el tamaño de los cationes y la naturaleza de los aniones [157]. La adición de líquidos iónicos a la fase móvil mejora tanto la eficacia de la separación como la morfología de los picos cromatográficos [158].

Recientemente se han desarrollado fases estacionarias basadas en líquidos iónicos para cromatografía líquida en sus distintas modalidades [159].

En cromatografía de fase reversa se han utilizado fases estacionarias modificadas con diferentes líquidos iónicos que, en algunos casos, permiten mejorar la separación de enantiómeros [160]. En la modalidad de cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) se han desarrollado nuevas fases estacionarias con estos líquidos [161].

También se han aprovechado las peculiares características de estos líquidos iónicos que permiten nuevas interacciones y por ello se han propuesto como modificadores de la fase estacionaria en cromatografía de modo mixto (MMC) [162].

La investigación en el uso de sales fundidas como fases estacionarias en cromatografía de gases (GC) comenzó en los años 50. Barber y colaboradores [163] prepararon fases estacionarias utilizando estearatos fundidos de Mn, Co, Ni, Cu y Zn para separar alcoholes y aminas. Poole y colaboradores [164,165] prepararon y probaron fases estacionarias de nitrato de etilamonio y bromuro de etilpiridinio. Estas actúan como

fases estacionarias polares y sus interacciones dipolares o de enlaces por puentes de hidrógeno contribuyen significativamente a la retención. Sin embargo, estas primeras columnas presentaban todavía algunos inconvenientes, como una baja eficiencia y una pobre estabilidad térmica.

Las primeras fases estacionarias de líquidos iónicos con las que se obtuvieron buenos resultados fueron las de imidazolio [166]. Concretamente, se utilizaron sales de hexafluorofosfato y cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio ([BMIM][PF₆] y [BMIM][Cl]) para recubrir las paredes de columnas capilares de sílice. Las propiedades de estas fases estacionarias se examinaron por medio de cromatografía en fase inversa con un gran número de moléculas prueba. Estas columnas muestran un doble comportamiento ya que retienen tanto compuestos polares como no polares [167].

En 2005, se consiguieron mediante entrecruzamiento (*cross-linking*) fases estacionarias de alta estabilidad y selectividad utilizando una pequeña cantidad de radicales libres como iniciadores [168]. Más recientemente se han desarrollado nuevas fases estacionarias de alta estabilidad que permanecen estables hasta 350 °C [169,170].

Una de las características que hace que los líquidos iónicos sean buenas fases estacionarias es el amplio rango de temperaturas en el que se mantienen líquidos, permitiendo aumentar el margen de temperaturas de trabajo. Además, estos compuestos son poco volátiles y, por consiguiente, las columnas con fases estacionarias de líquidos iónicos tienen un menor sangrado y una vida útil más larga. La ausencia de grupos hidroxilo las hace más estables ante la humedad y el oxígeno.

La posibilidad de sintetizarlas con distintos grupos catiónicos y aniónicos, así como con distintas longitudes de cadena permite dotarlas de una selectividad “a la carta”.

La separación que se consigue con estas fases estacionarias depende, en gran medida, de la naturaleza de los cationes y los aniones de los líquidos iónicos. A partir de los estudios realizados se ha llegado a la conclusión de que los líquidos iónicos monocatiónicos no tienen propiedades cromatográficas tan buenas como los policatiónicos, siendo los más utilizados los dicatiónicos.

En cuanto a la organización de los componentes de estas sales dicatiónicas, los cationes se encuentran unidos por medio de una cadena carbonada de longitud variable y asociados a estos cationes, los correspondientes aniones. Un ejemplo de la estructura de uno de estos líquidos dicatiónicos se observa en la figura 8.

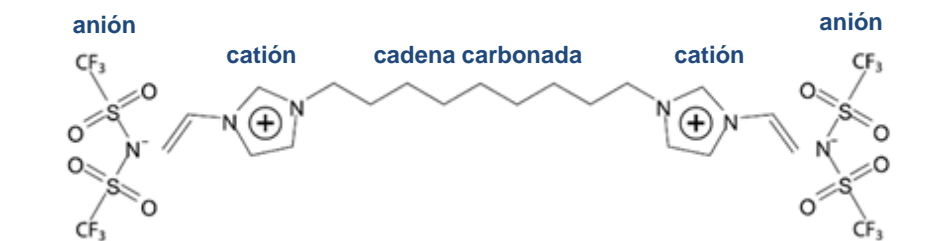


Figura 8: Estructura del líquido iónico dicatiónico utilizado en las columnas de fase estacionaria SLBTM-IL100, bis(trifluorometilsulfonyl)imidato de 1,9-di(3-vinilimidazolio)nonano

Teniendo en cuenta todo esto, a partir de los trabajos realizados por el profesor Daniel W. Armstrong de la Universidad de Texas en Arlington, EE. UU. [171], la casa comercial Supelco (Bellefonte, PA, USA) lanzó al mercado las primeras fases estacionarias de líquidos iónicos, que se encuentran desde entonces comercialmente disponibles y que serán

objeto de estudio en el primero de los trabajos que se describen en esta memoria.

Con algunas de estas columnas comerciales con fases estacionarias de líquidos iónicos se ha propuesto la determinación de nitrosaminas y metabolitos de la cafeína en aguas de desecho eligiéndose como óptima para la separación, en el caso de las primeras, la columna SLBTM-IL111 basada en el líquido iónico *bis(trifluorometilsulfonil)imidato de 1,5-di(2,3-dimetilimidazolio)pentano* y en el caso de los segundos compuestos, la columna SLBTM-IL59 a base de *bis(trifluorometilsulfonil)imidato de 1,12-di(tripropilfosfonio)dodecano* [172]. En esta misma matriz se ha estudiado la determinación de benzotiazoles y benzotriazoles con cinco fases estacionarias de líquidos iónicos mejorándose su separación, que resulta muy problemática utilizando columnas convencionales, y siendo de nuevo la columna SLBTM-IL59 la que mejores resultados proporciona [173]. Para el análisis de policlorobifenilos (PCBs) y pesticidas organoclorados se propuso la utilización de una columna SLBTM-IL111 [174]. Esta columna, además, fue la que mejores resultados proporcionó entre cinco columnas estudiadas en otro trabajo en el que se estudiaban las posibilidades que ofrecía el uso de este tipo de fases estacionarias en cromatografía multidimensional (GCxGC). Los líquidos iónicos alteran el orden de elución de algunos compuestos y resultan adecuados para su uso en esta modalidad de cromatografía de gases como columna secundaria [175,176].

Se ha propuesto la utilización de estas columnas para el estudio de contaminantes orgánicos (clorobencenos) en suelos [177]; en este trabajo se estudiaron cuatro columnas entre las que finalmente se seleccionó la

columna SLBTM-IL82 a base de *bis(trifluorometilsulfonyl)imidato de 1,12-di(2,3-dimetilimidazolio)dodecano* como óptima para la separación de estos compuestos.

No obstante, a pesar de la existencia de columnas comercialmente disponibles con diferentes fases estacionarias de líquidos iónicos, son muchos los trabajos que se han realizado en los últimos años en los que se proponen nuevos líquidos iónicos como fases estacionarias de cromatografía de gases [178,179]. Así, recientemente se han propuesto una serie de fases estacionarias basadas en guanidinio [180,181]. Otro grupo de líquidos iónicos que ha recibido creciente interés es el de los basados en aminoácidos (AAILs) ya que se han propuesto como compuestos más biodegradables y biocompatibles que los líquidos iónicos convencionales y se han descrito en aplicaciones como el análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) en grasa láctea mediante una fase estacionaria con un líquido iónico monocatiónico de imidazolio derivado de la L-fenilalanina [182].

Muchos trabajos, además, se centran en la caracterización de estas nuevas fases y de las interacciones que presentan estudiando la constante de McReynolds y el modelo de solvatación de Abraham [180,182].

Algunas de estas nuevas fases estacionarias, además, han sido propuestas con el objetivo de mejorar algunas de las características de las comercialmente disponibles y así alargar su vida útil haciéndolas más estables [175,176].

4. OLFATOMETRÍA ELECTRÓNICA BASADA EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Los procedimientos utilizados para resolver la mayoría de los problemas analíticos implican obtener información sobre los compuestos individuales de una mezcla. El tratamiento de la muestra incluye generalmente etapas de separación y es, en la mayoría de los casos, la parte más costosa de todo el proceso analítico. Además, suele ser, también, la etapa más larga y una de las mayores fuentes de error. El procesado de los datos suele ser sencillo y la información obtenida se utiliza para detectar, identificar y cuantificar los analitos.

Sin embargo, en algunas ocasiones no es necesario disponer de información individual sobre los compuestos de una muestra y el problema que se plantea puede resolverse satisfactoriamente con ciertas señales de perfil del conjunto de un grupo de compuestos. La información contenida en los datos se extrae mediante la aplicación de técnicas quimiométricas. En este caso, la manipulación de la muestra se reduce considerablemente, con lo que disminuyen los errores asociados a esta etapa y el tiempo total de análisis es muy corto al no ser necesarios procesos cromatográficos.

El desarrollo de metodologías que permiten la reducción de la etapa de preparación de muestra es, por tanto, una de las tendencias actuales en Química Analítica. El objetivo es obtener la información necesaria para resolver el problema que se plantea en el menor tiempo posible y reducir el coste del análisis.

Los métodos no separativos pueden utilizarse como criba de

muestras (presencia/ausencia de una característica). Estos métodos sirven para descartar muestras negativas y de esta manera reducir el número de muestras que precisan métodos confirmatorios (más lentos, laboriosos y costosos, generalmente) a las muestras con respuesta positiva.

Algunas de las técnicas basadas en este tipo de generación de señales del conjunto de componentes de una muestra son: espectroscopia en el infrarrojo cercano (NIR) [183,184] e infrarrojo medio (MIR) [185], espectroscopia ultravioleta-visible [186] y pirólisis acoplada a espectrometría de masas [187], entre otros. También puede incluirse en este grupo de técnicas la que suele denominarse olfatometría electrónica.

4.1. Olfatometría electrónica

La olfatometría electrónica es una metodología de análisis que responde al esquema de los métodos no separativos en la que se miden las señales del conjunto de compuestos volátiles de una muestra. Puede ser considerada como una aproximación artificial al sistema olfativo humano diseñada para proporcionar una herramienta rápida y eficaz en el estudio de olores.

4.1.1. Equipos basados en sensores de gases

El primer informe sobre un instrumento olfativo fue publicado en 1964 por Hartman y colaboradores [188]. El equipo estaba constituido por una serie de ocho celdas electroquímicas diferentes que proporcionaron distintos patrones de respuesta para varias muestras de

olores.

En 1965, otros dos grupos de investigación, Buck y colaboradores [189] y Dravnieks y Trotter [190], publicaron estudios sobre “narices electrónicas”.

Posteriormente, Persaud y Dodd [191] demostraron la capacidad de un conjunto de sensores para la diferenciación de olores sin utilizar receptores altamente específicos. Sin embargo, fue a mediados de los años 80 en la Universidad de Warwick (Reino Unido) cuando surgió la primera “nariz” como una herramienta rápida y prometedora para la discriminación de olores [192].

Grate y su equipo del Laboratorio de Investigación Naval de los Estados Unidos construyeron un dispositivo capaz de detectar sustancias químicas y agentes tóxicos [193].

Hoy en día se acepta la definición de “nariz electrónica” dada por Gardner y Barlett en 1994 [194]. Éstos la definen como un instrumento que comprende un conjunto de sensores químicos electrónicos con cierta especificidad y un sistema de reconocimiento de pautas adecuado, capaces de reconocer olores simples y complejos.

La comercialización de este tipo de instrumentos no llegó hasta la mitad de los años 90 debido principalmente a la complejidad del problema y a la necesidad de tecnologías avanzadas.

Entre los diferentes sensores utilizados en estas “narices electrónicas” se encuentran los óxidos metálicos, polímeros conductores, sensores de ondas acústicas y los ópticos. Las propiedades de todos ellos cambian

transitoriamente en presencia de ciertos compuestos volátiles. Los instrumentos comerciales trabajan principalmente con los dos primeros tipos de sensores [195].

Las etapas del proceso de medida con esta configuración instrumental son tres. En primer lugar, la muestra se deposita en un vial y se calienta a una cierta temperatura durante un periodo de tiempo hasta que se alcanza el equilibrio. Posteriormente, una fracción de los volátiles generados se inyecta y se introduce en la cámara de los sensores. Finalmente, la variación de la respuesta de los sensores con el tiempo se trata adecuadamente para convertirla en información útil.

Actualmente, la olfatometría electrónica basada en sensores está en pleno desarrollo [196-198]. La investigación básica en este campo involucra áreas de conocimiento tan dispares como tecnología de sensores electroquímicos, física del estado sólido y polímeros, entre otras. La aparición y desarrollo de nuevos diseños de sensores ha proporcionado un mayor número de campos de aplicación. Se han desarrollado varios dispositivos basados en sensores de polímeros conductores, sensores ópticos, piezoeléctricos, sistemas complejos de sensores (*microarrays*) y sensores basados en nuevos nanomateriales para ser utilizados en la resolución de diversos problemas en campos tan diferentes como la alimentación [199-202], el medioambiente y la seguridad [203] y la detección de explosivos [204,205]. También en el campo médico y diagnóstico se han propuesto varias aplicaciones que utilizan sensores para la discriminación de individuos sanos y enfermos [206,207].

De manera similar a las “narices electrónicas” se han desarrollado

diferentes configuraciones instrumentales para el análisis de muestras líquidas denominadas “lenguas electrónicas”. La técnica de medida incluye, generalmente, distintos sensores químicos potenciométricos y, de nuevo, la información relevante contenida en la señal registrada se extrae mediante la aplicación de técnicas quimiométricas. Entre otras aplicaciones se han utilizado para la detección de contaminación en aguas [208] y el análisis de alimentos [199].

4.1.2. Equipos basados en espectrometría de masas

Como alternativa a las “narices electrónicas” de sensores de gases se han desarrollado instrumentos basados en la espectrometría de masas. En algunas configuraciones se utiliza una membrana como interfase entre la muestra que se quiere analizar y el espectrómetro de masas y en otras se acopla directamente un analizador de masas a un sistema de inyección de líquidos o bien a un generador de espacio de cabeza.

Las etapas del proceso de medida con esta configuración instrumental son idénticas a las ya descritas anteriormente. La respuesta que se obtiene suele estar constituida por un elevado número de picos que corresponden a los fragmentos iónicos generados y que se caracterizan por su relación masa/carga (m/z). La mezcla de compuestos da lugar a un espectro de masas complejo, con señales formadas por las contribuciones de varios compuestos. De modo análogo a como se trabaja con un conjunto de sensores, las señales obtenidas se tratan mediante técnicas quimiométricas.

La utilización de una membrana como interfase en estos instrumentos es una técnica que permite la introducción directa y selectiva de componentes específicos de un gas o un líquido en un

espectrómetro [209]. La técnica se denomina introducción a través de membrana en espectrometría de masas (MIMS).

El analito se introduce en la fuente de ionización del analizador de masas a través de una membrana semipermeable en un proceso conocido con el nombre de pervaporación [210]. Éste incluye tres etapas: adsorción de los analitos sobre la membrana, difusión y desorción. La exclusión que realiza la membrana sobre posibles compuestos iónicos, sólidos en suspensión o compuestos con alto peso molecular elimina la necesidad de una etapa de preparación de la muestra.

La información cuando se utiliza cromatografía es, por supuesto, más completa [211] pero con la técnica MIMS es posible diferenciar grupos de compuestos en un tiempo menor de análisis. Aprovechando esta ventaja, se ha propuesto el método MIMS para el análisis rápido de compuestos orgánicos volátiles en aire y agua y de ingredientes activos en fármacos [212].

Mendes y colaboradores [213] utilizaron una aproximación similar basada en la utilización de una membrana como interfase para la introducción directa de los compuestos volátiles generados en el espacio de cabeza en un espectrómetro de masas. La técnica, denominada HS-MIMS, se utilizó para el análisis de trazas de compuestos orgánicos volátiles en suelos.

Marsili [214] utilizó un equipo de cromatografía de gases con detección mediante espectrometría de masas en el que sustituyó el cromatógrafo de gases por una columna de sílice fundida desactivada, que sirvió como línea de transferencia para introducir en el

espectrómetro los compuestos volátiles generados. Esta configuración instrumental se aplicó al estudio de muestras de leche desnatada sin tratar y sometidas a diferentes condiciones de luz, calor y contaminación microbiana. La nueva técnica es rápida y proporciona ventajas significativas con respecto a las “narices” de sensores.

Las configuraciones instrumentales más habituales utilizadas actualmente en olfatometría electrónica basada en espectrometría de masas consisten en el acoplamiento directo de un generador de espacio de cabeza (HS) a un espectrómetro de masas (MS) o, como se ha comentado anteriormente, el uso de un equipo convencional de generación de espacio de cabeza-cromatografía de gases-espectrometría de masas en el que o bien la columna cromatográfica se reemplaza por un capilar corto desactivado o la temperatura del horno del cromatógrafo se mantiene durante todo el tiempo de análisis lo suficientemente alta como para evitar la retención de los compuestos volátiles inyectados. Esta última posibilidad permite, además, no tener que cambiar la interfase cuando se realicen análisis cromatográficos.

Cuando la metodología de generación de espacio de cabeza acoplada a espectrometría de masas (HS-MS) se compara con la cromatografía de gases con el mismo sistema de detección, la primera proporciona una respuesta muy rápida, pero contiene menos información, como es habitual siempre que se utilizan métodos no separativos. Cuando se utilizan los métodos cromatográficos convencionales, el tiempo de análisis de una muestra está determinado por el tratamiento que ésta requiere y por el propio del análisis cromatográfico.

El sistema de detección de la configuración generador de espacio de

cabeza-espectrómetro de masas (HS-MS) es más estable que los utilizados en “narices electrónicas” de sensores de gases y permite realizar medidas en presencia de especies que saturan y, por tanto, inutilizarían los sistemas de sensores de gases. Estos nuevos sistemas, por ejemplo, no se ven afectados por el agua ni por el alcohol. Por otro lado, el analizador de masas puede considerarse como un “sistema abierto de sensores” en el que es posible seleccionar el conjunto de relaciones m/z (“sensores”) adecuado para cada aplicación.

Nuestro grupo de investigación ha comprobado las posibilidades de utilización del acoplamiento directo de un generador de espacio de cabeza a un espectrómetro de masas en diversos problemas analíticos. La técnica se aplicó con éxito a la detección de distintas adulteraciones en aceites de oliva [215] así como en la diferenciación de aceites procedentes de distintos tipos de aceituna [216].

En el campo medioambiental se ha utilizado para la detección de contaminación por hidrocarburos derivados del petróleo en suelos [217,218] y arenas de playa [63].

En la industria farmacéutica se aplicó esta técnica para la determinación de disolventes residuales en fármacos [219].

En el campo de la biomedicina se ha puesto a punto recientemente un método para la determinación de biomarcadores volátiles en saliva [82].

Otros grupos de investigación han utilizado configuraciones instrumentales similares fundamentalmente en el campo de la alimentación [220-220]. También la industria del automóvil ha utilizado esta configuración para el estudio del olor de los revestimientos de los

automóviles [223] que pueden ser desagradables para el conductor.

Sin embargo, este tipo de narices electrónicas ha sido poco utilizado [83] en el campo biomédico a pesar de las grandes ventajas que aporta: mayor número de sensores en cada análisis, no se produce envenenamiento del sensor y una mayor estabilidad de la señal.

Con el objetivo de aumentar la sensibilidad de estos instrumentos, se han propuesto acoplamientos que permiten la preconcentración mediante etapas adicionales como la microextracción en fase sólida [224] y la purga y trampa [225]. Más recientemente se ha propuesto también la incorporación de un inyector de temperatura programada (PTV) con el mismo objetivo [83]. Esta nueva configuración en el análisis no separativo permite alcanzar límites de detección del orden de los pocos $\mu\text{g L}^{-1}$.

5. TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS

La Quimiometría puede definirse como una disciplina química que utiliza métodos matemáticos y estadísticos con dos objetivos principales: diseñar procedimientos de medida o experimentos y extraer la máxima información útil a partir del análisis de datos [226].

Dentro de la Quimiometría pueden citarse los métodos de diseño experimental y exploración de datos, los métodos de reconocimiento de pautas, calibración simple y multivariante, así como los sistemas expertos e inteligencia artificial, entre otros.

El diseño experimental propone una alternativa en la planificación de experimentos frente a la técnica clásica de estudiar cada variable por separado. El método tradicional puede no ser adecuado en muchas ocasiones porque asume que el valor de una variable que influye en la respuesta es independiente del valor de las otras y no tiene en cuenta la posibilidad de interacción entre ellas. El diseño experimental, por el contrario, permite estudiar el efecto de las variables en la respuesta y detectar posibles interacciones entre ellas. Además, se utiliza para modelar la relación entre las variables y la respuesta con el menor número de experimentos posible [226].

Entre las aplicaciones fundamentales [227-229] de esta técnica se encuentra, por una parte, su utilización como técnica para la selección de variables [230] y, posteriormente, optimización de las mismas [231] y, por otra, para la calibración en situaciones complejas como es la determinación de compuestos de una mezcla [232].

Los métodos de reconocimiento de pautas tienen la finalidad de clasificar o agrupar muestras según las características de las mismas [233]. Pueden distinguirse dos tipos de técnicas de reconocimiento de pautas: supervisadas y no supervisadas.

Las técnicas no supervisadas tienen como objetivo determinar relaciones entre muestras sin utilizar ninguna información previa con respecto a la pertenencia de dichas muestras a determinadas clases. Permiten conocer la existencia de estructuras en los datos y tener una idea de la utilidad de la información contenida en los mismos. Entre estos métodos se encuentran el análisis de agrupamientos, una de cuyas modalidades es el agrupamiento jerárquico (HCA) en el que las muestras se asocian en función de unos índices de similitud, y el análisis de componentes principales (PCA), en el que se reduce la dimensión de un conjunto de datos mediante el cálculo de combinaciones lineales de las variables originales.

Las técnicas de reconocimiento de pautas supervisadas tienen como fin desarrollar reglas de clasificación para muestras (objetos) desconocidas a partir de un grupo de muestras conocidas que están caracterizadas por los valores de las variables medidas. El éxito de la predicción depende de que las reglas de clasificación y de que los límites marcados por ellas sean adecuados. La estrategia consta de tres etapas [227]:

- En la primera etapa se genera un modelo matemático que relaciona los valores de las variables medidas del conjunto de muestras con el grupo al que pertenecen. Estos objetos (muestras) reciben el nombre de conjunto de entrenamiento (*training set*).

- En la segunda etapa se determina la capacidad predictiva del modelo generado. Un parámetro representativo puede ser el porcentaje de objetos correctamente clasificados. Esto puede realizarse siguiendo distintos criterios. Dos de los más habituales son:

- Validación cruzada (*cross validation*).

La validación cruzada es una forma de validación interna del modelo. Una muestra o un conjunto pequeño de ellas se excluye del conjunto de entrenamiento y se construye un nuevo modelo sin las muestras excluidas. Con este nuevo modelo se comprueba la capacidad de predicción del modelo sobre esas muestras excluidas. El procedimiento se repite hasta que todas las muestras han quedado fuera del modelo al menos una vez.

- Validación externa (*test set*).

En este caso, para comprobar la calidad del modelo se realiza la predicción de un grupo independiente de muestras que no ha sido utilizado en ninguna etapa de la construcción del modelo. Se asume que estas muestras son desconocidas y se comparan los valores obtenidos tras aplicar el modelo con los valores reales conocidos.

- En la tercera etapa el modelo generado se aplica a muestras desconocidas.

Algunas de las técnicas más importantes de reconocimiento de pautas no supervisadas son el análisis discriminante (DA), el modelado independiente de clases (SIMCA), el modelo de las muestras apoyadas en la frontera o *support vector machines* (SVM), el método de los k vecinos más próximos (KNN) y las redes neuronales artificiales (ANN).

La Quimiometría también engloba los métodos de calibración. La calibración univariante tiene como objetivo obtener modelos que permitan predecir una variable respuesta a partir de otra variable correlacionada con la primera. Este método de calibración en el que solo se maneja una variable independiente, recibe el nombre de regresión lineal simple. La regresión lineal múltiple (MLR), es una extensión del modelo anterior en la que se utiliza más de una variable predictora o respuesta instrumental. Esta técnica permite extender el uso de la anterior a casos en los que en las muestras exista más de un compuesto cuya respuesta no se pueda medir individualmente, sin embargo, solo proporciona buenos resultados cuando se incluyen en el modelo todos los compuestos que contribuyen a la señal medida. Para solucionar este último supuesto, se utilizan técnicas de regresión multivariante que no requieren un modelo exacto para todos los compuestos presentes en las muestras y que se basan en concentrar toda la información de las variables medidas en un número menor de ellas sin pérdida de información relevante. Dentro de este tipo de calibración se encuentran la regresión por componentes principales (PCR) y la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS).

En esta memoria se han utilizado las siguientes técnicas quimiométricas:

- PCA, KNN, SIMCA, DA y SVM
- PLS
- Diseño experimental

A continuación, se describen brevemente los fundamentos de las diferentes técnicas utilizadas.

5.1. Técnicas de reconocimiento de pautas

5.1.1. Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (PCA) es una técnica de reconocimiento de pautas no supervisadas. Es una potente herramienta de visualización y, por ello, es muy utilizada para el análisis exploratorio de datos. El método trata de reducir la dimensión del conjunto de datos construyendo unas nuevas variables, ortogonales entre sí, que reciben el nombre de componentes principales (PCs) y que son combinaciones lineales de las variables primitivas.

En este análisis la matriz de datos X formada por I objetos o muestras y J variables (dimensión $I \times J$) se descompone en el producto de las matrices T y P que contienen la información relacionada con las muestras y con las variables respectivamente.

$$X = T \cdot P + E \quad (1)$$

En la expresión (1) la matriz T contiene las puntuaciones (*scores*),

valores de cada muestra en las nuevas variables, de I objetos en A componentes principales. La matriz P contiene los pesos (*loadings*), coeficientes en las variables originales para generar las nuevas, de J variables sobre A componentes principales. E es una matriz residual. Las matrices de puntuaciones y pesos consisten en una serie de vectores columna y fila respectivamente según muestra la figura 9. Ambas matrices están formadas por tantos vectores como PCs puedan calcularse. Estos vectores se representan como t_a y p_a donde a es el componente considerado y reciben el nombre de vectores principales. Si la matriz de datos originales es de dimensiones $I \times J$, el número máximo de PCs que pueden ser calculados es el valor de la dimensión más pequeña.

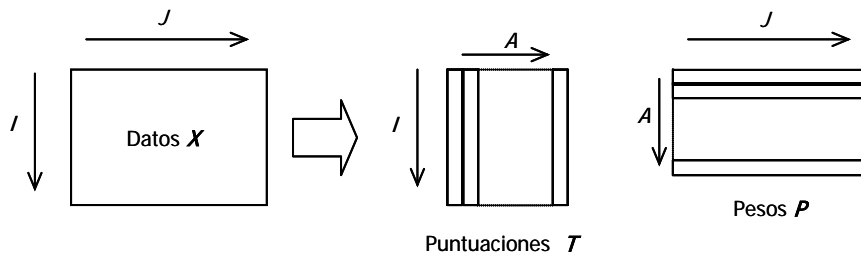


Figura 9: Análisis de componentes principales (PCA)

El objetivo de la técnica es que el número de componentes principales elegido explique la parte determinante de la matriz de datos de modo que los residuales sean lo más pequeños posibles [234]. En el caso de estudiar una mezcla de compuestos [227], el número de PCs debería ser idéntico al número de compuestos existentes. Sin embargo, esto no es generalmente tan simple y debemos tener en cuenta otros factores como por ejemplo el ruido que pueden presentar los datos. Los primeros componentes son sin duda los más importantes. El primero explica el

mayor porcentaje de varianza de los datos, el segundo el mayor de la restante y así sucesivamente. Mediante el proceso de selección del número de PCs se retiene la información significativa de las matrices y se separa del ruido.

La importancia de cada componente puede medirse mediante la suma de los cuadrados de las puntuaciones según la expresión:

$$g_a = \sum_{i=1}^I t_{ia}^2 \quad (2)$$

donde g_a es el valor propio (*eigenvalue*) del componente principal a . Además, la suma de todos los valores de g_a es la suma de los cuadrados de los valores de la matriz de datos X :

$$\sum_{a=1}^K g_a = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J x_{ij}^2 \quad (3)$$

donde K corresponde al valor más pequeño de I o J . Frecuentemente, estos valores se presentan como porcentajes calculados a partir de la expresión (4).

$$V_a = 100 \cdot \frac{g_a}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J x_{ij}^2} \quad (4)$$

donde V_a es el porcentaje de información modelada por el componente a .

El porcentaje acumulado es utilizado a menudo para determinar la proporción de información que ha sido modelada.

Tras aplicar esta técnica, los datos originales quedan matemáticamente modelados por medio de unos pocos componentes principales. Usando un número A de componentes es posible establecer un modelo para cada elemento de X de la forma:

$$x_{ij} = \sum t_{ia} \cdot p_{aj} + e_{ij} = \hat{x}_{ij} + e_{ij} \quad (5)$$

que es la expresión no matricial de la ecuación (1).

Una forma más clara de visualizar un análisis de componentes principales es buscar una interpretación gráfico-geométrica [234]. Así, un objeto queda definido por un punto en el hiperespacio constituido por J variables. Con las nuevas variables los objetos se sitúan en el nuevo espacio de forma similar a como lo estaban en el original. Esto produce un giro en el hiperespacio definido por las J variables de forma que la primera variable nueva (primer eje calculado) contenga la máxima información, la segunda (ortogonal a la primera) el máximo de la restante y así sucesivamente. La matriz de puntuaciones está constituida por las proyecciones de cada uno de los objetos del conjunto de datos en los nuevos ejes o componentes principales. La representación de las puntuaciones de los objetos sobre los componentes principales permite reconocer agrupamientos de las muestras. Esto se ilustra en la figura 10.

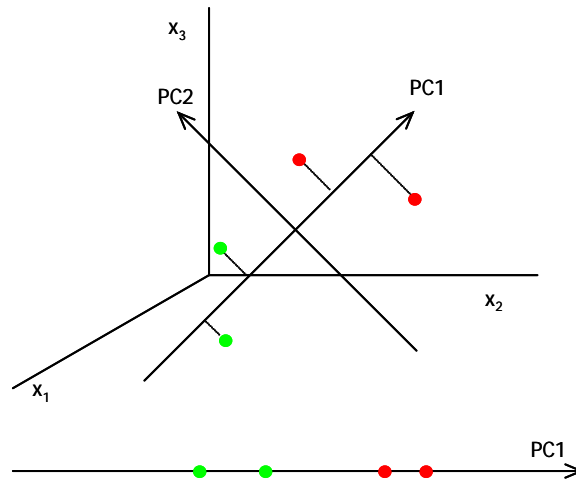


Figura 10: Representación de las puntuaciones de dos clases de objetos en los dos primeros componentes principales

5.1.2.K-vecinos más próximos

El algoritmo de los k -vecinos más próximos, *K-Nearest Neighbors*, (KNN) es una técnica de reconocimiento de pautas supervisadas basada en el criterio de similitud. Esta técnica intenta categorizar una muestra desconocida basándose en su proximidad a muestras previamente situadas en categorías establecidas [235]. Concretamente, la clase predicha para una muestra desconocida depende de la clase a la que pertenezcan sus k vecinos (muestras) más próximos. De manera análoga a una votación, cada uno de los vecinos más próximos dentro de las muestras del conjunto de entrenamiento vota una vez por la clase a la que pertenece y esos votos se suman. Una parte importante del proceso es determinar un valor apropiado de k , el número de muestras, vecinos más próximos que se seleccionarán para contabilizar la clase a la que pertenecen.

La idea de proximidad implica el concepto de distancia. La distancia multivariante utilizada en KNN es similar a la distancia que separa dos puntos en un plano, pero con N coordenadas en el cálculo y se calcula mediante la expresión (6) que define la distancia Euclídea entre dos muestras k y l :

$$d_{kl} = \sqrt{\sum_{j=1}^J (x_{kj} - x_{lj})^2} \quad (6)$$

donde J representa el número total de variables medidas y x_{kj} y x_{lj} son los valores de la variable j para las muestras k y l respectivamente. Esta medida es, en cierta forma, contraria al coeficiente de correlación y estrictamente es una medida de “no similitud”. No hay restricciones para su valor si bien es siempre positivo.

En la fase de construcción del modelo KNN, por lo tanto, la distancia Euclídea que separa a cada par de muestras dentro del grupo de entrenamiento se almacena en una tabla de distancias. Si dos (o más) clases obtienen el mismo número de votos, el empate se rompe basándose en las distancias acumuladas, es decir, se suman las distancias en lugar de los votos. La muestra, entonces, será asignada a la clase con la menor distancia acumulada.

5.1.3. Modelado independiente de clases

Uno de las técnicas de reconocimiento de pautas supervisadas más utilizadas es el modelado independiente de clases (SIMCA) [226,233].

Mientras que en otros métodos de clasificación cada muestra se

asigna solamente a una clase y ninguna queda fuera de alguna de ellas, éste permite que el resultado de la clasificación para una muestra sea que no pertenece a ninguna de las clases o que pertenece a más de una (con la misma o diferente probabilidad).

El método se basa en construir un modelo independiente para cada una de las clases mediante PCA. El número de componentes principales utilizados para cada clase puede prefijarse si se dispone de información previa o mantener un número de ellos que explique un determinado porcentaje de la varianza de los datos. En la figura 11 se presentan dos clases de objetos, A y B . Al aplicar PCA a la clase A (puntos verdes) se obtiene un modelo de dos componentes (un plano), mientras que la clase B (puntos rojos) se ajusta a un modelo de una única variable (una recta). Las regiones de confianza aparecen alrededor de cada clase.

La asignación de los nuevos objetos se hace comprobando si están localizados en la región de confianza de algún modelo. Así el objeto k de la figura 11 se puede asignar a la clase B mientras que h no pertenece a ninguna clase, es un "outlier".

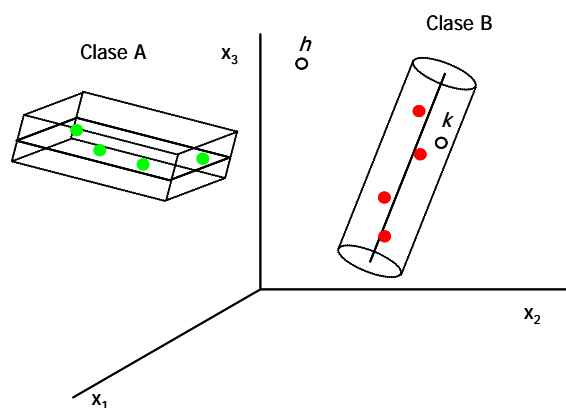


Figura 11: Modelos de dos clases de objetos A y B en el espacio de sus componentes principales, regiones de confianza y predicción de dos muestras

Para cada clase y su modelo correspondiente se define la sensibilidad como el porcentaje de muestras que perteneciendo a esa clase son reconocidas correctamente por el modelo matemático. Análogamente se define la especificidad como el porcentaje de muestras que perteneciendo a otra clase son reconocidas como ajenas al modelo.

Los diagramas de *Coomans* permiten visualizar estos índices ya que son representaciones bidimensionales de las distancias de las muestras a los modelos. La figura 12 es un esquema de estos diagramas. En el eje de abscisas se representa la distancia a la clase A y en el de ordenadas a la clase B. La recta horizontal discontinua delimita el recinto de la clase B mientras que la línea vertical discontinua delimita el recinto de la clase A. El cuadrado inferior izquierdo (1) es el recinto común a ambas clases y cuantas menos muestras tengan sus coordenadas en él, mayor será la especificidad de los modelos. El cuadrado superior derecho (2) representa el espacio que queda fuera de ambos modelos. Las muestras con coordenadas en él son muestras extrañas a los modelos generados.

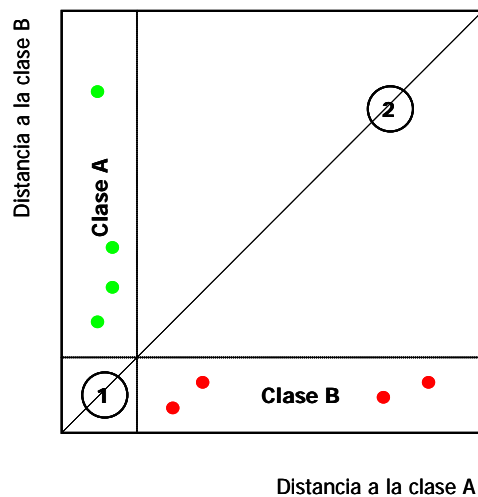


Figura 12: Diagrama de Coomans

Cuando SIMCA se utiliza únicamente como técnica para la clasificación en dos grupos, todas las muestras que se encuentren por encima de la diagonal serán asignadas a la clase A y las muestras por debajo a la clase B.

5.1.4. Análisis discriminante

El análisis discriminante es una técnica de reconocimiento de pautas supervisadas. Esta técnica, construye una hipersuperficie que divide el espacio de n dimensiones en tantos subespacios como clases, de modo que cada categoría queda asociada a uno de esos espacios. El objetivo del análisis discriminante es la reducción de la dimensionalidad preservando el máximo posible de información discriminatoria. El criterio utilizado para calcular las funciones discriminantes que definen estos espacios es maximizar la relación entre la varianza entre clases y la varianza dentro de cada clase.

A continuación, se describen las características de esta técnica mediante un ejemplo con muestras pertenecientes a dos clases diferentes. En la figura 13a los objetos representados en rojo podrían considerarse distintos de los representados en verde; sin embargo, ninguna de las variables (x_1 , x_2) por separado es capaz de discriminar los objetos. Ambas son esenciales. En la figura 13 es posible dibujar una línea (línea discriminante) entre ambos grupos. Los objetos por encima de la línea pertenecen a la clase A y los que están por debajo a la clase B. Gráficamente esto se puede representar mediante las proyecciones de los objetos sobre la línea perpendicular a la discriminante tal y como se

muestra en las figuras 13b y 13c. Ahora es fácil calcular el centro de cada clase y la distancia de una muestra desconocida a ambos centroides. La muestra desconocida se asignará al grupo más cercano.

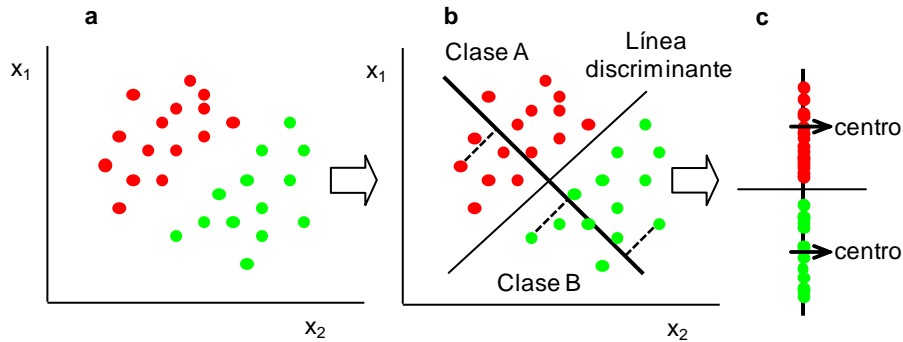


Figura 13: (a) Dos clases de objetos definidos por las variables x_1 y x_2 . (b) Línea discriminante que separa las clases de objetos. (c) Proyecciones de las muestras en la recta perpendicular a la línea discriminante y cálculo de centroides.

Los resultados obtenidos con este análisis deben ser cuidadosamente estudiados ya que aquellas muestras con características de ambas clases siempre serán asignadas, exclusivamente, a una de ellas e incluso las muestras que no pertenecen a ninguna clase siempre serán asignadas a una de ellas [236].

En muchas ocasiones se utiliza la distancia de Mahalanobis (8) para medir distancias entre grupos de muestras. Así, la distancia de una muestra k al centroide de una clase (A) viene definida por la expresión (8):

$$d_{kA} = \sqrt{(x_k - \bar{x}_A) \cdot C_A^{-1} \cdot (x_k - \bar{x}_A)^T} \quad (8)$$

donde x_k es el vector fila de la muestra k que recoge el valor de todas las variables y \bar{x}_A el que corresponde al centroide de esta clase. C_A es la

matriz varianza-covarianza para este grupo. Es una matriz simétrica cuyos elementos representan las covarianzas entre pares de variables. Los elementos de la diagonal corresponden a la varianza de cada variable. La matriz es de dimensiones $J \times J$.

Las figuras 14a y 14b ilustran las principales características de la distancia de Mahalanobis [226]. La distancia Euclídea entre el centro del grupo (punto C) y los objetos k y h de la figura 14a es idéntica, pero k forma parte del grupo mientras que h no. Sería deseable que la distancia de C a h fuera mayor que la distancia entre C y k . La distancia de Mahalanobis indica que el punto k está más “cerca” que h de C porque está situado en la dirección del eje mayor de la elipse mientras que h no. Los objetos situados dentro de la elipse tienen valores de x_1 y x_2 que están fuertemente correlacionados. Este no es el caso de h . De manera similar en la figura 14b, los grupos G_1 y G_2 están “más cerca” entre ellos que G_3 y G_4 según la distancia de Mahalanobis aunque presenten la misma distancia Euclídea. Todos los grupos tienen la misma forma y el mismo volumen, pero G_1 y G_2 se solapan mientras que G_3 y G_4 no.

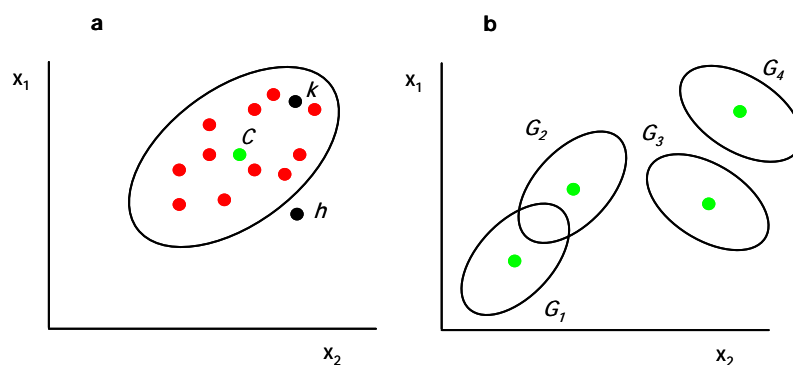


Figura 14: Distancia de Mahalanobis

El análisis discriminante no es fácilmente aplicable cuando el número de variables excede al de muestras analizadas debido a que la matriz C no tiene inversa. Una posible solución requeriría seleccionar un número más pequeño de variables. Su utilización, en esos casos, requiere trabajar con componentes principales en lugar de con las variables originales.

En análisis discriminante lineal pueden considerarse dos etapas: construcción de las funciones discriminantes y determinación de las reglas de clasificación. Esta técnica establece unas funciones discriminantes que forman un espacio reducido con respecto a las variables originales. La dimensión de este espacio es, generalmente, una menos que el número de clases que posea el grupo de entrenamiento. Para la construcción de las funciones se considera el caso donde existan dos clases de objetos A y B caracterizados por una serie de variables. El objetivo es ponderar y combinar linealmente las variables de manera que los conjuntos de muestras se diferencien todo lo posible reduciendo a la vez el número de dimensiones con una pérdida mínima de información [234]. Es posible calcular distintas funciones discriminantes lineales para separar dos clases de objetos, aunque, en este caso sencillo, es suficiente una única función del tipo:

$$D = \sum_{j=1}^J w_j y_j \quad (9)$$

donde D es la función discriminante, w_j es el coeficiente, y_j es la variable y J es el número de variables.

La obtención de los coeficientes resulta fundamental ya que no todos los ejes proporcionan una diferencia adecuada entre clases. Esto se

consigue seleccionando de entre todas las posibles funciones aquellas que producen las mayores distancias de Mahalanobis entre grupos diferentes.

Si el número de clases es superior a dos se necesita un mayor número de funciones discriminantes. Éstas deben de ser ortogonales entre sí, de forma que no compartan información.

Una vez determinadas las funciones, se necesita desarrollar una regla matemática de clasificación que divida el espacio en tantas regiones como clases. Una posible regla, mencionada anteriormente, puede ser considerar la distancia de una muestra a los centros de las clases de forma que la muestra desconocida se asigna a la clase cuyo centroide esté más cercano.

La hipótesis fundamental que sostiene esta aproximación para la clasificación de muestras por una recta, un plano o un hiperplano (análisis discriminante lineal) es que las variables tienen una distribución normal. Por lo tanto, el análisis discriminante lineal podrá utilizarse si se puede asumir que las matrices de covarianza de clase son iguales (o similares) para todas las clases (es decir, que proceden de la misma población) y se calcula una única matriz de covarianza común a todas ellas.

Si las matrices de covarianza son distintas, se utilizan todas las matrices de covarianza de las clases. En este otro caso, las hipersuperficies que separan las clases son cuadráticas y se hablará de análisis discriminante cuadrático (QDA).

5.1.5. Modelo de las muestras apoyadas en la frontera

La clasificación de muestras en distintos grupos o clases a partir de sus características es un proceso que generalmente requiere establecer modelos adecuados constituidos por un número elevado de muestras. Este procedimiento requiere tiempo, especialmente cuando se dispone de una gran variedad de ellas o cuando su proceso de análisis es largo. En estos casos, una estrategia que permita la construcción de un modelo fiable formado por un número reducido de muestras es una posibilidad interesante.

El modelo de las muestras apoyadas en la frontera "*Support Vector Machines*" (SVM) es una técnica de reconocimiento de pautas supervisadas capaz de generar límites o fronteras lineales, cuadráticas o de otra clase entre los grupos de muestras, dependiendo en cada caso de la naturaleza de la distribución de los datos.

La estrategia de esta técnica reside en confiar exclusivamente en un pequeño número de muestras distribuidas en las proximidades de la frontera que separa las clases. Éstas reciben el nombre de vectores soportados "*support vectors*" (SVs) o muestras localizadas ("apoyadas") en la frontera y constituyen el grupo de entrenamiento.

La figura 15 ilustra una posible situación donde se separan dos grupos de muestras. El modelo de clasificación solo utiliza las marcadas con un círculo que corresponden a aquellas situadas en las proximidades de la frontera que separa las clases. El resto de muestras de entrenamiento no intervienen en el modelo. Se define el margen como la distancia entre el plano de separación y la muestra más

próxima. La figura 15 indica que las muestras seleccionadas son un grupo muy reducido del conjunto de entrenamiento, lo cual puede ser muy interesante a la hora de formar o repetir nuevos modelos con el tiempo.

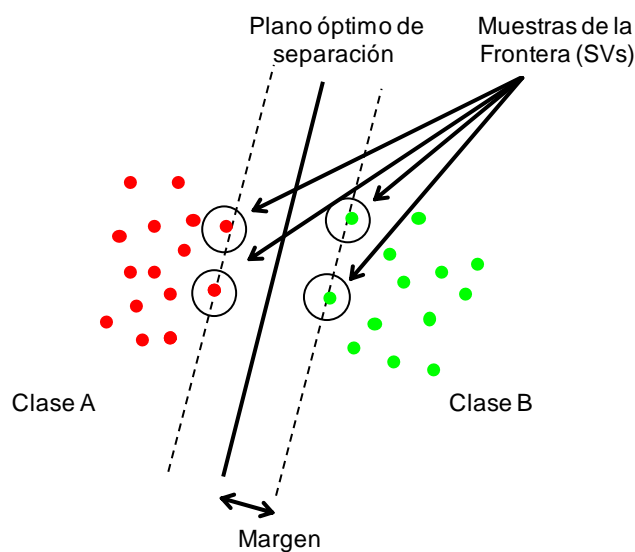


Figura 15: Conjunto de muestras seleccionadas para generar el modelo y margen del plano de separación

En la figura 16 se han representado algunos de los posibles planos que separan las muestras del ejemplo anterior correctamente. Es posible seleccionar diferentes posibilidades y obtener, inicialmente, resultados similares. Sin embargo, la técnica determina la frontera entre clases calculando el plano de separación óptimo entre los grupos, en el espacio de las variables originales, que hace máximo el margen a la vez que hace mínimo el error de clasificación. Este plano se ha representado en la figura 16 mediante la línea continua.

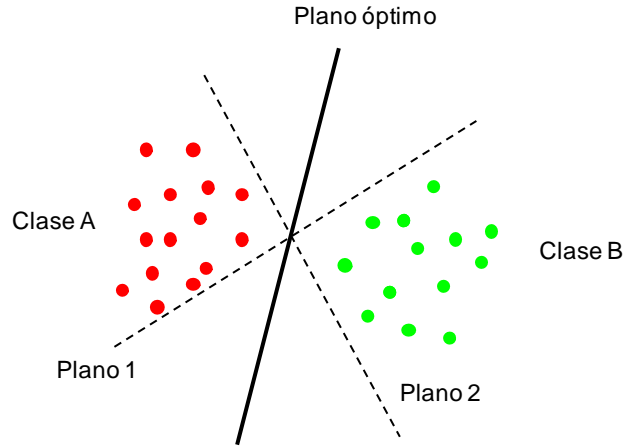


Figura 16: Plano óptimo de separación entre las clases A y B

Hacer máximo el margen entre dos clases es un problema de optimización que se resuelve maximizando la siguiente función [237] respecto a los coeficientes α :

$$L_D = \sum_i \alpha_i - \frac{1}{2} \sum_{i,j} \alpha_i \alpha_j y_i y_j x_i' x_j \quad (10)$$

donde x_i y x_j son los vectores de datos de dos muestras e y_i e y_j sus respectivas clases codificadas con los valores +1 ó -1. Los coeficientes α determinan directamente la posición de la frontera.

Solo las muestras localizadas (“apoyadas”) en la frontera tienen valores distintos de cero para el coeficiente α . Para el resto de muestras, esto es, la mayoría del grupo de entrenamiento, tiene un valor de cero y no influyen en la solución final. Cuanto mayor es su valor para una muestra, mayor es la influencia de ésta para determinar la frontera entre clases. Esto permite estimar la contribución de cada muestra en el modelo.

Los coeficientes α tienen las siguientes restricciones:

$$\sum_i \alpha_i y_i = 0 \quad (11)$$

$$0 \leq \alpha \leq C \quad (12)$$

La última restricción asegura evitar el problema del ajuste excesivo de los datos al imponer un límite superior, C , al coeficiente α . Este parámetro debe ser seleccionado por el usuario y su valor es inversamente proporcional a la anchura de los márgenes de la frontera. Si no se incluye este valor limitante se obtendrá un plano de separación con un margen muy estrecho que indica, generalmente, una reducida capacidad predictiva del modelo.

Es importante que el valor de C sea el adecuado ya que un valor demasiado pequeño produce márgenes muy anchos que incluyen un elevado número de SVs en el modelo y, por el contrario, un valor excesivo proporciona un margen estrecho que presentará problemas en la clasificación de nuevas muestras próximas a la frontera.

El plano de separación se define, entonces, por la ecuación:

$$xw + b = 0 \quad (13)$$

donde w y b se determinan por las ecuaciones:

$$w = \sum_{i=1}^N \alpha_i y_i s_i \quad (14)$$

$$b = \frac{1}{y_i} \sum_{j=1}^N \alpha_j y_j x_j s_i \quad (15)$$

En estas ecuaciones s_i es una muestra de la frontera y N es el número de ellas seleccionadas en el modelo. En la ecuación (15), s_i es cualquier SV que cumple $\alpha < C$.

El problema de optimización de la ecuación (10) incorpora las características más atractivas de este método.

Así, los vectores x_i y x_j aparecen en la ecuación solo en forma de producto escalar, lo que reduce los inconvenientes de la dimensionalidad de los datos.

Además, es posible sustituir el producto escalar de los vectores añadiendo otras funciones que, sin alterar la naturaleza del problema de optimización, permiten determinar fronteras más complejas cuando las clases así lo requieren. Generalmente estas funciones aumentan la dimensión de los datos proporcionando planos de separación adecuados en el espacio ampliado que se convierten en fronteras de diferente complejidad al transformarlas en las variables originales. A estas funciones se les denomina funciones *kernel* y entre las más utilizadas, se encuentran la función radial, polinomial de distintos órdenes y sigmoide.

La figura 17 muestra un ejemplo de clases linealmente no separables donde la frontera se determina reemplazando el producto escalar $x_i x_j$ por una función más compleja.

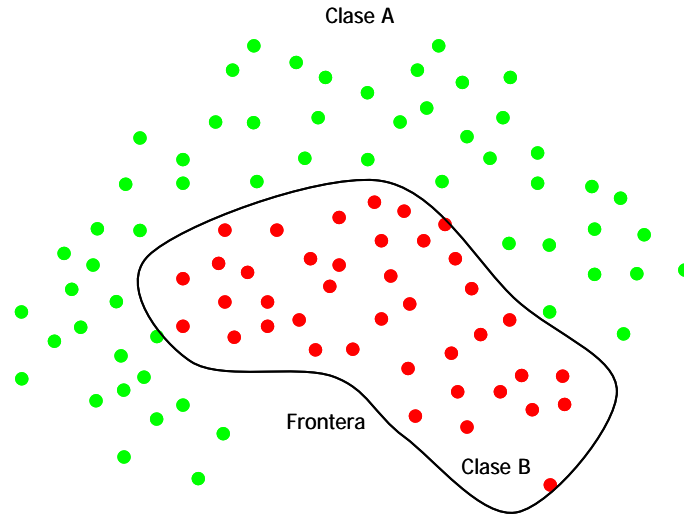


Figura 17: Clases linealmente no separables

En el caso más sencillo, esto es, cuando las clases son linealmente separables, el criterio para clasificar una nueva muestra x es el siguiente:

$$y = \left(\sum_{i=1}^N \alpha_i y_i s_i x + b \right) \quad (16)$$

Este valor puede ser positivo o negativo lo cual determina que la muestra x (vector de datos) pertenezca a una clase u otra. s_i es el vector de datos de una muestra de la frontera, y_i es +1 ó -1 en función de la clase a la que pertenece el SV y N es el número total de muestras de la frontera. Los coeficientes α_i y b son valores que se obtienen al determinar el plano óptimo.

5.2. Calibración

5.2.1. Calibración univariante

La calibración univariante [226,238,239] permite obtener modelos capaces de predecir una variable respuesta conociendo los valores de otra correlacionada con ella.

La expresión característica de este tipo de calibración es [238]:

$$x \approx c \cdot s \quad (17)$$

donde x es un vector que está formado por las respuestas analíticas para el número de muestras analizadas y c es el vector que corresponde a las concentraciones. Ambos vectores tienen la misma longitud, I , que es igual al número de muestras. El escalar s relaciona ambos parámetros.

En muchas situaciones será apropiado incluir un término adicional en el modelo de calibración, la ordenada en el origen.

La calidad de las predicciones puede determinarse mediante la expresión:

$$E = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (c_i - \hat{c}_i)^2}{d}} \quad (18)$$

donde $(c_i - \hat{c}_i)$ es la diferencia entre las concentraciones añadida y predicha para la muestra i y d son los grados de libertad. En el caso de la calibración univariante el número de grados de libertad es igual al número de experimentos realizados menos el número de parámetros

calculados en el modelo. El error absoluto puede representarse como un porcentaje mediante la expresión:

$$E\% = \frac{E}{\bar{c}} \cdot 100 \quad (19)$$

donde \bar{c} es la media de las concentraciones de todas las muestras.

A partir de los modelos clásicos que incluyen ordenada en el origen es posible determinar tres varianzas de interés [240]:

- La varianza explicada por el modelo.

Es la suma de cuadrados (SC) de las desviaciones de los valores predichos respecto a las coordenadas del centroide dividida por el número de grados de libertad que es uno.

$$s_{\text{exp}}^2 = \sum_{i=1}^I (\hat{x}_i - \bar{x}_i)^2 = SC_{\text{exp}} \quad (20)$$

- La varianza residual.

Es la suma de cuadrados de las desviaciones de los valores reales respecto a los predichos dividida por el número de grados de libertad, que en este caso es el número de experimentos realizados menos dos. Este tipo de varianza es una medida de la dispersión de las medidas a lo largo de la línea de regresión ajustada y representa la varianza en la respuesta que el modelo no tiene en cuenta.

$$s_{\text{res}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^I (x_i - \hat{x}_i)^2}{I - 2} = \frac{SC_{\text{res}}}{I - 2} \quad (21)$$

- La varianza total.

La varianza total de los puntos en ausencia de modelo se calcula mediante la suma de cuadrados de las desviaciones de los puntos respecto al centroide dividida por el número de grados de libertad, $I-1$.

$$s_{tot}^2 = \frac{\sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x}_i)^2}{I-1} = \frac{SC_{tot}}{I-1} \quad (22)$$

La relación [227] entre las tres sumas de cuadrados es:

$$SC_{tot} = SC_{exp} + SC_{res} \quad (23)$$

lo que manifiesta que el modelo divide la varianza total en dos, la explicada por él y la residual. Fácilmente se puede demostrar [240] que la relación entre SC_{exp} y SC_{tot} equivale al cuadrado del coeficiente de correlación lineal:

$$r^2 = \frac{\sum (\hat{x}_i - \bar{x}_i)^2}{\sum (x_i - \bar{x}_i)^2} = \frac{SC_{exp}}{SC_{tot}} \quad (24)$$

El parámetro r^2 se denomina coeficiente de determinación y expresa el porcentaje de variación total de los datos que es explicado por el modelo. Se utiliza para comprobar el porcentaje de información modelada por la regresión, pero necesariamente no implica que el modelo más adecuado para ajustar los datos sea el lineal incluso cuando sus valores son próximos a 1. Además de obtener un buen coeficiente de correlación es importante comprobar que el modelo generado no contiene fallo de ajuste [241]. Para ello es necesario tener réplicas de cada nivel de concentración.

La secuencia que se presenta a continuación corresponde a un conjunto de muestras con n niveles de concentración diferentes, repetidos cada uno p veces. x_{ij} son los valores experimentales obtenidos para las muestras.

$$\begin{array}{cccccc}
 c_1 & x_{11} & \dots & x_{1j} & \dots & x_{1p} \\
 c_2 & x_{21} & \dots & x_{2j} & \dots & x_{2p} \\
 \cdot & & & & & \\
 \cdot & & & & & \\
 \cdot & & & & & \\
 c_i & x_{i1} & \dots & x_{ij} & \dots & x_{ip} \\
 \cdot & & & & & \\
 \cdot & & & & & \\
 \cdot & & & & & \\
 c_n & x_{n1} & \dots & x_{nj} & \dots & x_{np}
 \end{array}$$

Ahora es posible dividir la variación residual, SC_{res} , en dos partes:

- Variación debida al error puro.

Mide la variación debida al error experimental según la expresión:

$$SC_{error} = \sum_{ij} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2 \quad (25)$$

donde \bar{x}_i es la media de las medidas realizadas para cada nivel de concentración.

- Variación debida al fallo de ajuste.

Es un componente que mide la variación de la media de las muestras repetidas para cada nivel de concentración a lo largo de la línea de

regresión mediante la expresión:

$$SC_{fall.ajus.} = SC_{res} - SC_{error} \quad (26)$$

Las varianzas asociadas a estos factores se obtienen dividiendo las sumas de cuadrados entre el número de grados de libertad tal y como se indica en las siguientes expresiones:

$$s_{error}^2 = \frac{SC_{error}}{n(p-1)} \quad (27)$$

$$s_{fall.ajus.}^2 = \frac{SC_{res} - SC_{error}}{n-2} \quad (28)$$

El posible fallo de ajuste se puede comprobar comparando la relación

$$F = \frac{s_{fall.ajus.}^2}{s_{error}^2}$$

obtenida experimentalmente con el valor crítico tabulado

de F a $(n-2)$ y $n(p-1)$ grados de libertad y un determinado nivel de significación. Si la diferencia es significativa (la varianza del fallo de ajuste es mayor que la varianza debida al error puro) se puede concluir que el modelo es inadecuado debido a que la variación de las medidas correspondientes a las muestras repetidas con el mismo nivel de concentración no puede ser explicado en términos de la incertidumbre del error puro. En este caso es aconsejable adoptar un modelo diferente. En caso contrario, el modelo no presenta fallo de ajuste y es adecuado para representar el conjunto de muestras estudiadas.

5.2.2. Regresión por mínimos cuadrados parciales

La regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) es a menudo considerada como la técnica de regresión multivariante [242] más importante.

El método está basado en análisis de componentes principales y no requiere detalles de todos los compuestos presentes en las muestras, aunque será necesario realizar una estimación del número de componentes principales significativos que no se corresponde, necesariamente, con el número de especies químicas [238].

Uno de los aspectos más importantes de esta técnica de calibración frente a otras como la regresión por componentes principales (PCR) es que tiene en cuenta no solo los posibles errores del bloque de datos X , sino, también, los errores relacionados con la estimación de la concentración.

Existen fundamentalmente dos métodos PLS que se denominan PLS1 y PLS2. En PLS1 se modela cada compuesto independientemente mientras que en PLS2 todos se modelan de forma conjunta. Esto puede resultar útil [227] en los casos donde existe correlación entre la concentración de los compuestos estudiados. Sin embargo, generalmente, las predicciones realizadas con PLS2 son peores que las obtenidas con PLS1.

A continuación, se describe la técnica de regresión por mínimos cuadrados parciales PLS1 que es la que se ha utilizado en esta memoria.

5.2.2.1. PLS1

Los bloques de matrices X y c se descomponen en sus componentes principales de acuerdo con las siguientes expresiones [238]:

$$X = T \cdot P + E \quad (29)$$

$$c = T \cdot q + f \quad (30)$$

Estas matrices se han representado en la figura 18. El producto de las matrices TP y Tq se aproxima a los valores medidos con la configuración instrumental utilizada y a las concentraciones reales de cada muestra, respectivamente. E y f son las matrices de error. La matriz de puntuaciones T es común a ambos bloques, X y c .

Como se observa en la figura 18, para cada componente a existe un vector de puntuaciones o "scores", un vector de pesos s o "loadings" y una matriz de residuales.

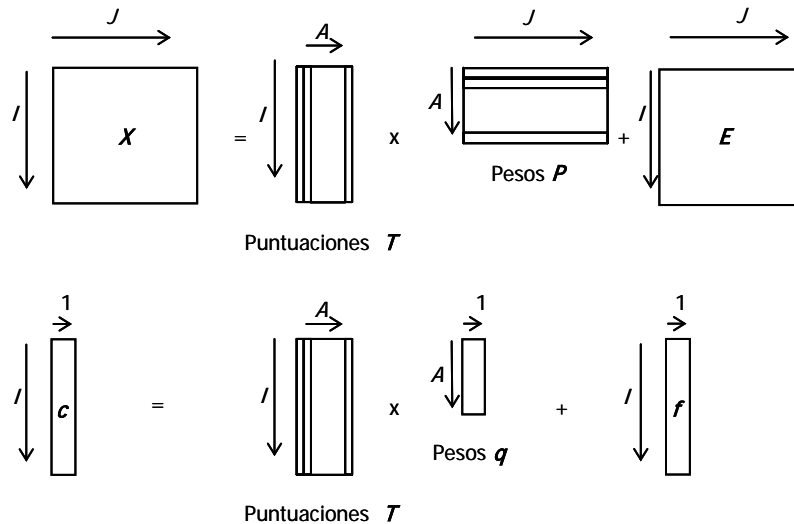


Figura 18: Matrices de PLS1

Cada compuesto considerado genera una matriz de puntuaciones distinta, al contrario que en otras técnicas como PCR donde hay una única matriz de puntuaciones para todos los compuestos de la mezcla.

5.2.3. Validación de los modelos

Al igual que ocurría en el caso de las técnicas de reconocimiento de pautas, tras la construcción de un modelo de calibración, será necesario llevar a cabo la validación de dicho modelo. Ésta facilita información fundamentalmente sobre el número de componentes significativos necesarios para caracterizar un conjunto de datos y sobre la capacidad predictiva de los modelos en futuras muestras. Los principales métodos de validación se describen a continuación:

- Auto predicción

Es la aproximación más sencilla y se basa en calcular la raíz cuadrada de la media del error de calibración al cuadrado para cada compuesto. Se calcula mediante la expresión:

$$E_{cal} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (c_i - \hat{c}_i)^2}{I}} \quad (31)$$

donde I es el número de muestras y la expresión entre paréntesis representa la diferencia entre la concentración añadida y predicha por el modelo. Generalmente este modelo de validación no se utiliza, ya que los datos pueden llegar a tener un ajuste perfecto aumentando simplemente el número de componentes del modelo.

- Validación cruzada (*cross validation*)

La capacidad predictiva del modelo se comprueba separando un pequeño número de muestras del conjunto de calibración y analizando las predicciones obtenidas para este conjunto con el modelo reducido.

Aunque existen diversos criterios, es habitual retirar solamente una muestra del modelo y predecir su concentración. Este proceso se repite I veces de modo que al final todas las muestras se han predicho una vez. El error cometido cuando se utiliza la validación cruzada (CV) se calcula mediante la expresión:

$$E_{CV} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (c_i - {}^{CV}\hat{c}_i)^2}{I}} \quad (32)$$

donde ${}^{CV}\hat{c}_i$ es la concentración predicha de la muestra i del grupo de validación cruzada.

- Validación externa (*test set*)

En lugar de la validación interna, como es el caso anterior, es posible comprobar la calidad predictiva del modelo con un conjunto independiente de muestras que no se han utilizado en ninguna etapa durante la construcción del modelo. El error cometido cuando se utiliza un grupo independiente o “*test set*” de I muestras es:

$$E_{test} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (c_i - {}^{test}\hat{c}_i)^2}{I}} \quad (33)$$

donde ${}^{test}\hat{c}_i$ es la concentración predicha de la muestra i del grupo de validación externa.

A partir de los valores absolutos de las ecuaciones (31-33) es habitual expresar el resultado en términos relativos, nuevamente, mediante la expresión (19).

Finalmente, el sesgo (*bias*) del modelo y del grupo de validación se cuantifica mediante la expresión:

$$S = \frac{\sum_{i=1}^I (\hat{c}_i - c_i)}{I} \quad (34)$$

donde I es el número de muestras del modelo o del grupo de validación.

5.2.4. Transferencia de calibrados

Cuando se utilizan métodos de calibración tanto univariantes como multivariantes es necesario tener en cuenta ciertas dificultades que se pueden presentar [243].

Un problema que puede surgir es la variación de la respuesta instrumental debido a problemas de inestabilidad con el transcurso de los días. Para corregir este fallo de reproducibilidad es posible realizar una normalización de las señales obtenidas. Sin embargo, esta alternativa es solo adecuada cuando se persiguen resultados cualitativos ya que gran parte de información cuantitativa se pierde tras el proceso de normalización. Es necesario aplicar una estrategia adecuada que corrija estos cambios en la respuesta del instrumento cuando se

persiguen fines cuantitativos.

Otra dificultad [243] surge cuando se pone a punto un método de calibración con una configuración instrumental y se aplica a muestras medidas en otro instrumento. Se hace necesaria, en este caso, la utilización de un algoritmo matemático que iguale las respuestas registradas por ambos equipos cuando se mide la misma muestra.

Para solucionar estos inconvenientes se han propuesto diferentes alternativas. La transferencia de calibrados es una estrategia para corregir los cambios de sensibilidad que se producen en una configuración instrumental y está basado en la variación de la señal para un conjunto de muestras de referencia también llamadas de transferencia [244]. El proceso de transferencia implica, por tanto, que un pequeño número de muestras debe ser analizado regularmente con objeto de poder corregir la inestabilidad de la señal. Uno de los pasos de mayor importancia es elegir las muestras de transferencia. El criterio de selección debe tener en cuenta que estas tienen que ser estables física y químicamente y, además, ser representativas [245] del conjunto de muestras analizadas. A continuación, se describen dos procesos de transferencia de calibrados que incorporan distintos algoritmos.

- Ajuste aditivo

A menudo, las diferencias de intensidad de las señales de las muestras de entrenamiento y predicción, debidos a los problemas de sensibilidad a largo plazo, se pueden corregir con este ajuste sencillo. La variación mencionada se cuantifica con las muestras de referencia y después es sumada a todas las muestras de predicción. Para ello es

necesario medir las muestras de transferencia el día que se genera el modelo y después regularmente junto con las muestras de predicción desconocidas que se miden días, semanas e incluso meses más tarde.

La expresión (35) es la ecuación del ajuste aditivo en el caso de trabajar con N muestras de transferencia y considerar la configuración instrumental de este trabajo, en el que, como se verá más adelante, las variables son las intensidades de las diferentes relaciones m/z registradas. La diferencia entre el valor de la intensidad media para una variable, $I_{(m/z)}$, en el conjunto de muestras de transferencia del día A y del día B, se suma al valor de la intensidad de cada muestra medida el día B:

$$I_{(m/z)_{tr}} = I_{(m/z)_{díaB}} + \left(\frac{1}{N} \sum_{n=1}^N I_{(m/z)_{díaA}} - \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N I_{(m/z)_{díaB}} \right) \quad (35)$$

donde $I_{(m/z)_{tr}}$ es la intensidad resultante tras aplicar el proceso de transferencia, $I_{(m/z)_{díaA}}$ corresponde a la intensidad en el momento de la construcción del modelo de calibración, $I_{(m/z)_{díaB}}$ es la intensidad medida el día B y N es el número de muestras de transferencia.

- Ajuste multiplicativo

De manera similar este ajuste utiliza las muestras de referencia para transformar las nuevas respuestas y relacionarlas con los perfiles previamente adquiridos cuando se desarrolló el modelo de calibración.

El valor de las variables registradas para las muestras de predicción se multiplica por el número, obtenido como una media, que mejor aproxima los valores de las variables del conjunto de muestras transferidas con las correspondientes del modelo de calibración. En el

caso de trabajar con N muestras de transferencia y considerar la configuración instrumental presentada en este trabajo, el valor para la intensidad de una de las variables m/z que sufre este proceso multiplicativo es:

$$I_{(m/z)_{tr}} = I_{(m/z)_{díaB}} \cdot \left(\frac{\frac{1}{N} \cdot \sum_{n=1}^N I_{(m/z)_{díaA}}}{\frac{1}{N} \cdot \sum_{n=1}^N I_{(m/z)_{díaB}}} \right) \quad (36)$$

5.3. Diseño experimental de selección y optimización de variables

El primer paso para construir un diseño experimental es determinar qué variables o factores influyen en la respuesta ya sean cuantitativas o cualitativas. A veces se puede tener información previa sobre los factores que producen efecto significativo en la respuesta, pero no siempre es así. En este caso, puede resultar útil realizar un diseño en el que se incluyan todos los posibles factores con el fin de realizar una selección de los mismos.

Una vez definidas las variables que se desean estudiar, es necesario definir los límites del dominio experimental, esto es, los niveles que tomará cada factor. Los diseños factoriales completos y los fraccionados son ejemplos de los diseños que tienen como finalidad reconocer los factores que afectan significativamente a la respuesta.

Los diseños factoriales completos permiten experimentar con todas las combinaciones de variables y niveles seleccionados. La interpretación de las observaciones, en este caso, no es muy compleja. La notación

utilizada para referirnos a estos diseños es una potencia de n del tipo n^k , donde n representa el número de niveles que tomará cada variable y k es el número de variables que intervienen en la experimentación.

Así, por ejemplo, un diseño factorial completo del tipo 2^7 , en el que se estudian 7 variables a dos niveles diferentes, requiere 128 experimentos que permiten calcular 128 parámetros entre los que se encuentran los valores de los efectos de las 7 variables estudiadas en la respuesta y las interacciones de 2, 3, 4, 5, 6 y 7 factores. En la práctica, resulta extremadamente raro que aparezcan interacciones de tres o más variables que resulten significativas. En general, se obtiene información aceptable del comportamiento de los sistemas de estudio considerando solo los efectos de las variables y las interacciones de dos factores. Para ello es suficiente con realizar una parte del diseño completo mediante lo que se denominan diseños factoriales fraccionados.

Los diseños factoriales fraccionados solo realizan una parte del correspondiente diseño completo. La notación utilizada en este caso es 2^{k-p} donde p indica el grado de fraccionamiento del diseño. Nuevamente, el resultado de esta expresión proporciona el número de experimentos.

Una vez seleccionadas de entre todas las posibles variables las que ejercen un efecto significativo sobre la respuesta medida, el siguiente paso es, a menudo, optimizar estas variables, es decir, encontrar las condiciones que producen la mejor señal o respuesta. En este caso, es necesario realizar diseños con tres o más niveles para cada factor con objeto de poder detectar curvaturas. Existen dos estrategias para optimizar variables: secuencial y simultánea.

La primera de ellas consiste en realizar un número muy reducido de experiencias y utilizar la información obtenida para seleccionar los próximos experimentos. El proceso prosigue hasta alcanzar las condiciones más favorables. La optimización por el método “simplex” [239] es una de las más utilizadas.

La estrategia simultánea realiza un número determinado de experimentos de acuerdo con un plan establecido previamente y como ejemplos pueden citarse los diseños compuestos centrales y los de Plackett-Burman.

El diseño Box-Behnken es otro ejemplo de este grupo. Cuando el número de factores es tres, los valores de las variables pueden visualizarse mediante el solapamiento de tres diseños factoriales completos 2^2 y su punto central o mediante los puntos que se encuentran en la mitad de todos los lados de un cubo y su centro. Estos diseños estudian cada variable en tres niveles.

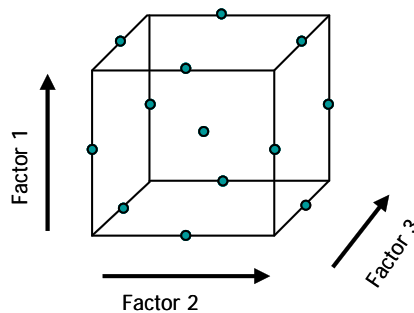


Figura 19: *Diseño Box-Behnken*

La figura 19 muestra los valores que toman las variables de las 13 muestras que constituyen el diseño. Los puntos experimentales están situados a la misma distancia del centro del cubo, lo que confiere al

diseño la característica de esfericidad que hace que todas las muestras influyan de manera similar en los parámetros calculados a partir de este.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Abdel-Rehim, New trend in simple preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications. I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 801 (2004) 317-321.
- [2] A. El-Beqqali, A. Kussak, M. Abdel-Rehim, Fast and sensitive environmental analysis utilizing microextraction in packed syringe online with gas chromatography-mass spectrometry. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, *J. Chromatogr. A* 1114 (2006) 234-238.
- [3] M. Quinto, G. Spadaccino, D. Nardiello, C. Palermo, P. Amodio, D. Li, D. Centonze, Microextraction by packed sorbent coupled with gas chromatography-mass spectrometry: A comparison between “draw-eject” and “extract-discard” methods under equilibrium conditions for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, *J. Chromatogr. A* 1371 (2014) 30-38.
- [4] A.R. Chaves, F.Z. Leandro, J.A. Carris, M.E.C. Queiroz, Microextraction in packed sorbent for analysis of antidepressants in human plasma by liquid chromatography and spectrophotometric detection, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 2123-2129.
- [5] I.D. de Souza, D.S. Domingues, M.E.C. Queiroz, Hybrid silica monolith for microextraction by packed sorbent to determine drugs from plasma samples by liquid chromatography-tandem mass

spectrometry, *Talanta* 140 (2015) 166-175.

[6] L. Konieczna, A. Roszkowska, A. Synakiewicz, T. Stachowicz-Stencel, E. Adamkiewicz-Drożyńska, T. Bączek, Analytical approach to determining human biogenic amines and their metabolites using eVol microextraction in packed syringe coupled to liquid chromatography mass spectrometry method with hydrophilic interaction chromatography column, *Talanta* 150 (2016) 331-339.

[7] M.M. Moein, A. Abdel-Rehim, M. Abdel-Rehim, Microextraction by packed sorbent (MEPS), *TrAC-Trend. Anal. Chem.* 67 (2015) 34-44.

[8] C. Duan, Z. Shen, D. Wu, Y. Guan, Recent developments in solid-phase microextraction for on-site sampling and sample preparation, *TrAC-Trend. Anal. Chem.* 30 (2011) 1568-1574.

[9] M. Farré, S. Pérez, C. Gonçalves, M.F. Alpendurada, D. Barceló, Green analytical chemistry in the determination of organic pollutants in the aquatic environment, *TrAC-Trend. Anal. Chem.* 29 (2010) 1347-1362.

[10] A. Páleníková, S. Hrouzková, Microextraction in packed syringe: solvent-minimized simple preparation technique, *Monatsh. Chem.* 145 (2014) 537-549.

[11] M. Abdel-Rehim, Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2569-2580.

[12] L. Nováková, H. Vlčková, A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and simple preparation, *Anal. Chim. Acta* 656 (2009) 8-35.

- [13] L. Somaini, M.A. Saracino, C. Marcheselli, S. Zanchini, G. Gerra, M.A. Raggi, Combined liquid chromatography-coulometric detection and microextraction by packed sorbent for the plasma analysis of long acting opioids in heroin addicted patients, *Anal. Chim. Acta* 702 (2011) 280-287.
- [14] S. Magiera, J. Baranowski, Determination of carnitine and acylcarnitines in human urine by means of microextraction in packed sorbent and hydrophilic interaction chromatography-ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Pharmaceut. Biomed.* 109 (2015) 171-176.
- [15] T. Abuzooda, A. Amini, M. Abdel-Rehim, Graphite-based microextraction by packed sorbent for online extraction of β -blockers from human plasma samples, *J. Chromatogr. B* 992 (2015) 86-90.
- [16] R. Mandrioli, L. Mercolini, D. Lateana, G. Boncompagni, M.A. Raggi, Analysis of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma, urine and saliva by MEPS-LC-UV, *J. Chromatogr. B* 879 (2011) 167-173.
- [17] C. Silva, C. Cavaco, R. Perestrelo, J. Pereira, J.S. Câmara, Microextraction by packed sorbent (MEPS) and Solid-Phase microextraction (SPME) as sample preparation procedures for the metabolomic profiling of urine, *Metabolites* 4 (2014) 71-97.
- [18] R. Perestrelo, C.L. Silva, J.S. Câmara, Determination of urinary levels of leukotriene B₄ using a highly specific and sensitive methodology based on automatic MEPS combined with UHPLC-PDA analysis, *Talanta* 144 (2015) 382-389.

-
- [19] M.A. Saracino, L. Santarcangelo, M.A. Raggi, L. Mercolini, Microextraction by packed sorbent (MEPS) to analyze catecholamines in innovative biological samples, *J. Pharmaceut. Biomed.* 104 (2015) 122-129.
- [20] V. Alves, J. Gonçalves, C. Conceição, H.M. Teixeira, J.S. Câmara, An improved analytical strategy combining microextraction by packed sorbent combined with ultra high pressure liquid chromatography for the determination of fluoxetine, clomipramine and their active metabolites in human urine, *J. Chromatogr. A* 1408 (2015) 30-40.
- [21] V.C. Jardim, L.P. Melo, D.S. Domingues, M.E.C. Queiroz, Determination of parabens in urine samples by microextraction using packed sorbent and ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 974 (2015) 35-41.
- [22] I. Moreno, M. Barroso, A. Martinho, A. Cruz, E. Gallardo, Determination of ketamine and its major metabolite, norketamine, in urine and plasma samples using microextraction by packed sorbent and gas chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 1004 (2015) 67-78.
- [23] M. Sergi, C. Montesano, S. Odoardi, L.M. Rocca, G. Fabrizi, D. Compagnone, R. Curini, Micro extraction by packed sorbent coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the rapid and sensitive determination of cannabinoids in oral fluid, *J. Chromatogr. A* 1301 (2013) 139-146.
- [24] M. Woźniakiewicz, R. Wietecha-Posłuszny, A. Moos, M. Wieczorek, P. Knihnicki, P. Kościelniak, Development of

microextraction by packed sorbent for toxicological analysis of tricyclic antidepressant drugs in human oral fluid, *J. Chromatogr. A* 1337 (2014) 9-16.

[25] M. Locatelli, M.T. Ciavarella, D. Paolino, C. Celia, E. Fiscarelli, G. Ricciotti, A. Pompilio, G. di Bonaventura, R. Grande, G. Zengin, L. di Marzio, Determination of ciprofloxacin and levofloxacin in human sputum collected from cystic fibrosis patients using microextraction by packed sorbent-high performance liquid chromatography photodiode array detector, *J. Chromatogr. A* 1419 (2015) 58-66.

[26] A. Prieto, S. Schrader, M. Moeder, Determination of organic priority pollutants and emerging compounds in wastewater and snow samples using multiresidue protocols on the basis of microextraction by packed sorbents coupled to large volume injection gas chromatography-mass spectrometry analysis, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6002-6011.

[27] M. Moeder, S. Schrader, U. Winkler, R. Rodil, At-line microextraction by packed sorbent-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of UV filter and polycyclic musk compounds in water samples, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2925-2932.

[28] M. del Nogal Sánchez, C. Pérez Sappó, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, A method based on microextraction by packed sorbent-programmed temperature vaporizer-fast gas chromatography-mass spectrometry for the determination of aromatic amines in environmental water samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 2007-2015.

- [29] G. Grueiro Noche, M.E. Fernández Laespada, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Determination of chlorobenzenes in water samples based on fully automated microextraction by packed sorbent coupled with programmed temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 6739-6748.
- [30] A.M. Casas Ferreira, M.E. Fernández Laespada, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, *In situ* derivatization coupled to microextraction by packed sorbent and gas chromatography for the automated determination of haloacetic acids in chlorinated water, *J. Chromatogr. A* 1318 (2013) 35-42.
- [31] I. González-Mariño, J.B. Quintana, I. Rodríguez, S. Schrader, M. Moeder, Fully automated determination of parabens, triclosan and methyl triclosan in wastewater by microextraction by packed sorbents and gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 684 (2011) 50-66.
- [32] A. Prieto, S. Schrader, C. Bauer, M. Moeder, Synthesis of a molecularly imprinted polymer and its application for microextraction by packed sorbent for the determination of fluoroquinolone related compounds in water, *Anal. Chim. Acta* 685 (2011) 146-152.
- [33] G. Grueiro Noche, M.E. Fernández Laespada, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, S. Muniategui Lorenzo, Microextraction by packed sorbent for the analysis of pharmaceutical residues in environmental water samples by *in situ* derivatization-programmed temperature vaporizer-gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 9390-9396.

- [34] M.P. Martínez-Moral, M.T. Tena, Use of microextraction by packed sorbents following selective pressurized liquid extraction for the determination of brominated diphenyl ethers in sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1364 (2014) 28-35.
- [35] R.M. González Paredes, C. García Pinto, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, *In situ* derivatization combined to automated microextraction by packed sorbents for the determination of chlorophenols in soil samples by gas chromatography mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1359 (2014) 52-59.
- [36] L. Magrini, A. Cappiello, G. Famiglini, P. Palma, Microextraction by packed sorbent (MEPS)-UHPLC-UV: a simple and efficient method for the determination of five benzodiazepines in an alcoholic beverage, *J. Pharmaceut. Biomed.* 125 (2016) 48-53.
- [37] J.L. Gonçalves, V.L. Alves, F.P. Rodrigues, J.A. Figueira, J.S. Câmara, A semi-automatic microextraction in packed sorbent, using a digitally controlled syringe, combined with ultra-high pressure liquid chromatography as a new and ultra-fast approach for the determination of prenylflavonoids in beers, *J. Chromatogr. A* 1304 (2013) 42-51.
- [38] J.M. Leça, V. Pereira, A.C. Pereira, J.C. Marques, Rapid and sensitive methodology for determination of ethyl carbamate in fortified wines using microextraction by packed sorbent and gas chromatography with mass spectrometric detection, *Anal. Chim. Acta* 811 (2014) 29-35.
- [39] R. Perestrelo, C.L. Silva, J.S. Câmara, Quantification of furanic derivatives in fortified wines by a highly sensitive and ultrafast

analytical strategy based on digitally controlled microextraction by packed sorbent combined with ultrahigh pressure liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1381 (2015) 54-63.

[40] J. Gonçalves, C.L. Silva, P.C. Castilho, J.S. Câmara, An attractive, sensitive and high-throughput strategy based on microextraction by packed sorbent followed by UHPLC-PDA analysis for quantification of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in wines, *Microchem. J.* 106 (2013) 129-138.

[41] M. Adam, P. Pavlíková, A. Čížková, P. Bajerová, K. Ventura, Microextraction by packed sorbent (MEPS) as suitable selective method for L-ascorbic acid determination in beverages, *Food Chem.* 135 (2012) 1613-1618.

[42] F.H. Salami, M.E.C. Queiroz, Microextraction in packed sorbent for the determination of pesticides in honey samples by gas chromatography coupled to mass spectrometry, *J. Chromatogr. Sci.* 51 (2013) 899-904.

[43] W. Du, C. Lei, S. Zhang, G. Bai, H. Zhou, M. Sun, Q. Fu, C. Chang, Determination of clenbuterol from pork samples using surface molecularly imprinted polymers as the selective sorbents for microextraction in packed syringe, *J. Pharmaceut. Biomed.* 91 (2014) 160-168.

[44] M. del Nogal Sánchez, P. Martín Santos, C. Pérez Sappó, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Microextraction by packed sorbent and salting-out-assisted liquid-liquid extraction for the determination of aromatic amines formed from azo dyes in textiles, *Talanta* 119 (2014)

375-384.

[45] B. Kolb, L.S. Ettre, *Static Headspace-Gas Chromatography*, Wiley Interscience, Hoboken, New Jersey, 2006.

[46] R.P. Belardi, J. Pawliszyn, Application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns, *Water Pollut. Res. J. Can.* 24 (1989) 179-191.

[47] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145-2148.

[48] Z. Zhang, J. Pawliszyn, Headspace solid-phase microextraction, *Anal. Chem.* 65 (1993) 1843-1852.

[49] R-s. Zhao, W-j. Lao, X-b. Xu, Headspace liquid-phase microextraction of trihalomethanes in drinking water and their gas chromatographic determination, *Talanta* 62 (2004) 751-756.

[50] J.W. Swinnerton, V.J. Linnenboom, C.H. Cheek, Determination of dissolved gases in aqueous solutions by gas chromatography, *Anal. Chem.* 34 (1962) 483-485.

[51] J.W. Swinnerton, V.J. Linnenboom, C.H. Cheek, Revised sampling procedure for determination of dissolved gases in solution by gas chromatography, *Anal. Chem.* 34 (1962) 1509.

[52] T.A. Bellar, J.J. Lichtenberg, Determining volatile organics at microgram-per-litre levels by gas chromatographs, *J. Am. Water Works*

Ass. 66 (1974) 739-744.

[53] B. Kolb, Headspace sampling with capillary columns, *J. Chromatogr. A* 842 (1999) 163-205.

[54] H-J. Stan, M. Linkerhägner, Large-volume injection in residue analysis with capillary gas chromatography using a conventional autosampler and injection by programmed-temperature vaporization with solvent venting, *J. Chromatogr. A* 727 (1996) 275-289.

[55] J. Zrostlíková, J. Hajšlová, M. Godula, K. Maštovská, Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices, *J. Chromatogr. A* 937 (2001) 73-86.

[56] B. Kolahgar, E. Pfannkock, Technical Note 36, Gerstel, Mülheim/Ruhr.

[57] J.L. Pérez Pavón, A.M. Casas Ferreira, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, *In situ* derivatization reaction and determination of ibuprofen in water samples using headspace generation-programmed temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6728-6734.

[58] C. Martínez, N. Ramírez, V. Gómez, E. Pocerull, F. Borrull, Simultaneous determination of 76 micropollutants in water samples by headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Talanta* 116 (2013) 937-945.

[59] P-S. Chen, Y-H. Tseng, Y-L. Chuang, J-H. Chen, Determination of volatile organic compounds in water using headspace knotted hollow

fiber microextraction, *J. Chromatogr. A* 1395 (2015) 41-47.

[60] M. Behzadi, M. Mirzaei, Poly(o-anisidine)/graphene oxide nanosheets composite as coating for the headspace solid-phase microextraction of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes, *J. Chromatogr. A* 10.1016/j.chroma.2016.03.039.

[61] A.R. Ghiasvand, M. Pirdadeh-Beiranvand, Cooling/heating-assisted headspace solid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils, *Anal. Chim. Acta* 900 (2015) 56-66.

[62] R. Magnusson, T. Nordlander, A. Östin, Development of a dynamic headspace gas chromatography-mass spectrometry method for on-site analysis of sulfur mustard degradation products in sediments, *J. Chromatogr. A* 1429 (2016) 40-52.

[63] M. del Nogal Sánchez, J.L. Pérez Pavón, M.E. Fernández Laespada, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, Factors affecting signal intensity in headspace mass spectrometry for the determination of hydrocarbon pollution in beach sands, *Anal. Bioanal. Chem.* (2005) 372-380.

[64] G. Hu, Y. Zhu, M. Hernández, T. Koutchma, S. Shao, An efficient method for the simultaneous determination of furan, 2-methylfuran and 2-pentylfuran in fruit juices by headspace solid phase microextraction and gas chromatography-flame ionisation detector, *Food Chem.* 192 (2016) 9-14.

[65] L.A. Frink, D.W. Armstrong, The utilization of two detectors for the determination of water in honey using headspace gas

chromatography, *Food Chem.* 205 (2016) 23-27.

[66] C-Y. Zhang, Q. Zhang, C-H. Zhong, M-Q. Guo, Analysis of volatile compounds responsible for kiwifruit aroma by desiccated headspace gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1440 (2016) 255-259.

[67] E. Canellas, P. Vera, C. Nerín, Multiple headspace-solid phase microextraction for the determination of migrants coming from a self-stick label in fresh sausage, *Food Chem.* 197 (2016) 24-29.

[68] A.R. Chiasvand, S. Hajipour, Direct determination of acrylamide in potato chips by using headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-flame ionization detection, *Talanta* 146 (2016) 417-422.

[69] W. Hu, L. Zhang, P. Li, X. Wang, Q. Zhang, B. Xu, X. Sun, F. Ma, X. Ding, Characterization of volatile components in four vegetable oils by headspace two-dimensional comprehensive chromatography time-of-flight mass spectrometry, *Talanta* 129 (2014) 629-635.

[70] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, Determination of filbertone in spiked olive oil samples using headspace-programmed temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 1463-1470.

[71] S-X. Zhang, X-S. Chai, B-X. Huang, X-X. Mai, A robust method for determining water-extractable alkylphenol polyethoxylates in textile products by reaction-based headspace gas chromatography, *J.*

Chromatogr. A 1406 (2015) 94-98.

[72] M.J. Cardador, M. Gallego, Determination of haloacetic acids in human urine by headspace gas chromatography-mass spectrometry, J. Chromatogr. B 878 (2010) 1824-1830.

[73] J. Caro, A. Serrano, M. Gallego, Sensitive headspace gas chromatography-mass spectrometry determination of trihalomethanes in urine, J. Chromatogr. B 848 (2007) 277-282.

[74] A. Valenzuela, G. Lespes, W. Quiroz, L.F. Aguilar, M.A. Bravo, Speciation analysis of organotin compounds in human urine by headspace solid-phase micro-extraction and gas chromatography with pulsed flame photometric detection, Talanta 125 (2014) 196-203.

[75] Z. Cui, K. Zhang, Q. Zhou, J. Liu, G. Jiang, Determination of methyltin compounds in urine of occupationally exposed and general population by *in situ* ethylation and headspace SPME coupled with GC-FPD, Talanta 85 (2011) 1028-1033.

[76] C.L. Silva, M. Passos, J.S. Câmara, Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry, British Journal of Cancer 105 (2011) 1894-1904.

[77] Y. Hanai, K. Shimono, K. Matsumura, A. Vachani, S. Albelda, K. Yamazaki, G.K. Bauchamp, H. Oka, Urinary Volatile Compounds as Biomarkers for Lung Cancer, Biosci. Biotechnol. Biochem. 76 (2012) 679-684.

[78] S.M. Rocha, M. Caldeira, J. Carrola, M. Santos, N. Cruz, I.F.

Duarte, Exploring the human urine metabolomic potentialities by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time of flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1252 (2012) 155-163.

[79] S. Smith, H. Burden, R. Persad, K. Whittington, B.L. Costello, N.M. Ratcliffe, C.S. Probert, A comparative study of the analysis of human urine headspace using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Breath Res.* 2 (2008) 1-10.

[80] M.S. Monteiro, M. Carvalho, M.L. Bastos, P.G. Pinho, Chapter: Potentiality of volatiles to discriminate patients with cancer by using chemometric tools. In book: Identification and Data processing methods in metabolomics, Publisher: Future Science, Editors: Eds. London: Future Science, 2015. pp. 167-184.

[81] H.G. Wahl, A. Hoffmann, D. Luft, H.M. Liebich, Analysis of volatile organic compounds in human urine by headspace gas chromatography-mass spectrometry with a multipurpose sampler, *J. Chromatogr. A* 847 (1999) 117-125.

[82] M. del Nogal Sánchez, E. Hernández García, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Fast analytical methodology based on mass spectrometry for the determination of volatile biomarkers in saliva, *Anal. Chem.* 84 (2012) 379-385.

[83] M. del Nogal Sánchez, P.Á. Callejo Gómez, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Á.P. Crisolino Pozas, Á. Sánchez Rodríguez, Sensitivity enhancement in the determination of volatile biomarkers in saliva using a mass spectrometry-based electronic nose with a programmed temperature vaporizer, *Anal. Chem.* 86 (2014) 7890-7898.

- [84] K. Abel, An evaluation of vented programmed temperature precolumns in gas-liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 13 (1964) 14-21.
- [85] W. Vogt, K. Jacob, H. W. Owexer, Sampling method in capillary column gas-liquid chromatography allowing injections of up to 250 μL , *J. Chromatogr.* 174 (1979) 437-439.
- [86] W. Vogt, K. Jacob, A-B. Ohnesorge, H. W. Obwexer, Capillary gas chromatographic injection system for large sample volumes, *J. Chromatogr.* 186 (1979) 197-205.
- [87] F. Poy, S. Visani, F. Terrosi, Automatic injection in high-resolution gas chromatography: a programmed temperature vaporizer as a general purpose injection system, *J. Chromatogr.* 217 (1981) 81-90.
- [88] G. Schomburg, H. Husmann, H. Behlau, F. Schulz, Cold sample injection with either the split or splitless mode of temperature-programmed sample transfer. Design and testing of a new, electrically heated construction for universal application of different modes of sampling, *J. Chromatogr.* 279 (1983) 251-258.
- [89] W. Engewald, J. Teske, J. Efer, Programmed temperature vaporiser-based injection in capillary gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 259-278.
- [90] Sistema de inyección refrigerado CIS 4, manual de usuario, Ver. Española 1.0, Andaluza de Instrumentación, Sevilla, España, 2000.
- [91] D.C. Harris, *Análisis Químico Cuantitativo* 2^a edición, 2001, Editorial Reverté S.A., Barcelona.

-
- [92] H.-M. Müller, H.-J. Stan, Thermal degradation observed with different injection techniques: quantitative estimation by the use of thermolabile carbamate pesticides, *J. High Resolut. Chromatogr.* 13 (1990) 759-763.
- [93] M. Hada, M. Takino, T. Yamagami, S. Daishima, K. Yamaguchi, Trace analysis of pesticide residues in water by high-speed narrow-bore capillary gas chromatography-mass spectrometry with programmable temperature vaporizer, *J. Chromatogr. A* 874 (2000) 81-90.
- [94] J.L. Pérez-Pavón, S. Herrero-Martín, C. García-Pinto, B. Moreno-Cordero, Programmed temperature vaporizer based method for the sensitive determination of trihalomethanes and benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soils, *J. Chromatography A* 1216 (2009) 6063-6070.
- [95] M. Herraiz, G. Reglero, E. Loyola, T. Herraiz, Sampling of volatile components using a PTV in the solvent split mode, *J. High Resolut. Chromatogr. Commun.* 10 (1987) 598-602.
- [96] H.G.J. Mol, P.J.M. Hendriks, H-G. Janssen, C.A. Cambers, U.A.Th. Brinkman, Large volume injection in capillary GC using PTV injectors: comparison of inertness of packing materials, *J. High Resolut. Chromatogr.* 18 (1995) 124-128.
- [97] E. Hoh, K. Mastovska, Large volume injection techniques in capillary gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 1186 (2008) 2-15.
- [98] H. Shen, R. Guan, J. Li, L. Zhang, Y. Ren, X. Xu, Y. Song, Y. Zhao, J. Han, Y. Wu, Determination of dioxin-like polychlorinated biphenyls in 1

mL whole blood using programmable temperature vaporization large volume injection coupled to gas chromatogram and high-resolution mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 767 (2013) 112-117.

[99] J. Teske, K. Putzbach, W. Engewald, R.K. Müller, Determination of cannabinoids by gas chromatography-mass spectrometry and large-volume programmed-temperature vaporiser injection using 25 μ L of biological fluid, *J. Chromatogr. B* 772 (2002) 299-306.

[100] A. Vemeulen, K. Welvaert, J. Verammen, Evaluation of a dedicated gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of phenols in water, *J. Chromatogr. A* 1071 (2005) 41-46.

[101] A. Covaci, J.D. Boer, J.J. Ryan, S. Voorspoels, P. Schepens, Determination of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in human adipose tissue by large-volume injection-narrow-bore capillary gas chromatography/electron impact low-resolution mass spectrometry, *Anal. Chem.* 74 (2002) 790-798.

[102] V. Yusà, G. Quintas, O. Pardo, A. Pastor, M. Guardia, Determination of PAHs in airborne particles by accelerated solvent extraction and large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometry, *Talanta* 69 (2006) 807-815.

[103] B.S. Crimmins, J.E. Baker, Improved GC/MS methods for measuring hourly PAH and nitro-PAH concentrations in urban particulate matter, *Atmos. Environ.* 40 (2006) 6764-6779.

[104] V. Ferreira, L. Culleré, N. Loscos, J. Cacho, Critical aspects of the determination of pentafluorobenzyl derivatives of aldehydes by gas

chromatography with electron-capture or mass spectrometric detection. Validation of an optimized strategy for the determination of oxygen-related odor-active aldehydes in wine, *J. Chromatogr A* 1122 (2006) 255-265.

[105] A. Herrero, C. Reguera, M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, Determination of dichlorobenil and its major metabolite (BAM) in onions by PTV-GC-MS using PARAFAC2 and experimental design methodology, *Chemometr. Intell. Lab. 133* (2014) 92-108.

[106] C. Guitart, J.W. Readman, Critical evaluation of the determination of pharmaceuticals, personal care products, phenolic endocrine disrupters and faecal steroids by GC/MS and PTV-GC/MS in environmental waters, *Anal. Chim. Acta* 658 (2010) 32-40.

[107] J. Efer, S. Müller, W. Engewald, Th. Knobloch, K. Levsen, Indirect GC determination of Ethephon in drinking water by a combination of reactive headspace sampling with adsorptive enrichment/thermal desorption, *Chromatographia* 37 (1993) 361-364.

[108] G. Bartolucci, E. Droghetti, C. Focardi, M. Bambagiotti-Alberti, M. Nocentini, G. Smulevich, High throughput headspace GC-MS quantitative method to measure the amount of carbon monoxide in treated tuna fish, *J. Mass Spectrom.* 45 (2010) 1041-1045.

[109] B. Gilbert-López, J. Robles-Molina, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, Rapid determination of BTEXS in olives and olive oil by headspace-gas chromatography/mass spectrometry (HS-GC-MS), *Talanta* 83 (2010) 391-399.

[110] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, Simultaneous determination of gasoline oxygenates and benzene, toluene, ethylbenzene and xylene in water samples using headspace-programmed temperature vaporization-fast gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1175 (2007) 106-111.

[111] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández Laespada, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, Analysis of class 1 residual solvents in pharmaceuticals using headspace-programmed temperature vaporization-fast gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1141 (2007) 123-130.

[112] J.L. Pérez Pavón, S. Herrero Martín, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, Headspace-programmed temperature vaporizer-fast gas chromatography-mass spectrometry coupling for the determination of trihalomethanes in water, *J. Chromatogr. A* 1194 (2008) 103.

[113] M. del Nogal Sánchez, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Determination of suspected allergenes in cosmetic products by headspace-programmed temperature vaporization-fast gas chromatography-quadrupole mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 2579-2591.

[114] M. del Nogal Sánchez, P. Glanzer, J.L. Pérez Pavón, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, Determination of antioxidants in new and used lubricant oils by headspace-programmed temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 3215-3224.

[115] J.L. Pérez Pavón, A.M. Casas Ferreira, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, Use of a programmed temperature vaporizer and an in situ derivatization reaction to improve sensitivity in headspace-gas chromatography. Application to the analysis of chlorophenols in water, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1192-1199.

[116] A.M. Casas Ferreira, M.E. Fernández Laespada, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Headspace sampling with in situ carbodiimide-mediated derivatization for the determination of ibuprofen in water samples, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4856-4862.

[117] R. Eiden, H.F. Schöler, M. Gastner, In situ ethylation-purge and programmed-temperature-vaporizer cold trapping-gas chromatography-mass spectrometry as an automated technique for the determination of methyl- and butyltin compounds in aqueous samples, *J. Chromatogr. A* 809 (1998) 151-157.

[118] N.R. Auer, B.U. Manzke, D.E. Schulz-Bull, Development of a purge and trap continuous flow system for the stable carbon isotope analysis of volatile halogenated organic compounds in water, *J. Chromatogr. A* 1131 (2006) 24-36.

[119] C. Basheer, H.K. Lee, Analysis of endocrine disrupting alkylphenols, chlorophenols and bisphenol-A using hollow fiber-protected liquid-phase microextraction coupled with injection port-derivatization gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1057 (2004) 163-169.

[120] F. Jaber, C. Schummer, J.A. Chami, P. Mirabel, M. Millet, Solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for

analysis of phenols and nitrophenols in rainwater, as their *t*-butyldimethylsilyl derivatives, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 2527-2535.

[121] N. Ochiai, K. Sasamoto, F. David, P. Sandra, Solvent-assisted stir bar sorptive extraction by using swollen polydimethylsiloxane for enhanced recovery of polar solutes in aqueous samples: Application to aroma compounds in beer and pesticides in wine, *J. Chromatogr. A* 1455 (2016) 45-56.

[122] A.M. Casas Ferreira, M. Möder, M.E. Fernández Laespada, GC-MS determination of parabens, triclosan and methyl triclosan in water by *in situ* derivatisation and stir-bar sorptive extraction, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 945-953.

[123] A.M. Casas Ferreira, M. Möder, M.E. Fernández Laespada, Stir bar sorptive extraction of parabens, triclosan and methyl triclosan from soil, sediment and sludge with *in situ* derivatization and determination by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 3837-3844.

[124] P. Sun, D.W. Armstrong, Ionic liquids in analytical chemistry, *Anal. Chim. Acta* 661 (2010) 1-16.

[125] J.S. Wilkes, Properties of ionic liquid solvents for catalysis, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 214 (2004) 11-17.

[126] R. Leyma, S. Platzer, F. Jirsa, W. Kandioller, R. Krachler, B.K. Keppler, Novel thiosalicylate-based ionic liquids for heavy metal extractions, *J. Hazard. Mater.* 314 (2016) 164-171.

- [127] A. Arce, M.J. Earle, S.P. Katdare, H. Rodríguez, K.R. Seddon, Application of mutually immiscible ionic liquids to the separation of aromatic and aliphatic hydrocarbons by liquid extraction: a preliminary approach, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 10 (2008) 2538-2542.
- [128] J. Wang, D. Cheng, X. Chen, Z. Du, Z. Fang, Direct extraction of double-stranded DNA into ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate and its quantification, *Anal. Chem.* 79 (2007) 620-625.
- [129] Y. Lu, W. Ma, R. Hu, X. Dai, Y. Pan, Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of phenolic alkaloids from the medicinal plant *Nelumbo nucifera* Gaertn, *J. Chromatogr. A* 1208 (2008) 42-46.
- [130] Z. Yang, Z. Tan, F. Li, X. Li, An effective method for the extraction and purification of chlorogenic acid from ramie (*Boehmeria nivea* L.) leaves using acidic ionic liquids, *Ind. Crop. Prod.* 89 (2016) 78-86.
- [131] L. Vidal, M-L. Riekkola, A. Canals, Ionic liquid-modified materials for solid-phase extraction and separation: A review, *Anal. Chim. Acta* 715 (2012) 19-41.
- [132] M.A. Farajzadeh, M. Bamorowat, M.R.A. Mogaddam, Ringer tablet-based ionic liquid phase microextraction: Application in extraction and preconcentration of neonicotinoid insecticides from fruit juice and vegetable samples, *Talanta* doi:10.1016/j.talanta.2016.03.097
- [133] J. Wang, S. Huang, P. Wang, Y. Yang, Method development for the analysis of phthalate esters in tea beverages by ionic liquid hollow fibre liquid-phase microextraction and liquid chromatographic detection,

Food Control 67 (2016) 278-284.

[134] L. Vidal, A. Chisvert, A. Canals, A. Salvador, Ionic liquid-based single-drop microextraction followed by liquid chromatography-ultraviolet spectrophotometry detection to determine typical UV filters in Surface water samples, *Talanta* 81 (2010) 549-555.

[135] L. Wang, D. Zhang, X. Xu, L. Zhang, Application of ionic liquid-based dispersive liquid phase microextraction for highly sensitive simultaneous determination of three endocrine disrupting compounds in food packaging, *Food Chem.* 197 (2016) 754-760.

[136] F. Shi, J. Liu, K. Liang, R. Liu, Tris(pentafluoroethyl) trifluorophosphate-based ionic liquids as advantageous solid-phase micro-extraction coatings for the extraction of organophosphate esters in environmental waters, *J. Chromatogr. A* 1447 (2016) 9-16.

[137] E. Aguilera-Herrador, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, The roles of ionic liquids in sorptive microextraction techniques, *TrAC-Trend. Anal. Chem.* 29 (2010) 602-616.

[138] J. Chen, X. Zhu, Magnetic solid phase extraction using ionic liquid-coated core-shell magnetic nanoparticles followed by high-performance liquid chromatography for determination of Rhodamine B in food samples, *Food Chem.* 200 (2016) 10-15.

[139] H.N. Abdelhamid, Ionic liquids for mass spectrometry: Matrices, separation and microextraction, *TrAC-Trend. Anal. Chem.* 77 (2016) 122-138.

[140] M. Galinski, A. Lewandowski, I. Stepniak, Ionic liquids as

electrolytes, *Electrochim. Acta* 51 (2006) 5567-5580.

[141] A. Safavi, N. Maleki, E. Farjami, F.A. Mahyari, Simultaneous electrochemical determination of glutathione and glutathione disulfide at a nanoscale copper hydroxide composite carbon ionic liquid electrode, *Anal. Chem.* 81 (2009) 7538-7543.

[142] X. Wang, K. Zheng, X. Feng, C. Xu, W. Song, Polymeric ionic liquid functionalized MWCNTs as efficient electrochemical interface for biomolecules simultaneous determination, *Sensor. Actuator.* 219 (2015) 361-369.

[143] L. Daneshvar, G. Rounaghi, Z. E'shaghi, M. Chamsaz, S. Tarahomi, Electrochemical determination of carbamazepine in the presence of paracetamol using a carbon ionic liquid paste electrode modified with a three-dimensional graphene/MWCNT hybrid composite film, *J. Mol. Liq.* 215 (2016) 316-322.

[144] E. Wanigasekara, X. Zhang, Y. Nanayakkara, T. Payagala, H. Moon, D.W. Armstrong, Linear tricationic room-temperature ionic liquids: synthesis, physicochemical properties, and electrowetting properties, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 1 (2009) 2126-2133.

[145] C. D. Tran, D. Oliveira, S. Yu, Chiral ionic liquid that functions as both solvent and chiral selector for the determination of enantiomeric compositions of pharmaceutical products, *Anal. Chem.* 78 (2006) 1349-1356.

[146] R. Adhikary, S. Bose, P. Mukherjee, A. Thite, G. A. Kraus, A.B. Wijeratne, P.S. Sharma, D. W. Armstrong, J. W. Petrich, Influence of

chiral ionic liquids on the excited-state properties of naproxen analogs, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 7555-7559.

[147] A. Kamio, Y. Nagaosa, 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid as a new solvent for the determination of Lead(II) and Cadmium(II) by anodic stripping voltammetry after extraction of the iodide complexes, *Anal. Sci.* 24 (2008) 1363-1367.

[148] D. Giovanelli, M.C. Buzzeo, N.S. Lawrence, C. Hardacre, K.R. Seddon, R.G. Compton, Determination of ammonia based on the electro-oxidation of hydroquinone in dimethylformamide or in the room temperature ionic liquid, 1-ethyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide, *Talanta* 62 (2004) 904-911.

[149] E. S. Forzani, D. Lu, M.J. Leright, A.D. Aguilar, F. Tsow, R.A. Iglesias, Q. Zhang, J. Lu, J. Li, N. Tao, A hybrid electrochemical-colorimetric sensing platform for detection of explosives, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 1390-1391.

[150] S. Tang, S. Liu, Y. Guo, X. Liu, S. Jiang, Recent advances of ionic liquids and polymeric ionic liquids in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A* 1357 (2014) 147-157.

[151] T. Jiang, Y. Gu, B. Liang, J. Li, Y. Shi, W. Ou, Dynamically coating the capillary with 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids for separation of basic proteins by capillary electrophoresis, *Anal. Chim. Acta* 479 (2003) 249-254.

[152] S. Qi, T. Li, Y. Deng, Y. Cheng, X. Chen, Z. Hu, Simultaneous determination of bioactive flavone derivatives in Chinese herb

extraction by capillary electrophoresis used different electrolyte systems-Borate and ionic liquids, *J. Chromatogr. A* 1109 (2006) 300-306.

[153] T. Krizek, Z.S. Breitbach, D.W. Armstrong, E. Tesarova, P. Coufal, Separation of inorganic and small organic anions by CE using phosphonium-based mono- and dicationic reagents, *Electrophoresis* 30 (2009) 3955-3963.

[154] Y. Lu, C. Jia, Q. Yao, H. Zhong, M.C. Breadmore, Analysis of flavonoids by non-aqueous capillary electrophoresis with 1-ethyl-3-methylimidazolium ionic-liquid as background electrolytes, *J. Chromatogr. A* 1319 (2013) 160-165.

[155] M. Borissova, K. Palk, M. Koel, Micellar electrophoresis using ionic liquids, *J. Chromatogr. A* 1183 (2008) 192-195.

[156] R. Kaliszan, M. P. Marszall, M. J. Markuszewski, T. Baczek, J. Pernak, Suppression of deleterious effects of free silanols in liquid chromatography by imidazolium tetrafluoroborate ionic liquids, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 263-271.

[157] P.H. Shetty, P. J. Youngberg, B.R. Kersten, C.F. Poole, Solvent properties of liquid organic salts used as mobile phases in microcolumn reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 411 (1987) 61-79.

[158] J.J. Fernández-Navarro, M.C. García-Álvarez-Coque, M.J. Ruiz-Ángel, The role of the dual nature of ionic liquids in the reversed-phase liquid chromatographic separation of basic drugs, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 398-407.

[159] X. Shi, L. Qiao, G. Xu, Recent development of ionic liquid

stationary phases for liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1420 (2015) 1-15.

[160] X. Li, Z. Zhou, Enantioseparation performance of novel benzimido- β -cyclodextrins derivatized by ionic liquids as chiral stationary phases, *Anal. Chim. Acta* 819 (2014) 122-129.

[161] M. Zhang, X. Liang, S. Jiang, H. Qiu, Preparation and applications of surface-confined ionic-liquid stationary phases for liquid chromatography, *TrAC-Trend. Anal. Chem.* 53 (2014) 60-72.

[162] K. Hu, W. Zhang, H. Yang, Y. Cui, J. Zhang, W. Zhao, A. Yu, S. Zhang, Calixarene ionic liquid modified silica gel: A novel stationary phase for mixed-mode chromatography, *Talanta* 152 (2016) 392-400.

[163] D. W. Barber, C. S. G. Phillips, G. F. Tusa, A. Verdin, The chromatography of gases and vapours. Part VI.* Use of the stearates of bivalent manganese, cobalt, nickel, copper, and zinc as column liquids in gas chromatography, *J. Chem. Soc.* (1959) 18-24.

[164] F. Pacholec, H. T. Butler, C. F. Poole, Molten organic salt phase for gas-liquid chromatography, *Anal. Chem.* 54 (1982) 1938-1941.

[165] F. Pacholec, C. F. Poole, Stationary phase properties of the organic molten salt ethylpyridinium bromide in gas chromatography, *Chromatographia* 17 (1983) 370-374.

[166] D.W. Armstrong, L. He, Y.S. Liu, Examination of ionic liquids and their interaction with molecules, when used as stationary phases in gas chromatography, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3873-3876.

-
- [167] J.L. Anderson, D.W. Armstrong, High-stability ionic liquids. A new class of stationary phases for gas chromatography, *Anal. Chem.* 75 (2003) 4851-4858.
- [168] J.L. Anderson, D.W. Armstrong, Immobilized ionic liquids as high-selectivity/high-temperature/high-stability gas chromatography stationary phases, *Anal. Chem.* 77 (2005) 6453-6462.
- [169] K. Huang, X. Han, X. Zang, D.W. Armstrong, PEG-linked germinal dicationic ionic liquids as selective, high-stability gas chromatographic stationary phases, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 2265-2275.
- [170] Z.S. Breitbach, D.W. Armstrong, Characterization of phosphonium ionic liquids through a linear solvation energy relationship and their use as GLC stationary phases, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 1605-1617.
- [171] L. M. Sidisky and M. D. Buchanan, Supelco Patented Ionic Liquid GC Phase Technology, *Supelco Reporter* 26 (2008) 3.
- [172] C. Reyes-Contreras, C. Domínguez, J.M. Bayona, Determination of nitrosamines and caffeine metabolites in wastewater using gas chromatography mass spectrometry and ionic liquid stationary phases, *J. Chromatogr. A* 1261 (2012) 164-170.
- [173] C. Domínguez, C. Reyes-Contreras, J.M. Bayona, Determination of benzothiazoles and benzotriazoles by using ionic liquid stationary phases in gas chromatography mass spectrometry. Application to their characterization in wastewater, *J. Chromatogr. A* 1230 (2012) 117-122.
- [174] J. de Boer, D. Blok, A. Ballesteros-Gómez, Assessment of ionic liquid stationary phases for the determination of polychlorinated

biphenyls, organochlorine pesticides and polybrominated diphenyl ethers, *J. Chromatogr. A* 1348 (2014) 158-163.

[175] C. Zhang, R.A. Park, J.L. Anderson, Crosslinked structurally-tuned polymeric ionic liquids as stationary phases for the analysis of hydrocarbons in kerosene and diesel fuels by comprehensive two-dimensional gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 1440 (2016) 160-171.

[176] C. Zhang, I.C. Ingram, L.W. Hantao, J.L. Anderson, Identifying important structural features of ionic liquid stationary phases for the selective separation of nonpolar analytes by comprehensive two-dimensional gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 1386 (2015) 89-97.

[177] R.M. González Paredes, C. García Pinto, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Ionic liquids as stationary phases in gas chromatography: Determination of chlorobenzenes in soils, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 1448-1455.

[178] C.F. Poole, N. Lenca, Gas chromatography on wall-coated open-tubular columns with ionic liquid stationary phases, *J. Chromatogr. A* 1357 (2014) 87-109.

[179] C. Ragonese, D. Sciarrone, P.Q. Tranchida, P. Dugo, L. Mondello, Use of ionic liquids as stationary phases in hyphenated gas chromatography techniques, *J. Chromatogr. A* 1255 (2012) 130-144.

[180] L. Qiao, K. Lu, M. Qi, R. Fu, Separation performance of guanidinium-based ionic liquids as stationary phases for gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 1276 (2013) 112-119.

[181] L. Wang, X. Wang, M. Qi, R. Fu, Cucurbit[6]uril in combination

with guanidinium ionic liquid as a new type of stationary phase for capillary gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 1334 (2014) 112-117.

[182] L. González Mendoza, J. González-Álvarez, C. Fernández Gonzalo, P. Arias-Abrodo, B. Altava, S.V. Luis, M.I. Burguete, M.D. Gutiérrez-Álvarez, Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters of milk fat by an ionic liquid derived from L-phenylalanine as the stationary phase, *Talanta* 143 (2015) 212-218.

[183] M.R. Cavalcanti Inácio, K.M. Gomes de Lima, V. Garcia Lopes, J.D. Cruz Pessoa, G.H. de Almeida Teixeira, Total anthocyanin content determination in intact açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and palmitero-juçara (*Euterpe edulis* Mart.) fruit using near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate calibration, *Food Chem.* 136 (2013) 1160-1164.

[184] J.C.L. Alves, R.J. Poppi, Quantification of conventional and advanced biofuels contents in diesel fuel blends using near-infrared spectroscopy and multivariate calibration, *Fuel* 165 (2016) 379-388.

[185] F.B. de Santana, L.C. Gontijo, H. Mitsutake, S.J. Mazivila, L.M. de Souza, W.B. Neto, Non-destructive fraud detection in rosehip oil by MIR spectroscopy and chemometrics, *Food Chem.* 209 (2016) 228-233.

[186] W. Zhang, N. Li, Y. Feng, S. Su, T. Li, B. Liang, A unique quantitative method of acid value of edible oils and studying the impact of heating on edible oils by UV-Vis spectrometry, *Food Chem.* 185 (2015) 326-332.

[187] F. Liu, B. Li, W. Li, Z. Bai, J. Yperman, Py-MS study of sulfur behavior during pyrolysis of high-sulfur coals under different

atmospheres, *Fuel Process. Technol.* 91 (2010) 1486-1490.

[188] W.F. Wilkens, J.D. Hartman, An electronic analog for the olfactory processes, *J. Food Sci.* 29 (1964) 372-378.

[189] T.M. Buck, F.G. Allen, J.V. Dalton, Detection of chemical species by surface effects on metals and semiconductors. Bell Telephone Laboratories, 1965.

[190] A. Dravnieks, P.J. Trotter, Polar vapour detection based on thermal modulation of contact potentials, *J. Sci. Instrum.* 42 (1965) 624.

[191] K. Persaud, G. Dodd, Analysis of discrimination mechanisms in the mammalian olfactory system using a model nose, *Nature* 299 (1982) 352-355.

[192] S.G. Shirley, A moving nozzle olfactometer, *Chem. Senses* 12 (1987) 525-536.

[193] J.W. Grate, M. Klusty, W.R. Barger, A.W. Snow, Role of selective sorption in chemiresistor sensors for organophosphorus detection, *Anal. Chem.* 62 (1990) 1927-1934.

[194] J.W. Gardner, P.N. Barlett, A brief history of electronic noses, *Sensor. Actuat. B-Chem.* 18 (1994) 211-220.

[195] S-W. Chiu, K-T. Tang, Towards a chemiresistive sensor-integrated electronic nose: A review, *Sensors* 13 (2013) 14214-14247.

[196] H. Alam, S.H. Saeed, Modern applications of electronic nose: A review, *IJECE* 3 (2013) 52-63.

-
- [197] M. Peris, L. Escuder-Gilabert, A 21st century technique for food control: Electronic noses, *Anal. Chim. Acta* 638 (2009) 1-15.
- [198] Y. Adiguzel, H. Kulah, Breath sensors for lung cancer diagnosis, *Biosens. Bioelectron.* 65 (2015) 121-138.
- [199] M. Peris, L. Escuder-Gilabert, On-line monitoring of food fermentation processes using electronic noses and electronic tongues: A review, *Anal. Chim. Acta* 804 (2013) 29-36.
- [200] S.B. Ali, B. Ghatak, S.D. Gupta, N. Debabhuit, P. Chakraborty, P. Sharma, A. Ghosh, B. Tudu, S. Mitra, M.P. Sarkar, N. Bhattacharyya, R. Bandyopadhyay, Detection of 3-Carene in mango using quartz cristal microbalance sensor, *Sensor. Actuat. B-Chem*, 230 (2016) 791-800.
- [201] D.L. García-González, N. Tena, R. Aparicio-Ruiz, R. Aparicio, Sensor responses to fat food aroma: A comprehensive study of dry-cured ham typicality, *Talanta* 120 (2014) 342-348.
- [202] M.E. Escuderos, M. García, A. Jiménez, M.C. Horrillo, Edible and non-edible olive oils discrimination by the application of a sensory olfactory system based on tin dioxide sensors, *Food Chem.* 136 (2013) 1154-1159.
- [203] J. Gutiérrez, M. C. Horrillo, Advances in artificial olfaction: Sensors and applications, *Talanta* 124 (2014) 95-105.
- [204] K. Brudzewski, S. Osowski, W. Pawlowski, Metal oxide sensor arrays for detection of explosives at sub-parts-per million concentration levels by the differential electronic nose, *Sensor. Actuat. B-Chem.* 161 (2012) 528-533.

- [205] F. Akhgari, H. Fattahi, Y.M. Oskoei, Recent advances in nanomaterial-based sensors for detection of trace nitroaromatic explosives, *Sensor. Actuat. B-Chem.* 221 (2015) 867-878.
- [206] E. Westenbrink, R. P. Arasaradnam, N. O'Connell, C. Bailey, C. Nwokolo, K. D. Bardhan, J. A. Covington, Development and application of a new electronic nose instrument for the detection of colorectal cancer, *Biosens. Bioelectron.* 67 (2015) 733-738.
- [207] E. H. Oh, H. S. Song, T. H. Park, Recent advances in electronics and bioelectronics noses and their biomedical applications, *Enzyme Microb. Tech.* 48 (2011) 427-437.
- [208] L. Nuñez, X. Cetó, M.I. Pividori, M.V.B. Zanoni, M. del Valle, Development and application of an electronic tongue for detection and monitoring of nitrate, nitrite and ammonium levels in waters, *Microchem. J.* 110 (2013) 273-279.
- [209] S. Bauer, Membrane introduction mass spectrometry; an old method that is gaining new interest through recent technological advances, *TrAC-Trend. Anal. Chem.* 14 (1995) 202-213.
- [210] N. Srinivasan, R.C. Jonson, N. Kasthurikrishnan, P. Wong, R.G. Cooks, Membrane introduction mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 350 (1997) 257-271.
- [211] R.A. Ketola, V.T. Virkki, M. Ojala, V. Komppa, T. Kotiaho, Comparison of different methods for the determination of volatile organic compounds in water samples, *Talanta* 44 (1997) 373-382.
- [212] N.G. Davey, E.T. Krogh, C.G. Gill, Membrane-introduction mass

spectrometry (MIMS), *TrAC-Trend. Anal. Chem.* 30 (2011) 1477-1485.

[213] M.A. Mendes, R. Sparrapan, M.N. Eberlin, Headspace membrane introduction mass spectrometry for trace level analysis of VOCs in soil and other solid matrixes, *Anal. Chem.* 72 (2000) 2166-2170.

[214] R.T. Marsili, SPME-MS-MVA as an electronic nose for the study of off-flavors in milk, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 648-654.

[215] I. Marcos Lorenzo, J.L. Pérez Pavón, M.E. Fernández Laespada, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, Detection of adulterants in olive oil by headspace-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 945 (2002) 221-230.

[216] I. Marcos Lorenzo, J.L. Pérez Pavón, M.E. Fernández Laespada, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, L.R. Henriques, M.F. Peres, M.P. Simões, P.S. Lopes, Application of headspace-mass spectrometry for differentiating sources of olive oil, *Anal. Bioanal. Chem.* 374 (2002) 1205-1211.

[217] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, C. García Pinto, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, A. Guerrero Peña, A method for the detection of hydrocarbon pollution in soils by headspace mass spectrometry and pattern recognition techniques, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2034-2041.

[218] J.L. Pérez Pavón, C. García Pinto, A. Guerrero Peña, B. Moreno Cordero, Headspace mass spectrometry methodology: application to oil spill identification in soils, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 599-607.

[219] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, C. García Pinto, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, Use of mass spectrometry

methods as a strategy for detection and determination of residual solvents in pharmaceutical products, *Anal. Chem.* 78 (2006) 4901-4908.

[220] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, C. García Pinto, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, A. Guerrero Peña, Strategies for qualitative and quantitative analyses with mass spectrometry-based electronic noses, *TrAC-Trend. Anal. Chem.* 25 (2006) 257-266.

[221] W. Cynkar, R. Damberg, P. Smith, D. Cozzolino, Classification of Tempranillo wines according to geographic origin: Combination of mass spectrometry based electronic nose and chemometrics, *Anal. Chim. Acta* 660 (2010) 227-231.

[222] J. Sung, B.-K. Kim, B.-S. Kim, Y. Kim, Mass spectrometry-based electric nose system for assessing rice quality during storage at different temperatures, *J. Stored Prod. Res.* 59 (2014) 204-208.

[223] S. Garrigues, T. Talou, D. Nesa, A. Gaset, Modified GC/MS system versus dedicated MS device: comparative application of electronic nose for QC in automotive industry, *Sensor. Actuat. B-Chem.* 78 (2001) 337-344.

[224] C. Pérès, C. Viallon, J-L. Berdagué, Solid-phase microextraction-mass spectrometry: a new approach to the rapid characterization of cheeses, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1030-1036.

[225] W.P. Gardner, R.E. Shaffer, J.E. Girard, J.H. Callahan, Application of quantitative chemometric analysis techniques to direct sampling mass spectrometry, *Anal. Chem.* 73 (2001) 596-605.

[226] D.L. Massart, G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J.

Lewi, J. Smeyers-Verbeke, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A. Elsevier, Amsterdam, 1997, Part B. Elsevier, Amsterdam, 1998.

[227] R.G. Brereton, Chemometrics Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant. Wiley, Chichester, 2003.

[228] G.E.P. Box, W.G. Hunter, J.S. Hunter, Statistics for Experimenters: An Introduction to Experimental Design. Reverté, Barcelona, 1988.

[229] E. Morgan, Chemometrics: Experimental Design. John Wiley & Sons, Londres, 1997.

[230] P.W. Araujo, R.G. Brereton, Experimental design. I. Screening, TrAC-Trend. Anal. Chem. 15 (1996) 26-31.

[231] P.W. Araujo, R.G. Brereton, Experimental design. II. Optimization, TrAC-Trend. Anal. Chem. 15 (1996) 63-70.

[232] P.W. Araujo, R.G. Brereton, Experimental design. III. Quantification, TrAC-Trend. Anal. Chem. 15 (1996) 156-159.

[233] R.G. Brereton, Chemometrics Applications of Mathematics and Statistics to Laboratory Systems. Ellis Horwood, Chichester, 1990.

[234] M. Blanco, V. Cerdá, Quimiometría. Publicaciones de la Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra, 1988.

[235] T.M. Cover, P.E. Hart, Nearest Neighbor Pattern Classification, IEEE T. Inform. Theory, 13 (1967) 21-27.

[236] D. Coomans, D.L. Massart, L. Kaufman, Optimization by statistical

linear discriminant analysis in analytical chemistry, *Anal. Chim. Acta* 112 (1979) 97-122.

[237] S. Zomer, R.G. Brereton, J.F. Carter, C. Eckers, Support vector machines for the discrimination of analytical chemical data: application to the determination of tablet production by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry, *Analyst* 129 (2004) 175-181.

[238] R.G. Brereton, Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry, *Analyst* 125 (2000) 2125-2154.

[239] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Pearson Education, Harlow, 2000.

[240] G. Ramis Ramos, M.C. García Álvarez-Coque, *Quimiometría*. Síntesis, Madrid, 2001.

[241] Analytical Methods Committee, Is my calibration linear?, *Analyst* 119 (1994) 2363-2366.

[242] H. Martens, T. Næs, *Multivariate Calibration*. John Wiley & Sons, Chichester, 1996.

[243] Y. Wang, D.J. Veltkamp, B.R. Kowalski, Multivariate instrument standardization, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2750-2756.

[244] *Pirouette: Comprehensive Chemometrics Modeling Software*, Ver. 3.0, Infometrix, Inc.: Woodinville, WA, 2000.

[245] E. Bouveressey, D.L. Massart, Standardisation of near-infrared spectrometric instruments: A review, *Vib. Spectrosc.* 11 (1996) 3-15.

III. CONFIGURACIONES INSTRUMENTALES

Para el desarrollo de los diferentes métodos analíticos que se han optimizado en este trabajo se han utilizado dos configuraciones instrumentales:

- Una jeringa manual de microextracción con sorbentes empaquetados (MEPS), un cromatógrafo de gases (GC) equipado con un inyector de temperatura programada (PTV) y un micro-detector de captura electrónica (μ -ECD).
- Un generador de espacio de cabeza (HS) acoplado a un cromatógrafo de gases (GC) con inyector de temperatura programada (PTV) y un espectrómetro de masas de tipo cuadrupolo (q-MS).

1. JERINGA MANUAL DE MICROEXTRACCIÓN CON SORBENTES EMPAQUETADOS Y CROMATÓGRAFO DE GASES CON INYECTOR DE TEMPERATURA PROGRAMADA Y MICRO-DETECTOR DE CAPTURA ELECTRÓNICA

1.1. Jeringa manual de microextracción con sorbentes empaquetados

La microextracción con sorbentes empaquetados se llevó a cabo con un dispositivo como el que se muestra en la figura 1.



Figura 1: *Dispositivo eVol® para la microextracción con sorbentes empaquetados*

El aparato consta de dos dispositivos de precisión acoplados; por un lado, un motor con control electrónico digital y por otro una jeringa analítica de 500 μL con adaptador XCHANGE®, que permite el acoplamiento entre los dos dispositivos. Para la función específica de la microextracción con sorbentes empaquetados, las agujas utilizadas (figura 2) tienen ensamblado un cartucho que contiene 4 mg de un sorbente sólido de sílice- C_{18} . El material de relleno del cartucho C_{18} es sílice modificada con grupos octadecilo sin bloqueo terminal, por lo que

dispone de grupos silanoles libres (SiOH), que permiten interacciones secundarias con los grupos polares de los analitos. El tamaño medio de poro es de 60 Å, el diámetro de las partículas de sílice de 45 µm y la superficie específica del material es de 500 m² g⁻¹. Estos dispositivos fueron suministrados por SGE Analytical Science (Griesheim, Alemania).

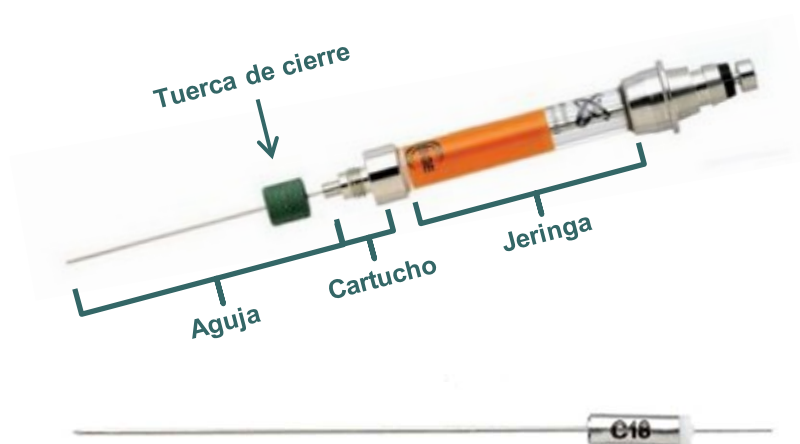


Figura 2: Imagen de una jeringa de MEPS y de la aguja con el cartucho de C₁₈

1.2. Sistema de introducción de muestras

El modelo utilizado es un inyector automático de líquidos Agilent 7683 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). La torre del inyector contiene una jeringa que permite la inyección de muestras líquidas. La jeringa utilizada en el método propuesto en la presente memoria (capítulo IV) tiene un volumen de 10 µL de los que permite inyectar en el sistema cromatográfico un máximo de 5 µL.

1.3. Inyector de temperatura programada

La muestra es transferida al sistema cromatográfico por medio de un

vaporizador de temperatura programada (PTV) Agilent Technologies 6890 (CIS-4). Un esquema del dispositivo utilizado se muestra en la figura 3.

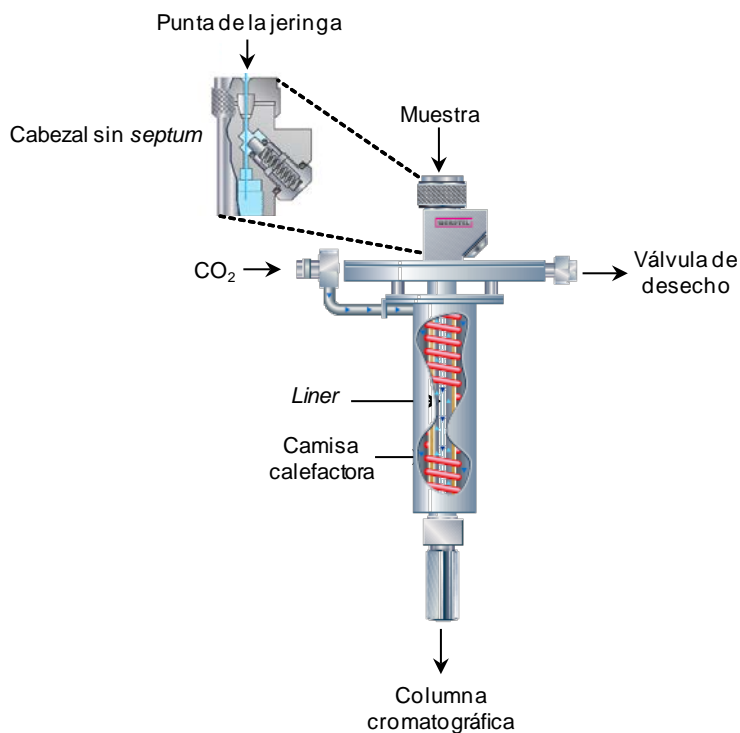


Figura 3: Esquema de un inyector PTV

El cabezal del inyector utilizado no tiene *septum*, sino que cuenta con una válvula de sellado que se desplaza durante la inyección para permitir el paso de la jeringa. El enfriamiento se logra mediante CO₂ líquido, que permite alcanzar la temperatura de -78 °C, mientras que el calentamiento se consigue mediante una camisa calefactora que proporciona un aumento lineal y homogéneo de la temperatura en el cuerpo del inyector y permite seleccionar rampas de calentamiento desde 2 °C s⁻¹ hasta 12 °C s⁻¹ así como dos rampas de temperatura

consecutivas.

El PTV está equipado con una cámara de vaporización (*liner*) rellena de Tenax-TA® de dimensiones 71 mm x 2.0 mm y un volumen interno de 180 µL. Este material de relleno es un polímero poroso de óxido de 2,6-difenileno con propiedades hidrofóbicas diseñado para retener compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles especialmente en muestras con alto contenido de humedad. El gas portador es helio N50 (pureza de 99.999 %, Air Liquide).

1.4. Cromatógrafo de gases

El análisis cromatográfico se lleva a cabo mediante un cromatógrafo de gases de Agilent Technologies modelo 7890A. El horno del cromatógrafo permite programar hasta cinco rampas de temperatura. Las rampas máximas permitidas por el equipo son 120 °C min⁻¹ hasta 70 °C, 95 °C min⁻¹ de 70 a 115 °C, 65 °C min⁻¹ de 115 a 175 °C, 45 °C min⁻¹ de 175 a 300 °C y 35 °C min⁻¹ de 300 a 400 °C. El gas portador utilizado es helio N50 (pureza de 99.999 %; Air Liquide).

Las columnas utilizadas en esta configuración para la aplicación de la determinación de haloanisoles en vino fueron fases estacionarias suministradas por la casa Supelco a través de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) dentro del proyecto SILEP (*Supelco Ionic Liquid Evaluation Program*). En concreto, se evaluaron cuatro columnas capilares de sílice fundida de 30 m de longitud con un diámetro interno de 0.25 mm y un espesor de fase estacionaria 0.2 µm (figura 4).

Los líquidos iónicos que constituyen cada una de estas fases no

ligadas son los siguientes: la columna SLB™-IL100 presenta una fase de *bis(trifluorometilsulfonyl)imidato de 1,9-di(3-vinil-imidazolio)nonano*, la columna SLB™-IL76 es una fase de *bis(trifluorometilsulfonyl)imidato de tri(tripropilfosfoniohexanamida) trietilamina*, la columna SLB™-IL61 es una fase de *bis(trifluorometil)imidato trifluorometilsulfonato de 1,12-di(tripropilfosfonio) dodecano* y por último, la columna SLB™-IL59 es una fase de *bis(trifluorometilsulfonyl)imidato de 1,12-di(tripropilfosfonio)dodecano*.



Figura 4: Columna capilar SLB™-IL59

1.5. Micro-detector de captura electrónica

El sistema cromatográfico utilizado está equipado con un micro-detector de captura electrónica (μ -ECD) de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania) con una fuente de radiación de ^{63}Ni . La

temperatura máxima permitida por la fuente de radiación es de 400 °C. El volumen de la zona de detección es diez veces menor que el de cualquier otro detector de captura electrónica convencional (ECD) y la velocidad de paso de los analitos a través de la zona de detección es superior, lo que reduce el tiempo de residencia de los analitos en la célula. Otro aspecto novedoso del detector μ -ECD es la disposición del ánodo (ánodo escondido), que está situado de tal manera que la probabilidad de que los contaminantes lleguen hasta él es mínima. Estas características del detector se traducen en una mayor sensibilidad a la vez que disminuyen las posibilidades de contaminación de la celda. Para facilitar el transporte de la muestra a través de la célula del detector se utiliza una corriente de gas auxiliar que se une a la corriente procedente de la columna. El flujo de este gas afecta a la sensibilidad del detector y a la resolución del cromatograma. Los valores habituales de flujo de gas auxiliar pueden oscilar entre 10-60 mL min⁻¹. El gas utilizado es nitrógeno (pureza de 99.999 %; Air Liquide).

1.6. Esquema de la configuración instrumental

En la figura 5 se muestra una fotografía de esta configuración instrumental. Esta configuración se ha utilizado para el desarrollo de la aplicación descrita de determinación de haloansoles en vinos.

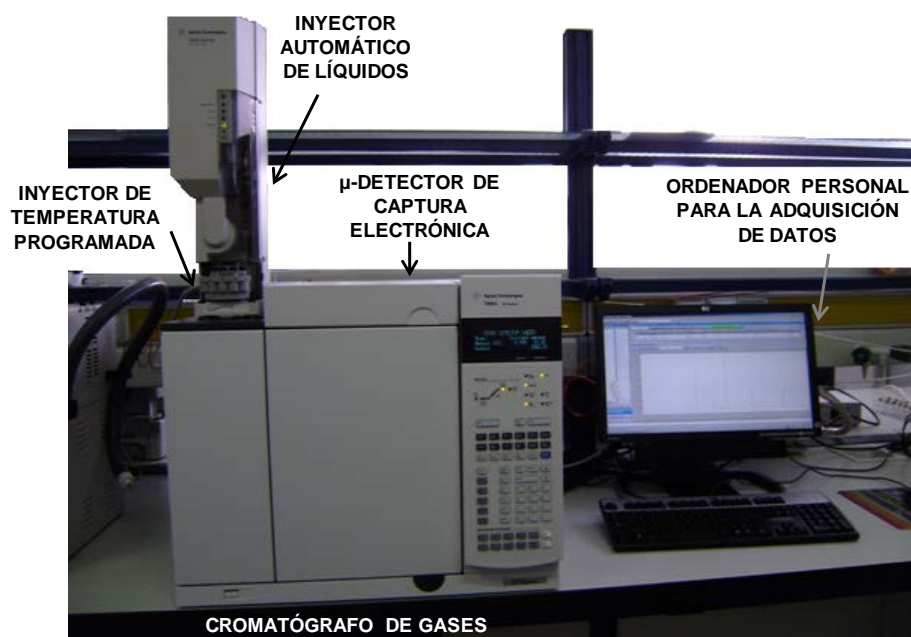


Figura 5: Configuración instrumental PTV-GC- μ ECD

El control de todos los módulos que componen la configuración instrumental, así como la adquisición y tratamiento de los datos se realizaron mediante *software* específico.

2. GENERADOR DE ESPACIO DE CABEZA ACOPLADO A UN CROMATÓGRAFO DE GASES CON INYECTOR DE TEMPERATURA PROGRAMADA Y ESPECTRÓMETRO DE MASAS CUADRUPOLAR

2.1. Generador de espacio de cabeza

El sistema de introducción de muestras acoplado a la configuración PTV-GC-MS es un automuestreador CombiPAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Suiza). Este automuestreador aporta una gran versatilidad al equipo, ya que permite seleccionar distintas modalidades de introducción de muestra (inyección de muestras líquidas, espacio de cabeza estático, microextracción en fase sólida...) siendo la generación de espacio de cabeza la utilizada en las aplicaciones que se describen en esta memoria. El dispositivo consiste en un brazo muestreador automático al que se pueden acoplar diferentes módulos, en los que va montada la jeringa apropiada, en función del tipo de introducción de muestra que se quiera realizar. También posee diferentes tipos de bandejas para los viales de muestra adecuados para cada aplicación. En el caso de espacio de cabeza tiene espacio para 32 viales de muestra. El horno generador de espacio de cabeza tiene capacidad para seis viales, cuya temperatura puede programarse entre 35 °C y 200 °C. Este horno permite la agitación orbital de las muestras en un intervalo de velocidades de entre 250 y 750 rpm.

2.2. Inyector de temperatura programada

El PTV utilizado en esta configuración es un CIS-4 (Gerstel, Baltimore, MD) y al igual que el descrito en la configuración anterior,

está equipado con un *liner* de las mismas dimensiones y el sistema de calentamiento y enfriamiento son iguales que en el caso anterior. Es un PTV sin septum en el cabezal.

2.3. Cromatógrafo de gases

El cromatógrafo de gases utilizado es un Agilent 6890 equipado con una columna capilar DB-VRX (20 m x 0.18 mm x 1 μ m, rango de trabajo - 10 a 260 °C) de Agilent Technologies (J&W Scientific Columns, USA). El horno del cromatógrafo permite programar hasta cinco rampas de temperatura con diferentes velocidades. Las rampas máximas permitidas por el equipo son 70 °C min⁻¹ hasta 175 °C, 45 °C min⁻¹ de 175 a 300 °C y 35 °C min⁻¹ de 300 a 450 °C. El gas portador utilizado es helio N50 (pureza de 99.999 %; Air Liquide).

2.4. Espectrómetro de masas

El espectrómetro de masas cuadrupolar es un HP 4440 N de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania). La fuente es de ionización electrónica, con un voltaje de ionización de 70 eV. Las temperaturas recomendadas para la fuente de ionización y el cuadrupolo son 230 °C y 150 °C, respectivamente.

Es posible seleccionar dos modos de adquisición de datos: *scan*, en el que el detector hace un barrido de un amplio intervalo de masas, previamente especificado; y el modo de seguimiento de iones seleccionados (*selected ion monitoring*, SIM), que permite seleccionar los iones característicos de las especies de interés, de modo que para cada intervalo de tiempo sólo se registran unos pocos iones seleccionados.

La base de datos utilizada para la identificación de los compuestos es la NIST'98 (NIST/EPA/NIH Mass spectral Library, version 2.0).

2.5. Esquema de la configuración instrumental

En la figura 6 se muestra la imagen de la configuración instrumental CombiPAL-PTV-GC-MS.

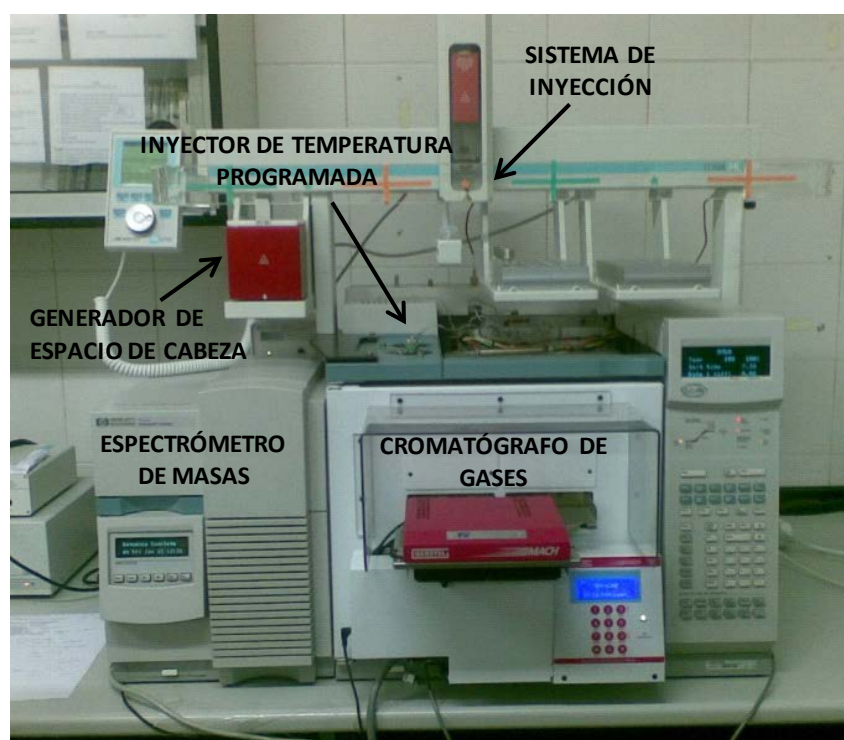


Figura 6: Configuración instrumental CombiPAL-PTV-GC-MS

La programación del CombiPAL se hace desde un controlador independiente propio, en el que se selecciona el tipo de inyección que se va a realizar y se programa un método en el que se especifican las condiciones de las diferentes variables implicadas en la inyección. A

continuación, se programa la secuencia de muestras.

El automuestreador se ha utilizado en el desarrollo de las aplicaciones descritas en la memoria de determinación de compuestos volátiles en orina y en el estudio de señales de perfil en saliva. En ambos casos se utilizó este elemento operando con el módulo de inyección de espacio de cabeza.

IV.

**MICROEXTRACCIÓN CON SORBENTES
EMPAQUETADOS Y CROMATOGRFÍA DE
GASES CON FASES ESTACIONARIAS DE
LÍQUIDOS IÓNICOS PARA LA
DETERMINACIÓN DE HALOANISOLEN EN
VINO**

Journal of Chromatography A 1260 (2012) 200-215

1. INTRODUCCIÓN

El objetivo de la química analítica verde es el uso de procedimientos más respetuosos con el medioambiente, más seguros y que generen menos desechos peligrosos. Para ello, se busca el desarrollo de nuevas metodologías analíticas o la modificación de los métodos tradicionales incorporando procedimientos que o bien usen un menor número de compuestos químicos peligrosos o bien reduzcan la cantidad necesaria de esos compuestos [1].

Se considera que la etapa más contaminante de un análisis es la etapa de preparación de muestra ya que generalmente requiere el uso de disolventes orgánicos [2]. Por lo tanto, aunque sería deseable utilizar metodologías de análisis directo de las muestras, en muchas ocasiones se necesitan etapas de aislamiento o de preconcentración de los analitos de interés previas al análisis de los mismos.

El uso de la extracción con disolventes tradicional en estos casos puede causar fenómenos de contaminación por la liberación de disolventes al medioambiente. El desarrollo de métodos de extracción a escala "micro" que reducen las cantidades necesarias de disolventes orgánicos o eliminan su uso ha estado dirigido a la mitigación de esta problemática [3]. Técnicas de microextracción como la microextracción en fase sólida (SPME), la microextracción por adsorción en barra agitadora (SBME), la microextracción en fase líquida mediante membrana porosa (HF-LPME), la microextracción en una gota (SDME) o la microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME), entre otras, han ido ganando terreno y ahora están bien establecidas entre las técnicas

más usadas de pretratamiento de muestra [4]. La posibilidad de automatización y de acoplamiento *online* de algunas de estas técnicas de microextracción son otros dos aspectos interesantes que las hacen más atractivas.

La microextracción con sorbentes empaquetados (MEPS) es una técnica de extracción basada en la adsorción. Esta técnica de pretratamiento de muestra se basa en la miniaturización de la extracción en fase sólida convencional. Una cantidad entre 1 y 4 mg de un material adsorbente empaquetado (cartucho MEPS) se sitúa en el extremo superior de la aguja de una jeringa por la que se hacen pasar pequeños volúmenes de muestra permitiendo la adsorción de una gran variedad de analitos dependiendo de las propiedades del material adsorbente elegido. La elución posterior de esos analitos retenidos se lleva a cabo con una pequeña cantidad (20-50 μ L) de un disolvente apropiado que podrá ser transferido directamente a un puerto de inyección de un sistema cromatográfico de gases o líquidos [5]. Esta técnica no solo permite trabajar con pequeños volúmenes de muestra, sino que también reduce en gran medida el consumo de disolventes orgánicos necesarios para la extracción de los analitos retenidos en el cartucho MEPS. Además, en comparación con los cartuchos de SPE, el cartucho MEPS puede ser reutilizado un gran número de veces ya que se lava con facilidad. Otra ventaja más por la que puede considerarse a la técnica de MEPS una técnica más barata que muchos de los procedimientos convencionales de preconcentración [6]. La técnica de MEPS se ha aplicado al análisis de diversos compuestos en matrices biológicas, como plasma humano, sangre, orina y saliva [6-8] así como al análisis de muestras ambientales, principalmente aguas superficiales y aguas de

desecho [8-14]. Sin embargo, son pocos los estudios que se han llevado a cabo con esta técnica en el campo del análisis de alimentos [15].

Se ha propuesto también el uso de líquidos iónicos como disolventes respetuosos con el medioambiente y buenos sustitutos de los disolventes orgánicos tradicionales que son volátiles e inflamables [16]. Los líquidos iónicos son sales orgánicas con bajos puntos de fusión. Su estructura consiste en cationes orgánicos enlazados por medio de una cadena de carbono de longitud variable y asociados a estos cationes, los correspondientes aniones [17,18]. Las características especiales de estos líquidos iónicos los hacen adecuados para su utilización como fase estacionaria en columnas capilares de cromatografía de gases [19-22]. Una de estas características es el amplio rango de temperaturas en el que se mantienen líquidos, permitiendo aumentar el margen de temperaturas de trabajo. Además, estos compuestos son poco volátiles y por consiguiente las columnas con fases estacionarias de líquidos iónicos tendrán un menor sangrado y una vida útil más larga. La ausencia de grupos hidroxilo las hace más estables ante la humedad y el oxígeno y la posibilidad de sintetizar estos líquidos con diferentes grupos catiónicos y aniónicos así como con distintas longitudes de cadena permitiría dotarlas de una selectividad "a la carta" [16]. Los líquidos iónicos se han utilizado en diferentes campos de la Química Analítica en muy diversas aplicaciones. Sin embargo, a pesar de todas las ventajas citadas, son pocas las aplicaciones analíticas en las que se han utilizado líquidos iónicos como fases estacionarias en columnas capilares de cromatografía de gases [23-27].

La presencia de haloansoles en el vino es un problema enológico importante ya que degradan sus propiedades organolépticas y le confieren un olor desagradable denominado como fúngico o a moho y olores y aromas propios de humedad. Dado que el aroma es uno de los principales parámetros de calidad de un vino, la contaminación por estas sustancias es un importante problema para la industria enológica [28]. Las concentraciones habituales de estos compuestos en los vinos contaminados son del orden de los ng L^{-1} , por lo que se hace necesaria la utilización de una técnica de preconcentración previa al análisis. Han sido muchas las técnicas de extracción y microextracción que se han utilizado para la extracción y concentración de haloansoles del vino [29] desde la extracción líquido-líquido (LLE) [30,31] y la extracción en fase sólida (SPE) [32] a las técnicas de microextracción tanto en fase líquida (SDME) [33] como en fase sólida (SPME) [34,35] y la extracción en barra agitadora (SBSE) [36].

2. OBJETIVO

El objetivo del presente estudio es proponer el acoplamiento de la técnica de microextracción con sorbentes empaquetados con un cromatógrafo de gases con fases estacionarias de líquidos iónicos y detección mediante micro-detector de captura electrónica (μ ECD) como una metodología analítica alternativa para la determinación de haloanisoles en vinos.

La técnica de microextracción con sorbentes empaquetados (MEPS) se propone como alternativa a otros métodos de extracción con el objetivo de facilitar procesos de preparación de muestra laboriosos, así como reducir el consumo de material no reutilizable en los primeros pasos del análisis. Presenta, además, la ventaja de que se trata de una técnica de extracción que minimiza de forma significativa el consumo de disolventes orgánicos. En este trabajo se estudiarán las distintas variables que afectan al proceso de extracción-elución de los compuestos de interés: el tipo de adsorbente, el disolvente de elución y los volúmenes tanto de muestra como de elución utilizados [37].

Con relación a la utilización de líquidos iónicos como fases estacionarias en cromatografía de gases, se estudiarán y caracterizarán distintas fases comerciales de estos compuestos.

Tras la optimización de todo el proceso, se aplicará el método propuesto a muestras de vino para la determinación de haloanisoles.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiales, disoluciones estándar y muestras

Los haloanísos (2,4,6-tricloroanisól (TCA), 1,2,4,5-tetracloroanisól (TeCA), 2,4,6-tribromoanisól (TBA) y pentacloroanisól (PCA)) y el disolvente acetato de etilo de grado HPLC, (CHROMASOLV® Plus, $\geq 99.9\%$) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El etanol (pureza $\geq 99.9\%$) y el KHCO_3 fueron suministrados por Scharlau (Barcelona, España). El metanol (pureza $\geq 99.9\%$) fue proporcionado por Merck (Darmstadt, Alemania).

A partir de los compuestos comerciales, se prepararon disoluciones madre de 100 mg L^{-1} de cada haloanisól en etanol y se conservaron a 4°C . Estas disoluciones se utilizaron para preparar disoluciones con un contenido alcohólico similar al de la mayoría de vinos (12% de etanol) que fueron las utilizadas en los diferentes estudios de optimización del método propuesto. También a partir de ellas se prepararon los distintos patrones de calibración y se doparon las muestras de vino analizadas en este trabajo.

Para la validación del procedimiento propuesto se utilizaron muestras de vinos comerciales correspondientes a vino blanco de la variedad "verdejo" y tinto de la variedad "tempranillo". Con la finalidad de alargar la vida del cartucho MEPS, las muestras de vino fueron filtradas con un filtro de membrana de nailon (Millipore) de $0.45\ \mu\text{m}$ antes de ser sometidas a la etapa de microextracción.

3.2. Instrumentación MEPS-PTV-GC- μ ECD

3.2.1. Microextracción con sorbentes empaquetados

La microextracción con sorbentes empaquetados se llevó a cabo de manera manual mediante un sistema dispensador controlado digitalmente (eVol®; SGE Europe Ltd., Kiln Farm Milton Keynes, Reino Unido) que permite una amplia variedad de procedimientos para la manipulación de líquidos acoplado con una jeringa de 500 μ L con una aguja para microextracción con sorbentes empaquetados que tiene ensamblado un cartucho que contiene 4 mg de un sorbente sólido de sílice- C_{18} (45 μ m de diámetro medio de partícula y 60 Å de tamaño medio de poro).

Las condiciones óptimas que se fijaron para las diferentes etapas del proceso de microextracción fueron las que se detallan a continuación.

El BIN o cartucho que contiene el sorbente sólido, es acondicionado con 500 μ L de etanol y a continuación con otros 500 μ L de agua ultrapura. Posteriormente, se lleva a cabo la extracción de los analitos de la muestra tomando y desechando diez ciclos de 500 μ L de la muestra de forma que el volumen total de muestra sometido al proceso de extracción es de 5 mL. A continuación, se realiza una etapa de lavado en dos fases con 500 μ L de una disolución acuosa al 1 % de $KHCO_3$ y con otros 500 μ L de agua ultrapura.

Para eliminar los restos de agua en el cartucho se lleva a cabo una etapa de secado con aire y finalmente los analitos se eluyen con 50 μ L de etanol. Esta fracción se deposita en un vial de vidrio (12 mm de diámetro x 32 mm de altura) provisto de un inserto cónico en su interior con un volumen 250 μ L. Este vial es el que se coloca en el sistema de inyección

del cromatógrafo de gases. Tanto los viales como los insertos son proporcionados por la casa comercial Scharlau (Barcelona, España).

Todas las etapas del proceso de microextracción con sorbentes empaquetados, excepto la etapa de secado, se desarrollan a una velocidad de $18 \mu\text{L s}^{-1}$ que es la mínima permitida por el dispositivo. Para la etapa de secado se selecciona una velocidad de $300 \mu\text{L s}^{-1}$ que es la máxima permitida por el dispositivo. El conjunto de etapas que componen una extracción MEPS requiere aproximadamente unos 15 minutos. En la figura 1 se muestra un esquema del proceso completo.

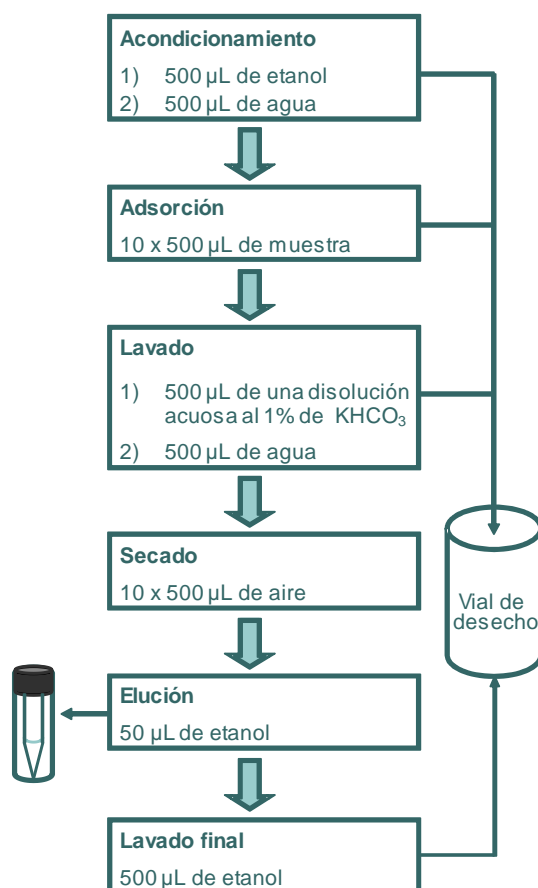


Figura 1: Esquema del proceso de extracción mediante MEPS

3.2.2. Sistema de inyección de muestras líquidas

La inyección de las muestras se realiza mediante un sistema automático de inyección de muestras líquidas (Agilent Technologies 7683, Waldbronn, Alemania) con una jeringa para la inyección de líquidos de 10 μ L que permite la inyección en el sistema cromatográfico de hasta 5 μ L, volumen que se seleccionó para esta aplicación.

3.2.3. Inyector de temperatura programada

La muestra es transferida al sistema cromatográfico por medio de un vaporizador de temperatura programada (PTV) Agilent Technologies 6890 (CIS-4).

El PTV está equipado con un *liner* relleno de Tenax-TA[®] de dimensiones 71 mm x 2.0 mm y un volumen interno de 180 μ L. Este material es un polímero poroso de óxido de 2,6-difenileno con propiedades hidrofóbicas diseñado para retener compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles especialmente en muestras con alto contenido de humedad.

En el PTV, se seleccionó el modo de purga del disolvente (*solvent vent*) y se inyectan 5 μ L del extracto a una velocidad de 5 μ L s⁻¹ mientras el PTV se encuentra a una temperatura de 50 °C (esta temperatura se mantiene mediante CO₂ líquido). La válvula de desecho permanece abierta durante 0.5 minutos para permitir la eliminación del disolvente y el flujo de purga se fijó en 50 mL min⁻¹. Después, y durante 1.5 minutos, se cierra la válvula de desecho y se aumenta la temperatura del PTV hasta 250 °C a una velocidad de 12 °C s⁻¹, produciéndose la transferencia de los analitos al sistema cromatográfico de forma rápida. El tiempo de inyección se fijó en 1.5 minutos.

3.2.4. Cromatógrafo de gases

El análisis cromatográfico se llevó a cabo mediante un cromatógrafo de gases de Agilent Technologies modelo 7890A.

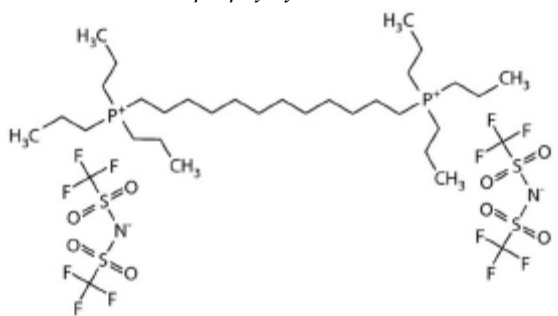
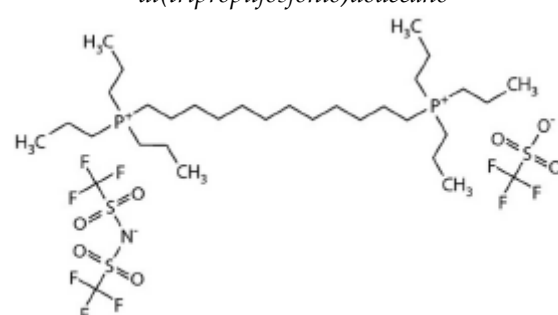
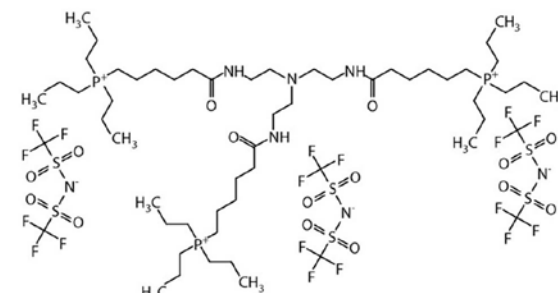
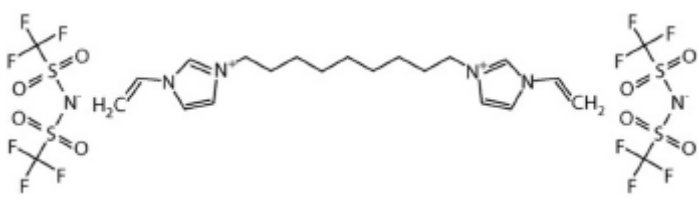
Las condiciones de medida cromatográfica optimizadas fueron las que se detallan a continuación: la columna cromatográfica seleccionada por ser aquella con la que se obtenían los mejores resultados, fue la SLB™-IL59, de medidas 30 m x 0.25 mm x 0.2 μ m; el gas portador utilizado fue helio N50 (pureza de 99.999 %; Air Liquide) a un flujo constante de 1.5 mL min⁻¹.

El horno del cromatógrafo se mantiene a una temperatura de 70 °C durante 2 min y después se incrementa hasta los 110 °C a una velocidad de 95 °C min⁻¹; en una segunda rampa la temperatura aumenta hasta los 150 °C a una velocidad de 65 °C min⁻¹ que se mantiene hasta el final del cromatograma (aproximadamente 20 minutos).

3.2.5. Columnas de líquidos iónicos

Los estudios de cromatografía con líquidos iónicos se llevaron a cabo con distintas fases estacionarias suministradas por la casa Supelco a través de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) dentro del proyecto SILEP (*Supelco Ionic Liquid Evaluation Program*). En concreto se evaluaron cuatro columnas capilares de sílice fundida (30 m x 0.25 mm x 0.2 μ m) que presentan fases no ligadas de diferentes líquidos iónicos. Las utilizadas en este trabajo están constituidas por los líquidos iónicos que se recogen en la tabla 1.

Tabla 1: Líquido iónico de la fase estacionaria de cada una de las columnas estudiadas

SLB TM -IL59	<p style="text-align: center;"><i>Bis(trifluorometilsulfonyl)imidato de 1,12-di(tripropilfosfonio)dodecano</i></p> 
SLB TM -IL61	<p style="text-align: center;"><i>Bis(trifluorometil)imidato trifluorometilsulfonato de 1,12-di(tripropilfosfonio)dodecano</i></p> 
SLB TM -IL76	<p style="text-align: center;"><i>Bis(trifluorometilsulfonyl)imidato de tri(tripropilfosfonio)hexanamida)trietilamina</i></p> 
SLB TM -IL100	<p style="text-align: center;"><i>Bis(trifluorometilsulfonyl)imidato de 1,9-di(3-vinilimidazolio)nonano</i></p> 

3.2.6. Micro-detector de captura electrónica

El detector utilizado es un micro-detector de captura electrónica (μ ECD) de Agilent Technologies 7890A GC con una fuente de radiación de ^{63}Ni . Los parámetros seleccionados en este estudio fueron una temperatura de detección de 290 °C y un flujo auxiliar de gas de 10 mL min^{-1} . El gas utilizado es nitrógeno (99.999 %; Air Liquide).

3.2.7. Análisis de datos

La recogida de los datos cromatográficos se realizó con el software GC ChemStation, versión Rev.B.04.02 SP1 [212] de Agilent Technologies.

3.2.8. Método optimizado MEPS-PTV-GC- μ ECD

Las condiciones experimentales óptimas de todos los módulos que componen la configuración instrumental utilizada en este trabajo se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Condiciones experimentales del método optimizado

MICROEXTRACCIÓN CON SORBENTES EMPAQUETADOS		
Sorbente empaquetado		Sílice-C ₁₈
Acondicionamiento		500 μ L etanol 500 μ L agua
Adsorción		10 x 500 μ L muestra
Lavado		500 μ L agua 1 % KHCO ₃ 500 μ L agua
Secado		10 x 500 μ L aire
Elución		50 μ L etanol
Lavado final		500 μ L etanol
INYECTOR DE TEMPERATURA PROGRAMADA		
<i>Liner</i>		<i>Liner</i> relleno de Tenax-TA®
	Flujo de purga	50 mL min ⁻¹
	Tiempo de purga	0.55 min
Modo de inyección:	Tiempo de inyección	1.5 min
<i>Solvent Vent</i>	Flujo de limpieza	100 mL min ⁻¹
	Temperatura	50 °C
	Rampa	12 °C s ⁻¹ hasta 250 °C
CROMATÓGRAFO DE GASES		
Columna		SLB™-IL59
	Temperatura inicial	70 °C
Horno	Rampa 1	95 °C min ⁻¹ hasta 110 °C
	Rampa 2	65 °C min ⁻¹ hasta 150 °C
MICRO-DETECTOR DE CAPTURA ELECTRÓNICA		
Temperatura detector		290 °C
Flujo de gas auxiliar (N ₂)		10 mL min ⁻¹

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Variables que afectan al proceso de microextracción con sorbentes empaquetados

En el proceso de microextracción con sorbentes empaquetados, la elección tanto del sorbente contenido en el cartucho de la jeringa como la del disolvente utilizado para la elución de los analitos retenidos en el mismo es fundamental y debe llevarse a cabo de forma previa a la optimización del resto de variables que condicionan la extracción.

4.1.1. Sorbente empaquetado

Para la elección del sorbente adecuado de relleno del cartucho de la jeringa de MEPS, se tuvo en cuenta la naturaleza hidrofóbica de los haloansoles, cuyos valores de $\log K_{ow}$ son 3.9 para el TCA, 4.2 para el TBA, 4.5 para el TeCA y 5.0 para el PCA [33]. Estos valores hacen aconsejable la utilización de sorbentes hidrofóbicos, y entre ellos, se seleccionó el C₁₈.

4.1.2. Disolvente de elución

Se estudiaron tres disolventes diferentes: etanol, metanol y acetato de etilo. Para cada uno de los disolventes, se realizaron tres microextracciones de una misma disolución de los analitos en una concentración de 0.3 $\mu\text{g L}^{-1}$. Las señales obtenidas con los tres disolventes fueron similares. En la figura 2 se representan las áreas de pico de los cuatro haloansoles para cada uno de los disolventes estudiados. Se observa que, a pesar de no existir grandes diferencias, las señales obtenidas con etanol son las más elevadas.

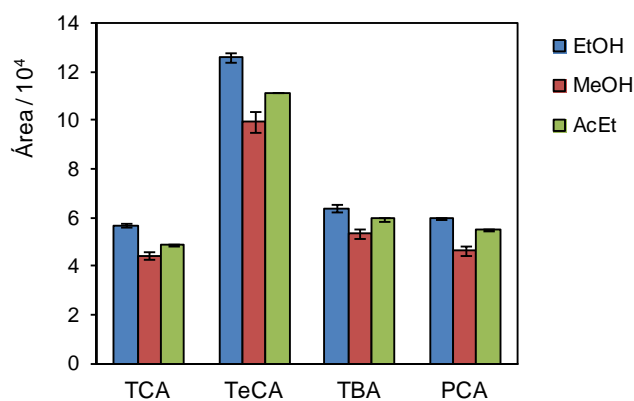


Figura 2: Área de pico para cada compuesto en la elución con etanol, metanol y acetato de etilo

Se decidió utilizar etanol como disolvente de extracción y se realizó un estudio más exhaustivo para confirmar su adecuación.

La capacidad de este disolvente para extraer los compuestos previamente retenidos por el sorbente empaquetado que contiene el cartucho de la jeringa se determinó comparando las señales obtenidas a partir de la inyección directa de una disolución de los analitos en etanol y las señales obtenidas para esa misma disolución, pero pasadas a través del cartucho de MEPS. Concretamente, se preparó una disolución de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de haloanisoles en etanol y $5 \mu\text{L}$ de la misma se inyectaron directamente en el sistema cromatográfico (ID). La experiencia a través del cartucho se realizó con dos volúmenes diferentes ($500 \mu\text{L}$ y 2 mL) de forma que se aspiraron los volúmenes correspondientes y, posteriormente, se vertieron en un vial de forma que se recuperó el volumen inicial. Si se toman como referencia las señales obtenidas a partir de la inyección directa de la disolución de los compuestos en etanol y se normalizan las señales de las disoluciones pasadas a través de la jeringa de microextracción, los porcentajes de recuperación

superan en todos los casos el 90 % (tabla 3).

Tabla 3: Porcentajes de recuperación obtenidos para las pruebas de 500 μ L y 2 mL

	TCA	TeCA	TBA	PCA
500 μ L	96	92	93	91
2 mL	94	95	94	91

Estos resultados ponen de manifiesto que el etanol es un disolvente adecuado para la elución de los haloanisoles preconcentrados en un cartucho de C_{18} .

4.1.3. Volumen de muestra

El volumen de muestra que se hace pasar a través del dispositivo MEPS se estudió para valores entre 1 y 8 mL. La experiencia se realizó preconcentrando diferentes volúmenes de una disolución de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de los cuatro haloanisoles en agua ultrapura al 12 % de etanol y eluyendo con 50 μ L de etanol; el estudio se realizó por triplicado. En la figura 3 se observa que la señal analítica aumenta de forma aproximadamente lineal hasta los 7 mL y se estabilizaba a partir de ese volumen.

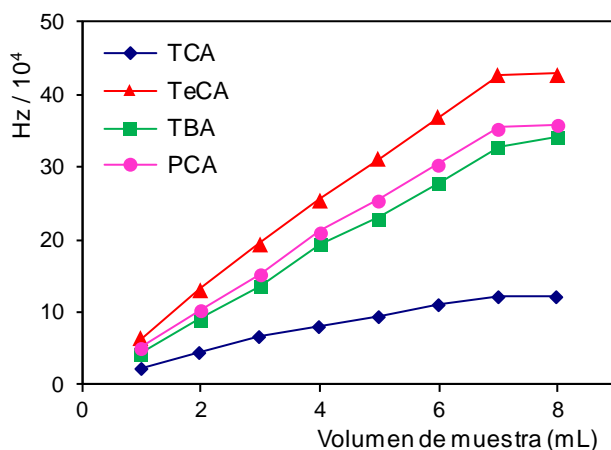


Figura 3: Área de los picos cromatográficos de los cuatro haloanisoles para diferentes volúmenes de muestra

Con los datos obtenidos con esta experimentación se calculó la eficacia de la extracción de los compuestos para cada uno de los volúmenes. La recuperación del proceso total (adsorción y elución) se puede estimar calculando la relación entre las señales obtenidas para una disolución alcohólica (12 % etanol) sometida al proceso de microextracción (Señal_{MEPS}) y las obtenidas a partir de una inyección directa (Señal_{ID}) de una disolución de la misma concentración de los analitos en el disolvente de elución según la ecuación que se muestra a continuación:

$$R(\%) = \frac{\text{Señal}_{MEPS}}{\text{Señal}_{ID} \cdot \frac{V_{muestra}}{V_{elución}}} \cdot 100$$

donde, $V_{muestra}/V_{elución}$ determina la relación de fases.

En la figura 4 se representan los valores de recuperación (%) para los distintos volúmenes y para cada uno de los cuatro haloanisoles.

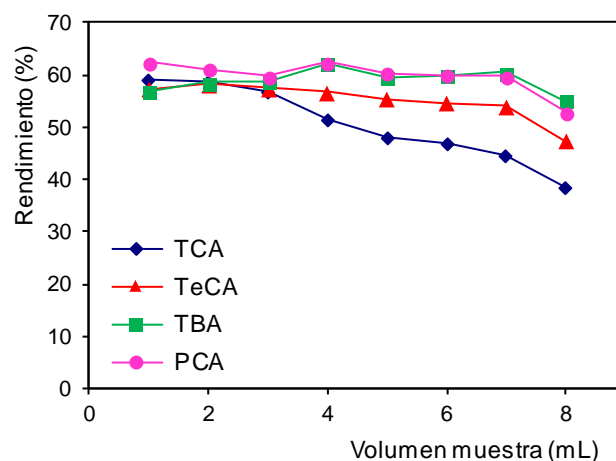


Figura 4: Porcentaje de recuperación para cada compuesto en función del volumen de muestra sometido al proceso MEPS

Para tres de los cuatro compuestos se obtuvieron valores relativamente constantes de recuperación para los diferentes volúmenes de muestra hasta los 7 mL, volumen a partir del cual la recuperación comenzaba a descender en todos los casos. En particular, para los compuestos TBA y PCA la recuperación hasta ese volumen presentaba valores de entre 57 y 62 % siendo ligeramente menores en el caso del TeCA pero sin bajar del 54 % (tabla 4). Algo particular es el caso del TCA, el compuesto menos polar. Para este compuesto, la recuperación cae desde un primer momento al ir aumentando el volumen de muestra.

Tabla 4: Porcentajes de recuperación para cada compuesto y para cada volumen de muestra

<i>Volumen de muestra (mL)</i>	TCA	TeCA	TBA	PCA
1	58.9	57.2	56.9	62.5
2	58.5	58.2	58.6	61.2
3	56.6	57.4	58.8	59.9
4	51.4	56.7	62.3	62.4
5	48.1	55.3	59.6	60.4
6	47.0	54.6	60.0	60.0
7	44.7	54.1	60.6	59.8
8	36.7	47.4	55.1	52.9

Teniendo en cuenta, por un lado, los valores obtenidos de señal analítica y recuperación y por otro, el tiempo necesario para llevar a cabo el muestreo, se escogió como solución de compromiso un volumen de 5 mL ya que volúmenes mayores alargaban mucho el tiempo total de análisis.

4.1.4. Velocidades de aspiración y descarga

Se probaron las diferentes velocidades permitidas por la jeringa automática de MEPS (entre 18 y 300 $\mu\text{L s}^{-1}$). Se seleccionó la menor de

ellas tanto para la aspiración como para la descarga ya que el resto de velocidades no aseguraban una toma de volúmenes de muestra reproducibles.

4.1.5. Disolución de lavado

La finalidad de la etapa de lavado consiste en la eliminación de posibles compuestos presentes en las muestras que pueden interferir posteriormente en la elución y detección de los analitos de interés.

Esta etapa, por tanto, cobra especial importancia cuando se analizan muestras de vino, para las cuales, un único lavado del cartucho con agua ultrapura tras la etapa de muestreo resulta insuficiente para eliminar las interferencias. Se realizaron varios lavados consecutivos con agua ultrapura pero no se consiguió disminuir la señal interferente generada por la matriz.

Con el propósito de solucionar este problema se estudiaron diferentes disoluciones de lavado consistentes en mezclas de agua y metanol en distintas proporciones con un contenido de hidrógeno carbonato potásico (KHCO_3) del 1 %. Mezclas similares se han utilizado en el proceso de limpieza de muestras de vino en metodologías de extracción similares a la microextracción con sorbentes empaquetados [33]. En la figura 5 se muestran los cromatogramas correspondientes a los extractos de muestras de vino dopado, sometidos al proceso de preconcentración mediante MEPS, cuyo proceso de lavado se realizó con disoluciones acuosas de hidrógeno carbonato potásico conteniendo 0, 30 y 70 % de metanol.

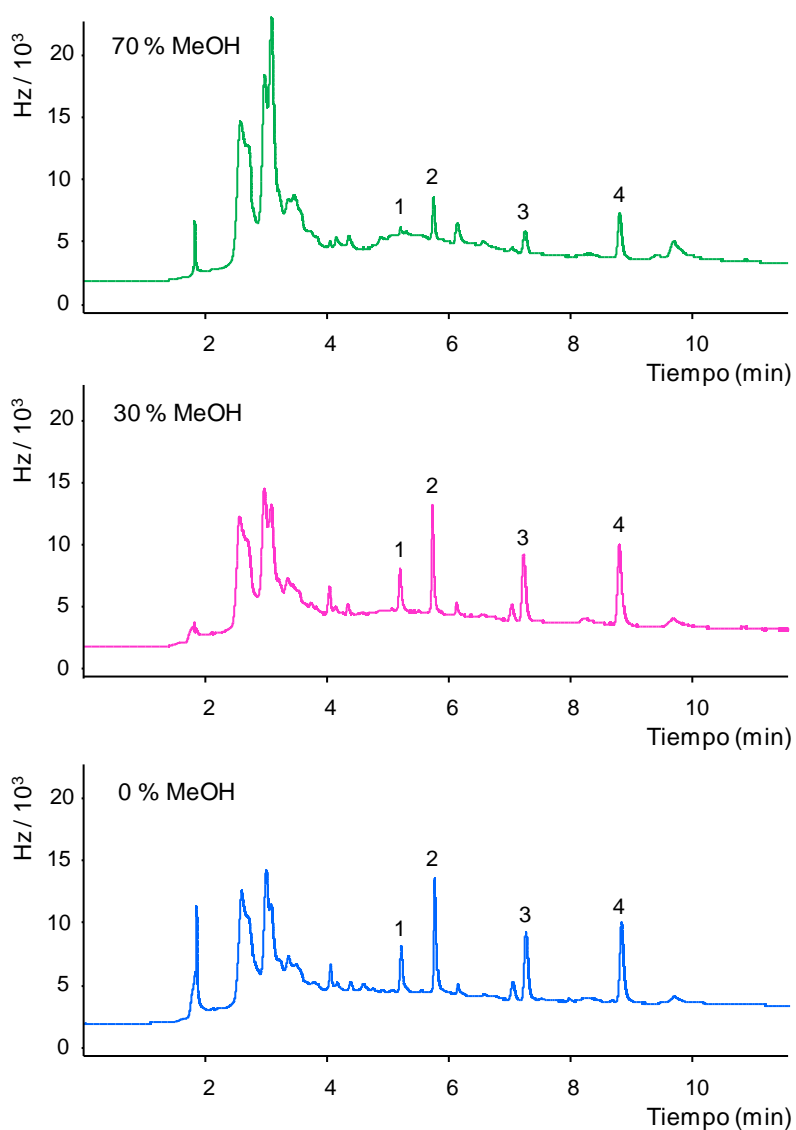


Figura 5: Cromatogramas correspondientes a un vino blanco dopado a una concentración de $0.7 \mu\text{g L}^{-1}$ y lavado con agua con 1 % de KHCO_3 y diferentes porcentajes (v/v) de metanol (columna SLB^{TM} -IL100).

1: TCA; 2: TeCA; 3: TBA; 4: PCA

Se observó que una elevada concentración de metanol (70 %) arrastraba una fracción importante de los analitos retenidos. Una menor concentración de este disolvente (30 %), sin embargo, proporcionaba los

mismos resultados que una disolución en la que no se añadía este compuesto. Por lo que se seleccionó como disolución de lavado una de agua ultrapura con un contenido del 1 % de KHCO_3 .

Finalmente, como lavado óptimo del cartucho se optó por un doble lavado; en primer lugar, un volumen de 500 μL de una disolución acuosa de KHCO_3 al 1 % y, en segundo lugar, 500 μL de agua ultrapura. La finalidad de este segundo lavado es eliminar la mayor parte de la sal de la disolución anterior que pudiese haber quedado retenida en el cartucho.

4.1.6. Volumen de elución

Los bajos niveles de concentración en los que se deben cuantificar los analitos estudiados obligan a proponer esquemas de preconcentración en los que se obtenga el máximo aumento de señal posible. Con el volumen de muestra seleccionado, 5 mL, la máxima sensibilidad se conseguirá eluyendo los analitos con la mínima cantidad de etanol posible siempre que la fracción extraída de los mismos fuese suficientemente elevada.

Para ello, se llevó a cabo un estudio del volumen de elución en el que una disolución alcohólica (12 % etanol) de 0.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada uno de los haloanisoles se sometió al proceso optimizado de MEPS y en la etapa de elución se seleccionaron diferentes volúmenes de etanol: 50, 70 y 100 μL .

En la figura 6 se muestran las señales obtenidas para los cuatro compuestos estudiados con los diferentes volúmenes de elución. Puede observarse que las mayores señales analíticas corresponden al menor de los volúmenes estudiados.

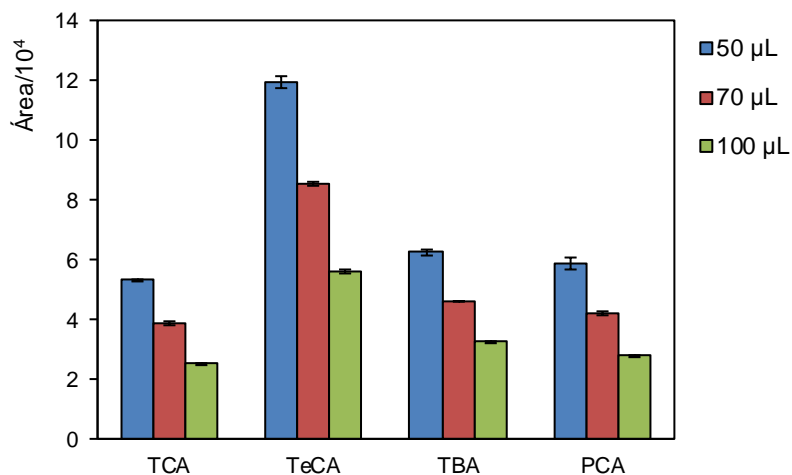


Figura 6: Señal obtenida en la primera elución con cada uno de los tres volúmenes para los cuatro haloanisoles

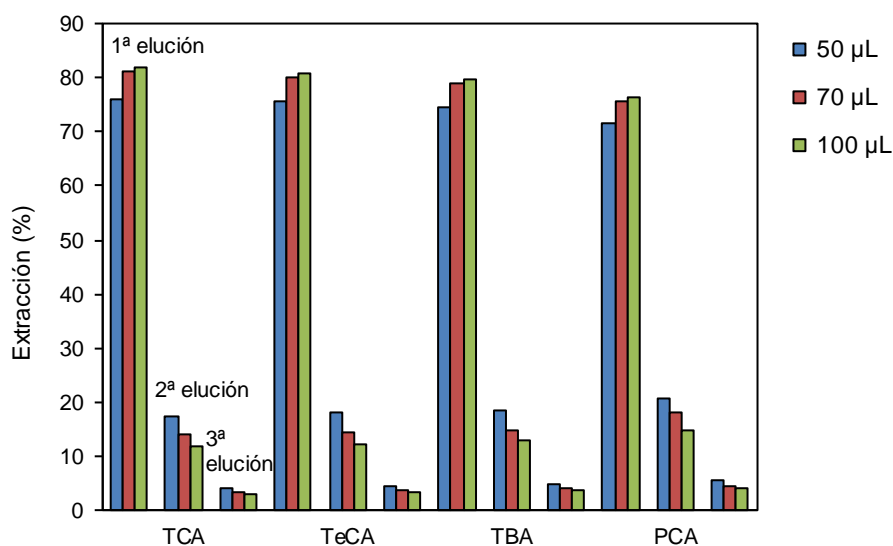
Para comprobar la fracción de analitos que permanece en el dispositivo MEPS tras esta etapa, después de cada una de las eluciones anteriores se realizaron otras tres eluciones consecutivas con el mismo volumen teniendo un total de cuatro eluciones con cada uno de ellos.

A la suma de la señal obtenida para cada compuesto en las cuatro eluciones consecutivas se le asignó el valor del 100 % y se calculó el porcentaje extraído de cada compuesto en la primera y en cada una de las eluciones sucesivas (tabla 5).

Tabla 5: Porcentajes de recuperación obtenidos en las cuatro eluciones consecutivas y con los tres volúmenes estudiados: 50, 70 y 100 μ

	TCA	TeCA	TBA	PCA
1ª elución				
50 μ L	75.9	75.8	74.6	71.6
70 μ L	81.0	80.0	79.0	75.6
100 μ L	82.0	80.8	79.8	76.4
2ª elución				
50 μ L	17.4	18.1	18.6	20.8
70 μ L	14.0	14.6	14.8	18.0
100 μ L	11.9	12.4	12.9	14.9
3ª elución				
50 μ L	4.3	4.4	4.9	5.5
70 μ L	3.6	3.8	4.2	4.6
100 μ L	3.1	3.4	3.8	4.3
4ª elución				
50 μ L	2.4	1.7	1.9	2.0
70 μ L	1.4	1.6	2.1	1.7
100 μ L	3.0	3.3	3.5	4.5

En la figura 7 se representa el porcentaje de recuperación de cada uno de los compuestos estudiados correspondiente a las tres primeras eluciones con cada uno de los volúmenes estudiados.

**Figura 7:** Porcentajes de recuperación obtenidos a partir de las tres primeras eluciones con 50, 70 y 100 μ L para cada uno de los cuatro haloanísos

Con estos resultados, se eligió un volumen de elución de 50 μ L ya que a pesar de que el porcentaje de extracción conseguido es ligeramente inferior al conseguido con los volúmenes de 70 y 100 μ L, la señal analítica que se obtiene en el primer caso es más alta (figura 6) que en los otros dos. Eluyendo con 50 μ L se consigue el factor de concentración más alto y, por tanto, la máxima sensibilidad para el procedimiento propuesto.

Se estudió también la posibilidad de realizar el proceso de elución en dos pasos. Se toman en primer lugar 20 μ L de etanol y se descargaron en el vial de análisis y a continuación se toman 30 μ L del mismo disolvente y se añadieron a la alícuota anterior completando de esta manera un volumen de 50 μ L. El interés de esta elución fraccionada residía en estudiar si por medio de un doble paso de disolvente a través del cartucho se conseguía eluir un mayor porcentaje de los analitos retenidos. Sin embargo, no se conseguía una mejora de las señales obtenidas y se descartó la utilización de la elución en dos pasos.

4.1.7. Efecto de memoria del proceso MEPS

Cuando se eluye con 50 μ L de etanol, una porción de los analitos permanece retenida en el cartucho. Normalmente, con la etapa de acondicionamiento del cartucho, en la que se hacen pasar a través del mismo 500 μ L de etanol, estas pequeñas cantidades de compuestos se eliminan. A pesar de ello, para asegurar la eliminación y dejar limpio el cartucho entre un análisis y el anterior, en el proceso de microextracción optimizado se realiza una etapa final de lavado adicional con 500 μ L de etanol evitando así problemas acarreados por el efecto memoria.

No obstante, para comprobar la existencia o no de este efecto

memoria se realizó una experimentación que consistía en la preconcentración de una muestra con los analitos en una concentración muy elevada. Posteriormente se realiza el lavado propuesto y a continuación se lleva a cabo la elución de los posibles compuestos aún retenidos en el cartucho con una fracción de 50 μ L de etanol.

Se realizaron, por tanto, tres inyecciones; en primer lugar, la inyección de una disolución alcohólica (12 % etanol) de 4 μ g L⁻¹ de cada uno de los haloanisoles extraída mediante MEPS con el método optimizado. Una segunda inyección del lavado realizado con etanol (500 μ L) y por último una inyección de una fracción de 50 μ L de etanol pasada por el dispositivo de MEPS tras el lavado y que contendría los compuestos que hubiesen quedado sin arrastrar. Los resultados de esta experiencia corresponden a la columna SLBTM-IL100. En la figura 8 se muestran los cromatogramas correspondientes a esta experiencia.

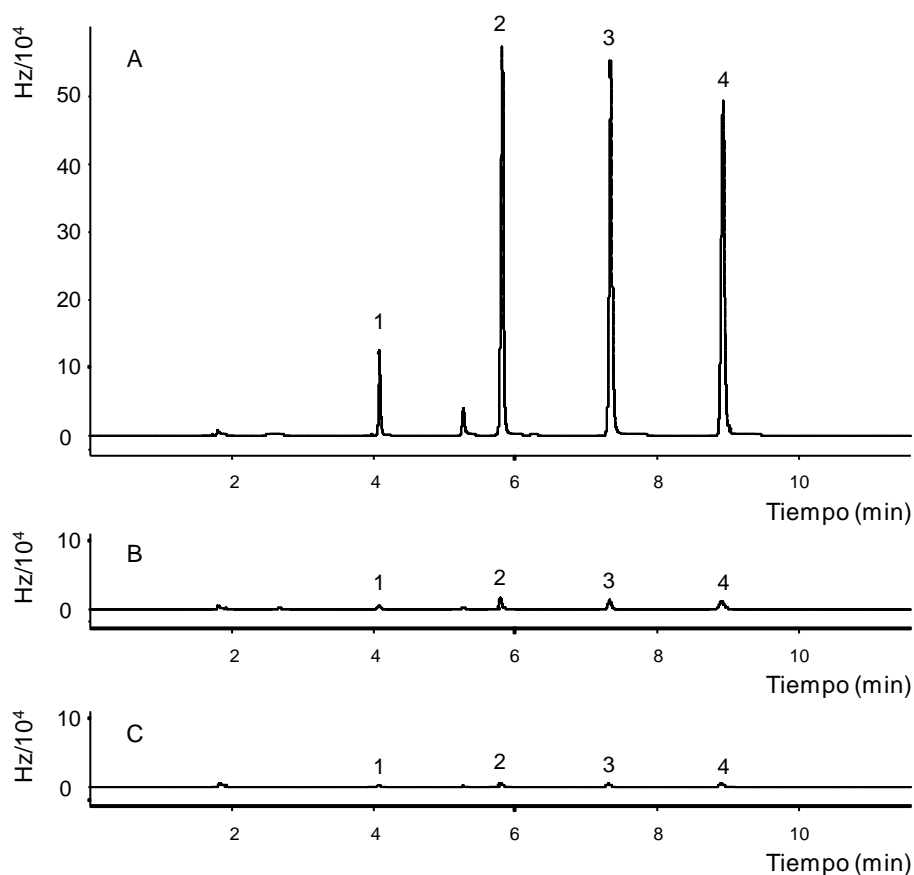


Figura 8: Cromatogramas correspondientes a: A) Disolución de $4 \mu\text{g L}^{-1}$ de haloanisoles en agua con 12 % etanol; B) lavado final con $500 \mu\text{L}$ etanol tras la preconcentración anterior; C) $50 \mu\text{L}$ etanol tras el lavado final.

1: TCA; 2: TeCA; 3: TBA; 4: PCA

Tomando como referencia la señal obtenida en la primera inyección, correspondiente al proceso MEPS de la disolución de los haloanisoles (cromatograma A), se calcularon los porcentajes de haloanisoles contenidos en el lavado y en el etanol inyectado tras el lavado (cromatograma B y C, respectivamente), cuyos valores se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: *Porcentajes de haloanisoles encontrados en el lavado y en el etanol tras el lavado con respecto a la señal obtenida en la extracción*

	TCA	TeCA	TBA	PCA
<i>% en el lavado (500 μL etanol)</i>	3.8	3.1	2.8	3.1
<i>% en 50 μL etanol tras el lavado final</i>	0.9	0.8	0.5	0.7

El efecto memoria, es decir, la cantidad de compuestos en el etanol inyectado tras el lavado, es menor al 0.9 % para todos los compuestos, por lo cabe afirmar que el efecto de memoria es prácticamente despreciable.

4.2. Variables que afectan al sistema PTV-GC- μ ECD

Con el fin de seleccionar las condiciones de análisis óptimas, se realizó un estudio de las variables instrumentales del inyector de temperatura programada (PTV), el cromatógrafo de gases (GC) y el micro-detector de captura electrónica (μ -ECD).

4.2.1. Condiciones del inyector de líquidos

Para el estudio del volumen óptimo de inyección se inyectaron en el sistema cromatográfico volúmenes comprendidos entre 1 y 15 μ L de una disolución de 100 μ g L⁻¹ de los cuatro haloanisoles en etanol.

Para realizar este estudio, se utilizaron dos jeringas diferentes, una de 10 μ L que permitía la inyección de volúmenes entre 1 y 5 μ L y otra de 50 μ L que permitía inyectar un rango de volúmenes entre 1 μ L y 25 μ L. Aunque con esta última jeringa habría sido posible realizar todas las pruebas, la jeringa de 10 μ L es más precisa para volúmenes bajos.

La señal aumentaba a medida que lo hacía el volumen de inyección;

sin embargo, la morfología de los picos así como la simetría de los mismos empeoraba considerablemente para los dos volúmenes más elevados (10 y 15 μ L) los picos presentaban colas delanteras e incluso la señal del primer compuesto presentaba un doble pico (figura 9).

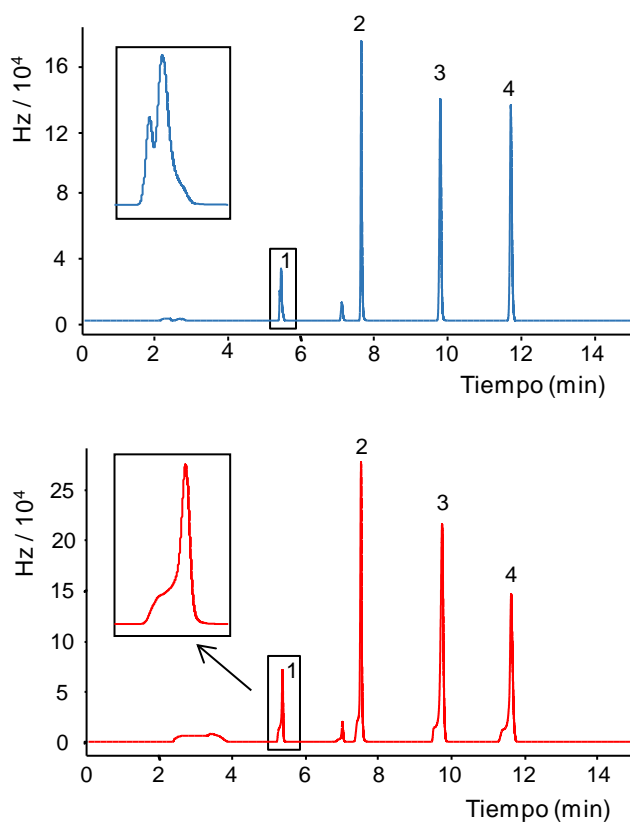


Figura 9: Cromatogramas registrados para una disolución etanólica de los cuatro haloanísos inyectando 10 μ L (parte superior) y 15 μ L (parte inferior) con la columna SLBTM-IL76.

1: TCA; 2: TeCA; 3: TBA; 4: PCA

Finalmente, como volumen óptimo de inyección se seleccionó 5 μ L utilizando la jeringa de 10 μ L para los estudios posteriores.

4.2.2. Condiciones del inyector de temperatura programada

En el inyector de temperatura programada se seleccionó el modo de inyección *solvent vent*, modalidad que aprovecha las ventajas de enfoque de la inyección en frío junto con la eliminación controlada del disolvente. Las características de este tipo de inyección son las más adecuadas para el análisis de los compuestos objeto de estudio. Las concentraciones a las que se necesita detectar los haloanísoles son muy bajas y, por lo tanto, un modo de inyección que permita llevar a cabo una preconcentración de los mismos resulta muy conveniente. Por otra parte, la diferencia entre los puntos de ebullición de los compuestos, comprendidos entre los 241 y los 309 °C, y el punto de ebullición del etanol, 78.3 °C, permite eliminar en la etapa de venteo gran parte de este disolvente. Los estudios con otros modos de inyección se limitaron a las primeras inyecciones de los compuestos para controlar los tiempos de elución de cada uno de ellos.

La temperatura inicial del PTV se seleccionó entre un rango de temperaturas entre 40 y 70 °C. El área de los picos disminuye a medida que la temperatura inicial aumenta; sin embargo, la reproducibilidad entre inyecciones para la temperatura de 40 °C era ligeramente inferior a la del resto de temperaturas estudiadas debido a la diferencia con la temperatura inicial del horno cromatográfico (70 °C). Se escogió finalmente como temperatura inicial del PTV 50 °C.

Como temperatura final de calentamiento del inyector de temperatura programada se seleccionó la máxima permitida por el *liner* de vidrio vacío con el que se realizaron gran parte de los estudios de optimización del método, 250 °C. Esta temperatura es compatible

también con el resto de los *liners* utilizados en el estudio. De la misma manera, se seleccionó para la rampa de calentamiento del *liner* la más alta permitida, 12 °C s⁻¹.

En cuanto al flujo de venteo, se realizó un estudio con tres valores de flujo diferentes; 50, 75 y 100 mL min⁻¹, y no se observaron grandes diferencias en la resolución o altura de los picos, por lo que se seleccionó un flujo de venteo de 50 mL min⁻¹, suficiente para conseguir una buena eliminación del disolvente que se inyectaba con la muestra.

En cuanto al tipo de *liner*, se realizó un estudio comparativo de la señal obtenida para los cuatro compuestos de interés cuando se utilizan un *liner* de vidrio vacío en zigzag y un *liner* de vidrio relleno de Tenax-TA®. En la figura 10 se muestran los cromatogramas obtenidos a partir de dos inyecciones de una misma disolución de los haloanisoles con cada una de ellas con uno de los *liners*. Con el *liner* de Tenax-TA® se conseguían mayores señales para los cuatro compuestos de interés, especialmente para el 2,4,6-tricloroanisol, por lo que se seleccionó este último para el método optimizado.

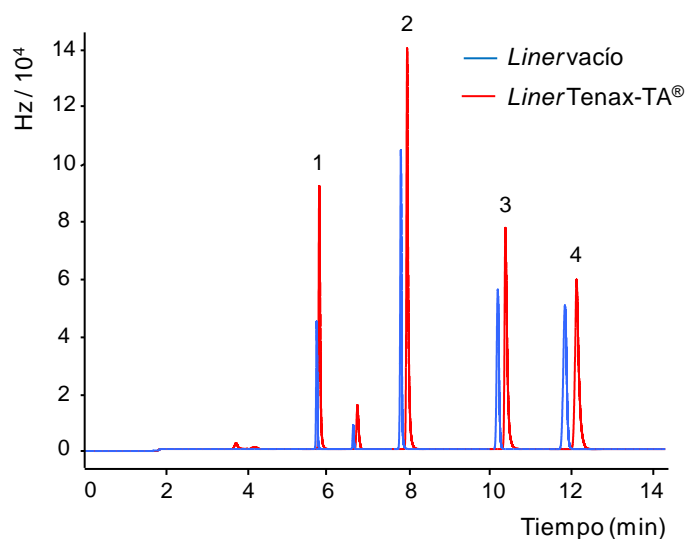


Figura 10: Comparación de los cromatogramas obtenidos a partir de dos inyecciones de una misma disolución de los cuatro haloanisoles con un liner vacío en zigzag y otro relleno de Tenax-TA® (columna SLB™-IL76)
1: TCA; 2: TeCA; 3: TBA; 4: PCA

4.2.3. Condiciones de la separación cromatográfica

La separación cromatográfica de los compuestos de interés se llevó a cabo con columnas capilares con diferentes fases estacionarias de líquidos iónicos. En concreto se estudiaron cuatro columnas diferentes de sílice fundida (30 m x 0.25 mm x 0.2 μ m).

De acuerdo con el procedimiento de Mondello y colaboradores (basado en los valores de la Constante de McReynolds) [27] la fase estacionaria SLB™-IL100 puede definirse como extremadamente polar, la SLB™-IL76 como altamente polar, mientras que las columnas SLB™-IL61 y SLB™-IL59 se corresponden con columnas de polaridad media. Los haloanisoles son compuestos de polaridad media y con puntos de ebullición altos (tabla 7) y, por lo tanto, este tipo de columnas debería

resultar especialmente adecuado para su separación.

Tabla 7: Logaritmos de la constante de partición octanol-agua ($\log K_{ow}$) y puntos de ebullición de los cuatro haloanisoles

	TCA	TeCA	TBA	PCA
$\log K_{ow}$	3.9	4.2	4.5	5.0
T^a ebullición ($^{\circ}\text{C}$)	246	286.9	298	321.5

Las cuatro columnas de líquidos iónicos se evaluaron en términos de eficiencia, resolución y simetría de pico en la separación de los cuatro estándares puros de los haloanisoles estudiados.

En primer lugar, se evaluaron las diferentes columnas en términos de eficiencia. Para ello, se calculan los valores del número de platos teóricos (N) a partir de la expresión:

$$N = 5.545 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{0.5}} \right)^2$$

donde, t_R es el tiempo de retención de los analitos y $w_{0.5}$ la medida de la anchura del pico a la mitad de la altura.

La altura equivalente de un plato teórico (HETP), representada como H_{exp} , para cada columna, se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$H_{exp} = \frac{L}{N}$$

donde L es la longitud de la columna cromatográfica expresada en milímetros.

El cálculo de la mejor eficacia teórica posible que se puede obtener para una columna dada se denomina altura equivalente mínima de plato teórico, H_{min} . Este valor se calculó mediante la ecuación de Golay [38]

utilizando los valores de los factores de retención (k) y el radio interior de la columna (r).

$$H_{\min} = r \cdot \sqrt{\frac{1 + 6 \cdot k + 11 \cdot k^2}{3 \cdot (1 + k)^2}} \quad \text{siendo} \quad k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

En la tabla 8 se recogen los valores de los parámetros mencionados anteriormente para los cuatro haloanísos con cada una de las columnas estudiadas.

Tabla 8: Valores de N , k , H_{exp} , $H_{\text{mín}}$ y UTE % para los cuatro haloanísos en las cuatro columnas

	TCA	TeCA	TBA	PCA
SLB TM -IL100				
N	20065	63718	72885	91729
k	1.21	1.85	2.39	3.04
H_{exp} (mm)	1.495	0.471	0.412	0.327
$H_{\text{mín}}$ (mm)	0.161	0.179	0.188	0.196
UTE (%)	11	38	46	60
SLB TM -IL76				
N	34019	65686	85251	98233
k	1.79	2.89	3.97	4.93
H_{exp} (mm)	0.882	0.457	0.352	0.305
$H_{\text{mín}}$ (mm)	0.177	0.195	0.204	0.210
UTE (%)	20	43	58	69
SLB TM -IL61				
N	117026	117150	124013	132728
k	1.75	2.98	4.69	6.35
H_{exp} (mm)	0.256	0.256	0.242	0.226
$H_{\text{mín}}$ (mm)	0.176	0.196	0.209	0.216
UTE (%)	69	76	86	95
SLB TM -IL59				
N	89291	142993	125736	126997
k	1.81	3.35	4.71	6.38
H_{exp} (mm)	0.336	0.210	0.238	0.236
$H_{\text{mín}}$ (mm)	0.178	0.199	0.209	0.216
UTE (%)	53	95	88	91

Puede observarse que el número de platos teóricos aumenta a medida que disminuye la polaridad de la fase estacionaria. Así, por ejemplo, para el compuesto TBA, las dos columnas más polares presentaban un número de platos de 72885 (SLBTM-IL100) y 85251 (SLBTM-IL76). Sin embargo, los valores para este mismo compuesto en las columnas menos polares (SLBTM-IL61 y SLBTM-IL59) eran de 124013 y 125736, respectivamente.

De forma general los valores del factor de retención también aumentan al disminuir la polaridad de la fase estacionaria. Este comportamiento resulta fácilmente explicable si se considera, como se ha mencionado anteriormente, que estos compuestos presentan una polaridad intermedia. En las columnas más polares se produce una retención menor y, por tanto, los factores de retención son más bajos.

Se puede hacer una comparación entre el rendimiento real y teórico de estas columnas calculando la relación entre los valores de altura equivalente mínima de plato teórico y experimental, H_{min} y H_{exp} , respectivamente. Esta comparación tiene relación con la utilización de la eficiencia teórica (UTE %) que puede expresarse como:

$$UTE\% = \frac{H_{min}}{H_{exp}} \cdot 100$$

Los valores de UTE % generalmente se encuentran entre el 60 y 90 %, indicando cómo se acerca el rendimiento real al posible teórico [39]. Las columnas polares tienen valores más bajos de este parámetro que las no polares debido a que es más difícil alcanzar un recubrimiento uniforme con fases estacionarias polares. Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con este comportamiento, siendo las columnas de polaridad

media las que presentan eficiencias más elevadas, mientras que las columnas más polares presentan valores más bajos.

Las dos columnas más polares en ningún caso presentan valores superiores al 70 % para este parámetro y, sin embargo, las columnas SLB™-IL61 y SLB™-IL59 alcanzan valores de hasta el 95 % para los compuestos PCA y el TeCA, respectivamente.

Las cuatro columnas han sido además evaluadas calculando la resolución y simetría de pico. En la figura 11 se muestran los cromatogramas obtenidos para la separación de los cuatro haloanisoles objeto de estudio en las cuatro columnas, desde la de mayor a la de menor polaridad. Todas las columnas muestran una buena selectividad para este grupo de compuestos.

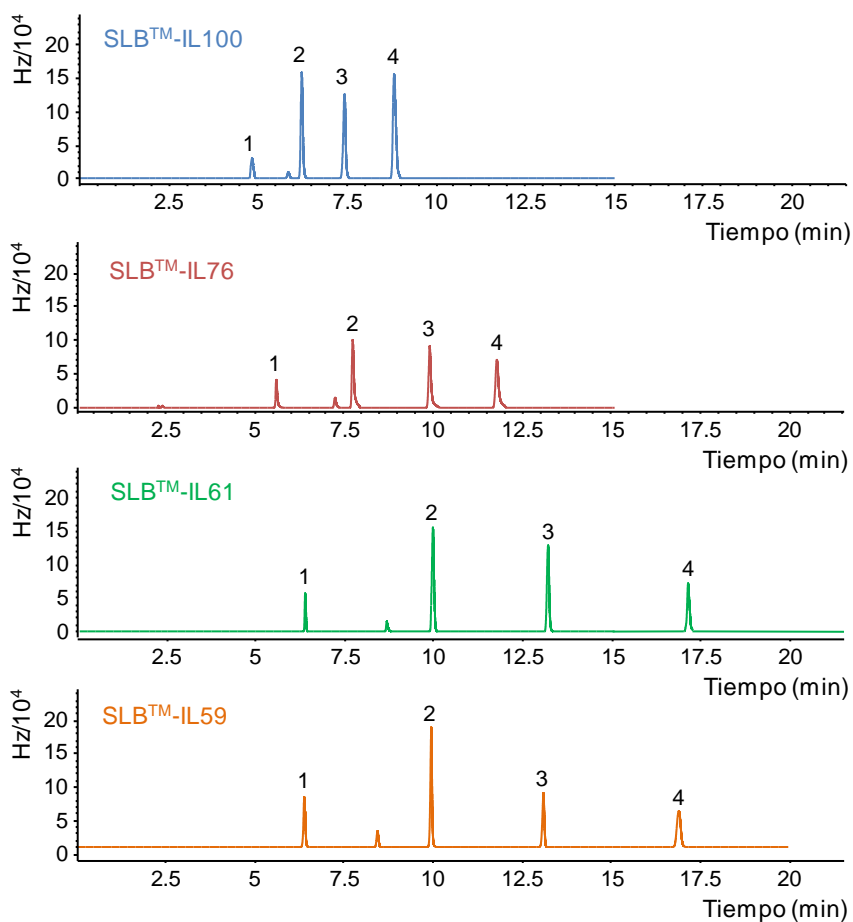


Figura 11: Cromatogramas de los cuatro haloanísoles con la misma concentración en las cuatro columnas de líquidos iónicos estudiadas.

1: TCA; 2: TeCA; 3: TBA; 4: PCA

Como era de esperar, el tiempo de retención aumenta a medida que la polaridad de la fase estacionaria decrece.

La resolución cromatográfica se calculó utilizando la siguiente expresión matemática:

$$R_s = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}}$$

donde, t_{R1} y t_{R2} son los tiempos de retención de dos compuestos que eluyen consecutivamente y w_{b1} y w_{b2} sus correspondientes anchuras de pico en la base.

El factor de asimetría (FA) en las columnas de líquidos iónicos es también un aspecto importante que debe tenerse en cuenta. El cálculo de este parámetro se realiza utilizando el software del equipo a partir de la siguiente expresión matemática:

$$FA = \frac{w_{0.05}}{2 \cdot f}$$

tomando, para ello, el valor de la anchura de pico al 5 % de la altura del mismo ($w_{0.05}$) y la distancia desde el máximo de pico al frente del pico medida también a una altura del 5 % sobre la línea base (f).

En la tabla 9 se muestran los valores de resolución obtenidos para las diferentes columnas. En todos los casos se obtuvo una resolución de pico adecuada.

Tabla 9: Resolución cromatográfica (R_s) y factor de asimetría (FA) calculado en las columnas estudiadas

	TCA	TeCA	TBA	PCA
SLB TM -IL100				
R_s		11.8	11.4	12.5
FA	0.69	0.73	0.76	0.77
SLB TM -IL76				
R_s		18.0	16.8	13.3
FA	0.65	0.72	0.76	0.78
SLB TM -IL61				
R_s		31.3	30.7	22.9
FA	0.75	1.00	1.01	1.02
SLB TM -IL59				
R_s		36.8	24.7	22.5
FA	0.80	1.02	1.02	0.97

Las dos columnas de mayor polaridad presentan valores del factor de asimetría claramente inferiores a 1, lo que demuestra la existencia de picos con importantes colas anteriores. En estas fases, los compuestos presentan una retención débil. En cambio, las otras dos fases estacionarias presentan un comportamiento muy parecido con valores cercanos a 1, lo que equivale a una gran simetría de pico. En todos los casos, el analito que presenta un mayor grado de colas anteriores es el que menos se retiene, el TCA. El resto de los analitos presenta un comportamiento prácticamente gaussiano.

Estos resultados demuestran que cualquiera de las cuatro columnas estudiadas permitiría una adecuada separación de los compuestos. Los mejores resultados en cuanto a simetría de picos corresponderían a las columnas menos polares, aunque se alarga considerablemente el tiempo de análisis. La elección final de la columna más adecuada está determinada por las posibles interferencias que generen los compuestos presentes en la matriz del vino y que se extraigan conjuntamente con los analitos de interés.

4.2.4. Condiciones del micro-detector de captura electrónica

La respuesta del detector de captura electrónica a los compuestos de interés está afectada por la temperatura del detector y por el flujo de gas auxiliar.

El estudio de la temperatura del detector se realizó para valores comprendidos entre 225 y 325 °C. Se observó un aumento de la señal analítica al aumentar la temperatura del detector hasta alcanzar los 290 °C sin que el ruido del sistema se incrementase de forma significativa. Para temperaturas más altas las señales seguían aumentando pero el

ruido del sistema aumentaba de forma considerable. Por ello, se fijó como temperatura de trabajo del detector 290 °C.

Para la elección del valor más apropiado del flujo de gas auxiliar, se llevó a cabo una serie de inyecciones de una misma disolución de los compuestos con valores de este parámetro comprendidos entre 10 (mínimo valor recomendado por el fabricante) y 40 mL min⁻¹. Se observó que a pesar de que la simetría de los picos no experimentaba cambios importantes, sí lo hacía la señal obtenida siendo ésta mucho menor a medida que se incrementaba el flujo de gas auxiliar. Los mejores resultados en cuanto al área de los picos se obtuvieron con un flujo de gas auxiliar de 10 mL min⁻¹, por lo que este se escogió como flujo óptimo.

4.3. Señales obtenidas con las condiciones óptimas de MEPS-PTV-GC- μ ECD

Una vez que todo el método se hubo optimizado, diferentes muestras de vino se sometieron al proceso de análisis utilizando las cuatro columnas de líquidos iónicos.

La figura 12 muestra los cromatogramas de una muestra de vino tinto y de una disolución patrón en las columnas más y menos polar respectivamente, la SLBTM-IL100 y la SLBTM-IL59.

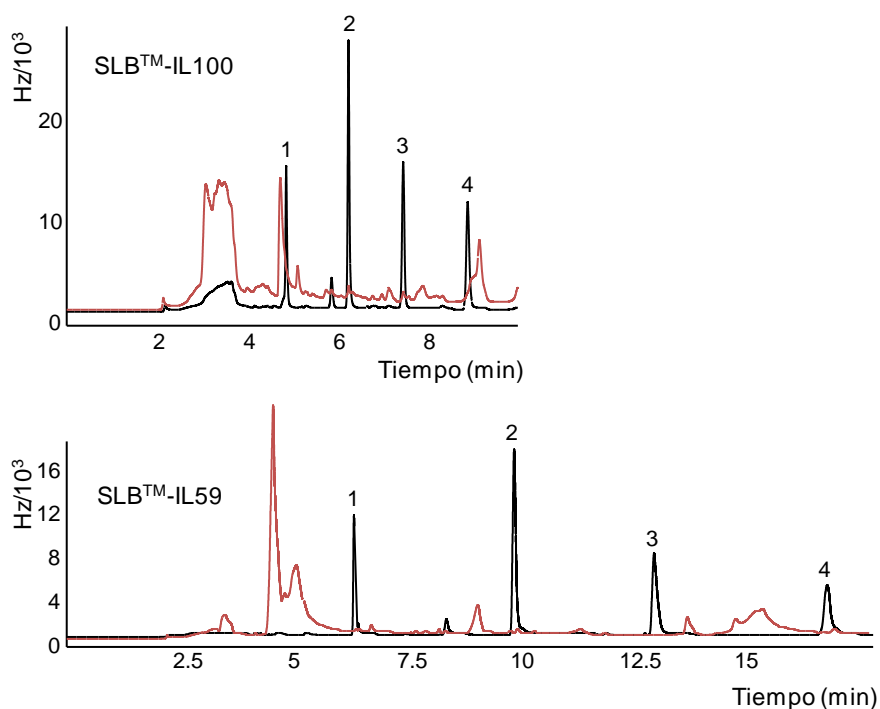


Figura 12: Interferencia de los compuestos de la matriz, vino (señales en rojo) con las señales de los cuatro haloanisoles (señal en negro) para las columnas SLB™-IL100 y SLB™-IL59

1: TCA; 2: TeCA; 3: TBA; 4: PCA

A pesar de las diferentes disoluciones de lavado que se probaron, puede observarse que no se consiguió una eliminación total de la señal de la matriz. Así, en el caso de la columna más polar, la elución conjunta de algunos de los analitos estudiados con especies presentes en la matriz de vino dificulta una adecuada cuantificación de los compuestos de interés.

De las cuatro columnas evaluadas, los mejores resultados en términos de cuantificación de los analitos de estudio se obtuvieron con la columna SLB™-IL59. En este caso, las medidas se encuentran prácticamente libres

de interferencias excepto un pequeño pico que eluye en un tiempo de retención próximo al del 2,3,5,6-tetracloroanisol pero que no impide realizar una cuantificación adecuada de este último.

A partir de estos resultados se decidió utilizar la columna SLBTM-IL59 para proponer un método analítico basado en la separación y cuantificación de haloanisoles en muestras de vino.

La figura 13 muestra un cromatograma correspondiente a un análisis mediante MEPS-PTV-GC- μ ECD para una muestra de vino dopada con una concentración de 20 ng L⁻¹ analizada con la columna SLBTM-IL59.

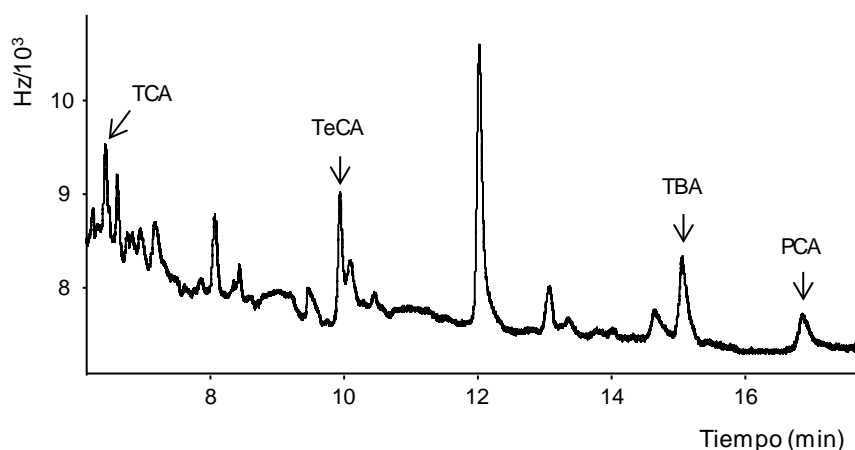


Figura 13: Cromatograma obtenido en el análisis, siguiendo el procedimiento propuesto, de un vino dopado con 20 ng L⁻¹ de cada uno de los haloanisoles.

Como se puede observar, el cromatograma presenta picos cromatográficos correspondientes a especies presentes en el vino que, como se ha comentado anteriormente, no se han conseguido eliminar con los distintos procesos de limpieza de extractos ensayados. No obstante, todos los compuestos estudiados se identifican bien en la

matriz del vino y, además, pueden ser cuantificados de forma adecuada a pesar de tratarse de un nivel bajo de concentración.

4.4. Efecto de matriz

Un aspecto fundamental que es necesario evaluar para determinar la aplicabilidad del método propuesto a la determinación de haloansoles en muestras de vino es la existencia o no de efecto de matriz. Para ello, diferentes muestras de vino (blancos y tintos), previamente filtradas, se doparon a un nivel de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ y se sometieron al proceso de microextracción con sorbentes empaquetados y posterior inyección en el sistema cromatográfico en las condiciones optimizadas en este estudio.

Las respuestas medidas (tres réplicas) a partir de las muestras de vino dopadas se compararon con las de disoluciones alcohólicas (12 % etanol) de la misma concentración y no se encontraron diferencias significativas entre ellas. Consecuentemente, la cuantificación de los haloansoles en muestras de vino se podía llevar a cabo por medio de calibración externa.

Una vez que se comprobó que no existía efecto de matriz, se analizaron muestras de vino comerciales correspondientes a vino blanco de la variedad "verdejo" y tinto de la variedad "tempranillo" sin dopar en las que no se encontró ninguno de los haloansoles estudiados en niveles de concentración superiores a los límites de detección del método propuesto.

4.5. Evaluación del método analítico optimizado

Las concentraciones a las que los haloansoles son percibidos por el ser humano en un vino son del orden de los ng L^{-1} . Por ello, para el

calibrado, se prepararon disoluciones de cada uno de estos compuestos en agua ultrapura al 12 % de etanol a ocho niveles de concentración que se encontraban entre 10 y 250 ng L⁻¹; cada nivel se analizó por triplicado.

Cada una de las disoluciones anteriores se sometió al proceso optimizado de MEPS-PTV-GC- μ ECD. Las características analíticas del método optimizado se muestran en la tabla 10.

Por medio del análisis de la varianza se comprobó la validez de los modelos lineales construidos y ninguno de ellos mostró fallo de ajuste. El valor del coeficiente de determinación (R^2) se muestra en la tabla 10 y resultó mayor de 0.9983 en todos los casos.

Los estudios de repetibilidad (6 réplicas en el mismo día) y reproducibilidad (3 réplicas cada día durante 6 días) se realizaron utilizando en ambos casos disoluciones dopadas a un nivel de concentración de 50 ng L⁻¹. En la tabla 10 se muestran los valores obtenidos para los cuatro analitos estudiados en forma de desviación estándar relativa (RSD , %). Puede observarse que los valores de repetibilidad son inferiores al 5 % mientras que la reproducibilidad del método (que incluye la variabilidad entre días) se encuentra entre el 7 y el 10 %. Estos valores se pueden considerar satisfactorios teniendo en cuenta que corresponden al método global en el que se produce un proceso de extracción y preconcentración de los analitos en el MEPS seguido de una preconcentración adicional en el PTV (con eliminación de disolvente) y un posterior proceso de separación en el sistema cromatográfico. Por otro lado, estos valores son del mismo orden o incluso mejores que los obtenidos por otras técnicas de microextracción (SPME, SBSE o SDME) cuando se aplican a muestras dopadas con

concentraciones similares de los haloanisoles estudiados [40].

Los límites de detección (*LODs*) y cuantificación (*LOQs*) se muestran en la tabla 10 y se encuentran en el rango entre 1.2 y 4.8 ng L⁻¹ y entre 4.0 y 16.0 ng L⁻¹, respectivamente, para disoluciones alcohólicas (12 % de etanol). Se calcularon también ambos límites en muestras de vino, encontrándose en este caso los valores entre 2.1 y 8.3 ng L⁻¹ en el caso de los límites de detección y entre 7.0 y 28.0 ng L⁻¹ en el caso de los de cuantificación. Los límites de cuantificación son inferiores a 20 ng L⁻¹ en disolución y a 30 ng L⁻¹ en muestras de vino; los valores para cada uno de los compuestos en ambas matrices se recogen en la tabla 10. Los resultados ponen de manifiesto que el método propuesto permite detectar los anisoles halogenados por debajo de su umbral de percepción en muestras de vino [40]. Por otra parte, debido a que solo el 10 % del extracto final (50 μ L) se inyecta en el cromatógrafo, es razonable pensar que con el uso de un dispositivo de MEPS automático acoplado directamente a un inyector de temperatura programada (PTV), que permitiría la inyección directa de todo el volumen extraído, estos límites de detección podrían mejorar. Finalmente, resaltar que estos valores de límites de detección son similares a los obtenidos mediante SPE y ligeramente más altos que los obtenidos con otras técnicas de preconcentración como SPME, SDME y SBSE [40].

La precisión del método propuesto se evaluó mediante el cálculo de las recuperaciones aparentes para cada uno de los compuestos objeto de estudio. Para ello, se doparon vinos con diferentes características (vino tinto y vino blanco) a diferentes niveles de concentración (20 y 40 ng L⁻¹) y se analizaron siguiendo el método optimizado. Con los modelos de

calibración obtenidos se cuantificaron los cuatro haloanisoles en las muestras de vino analizadas y en la tabla 10 se muestran las predicciones y el intervalo de confianza de las mismas obtenidas con calibración externa expresadas en porcentaje. Se obtuvieron recuperaciones de entre el 75 y el 95 % y entre el 85 y el 98 %, respectivamente. Valores que se pueden considerar aceptables considerando que ambas concentraciones se encuentran en la parte más baja de la recta de calibrado. Los resultados obtenidos para el nivel más bajo (20 ng L^{-1}) pueden explicarse teniendo en cuenta que corresponde a un valor prácticamente igual e incluso en algunos casos menor del límite de cuantificación del método propuesto para algunos de los compuestos estudiados. Estos resultados ponen de manifiesto que la metodología propuesta en este trabajo es aplicable a la cuantificación de haloanisoles en muestras de vinos.

A partir de la experimentación realizada en el apartado 4.1.3. para la elección del volumen de muestra pasado por el MEPS, se puede calcular la recuperación absoluta del método propuesto, ya que en ella se comparaba la señal obtenida para una disolución de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de los cuatro haloanisoles en agua ultrapura al 12 % de etanol y eluyendo con $50 \mu\text{L}$ de etanol con la obtenida a partir de una inyección directa de una disolución de la misma concentración de los analitos en el disolvente de elución. En la tabla 10 se recogen los valores del porcentaje de recuperación para cada uno de los cuatro haloanisoles que se encuentran entre 48.1 y 60.4 %, valores normales para este tipo de metodologías que presentan etapas de preparación de muestra en las que se realiza una extracción de los compuestos y posterior elución.

Tabla 10. Características analíticas del método propuesto

Compuesto	R ²	RSD (%)		LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)	Recuperación aparente (ng L ⁻¹ , %)				Recuperación absoluta (1 μ g L ⁻¹ , %)		
		Intra-día n = 10 1 μ g L ⁻¹	Inter-día n = 3 1 μ g L ⁻¹			20 ng L ⁻¹		40 ng L ⁻¹				
TCA	0,9996	2.1	6.8	1.8	3.2	6.0	11.0	80 (10)	85 (15)	97 (5)	90 (7)	48.1
TeCA	0,9993	3.6	7.2	1.2	2.1	4.0	7.0	75 (15)	80 (15)	87 (7)	85 (7)	55.3
TBA	0,9983	4.3	8.3	3.3	5.8	11.0	19.0	95 (20)	90 (20)	97 (7)	92 (7)	59.6
PCA	0,9983	4.7	10.3	4.8	8.3	16.0	28.0	80 (25)	85 (20)	85 (12)	90 (10)	60.4

5. CONCLUSIONES

En el trabajo realizado se ha puesto a punto un método para la determinación de haloanisoles en vino en el que se propone el acoplamiento de una técnica de extracción y preconcentración de muestra basada en la microextracción con sorbentes empaquetados (MEPS) con la separación de los compuestos mediante cromatografía de gases (GC), utilizando columnas capilares de líquidos iónicos (IL) como fases estacionarias, y su posterior detección mediante captura electrónica (μ ECD).

La microextracción con sorbentes empaquetados reduce el volumen de muestra necesario para cada medida y elimina todo tipo de tratamiento previo a la microextracción ya que el vino directamente se hace pasar a través del cartucho suprimiendo el uso de material adicional. De la misma manera, el consumo de disolventes orgánicos se reduce de forma significativa, siendo necesarios únicamente 1 mL de etanol para las etapas de acondicionamiento y limpieza del cartucho y tan sólo 50 μ L para la elución de los analitos retenidos en el mismo.

Las cuatro columnas capilares de líquidos iónicos utilizadas como fases estacionarias permiten una separación adecuada de los compuestos estudiados. Sin embargo, las señales generadas por la matriz del vino dificultan, en algunos casos, la cuantificación de los analitos. De las cuatro columnas estudiadas, la SLBTM-IL59 permite una adecuada separación de los compuestos y de las especies presentes en la matriz de forma que se puede realizar la cuantificación de los analitos sin necesidad de llevar a cabo largos y laboriosos procesos de pretratamiento de muestra. Conviene señalar, sin embargo, que se han

observado problemas de estabilidad en algunas de las columnas estudiadas. Las fases estacionarias no están enlazadas a las paredes del capilar y esto podría ser la causa de la irreproducibilidad y pérdida de resolución encontradas a pesar de la alta estabilidad térmica que se atribuye a los líquidos iónicos.

La metodología propuesta permite la determinación de estos haloanisoles en concentraciones que se encuentran en el umbral de percepción de estos compuestos, por lo que podría utilizarse como método de rutina.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Green Analytical Chemistry*, Trends Anal. Chem. 27 (2008) 497-511.
- [2] M. Tobiszewski, A. Mechlinska, B. Zygmunt, J. Namiesnik, *Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants*, Trends Anal. Chem. 28 (2009) 943-951.
- [3] W. Wardencki, J. Curyło, J. Namieśnik, *Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis*, J. Biochem. Biophys. Methods 70 (2007) 275-288.
- [4] L. Ramos, *Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques*, J. Chromatogr. A 1221 (2012) 84-98.
- [5] M. Abdel-Rehim, *New trend in simple preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications. I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry*, J. Chromatogr. B 801 (2004) 317-321.
- [6] M. Abdel-Rehim, *Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial*, Anal. Chim. Acta 701 (2011) 119-128.
- [7] R. Mandrioli, L. Mercolini, D. Lateana, G. Boncompagni, M.A. Raggi, *Analysis of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma, urine and saliva by MEPS-LC-UV*, J. Chromatogr. B 879 (2011) 167-173.

- [8] J. Aufartová, C. Mahugo-Santana, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, L. Nováková, P. Solich, Determination of steroid hormones in biological and environmental samples using green microextraction techniques: An overview, *Anal. Chim. Acta* 704 (2011) 33-46.
- [9] A. El-Beqqali, A. Kussak, M. Abdel-Rehim, Fast and sensitive environmental analysis utilizing microextraction in packed syringe online with gas chromatography-mass spectrometry. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, *J. Chromatogr. A* 1114 (2006) 234-238.
- [10] M. Moder, S. Schrader, U. Winkler, R. Rodil, At-line microextraction by packed sorbent-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of UV filter and polycyclic musk compounds in water samples, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2925-2932.
- [11] A. Prieto, S. Schrader, M. Moeder, Determination of organic priority pollutants and emerging compounds in wastewater and snow samples using multiresidue protocols on the basis of microextraction by packed sorbents coupled to large volume injection gas chromatography-mass spectrometry analysis, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6002-6011.
- [12] I. González-Mariño, J.B. Quintana, I. Rodríguez, S. Schrader, M. Moeder, Fully automated determination of parabens, triclosan and methyltriclosan in wastewater by microextraction by packed sorbents and gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 684 (2011) 59-66.

- [13] A. Prieto, S. Schrader, C. Bauer, M. Moeder, Synthesis of a molecularly imprinted polymer and its application for microextraction by packed sorbent for the determination of fluoroquinolone related compounds in water, *Anal. Chim. Acta* 685 (2011) 146-152.
- [14] G. Grueiro Noche, M.E. Fernández Laespada, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, S. Muniategui Lorenzo, Microextraction by packed sorbent for the analysis of pharmaceutical residues in environmental water samples by *in situ* derivatization-programmed temperature vaporizer-gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 9390-9396.
- [15] J. Gonçalves, B. Mendes, C.L. Silva, J.S. Câmara, Development of a novel microextraction by packed sorbent-based approach followed by ultrahigh pressure liquid chromatography as a powerful technique for quantification phenolic constituents of biological interest in wines, *J. Chromatogr. A* 1229 (2012) 13-23.
- [16] C.F. Poole, S.K. Poole, Extraction of organic compounds with room temperature ionic liquids, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2268-2286.
- [17] J.-f. Liu, J.Å. Jönsson, G.-b. Jiang, Application of ionic liquids in analytical chemistry, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 20-27.
- [18] P. Sun, D.W. Armstrong, Ionic liquids in analytical chemistry, *Anal. Chim. Acta* 661 (2010) 1-16.
- [19] A. Berthod, M.J. Ruiz-Ángel, S. Carda-Broch, Ionic liquids in separation techniques, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 6-18.

- [20] J.L. Anderson, D.W. Armstrong, High-stability ionic liquids. A new class of stationary phases for gas chromatography, *Anal. Chem.* 75 (2003) 4851-4858.
- [21] T. Payagala, Y. Zhang, E. Wanigasekara, K. Huang, Z.S. Breitbach, P.S. Sharma, L.M. Sidisky, D.W. Armstrong, Trigonal tricationic ionic liquids: A generation of gas chromatographic stationary phases, *Anal. Chem.* 81 (2009) 160-173.
- [22] K. Huang, X. Zhang, D.W. Armstrong, Ionic cyclodextrins in ionic liquid matrices as chiral stationary phases for gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 5261-5273.
- [23] C. Ragonese, P.Q. Tranchida, D. Sciarrone, L. Mondello, Conventional and fast gas chromatography analysis of biodiesel blends using an ionic liquid stationary phase, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8992-8997.
- [24] C. Villegas, Y. Zhao, J.M. Curtis, Two methods for the separation of monounsaturated octadecenoic acid isomers, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 775-784.
- [25] P. Delmonte, A.-R.F. Kia, J.K.G. Kramer, M.M. Mossoba, L. Sidisky, J.I. Rader, Separation characteristics of fatty acid methyl esters using SLB-IL111, a new ionic liquid coated capillary gas chromatographic column, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 545-554.
- [26] M. Zapadlo, J. Krupčík, T. Kovalczuk, P. Májek, I. Špánik, D.W. Armstrong, P. Sandra, Enhanced comprehensive two-dimensional gas chromatographic resolution of polychlorinated biphenyls on a non-polar

polysiloxane and an ionic liquid column series, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 746-751.

[27] C. Ragonese, D. Sciarrone, P.Q. Tranchida, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello, Evaluation of a medium-polarity ionic liquid stationary phase in the analysis of flavor and fragrance compounds, *Anal. Chem.* 83 (2011) 7947-7954.

[28] C. Pizarro, C. Sáenz-González, N. Perez-del-Notario, J.M. González-Sáiz, Optimisation of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the simultaneous determination of halophenols and haloanisoles in wines, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7630-7637.

[29] C. Pizarro, C. Sáenz-González, N. Perez-del-Notario, J.M. González-Sáiz, Development of an ultrasound-assisted emulsification-microextraction method for the determination of the main compounds causing cork taint in wines, *J. Chromatogr. A* 1229 (2012) 63-71.

[30] A. Peña-Neira, B. Fernández de Simón, M.C. García-Vallejo, T. Hernández, E. Cadahía, J.A. Suarez, Presence of cork-taint responsible compounds in wines and their cork stoppers, *Eur. Food. Res. Technol.* 211 (2000) 257-261.

[31] P. Chatonnet, D. Labadie, S. Boutou, Simultaneous assay of chlorophenols and chloroanisoles in wines and corks or cork-based stoppers application in determining the origin of pollution in bottled wines, *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 37 (2003) 181-193.

[32] S. Insa, E. Anticó, V. Ferreira, Highly selective solid-phase extraction and large volumen injection for the robust gas chromatography-mass spectrometric analysis of TCA and TBA in wines, *J. Chromatogr. A* 1089 (2005) 235-242.

[33] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, Solvent microextraction into a single drop, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2236-2240.

[34] A. Martínez-Uruñuela, J.M. González-Sáiz, C. Pizarro, Multiple solid-phase microextraction in a non-equilibrium situation. Application in quantitative analysis of chlorophenols and chloroanisoles related to cork taint in wine, *J. Chromatogr. A* 1089 (2005) 31-38.

[35] E. Lizarraga, Á. Irigoyen, V. Belsue, E. González-Peñas, Determination of chloranisole compounds in red wine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1052 (2004) 145-149.

[36] L. Maggi, A. Zalacain, V. Mazzoleni, G.L. Alonso, M.R. Salinas, Comparison of stir bar sorptive extraction and solid-phase microextraction to determine halophenols and haloanisoles by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry, *Talanta* 75 (2008) 753-759.

[37] Z. Altun, M. Abdel-Rehim, Study of the factors affecting the performance of microextraction by packed sorbent (MEPS) using liquid scintillation counter and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 630 (2008) 116-123.

-
- [38] L. S. Ettre, The correct meaning of "Coating efficiency" *vs.* the "Utilization of theoretical efficiency", *J. High Resol. Chromatogr.* 21 (1998) 121-123.
- [39] E. F. Barry, in: R.L. Grob, E.F. Barry (Eds.), *Modern Practice of Gas Chromatography* (4th ed.), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2004, pp. 133.
- [40] R. Montes, I. Rodríguez, E. Rubí, M. H. Bollaín, R. Cela, Alternative sorptive extraction method for gas chromatography determination of halogenated anisoles in water and wine samples, *Anal. Chim. Acta*, 599 (2007) 84-91.

V.

**GENERACIÓN DE ESPACIO DE CABEZA
ACOPLADA A CROMATOGRFÍA DE
GASES Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS
PARA LA DETERMINACIÓN DE
COMPUESTOS ENDÓGENOS EN ORINA.
ALDEHÍDOS COMO POSIBLES
MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO**

Journal of Chromatography A 1367 (2014) 9-15

1. INTRODUCCIÓN

Los aldehídos han sido estudiados debido a su relación con el proceso de estrés oxidativo inducido por radicales libres. Estos compuestos son productos de peroxidación de lípidos y, por lo tanto, podrían ser considerados indicadores del daño producido por estos radicales, estando este daño relacionado en gran medida con un amplio número de enfermedades [1-7] entre las que se encuentra el cáncer [8-10]. Concretamente, los aldehídos hexanal y heptanal han sido estudiados como biomarcadores de cáncer de pulmón [11-18]. Otros aldehídos como el pentanal [1], aldehídos alifáticos y el benzaldehído también han sido objeto de estudio por razones semejantes [2,19,20].

Estos compuestos han sido analizados en diferentes matrices biológicas como la sangre [4,6,12-17], la orina [1,4,11,18,21] y el aliento [8,19] habiéndose propuesto diversas metodologías para su determinación. La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se ha aplicado al análisis de sangre [14-17] y orina [21]. Para la determinación de aldehídos alifáticos también se ha propuesto la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem [1,2,4,6], a un detector de longitud de onda variable [12,13,18] o a un detector de barrera de diodos [19]. En estudios más recientes, se ha utilizado electroforesis capilar con detector amperométrico; en este caso, se necesita la derivatización de los compuestos para convertirlos en especies electroactivas [11]. También se ha desarrollado un método para la discriminación de un grupo de aldehídos por medio de un conjunto de sensores colorimétricos [22].

El análisis de estos compuestos en matrices biológicas frecuentemente requiere la utilización de técnicas de extracción y preconcentración previas a la determinación. Entre las diferentes técnicas de pretratamiento de muestra, la extracción en fase sólida (SPE) ha sido utilizada para el análisis de pentanal y hexanal en muestras de orina [1,4] y plasma [6]. La microextracción en fase sólida se ha aplicado tanto sola [18] como acoplada a la técnica de generación de espacio de cabeza (HS-SPME) para el análisis de muestras de orina [21] y de sangre [15]. La microextracción en fase líquida se ha aplicado en sus modalidades de microextracción en fase líquida mediante membrana porosa (HF-LPME) en el caso de muestras de orina [11] y en su modalidad de microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) para muestras de sangre [12,13]. Se ha desarrollado un nuevo método basado en extracción magnética en fase sólida con nanopartículas como adsorbentes de extracción para el análisis de aldehídos en aliento exhalado [19]. La mayoría de las metodologías propuestas incluyen una etapa de derivatización ya sea *in situ* [1,13,14,17-19] o previa a la técnica de extracción [4,6,11,12,16]. Los reactivos derivatizantes más comúnmente utilizados son la 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DNPH) [1,12,13,18,19] y el clorhidrato de *o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)-hidroxilamina (PFBHA) [14,16,17]. Además de estos, que son los agentes derivatizantes más utilizados, se han probado también la 1,3-ciclohexanodiona (CHD) [6], la 2,4,6-triclorofenilhidracina (TCPH) [23], los haluros de 4-(2-(trimetilamonio) etoxi) bencenaminio (4-APC) [2,4] y el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) [11].

La etapa de preparación de muestra es, en muchas ocasiones, la más delicada y la que más tiempo requiere del proceso analítico. Por lo que,

siempre que sea posible, esta etapa deberá ser reducida o incluso evitada [24,25]. El uso de la técnica de espacio de cabeza (HS) representa una buena opción para minimizar el tratamiento de la muestra [26]. La facilidad de preparación de muestra, la automatización, la velocidad y la ausencia de interferencias de compuestos no volátiles de la matriz hacen que sea una técnica frecuentemente utilizada para el análisis de muestras complejas [27]. En el caso de muestras biológicas, esta técnica ha sido utilizada previamente para la determinación de ácidos haloacéticos [28] y trihalometanos [29] en orina. En esta misma matriz, se ha propuesto la determinación de compuestos orgánicos volátiles mediante espacio de cabeza acoplado a un sistema de inyección que permite el control de temperatura y la inyección de la muestra en frío [30]. En cuanto a la determinación de aldehídos, se han propuesto metodologías que incluyen el muestreo mediante espacio de cabeza para la determinación de estos compuestos en matrices ambientales [31], fármacos [32] y alimentos [33-36].

2. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es el desarrollo de un nuevo método, en gran parte automatizado, para la determinación de aldehídos en muestras de orina. La estrategia se basa en la separación de los aldehídos volátiles por medio de la técnica de espacio de cabeza que se acopla a un inyector de temperatura programada para introducir una porción del espacio de cabeza generado en un cromatógrafo de gases con detección mediante espectrometría de masas. Además, esta estrategia no requiere derivatización de los compuestos estudiados por lo que es más rápida y simple que otras metodologías propuestas para el estudio de estos mismos analitos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiales, disoluciones estándar y muestras

Los aldehídos empleados en el estudio (pentanal, hexanal, heptanal, octanal y benzaldehído) así como los reactivos para las medidas de creatinina (patrón de creatinina y ácido pícrico) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El metanol (pureza ≥ 99.9 %) fue proporcionado por Merk (Darmstadt, Alemania). El cloruro sódico, el hidróxido sódico y el ácido fosfórico (85 %) fueron suministrados por Scharlau (Barcelona, España).

A partir de cada uno de los aldehídos comerciales se prepararon disoluciones madre de 2500 mg L^{-1} de cada uno de ellos en metanol y se conservaron a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Estas disoluciones se utilizaron para dopar las muestras de agua y orina a las distintas concentraciones utilizadas en las etapas del estudio.

La optimización del método se llevó a cabo con agua ultrapura (UHQ) y muestras de orina a concentraciones entre 80 y $1000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. El agua UHQ se obtuvo por medio de un sistema de purificación Wasserlab Ultramatic (Noain, España).

3.2. Preparación de muestra

Las muestras para el análisis se prepararon en un vial de 10 mL . En primer lugar, se añadieron 2 g de sal (NaCl) y después 1 mL de orina seguido de 3 mL de agua ultrapura. El vial se cerró herméticamente y se colocó en la bandeja del muestreador.

3.3. Medida de la creatinina

La orina es una matriz muy variable. No solo varía diariamente su composición dependiendo de la dieta, sino que, además, también la concentración de los compuestos endógenos varía debido a la irregularidad del volumen de orina excretado en cada micción. Es por ello que, si se quiere realizar un muestreo puntual de orina en lugar de prolongadas colecciones de orina a lo largo de 24 horas, se necesita un método de normalización. El método más utilizado es la normalización de las concentraciones de los analitos a la concentración de creatinina (mmol).

Para llevar a cabo estas medidas, se utilizó una modificación del método Jaffé [37,38]. Este método se basa en la detección de un complejo rojizo resultante de la reacción entre la creatinina y el ácido pícrico y en la medida de su absorbancia. Estas medidas se llevaron a cabo con un espectrofotómetro ultravioleta-visible Shimadzu UV/Vis-160 (Kioto, Japón). Se utilizó una celda de cuarzo (Suprasil) de 10 mm de paso óptico.

Los valores normalizados se expresaron como nmol de aldehído/mmol de creatinina.

3.4. Instrumentación HS-PTV-GC-MS

3.4.1. Generador de espacio de cabeza

El muestreo mediante espacio de cabeza se llevó a cabo con un automuestreador PAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Suiza). Este muestreador está equipado con una bandeja para 32 muestras

consecutivas y con un horno con 6 posiciones para viales de muestra. Para la generación del espacio de cabeza el horno se mantuvo a una temperatura de 84 °C durante 10 min agitando la muestra a 750 rpm. La inyección del espacio de cabeza se realizó con una jeringa a 120 °C que permite tomar un volumen máximo de 2.5 mL, siendo este el volumen seleccionado en este trabajo. Las velocidades de llenado y de inyección se fijaron en 100 y 250 $\mu\text{L s}^{-1}$, respectivamente. Tras la inyección, la jeringa se limpia durante 2 minutos con un flujo de He N50 (99.999 %, Air Liquide). El tiempo entre dos inyecciones consecutivas se fijó en 14 min.

3.4.2. Inyector de temperatura programada

Todas las pruebas se llevaron a cabo utilizando un inyector de temperatura programada (PTV) CIS-4 de Gerstel (Baltimore, MD, USA) con un *liner* también de Gerstel para este tipo de inyector de dimensiones 71 mm x 2 mm y relleno con un material adsorbente (Tenax-TA®). En el método optimizado, se seleccionó el método de inyección *solvent vent*. El enfriamiento se consigue mediante CO₂ líquido.

La temperatura inicial del inyector se fijó en 50 °C. El flujo se ajustó a 20 mL min⁻¹ y la presión de venteo a 5.00 psi. Estas condiciones se mantienen durante 0.5 min, tiempo durante el cual se produce la purga de disolvente. El *liner* se mantiene a la temperatura inicial durante 0.55 min como mecanismo de seguridad que evita que comience la rampa de calentamiento antes de que la válvula de *split* se haya cerrado. Cuando el tiempo de venteo o purga de disolvente ha finalizado, la válvula de *split* se cierra y el *liner* del PTV se calienta rápidamente a 12 °C s⁻¹ hasta 250 °C. Los analitos, entonces, son transferidos desde el *liner* hasta la

columna capilar durante 1 min. Una vez pasado este tiempo, la válvula de *split* vuelve a abrirse y el *liner* se mantiene a 250 °C durante 2 min, para asegurar que éste quede limpio para una nueva inyección.

3.4.3. Cromatógrafo de gases

El cromatógrafo de gases utilizado es un modelo Agilent Technologies 6890 GC equipado con una columna capilar de baja polaridad DB-VRX de dimensiones 20 m x 0.18 mm x 1 µm y cuyo rango de temperaturas permitidas es de -10 °C a 260 °C de J&W Scientific Agilent (Folsom, CA, USA). El gas portador utilizado fue helio N50 de pureza 99.999 % (Air Liquide) y el flujo en columna se fijó en 1.8 mL min⁻¹.

El programa de temperaturas seleccionado en el horno del cromatógrafo comenzaba con una temperatura inicial de 45 °C que se mantuvo durante 2.00 min, transcurridos estos dos minutos, se programó una rampa de 60 °C min⁻¹ hasta 175 °C y a continuación una nueva rampa a 45 °C min⁻¹ hasta 240 °C, temperatura que se mantuvo durante 0.5 min. Las rampas seleccionadas son las máximas permitidas por el cromatógrafo empleado. El tiempo total del cromatograma fue de 6.11 min.

3.4.4. Espectrómetro de masas

El detector utilizado en esta configuración fue un espectrómetro de masas cuadrupolar (HP 5973 N) que opera en modo de ionización electrónica utilizando un voltaje de ionización de 70 eV. Las temperaturas que se fijaron para la fuente de ionización y el cuadrupolo fueron 230 y 150 °C, respectivamente. El filamento se mantuvo apagado durante los 2 primeros minutos del análisis cromatográfico (*solvent*

delay). La adquisición de datos se realizó en el modo SIM/*scan* combinado que permite el registro de datos SIM (seguimiento de iones seleccionados) y *scan* en un mismo análisis. En el modo de adquisición *scan* se registraron las relaciones m/z (masa/carga) comprendidas entre 25 y 160, la velocidad de barrido fue de 23.58 ciclos s⁻¹ y se seleccionó un umbral de abundancia de 0. La identificación de los compuestos objeto de estudio se realizó mediante comparación con los espectros experimentales de estos compuestos de la base de datos NIST'98 (NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library, versión 1.6).

La cuantificación se realizó en modo SIM seleccionando cuatro ventanas, en cada una de las cuales se miden las relaciones m/z más abundantes para cada uno de los compuestos. En la primera (2.80 – 3.40 min) se midieron las relaciones m/z para el pentanal (29, 44 y 58); en la segunda (3.40 – 3.80 min) las relaciones m/z para el hexanal (41, 44 y 56); en la tercera (3.80 – 4.10 min) las relaciones m/z del heptanal (43, 44 y 70) y en la cuarta (4.10 – 6.11 min) las de los compuestos benzaldehído y octanal (44, 77, 84, 105 y 106). En todos los casos se seleccionó un tiempo de residencia (*dwell time*) de 10 ms.

En la tabla 1 se muestran los iones de cuantificación y confirmación para cada compuesto en particular, así como sus tiempos de retención.

Tabla 1: Iones de cuantificación y confirmación para los cinco aldehídos y sus tiempos de retención

Compuestos	Iones SIM (m/z)*	t _R (min)
Pentanal	44 , 58, 29	3.112
Hexanal	44 , 56, 41	3.605
Heptanal	44 , 70, 43	4.011
Benzaldehído	106 , 77, 105	4.295
Octanal	44 , 84	4.365

*El ion de cuantificación aparece en negrita

3.4.5. Análisis de datos

La recogida de los datos cromatográficos se realizó con el software Enhanced ChemStation [39], G1701EA versión E.00.00.202 de Agilent Technologies.

3.4.6. Método optimizado HS-PTV-GC-MS

Las condiciones óptimas de todos los módulos que componen la configuración instrumental utilizada en este trabajo se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Condiciones experimentales del método optimizado

GENERADOR DE ESPACIO DE CABEZA		
Volumen de muestra	1 mL de orina + 3 mL de agua UHQ	
Cantidad de sal (NaCl)	2 g	
Temperatura del horno	84 °C	
Tiempo de generación del espacio de cabeza	10 min	
Velocidad de agitación	750 rpm	
Tiempo entre muestras	14 min	
INYECTOR DE TEMPERATURA PROGRAMADA		
<i>Liner</i>	<i>Liner</i> relleno de Tenax-TA®	
	Flujo de purga	20 mL min ⁻¹
	Tiempo de purga	0.50 min
Modo de inyección:	Tiempo de inyección	1 min
<i>Solvent Vent</i>	Flujo de limpieza	100 mL min ⁻¹
	Temperatura	50 °C
	Rampa	12 °C s ⁻¹ hasta 250 °C
CROMATÓGRAFO DE GASES		
Columna	Columna capilar DB-VRX (baja polaridad)	
	Temperatura inicial	45 °C (2 min)
Horno	Rampa 1	60 °C min ⁻¹ hasta 175 °C
	Rampa 2	45 °C min ⁻¹ hasta 240 °C (0.5 min)
ESPECTRÓMETRO DE MASAS		
Modo de adquisición de datos	SIM/ <i>scan</i> combinado	
Relaciones m/z (<i>scan</i>)	25 - 160 (N=0)	
Tiempo de permanencia (SIM)	10 ms	
<i>Solvent delay</i>	2.00 min	

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Variables que afectan a la generación de espacio de cabeza

Para la elección de las condiciones óptimas para la generación del espacio de cabeza, las variables que se estudiaron fueron las siguientes: fuerza iónica, pH, volumen de muestra y tiempo y temperatura de equilibrado.

4.1.1. Fuerza iónica

Se estudió la variación del coeficiente de actividad (γ_i) modificando la matriz de la muestra. En el caso de muestras acuosas y analitos polares, este efecto se consigue mediante la adición de un electrolito al medio; a este proceso se le conoce como *salting-out*.

Para estudiar este efecto se prepararon tres muestras tomando 3 mL de orina dopada con los compuestos a niveles de concentración entre 200 y 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (hexanal, heptanal y octanal a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, pentanal a 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ y benzaldehído a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$). A una de las muestras no se le añade sal mientras que a las otras dos se le añaden 0.3 y 1.5 g de NaCl, respectivamente. Este tercer nivel corresponde a una situación de sobresaturación de la disolución. En la figura 1 se muestra la variación de la señal analítica con la concentración de sal.

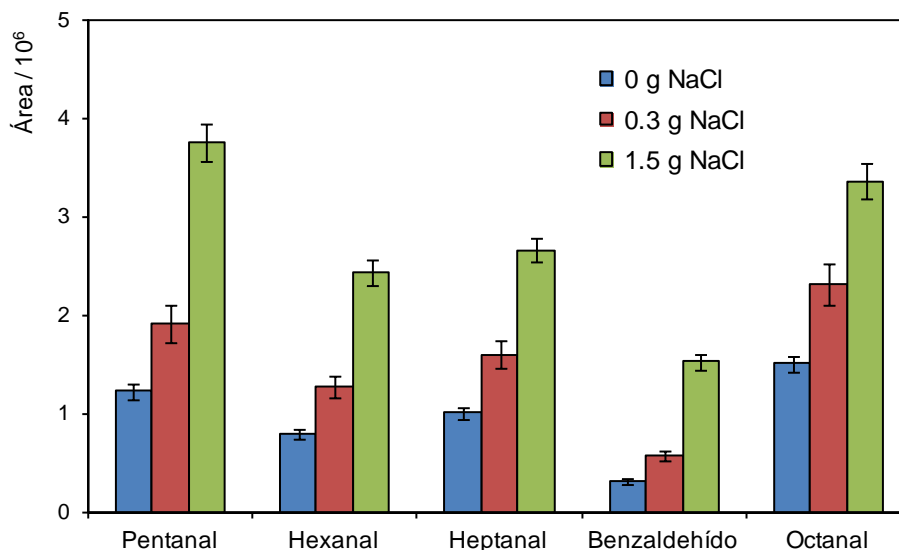


Figura 1: Señales obtenidas para los cinco aldehídos para diferentes cantidades de sal añadida a la muestra

El aumento de señal observado en condiciones de sobresaturación es especialmente importante en el caso del benzaldehído, siendo además este compuesto el que presenta una menor sensibilidad.

4.1.2. pH

Para el estudio de la influencia del pH se prepararon muestras de 3 mL de orina dopada con los cinco compuestos (en las mismas concentraciones que en la experiencia anterior) a pH básico (10 μ L de NaOH 1M), fisiológico y ácido (10 μ L de H₃PO₄).

No se encontraron grandes diferencias entre los tres valores estudiados (figura 2) coincidiendo, en cualquier caso, las mayores señales con el pH fisiológico, por lo que se decidió seguir trabajando a este pH.

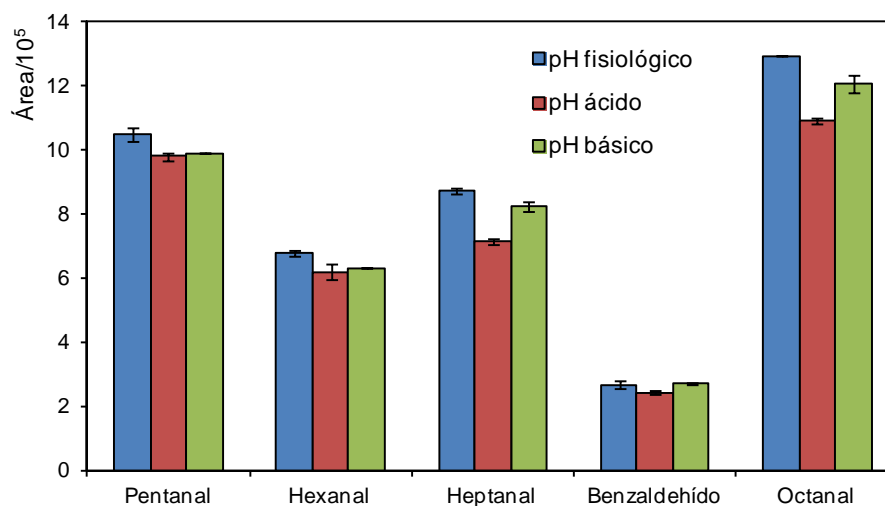


Figura 2: Señales obtenidas para los cinco aldehídos para los diferentes pH estudiados

4.1.3. Volumen de muestra y tiempo y temperatura de equilibrado

Las variables volumen de muestra y tiempo y temperatura de equilibrado se estudiaron mediante un diseño experimental multivariante. La elección de los valores óptimos de estas variables se llevó a cabo mediante este tipo de estudio debido a las interacciones que existen entre ellas. La temperatura afecta al equilibrio y, por lo tanto, al tiempo que tarda éste en alcanzarse. Además, el tiempo en el que se consigue podría estar condicionado por el volumen de muestra.

Para estudiar el efecto de cada una de las variables individualmente, así como los efectos de su interacción en la señal analítica, se realizó un diseño experimental de tipo Box-Behnken. Este diseño permite la generación de superficies de respuesta mediante el uso de tres niveles de cada una de las variables estudiadas.

En todos los casos se utilizaron muestras de UHQ dopadas con los analitos en concentraciones que se encuentran entre $80 \mu\text{g L}^{-1}$ (octanal) y 1 mg L^{-1} (benzaldehído). Los valores escogidos para las diferentes variables del diseño fueron: temperatura (A), 70, 80 y $90 \text{ }^\circ\text{C}$; tiempo (B), 10, 20 y 30 min y volumen (C), 1, 2.5 y 4 mL. Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado para detectar posibles fallos de ajuste en los modelos generados. En todos los experimentos se tomó la precaución de mantener un nivel de sobresaturación de sales y se añadieron cantidades proporcionales de sal a los diferentes volúmenes estudiados. El número de experimentos necesarios para realizar el estudio fue de 39, realizándose de manera aleatoria según una plantilla generada por el programa UnscramblerX® [40].

La respuesta o variable dependiente escogida fue el área correspondiente al pico base del espectro de cada uno de los compuestos analizados. El único modelo que no mostraba fallo de ajuste era el que incluía las variables, sus cuadrados y las interacciones entre ellas.

Como se puede observar en la tabla 3 el volumen de muestra es una variable significativa (a un nivel de significación de 5 %) para todos los compuestos mientras que la temperatura es significativa para el pentanal y el benzaldehído. En cuanto a las interacciones y los términos cuadráticos son significativas la interacción entre la temperatura y el volumen de muestra (AC) para el pentanal, el hexanal y el benzaldehído, el cuadrado de la temperatura (AA) para el pentanal, el hexanal y el heptanal y el del volumen de muestra (CC) para el hexanal, el heptanal y el octanal. Ni el tiempo de equilibrado ni su término cuadrático resultaron significativos para ninguno de los compuestos.

Tabla 3: Resultados del diseño experimental (*p*-valores). A, temperatura; B, tiempo de equilibrado y C, volumen de muestra. Los *p*-valores ≤ 0.05 se resaltan en negrita.

Analito	A	B	C	AB	AC	BC	AA	BB	CC
Pent	0.0001	0.6633	0.0000	1.0000	0.0000	0.3869	0.0000	0.1417	0.9568
Hex	0.7837	0.8729	0.0000	0.7606	0.0023	0.4196	0.0003	0.1988	0.0035
Hept	0.7312	0.9574	0.0000	0.5310	0.0518	0.4752	0.0025	0.1875	0.0005
Benz	0.0000	0.5846	0.0000	0.3087	0.0072	0.4943	0.2583	0.8347	0.0982
Oct	0.3807	0.8096	0.0000	0.5080	0.3437	0.1626	0.0760	0.7797	0.0000

En la figura 3 se muestran las superficies de respuesta generadas a un volumen constante de 4 mL y valores variables de tiempo y temperatura de equilibrado.

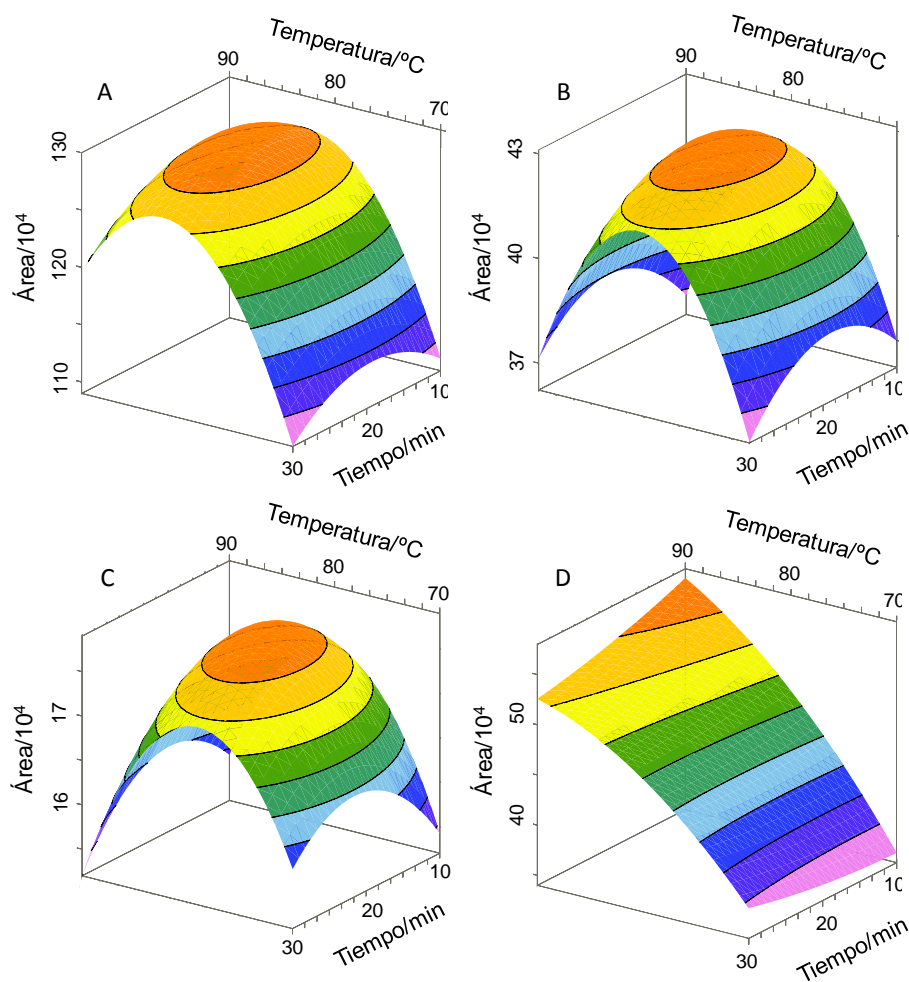


Figura 3: Superficies de respuesta generadas a un volumen constante de 4 mL y valores variables de tiempo y temperatura (A: pentanal, B: hexanal, C: heptanal y D: benzaldehído)

A la vista de los resultados obtenidos se eligió un volumen de 4 mL de muestra, un tiempo de equilibrado de 10 minutos y una temperatura de 84 °C como valor de compromiso entre los valores óptimos encontrados para cada uno de los compuestos.

4.2. Variables que afectan al sistema PTV-GC-MS

4.2.1. Condiciones del inyector de temperatura programada

El estudio de las variables que afectaban a la generación de espacio de cabeza se realizó en modo de inyección con división de muestra (*split*) 1:5 a una temperatura de 250 °C. Sin embargo, una vez que se optimizaron esas variables, se seleccionó el modo de inyección *solvent vent* en el PTV debido al aumento de sensibilidad que se consigue con este modo de inyección.

La temperatura inicial utilizada en el inyector PTV es un parámetro importante cuando se selecciona el modo de inyección *solvent vent*. Por ello, se estudiaron temperaturas iniciales entre 10 y 90 °C. Para ello, una disolución de los compuestos a concentraciones entre 80 y 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ se sometió a sucesivos análisis a las diferentes temperaturas estudiadas. En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos representando el área de pico de cada uno de los compuestos frente a las diferentes temperaturas iniciales del PTV estudiadas.

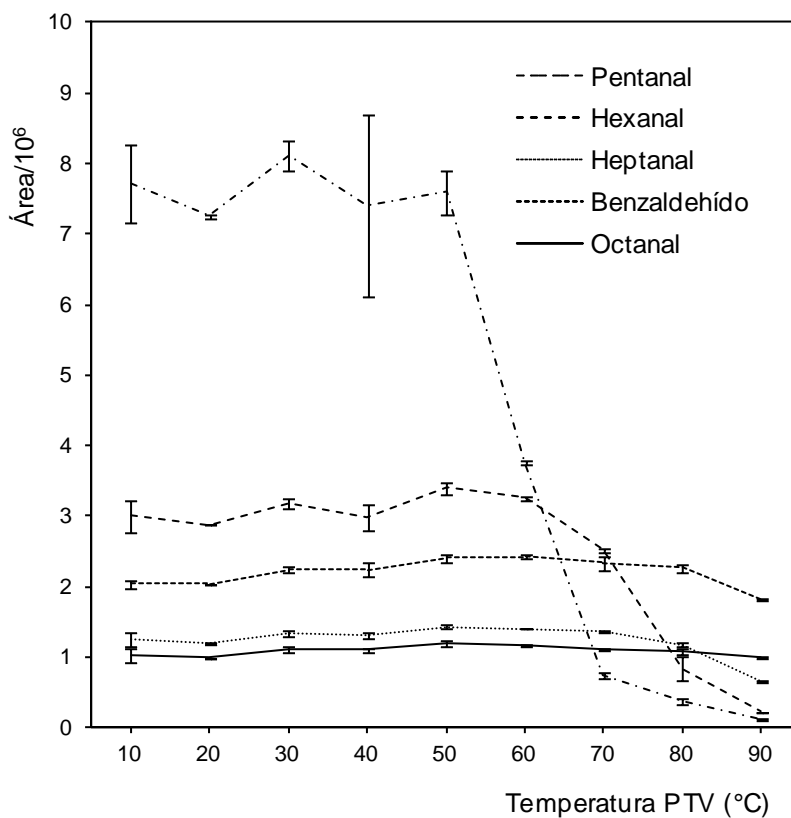


Figura 4: Variación en la señal analítica de los cinco aldehídos al fijarse diferentes temperaturas iniciales en el PTV

La temperatura inicial del inyector afecta más a los compuestos más volátiles; en este estudio, el compuesto más volátil es el pentanal. En la figura 4 se observa una disminución muy acusada de la señal de este compuesto a valores por encima de 50 °C. El hexanal presenta un comportamiento similar; sin embargo, la fuerte disminución de señal en este caso se observa a partir de los 60 °C. Para el resto de compuestos, la señal analítica no varía demasiado con la temperatura inicial seleccionada en el inyector hasta temperaturas más altas (80 °C) a partir de las cuales sí empieza a observarse la misma tendencia que para los

dos aldehídos mencionados. Se eligió una temperatura de 50 °C, con la que se obtiene una respuesta adecuada para todos los analitos, una adecuada eliminación del disolvente y valores de reproducibilidad comprendidos entre entre 1.5 % (heptanal) y 4 % (pentanal).

En la figura 5 se muestran dos cromatogramas de una misma disolución de los analitos de estudio con el modo de inyección de división de muestra (*split*) 1:5 a 250 °C con el que se llevaron a cabo las optimizaciones del generador de espacio de cabeza y otro con el modo de inyección *solvent vent* en el que se ha optimizado la temperatura inicial (50 °C). La comparación pone de manifiesto el aumento de sensibilidad que se obtiene mediante el uso de este modo de inyección (*solvent vent*).

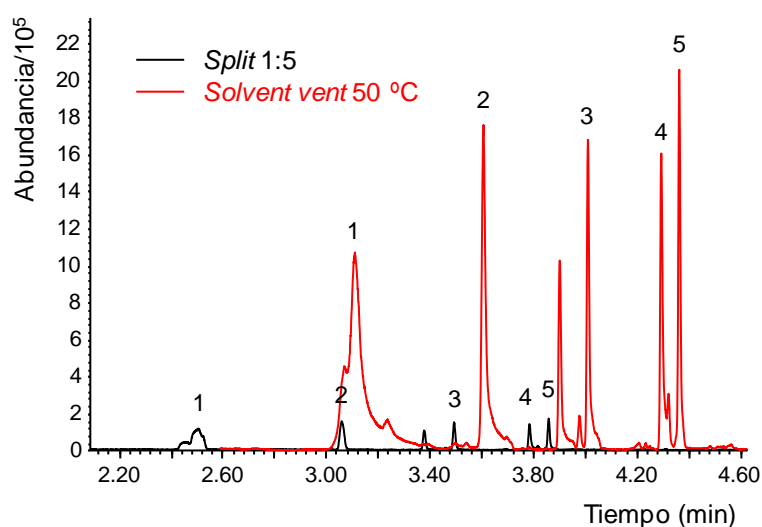


Figura 5: Cromatogramas en scan obtenidos para una misma disolución en los modos de inyección *split* (relación de división 1:5 a 250 °C) y *solvent vent* (temperatura inicial, 50 °C)

Se realizó el estudio del flujo de venteo para valores entre 10 y 70 mL min⁻¹. No se observaron grandes diferencias en la señal analítica de los

compuestos salvo en el caso del pentanal donde sí se observó una importante disminución de la señal a valores de este parámetro por encima de 30 mL min⁻¹. Como ocurría con la temperatura inicial del inyector, los parámetros que afectan al venteo del disolvente, afectan en mayor medida a los compuestos más volátiles. Se eligió un flujo de venteo de 20 mL min⁻¹ ya que la señal obtenida con este valor es muy similar a la obtenida con 10 mL min⁻¹ y asegura mejor la eliminación del disolvente.

Para estudiar el tiempo de venteo, se realizaron pruebas a 0.25, 0.5 y 0.75 min. No se observaron diferencias significativas en la señal analítica de ninguno de los compuestos analizados, por lo que se fijó un tiempo intermedio que no fuese demasiado corto para asegurar, en cualquier caso, una eficaz eliminación del disolvente en la etapa de venteo.

En cuanto al tiempo de inyección, valores entre 1 y 1.5 min apenas modificaban la señal analítica obtenida. Sin embargo, especialmente para los tres analitos con menor tiempo de retención, un aumento de tiempo de inyección hasta 2 min sí generaba una importante disminución de la señal. Además, la definición de la línea base era mejor cuanto menor era el tiempo de inyección, por lo que se seleccionó 1 minuto como tiempo de inyección.

4.2.2. Condiciones del horno cromatográfico

La optimización de variables del PTV se llevó a cabo con un programa de temperaturas que empezaba a 45 °C, temperatura a la que se mantenía durante 2 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se aumentaba la temperatura en el horno a una velocidad de 60 °C min⁻¹ hasta 175 °C y a partir de esa temperatura continúa aumentando a una

velocidad más baja, de 45 °C min⁻¹, hasta 240 °C, temperatura que se mantenía durante 5 min. Estas rampas son las máximas permitidas por el cromatógrafo de gases.

A partir de este programa de temperaturas, se realizaron algunos estudios para seleccionar las condiciones más favorables.

Se estudiaron tres temperaturas iniciales (30, 40 y 45 °C). A medida que disminuye la temperatura inicial, la altura de pico de los compuestos más volátiles (pentanal y hexanal) aumenta. Sin embargo, al integrar las señales de esos picos, no se encontraron diferencias significativas, por lo que se mantuvo finalmente una temperatura inicial de 45 °C. Seleccionar cualquiera de las otras dos temperaturas alargaría el tiempo total de análisis ya que se emplea mucho tiempo en enfriar hasta temperaturas más bajas el horno del cromatógrafo preparándolo para un nuevo análisis.

Estas pruebas se realizaron manteniendo la temperatura inicial del horno durante 2 min. Se observó que la disminución de este tiempo hasta 1.5 min empeoraba la morfología y disminuía la altura de todos los picos cromatográficos de los compuestos estudiados excepto del primero de ellos, por lo que se mantuvo este tiempo en 2 min.

4.2.3. Condiciones del espectrómetro de masas

Durante la fase de optimización del resto de variables, el modo de adquisición de datos en el detector fue *scan*. Sin embargo, una vez que se escogieron el resto de condiciones de análisis, se seleccionó el modo de adquisición de datos SIM/*scan* combinado que permite la recogida de datos SIM (seguimiento de iones seleccionados) y *scan* en un mismo

análisis.

El cromatograma SIM se utiliza para la cuantificación de los analitos en las muestras y el cromatograma en *scan* permite su identificación y la de otros compuestos que aparezcan en las muestras de estudio.

En el modo de adquisición de datos SIM, es necesaria la optimización del tiempo de permanencia o *dwell time* para cada ion seleccionado.

Se probaron diferentes tiempos de permanencia (1, 10, 30, 50, 70 y 100 ms). Con tiempos de permanencia altos (70 y 100 ms) la definición de los picos era muy pobre y, por el contrario, cuando se seleccionaba un tiempo de 1 ms, los picos aparecían mucho mejor definidos pero el ruido aumentaba significativamente. La mejor relación entre definición de pico y señal del ruido se obtuvo para un tiempo de permanencia de 10 ms que se seleccionó como óptimo.

4.3. Señales obtenidas con las condiciones óptimas de HS-PTV-GC-MS

La figura 6 muestra los cromatogramas obtenidos para un blanco y para una muestra de orina con las condiciones optimizadas de HS-PTV-GC-MS.

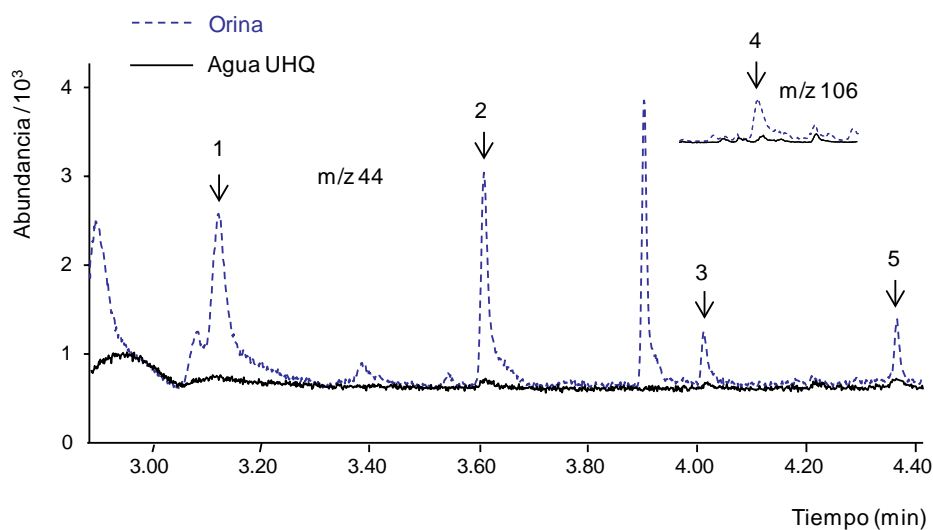


Figura 6: Cromatogramas de una muestra de agua ultrapura y una muestra de orina en la que los picos numerados corresponden a pentanal (1), hexanal (2), heptanal (3), benzaldehído (4) y octanal (5)

4.4. Efecto de matriz

Para estudiar la posible existencia de efecto de matriz e investigar la aplicabilidad del método al análisis de muestras de orina, se compararon las señales obtenidas para una muestra de agua y muestras de orina de 7 individuos diferentes. Las muestras se doparon con los cinco aldehídos a concentraciones entre $80 \mu\text{g L}^{-1}$ (octanal) y 1mg L^{-1} (benzaldehído). Se observaron diferencias significativas entre las muestras de orina (figura 7A) y entre las orinas y el blanco.

Con el fin de solucionar este problema, se estudió la posibilidad de diluir las muestras de orina con agua UHQ. El factor de dilución seleccionado fue 1:4 (1 mL de orina + 3 mL de agua ultrapura). Tras la dilución, se consiguió eliminar el efecto de matriz que existía tanto entre orinas (figura 7B) como entre la orina y el agua (figura 7C). En las figuras 7A y 7B se muestran las señales analíticas obtenidas para uno de

los compuestos (hexanal), representativo del comportamiento del resto de compuestos del estudio, en las siete muestras de orina dopadas a la misma concentración ($200 \mu\text{g L}^{-1}$). Las señales de la figura 7A corresponden a las muestras de orina sin diluir y las señales de la figura 7B a las de la orina diluida 1:4 (1 mL de orina + 3 mL de agua UHQ).

La figura 7C recoge las señales analíticas de una orina diluida y una muestra de agua dopadas ambas con todos los compuestos, observándose que la dilución de la matriz consigue eliminar también el efecto de matriz entre la orina y el agua.

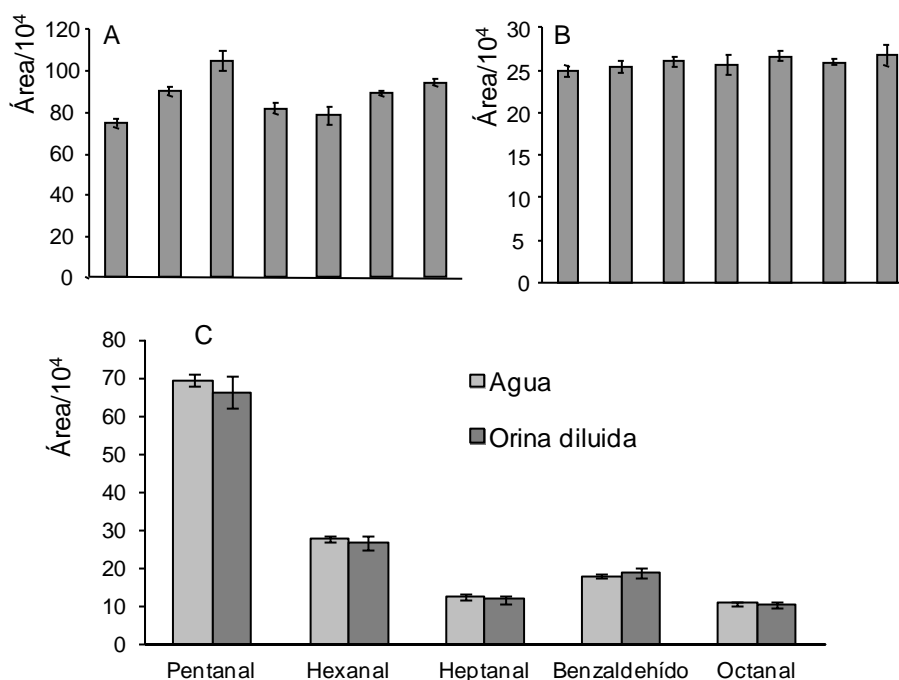


Figura 7: A y B muestran las señales analíticas obtenidas para el hexanal en 7 muestras de orina diferentes dopadas a la misma concentración para orinas sin diluir y orinas diluidas (1:4), respectivamente. La gráfica C representa la señal analítica de todos los compuestos estudiados para una muestra de agua y una muestra de orina diluida dopadas ambas con los cinco aldehídos.

La resolución del efecto de matriz mediante la dilución permite proponer una metodología de análisis de rutina mediante un proceso de calibración externa con patrones acuosos. La disminución de la señal de los compuestos debida a la dilución de la muestra queda ampliamente compensada por la posibilidad de utilizar este tipo de calibración.

4.5. Efecto de memoria

Con el fin de estudiar la posible existencia de efecto de memoria, se realizó una media de la señal de los compuestos objeto de estudio que se obtenía en el análisis de una muestra de aire tras la inyección de una disolución de los aldehídos a una concentración de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada uno de ellos. Se calculó el porcentaje de la señal de cada compuesto en el aire sobre la señal de la muestra que le precedía. Los valores obtenidos se encontraban, en todos los casos, por debajo del 1 %. Estos valores se consideran aceptables.

4.6. Evaluación del método analítico optimizado

Las curvas de calibrado se obtuvieron con disoluciones acuosas de los compuestos a diez niveles de concentración que se encontraban entre 0.1 y $10 \mu\text{g L}^{-1}$; cada nivel se analizó por triplicado.

Cada una de las disoluciones anteriores se sometió al proceso optimizado de HS-PTV-GC-MS. Como señal analítica se utilizó el área de pico cromatográfico de cada uno de los compuestos analizados.

Las características analíticas del método optimizado se muestran en la tabla 4.

La validez de los modelos lineales construidos se comprobó por

medio del análisis de la varianza y se observó que ninguno de ellos mostraba fallo de ajuste. El valor del coeficiente de determinación (R^2) resultó, en todos los casos, mayor de 0.98 (tabla 4).

Los estudios de la repetibilidad y reproducibilidad se llevaron a cabo con disoluciones dopadas a una concentración de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ y analizadas en el mismo día (10 réplicas) o en días diferentes (3 réplicas por día), respectivamente. Las desviaciones estándar relativas (RSD , %) obtenidas para todos los compuestos se muestran en la tabla 4, encontrándose los valores por debajo del 12.2 % en el caso de la repetibilidad y del 17.9 % en el caso de la reproducibilidad. Estos valores pueden considerarse satisfactorios ya que incluyen las diferentes fuentes de irreproducibilidad que se produce en un proceso de análisis en el que existe un proceso de extracción de analitos al espacio de cabeza seguido de una preconcentración en el PTV mediante el modo de inyección *solvent vent* antes de llevarse a cabo la separación cromatográfica.

Los límites de detección ($LODs$) y los límites de cuantificación ($LOQs$) se muestran en la tabla 4 y se encuentran entre 0.04 y 0.08 $\mu\text{g L}^{-1}$ y entre 0.12 y 0.24 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Estos valores son similares a los obtenidos utilizando otras metodologías como son la extracción en fase sólida (SPE) o la microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía líquida [1,18]. Se obtuvieron valores ligeramente mejores mediante esta metodología propuesta cuando se comparan con los obtenidos utilizando microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía de gases [15,21] o microextracción en fase líquida mediante membrana porosa (HF-LPME) acoplada a electroforesis capilar y detección amperométrica [11].

Tabla 4: Características analíticas del método propuesto

Compuesto	R ²	RSD (%)		LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperación aparente ($(5 \mu\text{g L}^{-1}, \%)$) (RSD, %)					Recuperación absoluta ($1 \mu\text{g L}^{-1}, \%$)
		Intra-día	Inter-día			Orina					
		n = 10 $1 \mu\text{g L}^{-1}$	n = 3 $1 \mu\text{g L}^{-1}$			1	2	3	4	5	
Pentanal	0.9990	6.3	13.8	0.04	0.12	100(8)	94(8)	102(8)	96(8)	104(6)	37
Hexanal	0.9980	12.2	8.0	0.06	0.18	100(8)	94(8)	102(8)	94(8)	102(8)	57
Heptanal	0.9800	10.4	17.9	0.04	0.12	110(10)	100(10)	104(8)	104(8)	112(9)	45
Benzaldehído	0.9952	11.7	14.1	0.08	0.24	100(10)	96(8)	86(12)	88(12)	92(8)	11
Octanal	0.9984	10.1	6.1	0.07	0.21	116(8)	120(8)	110(8)	110(8)	114(8)	74

Las recuperaciones del método se evaluaron mediante el cálculo de las recuperaciones aparentes para cada uno de los compuestos objeto de estudio. Cinco muestras de orina (de individuos diferentes) se doparon a una concentración de $5 \mu\text{g L}^{-1}$. Las recuperaciones aparentes se calcularon como la relación de la concentración medida y la concentración dopada. Los valores expresados en porcentaje para las recuperaciones aparentes se muestran en la tabla 4 y se encuentran entre el 86 y el 120 %.

Las recuperaciones absolutas se calcularon comparando las áreas de pico de los compuestos extraídos de una muestra de orina dopada ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) con las de una disolución de los analitos en metanol inyectada directamente en el sistema. En ambos casos, la cantidad de analitos inyectada en el cromatógrafo de gases fue la misma. Los valores obtenidos se encontraban entre el 11 y 74 %. Los valores correspondientes a cada uno de los cinco compuestos se detallan en la tabla 4. Estos valores son bajos excepto en el caso del octanal, demostrando que la extracción al espacio de cabeza no es cuantitativa. Sin embargo, esta es constante a lo largo de todo el rango lineal y los límites de detección y de cuantificación del método fueron satisfactorios.

4.7. Aplicación del método a muestras de orina

El método desarrollado se aplicó al análisis de 17 muestras de orina de individuos sanos con la finalidad de cuantificar en ellas los cinco aldehídos estudiados y estimar a partir de estos resultados las concentraciones de estos compuestos endógenos en muestras de orina.

Se eligieron donantes de muestra voluntarios de ambos sexos y con edades comprendidas entre los 23 y los 60 años, de los cuales 7 eran

fumadores. La tabla 5 muestra los resultados obtenidos (las concentraciones de los aldehídos se expresan normalizadas a la concentración de creatinina como nmol de analito/mmol de creatinina), distinguiéndose entre sujetos fumadores y no fumadores. El humo de los cigarrillos ha sido considerado como un carcinógeno exógeno que promueve la presencia de especies con oxígeno reactivo en el organismo [41]. Estas especies se generan cuando la corriente de humo del cigarro interacciona con los fluidos fisiológicos.

Tabla 5: Concentraciones normalizadas (nmol analito/mmol creatinina) para los compuestos objeto de estudio en muestras de orina (n=3)

	Individuo	Pentanal	Hexanal	Heptanal	Benzaldehído	Octanal
No fumadores	1	1.7 ± 0.2	1.9 ± 0.3	0.4 ± 0.1	2.3 ± 0.4	0.20 ± 0.03
	2	1.4 ± 0.1	3.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.20 ± 0.01
	3	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.10 ± 0.02
	4	1.6 ± 0.1	2.9 ± 0.2	0.6 ± 0.1	1.5 ± 0.2	0.20 ± 0.02
	5	1.8 ± 0.1	3.9 ± 0.2	0.3 ± 0.1	7.5 ± 0.4	0.20 ± 0.02
	6	1.4 ± 0.1	2.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.10 ± 0.02
	7	1.8 ± 0.3	1.6 ± 0.5	0.4 ± 0.2	1.7 ± 0.6	0.10 ± 0.05
	8	2.1 ± 0.1	3.3 ± 0.2	0.6 ± 0.1	5.6 ± 0.3	0.30 ± 0.02
	9	1.0 ± 0.1	2.0 ± 0.2	0.6 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.10 ± 0.02
	10	2.2 ± 0.2	1.5 ± 0.4	0.6 ± 0.2	2.6 ± 0.6	0.30 ± 0.05
	Intervalo	0.6-2.2	0.9-3.9	0.3-0.6	0.6-7.5	0.1-0.3
Fumadores	11	4.1 ± 0.2	4.5 ± 0.3	0.9 ± 0.1	5.8 ± 0.4	0.30 ± 0.03
	12	0.8 ± 0.1	2.0 ± 0.2	0.3 ± 0.1	1.5 ± 0.2	0.20 ± 0.02
	13	1.4 ± 0.2	1.6 ± 0.3	0.3 ± 0.1	1.1 ± 0.4	0.10 ± 0.03
	14	2.7 ± 0.1	4.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1	2.0 ± 0.2	0.20 ± 0.02
	15	0.8 ± 0.1	2.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1	1.4 ± 0.2	0.20 ± 0.02
	16	0.9 ± 0.1	6.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1	1.5 ± 0.1	0.10 ± 0.01
	17	2.1 ± 0.2	1.8 ± 0.3	0.3 ± 0.1	1.1 ± 0.3	0.20 ± 0.02
	Intervalo	0.8-4.1	1.6-6.2	0.2-0.9	1.1-5.8	0.1-0.3

Las diferencias en las señales normalizadas de los aldehídos estudiados entre fumadores y no fumadores no fueron significativas como se puede observar en los gráficos que se presentan en la figura 8.

Sin embargo, la variación encontrada en las concentraciones de los compuestos pentanal, hexanal y heptanal es mayor en el caso del grupo de individuos fumadores que en el caso de individuos no fumadores a pesar de no resultar significativamente diferentes. La variación en las concentraciones de benzaldehído y octanal, sin embargo, es similar en ambos grupos.

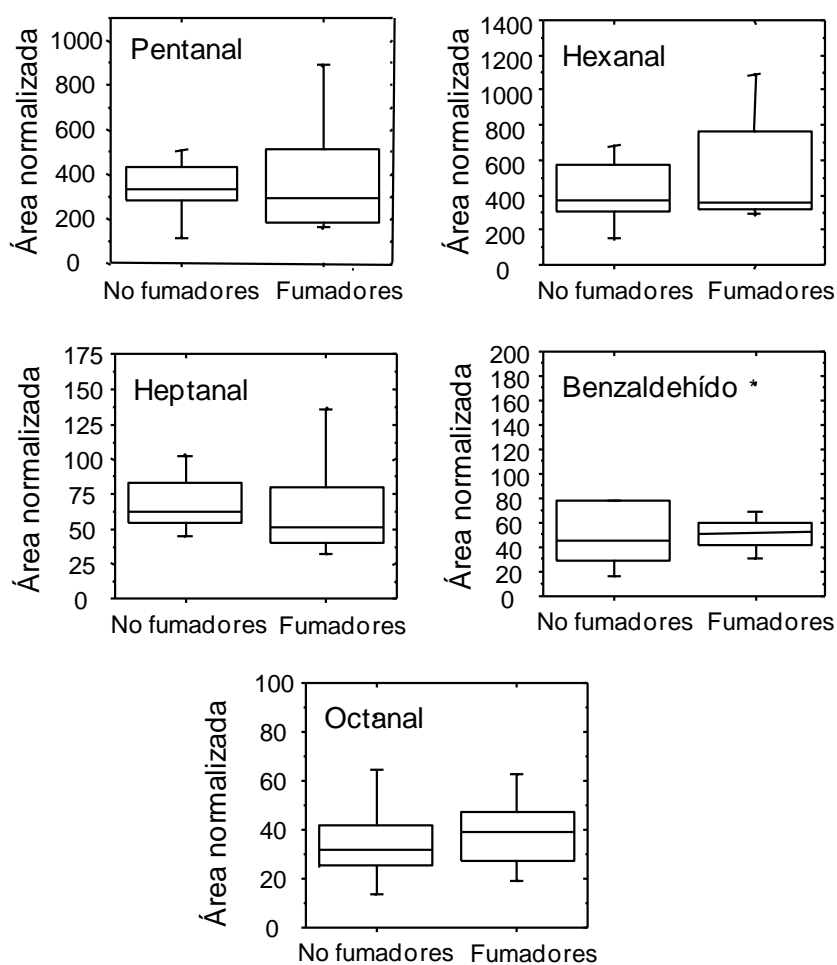


Figura 8: Gráficos box plot para representar las señales de los cinco analitos encontrados en muestras de orina de individuos sanos, distinguiendo fumadores y no fumadores.

5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se ha desarrollado un procedimiento simplificado y rápido para la determinación de cinco aldehídos en orina basado en el acoplamiento de un generador de espacio de cabeza con un cromatógrafo de gases que dispone de un sistema de detección mediante espectrometría de masas y un inyector de temperatura programada. Esta configuración instrumental minimiza la manipulación de muestra necesaria y, por lo tanto, reduce los errores asociados a esta etapa del proceso analítico. Además, con la metodología propuesta, no se requiere llevar a cabo la derivatización de los aldehídos, comúnmente utilizada en el análisis de estos compuestos.

El método desarrollado permite la cuantificación de cinco aldehídos en muestras de orina por medio de calibración externa. Las características analíticas del mismo muestran ausencia de fallo de ajuste, valores adecuados de reproducibilidad y repetibilidad y límites de detección entre 0.04 y 0.08 $\mu\text{g L}^{-1}$. Estos valores se encuentran entre los más bajos encontrados en bibliografía, donde se proponen técnicas como la microextracción en fase sólida acoplada tanto a cromatografía líquida como de gases para la determinación de estos mismos compuestos en muestras de orina.

Por último, en este estudio no se han encontrado diferencias significativas entre las concentraciones de los aldehídos estudiados de muestras de fumadores y no fumadores.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] C.E. Baños, M. Silva, Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of low-molecular mass aldehydes in human urine, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 653–658.
- [2] M. Eggink, M. Wijtmans, R. Ekkebus, H. Lingeman, I.J.P.D. Esch, J. Kool, W.M.A. Niessen, H. Irth, Development of a selective ESI-MS derivatization reagent: synthesis and optimization for the analysis of aldehydes in biological mixtures, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9042–9051.
- [3] S. Meinardi, K. Jin, B. Barletta, D.R. Blake, N.D. Vaziri, Exhaled breath and fecal volatile organic biomarkers of chronic kidney disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1830 (2013) 2531–2537.
- [4] M. Eggink, S. Charret, M. Wijtmans, H. Lingeman, J. Kool, W.M.A. Niessen, H. Irth, Development of an on-line weak-cation exchange liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for screening aldehyde products in biological matrices, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 3937–3945.
- [5] L.L. de Zwart, J.H.N. Meerman, J.N.M. Commandeur, N.P.E. Vermeulen, Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 202–226.
- [6] I.C. O'Brien-Coker, G. Perkins, A.I. Mallet, Aldehyde analysis by high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 920–928.
- [7] H.H. Draper, A.S. Csallany, M. Hadley, Urinary aldehydes as

indicators of lipid peroxidation in vivo, *Free Radic. Biol. Med.* 29 (2000) 1071–1077.

[8] M. Hakim, Y.Y. Broza, O. Barash, N. Peled, M. Phillips, A. Amann, H. Haick, Volatile organic compounds of lung cancer and possible biochemical pathways, *Chem. Rev.* 112 (2012) 5949–5966.

[9] M. Yazdanpanah, X. Luo, R. Lau, M. Greenberg, L.J. Fisher, D.C. Lehotay, Cytotoxic aldehydes as possible markers for childhood cancer, *Free Radic. Biol. Med.* 23 (1997) 870–878.

[10] S.M. Rocha, M. Caldeira, J. Carrola, M. Santos, N. Cruz, I.F. Duarte, Exploring the human urine metabolomic potentialities by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time of flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1252 (2012) 155–163.

[11] F. Chen, C. Wang, M. Zhang, X. Zhang, Y. Liu, J. Ye, Q. Chu, Sensitive determination of endogenous hexanal and heptanal in urine by hollow-fiber liquid-phase microextraction prior to capillary electrophoresis with amperometric detection, *Talanta* 119 (2014) 83–89.

[12] L. Lili, H. Xu, D. Song, Y. Cui, S. Hu, G. Zhang, Analysis of volatile aldehyde biomarkers in human blood by derivatization and dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2365–2370.

[13] H. Xu, L. Lv, S. Hu, D. Song, High-performance liquid chromatographic determination of hexanal and heptanal in human blood by ultrasound-assisted headspace liquid-phase microextraction

with in-drop derivatization, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2371–2375.

[14] C. Deng, N. Li, X. Zhang, Development of headspace solid-phase microextraction with on-fiber derivatization for determination of hexanal and heptanal in human blood, *J. Chromatogr. B* 813 (2004) 47–52.

[15] C. Deng, X. Zhang, N. Li, Investigation of volatile biomarkers in lung cancer blood using solid-phase microextraction and capillary gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 808 (2004) 269–277.

[16] N. Li, C. Deng, N. Yao, X. Shen, X. Zhang, Determination of acetone, hexanal and heptanal in blood samples by derivatization with pentafluorobenzylhydroxylamine followed by headspace single-drop microextraction and gas chromatography–mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 540 (2005) 317–323.

[17] N. Li, C. Deng, X. Yin, N. Yao, X. Shen, X. Zhang, Gas chromatography–mass spectrometric analysis of hexanal and heptanal in human blood by headspace single head space single-drop microextraction with droplet derivatization, *Anal. Biochem.* 342 (2005) 318–326.

[18] H. Xu, S. Wang, G. Zhang, S. Huang, D. Song, Y. Zhou, G. Long, A novel solid-phase microextraction method based on polymer monolith frit combining with high-performance liquid chromatography for determination of aldehydes in biological samples, *Anal. Chim. Acta* 690 (2011) 86–93.

- [19] H. Xu, Y. Wei, L. Zhu, J. Huang, Y. Li, F. Liu, S. Wang, S. Liu, Bifunctional magnetic nanoparticles for analysis of aldehyde metabolites in exhaled breath of lung cancer patients, *J. Chromatogr. A* 1324 (2014) 29–35.
- [20] A. Bajtarevic, C. Ager, M. Pienz, M. Klieber, K. Schwarz, M. Ligor, T. Ligor, W. Filipiak, H. Denz, M. Fiegl, W. Hilbe, W. Weiss, P. Lukas, H. Jamnig, M. Hackl, A. Haidenberger, B. Buszewski, W. Miekisch, J. Schubert, A. Amann, Noninvasive detection of lung cancer by analysis of exhaled breath, *BMC Cancer* 9 (2009) 348–363.
- [21] R. Guadagni, N. Miraglia, A. Simonelli, A. Silvestre, M. Lamberti, D. Feola, A. Acampora, N. Sannolo, Solid-phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry method validation for the determination of endogenous substances: urinary hexanal and heptanal as lung tumor biomarkers, *Anal. Chim. Acta* 701 (2011) 29–36.
- [22] J. Li, C. Hou, D. Huo, M. Yang, H. Fa, P. Yang, Development of a colorimetric sensor array for the discrimination of aldehydes, *Sens. Actuators B: Chem.* 196 (2014) 10–17.
- [23] C.N. Konidari, T.S. Giannopoulos, C.G. Nanos, C.D. Stalikas, Determination of plasma, urine, and bovine serum albumin low-molecular-weight carbonyl levels by capillary gas chromatography with electron-capture and mass-selective detection, *Anal. Biochem.* 338 (2005) 62–70.
- [24] A. Namera, T. Saito, Recent advances in unique simple preparation techniques for bioanalysis, *Bioanalysis* 5 (2013) 915–932.

- [25] P.L. Kole, G. Venkatesh, J. Kotecha, R. Sheshala, Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods, *Biomed. Chromatogr.* 25 (2011) 199–217.
- [26] B. Kolb, in: I.D. Wilson (Ed.), *CHROMATOGRAPHY: GAS|Headspace Gas Chromatography*. Encyclopedia of Separation Science, Academic Press, Oxford, 2000, pp. 489–496.
- [27] N.H. Snow, G.P. Bullock, Novel techniques for enhancing sensitivity in static headspace extraction-gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2726–2735.
- [28] M.J. Cardador, M. Gallego, Determination of haloacetic acids in human urine by headspace gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 1824–1830.
- [29] J. Caro, A. Serrano, M. Gallego, Sensitive headspace gas chromatography-mass spectrometry determination of trihalomethanes in urine, *J. Chromatogr. B* 848 (2007) 277–282.
- [30] H.G. Wahl, A. Hoffmann, D. Luft, H.M. Liebich, Analysis of volatile organic compounds in human urine by headspace gas chromatography-mass spectrometry with a multipurpose sampler, *J. Chromatogr. A* 847 (1999) 117–125.
- [31] I. San Román, M.L. Alonso, L. Bartolomé, R.M. Alonso, R. Fañanás, Analytical strategies based on multiple headspace extraction for quantitative analysis of aroma components in mushrooms, *Talanta* 123 (2014) 207–217.
- [32] Z. Li, L.K. Jacobus, W.P. Wuelfing, M. Golden, G.P. Martin, R.A.

Reed, Detection and quantification of low-molecular-weight aldehydes in pharmaceutical excipients by headspace gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 1104 (2006) 1-10.

[33] Y. Wang, J. Ha, Determination of hexanal in rice using an automated headspace sampler coupled to a gas chromatograph-mass spectrometer, *J. Chromatogr. Sci.* 51 (2013) 446-452.

[34] M. Serrano, M. Gallego, M. Silva, Static headspace gas chromatography-mass spectrometry for the one-step derivatisation and extraction of eleven aldehydes in drinking water, *J. Chromatogr. A* 1307 (2013) 158-165.

[35] C. Colina-Coca, D. González-Peña, E. Vega, B. de Ancos, C. Sánchez-Moreno, Novel approach for the determination of volatile compounds in processed onion by headspace gas chromatography-mass spectrometry (HS GC-MS), *Talanta* 103 (2013) 137-144.

[36] J. Tian, Application of static headspace gas chromatography for determination of acetaldehyde in beer, *J. Food Compos. Anal.* 23 (2010) 475-479.

[37] M. Jaffe, Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure im normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins, *Z. Physiol. Chem.* 10 (1886) 391-400.

[38] J.R. Delanghe, M.M. Speeckaert, Creatinine determination according to Jaffe -what does it stand for? *NDT Plus* 4 (2011) 83-86.

[39] Enhanced ChemStation, MSD ChemStation E.02.00493, Agilent Technologies: 2008.

[40] The Unscrambler v 10.2; Camo Process AS: 2012.

[41] B. Halliwell, H.E. Poulsen, *Cigarette Smoke and Oxidative Stress*, Springer, Berlin, 2006.

VI.

**UTILIZACIÓN DE UNA NARIZ
ELECTRÓNICA BASADA EN
ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA
DETERMINACIÓN RÁPIDA DE POSIBLES
BIOMARCADORES VOLÁTILES DE CÁNCER
DE PULMÓN EN ORINA**

Analytical and Bioanalytical Chemistry 408 (2016) 5239-5246

1. INTRODUCCIÓN

El análisis de orina es un método no invasivo ampliamente utilizado en diagnóstico. Son numerosos los estudios que se están llevando a cabo relacionados con el estudio de compuestos presentes en esta matriz con el fin de mejorar o acelerar la detección de ciertas enfermedades [1]. Como resultado de estos estudios, algunos compuestos han sido descritos como posibles biomarcadores de diferentes trastornos. Los biomarcadores son compuestos cuya presencia o ausencia puede estar relacionada con una determinada enfermedad y cuya concentración difiere entre muestras de individuos sanos y muestras de pacientes [2,3]. Normalmente, para la caracterización de una muestra, se utiliza un grupo de biomarcadores en vez de uno solo. En este trabajo, se estudiaron cinco potenciales biomarcadores volátiles de cáncer de pulmón en orina (2-butanona, 2-pentanona, pirrol, 2-heptanona y 2-etil-1-hexanol) [2,4].

Aunque la orina presenta la gran ventaja de estar fácilmente disponible y generalmente el volumen no es una cuestión limitante tiene como inconveniente que es una matriz bastante compleja cuyo análisis normalmente requiere una preparación minuciosa para el aislamiento y la preconcentración de los analitos [3-9]. La generación de espacio de cabeza (HS) [3-10] es una técnica adecuada para el análisis de biomarcadores volátiles en muestras de orina debido a la facilidad de preparación de la muestra, la automatización, la velocidad y la ausencia de interferencias por compuestos no volátiles de la matriz. Sin embargo, esta técnica no garantiza la superación de algunos problemas como el efecto de matriz [5,10].

La cromatografía de gases ha sido la técnica más utilizada para el análisis de compuestos volátiles en orina [3,4,6-10], pero los análisis cromatográficos son generalmente lentos. Sin embargo, existen varias alternativas que permiten acelerar los procesos de separación cromatográfica. Estas alternativas incluyen el uso de columnas capilares más cortas con secciones más estrechas y la programación en el horno de rampas de temperatura más rápidas [11]. Además, el desarrollo de métodos no separativos para la resolución de diferentes problemáticas analíticas es de gran interés principalmente debido a la alta velocidad de análisis. Se han propuesto algunos métodos no separativos basados en sensores para la discriminación de pacientes que sufren diversas enfermedades e individuos sanos utilizando muestras de aliento, saliva, sangre y orina [12-15]. Junto a los avances en diferentes plataformas de sensores y de dispositivos complejos de *microarray*, la tecnología de la nariz electrónica también ha experimentado un desarrollo significativo. Las narices electrónicas basadas en espectrometría de masas, donde cada relación masa/carga (m/z) actúa como un "sensor" que detecta un fragmento iónico con esa relación, se han utilizado en aplicaciones biomédicas [9,16].

Además de las narices electrónicas, se han utilizado otros métodos no separativos como la espectrometría de masas con ionización por desorción con electrospray (DESI-MS) [17], con tubo de flujo de iones seleccionados (SIFT-MS) [18] y la resonancia magnética nuclear (RMN) [17,19,20] para la determinación de biomarcadores en muestras de orina.

2. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo consiste en la determinación rápida de cinco compuestos volátiles descritos en bibliografía como posibles biomarcadores de cáncer de pulmón en muestras de orina mediante una nariz electrónica basada en un generador de espacio de cabeza, un inyector de temperatura programada en modo de inyección *solvent vent* y un espectrómetro de masas (HS-PTV-MS). Se propone el uso de modelos de calibración multivariante para cuantificar las concentraciones de biomarcadores en las muestras de orina de individuos sanos, así como de pacientes. Para la asignación de las muestras a uno u otro grupo (individuos sanos y pacientes) se plantea la utilización del test de rangos y signos de Wilcoxon. Este test compara las concentraciones obtenidas con la media de las concentraciones de un grupo de referencia de individuos sanos.

Hasta la fecha, esta es la primera vez que se propone un método que combina la calibración multivariante y métodos de clasificación no paramétricos para la clasificación de muestras biológicas a partir de señales de perfil obtenidas mediante una nariz electrónica basada en espectrometría de masas.

Para las muestras en las que se encuentren diferencias significativas en la concentración de uno o más biomarcadores respecto del grupo de referencia se propone la realización de un segundo análisis que incluirá una etapa de separación cromatográfica (HS-PTV-GC-MS) para confirmar los resultados obtenidos en el primero.

El objetivo final, por tanto, es aprovechar la rapidez que supone la

metodología no separativa HS-PTV-MS que no necesita separación cromatográfica previa ni manipulación de muestra y permite incrementar el número de muestras analizadas por hora y restringir el uso de técnicas largas que incluyan esta etapa de separación (HS-PTV-GC-MS) a los casos concretos en los que sean necesarias.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiales, disoluciones estándar y muestras

Los analitos 2-butanona, 2-pentanona, pirrol, 2-heptanona y 2-etil-1-hexanol fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El metanol fue proporcionado por Merk (Darmstadt, Alemania). Las purezas de los compuestos fueron al menos del 98 %. El agua ultrapura UHQ se obtuvo con un sistema de purificación Wasserlab Ultramatic (Noain, España).

Se prepararon disoluciones madre a partir de cada uno de los compuestos comerciales de concentraciones entre 490 y 5000 mg L⁻¹ en metanol y se conservaron a 4 °C. Estas disoluciones se utilizaron para preparar otras de concentración intermedia que contenían los cinco compuestos también en metanol a partir de las cuales se prepararon las disoluciones de trabajo en agua ultrapura en las que los compuestos se encontraban en concentraciones entre 0.048 y 12 mg L⁻¹.

Se utilizaron muestras de orina de 20 adultos de ambos sexos que se almacenaron a -20 °C. Las muestras entre la 1 y la 13 (4 mujeres y 9 hombres) pertenecían a individuos sanos no afectados aparentemente por ninguna enfermedad; las muestras entre la 14 y la 20 (2 mujeres y 5 hombres) pertenecían a pacientes de la Unidad de Medicina Interna del Hospital Virgen de la Vega de Salamanca. El paciente n° 14 tenía un carcinoma metastásico urotelial infiltrante y el paciente n° 15 tenía un hepatocarcinoma multicéntrico metastásico; los pacientes del 16 al 20 tenían enfermedades pulmonares, concretamente las que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: *Visión general de los pacientes con enfermedades pulmonares*

Muestra	Patología
16	Adenocarcinoma de pulmón metastásico
17	Adenocarcinoma de pulmón metastásico
18	Melanoma metastásico
19	Carcinoma epidermoide de pulmón metastásico
20	Adenocarcinoma de pulmón metastásico

El estudio fue autorizado por el Comité Ético del Hospital.

3.2. Preparación de muestra

Para realizar el análisis de las muestras, estas se descongelaban a temperatura ambiente y después se transferían a un tubo de centrífuga de 15 mL con tapón de rosca (Scharlau, España) y se centrifugaban durante 10 minutos a 5000 rpm. Para medir las muestras tanto de individuos sanos como de pacientes, 4.0 mL de orina, 2.0 g de sal (NaCl) y 50 μ L de agua ultrapura se transferían a un vial de espacio de cabeza de 10 mL (Agilent Technologies, DE, Alemania) que se cerraba con un tapón con septo de Teflon®/silicona (Agilent Technologies, DE, Alemania). Para la medida de las muestras dopadas, 4.0 mL de orina, 2.0 g de NaCl y 50 μ L de la disolución de trabajo descrita anteriormente se transferían a un vial de las mismas características (10 mL y tapón con septo de Teflon®/silicona). Cada muestra se analizó por triplicado (tres viales, una inyección por vial).

3.3. Medida de la creatinina

La variabilidad que presenta la matriz de estudio (como se ha descrito en el apartado V, en esta misma sección) hace necesario el uso de un método de normalización si se quiere realizar una recogida

puntual de orina en lugar de prolongados muestreos que podrían consistir en la recogida de muestra a lo largo de todo un día. El método más utilizado es la normalización de las concentraciones de los analitos a la concentración de creatinina (mmol).

Para llevar a cabo estas medidas, se utilizó una modificación del método Jaffé [37,38] y se utilizó un espectrofotómetro ultravioleta-visible Shimadzu UV/Vis-160 (Kioto, Japón). Se utilizó una celda de cuarzo (Suprasil) de 10 mm de paso óptico.

Los valores normalizados se expresaron como nmol de analito/mmol de creatinina.

3.4. Instrumentación utilizada en el método de cribado HS-PTV-MS

3.4.1. Generador de espacio de cabeza

El muestreo mediante espacio de cabeza se llevó a cabo con un automuestreador PAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Suiza). Este muestreador está equipado con una bandeja para 32 muestras consecutivas y con un horno con 6 posiciones para viales de muestra. Los viales de muestra se introducían en el horno a 90 °C durante 5 min, condiciones en las que se generaba el espacio de cabeza. Durante este tiempo, la muestra era agitada a 750 rpm. Para la inyección de la muestra de espacio de cabeza se utilizó una jeringa a 110 °C en la que se seleccionó el volumen de inyección máximo, 2.5 mL. Las velocidades de llenado y de inyección se fijaron en 100 y 250 $\mu\text{L s}^{-1}$, respectivamente. Tras la inyección, la jeringa se limpia durante 2 minutos con un flujo de He N50 (99.999 %, Air Liquide). El tiempo entre dos inyecciones

consecutivas se fijó en 14 min.

3.4.2. Inyector de temperatura programada

Los experimentos se llevaron a cabo con un inyector de temperatura programada (PTV, CIS-4, Gerstel, Baltimore, MD, USA), con un *liner* relleno de Tenax-TA® de dimensiones 71 mm x 2 mm. En el PTV se seleccionó el modo de inyección *solvent vent* en el que, inicialmente, la muestra del espacio de cabeza se inyectaba en el PTV, que mediante un sistema de enfriamiento con CO₂ líquido, se encontraba a 35 °C de tal manera que los analitos quedaban retenidos en el *liner* mientras la válvula de división o de *split* permanecía abierta permitiendo la eliminación del disolvente durante 0.1 min. Se ajustó un flujo y una presión de venteo de 50 mL min⁻¹ y 5.0 psi (34474 Pa), respectivamente. Una vez finalizada esta etapa de venteo, se programa la segunda etapa, de transferencia de los analitos al sistema cromatográfico; para ello, se cierra la válvula de *split* y el PTV se calienta rápidamente (12 °C s⁻¹) hasta 250 °C. El tiempo de transferencia se fijó en 1.5 min. Finalmente, la válvula de *split* se vuelve a abrir para limpiar el sistema con un flujo de 150 mL min⁻¹ mientras se mantiene la temperatura el PTV a 250 °C.

3.4.3. Interfaz entre el PTV y el MS

La interfaz entre el sistema de inyección y el espectrómetro de masas fue una columna de baja polaridad DB-VRX de dimensiones 20 m x 0.18 mm x 1µm de J&W Scientific Columns de Agilent Technologies que se mantenía a 240 °C en un cromatógrafo Agilent Technologies 6890 GC durante todo el tiempo de análisis. A esa temperatura, la columna pierde su capacidad de separación y se comporta como una simple línea

de transferencia que une el PTV y el detector. Esta configuración instrumental permite llevar a cabo posteriores análisis cromatográficos únicamente cambiando el programa de temperaturas del horno.

3.4.4. Espectrómetro de masas

El detector utilizado fue un espectrómetro de masas cuadrupolar (HP 5973 N) equipado con una fuente de ionización inerte. Se operó en el modo de ionización electrónica a un voltaje de 70 eV. La fuente de ionización y el cuadrupolo se mantuvieron respectivamente a una temperatura de 230 y 150 °C.

Los análisis se realizaron en modo de adquisición de datos *scan* (1.06 scan s⁻¹) en un rango de relaciones masa/carga de 35 - 120 amu.

El tiempo de adquisición se fijó en 2.5 min. Y se fijó un tiempo entre inyecciones de 6.0 min ya que el PTV tenía que enfriarse desde la temperatura final de 250 °C hasta la temperatura inicial de 35 °C.

3.5. Instrumentación utilizada para el método de confirmación HS-PTV-GC-MS

Las condiciones del generador de espacio de cabeza (HS) y del inyector de temperatura programada (PTV) fueron las mismas que las usadas en el método de cribado.

3.5.1. Cromatógrafo de gases

En este método separativo, la columna es la misma que en el método anterior; sin embargo, en este caso se utiliza un programa de temperaturas que permite la separación cromatográfica.

Se programó una temperatura inicial de 45 °C que se mantuvo durante 1.5 min. Una vez pasado este tiempo, la temperatura se fue incrementando a una velocidad de 30 °C min⁻¹ hasta 81 °C; después se seleccionó otra rampa de 60 °C min⁻¹ para aumentar la temperatura hasta los 175 °C y, por último, una de 45 °C min⁻¹ hasta alcanzar la temperatura final de 240 °C que se mantuvo durante 0.50 min. El gas portador utilizado fue helio N50 (pureza 99.999 %, Air Liquide) a un flujo de 2.0 mL min⁻¹. El tiempo total de cromatograma fue de 6.21 min. Tras este tiempo, se necesitaron otros 7 min antes de que la siguiente muestra pudiese ser analizada ya que la columna tenía que ser enfriada desde la temperatura final (240 °C) hasta la temperatura inicial (45 °C). Por lo tanto, se fijó un intervalo entre dos inyecciones consecutivas de 14 min.

3.5.2. Espectrómetro de masas

El modo de adquisición utilizado en el detector en el método de confirmación fue el modo SIM/*scan* combinado que permite el registro de datos SIM (seguimiento de iones seleccionados) y *scan* en un mismo análisis. En el modo de adquisición *scan* se registraron las relaciones m/z (masa/carga) comprendidas entre 35 y 120; sin embargo, se crearon tres grupos con diferentes velocidades de barrido entre 2.94 y 9.30 *scan s*⁻¹. Este modo se utilizó para la identificación de los compuestos objeto de estudio mediante la comparación de los espectros obtenidos con los espectros de la base de datos NIST'98 (NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library, versión 2.0).

El modo de adquisición SIM se utilizó para la cuantificación. En este modo de adquisición se seleccionaron cinco ventanas, escogiéndose en

cada caso los iones característicos de los analitos que aparecían a esos tiempos, como se observa en la tabla 2 en la que se recogen los parámetros del modo de adquisición SIM/*scan*.

Tabla 2: *Parámetros del modo de adquisición de datos SIM/scan combinado utilizado en el método separativo de confirmación*

Pico n ^o	Compuesto	Método de confirmación (SIM/ <i>scan</i> combinado)				
		t _R (min)	SIM		SIM y <i>Scan</i> (scan s ⁻¹)	
			Iones*		Dwell time (ms)	
1	2-butanona	2.127	41, 42, 43 , 57, 72		10	2.94
2	2-pentanona	2.861	41, 43 , 86		10	5.08
3	Pirrol	3.291	39, 41, 67		10	5.08
4	2-heptanona	3.980	43 , 58, 71		1	9.30
5	2-etil-1-hexanol	4.466	41, 43, 57		1	9.30

* Pico base en negrita

3.6. Análisis de datos

La recogida de los datos se realizó con el software Enhanced ChemStation, G1701EA versión E.00.00.202 de Agilent Technologies [23]. La calibración multivariante por regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS1) se llevó a cabo utilizando el paquete de software estadístico Unscrambler® v10.2 [24]. Para la realización de los gráficos box-plot, el test U de Mann-Whitney y el test de rangos y signos de Wilcoxon se utilizó el programa estadístico OriginPro v8.0724 [25].

3.7. Métodos optimizados HS-PTV-MS y HS-PTV-GC-MS

Las condiciones experimentales óptimas de los dos métodos de análisis y de todos los módulos que componen la configuración instrumental utilizada en este trabajo se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Condiciones experimentales de los métodos optimizados

GENERADOR DE ESPACIO DE CABEZA		
Volumen de muestra		4 mL de orina
Cantidad de sal (NaCl)		2 g
Temperatura del horno		90 °C
Tiempo de generación del espacio de cabeza		5 min
Velocidad de agitación		750 rpm
INYECTOR DE TEMPERATURA PROGRAMADA		
<i>Liner</i>		<i>Liner</i> relleno de Tenax-TA®
	Flujo de purga	50 mL min ⁻¹
	Tiempo de purga	0.10 min
Modo de inyección:	Tiempo de inyección	1.5 min
<i>Solvent Vent</i>	Flujo de limpieza	150 mL min ⁻¹
	Temperatura	35 °C
	Rampa	12 °C s ⁻¹ hasta 250 °C
CROMATÓGRAFO DE GASES		
Columna		Columna capilar DB-VRX (baja polaridad)
Método	Temperatura	240 °C
HS-PTV-MS		
	Temperatura inicial	45 °C (1.5 min)
Método	Rampa 1	30 °C min ⁻¹ hasta 81 °C
HS-PTV-GC-MS	Rampa 2	60 °C min ⁻¹ hasta 175 °C
	Rampa 3	45 °C min ⁻¹ hasta 240 °C (0.5 min)
ESPECTRÓMETRO DE MASAS		
Modo de adquisición		<i>scan</i>
Relaciones m/z (<i>scan</i>)		35 – 120
Velocidad de barrido		1.06 scan s ⁻¹
Modo de adquisición de datos		SIM/ <i>scan</i> combinado
Relaciones m/z (<i>scan</i>)		35 – 120
		2.94 scan s ⁻¹ (0.43 – 2.66 min)
Velocidades de barrido		5.08 scan s ⁻¹ (2.66 – 3.45 min)
		9.30 scan s ⁻¹ (3.45 – 6.21 min)
Tiempo de permanencia (SIM)		10 ms (0.43 – 3.45 min)
		1 ms (3.45 – 6.21 min)
<i>Solvent delay</i>		0.43 min

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Variables que afectan a la generación de espacio de cabeza

Las variables que se estudiaron para la elección de las condiciones óptimas de generación del espacio de cabeza fueron las siguientes: fuerza iónica, volumen de muestra y tiempo y temperatura de equilibrado.

Habiéndose comprobado en trabajos anteriores de esta Tesis la ventaja que aporta la adición de sales a la matriz de orina (capítulo V), se decidió utilizar la misma situación de sobresaturación de sales en el vial de análisis. De igual manera, se mantuvo el mismo volumen de muestra de 4 mL que en el trabajo anterior. El contenido de sales para este volumen (2 g de NaCl) junto con el volumen de orina seleccionado permitía una relación de fases adecuada entre la muestra y el espacio de cabeza.

Se probaron diferentes temperaturas de generación de espacio de cabeza: 60, 70, 80 y 90 °C. La señal analítica de los compuestos estudiados aumenta al aumentarse la temperatura de equilibrado del espacio de cabeza (figura 1), por lo que se seleccionó como óptima una temperatura de equilibrado de 90 °C ya que temperaturas mayores conducirían a una presencia elevada de agua en el espacio de cabeza.

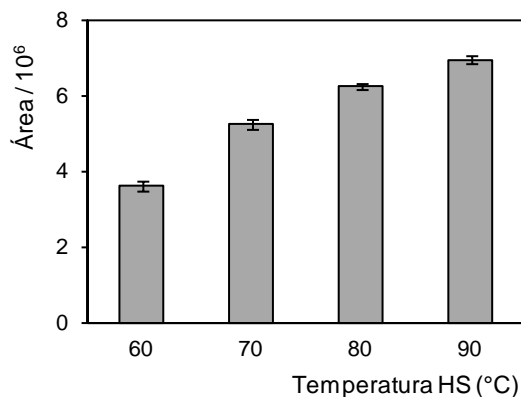


Figura 1: Área de pico del compuesto 2-butanona (compuesto representativo del comportamiento del resto de biomarcadores estudiados) para diferentes valores de temperatura de equilibrado

En cuanto al tiempo de equilibrado, se realizó un estudio a tres tiempos diferentes: 5, 10 y 15 minutos. No se observaron diferencias significativas en las áreas de pico de los analitos objeto de estudio, por lo que se concluye que al menor de los tiempos estudiados se ha alcanzado ya el equilibrio en el vial y se seleccionó ese tiempo como óptimo.

4.2. Variables que afectan al sistema PTV-(GC)-MS

4.2.1. Condiciones del inyector de temperatura programada

El modo de inyección seleccionado en ambos métodos fue el de purga de disolvente o *solvent vent* debido a las ventajas que supone su utilización en cuanto al aumento de la sensibilidad del método.

Para la elección de la temperatura inicial a la que se realiza la inyección, una misma disolución de los compuestos objeto de estudio se sometió a diferentes análisis en los que se modificó la temperatura de

inyección entre 15 y 65 °C. Las mayores diferencias se encontraron en el más volátil de los compuestos estudiados, la 2-butanona; para este compuesto los mejores resultados se obtenían con una temperatura de 25 °C y se observaba una clara disminución de la señal analítica a partir de los 45 °C. Para el resto de compuestos la señal aumentaba hasta los 45 °C y se mantenía constante a temperaturas superiores. Como solución de compromiso, se escogió una temperatura de 35 °C con la que se obtenían las señales más altas para la mayoría de los compuestos objeto de estudio. En la figura 2 se observa la variación de la señal analítica para las diferentes temperaturas de venteo estudiadas para el compuesto más y menos volátil de los estudiados.

A partir de las señales de perfil generadas a cada una de estas temperaturas con el método de cribado se obtuvieron los mismos resultados cuando se integró el área bajo la curva de las relaciones m/z mayoritarias de cada uno de los compuestos estudiados.

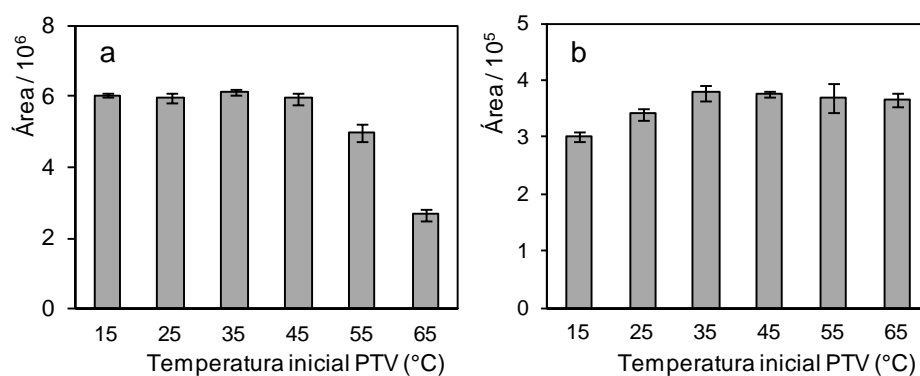


Figura 2: Señal analítica para las diferentes temperaturas de venteo estudiadas y para los compuestos (a) 2-butanona y (b) 2-etil-1-hexanol

Se realizó el estudio del flujo de venteo para valores entre 25 y 150 mL min⁻¹. No se observaron grandes diferencias en la señal analítica de

los compuestos ni en la de sus relaciones m/z cuando se realizó esta prueba con el método no separativo, por lo que se seleccionó un flujo intermedio de 50 mL min^{-1} .

En cuanto al tiempo de venteo, se estudiaron tiempos entre 0.10 y 1.00 min. El menor de estos tiempos era suficiente para asegurar la eliminación del disolvente y además era aquel con el que mayor reproducibilidad entre inyecciones se conseguía, por lo que se seleccionó un tiempo de venteo de 0.10 min.

Para estudiar el tiempo de inyección se realizaron pruebas a 1, 1.5 y 2 minutos. No se observaron diferencias significativas en la señal analítica de los compuestos estudiados para los diferentes tiempos de inyección, por lo que se seleccionó un tiempo intermedio de 1.5 min en ambas metodologías.

A partir de los estudios previos recogidos en esta memoria (capítulo V), se seleccionó Tenax-TA® como relleno del *liner* del inyector; se trata de un relleno hidrofóbico muy útil para el análisis de muestras con matrices acuosas como es la orina y mejora la retención de los compuestos en modos de inyección como el de venteo de disolvente.

4.2.2. Condiciones de la separación cromatográfica

En cuanto a la separación cromatográfica, se estudiaron temperaturas iniciales entre 40 y 75 °C. Los mejores resultados en cuanto a morfología de pico y señal analítica para los compuestos más volátiles, que son los que se ven más afectados por la temperatura inicial de la rampa cromatográfica, se obtenían a temperaturas bajas. Por tanto, se seleccionó una temperatura inicial de 45 °C con la que, además, se

obtenían los mejores valores de reproducibilidad entre inyecciones.

Se realizó también un estudio del tiempo al que se mantenía la temperatura inicial para tres valores: 0.5, 1 y 1.5 min. Se seleccionó un tiempo de 1.5 min siendo aquel con el que mejores resultados en cuanto a la altura y morfología de pico del primero de los compuestos se obtenían. Para el resto de los compuestos no se observaban grandes diferencias.

Como temperatura final se seleccionó una temperatura de 240 °C. Esta temperatura es la que se utiliza en el método no separativo cuando se quiere utilizar la columna cromatográfica como línea de transferencia.

4.2.3. Condiciones del espectrómetro de masas

El modo de adquisición de datos seleccionado fue el modo SIM/*scan* combinado que permite la recogida de datos SIM (seguimiento de iones seleccionados) y *scan* en un mismo análisis, utilizándose el cromatograma SIM para la cuantificación de los analitos objeto de estudio y el cromatograma en *scan* para la identificación de los mismos.

En el modo de adquisición de datos *scan*, para las relaciones m/z comprendidas entre 35 - 120, se probaron diferentes velocidades de barrido entre 29.06 y 0.54 scan s^{-1} tanto en el método separativo como en el no separativo. En el primer caso, se realizaron tres grupos diferentes para la adquisición en *scan* utilizando como criterio la relación señal/ruido para cada uno de los compuestos estudiados. Los mejores resultados se obtuvieron para una velocidad de 2.94 scan s^{-1} para el primer grupo (2-butanona), una de 5.08 scan s^{-1} para el segundo (2-pentanona y pirrol) y una de 9.30 scan s^{-1} para el tercero (2-heptanona y

2-etil-1-hexanol).

Para el método no separativo, sin embargo, se escogió una única velocidad de barrido ya que en este caso se comparó la relación señal/ruido de toda la señal de perfil y no de compuestos por separado, obteniéndose que los mejores resultados se conseguían con una velocidad de barrido de 1.06 scan s⁻¹.

En el modo de adquisición de datos SIM, es necesaria la optimización del tiempo de permanencia o *dwell time* para cada ion seleccionado.

Se probaron diferentes tiempos de permanencia (1, 10, 30, 60 y 100 ms). Con tiempos de permanencia altos (60 y 100 ms) la definición de los picos era muy pobre y, por el contrario, cuando se seleccionaba un tiempo de 1 ms, sin embargo, especialmente en el caso de los primeros picos, también el ruido aumentaba en gran medida. La mejor relación entre definición de pico y señal del ruido se obtuvo para un tiempo de permanencia de 10 ms en las tres primeras ventanas y para las dos últimas se seleccionó un tiempo de 1 ms.

4.3. Señales obtenidas con los métodos optimizados

Se han propuesto dos métodos de análisis. Un primer método de cribado (*screening*) HS-PTV-MS basado en un esquema analítico no separativo en el que la interfaz entre el HS y el MS es una columna que se mantiene a una temperatura de 240 °C y un segundo método de confirmación que incluye una etapa de separación cromatográfica HS-PTV-GC-MS. Un esquema de ambos métodos, así como del tipo de señal que se obtiene con cada uno se observa en la figura 3.

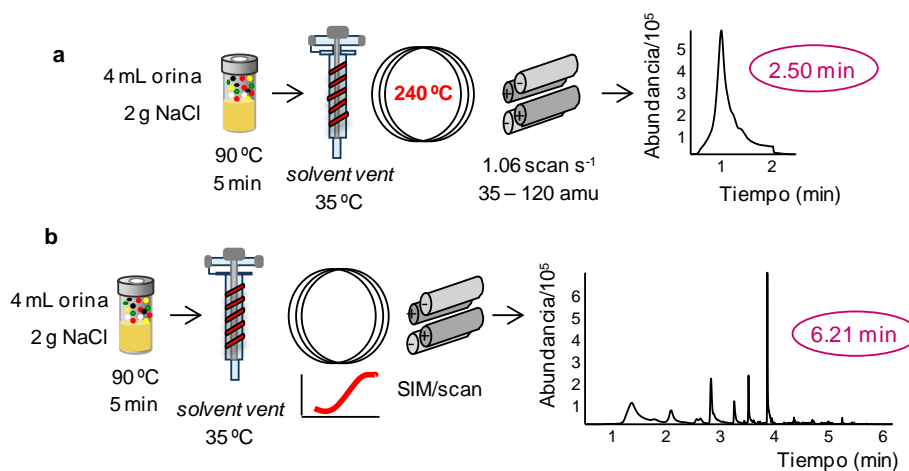


Figura 3: Esquema de las configuraciones instrumentales de (a) método de criba (screening) HS-PTV-MS y (b) método de confirmación HS-PTV-GC-MS

En el método basado en una configuración de nariz electrónica, los volátiles generados en el espacio de cabeza producen un perfil de corriente iónica total como el que se muestra en la figura 4a, que corresponde a una muestra de orina con concentración de analitos entre 0.12 y 124 $\mu\text{g L}^{-1}$. El espectro de masas que representa la suma de las intensidades de todos los iones detectados durante el tiempo de adquisición se muestra en la figura 4b. Algunas de las relaciones m/z más abundantes corresponden a los iones característicos en el espectro de masas de algunos de los analitos estudiados (43, 58 y 86).

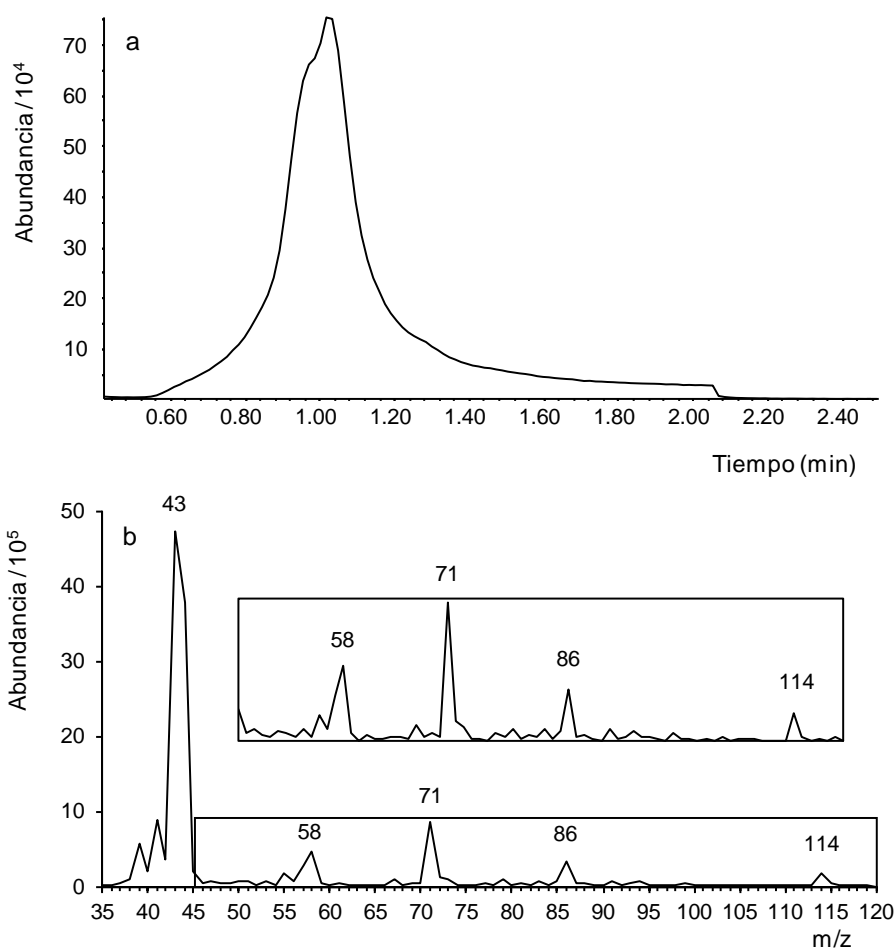


Figura 4: (a) Señal de perfil de los iones totales obtenida con el método HS-PTV-MS de una orina con concentraciones de los compuestos estudiados entre 0.12 y 124 $\mu\text{g L}^{-1}$; (b) espectro de masas que representa la suma de las intensidades de todos los iones detectados durante el tiempo de análisis.

4.4. Evaluación de los métodos analíticos optimizados

4.4.1. Método de confirmación HS-PTV-GC-MS

Se describe primero la evaluación del método separativo, ya que, a pesar de proponerse como método de confirmación, este método será el

utilizado para cuantificar las concentraciones de los analitos en las muestras que se utilizarán para construir los calibrados del método no separativo.

En primer lugar y con el fin de estudiar la posible existencia de efecto de matriz, se llevó a cabo una comparación entre las señales obtenidas con muestras de agua ultrapura y de orina de 8 individuos diferentes. Las muestras se doparon con los cinco analitos en concentraciones que variaban entre 1.6 (2-heptanona) y 88 $\mu\text{g L}^{-1}$ (pirrol). Se observaron diferencias significativas en las señales de los analitos entre las diferentes muestras de orina y entre estas muestras y la de agua ultrapura. Para evitar el efecto de matriz, se valoró la posibilidad de diluir la orina con agua ultrapura. Se probaron dos relaciones de dilución distintas, 1:1 (2 mL de orina + 2 mL de agua ultrapura) y 1:3 (1 mL de orina + 3 mL de agua ultrapura). Sin embargo, el efecto de matriz no se consiguió eliminar como se puede observar en la figura 5. No se probaron mayores diluciones de la muestra debido a la pérdida de sensibilidad que supondrían.

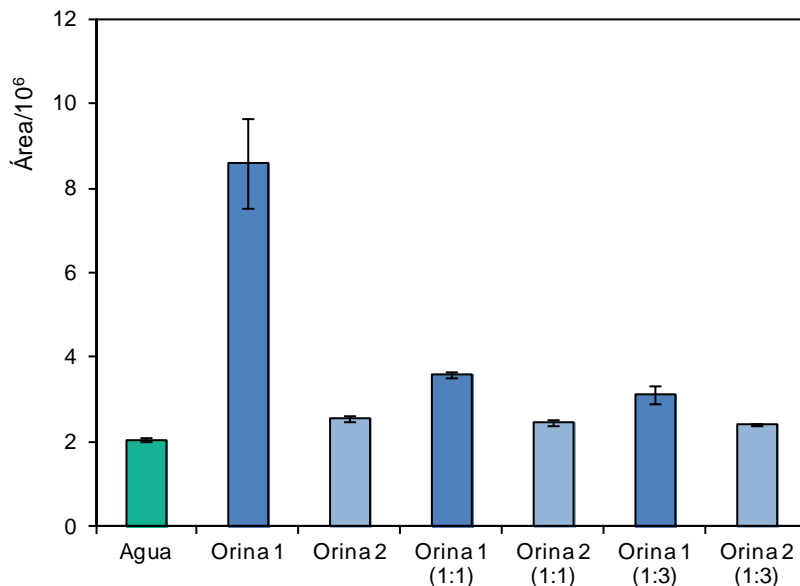


Figura 5: Resultados obtenidos para una muestra de agua y dos muestras de orina con distintas diluciones (sin dilución, dilución 1:1 y 1:3) y dopadas a una misma concentración (tras la dilución). Como ejemplo se ha considerado la señal analítica del analito 2-pentanona

La cuantificación se llevó a cabo mediante el método de las adiciones estándar. Además, se utilizó un compuesto endógeno (4-heptanona), presente en todas las muestras de orina, como patrón interno. Esta estrategia de calibración, conocida como “patrón interno-adición estándar” (*standard addition-internal standard*) y que combina las ventajas de ambos métodos de calibración, ha sido utilizada anteriormente en otros trabajos que estudian la misma matriz [5,10] pero con la adición de un compuesto no endógeno como patrón interno.

El rango de concentraciones que se utilizó para las adiciones estándar fue de entre 0.80 y 150 $\mu\text{g L}^{-1}$. La señal utilizada fue el área bajo la curva de cada uno de los compuestos en el cromatograma de ion extraído para las relaciones masa/carga que se mostraban en **negrita** en la tabla 2. En

todos los casos (20 muestras: 13 de individuos sanos y 7 de pacientes) se obtuvieron curvas de calibrado sin fallo de ajuste y con valores del coeficiente de determinación (R^2) iguales o mayores que 0.99.

La repetibilidad ($n=5$) se estudió para cinco muestras y se evaluó a dos niveles distintos de concentración; por un lado, al nivel más bajo posible que corresponde al de las concentraciones de las muestras sin dopar y, por otro lado, a un segundo nivel correspondiente al de estas mismas muestras dopadas con los biomarcadores a concentraciones de entre 0.80 y 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ en función de la sensibilidad de cada compuesto. La desviación estándar relativa (RSD), es la medida escogida para el estudio de este parámetro, y en todos los casos fue menor al 6 % indicando la buena repetibilidad del método. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 4.

Para calcular los límites de detección y cuantificación se utilizaron las expresiones siguientes:

$$LOD = 3.3 \cdot \frac{s}{m} \quad LOC = 10 \cdot \frac{s}{m}$$

donde s es la desviación estándar de las medidas para cada uno de los compuestos de 10 réplicas de una muestra sin dopar sometida al proceso optimizado de análisis y m es la pendiente de la recta de calibrado para cada uno de los analitos objeto de estudio. Los analitos estudiados son compuestos presentes en todas las orinas y dependiendo de su concentración en cada orina, la desviación estándar generalmente será mayor o menor. Además, existiendo efecto de matriz la pendiente de la recta de calibrado para cada compuesto varía también en función de la orina escogida. Por lo tanto, como ejemplo, se presentan los valores de

los límites de detección calculados para una de las orinas medidas (tabla 4). Los límites de detección calculados para otras orinas estudiadas eran diferentes pero del mismo orden de magnitud que los que se presentan en la tabla 4.

Tabla 4: Características analíticas del método de confirmación HS-PTV-GC-MS

Compuesto	Repetibilidad (RSD, %)		LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
	Orina	Orina dopada (entre 0.80 y 60 $\mu\text{g L}^{-1}$)		
2-butanona	2	4	2.3	6.9
2-pentanona	3	2	0.6	1.8
Pirrol	4	1	3.1	9.3
2-heptanona	2	2	0.050	0.150
2-etil-1-hexanol	6	3	0.091	0.273

4.4.2. Método de cribado HS-PTV-MS

En este método se utilizó la calibración multivariante por regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS1). La calidad de los resultados de esta técnica depende de las muestras utilizadas en el grupo de calibración en el que se modela la variabilidad de los compuestos que contribuyen a las señales utilizadas para la cuantificación. Esta es la razón por la que se utilizaron diferentes muestras de orina para la construcción de los modelos de calibrado. Concretamente, se usaron 10 muestras de orina diferentes como patrones de calibración: 8 muestras de voluntarios sanos (n^{os} 1-8) y 2 muestras de pacientes (n^{os} 14 y 15). Estas muestras se midieron con el método no separativo y se construyeron los modelos de calibrado PLS1 que utilizaban como variables independientes las sumas de las intensidades de todos los iones detectados durante el tiempo de adquisición y como variables

dependientes las concentraciones de los biomarcadores (determinados mediante el método cromatográfico).

Algunos de los compuestos estudiados mostraban superposición en sus espectros de masas característicos. Este hecho permitió comprobar la validez de la metodología no separativa en condiciones complejas. Por ejemplo, la relación m/z 43 es el pico base de la 2-butanona, la 2-pentanona y la 2-heptanona y la relación m/z 57, que es el pico base del 2-etil-1-hexanol es un pico que se observa también en la 2-butanona. Se obtuvieron los modelos PLS1 para cada uno de los compuestos y se utilizó la técnica de validación cruzada (*cross-validation*) dejando una muestra fuera cada vez (*leave one out*) para seleccionar el número óptimo de factores PLS1 y el criterio de incertidumbre de Martens (incluido en el paquete estadístico Unscrambler® v.10.2) para la selección de las variables m/z . Este criterio elimina todas las variables cuyo coeficiente de regresión tiene un valor de incertidumbre mayor que su valor absoluto en el modelo. El número óptimo de factores PLS y los valores relativos de la raíz del error cuadrático medio (RMSE) de las etapas de calibración y validación cruzada para cada biomarcador se muestran en la tabla 5.

Tabla 5: Número de factores PLS y error de predicción relativo de los modelos PLS en las etapas de calibración, validación cruzada y validación externa

Compuesto	Factores PLS	E (%)		
		Calibración	Validación cruzada	Validación externa
2-butanona	3	18	22	19
2-pentanona	4	18	26	17
Pirrol	4	10	15	30
2-heptanona	4	15	20	29
2-etil-1-hexanol	3	12	14	35

Además, las relaciones m/z seleccionadas en cada modelo se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: Relaciones m/z seleccionadas por el criterio de incertidumbre de Martens para los modelos de calibración multivariante

Compuesto	Relaciones m/z
2-butanona	39, 41, 50, 51, 52, 63, 64, 71, 72, 76, 78, 90, 94, 96, 99, 101, 110
2-pentanona	43, 58, 71, 86
Pirrol	38, 39, 59, 62, 63, 65, 66, 69, 70, 72, 77, 79, 84, 89, 90, 91, 99, 101, 110, 112, 113
2-heptanona	44, 72, 83, 114
2-etil-1-hexanol	35, 47, 48, 50, 62, 64, 73, 91, 92, 93, 98, 111, 117, 119

La repetibilidad ($n=5$) se estudió para cinco muestras y se evaluó a dos niveles distintos de concentración; por un lado, al nivel más bajo posible, que corresponde al de las concentraciones de las muestras sin dopar y, por otro lado, a un segundo nivel correspondiente al de estas mismas muestras dopadas con los biomarcadores a concentraciones entre 0.80 y 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ en función de la sensibilidad de cada compuesto. Se estudió el área bajo la curva de las señales de tipo perfil correspondientes a las relaciones m/z más abundantes para cada uno de los analitos, excepto para la 2-pentanona y la 2-heptanona, para las que se escogió la segunda relación m/z más abundante de sus espectros, ya que la primera coincidía con la de la 2-butanona ($m/z = 43$).

La desviación estándar relativa (RSD) fue menor o igual a 10 % en todos los casos, excepto para la relación m/z 58, cuyo valor fue de 20 % (tabla 7).

Los límites de detección multivariante en orina se obtuvieron

siguiendo una estrategia basada en la varianza de la concentración predicha por el modelo [27] y fueron de entre 0.16 y 21 $\mu\text{g L}^{-1}$ (tabla 7). Sin embargo, al igual que ocurría en el método anterior, los límites de detección variarán ligeramente en función de la orina que se tome como referencia.

Tabla 7: Características analíticas del método de cribado HS-PTV-MS

Compuesto (m/z)	Repetibilidad (RSD, %)		LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)
	Orina	Orina dopada (entre 0.80 y 60 $\mu\text{g L}^{-1}$)	
2-butanona (43)	10	7	17
2-pentanona (86)	7	5	11
Pirrol (67)	6	5	21
2-heptanona (58)	20	6	0.16
2-etil-1-hexanol (57)	7	7	0.27

4.5. Aplicación del método propuesto a muestras de orina

Los modelos de calibración multivariante correspondientes al método de cribado (HS-PTV-MS) se utilizaron para predecir la concentración de un grupo de muestras de orina de 5 individuos sanos (muestras n^{os} 9-13) que no habían sido utilizadas en ninguna etapa de calibración. El método no separativo se aplicó también, al análisis de cinco muestras (n^{os} 16-20) de pacientes con enfermedades pulmonares; las concentraciones predichas de los biomarcadores estudiados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8: Concentración predicha (nmol analito/mmol creatinina) para los biomarcadores estudiados en las muestras de orina de pacientes con enfermedades pulmonares con el método de cribado HS-PTV-MS

Muestras	16	17	18	19	20
2-butanona	(4±1)x10	(7±1)x10	32±8	45±7	(4±1)x10
2-pentanona	80±5	66±5	64±6	58±5	90±4
Pirrol	(12±1)x10	<LOD	(6±1)x10	(16±2)x10	(2.0±0.5)x10 ²
2-heptanona	1.54±0.04	<LOD	1.90±0.06	1.61±0.06	2.19±0.05
2-etil-1-hexanol	0.63±0.08	0.4±0.1	0.97±0.06	0.8±0.1	0.7±0.1

Con el fin de conocer si existían diferencias entre las concentraciones de los biomarcadores entre el grupo de pacientes con enfermedades pulmonares (muestras n^{os} 16-20) y el de individuos sanos (muestras n^{os} 9-13) se realizó el contraste *U* de Mann-Whitney con las concentraciones predichas con el método no separativo de las 10 muestras del grupo de validación externa. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) para cuatro de los cinco compuestos (2-butanona, 2-pentanona, 2-heptanona y 2-etil-1-hexanol). La figura 6 muestra los gráficos box-plot que representan las concentraciones de los analitos normalizadas para los dos grupos de muestras.

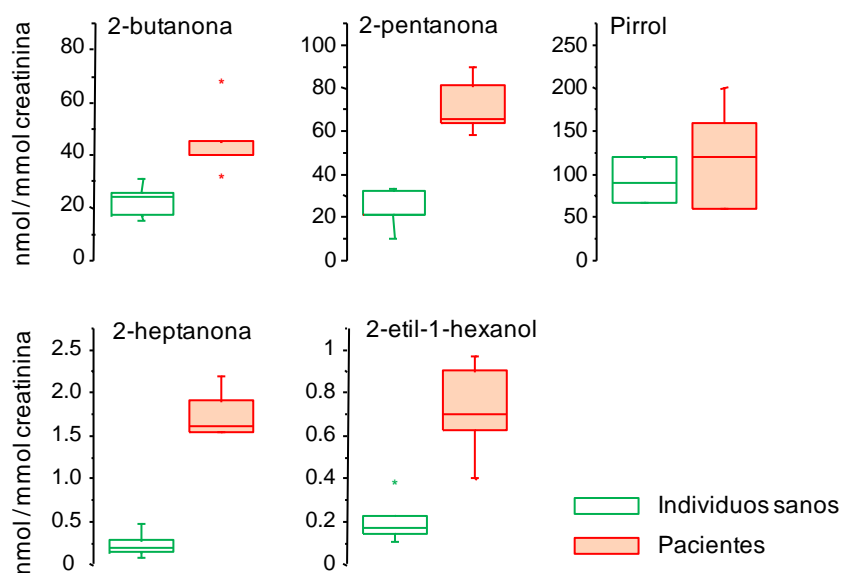


Figura 6: Gráficos box-plot que muestran la distribución de las concentraciones normalizadas de los biomarcadores encontrados en las muestras del grupo de validación externa con el método no separativo distinguiéndose entre individuos sanos y pacientes

Para llevar a cabo la asignación a la clase de individuos sanos o de pacientes de las 10 muestras de validación externa, se usó el contraste de rangos y signos de Wilcoxon para los cuatro biomarcadores que presentaban diferencias significativas entre los grupos. El cálculo de las medianas se llevó a cabo con la concentración de los biomarcadores calculada cromatográficamente en las 8 muestras de individuos sanos (muestras n^{os} 1-8). Este valor de referencia se comparó con las concentraciones de los biomarcadores predichas con el método no separativo en las 10 muestras de validación externa. La tabla 9 muestra los resultados que se obtuvieron.

Tabla 9: Resultados obtenidos en la clasificación de las muestras del grupo de validación externa utilizando el contraste de rangos y signos de Wilcoxon

Muestra n°	2-butanona	2-pentanona	2-heptanona	2-etil-1-hexanol
9 (individuo sano)	-	-	-	-
10 (individuo sano)	-	-	-	-
11 (individuo sano)	-	-	-	-
12 (individuo sano)	-	-	-	-
13 (individuo sano)	-	-	-	-
16 (paciente)	-	+	-	+
17 (paciente)	+	+	-	+
18 (paciente)	-	+	+	+
19 (paciente)	+	+	+	+
20 (paciente)	-	+	+	+

- : La mediana de las concentraciones del grupo de individuos sanos (grupo de referencia) no es significativamente menor ($p < 0.05$) que la concentración de la muestra estudiada.

+ : La mediana de las concentraciones del grupo de individuos sanos es significativamente menor ($p < 0.05$) que la concentración de la muestra estudiada.

En el caso de los individuos sanos, todas las muestras fueron correctamente clasificadas ya que la mediana obtenida para cada biomarcador en el grupo de individuos sanos o grupo de referencia, no fue significativamente más baja ($p < 0.05$) que la concentración obtenida para cada muestra. En lo que respecta a las muestras de pacientes, en todos los casos 2 o 3 biomarcadores presentaban valores significativamente mayores ($p < 0.05$) que el valor de la mediana del grupo de referencia. Las concentraciones de 2-pentanona y 2-etil-1-hexanol fueron en todos los casos mayores en el grupo de pacientes que en el de referencia de individuos sanos.

La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (*PPV*) y valor predictivo negativo (*NPV*) para la 2-butanona, la 2-pentanona, la 2-heptanona y el 2-etil-1-hexanol se muestran en la tabla 10. El *PPV* mide

la probabilidad de que un resultado positivo haya sido correctamente predicho y el NPV, la probabilidad de que un resultado negativo haya sido correctamente predicho. A diferencia de la sensibilidad y especificidad, que son inherentes al biomarcador concreto, el PPV y el NPV dependen fuertemente de la población en estudio (prevalencia).

Tabla 10: Valores de sensibilidad, especificidad, PPV y NPV en porcentaje para los cinco biomarcadores estudiados

Compuesto	Sensibilidad %	Especificidad %	PPV %	NPV %
2-butanona	40	100	100	62
2-pentanona	100	100	100	100
2-heptanona	60	100	100	71
2-etil-1-hexanol	100	100	100	100

Las muestras asignadas al grupo de pacientes se midieron cromatográficamente confirmándose la concentración de biomarcadores encontrada en el método de cribado.

La figura 7 muestra los cromatogramas obtenidos para tres muestras de orina diferentes, una de ellas perteneciente a un individuo sano y las otras dos pertenecientes a pacientes con cáncer de pulmón (muestras nºs 16 y 20). El modo de adquisición de datos fue el de SIM/*scan* combinado. Los cromatogramas que se muestran a la izquierda de la figura 7 corresponden a los cromatogramas de iones totales en modo *scan* (figura 7a, 7c y 7e) y los cromatogramas de la derecha de la figura 7 (7b, 7d y 7f) son cromatogramas de iones totales, pero en modo SIM.

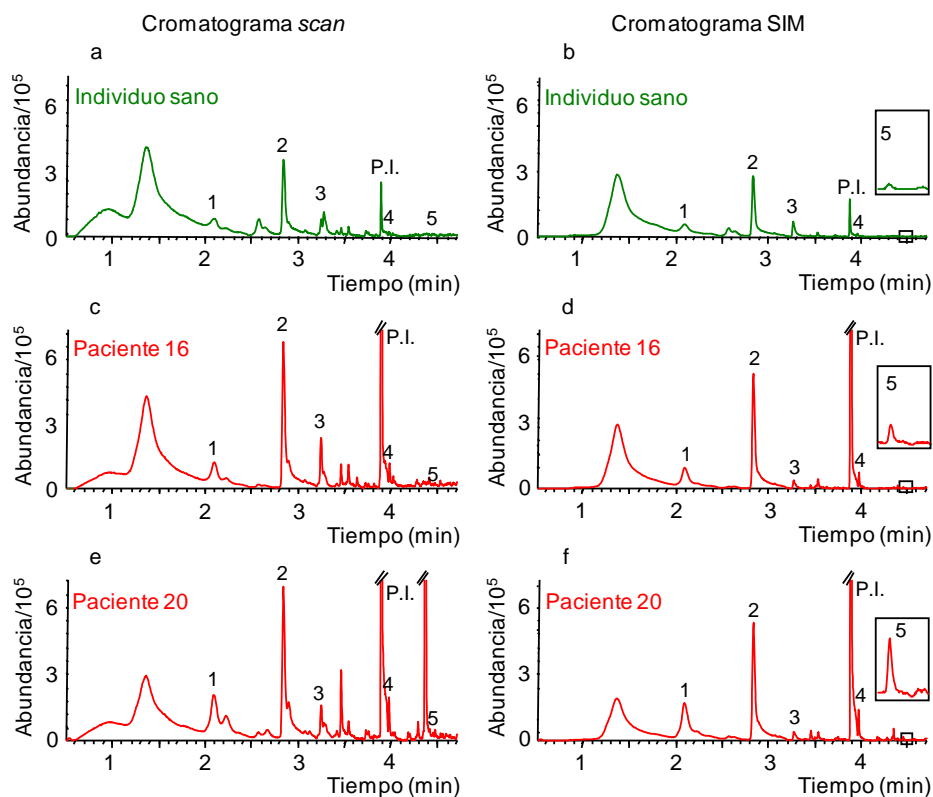


Figura 7: Cromatogramas de iones totales en los modos scan (a, c y e) y en SIM (b, d y f) obtenidos para una muestra de orina de un individuo sano y de dos individuos con cáncer de pulmón (n^{os} 16 y 20).

2-butanona (1), 2-pentanona (2), pirrol (3), 2-heptanona (4), 2-etil-1-hexanol (5) y 4-heptanona (P.I.)

Se observan diferencias en la intensidad de los picos cromatográficos de los compuestos de interés entre las dos muestras de orina pertenecientes a pacientes y la orina perteneciente a un individuo sano.

5. CONCLUSIONES

El procedimiento general propuesto en este trabajo consiste en el análisis inicial de la muestra de orina con el método de cribado (HS-PTV-MS). Tras este análisis, se propone la utilización del contraste de rangos y signos de Wilcoxon para comparar las concentraciones obtenidas con el método no separativo de los cuatro analitos que presentaban diferencias significativas entre individuos sanos y pacientes con la mediana de cada uno de ellos del grupo de individuos sanos (grupo de referencia). Cuando se encuentran diferencias significativas en algún biomarcador, la muestra se asignaba al grupo de pacientes con cáncer de pulmón y se sometía a un nuevo análisis, en este caso cromatográfico (método de confirmación), para confirmar los resultados obtenidos previamente. En caso de que se obtuviera un falso positivo con el método no separativo debido a la presencia en la orina de otros compuestos con las mismas relaciones m/z que los biomarcadores estudiados, esta muestra sería descartada, posteriormente, con el método de confirmación.

La utilización de la metodología de nariz electrónica basada en espectrometría de masas junto con la calibración PLS puede considerarse una opción fiable para la determinación de biomarcadores volátiles en orina y se propone por primera vez la utilización combinada de calibración multivariante y pruebas no paramétricas para la clasificación de muestras biológicas por medio de señales de perfil.

Una vez que el vial de muestra se coloca en el sistema, todo el resto de etapas se realizan de manera automática, por lo que el método podría considerarse apropiado para análisis de rutina. La metodología

propuesta, con generador de espacio de cabeza no requiere pretratamiento de muestra reduciéndose, por tanto, los errores asociados a esta etapa del proceso analítico. El método es rápido, simple y presenta buena precisión y sensibilidad. Además, en vista de los resultados, se puede considerar como una opción apropiada para la determinación de biomarcadores volátiles en un gran número de pacientes, ya que permite aumentar el número de muestras analizadas por hora y restringe el uso de la metodología que incluye separación cromatográfica HS-PTV-GC-MS a las muestras de orina que presenten diferencias significativas en la concentración de los biomarcadores con el grupo de individuos sanos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A.K. Greenberg, M.S. Lee, Biomarkers for lung cancer: clinical uses, *Curr. Opin. Pulm. Med.* 13 (2007) 249-255.
- [2] W. Filipiak, A. Sponring, A. Filipiak, C. Ager, J. Schubert, W. Miekisch, A. Amann, J. Troppmair, TD-GC-MS Analysis of Volatile Metabolites of Human Lung Cancer and Normal Cells In vitro, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 19 (2010) 182-195.
- [3] C.L. Silva, M. Passos, J.S. Câmara, Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry, *British Journal of Cancer* 105 (2011) 1894-1904.
- [4] Y. Hanai, K. Shimono, K. Matsumura, A. Vachani, S. Albelda, K. Yamazaki, G.K. Bauchamp, H. Oka, Urinary Volatile Compounds as Biomarkers for Lung Cancer, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76 (2012) 679-684.
- [5] Y. He, A. Vargas, Y-J. Kang, Headspace liquid-phase microextraction of methamphetamine and amphetamine in urine by an aqueous drop, *Anal. Chim. Acta* 589 (2007) 225-230.
- [6] S.M. Rocha, M. Caldeira, J. Carrola, M. Santos, N. Cruz, I.F. Duarte, Exploring the human urine metabolomic potentialities by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time of flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1252 (2012) 155-163.
- [7] S. Smith, H. Burden, R. Persad, K. Whittington, B.L. Costello, N.M. Ratcliffe, C.S. Probert, A comparative study of the analysis of human

urine headspace using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Breath Res.* 2 (2008) 1-10.

[8] A. Pérez Antón, A.M. Casas Ferreira, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, J.L. Pérez Pavón, Headspace generation coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the automated determination and quantification of endogenous compounds in urine. Aldehydes as possible markers of oxidative stress, *J. Chromatogr. A* 1367 (2014) 9-15.

[9] M. del Nogal Sánchez, P.Á. Callejo Gómez, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Á.P. Crisolino Pozas, Á. Sánchez Rodríguez, Sensitivity enhancement in the determination of volatile biomarkers in saliva using a mass spectrometry-based electronic nose with a programmed temperature vaporizer, *Anal. Chem.* 86 (2014) 7890-7898.

[10] N. Sakura, S. Nishimura, N. Fujita, A. Namera, M. Yshiki, T. Kojima, Determination of acrolein in human urine by headspace gas chromatography and mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 719 (1998) 209-212.

[11] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, Determination of aromatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in gasoline using programmed temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1202 (2008) 196-202.

[12] Y. Adiguzel, H. Kulah, Breath sensors for lung cancer diagnosis, *Biosens. Bioelectron.* 65 (2015) 121-138.

[13] A. D'Amico, G. Pennazza, M. Santonico, E. Martinelli, C. Roscioni,

G. Galluccio, R. Paolesse, C. di Natale, An investigation on electronic nose diagnosis of lung cancer, *Lung Cancer* 68 (2010) 170-176.

[14] E.H. Oh, H.S. Song, T.H. Park, Recent advances in electronic and bioelectronic noses and their biomedical applications, *Enzyme. Microb. Tech.* 48 (2011) 427-437.

[15] E. Westenbrink, R.P. Arasaradnam, N. O'Connell, C. Bailey, C. Nwokolo, K.D. Bardhan, J.A. Covington, Development and application of a new electronic nose instrument for the detection of colorectal cancer, *Biosens. Bioelectron.* 65 (2015) 733-738.

[16] M. del Nogal Sánchez, E. Hernández García, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Fast analytical methodology based on mass spectrometry for the determination of volatile biomarkers in saliva, *Anal. Chem.* 84 (2012) 379-385.

[17] H. Chen, Z. Pan, N. Talaty, D. Raftery, R.G. Cooks, Combining desorption electrospray ionization mass spectrometry and nuclear magnetic resonance for differential metabolomics without sample preparation, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 20 (2006) 1577-1584.

[18] J. Huang, S. Kumar, N. Abbassi-Ghadi, P. Španěl, D. Smith, G.B. Hanna, Selected Ion Flow Tube Mass Spectrometry Analysis of Volatile Metabolites in Urine Headspace for the Profiling of Gastro-Esophageal Cancer, *Anal. Chem.* 85 (2013) 3409-3416.

[19] J.L. McClay, D.E. Adkins, N.G. Isern, T.M. O'Connell, J.B. Wooten, B.K. Zedler, M.S. Dasika, B.T. Webb, B-J. Webb-Robertson, J.G. Pounds, E.L. Murrelle, M.F. Leppert, E.J.C.G. van der Oord, 1H Nuclear

Magnetic Resonance Metabolomics Analysis Identifies Novel Urinary Biomarkers for Lung Function, *J. Proteome. Res.* 9 (2010) 3083-3090.

[20] J. Carrola, C.M. Rocha, A.S. Barros, A.M. Gil, B.J. Goodfellow, I.M. Carreira, J. Bernardo, A. Gomes, V. Sousa, L. Carvalho, I.F. Duarte, Metabolic Signatures of Lung Cancer in Biofluids: NMR-Based Metabonomics of Urine, *J. Proteome. Res.* 10 (2011) 221-230.

[21] M. Jaffe, Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure im normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins, *Z. Physiolog. Chem.* 10 (1886) 391-400.

[22] J. R. Delanghe, M.M. Speeckaert, Creatinine determination according to Jaffe – what does it stand for?, *NDT Plus* 4 (2011) 83-86.

[23] Enhanced ChemStation, MSD ChemStation E.02.00493, Agilent Technologies: 2008.

[24] The Unscrambler v10.2; Camo Process AS: 2012.

[25] OriginPro v8.0724; OriginLab Corporation: 2007.

[26] R.G. Brereton, Multilevel multifactor designs for multivariate calibration, *Analyst* 122 (1997) 1521-1529.

[27] M. Blanco, M. Castillo, A. Peinado, R. Beneyto, Determination of low analyte concentrations by near-infrared spectroscopy: Effect of spectral pretreatments and estimation of multivariate detection limits, *Anal. Chim. Acta* 581 (2007) 318-323.

VII.

UTILIZACIÓN DE UNA NARIZ ELECTRÓNICA BASADA EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y TÉCNICAS DE RECONOCIMIENTO DE PAUTAS PARA EL ANÁLISIS DE VOLÁTILES EN MUESTRAS DE SALIVA

Talanta 160 (2016) 21-27

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con las guías de la Sociedad Americana del Cáncer (*American Cancer Society*) [1], los métodos de cribado (*screening methods*) para la detección del cáncer en sus primeras fases tienen una influencia satisfactoria en la supervivencia de los pacientes. Hoy en día, métodos como las radiografías, la tomografía computarizada espiral de bajas dosis, la resonancia magnética, la tomografía de emisión de positrones y la broncoscopia de fluorescencia se utilizan para aumentar la supervivencia. Sin embargo, no siempre resultan adecuados para ser aplicados a un amplio grupo de población debido a los efectos secundarios en la salud relacionados con la exposición a la radiación y al coste que suponen.

El análisis de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) en matrices como la saliva [2,3], la orina [4,5] y el aliento [6-8] está ganando interés en los últimos años ya que la inspección del olor puede proporcionar información sobre el estado de salud de un individuo. Algunas investigaciones han demostrado la capacidad del olfato canino para la diferenciación de pacientes con distintos tipos de cáncer de individuos sanos [9,10].

Los sistemas de nariz electrónica son una alternativa interesante para el análisis de compuestos volátiles ya que evalúan el perfil químico total de una muestra en vez de detectar cada compuesto de manera individual. Se ha puesto mucho empeño en el desarrollo de narices electrónicas para aplicaciones biomédicas debido a su potencial en la detección rápida y la caracterización de olores. Su uso en la detección del cáncer es básicamente una adaptación de una antigua práctica

médica [11]. Algunos ejemplos son los relacionados con el olor a putrefacto de abscesos pulmonares o el olor a pescado relacionado con enfermedades hepáticas avanzadas. Desde que Dodd y Persaud introdujeron en 1982 la primera nariz electrónica que utilizaba sensores de óxidos metálicos [12], se han desarrollado varios dispositivos basados en sensores de polímeros conductores, así como sensores ópticos y piezoeléctricos para ser utilizados en la resolución de diversos problemas en campos tan diferentes como el médico y diagnóstico [13-17], el de la alimentación [18,19], el ambiental y de seguridad [20,21] consiguiendo resultados satisfactorios. Se han desarrollado, además, sensores olfativos que imitan el sistema olfativo humano basados en biomateriales como células de mamíferos o proteínas [22].

También se han utilizado narices electrónicas basadas en espectrometría de masas para solucionar muchos problemas en campos como el alimentario y el ambiental [23-26]. Sin embargo, este tipo de narices electrónicas ha sido poco utilizado en el campo biomédico a pesar de las grandes ventajas que aporta: mayor número de sensores en cada análisis, no se produce envenenamiento del sensor y mayor estabilidad de la señal. Hasta la fecha, solo se han encontrado dos contribuciones en las que este método haya sido utilizado para la determinación semi-cuantitativa de biomarcadores volátiles relacionados con el cáncer de pulmón [27,28]. En ambos casos, se desarrollaron métodos para la determinación de compuestos individuales basados en modelos PLS. En uno de ellos [28] se incorpora un inyector de temperatura programada (PTV) entre el generador de espacio de cabeza (HS) y el espectrómetro de masas cuadrupolar (qMS) para mejorar la sensibilidad. Esta nueva configuración en el análisis no

separativo permite alcanzar límites de detección del orden de los pocos $\mu\text{g L}^{-1}$, concentraciones a las que se encuentran muchos de los compuestos orgánicos volátiles en las muestras biológicas de pacientes con cáncer de pulmón [29]. Además de las narices electrónicas basadas en espectrometría de masas, se han utilizado otros métodos sensibles para el seguimiento de biomarcadores como son la espectrometría de movilidad iónica (IMS) [30], la espectrometría de masas de reacción de transferencia de protones (PTR-MS) [31] y tubo de selección de iones con flujo y detección por espectrometría de masas (SIFT-MS) [4,32].

No se ha encontrado bibliografía que utilice técnicas de reconocimiento de pautas para el estudio de señales de perfil generadas por medio de HS-MS, que se centre en el conjunto de la porción volátil de las muestras en lugar de en compuestos individuales y analice las posibilidades que esta metodología presenta para la discriminación entre pacientes e individuos sanos.

2. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es la propuesta de un nuevo método rápido para el análisis del perfil de compuestos volátiles en muestras de saliva. El método se basa en el acoplamiento de tres componentes: un generador de espacio de cabeza (HS), un inyector de temperatura programada (PTV) y un espectrómetro de masas cuadrupolar (qMS).

Se han propuesto diversas aplicaciones con narices electrónicas basadas en distintos tipos de sensores en el campo biomédico. Sin embargo, hasta la fecha, son pocos los trabajos desarrollados en este campo mediante el uso de nariz electrónica basada en espectrometría de masas.

Este trabajo se centra en el análisis por medio de HS-PTV-MS de muestras de pacientes con cáncer y muestras de individuos sanos sometiendo las señales de perfil generadas a técnicas de reconocimiento de pautas con el objetivo de estudiar las posibilidades que ofrece esta metodología para diferenciar a pacientes con cáncer de individuos sanos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Muestras

Se analizaron muestras de 55 adultos de ambos sexos. Las muestras entre la 1 y la 23 pertenecen a pacientes de la Unidad de Medicina Interna del Hospital Virgen de la Vega de Salamanca y las muestras de la 24 a la 55 fueron de voluntarios sanos que no se encontraban aparentemente afectados por ninguna enfermedad. La tabla 1 muestra una descripción general de la patología que presentan los pacientes de este trabajo. El estudio fue autorizado por el Comité Ético del Hospital.

Tabla 1: Descripción general de la patología de los pacientes estudiados

Muestra	Patología
1	Carcinoma no microcítico de pulmón indiferenciado metastásico
2	Adenocarcinoma de pulmón metastásico
3	Carcinoma urotelial infiltrante metastásico
4	Sarcoma indiferenciado metastásico
5	Adenocarcinoma de pulmón metastásico
6	Adenocarcinoma de páncreas metastásico
7	Carcinoma epidermoide de pulmón metastásico
8	Carcinoma epidermoide de pulmón localizado
9	Adenocarcinoma de pulmón metastásico
10	Melanoma metastásico
11	Adenocarcinoma de pulmón metastásico
12	Carcinoma microcítico de pulmón diseminado
13	Carcinoma urotelial infiltrante metastásico
14	Adenocarcinoma de pulmón metastásico

15	Carcinoma no microcítico de pulmón indiferenciado metastásico
16	Carcinoma epidermoide de pulmón metastásico
17	Carcinoma hepatocelular multicéntrico metastásico
18	Adenocarcinoma de páncreas metastásico
19	Adenocarcinoma de pulmón metastásico
20	Adenocarcinoma de pulmón metastásico
21	Carcinoma epidermoide de pulmón localizado
22	Melanoma metastásico
23	Carcinoma intraductal de mama infiltrante no metastásico

3.2. Instrumentación HS-PTV-MS

3.2.1. Preparación de muestra

Para la medida de cada una de las 55 muestras de saliva, 500 μ L se depositan en un vial de 10.0 mL y se cierra herméticamente con un tapón con septo de Teflon®/silicona (Agilent Technologies, DE, Alemania). Las muestras de saliva se recogieron y se analizaron en el mismo día.

3.2.2. Generador de espacio de cabeza

El muestreo mediante espacio de cabeza se llevó a cabo con un automuestreador PAL (CTC Analytics AG, Zwingen, Suiza). Este muestreador está equipado con una bandeja para 32 muestras consecutivas y con un horno con 6 posiciones para viales de muestra. La temperatura del horno se fijó en 70 °C y el tiempo de equilibrado a esa temperatura en 10 min. Durante este tiempo, la muestra es agitada a 750

rpm. Para la inyección de la muestra de espacio de cabeza se utilizó una jeringa a 120 °C y se seleccionó como volumen de inyección el máximo permitido, 2.5 mL. Las velocidades de llenado y de inyección se fijaron en 100 y 250 $\mu\text{L s}^{-1}$, respectivamente. Tras la inyección, la jeringa se limpia durante 2 minutos con un flujo de He N50 (99.999 %, Air Liquide).

3.2.3. Inyector de temperatura programada

La medida de las salivas con el método optimizado se llevó a cabo con un inyector de temperatura programada (PTV) CIS-4 de Gerstel (Baltimore, MD, USA) con un *liner* también de Gerstel para este tipo de inyector de dimensiones 71 mm x 2 mm y relleno de un material adsorbente (Tenax-TA®); se seleccionó el modo de inyección *solvent vent* consiguiendo el enfriamiento necesario mediante CO₂ líquido.

En primer lugar, la muestra de espacio de cabeza se inyecta en interior del *liner* del PTV que se encuentra a una temperatura inicial de 25 °C. Durante este tiempo inicial, la válvula de *split* está abierta permitiendo la eliminación del disolvente y el flujo de venteo se fijó en 50 mL min⁻¹ y se impuso una presión de venteo de 5.0 psi (34474 Pa). Estas condiciones se mantienen durante 0.1 min, tiempo durante el cual se produce la purga de disolvente. El *liner* se mantiene a la temperatura inicial durante 0.05 min más como mecanismo de seguridad que evita que comience la rampa de calentamiento antes de que la válvula de *split* se haya cerrado, evitando la pérdida de analitos. Cuando el tiempo de venteo o purga de disolvente ha finalizado, la válvula de *split* se cierra y el *liner* del PTV se calienta rápidamente con una rampa de 12 °C s⁻¹ hasta 250 °C. Los analitos, entonces, son transferidos desde el *liner* hasta la

columna capilar durante 1.5 min. Una vez pasado este tiempo, la válvula de *split* se abre de nuevo y el *liner* se mantiene a 250 °C durante 0.5 min mientras pasa por él un flujo de purga de 150 mL min⁻¹ que asegura la limpieza del mismo para la siguiente inyección. El tiempo entre dos inyecciones consecutivas se fijó en 6 min para asegurar el enfriamiento del PTV desde la temperatura final de 250 °C hasta la temperatura inicial de 25 °C.

3.2.4. Cromatógrafo de gases

La interfaz entre el inyector de temperatura programada y el espectrómetro de masas es una columna capilar (20 m x 0.18 mm x 1 µm) DB-VRX de baja polaridad de Agilent J&W, que se encuentra en un cromatógrafo de gases (Agilent 6890 GC) y se mantiene a 240 °C durante todo el tiempo de análisis. De esta manera, manteniendo la columna a una temperatura elevada, se suprime su capacidad de separación y esta actúa como una simple línea de transferencia desde el PTV al MS.

3.2.5. Espectrómetro de masas

El detector utilizado fue un espectrómetro de masas cuadrupolar (HP 5973 N) equipado con una fuente de ionización inerte y que opera en modo de ionización electrónica utilizando un voltaje de ionización de 70 eV. Las temperaturas que se fijaron para la fuente de ionización y el cuadrupolo fueron 230 y 150 °C, respectivamente. La adquisición de datos se realizó en el modo *scan* y se midió el rango de masas comprendido entre 25 y 125. La velocidad de barrido fue de 3.46 scan s⁻¹. El tiempo de registro se fijó en 2.5 min. Del conjunto de masas registradas, se eliminaron en los perfiles obtenidos las masas 28, 32, 40 y

44 que corresponden a los gases del espacio de cabeza (N_2 , O_2 , Ar, CO y CO_2) que no provienen de la muestra de saliva y enmascaran a los componentes minoritarios.

3.2.6. Análisis de datos

La recogida de los datos cromatográficos se realizó con el software Enhanced ChemStation [33] G1701EA versión E.00.00.202 de Agilent Technologies.

Las técnicas de reconocimiento de pautas SIMCA, LDA y SVM se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico Unscrambler® v10.2 [34] y PCA y KNN con el software Pirouette 3.11 de Infometrix Inc. (Woodinville, WA) [35].

3.2.7. Método optimizado HS-PTV-MS

Las condiciones experimentales óptimas de todos los módulos que componen la configuración instrumental utilizada en este trabajo se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Condiciones experimentales del método optimizado

GENERADOR DE ESPACIO DE CABEZA		
Volumen de muestra		500 μ L de saliva
Temperatura del horno		70 $^{\circ}$ C
Tiempo de generación del espacio de cabeza		10 min
Velocidad de agitación		750 rpm
Tiempo entre muestras		6 min
INYECTOR DE TEMPERATURA PROGRAMADA		
<i>Liner</i>		<i>Liner</i> relleno de Tenax-TA®
	Flujo de purga	50 mL min ⁻¹
	Tiempo de purga	0.10 min
Modo de inyección:	Tiempo de inyección	1.5 min
<i>Solvent Vent</i>	Flujo de limpieza	150 mL min ⁻¹
	Temperatura	25 $^{\circ}$ C
	Rampa	12 $^{\circ}$ C s ⁻¹ hasta 250 $^{\circ}$ C
CROMATÓGRAFO DE GASES		
Línea de transferencia		Columna capilar DB-VRX (baja polaridad)
Horno	Temperatura	240 $^{\circ}$ C todo el tiempo de análisis
ESPECTRÓMETRO DE MASAS		
Modo de adquisición de datos		<i>scan</i>
Relaciones m/z		25 - 125 (N=0)
Velocidad de barrido		3.46 scan s ⁻¹

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Estudio de las señales obtenidas

Los compuestos volátiles generados en el espacio de cabeza se introdujeron en el inyector de temperatura programada donde quedaban retenidos en el *liner* por focalización a baja temperatura mientras otros compuestos más volátiles y el disolvente eran eliminados. Después, los analitos pasan a la columna cromatográfica, que actúa en esta configuración como una simple línea de transferencia entre el inyector y el detector. La suma de las intensidades de todos los iones del rango seleccionado (25 - 125 m/z) detectados durante el tiempo de adquisición genera un espectro que es el utilizado como señal analítica de las muestras de saliva. La figura 1 muestra una comparación entre el espectro de masas medio de todas las muestras de pacientes y de individuos sanos.

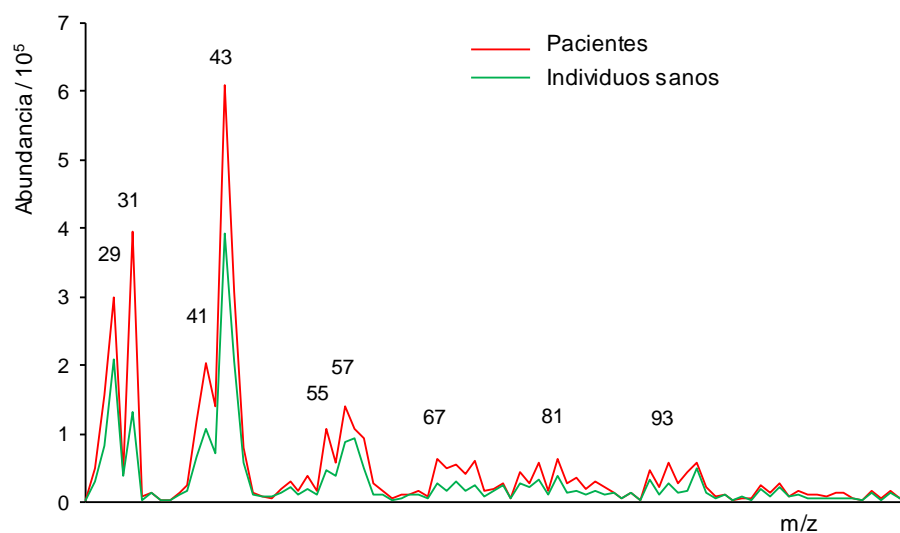


Figura 1: Comparación entre el espectro medio de todos los pacientes (línea roja) y el de los individuos sanos (línea verde) que representa la suma de las intensidades de todos los iones detectados desde el tiempo 0 a 2.5 min (las masas principales de los gases N₂, O₂, Ar, CO y CO₂ han sido eliminadas de los espectros)

Entre las relaciones masa/carga que más diferencias presentan entre ambos grupos se encuentran las siguientes: 29, 31, 41, 43, 55, 57, 67, 81 y 93.

Antes de llevar a cabo las diferentes técnicas de reconocimiento de pautas, las señales de perfil (datos en bruto) se sometieron a dos procesos distintos de normalización interna consistentes en la expresión de cada una de las variables (relaciones m/z) de cada espectro individual como un porcentaje del valor de la variable máxima o como un porcentaje del valor de la suma de todas las variables medidas para esa muestra. Ambas normalizaciones se probaron con las diferentes técnicas quimiométricas de reconocimiento de pautas (PCA, SIMCA, KNN, DA y SVM) y se escogió, para cada una, aquella con la que se obtenían mejores resultados en la clasificación de las muestras.

Cuando se utilizaron técnicas de reconocimiento de pautas supervisadas, el estudio de las señales se llevó a cabo en dos pasos. En el primero, se construyó un modelo de clasificación en el que el grupo de entrenamiento consistía en 14 muestras de saliva (13 hombres y 1 mujer) de pacientes con cáncer (tabla 1, muestras n^{os} 1 - 14) para definir la clase 1 y 20 muestras de saliva (10 hombres y 10 mujeres) de individuos voluntarios sanos para definir la clase 2 (muestras n^{os} 24 - 43). El segundo paso consiste en la predicción de un grupo de validación externa para comprobar la capacidad de predicción del modelo generado en el paso anterior. Este grupo se formó con 9 muestras (7 hombres y 2 mujeres) de pacientes con cáncer (tabla 1, muestras n^{os} 15 - 23) y 12 muestras (5 hombres y 7 mujeres) de saliva de individuos sanos (muestras n^{os} 44 - 55). Por lo tanto, el grupo de entrenamiento y el grupo

de validación tienen 34 y 21 muestras, respectivamente.

Para comprobar que el sexo no es un factor que afecte a los resultados, se llevó a cabo el test *U* de Mann-Whitney con las muestras de individuos sanos del grupo de entrenamiento separadas por sexos. No se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) para ninguna de las relaciones m/z medidas.

4.2. Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (PCA) se llevó a cabo, en este caso, utilizando todas las muestras disponibles (32 muestras de saliva de individuos voluntarios sanos y 23 muestras de saliva de pacientes con cáncer). Los mejores resultados se obtuvieron con la normalización de los datos a la suma de los valores de las variables.

El porcentaje de la varianza explicada acumulada por cada uno de los tres primeros componentes principales fue 49, 77 y 88 %, respectivamente. La figura 2 muestra un gráfico de puntuaciones de las muestras para los tres primeros componentes principales.

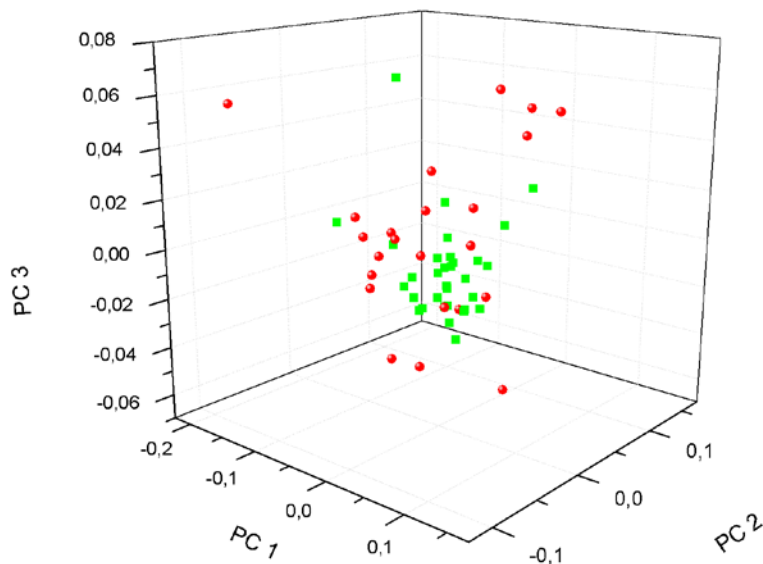


Figura 2: Gráfico de puntuaciones para las 55 muestras de saliva correspondientes a pacientes con cáncer (círculos rojos) y a voluntarios sanos (cuadrados verdes)

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que los dos grupos de muestras no son fácilmente separables mediante análisis de componentes principales. Con ninguna otra combinación de PCs se obtuvo una mejor separación entre clases.

4.3. Modelado independiente de clases

El modelado independiente de clases (SIMCA) se llevó a cabo con el mismo proceso de normalización de los datos que se utilizó en PCA, aquel en el que cada variable de cada espectro individual se transformaba en un porcentaje de la suma de todas las variables. El número óptimo de PCs fue de 5 y 6 para los modelos de individuos sanos y pacientes con cáncer, respectivamente.

El diagrama de *Coomans* para el modelo de clasificación y para la predicción del grupo de muestras de validación externa se muestran en la figura 3.

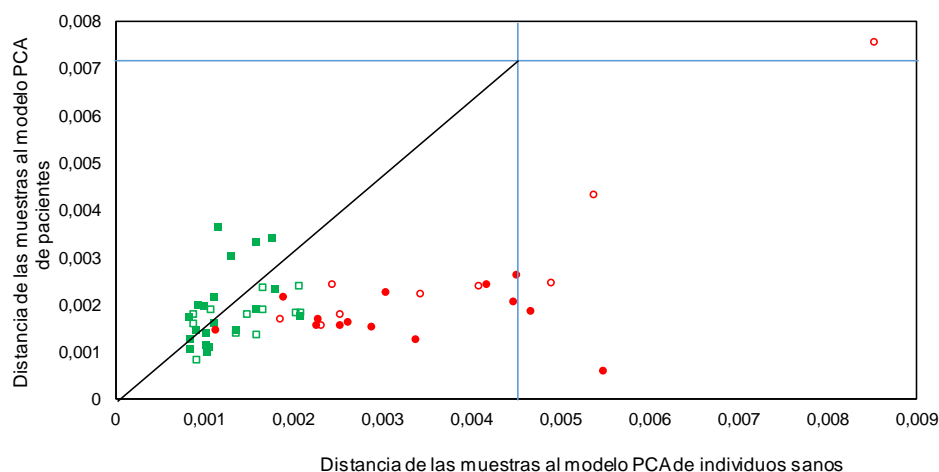


Figura 3: Diagrama de *Coomans* del modelo de clasificación (cuadrados verdes rellenos para los individuos sanos y círculos rojos rellenos para los pacientes con cáncer) y de la predicción de las muestras de validación externa (cuadrados verdes vacíos para los individuos sanos y círculos rojos vacíos para los pacientes con cáncer)

Como se puede observar, no existe suficiente distancia entre las clases en el grupo de clasificación (cuadrados verdes rellenos: individuos sanos y círculos rojos rellenos: pacientes con cáncer) ya que la mayoría de las muestras se encuentra en la región común a ambas clases. Por lo tanto, las muestras correspondientes al grupo de validación externa (cuadrados verdes vacíos: individuos sanos y círculos rojos vacíos: pacientes con cáncer) se encuentran también en la región común a las dos clases. Los malos resultados obtenidos con SIMCA eran esperables debido a que esta técnica se basa en la técnica PCA.

4.4. K-vecinos más próximos

Las señales de perfil se sometieron al proceso de normalización en el cual cada espectro individual se transforma en un porcentaje de su valor máximo y se llevó a cabo el análisis de los k-vecinos más próximos (KNN) utilizando la distancia Euclídea como medida de similitud. La figura 4 muestra el número de muestras mal clasificadas en el grupo de entrenamiento para los diferentes números de vecinos seleccionados.

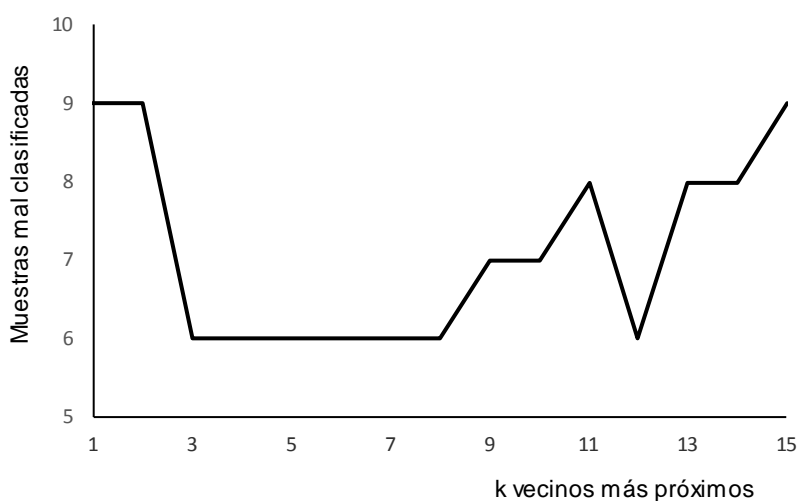


Figura 4: Muestras mal clasificadas en el grupo de entrenamiento frente al número de vecinos más próximos

Los mejores resultados se obtuvieron seleccionando 3 vecinos. En este caso, 6 muestras de saliva del grupo de entrenamiento (2 muestras de individuos sanos y 4 muestras de pacientes con cáncer) eran mal clasificadas. La capacidad de predicción de la técnica se determinó analizando las muestras de validación externa que no habían sido usadas en ninguna etapa en el grupo de entrenamiento. Dos muestras correspondientes a pacientes con cáncer (muestras n^{os} 20 y 23, tabla 1)

fueron asignadas a la clase de individuos sanos y una muestra correspondiente a un individuo sano fue asignada al grupo de pacientes. La consecuencia de obtener falsos negativos es más preocupante que la de obtener falsos positivos. Cuando un método falla en la detección de “positivos” cuando existe enfermedad, el individuo al que pertenece esa muestra no es diagnosticado de la enfermedad y pierde la oportunidad de la intervención médica correspondiente. Sin embargo, cuando se obtiene un falso positivo, el individuo puede ser sometido a pruebas costosas y no necesarias, pero que en general, no le van a influir en su estado de salud.

4.5. Análisis discriminante

Los mejores resultados para el análisis discriminante (DA) se obtuvieron con la normalización en la que cada espectro individual se transformó en un porcentaje del total de la suma de todos los fragmentos de masas y los grupos de entrenamiento y de validación fueron los mismos que los utilizados en el resto de técnicas descritas anteriormente.

Cuando, como en este caso, el número de variables es mayor que el número de muestras del grupo de entrenamiento, hay que realizar un análisis PCA-DA, es decir, por medio de un análisis PCA, se reduce la dimensionalidad de los datos antes de llevar a cabo el análisis discriminante. PCA-DA utiliza un espacio de proyección común para todas las clases en el grupo de entrenamiento, a diferencia de lo que ocurría en SIMCA en la que se realizaba un PCA para cada una de las clases o categorías.

Se realizaron tres métodos distintos de análisis discriminante: lineal, cuadrático y Mahalanobis. En todos los casos se realizaron previamente PCAs con 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 componentes principales. Los resultados obtenidos para todos los modelos construidos se muestran en la tabla 3 (grupo de entrenamiento). Los mejores resultados corresponden a los obtenidos con un Análisis Discriminante de Mahalanobis con 9 PCs. Todas las muestras del grupo de entrenamiento fueron clasificadas correctamente. La figura 5a muestra el gráfico de puntuaciones del grupo de entrenamiento. La predicción de las muestras del grupo de validación externa se muestra también en la tabla 3.

Tabla 3: Muestras mal clasificadas y % de asignación correcta de muestras en el grupo de entrenamiento y en el de validación externa cuando se utiliza la estrategia PCA-DA con distinto número de PCs

Tipo de DA	Grupo de entrenamiento			Grupo de validación externa			
	PCs	Falsos positivos	Falsos negativos	% Asignación correcta	Falsos positivos	Falsos negativos	% Asignación correcta
Lineal	5	2	5	79	5	3	62
	6	3	5	76	3	4	67
	7	1	3	88	4	3	67
	8	1	3	88	3	2	76
	9	1	3	88	3	3	71
	10	2	2	88	3	4	67
	11	3	2	85	3	3	71
Cuadrático	5	2	3	85	4	4	62
	6	1	3	88	3	2	76
	7	0	3	91	1	1	90
	8	0	1	97	3	1	81
	9	0	1	97	1	1	90
	10	0	1	97	0	2	90
Mahalanobis	11	0	1	97	1	2	86
	5	9	0	74	8	0	62
	6	9	0	74	10	0	52
	7	4	0	88	9	0	57
	8	5	0	85	9	0	57
	9	0	0	100	2	0	90
10	1	0	97	2	1	86	
11	1	0	97	2	1	86	

Cuando se escoge el mejor modelo, todas las muestras correspondientes a pacientes con cáncer fueron clasificadas correctamente en su clase y solo dos muestras de voluntarios sanos se clasificaron incorrectamente. La figura 5b muestra el gráfico de puntuaciones para el grupo de validación.

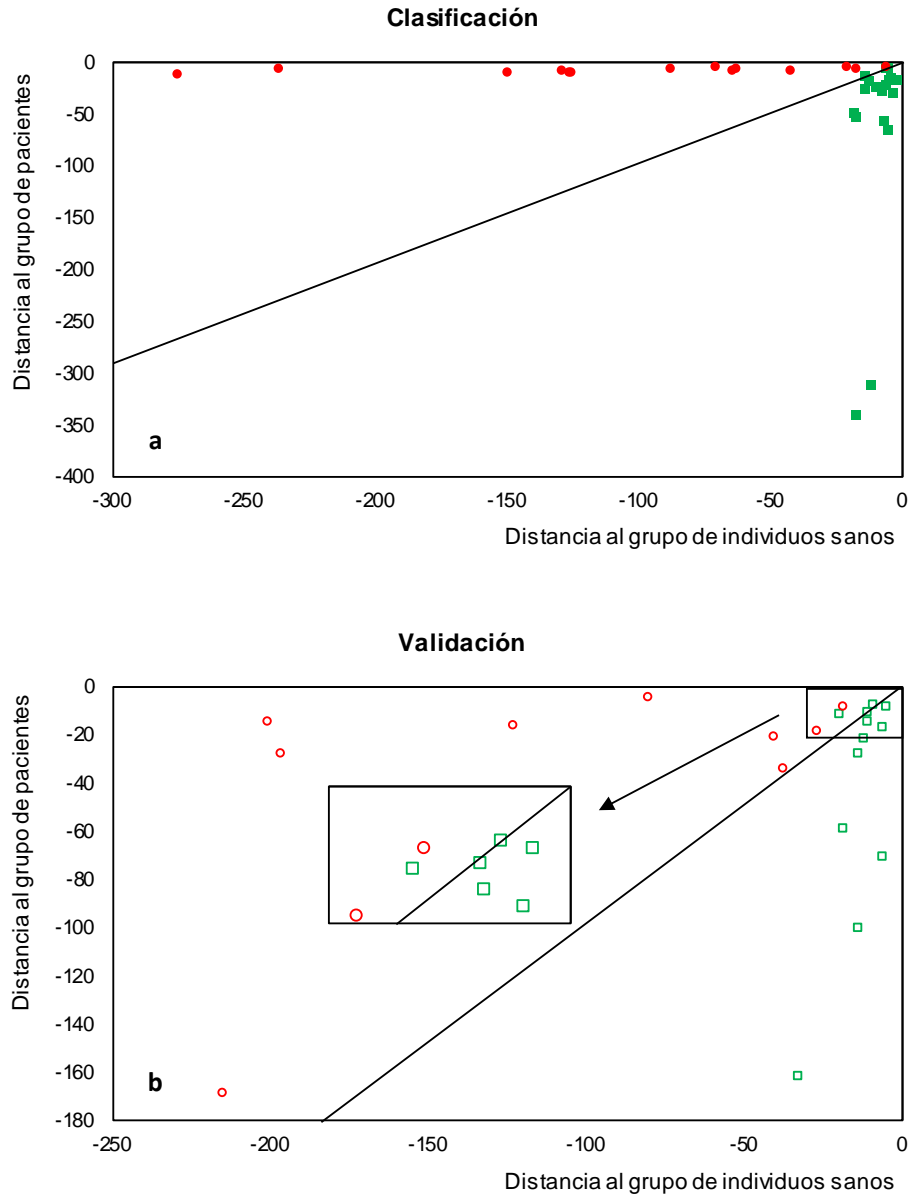


Figura 5: Gráfico de puntuaciones discriminantes para (a) el modelo correspondiente a Mahalanobis (9 PCs) y para (b) la predicción del grupo de validación externa

Es importante enfatizar que no se obtuvieron falsos negativos cuando se utilizó el mejor modelo para predecir las muestras del grupo de validación externa.

La sensibilidad de la técnica se define como la habilidad de identificar el cáncer cuando se encuentra presente, y en este caso sería del 100 % ya que todas las muestras de pacientes con cáncer en el grupo de validación externa fueron bien clasificadas (9/9). La especificidad, sin embargo, mide la habilidad de la técnica de descartar la existencia de enfermedad cuando realmente esta está ausente en la muestra, y en este caso es de 83 % (10/12) ya que 10 de las 12 muestras de individuos sanos fueron clasificadas como pertenecientes a dicho grupo.

4.6. Modelo de las muestras apoyadas en la frontera

Como en el caso de las otras técnicas estudiadas, los datos se sometieron al proceso de normalización y en este caso se escogió la normalización en la que cada espectro individual se transforma en un porcentaje del valor máximo y de igual manera, se mantuvieron los grupos de entrenamiento y de validación externa empleados para las otras técnicas.

Se estudiaron los resultados obtenidos para el grupo de entrenamiento tanto con funciones lineales como con tres tipos de funciones *kernel* (polinómicas, radiales y sigmoides). Se comprobaron diferentes pares de valores de C y γ , parámetros clave para obtener una alta exactitud en los modelos generados, mediante un método de búsqueda en una cuadrícula (*grid*) de valores generados por validación cruzada de 5 iteraciones (*five-fold cross validation*) seleccionándose en cada caso aquellos con los que se obtenía una mayor exactitud.

La mayor exactitud en el modelo final generado, se obtuvo para la función radial (100 %). La figura 6 muestra la cuadrícula de exactitudes

para todos los posibles pares de valores C (desde 1 hasta 1000) y γ (desde 0.01 hasta 100) para la función radial. Para facilitar la lectura de la figura 6, se han representado en los ejes el logaritmo de C y de γ .

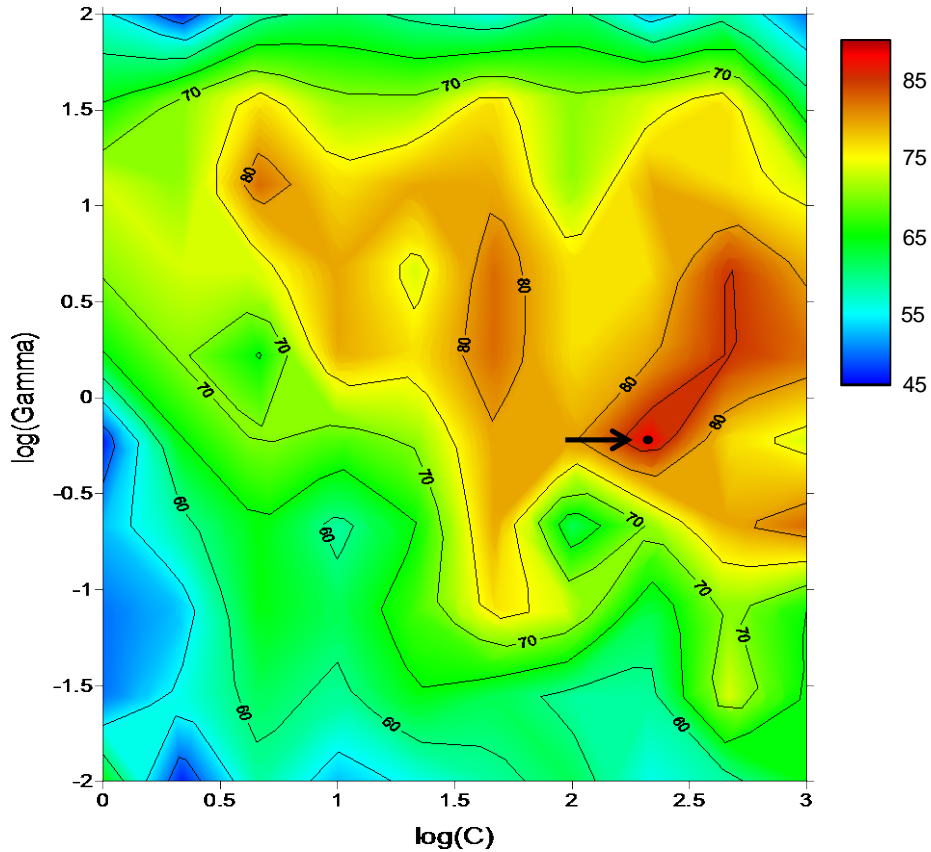


Figura 6: Cuadrícula de resultados de exactitud obtenidos por medio de validación cruzada para el grupo de entrenamiento en función del par de valores de C y γ escogidos

La pareja de valores $C = 215.443$ y $\gamma = 0.599$ ($\log C = 2.33$ y $\log \gamma = -0.22$) era la que daba un mayor valor de exactitud calculado por medio de validación cruzada de 5 iteraciones (88 %) en la cuadrícula. El número de vectores soportados en la frontera en el modelo construido con estos parámetros fue de 16 (8 muestras de voluntarios sanos y 8 muestras de pacientes con cáncer). En el modelo generado ninguna muestra resultó

mal clasificada.

Este modelo fue utilizado para predecir el grupo de muestras de validación externa. Todas las muestras de los pacientes con cáncer y de los individuos sanos fueron clasificadas correctamente. Así, en este caso tanto la sensibilidad (9/9) como la especificidad (12/12) fueron del 100 %.

4.7. Resumen de los resultados obtenidos con las diferentes técnicas de reconocimiento de pautas

La tabla 4 muestra un resumen de los resultados obtenidos en la predicción de las muestras de saliva correspondientes al grupo de validación externa cuando se utilizan las técnicas SVM, DA y KNN.

Todos los individuos a los que se les había diagnosticado cáncer fueron clasificados correctamente con el modelo de SVM y el de análisis discriminante con distancia de Mahalanobis. En el caso de KNN, dos pacientes fueron mal clasificados (muestras n^{os} 20 y 23). En cuanto a los individuos sanos, con este último modelo, un sano fue mal clasificado (muestra n^o 53). En el caso del análisis discriminante de Mahalanobis, dos muestras de sanos fueron clasificadas de forma incorrecta (muestras n^{os} 52 y 54) y en el caso del modelo de SVM todas las muestras de individuos sanos fueron correctamente clasificadas.

Tabla 4: *Clasificación de las muestras correspondientes al grupo de validación externa en clase + (con cáncer) y clase - (sanos)*

Muestra	SVM	Mahalanobis DA	KNN
Pacientes en el grupo de validación externa			
15	+	+	+
16	+	+	+
17	+	+	+
18	+	+	+
19	+	+	+
20	+	+	-
21	+	+	+
22	+	+	+
23	+	+	-
Voluntarios sanos en el grupo de validación externa			
43	-	-	-
44	-	-	-
45	-	-	-
46	-	-	-
47	-	-	-
48	-	-	-
49	-	-	-
50	-	-	-
51	-	-	-
52	-	+	-
53	-	-	+
54	-	+	-
55	-	-	-

En la tabla 5 se muestra un resumen de los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos para estas tres técnicas de clasificación junto con los valores del valor predictivo positivo (*positive predictive value*, PPV) y valor predictivo negativo (*negative predictive value*, NPV). El valor predictivo positivo mide la probabilidad de que un resultado positivo esté correctamente predicho y el valor predictivo negativo mide la probabilidad de que un resultado negativo esté correctamente predicho. Estos dos valores, sin embargo, al contrario que la sensibilidad y especificidad, están fuertemente influenciados por la población mediada (prevalencia).

Tabla 5: *Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (PPV) y valor predictivo negativo (NPV) para los tres mejores métodos de clasificación*

Método de clasificación	Sensibilidad %	Especificidad %	PPV %	NPV %
KNN	78	92	87	85
Mahalanobis DA	100	83	82	100
SVM	100	100	100	100

5. CONCLUSIONES

Las señales de perfil correspondientes a muestras de saliva medidas por medio de la configuración HS-PTV-MS contienen suficiente información para discriminar pacientes con cáncer de individuos voluntarios sanos.

El método propuesto es rápido, ya que no necesita llevar a cabo la separación previa de los analitos; simple, ya que la única preparación que se necesita es depositar 500 μL de saliva directamente en un vial de muestra y la toma de muestra de saliva es no invasiva.

Las señales de perfil se sometieron a diferentes técnicas de reconocimiento de pautas y se obtuvieron buenos resultados en el caso de aquellas técnicas que permitían modelar datos no linealmente separables.

Con los modelos de análisis discriminante lineal con distancia de Mahalanobis y de las muestras apoyadas en la frontera no se obtuvieron falsos negativos. Esto constituye un logro importante en un método de *screening* o cribado de muestras. Además, con la técnica SVM se consigue un 100 % de especificidad. El método propuesto, por tanto, podría servir para disminuir el número de individuos que tienen que ser sometidos a análisis médicos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] R. Wender, E.T. H Fontham, E. Barrera, G.A. Colditz, T.R. Church et al., American Cancer Society Lung Cancer Screening Guidelines, *CA Cancer J. Clin.* 63 (2013) 107-117.
- [2] H. AL-Kateb, B. de Lacy Costello, N. Ratcliffe, An investigation of volatile organic compounds from the saliva of healthy individuals using headspace-trap/GC-MS, *J. Breath Res.* 7 (2013) 036004, 1-13.
- [3] J. S. Brown, P.A. Prada, A.M. Curran, K.G. Furton, Applicability of emanating volatile organic compounds from various forensic specimens for individual differentiation, *Forensic Sci. Int.* 226 (2013) 173-182.
- [4] P. Spanel, D. Smith, T.A. Holland, W. Al Singary, J.B. Elder, Analysis of formaldehyde in the headspace of urine from bladder and prostate cancer patients using selected ion flow tube mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 1354-1359.
- [5] A. Pérez Antón, A.M. Casas Ferreira, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, J.L. Pérez Pavón, Headspace generation coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the automated determination and quantification of endogenous compounds in urine. Aldehydes as possible markers of oxidative stress, *J. Chromatogr. A* 1367 (2014) 9-15.
- [6] J. Rudnicka, T. Kowalkowski, T. Ligor, B. Buszewski, Determination of volatile organic compounds as biomarkers of lung cancer by SPME-GC-TOF/MS and chemometrics, *J. Chromatogr. B* 879 (2011) 3360-3366.
- [7] B. Buszewski, J. Rudnicka, T. Ligor, M. Walczak, T. Jezierski, A.

Amann, Analytical and unconventional methods of cancer detection using odor, *TrAC-Trend. Anal. Chem.* 38 (2012) 1-12.

[8] M. Zhou, Y. Liu, Y. Duan, Breath biomarkers in diagnosis of pulmonary diseases, *Clin. Chim. Acta* 413 (2012) 1770-1780.

[9] G. Lippi, G. Cervellin, Canine olfactory detection of cancer versus laboratory testing: myth or opportunity?, *Clin. Chem. Lab. Med.* 50 (2012) 435-439.

[10] H. Sonoda, S. Kohnoe, T. Yamazato, Y. Satoh, G. Morizono et al., Colorectal cancer screening with odour material by canine scent detection, *Gut* 60 (2011) 814-819.

[11] Y. Adiguzel, H. Kulah, Breath sensors for lung cancer diagnosis, *Biosens. Bioelectron.* 65 (2015) 121-138.

[12] K. Persaud, G. Dodd, Analysis of discrimination mechanisms in the mammalian olfactory system using a model nose, *Nature* 299 (1982) 352-355.

[13] E. Westenbrink, R.P. Arasaradnam, N. O'Connell, C. Bailey, C. Nwokolo, K.D. Bardhan, J.A. Covington, Development and application of a new electronic nose instrument for the detection of colorectal cancer, *Biosens. Bioelectron.* 67 (2015) 733-738.

[14] A. D'Amico, G. Pennazza, M. Santonico, E. Martinelli, C. Roscioni, G. Galluccio, R. Paolesse, C. Di Natale, An investigation on electronic nose diagnosis of lung cancer, *Lung Cancer* 68 (2010) 170-176.

[15] R.M. Schnabel, M.L.L. Boumans, A. Smolinska, E.E. Stobberingh,

R. Kaufmann, P.M.H.J. Roekaerts, D.C.J.J. Bergmans, Electronic nose analysis of exhaled breath to diagnose ventilator-associated pneumonia, *Respir. Med.* 109 (2015) 1454-1459.

[16] S. Dragonieri, J.T. Annema, R. Schot, M.P.C. van der Schee, A. Spanevello, P. Carratú, O. Resta, K.F. Rabe, P.J. Sterk, An electronic nose in the discrimination of patients with non-small cell lung cancer and COPD, *Lung Cancer* 64 (2009) 166-170.

[17] M. Santonico, G. Lucantoni, G. Pennaza, R. Capuano, G. Galluccio, C. Roscioni, G. La Delfa, D. Consoli, E. Martinelli, R. Paolesse, C. Di Natale, A. D' Amico, In situ detection of lung cancer volatile fingerprints using bronchoscopic air-sampling, *Lung Cancer* 77 (2012) 46-50.

[18] E. Gobbi, M. Falasconi, G. Zambotti, V. Sberveglieri, A. Pulvirenti, G. Sberveglieri, Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae in vegetable soups by a metal oxide sensor based electronic nose, *Sens. Actuators B* 207 (2015) 1104-1113.

[19] M. Peris, L. Escuder-Gilabert, On-line monitoring of food fermentation processes using electronic noses and electronic tongues: A review, *Anal. Chim. Acta* 804 (2013) 29-36.

[20] S. Deshmukh, R. Bandyopadhyay, N. Bhattacharyya, R.A. Pandey, A. Jana, Application of electronic nose for industrial odors and gaseous emissions measurement and monitoring - An overview, *Talanta* 144 (2015) 329-340.

[21] J. Gutiérrez, M.C. Horrillo, Advances in artificial olfaction: Sensors and applications, *Talanta* 124 (2014) 95-105.

- [22] E.H. Oh, H.S. Song, T.H. Park, Recent advances in electronics and bioelectronics noses and their biomedical applications, *Enzyme Microb. Tech.* 48 (2011) 427-437.
- [23] W. Cynkar, R. Damberg, P. Smith, D. Cozzolino, Classification of Tempranillo wines according to geographic origin: Combination of mass spectrometry based electronic nose and chemometrics, *Anal. Chim. Acta* 660 (2010) 227-231.
- [24] J. Sung, B.-K. Kim, B.-S. Kim, Y. Kim, Mass spectrometry-based electric nose system for assessing rice quality during storage at different temperatures, *J. Stored Prod. Res.* 59 (2014) 204-208.
- [25] D. Cozzolino, H.E. Smyth, W. Cynkar, R.G. Damberg, M. Gishen, Usefulness of chemometrics and mass spectrometry-based electronic nose to classify Australian white wines by their varietal origin, *Talanta* 68 (2005) 382-387.
- [26] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, C. García Pinto, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, A. Guerrero Peña, Strategies for qualitative and quantitative analyses with mass spectrometry-based electronic noses, *TrAC-Trend. Anal. Chem.* 25 (2006) 257-266.
- [27] M. del Nogal Sánchez, E. Hernández García, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Fast analytical methodology based on mass spectrometry for the determination of volatile biomarkers in saliva, *Anal. Chem.* 84 (2012) 379-385.
- [28] M. del Nogal Sánchez, P.Á. Callejo Gómez, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Á.P. Crisolino Pozas, Á. Sánchez Rodríguez,

Sensitivity enhancement in the determination of volatile biomarkers in saliva using a mass spectrometry-based electronic nose with a programmed temperature vaporizer, *Anal. Chem.* 86 (2014) 7890-7898.

[29] Y. Hanai, K. Shimono, K. Matsumura, A. Vachani, S. Albelda, K. Yamazaki, G.K. Bauchamp, H. Oka, Urinary Volatile Compounds as Biomarkers for Lung Cancer, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76 (2012) 679-684.

[30] E. Jazan, H. Mirzaei, Direct analysis of human breath ammonia using corona discharge ion mobility spectrometry, *J. Pharmaceut. Biomed.* 88 (2014) 315-320.

[31] M.E. O'Hara, T.H. Clutton-Brock, S. Green, S. O'Hehir, C.A. Mayhew, Mass spectrometric investigations to obtain the first direct comparisons of endogenous breath and blood volatile organic compound concentrations in healthy volunteers, *Int. J. Mass Spectrom.* 281 (2009) 92-96.

[32] A. Ulanowska, T. Ligor, M. Michel, B. Buszewski, Hyphenated and unconventional methods for searching volatile cancer biomarkers, *Ecol. Chem. Eng. S.* 17 (2010) 9-23.

[33] Enhanced ChemStation, MSD ChemStation E.02.00493, Agilent Technologies: 2008.

[34] The Unscrambler v10.2; Camo Process AS: 2012.

[35] Pirouette: Comprehensive Chemometrics Modeling Software, Ver. 3.11; Infometrix, Inc.: Woodinville, WA, 2003.

VIII. CONCLUSIONES

En la presente memoria se han propuesto nuevas metodologías analíticas encaminadas a conseguir una reducción significativa del esfuerzo necesario para llevar a cabo la etapa de tratamiento de muestra con el fin de minimizar costes y tiempo y reducir los errores asociados a esta etapa del proceso analítico.

Con el fin de estudiar las posibilidades de estas nuevas metodologías, se han puesto a punto diferentes métodos analíticos para la resolución de problemas concretos dentro del campo de la alimentación, así como el de la salud.

A continuación, se exponen las principales conclusiones obtenidas, unas de carácter general, referidas a las metodologías utilizadas y otras particulares de las diferentes aplicaciones que se han desarrollado.

✓ **Utilización de la técnica de microextracción con sorbentes empaquetados.**

Se han estudiado las posibilidades que ofrece esta técnica de microextracción. La nueva técnica reduce, por un lado, el volumen de muestra necesario para llevar a cabo la preconcentración de los analitos, frente a los utilizados en otras técnicas de extracción, y por otro, el volumen de disolvente orgánico con el que se lleva a cabo la elución de los compuestos retenidos.

En la aplicación concreta que se propone en esta memoria, se ha comprobado la utilidad de la técnica MEPS con un sorbente empaquetado C₁₈ para la extracción de los haloanisoles del vino pasándolo directamente a través del cartucho que contiene el sorbente,

utilizando para la elución un volumen de 50 μ L de etanol.

✓ **Estudio de las posibilidades de las columnas capilares con fases estacionarias de líquidos iónicos en cromatografía de gases.**

El uso de columnas de líquidos iónicos, que presentan diferentes polaridades, facilita la separación cromatográfica de compuestos difícilmente separables mediante el uso de columnas convencionales con baja polaridad. Los haloanisoles, como compuestos objeto de estudio en este trabajo, presentan buena resolución con todas las columnas de líquidos iónicos estudiadas. Sin embargo, teniendo en cuenta la separación de estos compuestos de otros interferentes existentes en la matriz, la columna que mejor permite esta separación es la columna SLB™-IL59 cuya fase estacionaria es de *bis(trifluorometilsulfonyl)imidato de 1,12-di(tripropilfosfonio)dodecano*.

✓ **Acoplamiento de un generador de espacio de cabeza con un inyector de temperatura programada para el análisis cromatográfico de compuestos volátiles en muestras de orina.**

Se han comprobado las ventajas que supone la utilización de la técnica de pretratamiento de muestra de generación de espacio de cabeza para el análisis de compuestos volátiles en muestras de orina. Esta técnica permite el análisis de compuestos de interés presentes en estas matrices separándolos de otros compuestos interferentes no volátiles sin tener que recurrir a etapas de pretratamiento adicionales. El acoplamiento de esta técnica con un inyector de temperatura programada aumenta la sensibilidad de la metodología permitiendo la

focalización térmica de los compuestos volátiles extraídos en el espacio de cabeza mediante el modo de inyección *solvent vent* que, además, facilita la eliminación del disolvente.

Concretamente, se ha propuesto esta configuración para el análisis de cinco aldehídos en orina, consiguiéndose su determinación y cuantificación sin necesidad de una derivatización previa, comúnmente utilizada para el análisis de estos compuestos.

También se ha propuesto esta metodología para la cuantificación en orina de otros cinco compuestos (cetonas y alcoholes), posibles biomarcadores de cáncer de pulmón, obteniéndose, asimismo, buenos resultados para su separación y cuantificación.

- ✓ **Utilización de una nariz electrónica basada en el acoplamiento de un generador de espacio de cabeza con un inyector de temperatura programada y un espectrómetro de masas para la obtención de señales de perfil de muestras de orina y saliva.**

La utilización de una nariz electrónica basada en el acoplamiento HS-PTV-MS es una técnica rápida y sencilla, ventajas importantes cuando se trata de analizar muestras biológicas y proponer metodologías para su potencial uso en análisis de rutina. El procedimiento no incluye etapa de separación cromatográfica y la manipulación de la muestra se reduce a la colocación de un determinado volumen de la misma en el vial de generación de espacio de cabeza. El estudio en matrices de orina y saliva es especialmente interesante ya que ambas pueden ser recolectadas de forma no invasiva.

La configuración propuesta, que incluye la utilización de una columna cromatográfica a alta temperatura (240 °C) como línea de transferencia entre el inyector y el detector, permite proponer una metodología no separativa para el estudio de señales de perfil de manera aislada o bien una metodología de este tipo como etapa de cribado de muestras seguida de una etapa de confirmación que sí incluya separación cromatográfica.

Se han descrito en esta memoria dos metodologías que utilizan una nariz electrónica de estas características. Por un lado, se propone la utilización de este acoplamiento para el análisis de cinco posibles biomarcadores de cáncer de pulmón en muestras de orina. En esta primera aplicación, se ha utilizado la calibración PLS para la cuantificación de estos compuestos a partir de señales de perfil como etapa de criba en muestras de orina de individuos sanos y enfermos.

En una segunda aplicación, se utiliza la nariz electrónica descrita para la obtención de señales de perfil de muestras de saliva de individuos sanos y enfermos. El estudio y tratamiento de la información contenida en estas señales ha resultado útil para fines de clasificación sin llevar a cabo cuantificación de compuestos individuales.

- ✓ **Utilización de técnicas quimiométricas para el estudio de señales de tipo perfil obtenidas mediante metodologías no separativas para la clasificación de muestras de saliva de individuos sanos y enfermos.**

La utilización de diferentes técnicas de reconocimiento de pautas permite la clasificación de muestras a partir de señales de tipo perfil que

contienen información de un gran número de variables. De entre las distintas técnicas existentes, aquellas que permiten trabajar con datos no linealmente separables son las que mejores resultados aportan.

Concretamente, para la clasificación de muestras de saliva de individuos sanos y enfermos se ha comprobado la utilidad de las técnicas de reconocimiento de pautas supervisadas de los k-vecinos más próximos, el análisis discriminante y el modelo de las muestras apoyadas en la frontera, siendo esta última la técnica con la que mejores resultados se obtienen.

VERSIÓN RESUMIDA EN INGLÉS
SUMMARY IN ENGLISH

TABLE OF CONTENTS

I.	AIM	331
II.	INTRODUCTION	335
III.	INSTRUMENTAL CONFIGURATIONS	343
1.	HAND-HELD AUTOMATED SYRINGE FOR MICROEXTRACTION BY PACKED SORBENT AND GAS CHROMATOGRAPHY WITH PROGRAMMED TEMPERATURE VAPORIZER AND MICRO-ELECTRON CAPTURE DETECTOR	344
1.1.	Hand-held automated syringe for microextraction by packed sorbents	344
1.2.	Sample injection system	345
1.3.	Programmed temperature vaporizer	345
1.4.	Gas chromatograph	347
1.5.	Micro-electron capture detector	348
1.6.	Instrumental configuration scheme	349
2.	HEADSPACE SAMPLER COUPLED WITH GAS CHROMATOGRAPHY, PROGRAMMED TEMPERATURE VAPORIZER AND QUADRUPOLE MASS SPECTROMETER	350
2.1.	Headspace sampler	350
2.2.	Programmed temperature vaporizer	350
2.3.	Gas chromatograph	350
2.4.	Quadrupole mass spectrometer detector	351
2.5.	Instrumental configuration scheme	352

IV. COUPLING OF MICROEXTRACTION BY PACKED SORBENTS WITH GAS CHROMATOGRAPHY WITH IONIC LIQUID STATIONARY PHASES FOR THE DETERMINATION OF HALOANISOLES IN WINES	353
Journal of Chromatography A 1260 (2012) 200-205 ..	
V. HEADSPACE GENERATION COUPLED TO GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY FOR THE AUTOMATED DETERMINATION AND QUANTIFICATION OF ENDOGENOUS COMPOUNDS IN URINE. ALDEHYDES AS POSSIBLE MARKERS OF OXIDATIVE STRESS	359
Journal of Chromatography A 1367 (2014) 9-15	
VI. HEADSPACE-PROGRAMMED TEMPERATURE VAPORIZATION-MASS SPECTROMETRY FOR THE RAPID DETERMINATION OF POSSIBLE VOLATILE BIOMARKERS OF LUNG CANCER IN URINE	367
Analytical and Bioanalytical Chemistry 408 (2016) 5239-5246	
VII. HEADSPACE-PROGRAMMED TEMPERATURE VAPORIZER-MASS SPECTROMETRY AND PATTERN RECOGNITION TECHNIQUES FOR THE ANALYSIS OF VOLATILES IN SALIVA SAMPLES	375
Talanta 160 (2016) 21-27	
VIII. GENERAL CONCLUSIONS	383

I. AIM

The general aim of this PhD thesis is to develop analytical methodologies directed to achieving a significant reduction of the effort needed to perform the sample treatment step with the purpose of minimizing costs and analysis time and reducing errors associated to this step of the analytical process.

The doctoral thesis consists of two parts, both dedicated to the development of different methodologies that meet the characteristics above described but differ in the type of matrix of study. The first part is dedicated to food matrices and the second one to biological matrices.

The first part, therefore, is dedicated to the development of an analytical methodology for the detection of contaminants present in food samples, in particular haloanisoles in wine, based on the coupling of microextraction with packed sorbent (MEPS) with gas chromatography (GC) with ionic liquid stationary phases (IL) and electron capture detection (ECD).

In this first part, there are two concrete objectives:

1. The study of the possibilities offered by microextraction by packed sorbent (MEPS).
2. The study of the potential advantages of the new ionic liquid stationary phases for the determination of relatively polar compounds such as haloanisoles.

Two hypotheses are proposed in this first part:

- The first one, that the microextraction technique MEPS allows the separation of these compounds from wine, their preconcentration by successively passing the matrix through the cartridges that are characteristic of this technique and their elution with a small amount of organic solvent.
- The second one, that new ionic liquid stationary phases, more polar than conventional ones, allow adequate separation of compounds with intermediate polarity, such as haloanisoles. Depending on the ionic liquid that constitutes the stationary phase, chromatographic characteristics will differ.

The second part of this doctoral thesis is focused on the development of rapid and effective methodologies for the determination and quantification of compounds that have been described as potential biomarkers in biological matrices. Headspace generation (HS) will be used as sample pre-treatment technique coupled to a programmed temperature vaporizer (PTV) and detection will be carried out by mass spectrometry (MS). In this part, besides the development of chromatographic methods, methodologies without chromatographic separation in which generated profile signals will be treated chemometrically, will also be proposed.

In this second part, the concrete objectives are:

1. The development of a series of rapid, sensitive and efficient analytical methodologies applicable to the determination and

quantification of biomarkers in biological samples:

- Coupling of a headspace sampler with a programmed temperature vaporizer for the chromatographic analysis and the detection by means of mass spectrometry of urine samples.
 - Use of an electronic nose based on the coupling of a headspace generator, a programmed temperature vaporizer and a mass spectrometer for obtaining profile signals from urine and saliva samples.
2. Comparing samples from healthy individuals and patients to study the possible existence of differences in the levels of these compounds or in their profile signals, thus allowing classification of the analyzed samples.

In this second part, three hypotheses are proposed:

- The first one, that the headspace generation technique (HS) is suitable for the determination of volatile compounds in biological samples (urine and saliva) as it reduces the treatment to which the sample should be subjected and eliminates many non-volatile interfering compounds present in this type of matrices.
- The second one, that chemometric treatment of profile signals obtained with non-separative methodologies allows to extract qualitative and quantitative information on the different compounds under study.

-The third one, that significant differences exist on the levels of the compounds described as biomarkers or in the profile signals in the samples from healthy individuals and the ones from patients.

II. INTRODUCTION

Gas chromatography (GC) is a widely used technique for the analysis of volatile and semivolatile compounds. For the last decades many efforts have been made on the development of the technique and nowadays it is possible to determine compounds at low concentration levels very fast.

Research on ionic liquids (organic salts with low melting points) has experienced a great increase in recent years. They have a structure in which the organic cations are linked by a carbon chain of varying length and the corresponding anions are associated with them [1]. Among their special characteristics [2], some of them (low volatility, stability to high temperatures, absence of hydroxyl groups and the possibility of synthesizing them with the desired selectivity) make ionic liquids suitable for the requirements of the capillary columns used in gas chromatography. Accordingly, they have been used as stationary phases [3].

Together with the development of gas chromatography, a great development of sample pre-treatment techniques has also been conducted to address the complexity and diversity of the matrices studied. As a matter of fact, in many cases the pre-treatment prior to the determination itself is the most critical step of the whole procedure.

This pre-treatment involves the isolation of the compounds of interest from the matrix and their transfer to another medium, ideally with the simultaneous removal of interfering substances and selective enrichment in the receiving medium to a concentration higher than the

detection limit of the proposed procedure. Some of these pre-treatment techniques, especially multistep ones, are time consuming and, in many cases, require longer times than the chromatographic analysis itself. The sample treatment step has also been considered the most polluting and one of the most frequent sources of error of the whole analytical procedure.

Development of solventless (or at least with low solvent consumption) sample preparation techniques constitutes a pillar of Green Analytical Chemistry [4]. The great interest in this approach is due to toxicological, environmental and economic aspects. A great number of techniques with those characteristics have been developed, among them, microextraction by packed sorbent (MEPS) and headspace generation (HS) are the two techniques used herein and both meet these requirements.

Microextraction by packed sorbent (MEPS) is a recently developed technique that arises from the attempt to speed up and make more efficient other existing extraction techniques [5]. It is a sorption-based separation technique for sample preparation based on the miniaturization and automation of conventional solid-phase extraction (SPE) in which a sorbent packed material (ca. 1-4 mg) is placed at the top of a syringe needle. Small volumes of sample are drawn and this allows the sorption of a large variety of analytes, depending on the properties of the sorbent. Analytes elution is typically accomplished with few microliters of solvent. This technique not only allows working with small sample volumes but also greatly reduces the consumption of organic solvents required for the extraction of the retained analytes.

Moreover, the extraction cartridges that are needed can be reused many times.

Headspace sampling (HS) is a technique used for the separation of volatile compounds from a sample. It can be coupled to different analytical techniques of separation, but it has been mainly used coupled to gas chromatography (GC) due to its suitability for the analysis of gaseous samples [6]. Headspace sampling can be carried out statically and dynamically. In static headspace (SHS), the one used herein, the sample is introduced into a vial leaving a free volume over it. This gaseous phase in contact with the sample is called "headspace". Then, the vial is sealed and placed in an oven so that the volatile compounds are separated from the matrix and pass to the headspace. Once equilibrium between both phases is achieved, a portion of the headspace is injected into the gas chromatograph.

Headspace sampling represents a good option for minimizing sample treatment [7]. Ease of sample preparation, automation, rapidity and the absence of interferences of non-volatile compounds of the matrix make static headspace one of the techniques of choice for complex matrices [8].

The coupling of both sample treatment techniques with a programmed temperature vaporizer (PTV) could be of great interest as it allows increasing the sensitivity and thus, achieving much lower detection limits in the proposed applications in which MEPS or HS are used. This can be accomplished by using the cold injection mode "solvent vent" allowed by this type of injectors. In this injection mode the PTV is programmed so that the liner is firstly set at a temperature slightly below the boiling point of the solvent when the sample is

injected. During this process, the split valve is open, so that the solvent is removed while the analytes of interest which have higher boiling points remain retained in the liner. This time is called "purge time". After this time, the split valve is closed and the liner is heated rapidly transferring the analytes to the chromatographic column in splitless mode.

The presence of certain volatile organic compounds in biological samples can provide valuable information on the health status of an individual as its formation is related to some basic cellular functions [9]. Therefore, the study of these compounds is an interesting tool for the early detection of some diseases [10]. The development of non-invasive detection methodologies that allow their detection constitutes a research line of great interest.

Among the techniques described for the detection and quantification of possible biomarkers in biological samples, alongside with the more traditional separative methodologies, essentially gas and liquid chromatography, some non-separative methodologies have also been developed. Among the latter, electronic olfactometry is a technique that responds to the scheme of non-separative methods in which the signal of all volatile compounds in a sample is measured. It can be considered as an artificial approach to the human olfactory system and it was designed to provide a rapid and effective technique for the study of odours.

An "electronic nose" can be defined as an instrument comprising a set of electronic chemical sensors with some specificity and a suitable recognition pattern system which is able to recognize simple and

complex odours [11]. As an alternative to the first "electronic noses" based on gas sensors, mass spectrometry based systems have been developed. Thus, the most common instrument configuration currently used in electronic olfactometry based on mass spectrometry is the direct coupling of a headspace generator (HS) and a mass spectrometer (MS).

This instrumental scheme generates profile signals of all the volatiles present in a sample. The information contained in the data is extracted by means of chemometric techniques that allow either quantification of compounds or classification of samples in different groups [12].

The pattern recognition methods are intended to classify or group samples according to their characteristics. Two types of pattern recognition techniques can be distinguished: supervised and unsupervised ones. Unsupervised techniques are designed to determine relationships between samples without using any prior information regarding the belonging of these samples to certain classes. Supervised pattern recognition techniques aim to develop classification rules for unknown samples (objects) from a group of known samples that are characterized by the values of the measured variables. The success of prediction depends on the classification rules and on the limits established by them.

REFERENCES

- [1] P. Sun, D.W. Armstrong, *Ionic liquids in analytical chemistry*, *Anal. Chim. Acta* 661 (2010) 1-16.
- [2] J.S. Wilkes, *Properties of ionic liquid solvents for catalysis*, *J. Mol. Catal. A-Chem.* 214 (2004) 11-17.
- [3] A. Berthod, M.J. Ruiz-Ángel, S. Carda-Broch, *Ionic liquids in separation techniques*, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 6-18.
- [4] M. Farré, S. Pérez, C. Gonçalves, M.F. Alpendurada, D. Barceló, *Green analytical chemistry in the determination of organic pollutants in the aquatic environment*, *Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 1347-1362.
- [5] M. Abdel-Rehim, *New trend in simple preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications. I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry*, *J. Chromatogr. B* 801 (2004) 317-321.
- [6] B. Kolb, L.S. Ettre, *Static Headspace-Gas Chromatography*, Wiley Interstice, Hoboken, New Jersey, 2006.
- [7] B. Kolb, in: I.D. Wilson (Ed.), *Chromatography: Gas | Headspace Gas Chromatography*. *Encyclopedia of Separation Science*, Academic Press, Oxford, 2000, pp. 489-496.
- [8] N.H. Snow, G.P. Bullock, *Novel techniques for enhancing sensitivity in static headspace extraction-gas chromatography*, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2726-2735.
- [9] I. Horváth, Z. Lázár, N. Gyulai, M. Kollai, G. Losonczy, *Exhaled biomarkers in lung cancer*, *Eur. Respir. J.* 34 (2009) 261-275.

-
- [10] B. Buszewski, J. Rudnicka, T. Ligor, M. Walczak, T. Jezierski, A. Amann, Analytical and unconventional methods of cancer detection using odor, *A. Trends Anal. Chem.* 38 (2012) 1-12.
- [11] J.W. Gardner, P.N. Barlett, A brief history of electronic noses, *Sensor. Actuat. B-Chem.* 18 (1994) 211-220.
- [12] Brereton, R. G. *Chemometrics Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant.* Wiley, Chichester, 2003.

III. INSTRUMENTAL CONFIGURATIONS

Throughout the PhD thesis, two different instrumental configurations have been used:

- A hand-held automated syringe for microextraction by packed sorbent (MEPS), a gas chromatograph (GC) equipped with a programmed temperature vaporizer (PTV) and a micro-electron-capture detector (μ -ECD).
- A headspace sampler (HS) coupled with a gas chromatograph (GC) with a programmed temperature vaporizer (PTV) and a quadrupole mass spectrometer (q-MS).

1. HAND-HELD AUTOMATED SYRINGE FOR MICROEXTRACTION BY PACKED SORBENT AND GAS CHROMATOGRAPHY WITH PROGRAMMED TEMPERATURE VAPORIZER AND MICRO-ELECTRON CAPTURE DETECTOR

1.1. Hand-held automated syringe for microextraction by packed sorbent

Microextraction by packed sorbent was performed with a handled automated analytical syringe (eVol®; SGE Europe Ltd., Kiln Farm Milton Keynes, United Kingdom) coupled with a MEPS syringe of 500 μ L (Figure 1).



Figure 1: *eVol® device for microextraction by packed sorbent*

The device consists of two coupled precision instruments; one is a motor with digital electronic control and the other one, a 500 μ L analytical syringe with an XCHANGE® adapter. This means automatic piston movement but manual performance of the different steps of the process. A BIN (Barrel Insert and Needle) containing 4 mg of solid-phase silica C₁₈ as packed sorbent (mean particle size 45 μ m, pore size 60 Å) was used (Figure 2).

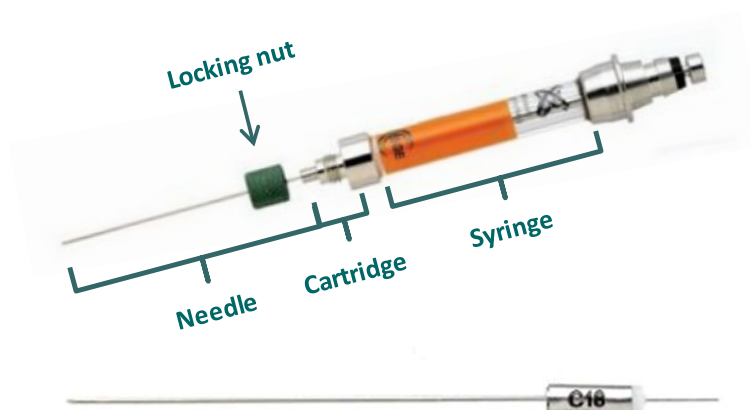


Figure 2: MEPS syringe and BIN C₁₈

1.2. Sample injection system

Injection of the samples was carried out with an automatic liquid sample injection system (Agilent Technologies 7683) (Waldbronn, Germany) with a syringe of 10 μL which allows the injection of a maximum volume of 5 μL .

1.3. Programmed temperature vaporizer

The PTV used was from Gerstel (CIS-4; Gerstel, Baltimore, MD, USA). A scheme of the device used is shown in figure 3.

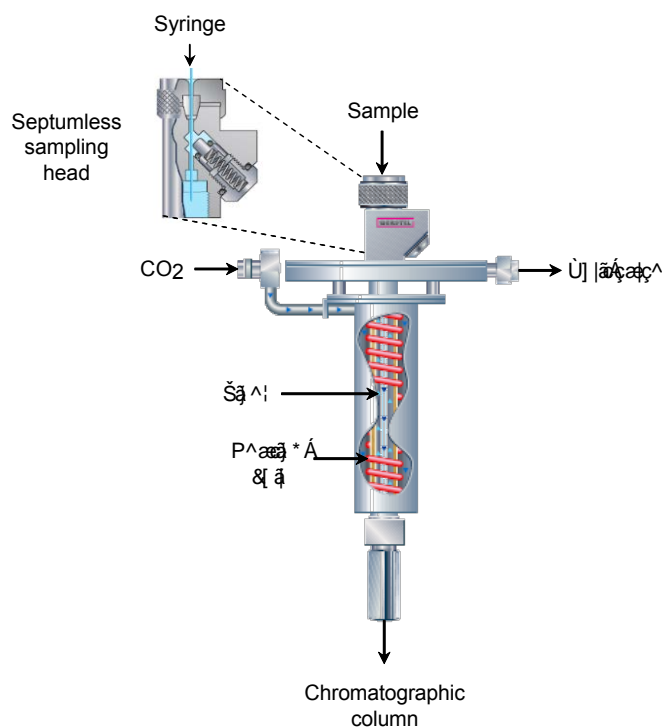


Figure 3: Scheme of a PTV CIS-4 injector

The injector has a septumless sampling head. Cooling is accomplished with liquid CO₂, which allows reaching a temperature of -78 °C. Heating is achieved by means of a heating coil, which provides a homogenous heating of the injector body. The heating rate can be selected between 2 °C s⁻¹ and 12 °C s⁻¹, and it is possible to use two consecutive heating ramps. Programmed temperature control is performed with an electronic controller.

The PTV is equipped with a vaporization chamber (liner) filled with Tenax-TA® (71 mm x 2.0 mm) and an inner volume of 180 µL. This filler material is a poly(2,6-diphenylphenylene oxide) porous polymer with hydrophobic properties designed to retain volatile and semivolatile

organic compounds specially in samples with high moisture content. The carrier gas was helium N50 (99.999 % purity, Air Liquide).

1.4. Gas chromatograph

The gas chromatograph used was an Agilent 7890A from Agilent Technologies. The oven allows five temperature ramps. The maximum temperature ramps allowed are 120 °C min⁻¹ to 70 °C, 95 °C min⁻¹ from 70 to 115 °C, 65 °C min⁻¹ from 115 to 175 °C, 45 °C from 175 to 300 °C and 35 °C min⁻¹ from 300 to 400 °C. The carrier gas was helium N50 (99.999 % purity; Air Liquide).

The columns used in this configuration were capillary columns with different stationary phases of ionic liquids. These columns were supplied by Supelco through Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) within the SILEP project (Supelco Ionic Liquid Evaluation Program). Specifically, four fused silica capillary columns (30 m x 0.25 mm x 0.2 µm) (Figure 4).

The ionic liquids that constitute each one of the stationary non-bonded phases are: SLBTM-IL100, *1,9-di(3-vinylimidazolium)nonane bis(trifluoromethylsulfonyl)imide*; SLBTM-IL76, *tri(tripropylphosphonium hexanamido)trimethylamine bis(trifluoromethylsulfonyl)imide*; SLBTM-IL61, *1,12-di(tripropylphosphonium)dodecane bis(trifluoromethylsulfonyl)imide trifluoromethylsulfonate* and SLBTM-IL59, *1,12-di(tripropylphosphonium)dodecane bis(trifluoromethylsulfonyl)imide*.



Figure 4: Ionic liquid fused silica capillary column, SLB™-IL59

1.5. Micro-electron capture detector

The detector was a Ni⁶³ micro electron capture detector (μ ECD) from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany). The maximum temperature allowed by the radiation source is 400 °C. According to the specifications, the detection zone volume of this detector is 10 times smaller than a conventional ECD, which translates into greater sensitivity and decreases the chance of cell contamination. The auxiliary gas used is nitrogen (99.999 % purity; Air Liquide).

1.6. Instrumental configuration scheme

Figure 5 shows an image of this instrumental configuration.

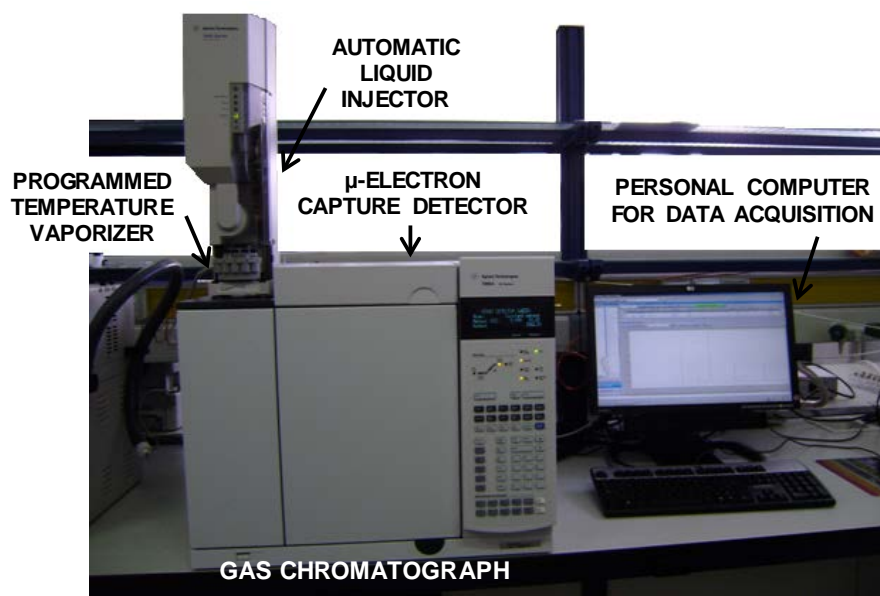


Figure 5: *Instrumental configuration PTV-GC- μ ECD*

The liquid sampler injector, the gas chromatograph, the PTV and the micro detector, as well as the data acquisition were performed using specific software with a personal computer.

2. HEADSPACE SAMPLER COUPLED WITH GAS CHROMATOGRAPHY, PROGRAMMED TEMPERATURE VAPORIZER AND QUADRUPOLE MASS SPECTROMETER

2.1. Headspace sampler

Headspace sampling was performed with a CombiPAL autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland). This autosampler is equipped with a tray for 32 consecutive samples and an oven with positions for six sample vials. The oven can be heated from 35 °C to 200 °C and orbital agitation of the samples from 250 to 750 rpm can be used.

Headspace mode enables different syringe sizes (from 1.0 mL to 5.0 mL), in this configuration a syringe of 2.5 mL was used and it can be heated from 35 °C to 150 °C. Once sample injection is complete, the hot syringe is automatically cleaned by purging with inert gas.

2.2. Programmed temperature vaporizer

The PTV used in this configuration was a CIS-4 (Gerstel, Baltimore, MD) and as described in the above section, it is a septumless PTV equipped with a liner of the same dimensions and the heating and cooling system are also the same.

2.3. Gas chromatograph

The gas chromatograph used was an Agilent 6890 GC equipped with a low polarity DB-VRX capillary column (20 m x 0.18 mm x 1 µm, working range -10 a 260 °C) from Agilent Technologies (J&W Scientific Columns, USA). The maximum temperature ramps allowed by the oven were 70 °C min⁻¹ from 45 °C to 175 °C, 45 °C min⁻¹ from 175 to 300 °C and

35 °C min⁻¹ from 300 to 450 °C. The carrier gas was helium N50 (99.999 % purity; Air Liquide).

2.4. Quadrupole mass spectrometer detector

The quadrupole mass spectrometer used was an HP 5973 from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany), equipped with an inert ion source operated in the electron impact mode using a 70 eV ionization voltage. The recommended temperatures for the ion source and the quadrupole were 230 °C and 150 °C, respectively.

Two acquisition modes were allowed: scan mode, in which the detector scans from high to low across a range of masses, previously specified; and selected ion monitoring (SIM) mode, where only a selected number of representative ions, needed to characterize and quantify the compounds, are analysed and the instrument rapidly switches between the selected ions until the measurements are complete.

The NIST'98 (NIST/EPA/NIH Mass spectral Library, version 2.0) mass spectrum database was used for the spectra search.

2.5. Instrumental configuration scheme

Figure 6 shows an image of this instrumental configuration, HS-GC-PTV-MS.

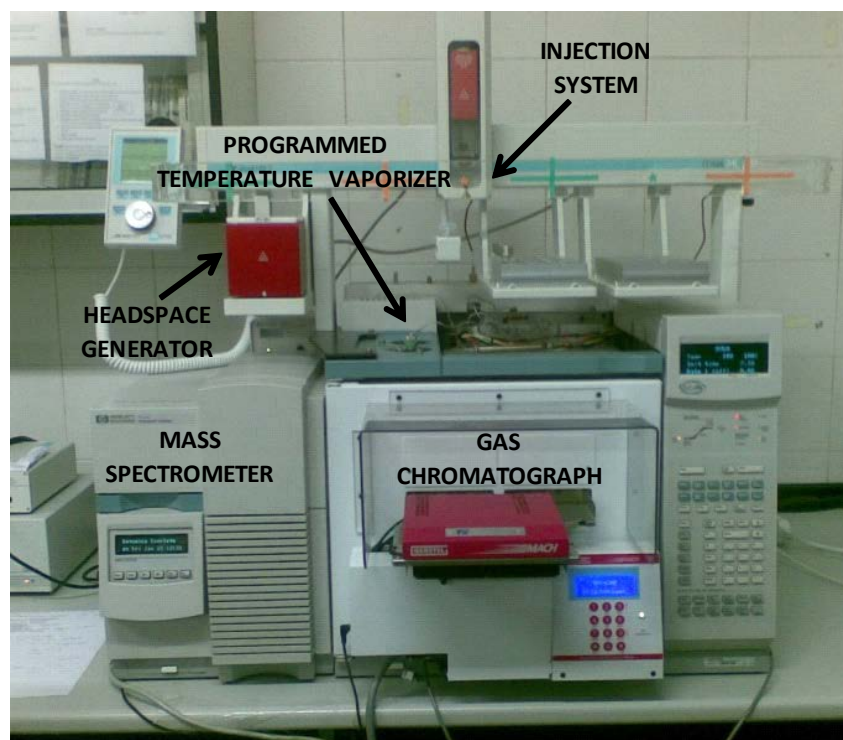


Figure 6: Scheme of the instrumental configuration, HS-PTV-GC-MS

The HS (CombiPAL autosampler) is programmed using an independent controller, in which the injection mode and the different conditions of the variables involved are fixed. Subsequently, the sample sequence is programmed.

IV. COUPLING OF MICROEXTRACTION BY PACKED SORBENTS WITH GAS CHROMATOGRAPHY WITH IONIC LIQUID STATIONARY PHASES FOR THE DETERMINATION OF HALOANISOLES IN WINES

Journal of Chromatography A, 1260 (2012) 200–205



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Coupling of microextraction by packed sorbents with gas chromatography with ionic liquid stationary phases for the determination of haloanisoles in wines

Carmelo García Pinto*, Ana Pérez Antón, José Luis Pérez Pavón, Bernardo Moreno Cordero

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Salamanca, Plaza de la Merced s/n, 37008 Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 March 2012
Received in revised form 13 July 2012
Accepted 22 August 2012
Available online 29 August 2012

Keywords:

Ionic liquid stationary phases
Microextraction by packed sorbents
Haloanisoles
Wine samples

ABSTRACT

A new method based on the coupling of microextraction by packed sorbents (MEPS) and gas chromatography with ionic liquid stationary phases for the determination of four haloanisoles in wine matrices is proposed. The analytes were concentrated in a C_{18} barrel insert and needle (BIN), desorbed with a small volume of an organic solvent, and determined by gas chromatography with electron-capture detection (GC- μ ECD). The influence of several factors on the efficiency of extraction, washing and elution steps was investigated. Additionally, ionic liquid stationary phases of very different polarities were evaluated in terms of efficiency. Under optimized conditions, the analytes were first extracted in the sorbent material and, after an adequate washing step, eluted with 50 μ L of ethanol. An aliquot of 5 μ L of this extract was further injected, using a programmed temperature vaporizer (PTV), into the chromatographic system. The yield of the overall procedure ranged from 48 to 60%; the reproducibility of the method, calculated as the relative standard deviation (RSD), was below 10% for all compounds, and the limits of detection ranged from 1.2 to 4.8 ng L⁻¹. External calibration was used in the determination of the target compounds in wine samples.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The goal of green analytical chemistry is to use analytical procedures that will generate less hazardous waste and that are safer to use and more benign to the environment. This can be achieved by developing new analytical methodologies or modifying older methods to incorporate procedures that either use less hazardous chemicals or use smaller amounts of hazardous chemicals [1].

Sample preparation is considered to be the potentially most polluting step of analysis, since it usually requires the use of organic solvents [2]. Although, whenever possible, this step should be avoided by choosing direct analytical methods, in most cases, the isolation and preconcentration of analytes are required. Application of traditional solvent extraction for this purpose may cause significant pollution by releasing solvents into the environment, and hence some micromethods that reduce the organic solvent use have been developed [3]. Microextraction techniques such as solid-phase microextraction (SPME), stir-bar microextraction (SBME), hollow fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME), single-drop microextraction (SDME) or dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME), among others, have gained ground and are now well established [4]. The possibility of automation and online coupling

of some of these microextraction techniques is another very important aspect which makes them very attractive.

Microextraction by packed sorbents (MEPS) is a sorption-based extraction technique for sample preparation based on the miniaturization of conventional solid-phase extraction in which a sorbent packing material (ca. 1–4 mg) is placed at the top of the syringe needle. Small volumes of sample are drawn and this allows the sorption of a large variety of analytes, depending on the properties of the sorbent packed in the MEPS BIN. Analyte elution is typically accomplished with 20–50 μ L of an appropriate solvent, which can be transferred directly to the GC/LC port [5]. This technique not only allows work with small sample volumes but also greatly reduces the consumption of the organic solvents required for the extraction of the retained analytes. Besides, MEPS BIN can be reused 100 times or more compared to SPE and it may therefore be considered a less expensive technique than conventional preconcentration procedures [6]. MEPS applications include the analysis of diverse compounds in biological matrices, such as human plasma, blood, urine and saliva [6–8] and also the analysis of environmental samples, mainly water and wastewater [8–14]. However, few studies have been carried out in the field of food analysis [15].

Ionic liquids have also been proposed as environmentally friendly solvents and they are good substitutes for traditional organic solvents that are volatile and flammable [16]. Ionic liquids can be defined as organic salts with low melting points. They have a structure in which the organic cations are linked by a carbon chain of varying length and the corresponding anions are associated with

* Corresponding author. Tel.: +34 923 294483; fax: +34 923 294483.
E-mail address: cgp@usal.es (C. García Pinto).

them [17,18]. The special characteristics of these ionic liquids make them suitable for the requirements of the capillary columns used in gas chromatography, making them ideal for use as stationary phases [19–22]. They are liquid over a wide temperature range such that the working temperature can be increased substantially; they are not very volatile, and hence columns containing them have less bleeding and a longer life. They are polar stationary phases, the absence of hydroxyl groups renders them more stable to oxygen, and the possibility of synthesizing these compounds with different cationic and anionic groups as well as with variable chain lengths would permit them to be provided with the desired selectivity [16]. Ionic liquids are used in different fields of analytical chemistry and can be used in many different applications. However, despite all these advantages there are not many analytical applications with ionic liquid capillary columns in gas chromatography [23–27].

The presence of haloanisoles is a considerable enological problem because of their off-flavors that transmit to wine, and their determination is of great interest to the wine industry [28]. The usual concentrations of these compounds in wines are in the ng L^{-1} range, so a preconcentration technique before their analytical determination must be performed. Several extraction and microextraction methods [29] have been employed for the extraction and concentration of haloanisoles from wine prior to their determination.

In the present work we propose the coupling of microextraction by packed sorbents (MEPS) and gas chromatography with ionic liquid stationary phases as an alternative “environmentally friendly” analytical methodology for the determination of haloanisoles in wines. For this purpose, different ionic liquid stationary phases and the parameters affecting the whole extraction–elution process, such as the type of sorbent, the elution solvent and the sample and elution volumes [30], were evaluated. The haloanisoles were determined using a gas chromatograph equipped with a microelectron-capture detector (GC- μ ECD). Once the overall process had been optimized, the quality parameters of the method were established and it was used for the determination of haloanisoles in wine samples. Owing to the absence of any matrix effect, it was possible to perform external standard calibrations.

2. Experimental

2.1. Materials, standard solutions and samples

Haloanisoles (2,4,6-trichloroanisole (TCA), 1,2,4,5-tetrachloroanisole (TeCA), 2,4,6-tribromoanisole (TBA) and pentachloroanisole (PCA)) and ethyl acetate HPLC grade (CHROMASOLV[®] Plus $\geq 99.9\%$) were supplied by Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Ethanol $\geq 99.9\%$ and KHCO_3 were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain). Methanol $\geq 99.9\%$ was provided by Merck (Darmstadt, Germany).

Stock solutions, 100 mg L^{-1} of each haloanisole in ethanol were prepared and stored at 4°C in a refrigerator. These solutions were used to spike wine at the different concentrations analyzed as well as the deionized/ultrapure water (12% ethanol) solutions employed to optimize the method. For the purposes of method optimization and validation, a white wine made from “verdejo” variety, and a red wine made from “tempranillo” variety, purchased in a local store, were employed. To extend the MEPS BIN life the wine samples were filtered through $0.45 \mu\text{m}$ nylon membrane filters (Millipore) before use.

2.2. Apparatus

Microextraction by packed sorbents was carried out with a handheld automated analytical syringe (eVol) (SGE Europe Ltd., Kiln

Farm Milton Keynes, United Kingdom) coupled with a MEPS syringe of $500 \mu\text{L}$. This means automatic piston movement but manual performance of the different steps of the process. A BIN (barrel insert and needle) containing 4 mg of solid-phase silica C_{18} as packed sorbent (mean particle size $45 \mu\text{m}$, pore size 60 \AA) was used.

Injection of the samples was carried out with an automatic liquid sample injection system (Agilent Technologies 7683) (Waldbronn, Germany) with a syringe of $10 \mu\text{L}$. The sample was transferred into the gas chromatography system by means of an Agilent Technologies 6890 programmable temperature vaporizing (PTV) inlet (CIS-4). Cooling was accomplished with CO_2 . The PTV was equipped with a $71 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ liner (internal volume of $180 \mu\text{L}$) packed with Tenax-TA[®], a hydrophobic polymer designed to trap organics. The carrier gas was helium (99.999% pure, Air Liquide).

Gas chromatography analysis was performed using an Agilent Technologies 7890A GC system equipped with a ^{63}Ni microelectron capture detector (μ ECD). For the evaluation of the different ionic liquid stationary phases, fused silica capillary columns ($30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.2 \mu\text{m}$) SLB-IL100 (non-bonded; 1,9-di(3-vinyl-imidazolium) nonanebis(trifluoromethyl) sulfonylimide), SLB-IL76 (non-bonded; proprietary) SLB-IL61 (non-bonded; proprietary) and SLB-IL59 (non-bonded; 1,12-di(triisopropylphosphonium)dodecanebis(trifluoromethanesulfonyl) amide), from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany) were used.

2.3. Optimization of MEPS influencing parameters

Some factors affecting of MEPS performance were studied using C_{18} as sorbent. Prior to each sample extraction, the MEPS-BIN was conditioned, first with $500 \mu\text{L}$ of ethanol and then with $500 \mu\text{L}$ of ultrapure water. Variables as nature and volume of elution solutions, nature and volume of washing solutions, volume of sample and speed of sample drawing were evaluated in terms of recovery, carry-over and leakage. Ethanol, methanol and ethyl acetate were used as elution solvents and volumes between 50 and $100 \mu\text{L}$ were tested. Washing solutions including ultrapure water and different mixtures of water and methanol with potassium hydrogen carbonate were tested. Volumes of sample between 1 and 8 mL were also analyzed and preconcentration factors were calculated.

2.4. Microextraction by the packed sorbent procedure

Samples were extracted by drawing and discarding 5 mL of sample (10 cycles of $500 \mu\text{L}$). The sorbent was then washed with $500 \mu\text{L}$ of a 1% KHCO_3 water solution and then with ultrapure water ($500 \mu\text{L}$) to remove possible interfering substances, and was dried with 10 cycles of pumped air. The haloanisoles were eluted with $50 \mu\text{L}$ of ethanol; this volume was pumped through the MEPS BIN and ejected into a glass vial ($12 \text{ mm} \times 32 \text{ mm}$) of 1.8 mL with a conical glass insert of $250 \mu\text{L}$ from Scharlau (Barcelona, Spain). Finally, after elution, the sorbent was washed with $500 \mu\text{L}$ of ethanol. The time needed for a MEPS extraction was about 15 min . All the steps were carried out at the lowest speed ($18 \mu\text{L s}^{-1}$) allowed by the syringe device, except for the drying step, for which the highest one ($300 \mu\text{L s}^{-1}$) was selected.

2.5. PTV-GC- μ ECD conditions

In order to achieve the optimum injection conditions, the PTV inlet was set to the solvent-vent mode. During injection, accomplished at a rate of $5 \mu\text{L s}^{-1}$, the split valve was open, the PTV was set at 50°C , and the vent flow was adjusted to 50 mL min^{-1} . The purge time was set at 0.5 min , after which the splitless mode was programmed for 2.0 min while the temperature was increased by 12°C s^{-1} to 300°C over 5 min , such that the analytes were

202

C. García Pinto et al. / J. Chromatogr. A 1260 (2012) 200–205

transferred to the chromatographic system. Cooling was accomplished with CO₂. The injection time was fixed at 1.5 min.

The conditions for the chromatographic measurements were optimized. Ionic liquid stationary phase SLB-IL59 was selected. The carrier gas used was helium at a rate of 1.5 mL min⁻¹. The oven temperature program started at 70 °C for 2 min, increased at a rate of 95 °C min⁻¹ to 110 °C, and then at 65 °C min⁻¹ up to final temperature of 150 °C, which was held until the end of the chromatographic run time (20 min). The parameters of the μ ECD detector were a detection temperature of 290 °C and a make-up flow gas (N₂) of 10 mL min⁻¹.

2.6. Method validation

The proposed method was validated following the recommendations of the IUPAC. No matrix effect was detected so MEPS-PTV-GC-ECD linearity was evaluated by analyzing standard solutions spiked with known amounts of analytes in the range 10–250 ng L⁻¹. Method reproducibility was checked by the evaluation of intra-day (repeatability) and inter-day reproducibility. Repeatability was determined by the replicated analysis of solutions spiked with 50 ng L⁻¹ of analytes ($n=8$). Inter-day reproducibility was determined by the analysis in five different days of solutions spiked with 50 ng L⁻¹ of analytes. The signal-to-noise ratio found in the analysis of blank samples ($n=8$) was used to calculate method detection limits and quantification limits as the concentration which should give a S/N ratio higher or equal to 3 or equal to 10, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Chromatographic separation in ionic liquid columns

3.1.1. Chromatographic parameters

The four different ionic liquid columns were evaluated in terms of efficiency, resolution, and peak symmetry for the separation of the four pure standard haloanisoles studied. According to the procedure proposed by Mondello et al. (based on the McReynolds Constant Values) [27], the SLB-IL100 phase can be defined as an extremely polar one, the SLB-IL76 as a highly polar one, and the SLB-IL61 and SLB-IL59 can be classified as being of medium or medium-high polarity. The analytes are slightly polar compounds with high boiling points (241–309 °C), and this kind of column could be adequate for the separation of these compounds.

We first evaluated the different columns in terms of efficiency. The two most polar columns showed a total plate number for 2,4,6-tribromoanisole of 72,885 (SLB-IL100) and 85,251 (SLB-IL76). However, the least polar ones had much higher values: 124,012 (SLB-IL61) and 125,736 (SLB-IL59). The height equivalent to one theoretical plate (HETP) (H_{exp}) for each column was 0.411, 0.352, 0.242, and 0.238 mm, respectively. The theoretical minimum HETP (H_{min}) was calculated from the Golay equation [31]. The lower values correspond to the most polar column whereas the less polar ones show the higher values.

The calculated values (between 0.161 and 0.216) are in good agreement with those predicted by theory for conventional capillary columns [32]. The relationship of actual vs. theoretical column performance, is related to the use of the theoretical efficiency (UTE%). The values of UTE% generally vary between 60 and 90%, indicating how close the actual column performance is to the theoretical possibility. The medium-polarity columns present the highest efficiencies (86 and 88% for SLB-IL61 and SLB-IL59, respectively). For the SLB-IL76 column this value was reduced to 58%, and the extremely polar column SLB-IL100 showed a very low value of 48%.

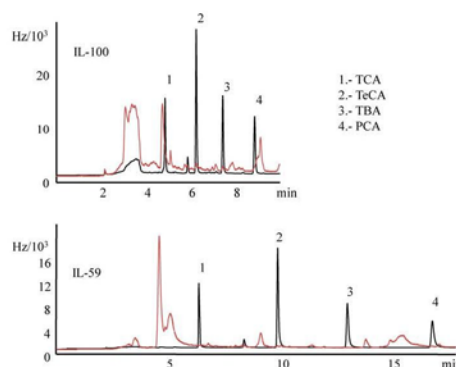


Fig. 1. GC-ECD chromatograms of a red wine sample (red line) and a standard solution of the target compounds (black line) on the most (SLB-IL100) and least (SLB-IL59) polar columns. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

Fig. 1 shows the chromatograms obtained for the separation of the standard components with the most and least polar columns. The two columns showed good selectivity toward this group of compounds. As expected, the retention time increased as the polarity of the column decreased. Table 1 shows the resolution values obtained for the different columns. The highest resolution for the entire class of compounds was obtained with the least polar ionic liquid stationary phases, although all values point to adequate peak resolution. The two most polar columns had values well below 1, pointing to an important degree of fronting. In these phases, the compounds were only weakly retained. This effect was slightly more pronounced in the SLB-IL100 column. The other two stationary phases exhibited the same behavior. The least retained analyte (TCA) showed weaker retention (a slight degree of fronting) and the other three compounds exhibited nearly Gaussian behavior.

3.1.2. Chromatographic behavior with wine matrices

The next step in the evaluation of the ionic liquid columns was to test the stationary phases in real samples of wine to check the signal generated by the matrix. For this purpose, different wine samples were subjected to microextraction with the packed sorbent process and the extracts (in the optimized conditions) were analyzed chromatographically with the four columns tested. Fig. 1 shows the chromatograms relative to the analysis of a sample of red wine in the SLB-IL100 and SLB-IL59 columns.

Although different solutions and washing combinations were studied, complete cleaning of the extracts was not achieved. As can be seen (Fig. 1), in the most polar column the matrix of the sample interfered in the determination of some of the analytes, hindering quantification. The best results in terms of analytes quantification were obtained with the IL-59 and IL-61 columns. In

Table 1
Retention factor (R_f) and tailing factor (TF) calculated in the columns studied.

Compound	SLB-IL100		SLB-IL76		SLB-IL61		SLB-IL59	
	R_f	TF	R_f	TF	R_f	TF	R_f	TF
TCA		0.69		0.65		0.75		0.80
TBA	11.8	0.73	18.0	0.72	31.3	1.00	36.8	1.02
TeCA	13.5	0.76	21.9	0.76	36.4	1.01	38.4	1.02
PCA	24.2	0.77	29.9	0.78	53.0	1.02	47.0	0.97

C. García Pinto et al. / J. Chromatogr. A 1260 (2012) 200–205

203

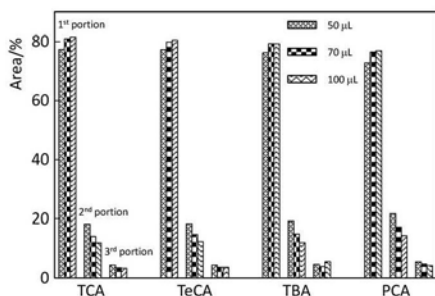


Fig. 2. Desorbed percentage corresponding to the first, second and third portions of the elution solvent for target compounds.

these cases, the measurements were free of interference, except for a small peak eluting at a retention time close to that of tetrachloroanisole, although this did not prevent proper quantification of this compound. Accordingly, the SLB-IL 59 column was selected to propose an analytical method for the separation and quantification of haloanisoles in wine samples.

3.2. Optimization of the MEPS procedure

The effect of different factors on the performance of the extraction step was investigated using 12% ethanol/water solutions spiked with haloanisoles at the $5.00 \mu\text{g L}^{-1}$ level. The slightly polar nature of these compounds ($\log K_{ow}$ values: 3.9 for TCA, 4.2 for TBA, 4.5 for TeCA and 5.0 for PCA) [33] suggests that hydrophobic sorbents such as C_{18} may be suitable for the extraction of haloanisoles. This sorbent was selected and the efficiency of the different eluting solvents for that solid phase was evaluated. For this, a solution of the compounds in the solvent of choice was passed through a conditioned MEPS BIN and was subjected to chromatographic separation. The results were compared with those obtained for the same standard solution chromatographed directly (i.e., without passing through the MEPS device). With ethanol, recoveries of 97, 92, 93, and 91% for TCA, TeCA, TBA and PCA, respectively, were obtained and hence the solvent was considered to be suitable for elution. Methanol and ethyl acetate were also tested as desorption solvents; however, they did not improve the yield provided by ethanol, which was retained for further experiments.

Ultrapure water and mixtures of water and methanol at different proportions with 1% of potassium hydrogen carbonate were tested as washing solutions in order to eliminate these matrix interferences. At a high concentration (70%) of methanol, a fraction of the retained analytes was eluted, and a lower concentration (30%) of this solvent provided the same results as the solution without methanol. Finally, 500 μL of an aqueous solution of potassium hydrogen carbonate 1% with no methanol was selected, followed by a second washing step of 500 μL of water to remove the salts that might have been retained in the sorbent.

To elute the compounds retained, elution volumes of between 50 and 100 μL were studied. Not only one but also two, three and four portions were tested and each portion was analyzed separately. The study was performed in triplicate and, in each case, the sum of the signals corresponding to the first three portions of the elution solvent represented more than 97% of the total peak area. Fig. 2 shows the percentage obtained for each compound for the different portions of solvent. The percentage of compound desorbed increased slightly with increasing elution volumes. Furthermore,

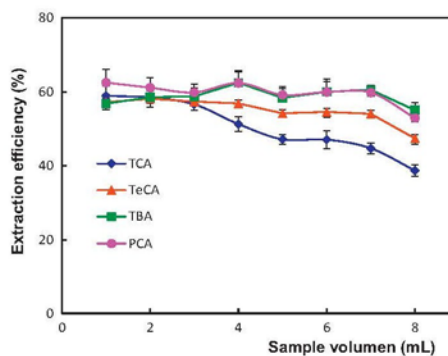


Fig. 3. Efficiency of the overall extraction–elution process versus sample volume.

the highest analytical signals corresponded to the lowest of the volumes studied (50 μL), this being the minimum volume necessary to perform three replicates of each of the solutions measured. Elution in two portions ($25 \mu\text{L} \times 2 \mu\text{L}$) was also evaluated, but no improvement was achieved. Accordingly, a final volume of 50 μL was chosen. With this volume, a portion of the analytes remained retained in the MEPS BIN. To ensure the elimination of these small quantities (avoiding contamination between samples and possible carry-over) a washing step with two portions of 500 μL of ethanol was included in the optimized extraction process.

The recoveries of the overall process (sorption and elution) can be estimated by calculating the ratio between the signals provided by a solution subjected to the MEPS process with the signals obtained on injecting a solution of the analytes prepared in the elution solvent with the same concentrations and relating it to the phases volume ratio (sample volume/elution volume). Different sample volumes were tested and each solution was analyzed in triplicate. The average value of the three injections was used to calculate the recoveries. Fig. 3 shows the effect of sample volume on the efficiency of the overall process. For most of the compounds, fairly constant values ranging between 58 and 62% were obtained for volumes up to 7 mL and they were slightly lower for higher volumes. However, the recovery of TCA (the least polar compound) decreased with the increase in the volume of sample passed through the MEPS BIN.

Additionally, the analytical signal increased almost linearly up to 7 mL, while at higher volumes no significant increase in the signal occurred (Fig. 4). This sampling step must be carried out at the lowest drawing rate allowed by the device ($18 \mu\text{L s}^{-1}$), since as speed increased suction bubbles appeared on the inside of the syringe and these decreased the extraction efficiency and the repeatability of the measurements.

Given that the sampling step is time-consuming, a compromise volume of 5 mL was selected, taking 10 aliquots of 500 μL (the maximum volume allowed by the syringe). Under these experimental conditions, the phases volume ratio was 100 and the overall recoveries of the extraction–elution procedure were 48 ± 1 (for TCA); 55 ± 1 (for TeCA); 60 ± 3 (for TBA), and $60 \pm 2\%$ (for PCA). From these data, and taking into account the yields in the elution and the fraction eluted with the first 50 μL , it is possible to estimate the efficiency of the C_{18} sorbent for the retention of these compounds. This efficiency ranged between 64% for TCA, 81% for TeCA, 84% for TBA, and 88% for PCA. Moreover, a correlation was seen between the

204

C. García Pinto et al. / J. Chromatogr. A 1260 (2012) 200–205

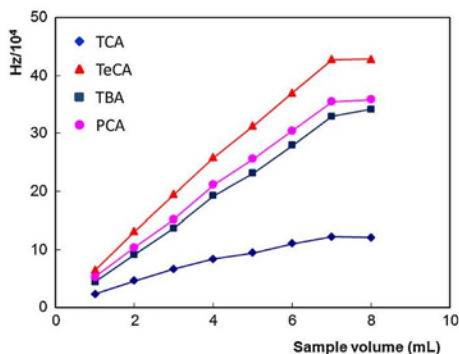


Fig. 4. Influence of sample volume on the analytical signal.

extraction efficiency and the octanol–water partition coefficient of each anisole.

Another important factor to be taken into account is the lifetime of the MEPS BIN. Regarding this, all studies were carried out with the same C₁₈ BIN and no problems of reproducibility were detected in the performance of the device.

3.3. Method validation

3.3.1. Analytical characteristics of the method

Bearing in mind that the usual concentrations of these compounds in wines are in the ng L⁻¹ range, different concentrations (10–250 ng L⁻¹) of haloanisoles in ultrapure water (12% ethanol) were prepared. These solutions were subjected to the optimized preconcentration and separation processes. The figures of merit (Table 2) of the proposed method were evaluated using GC- μ ECD. The validity of the models was tested by ANOVA and it was observed that in all cases the calibration straight lines had no lack of fit. Appropriate correlation coefficients of between 0.9983 and 0.9996 were obtained. Precision studies were carried out with solutions spiked at a concentration level of 0.05 μ g L⁻¹, extracted on the same day (repeatability studies) and on different days (evaluation of reproducibility). The relative standard deviations (RSDs) in the responses measured for the target species remained below 10%. These values may be considered appropriate, bearing in mind that the samples had been subjected to an extraction–preconcentration procedure and then injected into the chromatographic system.

The limits of detection (LODs) of the proposed method ranged from 1.2 to 5.8 ng L⁻¹, whereas the limits of quantification (LOQs) ranged from 4.0 to 19 ng L⁻¹. These values were similar than those achieved with other preconcentration techniques, such as SPME, SPE and SDME [33]. The proposed method is sufficiently sensitive

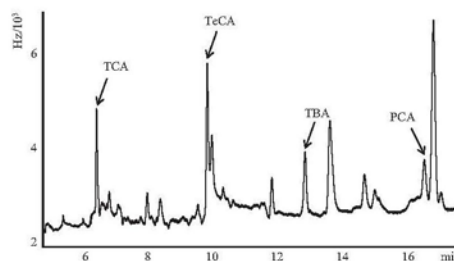


Fig. 5. Chromatogram obtained in the analysis, following the proposed procedure, of a red wine spiked at 40 ng L⁻¹ of each haloanisole.

for the determination of haloanisoles below their threshold levels in wine samples. Moreover, since only 10% of the final extract (50 μ L volume) was injected into the gas chromatograph, it may be expected that with the use of an automated MEPS system coupled directly to the PTV injector (allowing direct injection of the total extract) these limits could be improved.

3.3.2. Application to wine samples

The influence of the wine matrix on the recoveries of haloanisoles was investigated with different wine samples (white and red wines) spiked with target species. The differences between the responses measured for the spiked and non-spiked (blanks) fractions of the same sample were compared with those found for ultrapure water (12% ethanol) at the same level of addition. Without previous spiking of the samples, none of the haloanisoles studied were found at concentration levels above the detection limit of the proposed procedure. Moreover, in the wine samples spiked at different concentration levels and then subjected to the extraction procedure and chromatographic analysis there were no statistically significant differences with the standard solutions. Consequently, the quantification of haloanisoles in wine samples can be performed by external calibration. In these matrices, the LOD were estimated and the values ranged from 2.1 to 8.3 (see Table 2).

Wines with different characteristics (white and red wines) were spiked at different concentration levels (20 and 40 ng L⁻¹) and analyzed following the proposed procedure. Fig. 5 shows the chromatogram relative to the GC/ECD analyses of a spiked red wine (40 ng L⁻¹) in the SLB-IL59 column. As can be seen, all the compounds studied were quantified adequately. Table 3 shows the predictions as well as the precision obtained with external calibration. Recoveries were within the 75% and 98% range. These results are acceptable, considering that these concentrations were at the lowest part of the calibration curve.

Table 2

Concentration ranges, correlation coefficients, repeatability, reproducibility, and limits of detection of the proposed method.

	TCA	TeCA	TBA	PCA
Concentration range studied (ng L ⁻¹)	0.01–0.25	0.01–0.25	0.01–0.25	0.01–0.25
Correlation coefficient (R ²)	0.9996	0.9993	0.9983	0.9983
Repeatability (%) ^a	4.3	4.5	6.6	8.4
Reproducibility (%) ^a	6.8	7.2	8.3	10.3
LOD (ng L ⁻¹) (in solution) ^b	1.8 ± 0.2	1.2 ± 0.3	3.3 ± 0.2	4.8 ± 0.1
LOD (ng L ⁻¹) (in wine) ^b	3.2 ± 0.3	2.1 ± 0.3	5.8 ± 0.4	8.3 ± 0.2

^a 0.05 μ g L⁻¹.

^b n = 8.

Table 3
Determination of the target compounds in wine samples.

Sample	TCA	TECA	TBA	PCA
Red wine (20 ng L ⁻¹)	16 ± 2	15 ± 3	19 ± 2	18 ± 3
White wine (20 ng L ⁻¹)	17 ± 3	16 ± 3	18 ± 1	17 ± 4
Red wine (40 ng L ⁻¹)	39 ± 2	35 ± 3	39 ± 3	36 ± 3
White wine (40 ng L ⁻¹)	36 ± 3	34 ± 3	37 ± 3	38 ± 2

4. Conclusions

The suitability of coupling an MPES procedure with a C₁₈ sorbent and an ionic liquid stationary phase for the extraction and determination of haloanisoles in wine samples is demonstrated. The ionic liquid columns evaluated in the present research showed good separation performance for the target compounds, the IL-59 column being the one that allowed proper separation, relatively free of interference, in the wine samples. The type of sorbent, the elution solvent and sample volume were the most relevant parameters that affected the yield of the MEPS procedure. With the conditions selected (5 mL of sample volume and 50 μ L of extraction volume), detection limits below the threshold levels in wine samples were obtained. In its present form, the method developed provides adequate results concerning precision and linearity, and it is sufficiently sensitive for the determination of haloanisoles below their threshold levels in wine samples. Moreover, the proposed method was successfully applied to the analysis of real samples; no differences were found among the extraction efficiencies with standard solutions and it was possible to use external calibration for quantification, with good results. Future research will focus on the on-line coupling of the MEPS device with a gas chromatograph, which will probably improve the quantification limits of the method. Additionally, the evaluation of more ionic liquid columns, specifically for the determination of halophenols as precursors of haloanisoles without previous derivatization, would be of enormous interest.

Acknowledgments

The authors acknowledge financial support from the DGI (CTQ2010-17514/BQU). A.P.A. is also grateful to the Spanish MEC for the research fellowship. Authors are grateful to Sigma-Aldrich

for the supply of chromatographic columns through the project SILEP (Supelco Ionic Liquid Evaluation Project).

References

- [1] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, Trends Anal. Chem. 27 (2008) 497.
- [2] M. Tobiszewski, A. Mechlinska, B. Zygumt, J. Namiesnik, Trends Anal. Chem. 28 (2009) 943.
- [3] W. Wardencki, J. Curylo, J. Namiesnik, J. Biochem. Biophys. Methods 70 (2007) 275.
- [4] L. Ramos, J. Chromatogr. A 1221 (2012) 84.
- [5] M. Abdel-Rehim, J. Chromatogr. B 801 (2004) 317.
- [6] M. Abdel-Rehim, Anal. Chim. Acta 701 (2011) 119.
- [7] R. Mandrioli, L. Mercolini, D. Lateana, G. Boncompagni, M.A. Raggi, J. Chromatogr. B 879 (2011) 167.
- [8] J. Aulfartová, C. Mahugo-Santana, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, L. Nováková, P. Solich, Anal. Chim. Acta 704 (2011) 33.
- [9] A. El-Beqqali, A. Kussak, M. Abdel-Rehim, J. Chromatogr. A 1114 (2006) 234.
- [10] M. Möder, S. Schrader, U. Winkler, R. Rodil, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 2925.
- [11] A. Prieto, S. Schrader, M. Möder, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 6002.
- [12] I. González-Mariño, J.B. Quintana, I. Rodríguez, S. Schrader, M. Möder, Anal. Chim. Acta 684 (2011) 59.
- [13] A. Prieto, S. Schrader, C. Bauer, M. Moeder, Anal. Chim. Acta 685 (2011) 146.
- [14] G. Grueiro Noche, M.E. Fernández Laespada, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, S. Muniategui Lorenzo, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 9390.
- [15] J. Gonçalves, B. Mendes, C.L. Silva, J.S. Câmara, J. Chromatogr. A 1229 (2012) 13.
- [16] C.F. Poole, S.K. Poole, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 2268.
- [17] J. Liu, J.A. Jönsson, G. Jiang, Trends Anal. Chem. 24 (2005) 20.
- [18] P. Sun, D.W. Armstrong, Anal. Chim. Acta 661 (2010) 1.
- [19] A. Berthod, M.J. Ruiz-Angel, S. Carda-Broch, J. Chromatogr. A 1184 (2008) 6.
- [20] J.L. Anderson, D.W. Armstrong, Anal. Chem. 75 (2003) 4851.
- [21] T. Payagala, Y. Zhang, E. Wanigasekara, K. Huang, Z.S. Breitbach, P.S. Sharma, L.M. Sidisky, D.W. Armstrong, Anal. Chem. 81 (2009) 160.
- [22] K. Huang, X. Zhang, D.W. Armstrong, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 5261.
- [23] C. Ragonese, P.Q. Tranchida, D. Sciarone, L. Mondello, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 8992.
- [24] C. Villegas, Y. Zhao, J.M. Curtis, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 775.
- [25] P. Delmonte, A.-R.F. Kia, J.K.G. Kramer, M.M. Mossoba, L. Sidisky, J.L. Rader, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 545.
- [26] M. Zapadlao, J. Krupčík, T. Kovalczuk, P. Májek, I. Spánik, D.W. Armstrong, P. Sandra, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 746.
- [27] C. Ragonese, D. Sciarone, P.Q. Tranchida, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello, Anal. Chem. 83 (2011) 7947.
- [28] C. Pizarro, C. Sáenz-González, N. Pérez-del-Notario, J.M. González-Sáiz, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 7630.
- [29] C. Pizarro, C. Sáenz-González, N. Pérez-del-Notario, J.M. González-Sáiz, J. Chromatogr. A 1229 (2012) 63.
- [30] Z. Altum, M. Abdel-Rehim, Anal. Chim. Acta 630 (2008) 116.
- [31] L.S. Ettre, J. High Resolut. Chromatogr. 21 (1998) 121.
- [32] E.F. Barry, in: R.L. Grob, E.F. Barry (Eds.), Modern Practice of Gas Chromatography, 4th ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2004, 133 pp.
- [33] R. Montes, I. Rodríguez, E. Rubi, M.H. Bollain, R. Cela, Anal. Chim. Acta 599 (2007) 84.

V. HEADSPACE GENERATION COUPLED TO GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY FOR THE AUTOMATED DETERMINATION OF ENDOGENOUS COMPOUNDS IN URINE. ALDEHYDES AS POSSIBLE MARKERS OF OXIDATIVE STRESS

Journal of Chromatography A, 1367 (2014) 9–15



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma



Headspace generation coupled to gas chromatography–mass spectrometry for the automated determination and quantification of endogenous compounds in urine. Aldehydes as possible markers of oxidative stress



Ana Pérez Antón, Ana María Casas Ferreira, Carmelo García Pinto, Bernardo Moreno Cordero, José Luis Pérez Pavón*

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Salamanca, 37008 Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 July 2014
Received in revised form
15 September 2014
Accepted 15 September 2014
Available online 22 September 2014

Keywords:

Aldehydes
Oxidative stress
Urine
Headspace generation

ABSTRACT

A methodology for the determination of five aldehydes in urine has been developed based on the coupling of a headspace generation sampler with a gas chromatography–mass spectrometry system equipped with a programmed temperature vaporizer. This instrumental configuration minimizes sample manipulation and allows the determination of these compounds without the need for a derivatization step so that the methodology is largely shortened and simplified. An experimental design was carried out in order to optimize the headspace sampling. Sample matrix effect was eliminated by means of dilution of urine samples. The calibration models displayed good linearity (0.1–10 µg/L) and their validity was checked using ANOVA, and it was observed that they did not exhibit any lack of fit. The LODs obtained ranged between 0.04 and 0.08 µg/L and the LOQs between 0.12 and 0.24 µg/L. The accuracy of the method was evaluated in terms of apparent recoveries which were between 86 and 120%. The method developed was applied to the analysis of 17 samples of urine from different subjects in order to quantify these endogenous compounds.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Aldehydes have been studied due to their relation with the process of oxidative stress induced by free radicals. These compounds are lipid-peroxidation products and therefore, could be considered as indicators of free-radical damage related to a great extent with several diseases [1–7], such as cancer [8–10]. Concretely, hexanal and heptanal have been studied as biomarkers of lung cancer [11–18]. Some other aldehydes such as pentanal [1], other aliphatic aldehydes and benzaldehyde have been objects of study for similar reasons [2,19,20].

These aldehydes have been analyzed in different biological matrices including blood [4,6,12–17], urine [1,4,11,18,21] and breath [8,19] for which different analytical methodologies have been proposed. Gas chromatography coupled to mass spectrometry has been applied to the analysis of blood [14–17] and urine [21]. Aliphatic aldehydes have been also determined by means of liquid

chromatography coupled to tandem mass spectrometry [1,2,4,6], to a variable wavelength detector [12,13,18] or to a photo diode array detector [19]. Capillary electrophoresis with amperometric detection has been also used in recent studies; in this case, derivatization is needed to convert aldehydes in electroactive species [11]. Also, in a recent work, a colorimetric sensor array for the discrimination of a group of aldehydes has been developed [22].

For the analysis of aldehydes in biological matrices, different extraction and preconcentration techniques prior to determination have been commonly used. Between the different sample pretreatment techniques, solid-phase extraction (SPE) has been used for the analysis of pentanal and hexanal in urine [1,4] and plasma [6] samples. Solid-phase microextraction has been applied either on its own [18] or coupled with headspace generation technique (HS-SPME) for the analysis of urine [21] and blood samples [15]. Liquid-phase microextraction has been applied both as hollow-fibre liquid-phase microextraction (HF-LPME) in the case of urine samples [11] and dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) for blood sampling [12,13]. A novel method based on magnetic solid-phase extraction with nanoparticles as extraction sorbents has also been developed

* Corresponding author. Tel.: +34 923 294 483; fax: +34 923 294 483.
E-mail address: jlp@usal.es (J.L.P. Pavón).

for the analysis of aldehydes in exhaled breath [19]. In most of the methodologies proposed, a derivatization step is used either *in situ* [1,13,14,17–19] or prior to extraction techniques [4,6,11,12,16]. The most widely used derivatization reagents are 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH) [1,12,13,18,19] and *o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine hydrochloride (PFBHA) [14,16,17]. Nevertheless, other compounds such as cyclohexanedione (CHD) [6], 2,4,6-trichlorophenylhydrazine (TCPH) [23], 4-(2-(trimethylammonio)ethoxy)benzenaminium halide (4-APC) [2,4] and 2-thiobarbituric acid (TBA) [11] have been tested as derivatization reagents.

Sample preparation is considered to be the most delicate and time-consuming step of the analysis. Then, whenever possible, this step should be reduced or even avoided [24,25]. The use of headspace sampling (HS) represents a good option by minimizing sample treatment [26]. Ease of sample preparation, automation, rapidity and the absence of interferences of non-volatile compounds of the matrix make static headspace the technique of choice for complex matrices [27]. With regard to biological samples, this technique has been previously used for the determination of haloacetic acids [28] and trihalomethanes [29] in urine. Headspace generation has also been applied to the determination of volatile organic compounds in the same matrix by means of its coupling with a temperature-controlled cold injection system [30]. Regarding aldehydes determination, headspace sampling base methodologies have been previously proposed for the determination of these compounds in environmental [31], pharmaceutical [32] and food [33–36] matrices.

The aim of the present work is to develop an alternative automated method for the determination of aldehydes in urine samples. The strategy is based on the separation of the volatile aldehydes by headspace sampling coupled to a programmed temperature vaporizer followed by gas chromatography–mass spectrometry determination. To the best of our knowledge, this is the first time that this approach has been proposed for the determination of these analytes in urine samples. No derivatization is required so that the methodology is largely shortened and simplified.

2. Experimental

2.1. Materials and standard solutions

The aldehyde standards (pentanal, hexanal, heptanal, octanal and benzaldehyde) employed in this study as well as the reagents needed for creatinine measurements (creatinine standard and picric acid) were supplied by Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Methanol was of HPLC grade and provided by Merck (Darmstadt, Germany). Sodium chloride, sodium hydroxide and phosphoric acid reagent grade (85%) were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain).

Stock solutions (2500 mg/L in methanol) of each aldehyde were prepared and stored at 4 °C in a refrigerator. These solutions were used to spike the water and urine samples at the different concentrations analyzed.

Optimization of the method was performed with ultra-high quality water (UHQ) and urine sample at concentrations between 400 and 1000 µg/L. UHQ water was obtained with a Wasserlab Ultramatic water purification system (Noain, Spain).

2.2. Sample preparation

NaCl (2.4 g) was added to a 10-mL headspace vial. Then, 1 mL of urine sample was added, followed by 3 mL of UHQ water. The vial was sealed hermetically and placed in the headspace

sampler, where it was shaken at 84 °C for 10 min. During this time, the generation and equilibration of the headspace took place.

2.3. Creatinine measurements

Urine is a highly variable matrix. Not only urine composition can vary daily depending on the diet but also concentration of endogenous compounds varies because of the irregularity of urine volume excreted. Due to this variability, normalization of analyte concentrations to total creatinine concentration (mmol) is required. This practice allows a randomly sampling of urine instead of a 24-h collection.

For this purpose, a modification of Jaffé method has been used [37,38]. Jaffé method is based on the photometric detection of a reddish complex resulting from the reaction between creatinine and picric acid. These measurements were carried by a spectrophotometer Shimadzu UV/Vis-160, equipped with a processing and recording unit, using a quartz cell (Suprasil), 10 mm path length. Normalized concentration values are expressed as nmol aldehyde/mmol creatinine.

2.4. Headspace

HS sampling was performed with a PAL autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland). This sampler is equipped with a tray for 32 consecutive samples and an oven with positions for six sample vials. Oven temperature was kept at 84 °C and the equilibration time was set at 10 min. During this time, agitation of the sample was performed at 750 rpm. A 2.5-mL syringe at 120 °C was used, fixing an injection volume of 2.50 mL. The fill speed and injection speed were fixed to 100 µL/s and 250 µL/s, respectively. After injection, the syringe was cleaned with a flow of He (99.999%, Air Liquid) for 2 min. The time between samples was set at 14 min.

2.5. Programmed temperature vaporization

All experiments were carried out with a programmed temperature vaporizer (PTV) inlet (CIS-4, Gerstel, Baltimore, MD, USA). A Gerstel CIS-4 liner (71 mm × 2 mm) was used, packed with a chemical sorbent (Tenax-TA). In the optimized method, solvent-vent injection mode was used. Cooling was accomplished with liquid CO₂ (Air Liquid).

The initial injector temperature was set at 50 °C. Vent flow was adjusted to 20 mL/min, and vent pressure to 5.00 psi. The purge time was set at 0.5 min. The initial temperature of the liner was maintained for 0.55 min as a safety mechanism so that the heating ramp would start when the split valve was closed. Once venting had finished, the split valve was closed and the liner of the PTV was flash-heated at 12 °C/s up to 250 °C. The analytes were then transferred from the liner to the capillary column (1 min). Then, the split valve was opened and the liner temperature was maintained at 250 °C, and held for 2 min.

2.6. Fast gas chromatography

To perform the gas chromatography measurements, an Agilent 6890 GC device equipped with a low polarity DB-VRX capillary column (20 m × 0.18 mm × 1 µm, working range –10 °C to 260 °C) from J&W Scientific (Folsom, CA, USA) was used. The carrier gas was helium N50 (99.999% pure; Air Liquide).

The column oven temperature programme used an initial temperature of 45 °C for 2.00 min; an increase at 60 °C/min–175 °C and then an increase at 45 °C/min–240 °C, finally holding for 0.5 min. These temperature ramps are the maximum ones permitted by the instrumental configuration employed. The total chromatographic run time was 6.11 min.

Table 1
Quantitation and qualifier ions for the five aldehydes.

Compound	SIM ions (<i>m/z</i>)	<i>t_R</i> (min)
Pentanal	44, 58, 29	3.112
Hexanal	44, 56, 41	3.605
Heptanal	44, 70, 43	4.011
Benzaldehyde	106, 77, 105, 44, 84	4.295
Octanal		4.365

2.7. Mass spectrometry

The detector was a quadrupole mass spectrometer (HP 5973 N). It was operated in the electron ionization mode using a voltage of 70 eV. The ion source temperature was 230 °C, and the quadrupole was set to 150 °C. A solvent delay of 2 min was established. The analyses were performed in synchronous SIM/scan mode which allowed both SIM and full scan data to be collected in a single run. Full scan (25–160 *m/z*, scan rate, 23.58 cycles/s, abundance threshold value, was used for identification and SIM for quantification, selecting the characteristic ions in each case (Table 1), with a dwell time of 10 ms. Target compounds were identified by comparison of the experimental spectra with those of the NIST'98 database (NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library, version 1.6).

2.8. Data analysis

Data acquisition was performed with Enhanced ChemStation, G1701EA Ver. E.00.00.202 software from Agilent Technologies.

3. Results and discussion

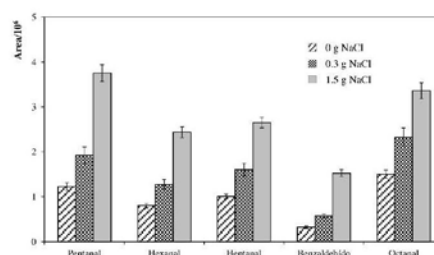
3.1. Variables affecting HS generation

In order to determine the optimum conditions for headspace generation, the variables studied were as follows: ionic strength, pH, sample volume, equilibration time and equilibration temperature.

The variation in the activity coefficient (γ_2) was studied by modifying the sample matrix. In the case of aqueous samples and polar analytes, this effect is achieved by adding an electrolyte to the medium (salting-out). A study was made of the effect of the addition of the electrolyte (NaCl) to the vials at three concentration levels: without NaCl, 0.3 g in 3 mL, and 1.5 g in 3 mL (supersaturation). The best results were obtained under supersaturation conditions (Fig. 1).

With regard to pH evaluation, different values were tested: acidic (10 μ L phosphoric acid), physiological and basic (10 μ L NaOH 1 M) pH. No significant differences were found between the three pH values, so that the physiological one was selected as the optimum pH.

The rest of the variables affecting HS, sample volume, equilibration time and equilibration temperature were studied by means of a multivariate experimental design due to the interactions between them. Temperature affects equilibrium and thus, equilibration time. Besides, time to achieve equilibrium could be also conditioned by sample volume. To study the effect of each of the

**Fig. 1.** Signals obtained for the aldehydes with different salt addition values.

three variables individually and their interactions on the analytical signal, a Box–Behnken experimental design was used. This design allows the generation of response surfaces by using three levels of each factor studied. In all cases, UHQ water samples spiked with aldehyde concentrations between 80 μ g/L (octanal) and 1 mg/L (benzaldehyde) were used. Each of the experiments was performed in triplicate so as to be able to detect any lack of fit of the data in the model generated. The response chosen was the peak area corresponding to the base peak of the spectrum of each one of the analyzed compounds. Only the model including the variables, their squares and the interactions among them did not show a lack of fit.

The values evaluated were: temperature (A), 70, 80 and 90 °C; time (B), 10, 20 and 30 min and sample volume (C), 1, 2.5 and 4 mL. As may be seen in Table 2, the significant variables found were temperature (A) for pentanal and benzaldehyde, sample volume (C), that was significant for all the compounds, the interaction between temperature and sample volume for pentanal, hexanal and benzaldehyde, and the squares of temperature (AA) for pentanal, hexanal and heptanal, and sample volume (CC) for hexanal, heptanal and octanal.

As volume was the only variable which was significant for all the compounds, surfaces of response to analyze the influence of temperature were generated at a constant volume of 4 mL being the optimal for all the aldehydes (Fig. 2). As equilibration temperature, 84 °C was chosen, being the average value of the optimum ones obtained for the aldehydes for which this variable was significant. In light of the results obtained with the experimental design, the values that provided the maximum signal were 10 min for the equilibration time, 4 mL for the sample volume and 84 °C for the equilibration temperature.

3.2. PTV-GC-MS conditions

Concerning the injection conditions, the study of variables affecting HS generation was performed with a 1:5 split mode of injection. Once those variables were optimized, the PTV inlet was set to the solvent-vent mode in order to enhance the sensitivity.

Initial temperature used in the PTV is an important parameter when solvent vent injection mode is selected so that a study of this

Table 2
Results of the experimental design (*p* values). A, temperature; B, equilibration time; C, volume.

Compound	A	B	C	AB	AC	BC	AA	BB	CC
Pentanal	0.0001	0.6633	0.0000	1.0000	0.0000	0.3869	0.0000	0.1417	0.9568
Hexanal	0.7837	0.8729	0.0000	0.7606	0.0023	0.4196	0.0003	0.1988	0.0035
Heptanal	0.7312	0.9574	0.0000	0.5310	0.0518	0.4752	0.0025	0.1875	0.0005
Benzaldehyde	0.0000	0.5846	0.0000	0.3087	0.0072	0.4943	0.2583	0.8347	0.0982
Octanal	0.3807	0.8096	0.0000	0.5080	0.3437	0.1626	0.0760	0.7797	0.0000

variable was carried out with temperatures ranging 10–90 °C. A temperature of 50 °C was chosen, been the one for which the highest signals for the whole of the analytes were obtained. Vent flow along with times of purge and transference were also studied and the optimum values chosen were 20 mL/min, 0.5 min and 1 min, respectively.

Regarding gas chromatography oven temperatures, the ramps set were the maximum ones permitted by the gas chromatograph configuration. However, three initial temperatures (35, 40 and 45 °C) were tested to decide on the optimum one. Although there were no significant differences in the area of the peaks obtained with the three temperatures, the time that the chromatograph took to cool the oven down to 35 or 40 °C lengthened the total analysis time. So that finally, 45 °C was chosen as the initial temperature of the oven programme.

The detector was set at the scan acquisition mode during variable optimization step and once the optimal conditions for the analysis were selected, it was set at the simultaneous SIM/scan mode, this mode of acquisition enables collection of both SIM (selected ion monitoring) and full-scan data in a single run.

The main advantage of this acquisition mode is that with one injection, a SIM chromatogram and a scan chromatogram are obtained, for identification and quantification of the samples, respectively, and thereby saving analysis time. In the SIM mode, it is necessary to optimize the dwell time for each ion selected. Different dwell times (1, 10, 30, 50, 70 and 100 ms) were studied. With high dwell time values (70 and 100 ms) peaks showed poor definition and, on the contrary, with a dwell time of 1 ms, peaks were more clearly defined though the chromatogram noise was increased greatly. The best relation between definition of the peaks

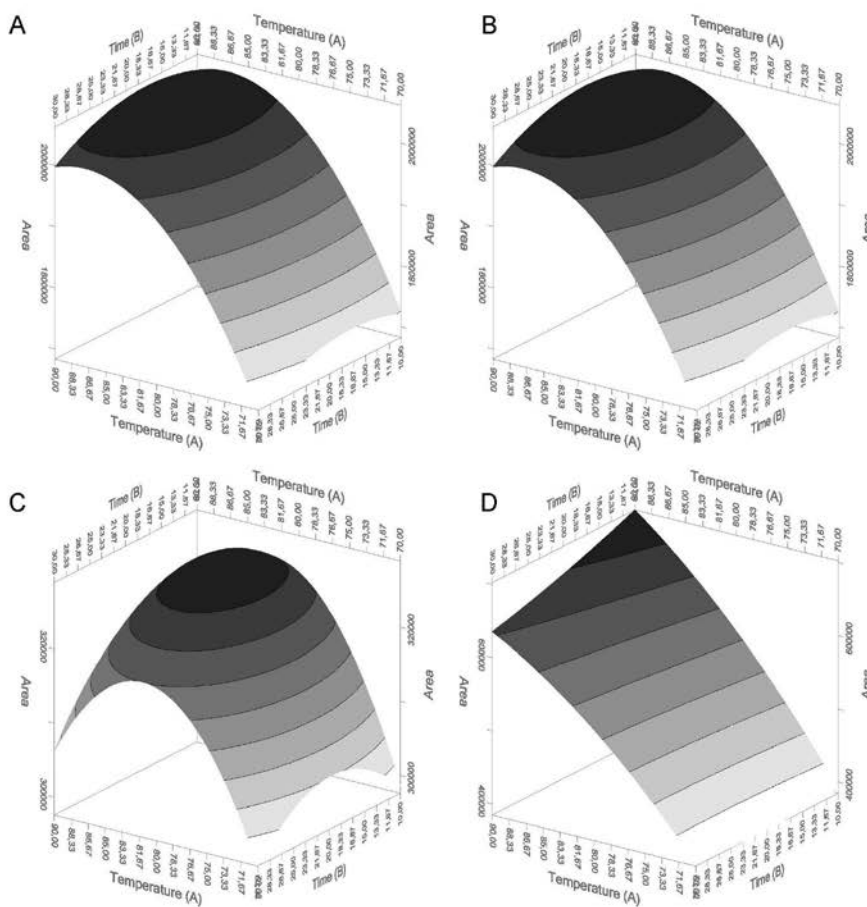


Fig. 2. Surfaces of response generated at a constant volume of 4 mL and variable values of time and temperature (A: pentanal, B: hexanal, C: heptanal and D: benzaldehyde).

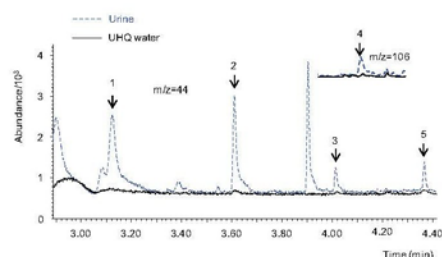


Fig. 3. Chromatograms of a UHQ water sample and a urine sample in which numbered peaks correspond to pentanal (1), hexanal (2), heptanal (3), benzaldehyde (4) and octanal (5).

and noise signals was found for a dwell time of 10 ms, so this was the dwell time selected.

Fig. 3 shows the chromatograms obtained for a urine sample and for a UHQ water sample with the optimized conditions.

3.3. Matrix effect

In order to check for possible matrix effects and investigate the applicability of the method to real urine analysis, a comparison between signals obtained with aqueous and urine samples (7 different subjects) was carried out. Samples were spiked at concentrations between 80 $\mu\text{g/L}$ (octanal) and 1 mg/L (benzaldehyde). Significant differences were observed between urine samples and between urines and UHQ samples. In order to avoid this, the possibility of sample dilution with UHQ water was evaluated. The dilution ratio selected were 1:4 (1 mL urine + 3 mL UHQ water). After dilution, matrix effect between urine samples and between urine and UHQ water was eliminated. When proposing a routine methodology, standard additions calibration should be avoided whenever possible. The smaller signals obtained due to dilution are greatly compensated by the possibility of using external calibration instead of standard addition calibration.

3.4. Evaluation of the PTV-GC-MS method

Calibration curves were obtained with ten concentration levels ranging from 0.1 to 10 $\mu\text{g/L}$. Each level was analyzed in triplicate. The analytical characteristics of the method are shown in Table 3. The calibration models displayed linear behaviour. Their validity was checked using ANOVA, and it was observed that they did not exhibit any lack of fit. The value of the correlation determination coefficient (R^2) was higher than 0.98 for all the compounds.

Repeatability and reproducibility evaluation was carried out with solutions spiked at a concentration level of 1 $\mu\text{g/L}$ and analyzed on the same day (10 replicates) and on different days (3 replicates per day). The relative standard deviation (% RSD) obtained for all the compounds is shown in Table 3, with values below 12.2% for repeatability and 17.9% for reproducibility.

Table 3
Analytical characteristics of the method.

Compound	Calibration range ($\mu\text{g/L}$)	R^2	Repeatability (%)	Reproducibility (%)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)
Pentanal	0.1–10	0.9990	6.3	13.8	0.04	0.12
Hexanal	0.1–10	0.9980	12.2	8.0	0.06	0.18
Heptanal	0.1–10	0.9800	10.4	17.9	0.04	0.12
Benzaldehyde	0.1–10	0.9952	11.7	14.1	0.08	0.24
Octanal	0.1–10	0.9984	10.1	6.1	0.07	0.21

Table 4
Apparent recoveries of five urine samples spiked at 5 $\mu\text{g/L}$.

Compound	Recovery (5 $\mu\text{g/L}$, %) (RSD, %)				
	Urine 1	Urine 2	Urine 3	Urine 4	Urine 5
Pentanal	100 (8)	94 (8)	102 (8)	96 (8)	104 (6)
Hexanal	100 (10)	94 (8)	102 (8)	94 (8)	102 (8)
Heptanal	110 (10)	100 (10)	104 (8)	104 (8)	112 (9)
Benzaldehyde	110 (10)	96 (8)	86 (8)	88 (12)	92 (8)
Octanal	116 (8)	120 (8)	120 (8)	110 (8)	114 (8)

The limits of detection (LODs) and the limits of quantification (LOQs) are also shown in Table 3. The LODs obtained ranged between 0.04 and 0.08 $\mu\text{g/L}$ and the LOQs between 0.12 and 0.24 $\mu\text{g/L}$. These values are similar to the ones obtained using other methodologies, such as solid phase extraction or solid phase microextraction coupled to liquid chromatography [1,18]. Slightly lower values were obtained with the methodology proposed here when compared with others using solid phase microextraction coupled to gas chromatography [11,21] or hollow fibre liquid-phase microextraction coupled to capillary electrophoresis and amperometric detection [11].

The accuracy of the method was evaluated in terms of apparent recoveries. Five urine samples (from different subjects) were spiked at 5 $\mu\text{g/L}$. The apparent recoveries (Table 4), calculated as the ratio of the measured concentration to the spiked concentration (expressed as percentages), were between 86 and 120%.

Absolute recoveries were calculated by comparing the GC-MS peak areas of the extracted compounds from a urine sample (1 $\mu\text{g/L}$) with those of a standard solution of the analytes in methanol injected directly into the system. In both cases, the amount of analyte injected into the GC was the same. The values obtained were 37% for pentanal, 57% for hexanal, 45% for heptanal, 11% for benzaldehyde and 74% for octanal. These values were low except for octanal, showing that the extraction was not quantitative. However, it was constant along the linear range and the LODs and LOQs of the method were satisfactory.

3.5. Urine samples

The method developed was applied to the analysis of 17 samples of urine from healthy subjects in order to quantify the aldehydes and estimate the concentrations of these endogenous compounds in urine samples.

With the aim of contemplating variability resulting from gender, age and smoking habit, individual donors of both sexes were chosen with ages ranging between 23 and 60 years old where 7 of the 17 samples pertain to active smoking subjects. Table 5 shows the results obtained (concentrations are expressed normalized to creatinine concentration, nmol analyte/mmol creatinine), distinguishing between non-smoking and smoking subjects. Cigarette smoke has been broadly considered as an exogenous carcinogen, promoting the presence of reactive oxygen species in the organism [39]. These species are generated when mainstream cigarette smoke interacts with physiological fluids.

Regarding differences between smokers and non-smokers, concentrations of the studied aldehydes were not significantly

Table 5
Results obtained for the compounds under study in urine samples ($n = 3$). Concentrations are given as nmol analyte/nmol creatinine.

Subject	Pentanal	Hexanal	Heptanal	Benzaldehyde	Octanal
No smokers					
Subject 1	1.7 ± 0.2	1.9 ± 0.3	0.4 ± 0.1	2.3 ± 0.4	0.2 ± 0.03
Subject 2	1.4 ± 0.1	3.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.2 ± 0.01
Subject 3	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.1 ± 0.02
Subject 4	1.6 ± 0.1	2.9 ± 0.2	0.6 ± 0.1	1.5 ± 0.2	0.2 ± 0.02
Subject 5	1.8 ± 0.1	3.9 ± 0.2	0.3 ± 0.1	7.5 ± 0.4	0.2 ± 0.02
Subject 6	1.4 ± 0.1	2.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.1 ± 0.02
Subject 7	1.8 ± 0.3	1.6 ± 0.5	0.4 ± 0.2	1.7 ± 0.6	0.1 ± 0.05
Subject 8	2.1 ± 0.1	3.3 ± 0.2	0.6 ± 0.1	5.6 ± 0.3	0.3 ± 0.02
Subject 9	1.0 ± 0.1	2.0 ± 0.2	0.6 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.1 ± 0.02
Subject 10	2.2 ± 0.2	1.5 ± 0.4	0.6 ± 0.2	2.6 ± 0.6	0.3 ± 0.05
Concentration interval	0.6–2.2	0.9–3.9	0.3–0.6	0.6–7.5	0.1–0.3
Smokers					
Subject 11	4.1 ± 0.2	4.5 ± 0.3	0.9 ± 0.1	5.8 ± 0.4	0.3 ± 0.03
Subject 12	0.8 ± 0.1	2.0 ± 0.2	0.3 ± 0.1	1.5 ± 0.2	0.2 ± 0.02
Subject 13	1.4 ± 0.2	1.6 ± 0.3	0.3 ± 0.1	1.1 ± 0.4	0.1 ± 0.03
Subject 14	2.7 ± 0.1	4.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1	2.0 ± 0.2	0.2 ± 0.02
Subject 15	0.8 ± 0.1	2.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1	1.4 ± 0.2	0.2 ± 0.02
Subject 16	0.9 ± 0.1	6.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1	1.5 ± 0.1	0.1 ± 0.01
Subject 17	2.1 ± 0.2	1.8 ± 0.3	0.3 ± 0.1	1.1 ± 0.3	0.2 ± 0.02
Concentration interval	0.8–4.1	1.6–6.2	0.2–0.9	1.1–5.8	0.1–0.3

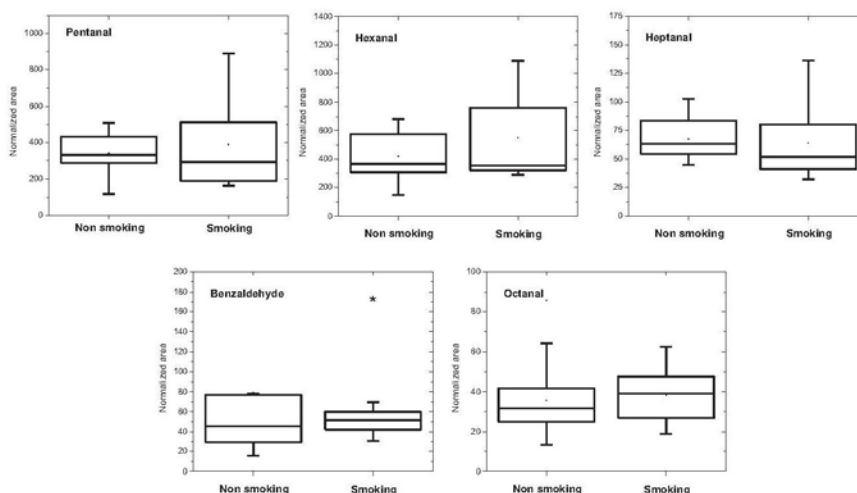


Fig. 4. Box plots representing the concentration of the analytes found in healthy subjects, distinguished between non-smoking (solid line) and smoking (dashed line) subjects.

different and, as shown in Fig. 4, and only slight differences in the interquartile range can be detected for some of them (pentanal and benzaldehyde).

4. Conclusions

In the present work, a simplified and shortened procedure for the determination of five aldehydes in urine has been developed based on the coupling of headspace generation sampler with a gas chromatograph–mass spectrometry system equipped with a programmed temperature vaporizer. This instrumental configuration minimizes sample manipulation and therefore may reduce errors

associated with this step of the analysis. Besides, with the proposed methodology, derivatization of the aldehydes, commonly used in the analysis of these compounds, is not required.

The method developed allowed quantification of five aldehydes in urine samples by means of external calibration, the analytical characteristics of the method showed no lack of fit, suitable reproducibility and repeatability values, and LODs between 0.04 and 0.08 $\mu\text{g/L}$. These values are among the lowest found in bibliography, where other techniques, such as solid phase microextraction coupled with both liquid chromatography and gas chromatography, are proposed for the determination of these compounds in urine samples.

No significant differences in the concentrations of the aldehydes studied were found between smokers and non-smokers samples.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from the DGI (CTQ2010-17514/BQU). A.P.A. is also grateful to the Spanish MEC for the research fellowship.

References

- C.E. Baños, M. Silva, Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of low-molecular mass aldehydes in human urine, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 653–658.
- M. Eggink, M. Wijtmans, R. Ekkebus, H. Lingeman, I.J.P.D. Esch, J. Kool, W.M.A. Niessen, H. Irtb, Development of a selective ESI-MS derivatization reagent: synthesis and optimization for the analysis of aldehydes in biological mixtures, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9042–9051.
- S. Meinardi, K. Jin, B. Barletta, D.R. Blake, N.D. Vaziri, Exhaled breath and fecal volatile organic biomarkers of chronic kidney disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1830 (2013) 2531–2537.
- M. Eggink, S. Charret, M. Wijtmans, H. Lingeman, J. Kool, W.M.A. Niessen, H. Irtb, Development of an on-line weak-cation exchange liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for screening aldehyde products in biological matrices, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 3937–3945.
- L.L. de Zwart, J.H. N. Meerman, J.M.M. Commandeur, N.P.E. Vermeulen, Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 202–226.
- L.C. O'Brien-Coker, G. Perkins, A.L. Mallet, Aldehyde analysis by high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 920–928.
- H.H. Draper, A.S. Csallany, M. Hadley, Urinary aldehydes as indicators of lipid peroxidation in vivo, *Free Radic. Biol. Med.* 29 (2000) 1071–1077.
- M. Hakim, Y.Y. Broza, O. Barash, N. Peled, M. Phillips, A. Amann, H. Haick, Volatile organic compounds of lung cancer and possible biochemical pathways, *Chem. Rev.* 112 (2012) 5949–5966.
- M. Yazdanpanah, X. Luo, R. Lau, M. Greenberg, L.J. Fisher, D.C. Lehotay, Cytotoxic aldehydes as possible markers for childhood cancer, *Free Radic. Biol. Med.* 23 (1997) 870–878.
- S.M. Rocha, M. Caldeira, J. Carrola, M. Santos, N. Cruz, I.F. Duarte, Exploring the human urine metabolomic potentialities by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time of flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1252 (2012) 155–163.
- F. Chen, C. Wang, M. Zhang, X. Zhang, Y. Liu, J. Ye, Q. Chu, Sensitive determination of endogenous hexanal and heptanal in urine by hollow-fiber liquid-phase microextraction prior to capillary electrophoresis with amperometric detection, *Talanta* 119 (2014) 83–89.
- L. Lill, H. Xu, D. Song, Y. Cui, S. Hu, G. Zhang, Analysis of volatile aldehyde biomarkers in human blood by derivatization and dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2365–2370.
- H. Xu, L. Lv, S. Hu, D. Song, High-performance liquid chromatographic determination of hexanal and heptanal in human blood by ultrasound-assisted headspace liquid-phase microextraction with in-drop derivatization, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2371–2375.
- C. Deng, N. Li, X. Zhang, Development of headspace solid-phase microextraction with on-fiber derivatization for determination of hexanal and heptanal in human blood, *J. Chromatogr. B* 813 (2004) 47–52.
- C. Deng, X. Zhang, N. Li, Investigation of volatile biomarkers in lung cancer blood using solid-phase microextraction and capillary gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 808 (2004) 269–277.
- N. Li, C. Deng, N. Yao, X. Shen, X. Zhang, Determination of acetone, hexanal and heptanal in blood samples by derivatization with pentafluorobenzyl hydroxylamine followed by headspace single-drop microextraction and gas chromatography–mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 540 (2005) 317–323.
- N. Li, C. Deng, X. Yin, N. Yao, X. Shen, X. Zhang, Gas chromatography–mass spectrometric analysis of hexanal and heptanal in human blood by headspace single-drop microextraction with droplet derivatization, *Anal. Biochem.* 342 (2005) 318–326.
- H. Xu, S. Wang, G. Zhang, S. Huang, D. Song, Y. Zhou, G. Long, A novel solid-phase microextraction method based on polymer monolith frit combining with high-performance liquid chromatography for determination of aldehydes in biological samples, *Anal. Chim. Acta* 690 (2011) 86–93.
- H. Xu, Y. Wei, L. Zhu, J. Huang, Y. Li, F. Liu, S. Wang, S. Liu, Bifunctional magnetic nanoparticles for analysis of aldehyde metabolites in exhaled breath of lung cancer patients, *J. Chromatogr. A* 1324 (2014) 29–35.
- A. Bajtarevic, C. Ager, M. Pienz, M. Kleber, K. Schwarz, M. Ligor, T. Ligor, W. Filipiak, H. Denz, M. Fiegl, W. Hilbe, W. Weiss, P. Lukas, H. Jarnig, M. Hackl, A. Haidenberger, B. Buszewski, W. Miekisch, J. Schubert, A. Amann, Noninvasive detection of lung cancer by analysis of exhaled breath, *BMC Cancer* 9 (2009) 348–363.
- R. Guadagni, N. Miraglia, A. Simonelli, A. Silvestre, M. Lamberti, D. Feola, A. Acampora, N. Sannolo, Solid-phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry method validation for the determination of endogenous substances: urinary hexanal and heptanal as lung tumor biomarkers, *Anal. Chim. Acta* 701 (2011) 29–36.
- J. Li, C. Hou, D. Huo, M. Yang, H. Fa, P. Yang, Development of a colorimetric sensor array for the discrimination of aldehydes, *Sens. Actuators B: Chem.* 196 (2014) 10–17.
- C.N. Konidari, T.S. Giannopoulos, C.G. Nanos, C.D. Stalikas, Determination of plasma, urine, and bovine serum albumin low-molecular-weight carbonyl levels by capillary gas chromatography with electron-capture and mass-selective detection, *Anal. Biochem.* 338 (2005) 62–70.
- A. Namera, T. Saito, Recent advances in unique simple preparation techniques for bioanalysis, *Bioanalysis* 5 (2013) 915–932.
- P.L. Kole, G. Venkatesh, J. Kotecha, R. Sheshala, Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods, *Biomed. Chromatogr.* 25 (2011) 199–217.
- B. Kolb, in: I.D. Wilson (Ed.), *CHROMATOGRAPHY: GAS/Headspace Gas Chromatography*, Encyclopedia of Separation Science, Academic Press, Oxford, 2000, pp. 489–496.
- N.H. Snow, G.P. Bullock, Novel techniques for enhancing sensitivity in static headspace extraction-gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2726–2735.
- M.J. Cardador, M. Gallego, Determination of haloacetic acids in human urine by headspace gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 1824–1830.
- J. Caro, A. Serrano, M. Gallego, Sensitive headspace gas chromatography–mass spectrometry determination of trihalomethanes in urine, *J. Chromatogr. B* 848 (2007) 277–282.
- H.G. Wahl, A. Hoffmann, D. Luft, H.M. Liebich, Analysis of volatile organic compounds in human urine by headspace gas chromatography–mass spectrometry with a multipurpose sampler, *J. Chromatogr. A* 847 (1999) 117–125.
- I. San Román, M.L. Alonso, L. Bartolomé, R.M. Alonso, R. Fafanías, Analytical strategies based on multiple headspace extraction for quantitative analysis of aroma components in mushrooms, *Talanta* 123 (2014) 207–217.
- Z. Li, L.K. Jacobus, W.P. Wuelfing, M. Golden, G.P. Martin, R.A. Reed, Detection and quantification of low-molecular-weight aldehydes in pharmaceutical excipients by headspace gas chromatography, *J. Chromatogr. A* 1104 (2006) 1–10.
- Y. Wang, J. Ha, Determination of hexanal in rice using an automated headspace sampler coupled to a gas chromatography–mass spectrometer, *J. Chromatogr. Sci.* 51 (2013) 446–452.
- M. Serrano, M. Gallego, M. Silva, Static headspace gas chromatography–mass spectrometry for the one-step derivatization and extraction of eleven aldehydes in drinking water, *J. Chromatogr. A* 1307 (2013) 158–165.
- C. Colina-Coca, D. González-Peña, E. Vega, B. de Ancos, C. Sánchez-Moreno, Novel approach for the determination of volatile compounds in processed onion by headspace gas chromatography–mass spectrometry (HS GC-MS), *Talanta* 103 (2013) 137–144.
- J. Tian, Application of static headspace gas chromatography for determination of acetaldehyde in beer, *J. Food Compos. Anal.* 23 (2010) 475–479.
- M. Jaffe, Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure im normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins, *Z. Physiol. Chem.* 10 (1886) 391–400.
- J.R. Delanghe, M.M. Speeckaert, Creatinine determination according to Jaffe – what does it stand for? *NDT Plus* 4 (2011) 83–86.
- B. Halliwell, H.E. Poulsen, *Cigarette Smoke and Oxidative Stress*, Springer, Berlin, 2006.

VI. HEADSPACE-PROGRAMMED TEMPERATURE VAPORIZATION-MASS SPECTROMETRY FOR THE RAPID DETERMINATION OF POSSIBLE VOLATILE BIOMARKERS OF LUNG CANCER IN URINE

Anal Bioanal Chem (2016) 408:5239–5246
DOI 10.1007/s00216-016-9618-5



RESEARCH PAPER

Headspace-programmed temperature vaporization-mass spectrometry for the rapid determination of possible volatile biomarkers of lung cancer in urine

Ana Pérez Antón¹ · Álvaro García Ramos¹ · Miguel del Nogal Sánchez¹ · José Luis Pérez Pavón¹ · Bernardo Moreno Cordero¹ · Ángel Pedro Crisolino Pozas²

Received: 8 April 2016 / Accepted: 3 May 2016 / Published online: 14 May 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract We propose a new method for the rapid determination of five volatile compounds described in the literature as possible biomarkers of lung cancer in urine samples. The method is based on the coupling of a headspace sampler, a programmed temperature vaporizer in solvent-vent injection mode, and a mass spectrometer (HS-PTV-MS). This configuration is known as an electronic nose based on mass spectrometry. Once the method was developed, it was used for the analysis of urine samples from lung cancer patients and healthy individuals. Multivariate calibration models were employed to quantify the biomarker concentrations in the samples. The detection limits ranged between 0.16 and 21 µg/L. For the assignment of the samples to the patient group or the healthy individuals, the Wilcoxon signed-rank test was used, comparing the concentrations obtained with the median of a reference set of healthy individuals. To date, this is the first time that multivariate calibration and non-parametric methods have been combined to classify biological samples from profile signals obtained with an electronic nose. When significant differences in the concentration of one or more biomarkers were found with respect to the reference set, the sample is considered as a positive one and a new

analysis was performed using a chromatographic method (HS-PTV-GC/MS) to confirm the result. The main advantage of the proposed HS-PTV-MS methodology is that no prior chromatographic separation and no sample manipulation are required, which allows an increase of the number of samples analyzed per hour and restricts the use of time-consuming techniques to only when necessary.

Keywords HS-PTV-MS · Volatile biomarkers · Multivariate calibration · Wilcoxon signed-rank test · Lung cancer and urine

Introduction

The analysis of urine is a non-invasive method widely used in diagnosis. Accordingly, numerous works addressing the study of compounds existing in this matrix are currently ongoing with the aim of improving or accelerating the detection of certain diseases [1]. As a result of these studies, some compounds have been described as possible biomarkers of different disorders. Biomarkers are therefore compounds whose presence or absence could be related to a certain disease or whose concentration differs between samples from healthy people and from patients suffering from a given disease [2, 3]. Usually, a group of biomarkers is used, rather than a single one, for the characterization of a sample. In this work, five possible volatile biomarkers of lung cancer in urine samples were studied (2-butanone, 2-pentanone, pyrrole, 2-heptanone, and 2-ethyl-1-hexanol) [2, 4].

As mentioned, urine has the great advantage of being readily available and so, generally, volume is not an important issue. However, urine is a rather complex matrix whose analysis usually requires thorough sample preparation for analyte isolation and preconcentration [3–9]. Headspace sampling [3–10] is the technique of choice for the analysis of volatile

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-016-9618-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Miguel del Nogal Sánchez
mns@usal.es

¹ Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Salamanca, 37008 Salamanca, Spain

² Servicio de Medicina Interna, Hospital Virgen de la Vega, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

biomarkers in urine samples owing to ease of sample preparation, automation, speed, and the absence of interferences from non-volatile compounds in the matrix. Nevertheless, this technique does not always guarantee that certain problems such as the matrix effect can be overcome [5, 10].

Gas chromatography has been the main technique of choice for the analysis of volatile compounds in urine [3, 4, 6–10], but chromatographic procedures are generally slow and time-consuming. However, several alternatives can be employed to speed up GC separations. These include the use of shorter capillary columns with narrower bores and fast temperature programming. Additionally, the development of non-separative methods for the resolution of different analytical problems is currently of great interest, mainly owing to their fast analysis speed. Some non-separative methods based on sensors [11–14] and even on trained dogs [15] have been proposed for the discrimination of patients suffering from different diseases and healthy controls, using breath, saliva, blood, and urine samples. Electronic nose technology has developed significantly, along with advances in different sensor platforms and complex microarray devices. Electronic noses based on MS, where each mass to charge ratio (m/z) acts as a “sensor” that detects any ion fragment with that ratio, have been used for several tasks including biomedical applications [9, 16] and analysis of beverages [17, 18] among others. Besides electronic noses, other sensitive and non-separative methods such as desorption electrospray ionization-mass spectrometry (DESI/MS) [19], selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT/MS) [20], and NMR [19] are often used for the determination of biomarkers in urine samples.

In the present work, a rapid, simple, sensitive, and non-separative method (HS-PTV-MS) for the determination of volatile biomarkers of lung cancer in urine samples is proposed. Five biomarkers have been selected as trial or test compounds to check the possibilities of the proposed methodology. This set of compounds includes some biomarkers (2-pentanone and 2-ethyl-1-hexanol) which have provided very good results in the discrimination of control and lung cancer samples according to the bibliography [2, 4]. Multivariate calibration models were employed to quantify the biomarker concentration in the samples, and the Wilcoxon signed-rank test was used to classify the samples in the group of healthy individuals or in the group of patients with lung cancer, comparing the sample concentrations with the median of the concentrations of a reference group of healthy individuals. To date, this is the first time that multivariate calibration and non-parametric methods have been combined to decide on whether a biological sample belongs to one set or another from its profile signal obtained with an electronic nose based on MS. For the samples assigned to the patient group, a new analysis was performed using a chromatographic method (HS-PTV-GC/MS) for confirmatory purposes.

Material and methods

Reagents, standards, and samples

2-Butanone, 2-pentanone, pyrrole, 2-heptanone, and 2-ethyl-1-hexanol were supplied by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Methanol was supplied by Merck (Darmstadt, Germany). The purities of the compounds were at least 98 %. Ultra-high-quality (UHQ) water was obtained with a Wasserlab Ultramatic water purification system (Noain, Spain).

Stock solutions (490–5000 mg/L in methanol) of each compound were prepared and stored at 4 °C in a refrigerator. They were diluted in methanol and used to prepare the working solutions (0.048–12 mg/L) containing the five compounds in ultrapure water.

Urine samples were obtained from 20 adults of both sexes and were stored at –20 °C. Sample nos. 1–13 (four women, nine men) were from healthy individuals apparently unaffected by diseases; sample nos. 14–20 (two women, five men) were from patients at the Internal Medicine Unit of the Virgen de la Vega Hospital in Salamanca. Patient no. 14 had a metastatic infiltrating urothelial carcinoma, no. 15 had a metastatic multicentric hepatocarcinoma, and nos. 16–20 had lung diseases (four patients had lung neoplasms and the other had lung metastasis from melanoma). For the analyses, the samples were left at room temperature until they had thawed completely. Then, they were transferred to a 15-mL glass centrifuge tube with a screw cap (Scharlau, Spain) and were centrifuged for 10 min at 5000 rpm. To perform the measurements of the samples (healthy volunteers and patients), 4.0 mL of urine, 2.0 g of NaCl, and 50 µL of ultrapure water were transferred to a 10-mL headspace vial (Agilent Technologies, DE, Germany) which was sealed with a Teflon[®]/silicone septum (Agilent Technologies, DE, Germany). To measure the spiked samples, 4.0 mL of urine, 2.0 g of NaCl, and 50 µL of the working solution described above were transferred to a 10-mL headspace vial which was sealed with a Teflon[®]/silicone septum. Each sample was analyzed in triplicate (three vials, one injection per vial).

The study was authorized by the Hospital Ethics Committee.

The concentration of endogenous compounds may also vary because of the irregularity of the volume of urine excreted. Because of this variability, normalization of the analyte concentrations to the total creatinine concentration (mmol) is required. This practice allows a random sampling of urine instead of a 24-h collection. For this purpose, a modification of the Jaffè method has been used [21, 22]. These measurements were made on a Shimadzu UV/Vis-160 spectrophotometer equipped with a processing and recording unit, using a quartz cell (Suprasil) with a 10-mm path length. Normalized concentration values are expressed as nanomoles of analyte/millimole of creatinine.

Measurements with the screening method (HS-PTV-MS)

HS sampling was performed with a PAL autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland). This sampler is equipped with a tray for 32 consecutive samples and an oven with positions for six sample vials. The oven temperature was kept at 90 °C and the equilibration time was set at 5 min. During this time, the vials were shaken at 750 rpm in the oven. A 2.5-mL syringe at 110 °C was used.

The experiments were carried out with a programmed temperature vaporizer (PTV) inlet (CIS-4: Gerstel, Baltimore, MD, USA), with a liner (71 mm × 2 mm) packed with Tenax-TA[®]. Solvent-vent injection mode was used. Initially, the sample from the headspace was injected into the PTV injector, which was at 35 °C, such that the analytes were retained in the liner while the split valve was open, allowing solvent elimination (0.10 min). The vent flow was adjusted to 50 mL/min and a venting pressure at 5.0 psi (34,474 Pa) was imposed. In the second step, involving the transfer of the sample to the column, the split valve was closed and the PTV was heated rapidly (12 °C/s) until it reached 250 °C. Thus, the analytes were desorbed and transferred to the column (1.5 min). Finally, the split valve was opened again to clean the system (purge flow 150 mL/min) and the liner temperature was held at 250 °C. Cooling was accomplished with liquid CO₂.

The interface between the PTV and the MS was a low-polarity DB-VRX capillary column (20 m × 0.18 mm × 1 μm) from Agilent J&W, which was maintained at 240 °C in an Agilent 6890 GC device throughout the time of analysis. Thus, the separation capacity of the column was eliminated, and it behaved as a simple transfer line from the PTV to the mass detector. This instrumental configuration made it unnecessary to change the interface when the chromatographic analyses were performed.

The detector was a quadrupole mass spectrometer (HP 5973 N) equipped with an inert ion source. It was operated in electron-ionization mode using an ionization voltage of 70 eV. The ion source temperature was 230 °C, and the quadrupole was set at 150 °C. The analyses were performed in full-scan mode (1.06 scan/s). The *m/z* range was 35–120 amu.

The signal-recording time was 2.5 min. An interval of 6.0 min between sample injections was necessary in order to allow the PTV to cool from the final (250 °C) to the initial (35 °C) temperature.

Measurements with the confirmatory method (HS-PTV-GC/MS)

The experimental conditions for the HS autosampler and the PTV inlet were the same as those used for the screening methodology.

The initial oven temperature was 45 °C, held for 1.5 min; this was increased at a rate of 30 °C/min up to 81 °C, then at a

rate of 60 °C/min up to 175 °C, and finally further increased to 45 °C/min up to 240 °C and held for 0.50 min. The carrier gas was helium (99.999 % pure; Air Liquide) and the flow rate was 2.0 mL/min. The total chromatographic run time was 6.21 min. Additionally, about 7 min was necessary before the next sample could be measured, since the column had to be cooled down from the final temperature (240 °C) to the initial condition of 45 °C. An interval between sample injections of 14 min was chosen.

The analyses were performed in synchronous selected ion-monitoring (SIM)/scan mode, which allowed the acquisition of both SIM and full-scan data in a single run. Three full-scan (*m/z* 35–120) groups with different data acquisition speeds were used for compound identification by comparison of the experimental spectra with those of the NIST'08 database (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, version 2.0). The number of scans per second varied between 2.94 and 9.30. SIM was used for quantification, choosing the characteristic ions in each case (Table S-1, Supplementary material).

Data analysis

Data collection was performed with an Enhanced ChemStation [23] from Agilent Technologies. Partial least-squares (PLS1) multivariate calibration was performed using the Unscrambler[®] v10.2 statistical package [24]. Box plots, the Mann-Whitney *U* test, and the Wilcoxon signed-rank test were implemented using the OriginPro v8.0724 statistical package [25].

Results and discussion

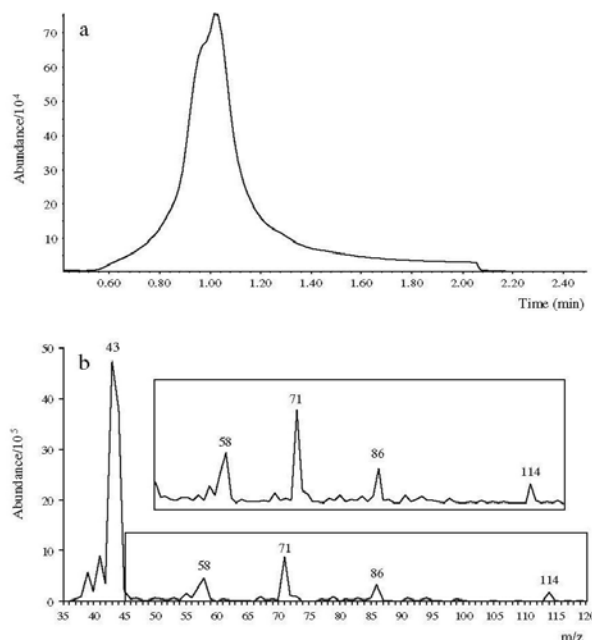
Study of the signals obtained

The volatiles generated in the HS produced a total ion current profile as shown in Fig. 1a, corresponding to a sample of urine with the concentration of the analytes ranging from 0.12 to 124 μg/L. The mass spectrum that represents the sum of the intensities of all the ions detected during the data acquisition period is shown in Fig. 1b. Some of the most abundant *m/z* ratios correspond to the characteristic ions in the mass spectrum of some of the studied analytes (43, 58, and 86 *m/z*).

Evaluation of the HS-PTV-GC/MS method

In order to check for possible matrix effects, a comparison between the signals obtained with spiked UHQ water samples and urine samples (eight different subjects) was carried out. The samples were spiked with the five analytes at concentrations ranging from 1.6 (2-heptanone) to 88 μg/L (pyrrole). In some urine samples, some studied analytes showed differences in peak areas between the urine samples and between

Fig. 1 a HS-PTV-MS total ion current profile of a urine sample with concentrations of the studied analytes ranging from 0.12 to 124 $\mu\text{g/L}$. b Mass spectrum that represents the sum of the intensities of all the ions detected



these samples and the spiked UHQ water sample. In order to prevent this matrix effect, the possibility of diluting the urine samples with UHQ water was evaluated. For this, two different dilution ratios were tested, namely 1:1 (2 mL urine + 2 mL UHQ water) and 1:3 (1 mL urine + 3 mL UHQ water). After dilution, the matrix effect was not eliminated. No stronger dilutions were tested owing to the loss of sensitivity.

In view of the matrix effect, quantification in the chromatographic method was performed with the standard addition method. Furthermore, 4-heptanone, an endogenous compound present in all the urine samples, was used as an internal standard. Since each calibration model is performed using the same urine to prepare the standards, the concentration of 4-heptanone in each model is the same in all the samples and it is not necessary to know its value. This calibration strategy, known as *standard addition-internal standard* and which integrates the advantages of both the internal standard method and the standard addition method, has been used previously [5, 10] but with the addition of an external compound as internal standard. The concentration value for the standard addition set ranged between 0.80 and 150 $\mu\text{g/L}$. The variables used in the univariate calibration models were the area under the curve of the compounds in the extracted ion chromatogram (SIM mode) for the base peak

(Table S-1, Supplementary material). In all cases (20 samples: 13 healthy volunteers and 7 patients), calibrations with no lack of fit were obtained, with values of the coefficient of determination (R^2) equal to or greater than 0.99. Repeatability ($n=5$) was evaluated at two different levels using samples of urine and urine spiked with the biomarkers (0.80–60 $\mu\text{g/L}$). The relative standard deviation (RSD) was lower than or equal to 6% in all cases, indicating the good repeatability of the method (Table S-2, Supplementary material). The limits of detection depended on each urine sample; as an example, the values for one of the urine samples ranged between 0.050 and 3.1 $\mu\text{g/L}$ (Table S-3, Supplementary material). After the first sample has been analyzed, this method allowed the measurement of four samples per hour with the separative approach.

Evaluation of the HS-PTV-MS method

The strategy of individual calibration for each urine sample based on *standard addition-internal standard* cannot be used with the non-separative method. In this work, PLS1 multivariate calibration was used. The quality of the results when this technique is used depends on the calibration set having samples in which the variability of the compounds that contribute

Table 1 Relative prediction error in the calibration and cross-validation steps when the PLS1 models were used

Analytes	PLS1 factors	E (%)	
		Calibration	Cross-validation
2-Butanone	3	18	22
2-Pentanone	4	18	26
Pyrrrole	4	10	15
2-Heptanone	4	15	20
2-Ethyl-1-hexanol	3	12	14

to the signals used for the determination is modeled. Consequently, calibration models with different types of urine were used. We considered using 10 urine samples as calibration standards: 8 samples from healthy volunteers (nos. 1–8) and 2 samples from patients (nos. 14 and 15; see “Reagents, standards, and samples”). Independent variables in the PLS1 models were the sum of the intensities of all the ions detected during data acquisition with the non-separative method, and the dependent variables were the biomarker concentrations determined by the chromatographic method.

Some compounds showed overlapping mass spectra, and this allowed us to check the non-separative methodology under complex situations. For example, m/z 43 is the base peak of 2-butanone, 2-pentanone, and 2-heptanone; m/z 57, which is the base peak of 2-ethyl-1-hexanol, was also seen for 2-butanone. PLS1 models were obtained for each compound. Cross-validation (leave one out) was used to select the optimum number of PLS1 factors, and the Martens uncertainty criterion (included in the Unscrambler[®] statistical package v. 10.2) was used as the m/z variable selection technique. This eliminates all the variables whose regression coefficients have uncertainty values greater than their absolute value from the model. The optimum number of PLS1 factors and the root mean square error (RMSE) in the calibration and cross-validation steps, expressed as relative values considering the average of the concentration for each biomarker studied, are shown in Table 1. The m/z ratios selected in each model are shown in Table S-4 (Supplementary material). Repeatability ($n=5$) was evaluated at two different levels using a urine sample and a urine sample spiked with the biomarkers (0.80–60 $\mu\text{g/L}$). The area under the curve of the profile signals

corresponding to different m/z ratios was studied. The most abundant m/z ratios of all the compounds were chosen, with the exception of 2-pentanone and 2-heptanone, for which the second most abundant ratios were selected because their base peak coincided with that of 2-butanone ($m/z=43$). The relative standard deviation (RSD) was lower than or equal to 10 % in all cases, except for m/z 58, whose value was equal to 20 % (Table S-2, Supplementary material). The multivariate detection limits in the urine samples were obtained following a strategy based on the variance of the concentration predicted by the model [26]. The values ranged between 0.16 and 21 $\mu\text{g/L}$ (Table S-3, Supplementary material). The average concentration of these analytes in urine samples corresponding to lung cancer patients is in the high ppb range [4] which shows that the non-separative technique could be considered suitable for diagnostic purposes. After the first sample has been analyzed, this method allowed the measurement of 10 samples per hour.

Sample analysis

The multivariate calibration models corresponding to the screening method (HS-PTV-MS) were used to predict the concentrations in a set of urine samples from five healthy volunteers (sample nos. 9–13) which had not been used in any calibration step. The non-separative method was also applied to the analysis of five samples (nos. 16–20) from patients with lung diseases; predicted concentrations of the studied biomarkers are shown in Table 2. Table S-5 (Supplementary material) offers a general overview of the situation of these patients.

In order to know whether there were significant differences in the concentration of the biomarkers between the group of patients with lung neoplasms (sample nos. 16–20) and the group of healthy individuals (sample nos. 9–13), the Mann-Whitney U test was implemented with the concentrations predicted with the non-separative method of the 10 samples of the external validation set. Significant differences ($p < 0.05$) were found for four of the five compounds present in the samples (2-butanone, 2-pentanone, 2-heptanone, and 2-ethyl-1-hexanol). Figure 2 shows the box plot representing the concentration of the analytes for both groups of samples.

Table 2 Predicted concentration (nmol analyte/mmol creatinine) of the biomarkers in urine samples from patients with the screening method

Samples	16	17	18	19	20
2-Butanone	$(4 \pm 1) \times 10$	$(7 \pm 1) \times 10$	32 ± 8	45 ± 7	$(4 \pm 1) \times 10$
2-Pentanone	80 ± 5	66 ± 5	64 ± 6	58 ± 5	90 ± 4
Pyrrrole	$(12 \pm 1) \times 10$	<LD	$(6 \pm 1) \times 10$	$(16 \pm 2) \times 10$	$(2.0 \pm 0.5) \times 10^2$
2-Heptanone	1.54 ± 0.04	<LD	1.90 ± 0.06	1.61 ± 0.06	2.19 ± 0.05
2-Ethyl-1-hexanol	0.63 ± 0.08	0.4 ± 0.1	0.97 ± 0.06	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1

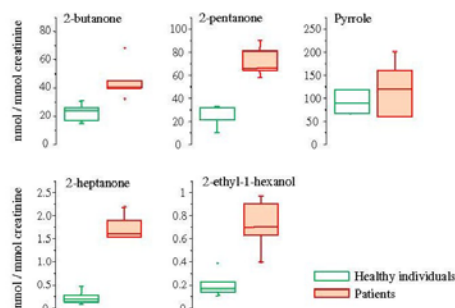


Fig. 2 Box plot graphics showing the normalized concentration distributions of the biomarkers found in the external validation samples with the non-separative method, distinguishing between healthy subjects and patients

With a view to assigning the 10 external validation samples to the class of healthy individuals or patients with lung neoplasms, the Wilcoxon signed-rank test was used for the four biomarkers that afforded significant differences. Calculation of the median was done with the biomarker concentrations measured chromatographically in the eight samples from healthy individuals (sample nos. 1–8). This reference value was compared with the concentration of biomarkers predicted by the non-separative method in the 10 external validation samples. Table 3 shows the results obtained. In the case of the healthy individuals, all the samples were classified correctly since the median obtained for each biomarker (reference

Table 3 Results obtained in the classification of the external validation samples using the Wilcoxon signed-rank test

Sample no.	2-Butanone	2-Pentanone	2-Heptanone	2-Ethyl-1-hexanol
9 (healthy individual)	–	–	–	–
10 (healthy individual)	–	–	–	–
11 (healthy individual)	–	–	–	–
12 (healthy individual)	–	–	–	–
13 (healthy individual)	–	–	–	–
16 (patient)	–	+	–	+
17 (patient)	+	+	–	+
18 (patient)	–	+	+	+
19 (patient)	+	+	+	+
20 (patient)	–	+	+	+

– The median of the concentrations of the groups of healthy individuals (reference model) is not significantly lower ($p > 0.05$) than the concentration of the sample studied. + The median of the concentrations of the group of healthy individuals is significantly lower ($p < 0.05$) than the concentration of the sample studied

set) was not significantly lower ($p > 0.05$) than the concentration obtained for each sample. Regarding the patient samples, in all cases, two or three biomarkers with concentrations higher than those of the reference set were found. The content in 2-pentanone and 2-ethyl-1-hexanol was higher in patient samples than in the reference set in all cases.

Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) for 2-butanone, 2-pentanone, 2-heptanone, and 2-ethyl-1-hexanol are shown in Table 4. PPV measures the likelihood that a positive result had been correctly predicted. NPV measures the likelihood that a negative result had been correctly predicted. Unlike sensitivity and specificity, which are inherent to the biomarker itself, PPV and NPV depend heavily on the population tested (prevalence). The samples that were assigned to the group of patients were measured chromatographically, and the concentration of the biomarkers found in the screening method was confirmed.

Figure 3 shows the chromatograms obtained for three different subjects: one of a healthy individual and two of lung cancer patients (sample nos. 16 and 20). Since chromatographic analysis was performed in simultaneous SIM/scan mode, the chromatograms shown in Fig. 3a, c, e are the total ion chromatograms in scan mode and the chromatograms in Fig. 3b, d, f are also total ion chromatograms but in SIM mode. Differences in intensity can be seen in the chromatographic peaks of the compounds of interest between the two urine samples belonging to the patients and the urine of a healthy individual.

Conclusions

The general analytical procedure proposed here consists of an initial analysis of a urine sample with the screening method (HS-PTV-MS). Following this, the Wilcoxon signed-rank test was used to compare the concentrations obtained with the non-separative method for the sample of interest with the median of the concentrations of a group of healthy individuals (reference group). When there were significant differences in some biomarker, the sample was assigned to the group of

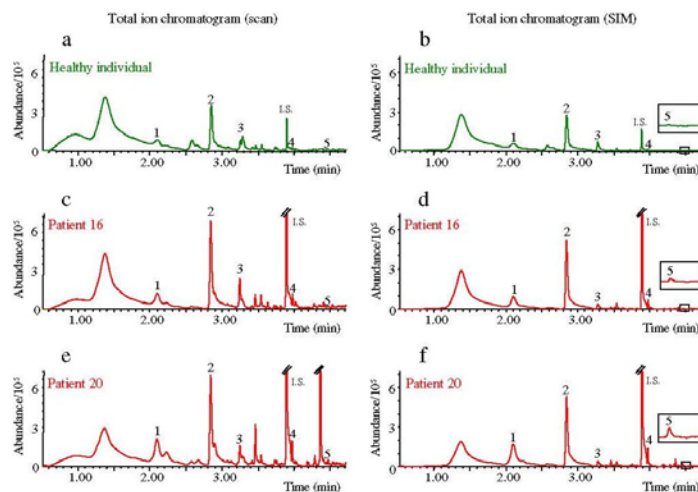
Table 4 Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of the four compounds for which significant differences in concentration between healthy individuals and patients were found

Analytes	Sensitivity %	Specificity %	PPV %	NPV %
2-Butanone	40	100	100	62
2-Pentanone	100	100	100	100
2-Heptanone	60	100	100	71
2-Ethyl-1-hexanol	100	100	100	100

Headspace-programmed temperature vaporization-mass spectrometry

5245

Fig. 3 Total ion chromatogram in full-scan (a, c, and e) and SIM (b, d, and f) modes of urine samples from a healthy individual and two lung cancer patients (nos. 16 and 20) in which the numbered peaks correspond to 1 2-butanone, 2 2-pentanone, 3 pyrrole, 4 2-heptanone, and 5 2-ethyl-1-hexanol. I.S. endogenous internal standard (4-heptanone)



patients with lung cancer and was subjected to chromatographic analysis to confirm the results obtained previously. In case a false positive is obtained with the non-separative method due to other compounds with the same m/z ratios as the studied biomarkers, it will be ruled out with the separative method.

Electronic olfactometry based on mass spectrometry coupling with PLS1 calibration offers a reliable technique for the determination of volatile biomarkers in urine samples. Once the sample vial has been introduced into the system, all the other steps proceed automatically, such that the method can be considered suitable for routine analyses. The proposed methodology, with headspace sampling, does not require prior sample treatment, which reduces the errors associated with this step of the analysis. In addition, the method is rapid and simple, has good precision and sensitivity, and in view of the results could be considered a suitable first option for determining volatile biomarkers in a large number of patients. After screening, for confirmatory purposes, GC/MS may only be used in samples with concentrations significantly different from those seen in the healthy population.

Acknowledgments The authors wish to thank Spain's Ministry of Economy and Competitiveness for funding Project CTQ2013-47993-P/BQU and the Junta de Castilla y León for Project SA162U14. A. Pérez Antón is also grateful to the Spanish Ministry of Education, Culture and Sports for a research fellowship.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Informed consent Informed consent was provided by all the individuals involved in the study.

Ethics approval The study was authorized by the Hospital Ethics Committee.

References

- Greenberg AK, Lee MS. Biomarkers for lung cancer: clinical uses. *Curr Opin Pulm Med*. 2007;13:249–55.
- Filipiak W, Sponring A, Filipiak A, Ager C, Schubert J, Miekisch W, et al. TD-GC-MS analysis of volatile metabolites of human lung cancer and normal cells *in vitro*. *Cancer Epidem Biomar*. 2010;19:182–95.
- Silva CL, Passos M, Câmara JS. Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry. *Brit J Cancer*. 2011;105:1894–904.
- Hanai Y, Shimono K, Matsumura K, Vachani A, Albelda S, Yamazaki K, et al. Urinary volatile compounds as biomarkers for lung cancer. *Biosci Biotech Bioch*. 2012;76:679–84.
- He Y, Vargas A, Kang YJ. Headspace liquid-phase microextraction of methamphetamine and amphetamine in urine by an aqueous drop. *Anal Chim Acta*. 2007;589:225–30.
- Rocha SM, Caldeira M, Carrola J, Santos M, Cruz N, Duarte IF. Exploring the human urine metabolomic potentialities by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2012;1252:155–63.
- Smith S, Burden H, Persad R, Whittington K, Costello BL, Ratcliffe NM, et al. A comparative study of the analysis of human urine headspace using gas chromatography-mass spectrometry. *J Breath Res*. 2008;2:037022.
- Pérez-Antón A, Casas-Ferreira AM, García-Pinto C, Moreno-Cordero B, Pérez-Pavón JL. Headspace generation coupled to gas

- chromatography-mass spectrometry for the automated determination and quantification of endogenous compounds in urine. Aldehydes as possible markers of oxidative stress. *J Chromatogr A*. 2014;1367:9–15.
9. Del Nogal-Sánchez M, Callejo-Gómez PÁ, Pérez-Pavón JL, Moreno-Cordero B, Crisolino-Pozas AP, Sánchez-Rodríguez Á. Sensitivity enhancement in the determination of volatile biomarkers in saliva using a mass spectrometry-based electronic nose with a programmed temperature vaporizer. *Anal Chem*. 2014;86:7890–8.
 10. Sakura N, Nishimura S, Fujita N, Namera A, Yshiki M, Kojima T. Determination of acrolein in human urine by headspace gas chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 1998;719:209–12.
 11. Adiguzel Y, Kulah H. Breath sensors for lung cancer diagnosis. *Biosens Bioelectron*. 2015;65:121–38.
 12. D'Amico A, Pennazza G, Santonico M, Martinelli E, Roscioni C, Galluccio G, et al. An investigation on electronic nose diagnosis of lung cancer. *Lung Cancer*. 2010;68:170–6.
 13. Oh EH, Song HS, Park TH. Recent advances in electronic and bioelectronic noses and their biomedical applications. *Enzyme Microb Tech*. 2011;48:427–37.
 14. Westenbrink E, Arasaradnam RP, O'Connell N, Bailey C, Nwokolo C, Bardhan KD, et al. Development and application of a new electronic nose instrument for the detection of colorectal cancer. *Biosens Bioelectron*. 2015;65:733–8.
 15. Rudnicka J, Walczak M, Kowalkowski T, Jezierski T, Buszewski B. Determination of volatile organic compounds as potential markers of lung cancer by gas chromatography-mass spectrometry versus trained dogs. *Sensor Actuat B-Chem*. 2014;202:615–21.
 16. Del Nogal-Sánchez M, Hernández-García E, Pérez-Pavón JL, Moreno-Cordero B. Fast analytical methodology based on mass spectrometry for the determination of volatile biomarkers in saliva. *Anal Chem*. 2012;84:379–85.
 17. Vera L, Mestres M, Boqué R, Busto O, Guasch J. Use of synthetic wine for models transfer in wine analysis by HS-MS e-nose. *Sensor Actuat B-Chem*. 2010;143:689–95.
 18. Cozzolino D, Cynkar W, Damberg R, Smith P. Two-dimensional correlation analysis of the effect of temperature on the fingerprint of wines analysed by mass spectrometry electronic nose. *Sensor Actuat B-Chem*. 2010;145:628–34.
 19. Chen H, Pan Z, Talaty N, Raftery D, Cooks RG. Combining desorption electrospray ionization mass spectrometry and nuclear magnetic resonance for differential metabolomics without sample preparation. *Rapid Commun Mass Sp*. 2006;20:1577–84.
 20. Huang J, Kumar S, Abbassi-Ghadi N, Španěl P, Smith D, Hanna GB. Selected ion flow tube mass spectrometry analysis of volatile metabolites in urine headspace for the profiling of gastroesophageal cancer. *Anal Chem*. 2013;85:3409–16.
 21. Jaffe M. Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure im normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins. *Z Phys Chem*. 1886;10:391–400.
 22. Delanghe JR, Speeckaert MM. Creatinine determination according to Jaffe—what does it stand for? *Nephrol Dial Transpl*. 2011;4:83–6.
 23. Enhanced ChemStation, MSD ChemStation E.02.00493, Agilent Technologies: 2008.
 24. The Unscrambler v10.2; Camo Process AS: 2012.
 25. OriginPro v8.0724; OriginLab Corporation: 2007.
 26. Blanco M, Castillo M, Peinado A, Beneyto R. Determination of low analyte concentrations by near-infrared spectroscopy: effect of spectral pretreatments and estimation of multivariate detection limits. *Anal Chim Acta*. 2007;581:318–23.

VII. HEADSPACE-PROGRAMMED TEMPERATURE VAPORIZER-MASS SPECTROMETRY AND PATTERN RECOGNITION TECHNIQUES FOR THE ANALYSIS OF VOLATILES IN SALIVA SAMPLES

Talanta 160 (2016) 21–27



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

Headspace-programmed temperature vaporizer-mass spectrometry and pattern recognition techniques for the analysis of volatiles in saliva samples



Ana Pérez Antón^a, Miguel del Nogal Sánchez^{a,*}, A. Ángel Pedro Crisolino Pozas^b, José Luis Pérez Pavón^a, Bernardo Moreno Cordero^a

^a Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Salamanca, 37008 Salamanca, Spain
^b Servicio de Medicina Interna, Hospital Virgen de la Vega, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 April 2016

Received in revised form

24 June 2016

Accepted 28 June 2016

Available online 29 June 2016

Keywords:

HS-PTV-MS

Volatile biomarkers

Pattern recognition techniques

Saliva

ABSTRACT

A rapid method for the analysis of volatiles in saliva samples is proposed. The method is based on direct coupling of three components: a headspace sampler (HS), a programmable temperature vaporizer (PTV) and a quadrupole mass spectrometer (qMS).

Several applications in the biomedical field have been proposed with electronic noses based on different sensors. However, few contributions have been developed using a mass spectrometry-based electronic nose in this field up to date.

Samples of 23 patients with some type of cancer and 32 healthy volunteers were analyzed with HS-PTV-MS and the profile signals obtained were subjected to pattern recognition techniques with the aim of studying the possibilities of the methodology to differentiate patients with cancer from healthy controls. An initial inspection of the contained information in the data by means of principal components analysis (PCA) revealed a complex situation where an overlapped distribution of samples in the score plot was visualized instead of two groups of separated samples. Models using K-nearest neighbors (KNN) and Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA) showed poor discrimination, specially using SIMCA where a small distance between classes was obtained and no satisfactory results in the classification of the external validation samples were achieved. Good results were obtained when Mahalanobis discriminant analysis (DA) and support vector machines (SVM) were used obtaining 2 (false positives) and 0 samples misclassified in the external validation set, respectively. No false negatives were found using these techniques.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

According to the American Cancer Society guidelines [1], screening methods for the detection of cancer at the early stage satisfactorily influences the survival of patients. Methods such as radiography, low dose spiral computer tomography, magnetic resonance, positron emission tomography and fluorescence bronchoscopy are used to increase survival nowadays. However, they could be sometimes unsuitable to be applied in a wide-range population due to the side effects on health related to radiation exposure. In addition, it is not sufficiently cost-effective for large-scale screening purposes.

Analysis of volatile organic compounds (VOCs) in matrixes such as saliva [2,3], urine [4,5] and breath air [6–8] is gaining interest in

the last years since the odor inspection can provide information about the state of health of an individual. Some investigations showed the ability of canine olfaction to discriminate patients suffering different types of cancer from healthy individuals [9,10].

Electronic noses are an attractive alternative for the analysis of volatile compounds by evaluating the total chemical profile of a sample rather than detecting each compound individually. Significant effort has been made in the development of electronic noses for biomedical application due to their potential in rapid detection and odor characterization. Their use in cancer detection is basically the adaptation of an ancient practice in medicine [11]. Some examples are those concerned with rotten stink of a lung abscess or the fishy odor of liver illness. Since Dodd and Persaud introduced the first electronic nose (1982) using a metal oxide sensor [12], several devices based on conducting polymer-based sensor and optical and piezoelectric sensors have been used to solve many problems satisfactorily in fields such as the medical and diagnostic [13–18], food [19,20], environmental and security

* Corresponding author.

E-mail address: mns@usal.es (M. del Nogal Sánchez).<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.06.061>

0039-9140/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

[21,22], among others. In addition, artificial olfactory sensors based on biomaterials such as mammalian cells or proteins have been developed to mimic the human olfactory system [23].

Mass spectrometry-based electronic nose has been also used to solve many problems successfully in fields such as food and environmental [24–27] but it has been hardly used in the biomedical field despite its advantages: higher number of sensor in each analysis, no poisoning effect and stability of the signal. To date there is only two contributions [28,29] using this approach for the semi-quantitative determination of volatile biomarkers related mainly to lung cancer. In both cases, methods for the determination of individual compounds were developed based on PLS models. In one of them [29] a PTV is incorporated between the HS and the qMS to improve the sensitivity. This new approach in the non-separative analysis allows reaching detection limits in the low ppb range which are typical in biological samples from patients with lung cancer [30]. To the best of our knowledge, no contribution using pattern recognition of HS-PTV-MS profile signals and focusing on the entire volatile portion of the sample instead of individual compounds has been developed up to date to check the possibilities of the methodology for the discrimination between patients and healthy controls.

Beside mass spectrometry-based electronic nose, other sensitive methods have been used for the monitoring of biomarkers such as ion mobility spectrometry (IMS) [31,33], proton transfer reaction mass spectrometry (PTR-MS) [32,33] and selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS) [4,33].

Here we propose a rapid and simple method for the analysis of the profile signals corresponding to saliva samples of patients with cancer and healthy controls using an HS-PTV-MS electronic nose and pattern recognition techniques. Identification of the analytes present in the headspace which could be responsible of the separation between groups is beyond the scope of the work.

2. Material and methods

2.1. Samples

500 μ L of unstimulated saliva samples were obtained from 55 adults of both sexes and placed directly into a 10.0 mL vial sealed with Teflon[®]/silicone septum caps (Agilent Technologies, DE, Germany). The saliva samples were collected and analyzed on the same day. Samples 1–23 were from patients at the Internal Medicine Unit of the Virgen de la Vega Hospital in Salamanca; samples 24–55 were from healthy volunteers apparently unaffected by diseases. Table 1 shows a general overview of the studied patients. The study was authorized by the Ethics Committee Hospital.

2.2. HS-PTV/MS measurements

HS sampling was performed with a PAL autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland). The oven temperature and the equilibration time were adjusted at 70 °C and 10 min, respectively. During this time, the vials were shaken at 750 rpm. A 2.5 mL syringe at 120 °C was used.

A programmed temperature vaporizer (PTV) inlet (CIS-4; Gerstel, Baltimore, MD, USA), in the solvent-vent injection mode was employed. A liner (71 mm \times 2 mm) packed with Tenax-TA[®] was used. In the first step, the sample from the headspace was injected into the PTV. During this step, the split valve is open, allowing solvent elimination. The solvent vent temperature and the vent flow were adjusted to 25 °C and 50 mL/min, respectively. A venting pressure to 5.0 psi (34,474 Pa) was imposed. The purge time was set at 0.1 min, after which the splitless mode was programmed for 1.5 min while the temperature was increased by 12 °C/s to 250 °C.

Table 1
General overview of the studied patients.

Sample	Pathology
1	Metastatic undifferentiated non-small cell lung cancer
2	Metastatic non-small cell lung cancer (adenocarcinoma)
3	Metastatic infiltrating urothelial carcinoma
4	Metastatic undifferentiated sarcoma
5	Metastatic non-small cell lung cancer (adenocarcinoma)
6	Metastatic pancreatic adenocarcinoma
7	Metastatic non-small cell lung cancer (squamous cell)
8	Located lung cancer (squamous cell)
9	Metastatic non-small cell lung cancer (adenocarcinoma)
10	Metastatic melanoma
11	Metastatic non-small cell lung cancer (adenocarcinoma)
12	Metastatic small cell lung cancer
13	Metastatic infiltrating urothelial carcinoma
14	Metastatic non-small cell lung cancer (adenocarcinoma)
15	Metastatic undifferentiated non-small cell lung cancer
16	Metastatic non-small cell lung cancer (squamous cell)
17	Metastatic multicenter hepatocellular carcinoma
18	Metastatic pancreatic adenocarcinoma
19	Metastatic non-small cell lung cancer (adenocarcinoma)
20	Metastatic non-small cell lung cancer (adenocarcinoma)
21	Located lung cancer (squamous cell)
22	Metastatic melanoma
23	Non-metastatic infiltrating ductal breast carcinoma

In this step, the analytes were desorbed from the liner and transferred to the column. Finally, the split valve was opened again to clean the system (purge flow 150 mL/min) and the liner temperature was held at 250 °C (0.5 min). Cooling was accomplished with liquid CO₂.

The interface between the PTV and the MS was a low-polarity DB-VRX capillary column (20 m \times 0.18 mm \times 1 μ m) from Agilent J&W, which was maintained at 240 °C in an Agilent 6890 GC device along the time of analysis. In this way, the separation capacity of the column was removed and it behaved as a simple transfer line from the PTV to the mass detector.

The detector was a quadrupole mass spectrometer (HP 5973N) equipped with an inert ion source. It was operated in the electron-ionization mode using an ionization voltage of 70 eV. The ion source temperature was 230 °C, and the quadrupole was set at 150 °C. The analyses were performed in scan mode (3.46 scan/s). The m/z range was 25–125 amu. The following m/z ratios were removed from the profile signal since they are typical from gases in the headspace, N₂, O₂, Ar, CO and CO₂, which do not come from the sample and mask the minor components: 28, 32, 40 and 44.

The signal-recording time was 2.5 min. An interval of 6.0 min between sample injections was chosen in order to allow the PTV to cool from the final (250 °C) to the initial temperature (25 °C).

2.3. Data analysis

Data collection was performed with an Enhanced ChemStation [34] from Agilent Technologies. Pattern recognition techniques were performed using the Unscrambler[®] v10.2 statistical package [35] and the Pirouette 3.11 software from Infometrix Inc. (Woodinville, WA) [36].

3. Results and discussion

3.1. Study of the signals obtained

The analytical signal used was the mass spectrum of each sample which represents the sum of the intensities of all the ions detected during the data acquisition time. Fig. 1 shows the comparison between the average mass spectrum of all the patients and

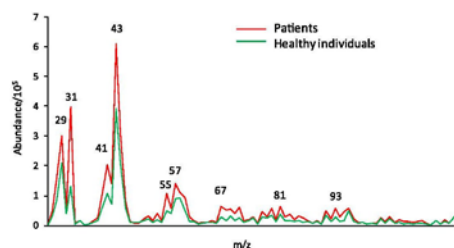


Fig. 1. Comparison between the average mass spectrum of all the patients (red line) and the healthy controls (green line) that represents the sum of the intensities of all the ions detected from 0 to 2.5 min (the highest masses from N_2 , O_2 , Ar , CO and CO_2 have been removed from the spectrums). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

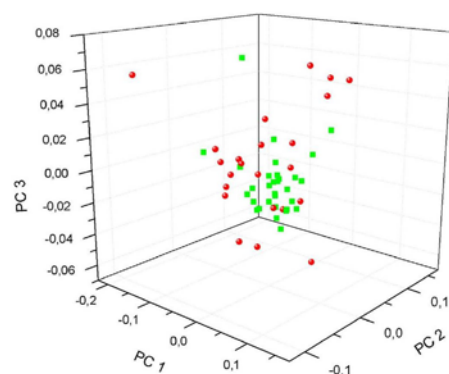


Fig. 2. PCA score plot for 55 saliva samples corresponding to patients with cancer (red circles) and healthy volunteers (green squares). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

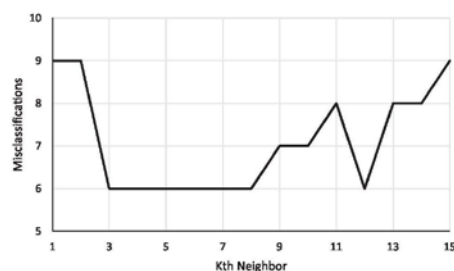


Fig. 3. Misclassified samples in the training set versus number of nearest neighbors K.

the healthy controls, the m/z ratios with the highest differences between the two groups were: 29, 31, 41, 43, 55, 57, 67, 81 and 93 among others.

Before using the pattern recognition techniques, the profile signals (raw data) were subjected to two different processes of

internal normalization consisting of the expression of the mass fragments of each individual spectrum as a percentage of its maximum value or as a percentage of the sum of the mass fragments. Both normalizations were tried for the different chemometric techniques (PCA, SIMCA, KNN, DA and SVM) and the one for which better classification was achieved was the one chosen for each one. The normalization in which every individual spectrum is transformed as a percentage of the sum of all the variables was used in PCA, SIMCA and DA, and the normalization in which every individual spectrum is transformed as a percentage of the maximum value was used in KNN and SVM.

Study of the signals using supervised pattern recognition techniques was carried out in two steps. In the first one, a classification model was built in which the training set consisted of 14 saliva samples (13 men and 1 woman) from patients with cancer (Table 1, samples 1–14) to define the class 1 and 20 saliva samples (10 men and 10 women) from healthy volunteers to define the class 2 (samples 24–43). In the second step, to validate the model, the prediction of an external validation set was performed; this set was formed by 9 saliva samples (7 men and 2 women) from patients with cancer (Table 1, samples 15–23) and 12 saliva samples (5 men and 7 women) from healthy individuals (samples 44–55). From the aforementioned, the training and the validation set were formed by 34 and 21 saliva samples. To check that sex is not a factor that affects the results, the Mann-Whitney U test was implemented with the samples from healthy individuals in the training set separated by sexes. No significant differences ($p < 0.05$) were found for any of the m/z ratios measured.

3.2. Principal components analysis

PCA is an unsupervised pattern recognition technique with the aim of reducing the dimensionality of the data and finding linear combinations of the original independent variables and representing them as a set of new orthogonal variables which are called Principal Components (PCs).

After normalization process, PCA was carried out using all the available samples (32 and 23 saliva samples from healthy volunteers and patients with cancer, respectively). The best results were obtained with normalization to the sum of the values of the variables. The percentage of the accumulative explained variance with each of the first three PCs is 49%, 77% and 88%, respectively. Fig. 2 shows a 3D score plot of the samples for the first three PCs. Results obtained lead to the conclusion that the two sample groups are not easily separated by means of PCA analysis. No other combination of PCs provided better separation between classes.

3.3. Soft independent modeling of class analogy

SIMCA is a supervised pattern recognition technique in which each class is described by independent principal component analysis. The optimal number of PCs for each model is chosen independently, since the classes may show different shapes and structures. Thereby, a closed space is constructed at a level of significance (95%) by a critical distance. The aim of SIMCA is to classify new samples by projecting them into the PC space of each class. The sample will be then, assigned to the category it best fits. SIMCA method was conducted with the same normalization technique as for PCA (each individual spectrum transformed as a percentage of the sum of all the variables) and the optimal number of PCs was 5 and 6 for models containing healthy individuals and patients with cancer, respectively.

There was not enough interclass distance between both classes in the training set since the vast majority of the samples were located in the common region of both classes. As it is normal, all the samples corresponding to the external validation set were also

Table 2
Misclassified samples for the training and the external validation sets when PCA-DA is used.

Type of DA	PCs	Training set			External validation			
		False positive	False negative	% Correct assignment	False positive	False negative	% Correct assignment	
Linear	5	2	5	79	5	3	62	
	6	3	3	76	3	4	67	
	7	1	3	88	4	3	67	
	8	1	3	88	3	2	76	
	9	1	3	88	3	3	71	
	10	2	2	88	3	4	67	
	11	3	2	85	3	3	71	
	Quadratic	5	2	3	85	4	4	62
		6	1	3	88	3	2	76
		7	0	3	91	1	1	90
		8	0	1	97	1	1	81
9		0	1	97	1	1	90	
10		0	1	97	0	2	90	
11		0	1	97	1	2	86	
Mahalanobis		5	9	0	74	8	0	62
		6	9	0	74	10	0	52
		7	4	0	88	9	0	57
		8	5	0	85	9	0	57
	9	0	0	100	2	0	90	
	10	1	0	97	2	1	86	
11	1	0	97	2	1	86		

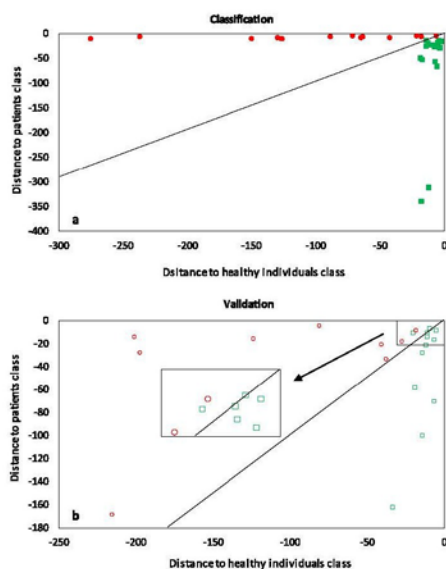


Fig. 4. Plot of the discriminant scores for (a) model corresponding to the Mahalanobis discriminant analysis (9 PCs) and for (b) the prediction of the external validation set.

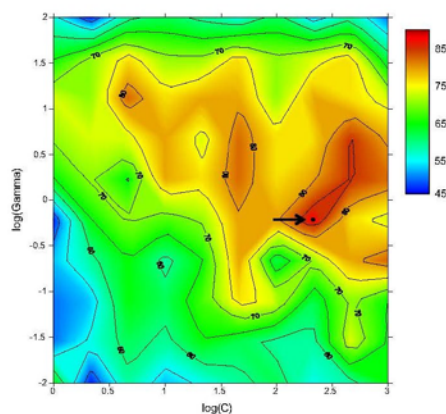


Fig. 5. Grid results for training set in terms of cross-validation accuracy for the radial function. The selected point has been marked with an arrow.

classified in this region. As expected, bad results were obtained with this technique since it is based on PCA.

3.4. K-nearest neighbors

KNN is a classification technique based on the idea of proximity

and the concept of distance between samples. This is a supervised technique in which samples from the training set have been pre-assigned to a category or class. Prediction of a sample is based on the category of its k nearest neighbors and the sample is assigned to the class to which most of the nearest neighbors belong.

The profile signals were subjected to the normalization process (each individual spectrum as a percentage of its maximum value) and KNN was carried out using the Euclidean distance as similarity measure. Fig. 3 shows the number of samples misclassified in the training set according to the number of neighbors selected. The best results were obtained by selecting three neighbors. In this case, 6 saliva samples were misclassified (2 from healthy individuals and 4 from patients with cancer). The prediction capacity of the technique was determined by analyzing the validation samples which have not been used at any time in the training set. Two samples corresponding to patients with cancer (samples nos. 20 and 23, Table 1) were assigned to the healthy class and one sample corresponding to a healthy individual was assigned to the patients group. The consequence of false negatives is more concerning than false positives. When the methodology fails to read positive despite the presence of illness, the individual misses the diagnosis of the disease and the opportunity of a medical intervention. However, when a false positive is obtained, the individual is subjected to costly and unnecessary testing, but in general, it does not influence his state of health.

3.5. Discriminant analysis

DA is a supervised classification technique. The discriminant functions, which are linear combinations of the original variables, are constructed in such a way that the categories in the training set are differentiated as much as possible, reducing the number of dimensions with a minimum loss of information. The mathematical classification rule divides the space into as many subspaces as categories defined. The criterion used to calculate the discriminant functions is to maximize the ratio of variance between categories to variance within categories. The best results were obtained when data were subjected to internal normalization in which each individual spectrum was transformed to a percentage of the sum of the mass fragments. The training and the validation sets were the same as described before. Since the number of variables is larger than the number of samples in the training set, PCA-DA has been used. By means of PCA, dimensionality of the data is reduced prior to running DA. PCA-DA makes use of a common projection space for all the classes in the training set unlike in SIMCA which described a PCA for each category.

Three different discriminant analysis methods have been carried out: linear, quadratic and Mahalanobis. In all cases PCA was previously run with 5, 6, 7, 8, 9, 10 and 11 PCs. Results for all the models constructed are shown in Table 2 (training set). The best results correspond to those obtained with Mahalanobis Discriminant Analysis (9 PCs). All the samples in the training set were classified correctly. Fig. 4a shows the plot of discriminant scores for the training set. The prediction of the external validation set is also showed in Table 2 (external validation set). When the best model (Mahalanobis, 9 PCs) was used, all the samples corresponding to the patients with cancer were classified correctly within their class and only two healthy volunteer samples were misclassified. Fig. 4b shows the plot of discriminant scores for the validation set. It is important to emphasize that no false negatives were obtained. False positives will be subjected to medical tests and they will be discarded. This technique extremely reduces the number of patients which should be subjected to medical routines which are more expensive and time consuming. Sensitivity, as a measure of the ability of the techniques to identify cancer when it is present, was 100% (9/9). Specificity, as a measure of the ability of

Table 3
Classification of samples corresponding to the external validation set into class + (with cancer) and class – (healthy class).

Sample	SVM	Mahalanobis DA	KNN
Patients in the external validation set			
15	+	+	+
16	+	+	+
17	+	+	+
18	+	+	+
19	+	+	+
20	+	+	–
21	+	+	+
22	+	+	+
23	+	+	–
Healthy volunteers in the external validation set			
43	–	–	–
44	–	–	–
45	–	–	–
46	–	–	–
47	–	–	–
48	–	–	–
49	–	–	–
50	–	–	–
51	–	–	–
52	–	+	–
53	–	–	+
54	–	+	–
55	–	–	–

Table 4
Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) for the three different classification methods.

Classification method	Sensitivity %	Specificity %	PPV %	NPV %
KNN	78	92	87	85
Mahalanobis DA	100	83	82	100
SVM	100	100	100	100

the techniques to rule out the disease when it is absent was 83% (10/12).

3.6. Support vector machines

SVM is a pattern recognition method for supervised classification. The training of the technique involves looking for the optimal separating hyperplane such that the largest margin is formed between two classes and the minimal classification error is found. The strategy of this technique is to rely exclusively on a small number of samples from the training set distributed close to the boundary between the classes. They are called "support vectors" (SVs) and the determination of the boundary between classes is independent from the rest of the samples. Although SVM was first used in order to carry out linear classification, it is also applicable to nonlinear data by using kernel functions. Different functions can be used to better handle nonlinear classification cases. Linear, polynomial, radial and sigmoid functions were studied in this work. SVM is suitable to work high-dimensional spaces since it does not require, as DA, a prior step of variable reduction to be applied in case that the number of samples is lower than the number of variables. The accuracy of an SVM model is largely dependent on the selection of the kernel parameters such as C and γ . The parameter C controls the tradeoff between errors of the SVM on training data and margin maximization. A small value for C will increase the number of training errors, while a high C aims at classifying all training examples correctly by increasing the number of support vectors. The γ parameter also has an important influence on the behavior of the model, it can be seen as the inverse of the radius of influence of samples selected by the model

as support vectors.

Data were subjected to the normalization process (each individual spectrum transformed as a percentage of its maximum value) and the same training and validation sets as before were employed. The four different kernel functions aforementioned were tested on the training set. Different pairs of C and γ , which are the key to obtain high accuracy, were checked using the grid-search method through a five-fold cross-validation and those providing the highest accuracy in the training set were selected. The maximum accuracy was found for the radial function. Fig. 5 shows the grid search for C (from 1 to 1000) and γ (from 0.01 to 100) versus cross validation accuracy in the case of the radial function. For the ease of interpretation of the Fig. 5, C and γ are plotted as logarithms. The couple of values selected (C=215.443 and $\gamma=0.599$) was the one giving a higher accuracy value (88%) in the grid. The final model generated with these parameters provided an accuracy of 100% in the classification of the samples in the training set. The number of SVs in the model built with those values was 16 of the 34 samples in the training set (8 samples from healthy volunteers and 8 samples from patients).

The model was used to predict the external validation set. All samples both from patients with cancer and from healthy individuals were classified correctly. In this case, both sensitivity (9/9) and specificity (12/12) were 100%.

Table 3 shows a summary of the results obtained in the prediction of the saliva samples corresponding to the external validation set when SVM, DA and KNN were used. All the individuals in which cancer was diagnosed were classified correctly with SVM and Mahalanobis discriminant analysis. In case of KNN, two patients were misclassified (samples nos. 20 and 23). For the healthy individuals, KNN and Mahalanobis discriminant analysis failed in classifying one (sample no. 53) and two samples (samples no. 52 and 54), respectively. In the case of SVM also all the samples from healthy individuals in the external validation set were correctly classified. A summary of the values of sensitivity and specificity for these three classification methods together with two other values which are positive predicted value (PPV) and negative predicted value (NPV) are shown in Table 4. PPV measures the likelihood that a positive result has correctly predicted. NPV measures the

likelihood that a negative result has correctly predicted. Unlike sensitivity and specificity, which are inherent to the biomarker itself, PVP and PVN depend heavily on the population tested (prevalence).

4. Conclusions

The HS-PTV-MS profile signals corresponding to the saliva samples contain information enough to discriminate patients with cancer from healthy volunteers successfully. The proposed method is rapid since no separation of the analytes is performed, simple since only 500 μ L of saliva must be placed directly into the vial without sample preparation and non-invasive.

Profile signals were subjected to different pattern recognition techniques and good results were obtained in case of those able to manage data non-linearly separable. No false negatives were obtained when Mahalanobis discriminant analysis and support vector machines were used. This is a very important goal for a screening method. SVM, moreover, achieved 100% specificity. The method can be used to diminish the number of individuals that should be subjected to the medical tests and this could reduce costs and waiting times.

Acknowledgments

The authors wish to thank Spain's Ministry of Economy and Competitiveness for funding Project CTQ2013-47993-P/BQU and the Junta de Castilla y León for Project SA162U14. A. Pérez Antón is also grateful to the Spanish Ministry of Education, Culture and Sports for a research fellowship.

References

- [1] R. Wender, E.T.H. Fontham, E. Barrera, G.A. Colditz, T.R. Church, et al., American Cancer Society Lung Cancer, Screen. Guid., *CA Cancer J. Clin.* 63 (2013) 107–117.
- [2] H. Al-Kateb, B. de Lacy Costello, N. Ratcliffe, An investigation of volatile organic compounds from the saliva of healthy individuals using headspace-trap GC-MS, *J. Breath. Res.* 7 (2013) 1–13.
- [3] J.S. Brown, P.A. Prada, A.M. Curran, K.G. Furton, Applicability of emanating volatile organic compounds from various forensic specimens for individual differentiation, *Forensic Sci. Int.* 226 (2013) 173–182.
- [4] P. Spanel, D. Smith, T.A. Holland, W. Al Singary, J.B. Elder, Analysis of formaldehyde in the headspace of urine from bladder and prostate cancer patients using selected ion flow tube mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 1354–1359.
- [5] A. Pérez Antón, A.M. Casas Ferreira, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, J.L.P. Pérez Pavón, Headspace generation coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the automated determination and quantification of endogenous compounds in urine. Aldehydes as possible markers of oxidative stress, *J. Chromatogr. A* 1367 (2014) 9–15.
- [6] J. Rudnicka, T. Kowalkowski, T. Ligor, B. Buszewski, Determination of volatile organic compounds as biomarkers of lung cancer by SPME-GC-TOF/MS and chemometrics, *J. Chromatogr. B* 879 (2011) 3360–3366.
- [7] B. Buszewski, J. Rudnicka, T. Ligor, M. Walczak, T. Jezierski, A. Amann, Analytical and unconventional methods of cancer detection using odor, *TrAC-Trend Anal. Chem.* 38 (2012) 1–12.
- [8] M. Zhou, Y. Liu, Y. Duan, Breath biomarkers in diagnosis of pulmonary diseases, *Clin. Chim. Acta* 413 (2012) 1770–1780.
- [9] G. Lippi, G. Cervellin, Canine olfactory detection of cancer versus laboratory testing: myth or opportunity? *Clin. Chem. Lab. Med.* 50 (2012) 435–439.
- [10] H. Sonoda, S. Kohnoe, T. Yamazato, Y. Satoh, G. Morizono, et al., Colorectal cancer screening with odour material by canine scent detection, *Gut* 60 (2011) 814–819.
- [11] Y. Adiguzel, H. Kulah, Breath sensors for lung cancer diagnosis, *Biosens. Bioelectron.* 65 (2015) 121–138.
- [12] K. Persaud, G. Dodd, Analysis of discrimination mechanisms in the mammalian olfactory system using a model nose, *Nature* 299 (1982) 352–355.
- [13] E. Westenbrink, R.P. Arasaradnam, N. O'Connell, C. Bailey, C. Nwokolo, K. D. Bardhan, J.A. Covington, Development and application of a new electronic nose instrument for the detection of colorectal cancer, *Biosens. Bioelectron.* 67 (2015) 733–738.
- [14] A. D'Amico, G. Pennazza, M. Santonico, E. Martinelli, C. Roscioni, G. Galluccio, R. Paolesse, C. Di Natale, An investigation on electronic nose diagnosis of lung cancer, *Lung Cancer* 68 (2010) 170–176.
- [15] R.M. Schnabel, M.L.L. Boumans, A. Smolinska, E.E. Stobberingh, R. Kaufmann, P. M.H.J. Roekaerts, D.C.J.J. Bergmans, Electronic nose analysis of exhaled breath to diagnose ventilator-associated pneumonia, *Respir. Med.* 109 (2015) 1454–1459.
- [16] S. Dragonieri, J.T. Annema, R. Schot, M.P.C. van der Schee, A. Spanevello, P. Caratù, O. Resta, K.F. Rabe, P.J. Sterk, An electronic nose in the discrimination of patients with non-small cell lung cancer and COPD, *Lung Cancer* 64 (2009) 166–170.
- [17] M. Santonico, G. Lucantoni, G. Pennazza, R. Capuano, G. Galluccio, C. Roscioni, G. La Delfa, D. Consoli, E. Martinelli, R. Paolesse, C. Di Natale, A. D'Amico, In situ detection of lung cancer volatile fingerprints using bronchoscopic air-sampling, *Lung Cancer* 77 (2012) 46–50.
- [18] P.J. Mazzone, X.-F. Wang, S. Lim, H. Choi, J. Jett, A. Vachani, Q. Zhang, M. Beukemann, M. Sedey, R. Martino, P. Rhodes, Accuracy of volatile urine biomarkers for the detection and characterization of lung cancer, *BMC. Cancer* 15 (2015) 1001.
- [19] E. Gobbi, M. Falasconi, G. Zambotti, V. Sberveglieri, A. Pulvirenti, G. Sberveglieri, Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae in vegetable soups by a metal oxide sensor based electronic nose, *Sens. Actuators B* 207 (2015) 1104–1113.
- [20] M. Peris, L. Escuder-Gilbert, On-line monitoring of food fermentation processes using electronic noses and electronic tongues: a review, *Anal. Chim. Acta* 804 (2013) 29–36.
- [21] S. Dushnukh, R. Bandyopadhyay, N. Bhattacharyya, R.A. Pandey, A. Jana, Application of electronic nose for industrial odors and gaseous emissions measurement and monitoring – an overview, *Talanta* 144 (2015) 329–340.
- [22] J. Gutiérrez, M.C. Horrillo, Advances in artificial olfaction: sensors and applications, *Talanta* 124 (2014) 95–105.
- [23] E.H. Oh, H.S. Song, T.H. Park, Recent advances in electronics and bioelectronics noses and their biomedical applications, *Enzym. Microb. Tech.* 48 (2011) 427–437.
- [24] W. Cynkar, R. Damberg, P. Smith, D. Cozzolino, Classification of Tempranillo wines according to geographic origin: combination of mass spectrometry based electronic nose and chemometrics, *Anal. Chim. Acta* 660 (2010) 227–231.
- [25] J. Sung, B.-K. Kim, B.-S. Kim, Y. Kim, Mass spectrometry-based electric nose system for assessing rice quality during storage at different temperatures, *J. Stored Prod. Res.* 59 (2014) 204–208.
- [26] D. Cozzolino, H.E. Smyth, W. Cynkar, R.G. Damberg, M. Gishen, Usefulness of chemometrics and mass spectrometry-based electronic nose to classify Australian white wines by their varietal origin, *Talanta* 68 (2005) 382–387.
- [27] J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, C. García Pinto, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, A. Guerrero Peña, Strategies for qualitative and quantitative analyses with mass spectrometry-based electronic noses, *TrAC-Trend Anal. Chem.* 25 (2006) 257–266.
- [28] M. del Nogal Sánchez, E. Hernández García, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Fast analytical methodology based on mass spectrometry for the determination of volatile biomarkers in saliva, *Anal. Chem.* 84 (2012) 379–385.
- [29] M. del Nogal Sánchez, P.Á. Callejo Gómez, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Á.P. Crisolino Pozas, Á.S. Sánchez Rodríguez, Sensitivity enhancement in the determination of volatile biomarkers in saliva using a mass spectrometry-based electronic nose with a programmed temperature vaporizer, *Anal. Chem.* 86 (2014) 7890–7898.
- [30] Y. Hanai, K. Shimono, K. Matsumura, A. Vachani, S. Albelda, K. Yamazaki, G. K. Bauekamp, H. Oka, Urinary Volatile Compounds as Biomarkers for Lung Cancer, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76 (2012) 679–684.
- [31] E. Jazan, H. Mirzaei, Direct analysis of human breath ammonia using corona discharge ion mobility spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Sci.* 88 (2014) 315–320.
- [32] M.E. O'Hara, T.H. Clutton-Brock, S. Green, S. O'Hehir, C.A. Mayhew, Mass spectrometric investigations to obtain the first direct comparisons of endogenous breath and blood volatile organic compound concentrations in healthy volunteers, *Int. J. Mass Spectrom.* 281 (2009) 92–96.
- [33] A. Ulanowska, T. Ligor, M. Michel, B. Buszewski, Hypenated and unconventional methods for searching volatile cancer biomarkers, *Ecol. Chem. Eng. S* 17 (2010) 9–23.
- [34] Enhanced MSD, ChemStation ChemStation E.02.00493, Agilent Technologies, 2008.
- [35] The Unscrambler v10.2; Camo Process AS, 2012.
- [36] Pirouette, Comprehensive Chemometrics Modeling Software, Ver. 3.11; Infometrix, Inc., Woodinville, WA, 2003.

VIII. GENERAL CONCLUSIONS

In the present PhD thesis, new analytical methodologies have been proposed, aimed at achieving a significant reduction on the effort necessary to carry out the sample treatment step, as well as at minimizing costs and analysis time and diminishing errors associated with this stage of the analytical process.

To study the possibilities of these new methodologies, different analytical methods for the resolution of specific problems in the field of food and health have been developed.

The main conclusions are outlined below. Some are general conclusions and others are particular ones of the different applications developed.

✓ **Use of microextraction by packed sorbent technique.**

Possibilities offered by this microextraction technique have been studied. The new technique reduces, firstly, the sample volume necessary to carry out preconcentration of analytes compared with those used in other extraction techniques, and secondly, the volume of organic solvent that is used for the elution of the retained compounds.

The specific application proposed herein proves the usefulness of the MEPS technique with a C₁₈ packed sorbent for the extraction of haloanisoles from wine, drawing the samples directly through the cartridge containing the sorbent and then eluting the analytes using 50 µL of ethanol.

✓ **Study of the potential of capillary columns with ionic liquids as stationary phases in gas chromatography.**

The use of columns with stationary phases of ionic liquids that present different polarities, facilitates the chromatographic separation of compounds that are difficult to separate using conventional low polarity columns. Haloanisoles, as analytes object of study, showed adequate resolution values when analyzed with all ionic liquid columns evaluated. However, considering the separation of these compounds from other interfering compounds existing in the matrix, the column that provided the best separation was the SLB™-IL59, whose stationary phase was the ionic liquid, *1,12-di(tripropylphosphonium)dodecane bis(trifluoromethanesulfonyl)amide*.

✓ **Coupling of a headspace sampler with a programmed temperature vaporizer for the chromatographic analysis of volatile compounds in urine samples.**

The advantages of the use of headspace sampling as pre-treatment technique for the analysis of volatile compounds in urine samples have been checked. This technique allows the analysis of the compounds of interest in this matrix by separating them from other non-volatile interfering compounds without having to resort to additional pretreatment steps. The coupling of HS with a programmed temperature vaporizer increases the sensitivity of the methodology allowing thermal focalization of the volatile compounds extracted in the headspace by means of "solvent vent" injection mode, which also facilitates the removal of the solvent.

Specifically, this configuration has been proposed for the analysis of five aldehydes in urine and its identification and quantification have been achieved without any prior derivatization which is a commonly used step in the analysis of these compounds.

This methodology has also been proposed for the quantification of another five compounds, ketones and alcohols, possible biomarkers of lung cancer, giving good results for its separation and quantification.

- ✓ **Using an electronic nose based on the coupling of a headspace sampler, a programmed temperature vaporizer and a mass spectrometer for obtaining profile signals from urine and saliva samples.**

The use of an electronic nose based on the coupling HS-PTV-MS is a rapid and simple technique, thus providing important advantages when it comes to analyzing biological samples and proposing methodologies for their use in routine analysis. The procedure does not include a chromatographic separation step and handling of the sample is reduced to placing a certain volume of it in the headspace vial. The study with samples such as urine and saliva is especially interesting since both can be collected noninvasively.

The proposed configuration, which includes the use of a chromatographic column set at a high temperature (240 °C) as the transfer line between the injector and the detector, enables to propose either a single step non-separative methodology for the study of profile signals or a non-separative methodology as screening step followed by a confirmatory one. This second step would include chromatographic

separation with temperature programming in the oven but without changing the instrumental configuration.

Two methodologies using an electronic nose like the one above described have been proposed. Firstly, this coupling was applied to the analysis of five possible biomarkers of lung cancer in urine samples and was used as a screening step in which PLS calibration models were used for the quantification of these compounds from profile signals from healthy individuals and patients.

In a second application, the described electronic nose was used in order to obtain profile signals from saliva samples also obtained from healthy individuals and patients. The study and treatment of the information contained in these signals has proved useful for classification purposes without the need for performing quantification of individual compounds.

✓ **Using chemometric techniques for the study of profile signals obtained by non-separative methodologies for classifying saliva samples from healthy individuals and patients.**

The use of different pattern recognition techniques allows the classification of profile signals containing information from a large number of variables. Among the various existing techniques, those that allow handling non linearly separable data, provide better results.

Specifically, for the classification of saliva samples, three techniques have proven usefulness: K nearest neighbours, discriminant analysis and support vector machines. The latter was the technique for which better results were obtained.

APÉNDICE: MENCIÓN
“DOCTORADO INTERNACIONAL”


Con la elaboración y defensa de esta memoria de tesis se pretende optar a la obtención de la mención de "Doctor Internacional" en el título de Doctor por la Universidad de Salamanca, al considerar que la doctoranda reúne los requisitos para optar a tal mención:

- La doctoranda ha realizado una estancia de tres meses en el centro de investigación Helmholtz - Centre for Environmental Research - UFZ, en Leipzig (Alemania), relacionada con la presente tesis.
- Esta memoria incluye un resumen en inglés donde se detallan los objetivos y conclusiones de la misma.
- La tesis cuenta con los informes favorables de dos doctores expertos pertenecientes a instituciones de educación superior no españolas.
- Uno de los miembros que ha de formar parte del tribunal evaluador de la tesis es un experto perteneciente a un centro de investigación de prestigio no español.

Se incluyen, en este apéndice, la certificación de la estancia breve y los pertinentes informes favorables.

**PROGRAMA ESTATAL DE PROMOCIÓN DEL TALENTO
Y SU EMPLEABILIDAD**

**CERTIFICADO DEL CENTRO RECEPTOR TRAS LA ESTANCIA BREVE O TRASLADO
TEMPORAL**
CERTIFICATE OF STAY IN A FOREIGN INSTITUTION

1. Beneficiario/ Applicant:
Nombre y apellidos/ Name: Ana Pérez Antón
D.N.I./ National identity Card: 71297652K
Centro de adscripción de la beca/ Home Institución: Universidad de Salamanca
2. Centro en el que se ha realizado la estancia/ Host institution:
Nombre/ Name: Helmholtz-Centre for Environmental Research - UFZ
Dirección/ Address: Permoserstraße 15, 04318 Leipzig
Localidad/ Country: Germany
3. Investigador responsable en el centro de la estancia/ Responsible person in the Host
Institución/ Institution: Department of Metabolomics
Nombre/ Name: Dr. Sven Baumann
Cargo/ Post: Postdoctoral Research Fellow
CERTIFICO: que el becario arriba mencionado ha realizado una estancia en este centro en las siguientes fechas: desde 15 / 09 / 2014 hasta 15 / 12 / 2014
THIS IS TO CERTIFY: that the above mentioned person has performed a stay in this Institution in the following dates: From: 15 / 09 / 2014 To: 15 / 12 / 2014
Lugar y fecha: City and date: Leipzig, 15. 12. 2014
Firma y Sello/ Signature & Stamp
 <div style="display: inline-block; text-align: right;"> <p>Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH - UFZ Department Metabolomics Permoserstraße 15 04318 Leipzig</p> </div>



ESCUELA DE DOCTORADO
EDIFICIO MULTIUSOS I+D+I
C/ ESPEJO Nº 2 - 1ª PLANTA. 37007 SALAMANCA

MODELO DE INFORME DE MENCIÓN DOCTOR INTERNACIONAL STANDARD FORM FOR THE INTERNATIONAL DOCTORATE MENTION

NOMBRE Y APELLIDOS / NAME OF THE EXAMINER

ARUNDHUTI SEN

CATEGORÍA ACADÉMICA O PROFESIONAL/ ACADEMIC OR PROFESSIONAL RANK

RESEARCH ASSOCIATE

UNIVERSIDAD U ORGANISMO Y PAÍS / UNIVERSITY OR INSTITUTION AND COUNTRY

KING'S COLLEGE LONDON, UNITED KINGDOM

TÍTULO DE LA TESIS OBJETO DE INFORME / TITLE OF THE TESIS

DEVELOPMENT OF COMBINATIONS OF SAMPLE TREATMENT
AND DATA PROCESSING TECHNIQUES FOR THE SIMPLIFICATION
OF ANALYTICAL METHODS

NOMBRE Y APELLIDOS DEL DOCTORANDO / NAME OF THE CANDIDATE

ANA PÉREZ ANTON

NOMBRE Y APELLIDOS DEL DIRECTOR/A(S) DE LA TESIS / NAME OF THE THESIS DIRECTOR(S)

JOSÉ LUIS PÉREZ PAVÓN
CARMELO GARCÍA PINTO

INFORME RAZONADO/REASONED REPORT
SOBRE LA CALIDAD CIENTÍFICA DE LA TESIS DOCTORAL (puede añadir las hojas que crea necesarias adjuntando a este informe)
ABOUT THE SCIENTIFIC QUALITY OF PhD (you can use all the pages you might need including this form)

Informo que la calidad científica de esta Tesis es merecedora de obtener la Mención Doctor Internacional
(marcar con una cruz una opción)
I inform that the scientific quality of this thesis is worthy of obtaining the International Doctor Mention (mark
with across one option)

Favorable

No favorable/Not favorable

FECHA / DATE : 5th of September 2016

FIRMA / SIGNATURA original: 

SELLO DE LA INSTITUCIÓN DEL FIRMANTE / THE INSTITUTION'S STAMP OF THE PERSON WHO FIRMS

Faculty of Life Sciences & Medicine
Analytical & Environmental Sciences Division
King's College London
Franklin-Wilkins Building
150 Stamford Street
London SE1 9NH
Tel.: 020 7848 4978
Email: arundhuti.sen@kcl.ac.uk



28th August 2016

To:

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología
Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Salamanca

Dear Sir or Madam,

The following is a report on the PhD Thesis Summary entitled '**Development of Combinations of Sample Treatment and Data Processing Techniques for the Simplification of Analytical Methods**' by Ana Pérez Antón.

The summary is clearly written, and concisely describes the main aims, background, and experimental settings relevant to the doctoral research project. The introductory sections ('Aims', 'Introduction', 'Instrumental Configurations') contain sufficient background information about the instrumental techniques employed, to orient the non-specialist reader. The conclusions adequately summarise the importance and impact of the primary results from all studies. For a thesis on both sample treatment and data processing, the summary could have contained more discussion of the chemometric techniques used or developed.

The central theme of the project (i.e. developing analytical methods which require minimal sample treatment) is also reflected in the resultant articles, all four of which were published in reputable international journals. The earliest publication (from 2012) described the application of a MEPS/GC- μ -ECD/ionic liquids work-flow to the determination of haloanisole contaminants in wine, and a thorough one-variable-at-a-time investigation of various parameters affecting MEPS outcomes. The method so developed was successful in determining low levels of haloanisole contaminants in wine in a reproducible manner. This was followed by an article in 2014 on the use of head-space (HS) analysis with a programmed temperature vaporizer (PTV) and GC-MS for the measurement of endogenous aldehyde levels in urine. This study also optimized conditions for the generation of HS samples via a design-of-experiments approach: specifically, a Box-Behnken design and response-surface analysis. Their optimized method permitted the precise quantification of five biologically relevant aldehydes in urine at lower levels than previously reported. The most recent publications (both from 2016) applied a similar HS-PTV/MS methodology to analyse other volatile compound classes in urine and saliva. While the urine study measured specific analytes of interest to lung cancer, the saliva study used 'profiling' data i.e. information obtained by the HS-PTV/MS method on all observable volatiles in the saliva

samples. Both studies used a variety of statistical/chemometric (Wilcoxon signed-rank test, PCA, SIMCA etc.) tools for data analysis and sample classification, with less emphasis on sample treatment methods than the earlier publications.

Given that Ms Antón is also the first author on three of these publications, it is evident that she has contributed substantially to the work described therein. Accordingly, and considering the quality of the thesis summary, I am satisfied that she has completed the work necessary to be considered for a PhD degree from the University of Salamanca.

Yours faithfully,



Dr Arundhuti Sen



ESCUELA DE DOCTORADO
EDIFICIO MULTUSOS I+D+I
C/ ESPEJO Nº 2 – 1ª PLANTA, 37007 SALAMANCA

MODELO DE INFORME DE MENCIÓN DOCTOR INTERNACIONAL

STANDARD FORM FOR THE INTERNATIONAL DOCTORATE MENTION

NOMBRE Y APELLIDOS / NAME OF THE EXAMINER

SARA HERRERO MARTÍN

CATEGORÍA ACADÉMICA O PROFESIONAL/ ACADEMIC OR PROFESSIONAL RANK

Head of the Laboratory of Stable Isotope Analysis

UNIVERSIDAD U ORGANISMO Y PAÍS / UNIVERSITY OR INSTITUTION AND COUNTRY

Leibniz-Centre for Agricultural Landscape Research (ZALF) e.V.,
Institute for Landscape Biogeochemistry, Müncheberg, Germany

TÍTULO DE LA TESIS OBJETO DE INFORME / TITLE OF THE TESIS

DEVELOPMENT OF COMBINATIONS OF SAMPLE TREATMENT
AND DATA PROCESSING TECHNIQUES FOR THE SIMPLIFICATION
OF ANALYTICAL METHODS

NOMBRE Y APELLIDOS DEL DOCTORANDO / NAME OF THE CANDIDATE

ANA PÉREZ ANTON

NOMBRE Y APELLIDOS DEL DIRECTOR/A(S) DE LA TESIS / NAME OF THE THESIS DIRECTOR(S)

JOSÉ LUIS PÉREZ PAVÓN
CARMELO GARCÍA PINTO

INFORME RAZONADO/REASONED REPORT

SOBRE LA CALIDAD CIENTÍFICA DE LA TESIS DOCTORAL (puede añadir las hojas que crea necesarias adjuntando a este informe)
 ABOUT THE SCIENTIFIC QUALITY OF PHD (you can use all the pages you might need including this form)

This thesis comprises eight chapters dealing with fast analytical methods and chemometric techniques for the determination of volatile and semivolatile compounds in environmental and human biological samples.

The first chapter describes the general goal of the thesis, which consists on the development of analytical methodologies directed to achieving a significant reduction of the effort, cost and environmental impact incurred in comparison with conventional methodologies. The specific objectives are clear and well described.

The introduction is well documented and provides a good overview of the current trend in analytical chemistry to achieve automatization and miniaturization of conventional procedures, taking green chemistry principles into consideration, and applying powerful data processing techniques to simplify the analytical methods and improve their efficiency, workload and limits of detection. The introduction also provides a detailed description of the principle and the state of the art of the analytical methods used within the thesis: the use of ionic liquids as stationary phase for gas chromatography; the environmentally friendly sample preparation techniques: microextraction by packed sorbent (MEPS) and headspace sampling (HS), and their novel combination with programmed temperature vaporized (PTV) injection; the "electronic nose" methodology based on mass spectrometry (HS-PTV-MS), combined with chemometric techniques for qualitative and quantitative analysis of volatiles.

The third chapter presents the different instrumental configurations with rigorous detail.

The four applications presented in the following chapters are very timely, and combine novelty in the analytical methodologies and the chemometric tools applied, with the resolution of specific problems which are relevant and have a definite social importance and impact in the fields of food and health analysis. The analytical methods have been rigorously optimized and validated, and deal with complex sample matrixes (wine, human urine and saliva). Several chemometric tools have been applied for the evaluation of the results, including multivariate calibration, non-parametric methods, and pattern recognition techniques: principal component analysis (PCA), K-nearest neighbors (KNN) model, soft independent modeling of class analogy (SIMCA), discriminant analysis (DA) and support vector machines (SVM).

All four applications have been published in internationally recognized, peer review journals with high impact factors, which validate their quality.

The main novel aspects and highlights of this thesis can be summarized as follows: i) the application of the modern miniaturized solvent extraction technique MEPS for food matrices, which had been rarely applied before; ii) the evaluation of the potential of ionic liquid stationary phases for the separation of highly polar compounds, which is a very pioneer field with strong possibilities to improve the thermal stability and selectivity of gas chromatography (GC) separations; iii) the demonstration of the potential of HS-PTV coupling as pre-concentration technique for the analysis of volatile compounds in human biological samples, rarely explored to date. The sensitivity of this coupling can avoid the step of derivatization, usually required for the analysis of several important polar biomarkers, which shortens and simplifies the current procedures significantly; iv) The inclusion of a PTV injector in the mass spectrometry-based electronic nose configuration (HS-MS) to increase its sensitivity, and the development of some of the first applications of this methodology in the biological field.

The methodological configurations presented in this thesis offer new possibilities and suppose a step forward for the simplification and optimization of the analytical methodologies currently applied in food and health analysis. The great potential of the electronic nose method (HS-PTV-MS), as a non-invasive methodology for early detection of diseases, could have a big impact for prevention purposes, as it is simple, cost effective and can be applied in wide-range population.

In summary, this thesis presents an original work of high social impact, it is solid and technically sound, and it has been performed with great skill and profession. Therefore, I consider this thesis has more than sufficient merit to be defended in front of a committee, and is worthy of obtaining the International Doctor Mention.

Informo que la calidad científica de esta Tesis es merecedora de obtener la Mención Doctor Internacional (marcar con una cruz una opción)

I inform that the scientific quality of this thesis is worthy of obtaining the International Doctor Mention (mark with across one option)

Favorable

No favorable/Not favorable

FECHA / DATE : 27-June-2016

FIRMA / SIGNATURA original:



Leibniz Centre for Agriculture
 Landscape Research
 Institute of Landscape Biogeochemistry
 Eberswalder Str. 84
 15374 Müncheberg, Germany
 Phone: +49 33432 - 82-240
 Fax: +49 33432 - 82-343

SELLO DE LA INSTITUCIÓN DEL FIRMANTE / THE INSTITUTION'S STAMP OF THE PERSON WHO FIRMS

