



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Desarrollo y validación de un método por
HPLC-UV-MS para la cuantificación de acetato
de vitamina E en líquidos rellenables de cigarrillo
electrónico**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

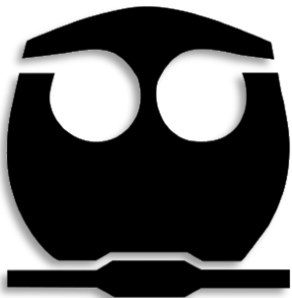
QUÍMICO

PRESENTA

JESÚS CARRIZOSA FERNÁNDEZ

Ciudad Universitaria, CD. MX

2024





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: **DEL RIO PORTILLA JOSE FEDERICO**

VOCAL: Profesor: **HERNANDEZ CHACON JUAN CARLOS**

SECRETARIO: Profesor: **TAPIA MENDOZA EVERARDO**

1° SUPLENTE: Profesora: **OVALLE MAGALLANES BERENICE**

2° SUPLENTE: Profesora: **OCAÑA RIOS IRAN**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y la Conservación del Patrimonio Cultural, LANCIC-IQ, Instituto de Química.

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Everardo Tapia Mendoza

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q. Emilio Iturbe Nava

SUSTENANTE:

Jesús Carrizosa Fernández

AGRADECIMIENTOS OFICIALES

Este documento se basa en datos provenientes del proyecto "Monitoreo del contenido de cigarrillos electrónicos: evidencia para apoyar su adecuada regulación", que fue posible gracias a la subvención (MEX-28-01) administrada por la Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (The Union) y financiada por Bloomberg Philanthropies. El contenido de este estudio es responsabilidad de los autores y bajo ningún caso refleja el punto de vista de The Union o de Bloomberg Philanthropies.

A la Facultad de Química y a la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de recibir la mejor educación y permitirme formarme como químico.

Al Programa de Apoyo Nutricional por el sostén alimenticio que me brindó a lo largo de mi carrera.

Al programa de Beca de Apoyo a la Manutención, por el sostén económico que fue primordial para sostener mi estadía en la Facultad de Química.

Al Instituto de Química y al Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural, por brindarme un lugar de trabajo y la oportunidad de desarrollar este escrito, por aportarme los conocimientos necesarios para mi formación como químico y futuro profesionista.

Al M. en C. Everardo Tapia Mendoza, a la M. en C. Mayra León Santiago y a la Dra. Marisol Reyes Lezama, miembros del Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural, por apoyarme, guiarme e instruirme en mi estadía en el laboratorio a lo largo del trabajo de este escrito.

A todos mis profesores y profesoras que me impartieron clases que sin duda contribuyeron en gran medida a mi formación profesional.

Al Instituto Nacional de Salud Pública, por brindar las herramientas y recursos para realizar este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Blanca, por el apoyo durante toda mi vida, en todos los aspectos. Ni las palabras en cualquier idioma, ni las acciones son suficientes para agradecerte.

A mi padre Octaviano, que hasta donde la vida te permitió, y aún después, estuviste y estás acompañándome.

A mis hermanos David y Javier, que a pesar de las adversidades me apoyaron y estuvieron ahí para mí siempre que lo necesité.

A mis padrinos Rogelio y Dora, por siempre tenerme en consideración, a pesar de que yo no tuve la madurez de hacer lo mismo.

A mi profesor y tutor Everardo, por las enseñanzas, la paciencia, la confianza que puso en mí y por demostrarme que solo hace falta creer en mi para lograr mis objetivos, tanto profesionales y personales.

A Karla, por estar conmigo en mis mejores y peores momentos, por ser mi confidente y compañera de vida, por enseñarme lo que es valentía, fortaleza, constancia y amor.

A Carlos Cosío Castañeda, Federico del Río, Marco Antonio Tafoya, Tonantzin Ramírez, Héctor García Ortega, Arturo Mendoza Nieto y José Mojica, que dejaron marca en mi forma de ser, de ver y de pensar; por las risas, los consejos y aprendizajes dentro y fuera del aula.

A Ahmed, por los esfuerzos que hizo por mí, por las pláticas y anécdotas que tuvimos, y por enseñarme a desarrollar un criterio propio.

A todos mis amigos durante la carrera, pero siendo necesario mencionar a Lizzet, Leslie, César, Jazive, Saúl, Naomi, Johan, Alexis, Regina, Zapata, Brandon, David P, Derek, Yoali, Aldo, Neri, Juanchi, Martín, Fercho, Juanmi, Benja, Ernesto, Yareli, Brayan, Karen, Jorge, Helios, Fátima, y Alan. Los mejores momentos de mi carrera los viví con ustedes, y ojalá vivir aún más.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

α	Selectividad
ACN	Acetonitrilo
BAL	Líquido broncoalveolar, por sus siglas en inglés
bar	bar, unidad de presión
CBD	Cannabidiol
CG	Cromatografía de gases
CI	Ionización química, por sus siglas en inglés
CL	Cromatografía de líquidos
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
CV	Coefficiente de variación
DOF	Diario Oficial de la Federación
ε°	Fuerza del disolvente
EI	Impacto electrónico, por sus siglas en inglés
ENDS	Sistemas Electrónicos de Suministro de Nicotina, por sus siglas en inglés
ESI	Ionización por electrospray, por sus siglas en inglés.
EURACHEM	Red de organizaciones en Europa con el objetivo de establecer un sistema para la trazabilidad internacional de las mediciones químicas y la promoción de buenas prácticas de calidad
eV	Electronvolt
EVALI	Lesión Pulmonar Asociada al Cigarrillo Electrónico, por sus siglas en inglés
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos, por sus siglas en inglés
FE	Fase Estacionaria
FM	Fase Móvil
GV	Glicerina vegetal
H₂O	Formula química del agua
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia, por sus siglas en inglés
IC	Intervalo de confianza
ICS	Intervalo de confianza superior

ICI	Intervalo de confianza inferior
INSP	Instituto Nacional de Salud Pública
IQ	Instituto de Química
ISO	Organización Internacional de Normalización, por sus siglas en inglés
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, por sus siglas en inglés
<i>k'</i>	Factor de retención
KNO₃	Formula química del nitrato de potasio
LANCIC	Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural
LOC	Límite de cuantificación
LOD	Límite de detección
μL	Microlitro
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
mL	Mililitro
MS	Espectrometría de Masas
<i>N</i>	Eficiencia de la columna
OMS	Organización Mundial de la Salud
PG	Propilenglicol
ppm	Partes por millón
psi	Libra por pulgada cuadrada
Q	Cuadrupolo, por su abreviación en inglés
QIT	Cuadrupolo de trampa de iones, por sus siglas en inglés
<i>r</i>	Coefficiente de correlación
<i>r</i>²	Coefficiente de determinación
<i>R_s</i>	Resolución
S/R	Relación señal/ruido
<i>t</i>₀	Tiempo muerto
THC	Tetrahidrocannabinol
THF	Tetrahidrofurano
ToF	Tiempo de vuelo, por sus siglas en inglés

t_R	Tiempo de retención
ua	Unidades de absorbancia
USP	Farmacopea de los Estados Unidos, por sus siglas en inglés
UV-C	Luz ultravioleta lejana
VEA	Acetato de vitamina E, por sus siglas en inglés
$w_{\frac{1}{2}}$	Ancho a la base de la mitad de la altura del pico cromatográfico de un compuesto
w_{b_n}	Ancho a la base de un pico cromatográfico de un compuesto n

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
CAPÍTULO I ANTECEDENTES.....	4
1.1. ¿Qué es un cigarrillo electrónico?.....	4
1.1.1. Historia del cigarrillo electrónico.	4
1.1.2. Tipos y estructura del cigarrillo electrónico.	5
1.1.3. Situación actual en México del cigarrillo electrónico.	8
1.2. Efecto en la salud humana proveniente del acetato de vitamina E en los cigarrillos electrónicos.....	8
1.2.1. Características del acetato de vitamina E.	8
1.2.2. Patología de <i>EVALI</i> y repercusiones a la salud por inhalación de acetato de vitamina E.	10
1.3. Cromatografía.	11
1.3.1. Cromatografía de líquidos.....	11
1.3.2. Cromatografía de líquidos de alta eficiencia.	12
1.3.3. Instrumentación típica de un equipo de <i>HPLC</i>	13
1.4. Espectrometría de masas.	16
1.5. Validación de métodos analíticos.	18
1.5.1. Parámetros de desempeño.....	19
1.5.2. Tipos de métodos y selección de parámetros de desempeño.	20
CAPÍTULO II MÉTODOLOGÍA.....	22
2.1. Materiales y equipos.	22
2.1.1. Reactivos.	22
2.1.2. Equipos.....	22
2.1.3. Instrumentos y aparatos.....	22
2.1.4. Preparación de disoluciones.	23
2.2. Desarrollo del método analítico.....	24
2.2.1. Condiciones de detección y separación.....	24
2.2.2. Parámetros cromatográficos.	26
2.2.3. Intervalo de trabajo.	27

2.3.	Validación del método analítico.....	28
2.3.1.	Preparación de muestra.....	28
2.3.2.	Parámetros de desempeño.....	29
2.4.	Cuantificación de acetato de vitamina E en muestras comerciales.....	35
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		36
3.1.	Desarrollo del método analítico.....	36
3.1.1.	Condiciones de separación y detección.....	36
3.1.2.	Parámetros cromatográficos.....	40
3.1.3.	Intervalo de trabajo.	43
3.2.	Validación del método analítico.....	47
3.2.1.	Preparación de muestra.....	47
3.2.2.	Parámetros de desempeño.....	48
3.3.	Declaración de la validación.....	66
3.4.	Cuantificación de acetato de vitamina E en muestras comerciales.....	67
CAPÍTULO IV CONCLUSIONES		76
REFERENCIAS		77

INTRODUCCIÓN

La popularidad de los dispositivos conocidos como cigarrillos electrónicos (*e-cigarettes*), ha ido en aumento en la última década. Estos se promueven al público como una alternativa “saludable” para combatir el tabaquismo, por medio de inhalación de bajas cantidades de nicotina (en comparación con el cigarro convencional) en forma de aerosol. Los vapeadores simulan la sensación de la acción de fumar, conocida actualmente como “vapeo”. Además, estos dispositivos se utilizan para el consumo de cannabinoides. De esta forma aumentan aún más su popularidad dado el interés de los usuarios por los principios activos de la marihuana, como son el tetrahidrocannabinol (THC) y el cannabidiol (CBD) (Layden *et al.*, 2020).

En junio de 2019, hubo un repentino aumento de casos de lesiones pulmonares, aparentemente asociadas al vapeo en diferentes partes de los Estados Unidos (Duffy *et al.*, 2020), por lo que, en agosto de 2019, se hizo pública una alerta sanitaria con el propósito de prevenir al público de las posibles consecuencias del vapeo (CDC, 2019). Sin embargo, para febrero de 2020, se tenían reportados un total de 2,807 pacientes hospitalizados en todo el territorio estadounidense, además de 68 muertes confirmadas en 29 estados (CDC, 2021).

Posteriormente, a este padecimiento se le atribuyó el nombre de “lesión pulmonar asociada al cigarrillo electrónico o vapeo” (*EVALI*, por sus siglas en inglés). Muchos de los pacientes diagnosticados con *EVALI* afirman haber consumido productos de cigarrillo electrónico con THC, dando una pista clara para encontrar la fuente del padecimiento; por lo que para un estudio, se recolectaron productos de *e-cigarettes* con THC con el propósito de analizar su contenido, encontrando diferentes componentes, entre ellos, el acetato de vitamina E (*VEA*, por sus siglas en inglés). A su vez, se realizó una investigación donde se analizó el líquido broncoalveolar (*BAL*) de los pulmones de 29 muestras provenientes de pacientes con *EVALI*, encontrando *VEA* en todas las muestras analizadas.

Dichos descubrimientos apuntan a que el acetato de vitamina E es el principal sospechoso, siendo un compuesto precursor desencadenante de *EVALI*, sin descartar que

otros componentes puedan causar diferentes tipos de lesiones pulmonares (Blount *et al.*, 2019). En la **figura 1** se muestra la estructura química del acetato de vitamina E.

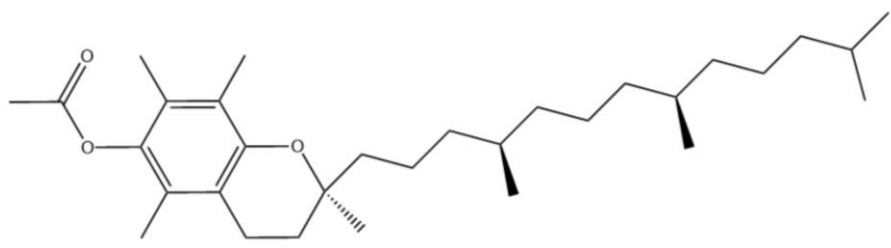


Figura 1. Estructura química del acetato de vitamina E.

Por consecuencia y teniendo como antecedente la situación en el país vecino, en México, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) declaró una alerta sanitaria máxima por los riesgos a la salud que representan los productos comúnmente denominados vapeadores, en todas sus modalidades (COFEPRIS, 2022), mencionando también al acetato de vitamina E como dañino para la salud. En el mismo mes, se emitió un decreto presidencial en el Diario Oficial de la Federación (DOF), prohibiendo la circulación y comercialización de cualquier cigarrillo electrónico y sus productos derivados en el interior del país. Sin embargo, siguen en circulación en la actualidad y con una demanda creciente, a través de tiendas en línea y el mercado negro.

Para dar a conocer a la población mexicana acerca de los posibles riesgos y daños a la salud, el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) en colaboración con el Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural (LANCIC) del Instituto de Química (IQ), desarrollaron y validaron métodos analíticos para la cuantificación de diversos componentes en líquidos de relleno (*e-liquids*) de cigarrillo electrónico por técnicas cromatográficas.

En este trabajo se muestra el desarrollo y validación de un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (*HPLC*, por sus siglas en inglés), con detector UV-visible y acoplado a Espectrometría de Masas (*MS*, por sus siglas en inglés) para la cuantificación de acetato de vitamina E en líquidos de relleno de cigarrillo electrónico de circulación en el mercado mexicano; de esta forma dar a conocer su presencia en dichas muestras.

OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar y validar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia con detección en la región del ultravioleta y acoplado a espectrometría de masas, para la cuantificación de acetato de vitamina E en líquidos rellenables de cigarrillo electrónico, con el fin de ser utilizado en un futuro para la regulación adecuada de dichos productos.

Objetivos particulares

1. Demostrar la presencia de acetato de vitamina E en líquidos rellenables regulares y cannábicos de cigarrillo electrónico.
2. Reportar resultados confiables de la cantidad de acetato de vitamina E presente en muestras comercializadas en México.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. ¿Qué es un cigarrillo electrónico?

1.1.1. Historia del cigarrillo electrónico.

En el 2003, el farmacéutico chino Hon Lik desarrolló el primer cigarrillo electrónico con el propósito de que los fumadores con adicción al tabaco tuvieran un método alternativo de consumir nicotina por inhalación, quitando de por medio el humo derivado de la combustión. De esta manera, el cigarrillo electrónico fue promocionado como una alternativa sin repercusiones a la salud para abandonar la adicción al tabaco. Pronto, su venta y comercialización aumentó dada la publicidad establecida, siendo acogidos en diversos países y entrando en el mercado estadounidense en el 2007 (Vapo, 2022).

Gracias al repentino aumento en ventas, la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2008 a través de un comunicado de prensa, salió a desmentir lo que los vendedores dan a entender en su publicidad: “los cigarrillos electrónicos no se consideran un tratamiento legítimo para los fumadores que quieren dejar el tabaco”, dejando claro la necesidad de realizar estudios clínicos y toxicológicos (OMS, 2013).

Los cigarrillos electrónicos estaban en la mira de diferentes instituciones como la Administración de Alimentos y Medicamentos (*FDA*, por sus siglas en inglés) para llegar a regular la venta e importación, lo cual obtuvo en 2016, con respaldo de diversos estudios clínicos. (U.S. Food and Drug Administration, 2016). Aun así, desde su año de creación y hasta la fecha, se han desarrollado diferentes versiones del cigarrillo electrónico para competir en el mercado, mejorando su tecnología, pero manteniendo el mismo principio de funcionamiento.

La situación en Estados Unidos ha mejorado la regulación con respecto a la importación, pero en el resto del mundo parece ser la misma; por lo que es necesario recalcar que hace falta mucho camino para catalogar a los cigarrillos electrónicos como un producto seguro para la población y es imprescindible la investigación de estos dispositivos para tener un amplio panorama acerca de su interacción en el cuerpo humano.

1.1.2. Tipos y estructura del cigarrillo electrónico.

Los cigarrillos electrónicos son dispositivos de liberación y administración de nicotina, cannabinoides (THC, CBD), saborizantes y otro conjunto de sustancias. Estos llegan al sistema respiratorio en forma de aerosol (mal llamado vapor), a través del calentamiento de una disolución conocida como *e-liquid* (líquido de relleno de cigarrillo electrónico) por medio de una bobina. En la **figura 2** se muestra la estructura general de un cigarrillo electrónico, el cual se compone de tres partes fundamentales: el cartucho, el atomizador, y la batería.

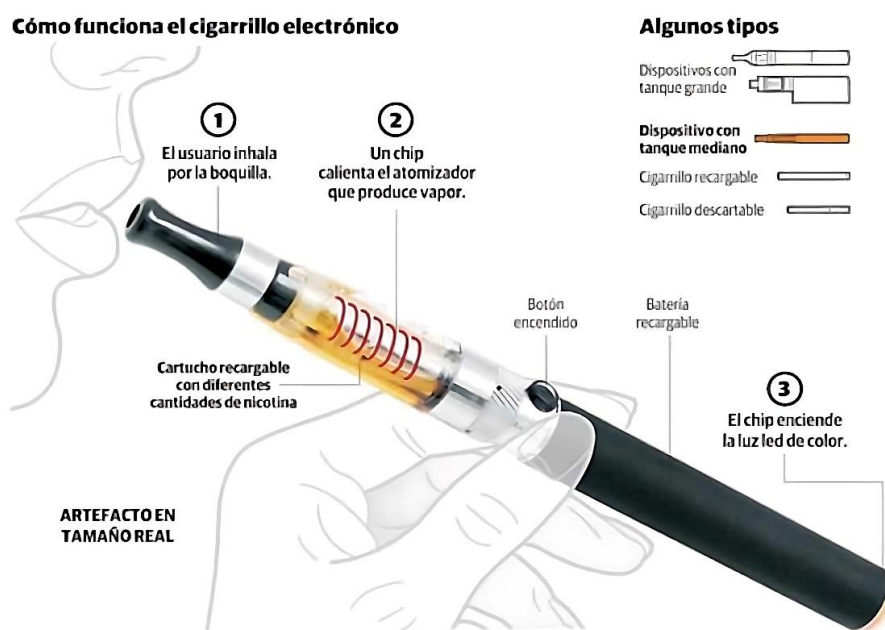


Figura 2. Estructura del cigarrillo electrónico. Tomada de Llambí *et al.*, (2020).

El cartucho es el que contiene el líquido de relleno, cuya disolución es convertida en aerosol por la bobina; puede ser de dos tipos: regulares y cannábicos como se muestra en la **figura 3**, en los regulares, el *e-liquid* está compuesto por una disolución de propilenglicol (PG) y glicerina vegetal (GV) en diferentes proporciones, agua, diferentes saborizantes grado alimenticio y nicotina a diferentes concentraciones, el propilenglicol y la glicerina son humectantes usados para producir aerosol que simule el humo de tabaco, y están en mayor cantidad que el resto de sus componentes (CDC, 2019).

Los *e-liquids* cannábicos, se componen de una mezcla de THC y CBD como componente principal, además del propilenglicol y glicerol como humectante (Duffy *et al.*, 2020).

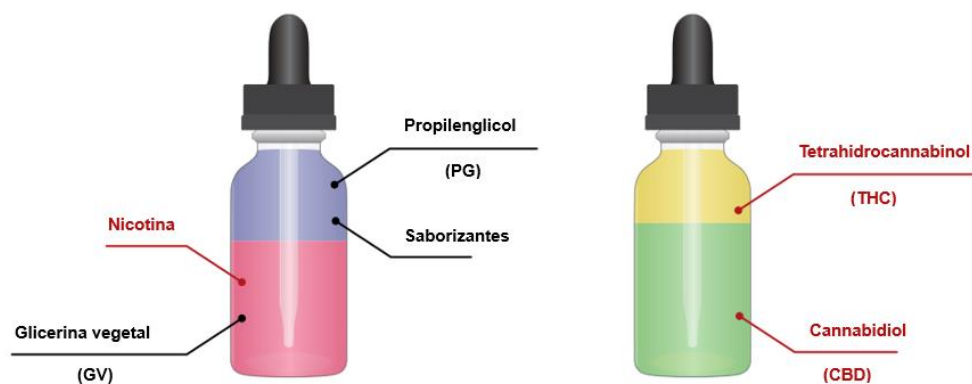







Figura 3. Ilustración de la diferencia entre *e-liquid* regular y cannábico. Tomada de CDC, (2019).

El atomizador, también conocido como nebulizador, es una bobina que convierte al *e-liquid* en aerosol. En algunos casos, se encuentra en contacto con el *e-liquid* para facilitar su calentamiento. La temperatura que alcanza, en cuestión de segundos, es alrededor de 200 °C. Se utiliza una batería de litio (recargable o desechable) que provee de suficiente energía al sistema para calentar a *e-liquid*. (CDC, 2019).

Los cigarrillos electrónicos tienen diferentes nombres: *e-cigarette*, *e-cigs*, *vaping*, *vape*, *E-cigs*, *vape pens*, *dab pens*, *dab rigs*, *tanks*, *mods*, *pod-mods*, sistemas electrónicos de suministro de nicotina (*ENDS*, por sus siglas en inglés), entre otros. Se han desarrollado diferentes presentaciones dado su tamaño, forma y tipo de dispositivo, debido a la evolución que han tenido desde su creación. Los tipos de cigarrillos electrónicos se dividen en cuatro generaciones, en la **tabla 1** se resume cada generación y sus características principales.

Tabla 1. Tipos de cigarrillo electrónico. Tomada de CDC, (2019).

Generación	Diseño	Características
1°	 <p>Cigarrillos electrónicos desechables.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Diseñado para ser de un sólo uso. • No son recargables ni rellenables. • Se desechan cuando se les agota el <i>e-liquid</i>. • Su diseño es semejante a los cigarrillos de tabaco convencionales.
2°	 <p>Cigarrillos electrónicos con cartucho rellenable.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • El <i>e-liquid</i> viene en cartuchos prellenados o rellenables. • En los cartuchos se pone en contacto el <i>e-liquid</i> y la bobina de calentamiento, la cual contiene la batería. • El cartucho y la pluma con pilas suelen venderse por separado.
3°	 <p>Tanques o <i>mods</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Cigarrillo electrónico diseñado para usarse varias veces. • Son dispositivos modificables (<i>mods</i>), permiten personalizar las sustancias en el dispositivo.
	 <p>Tanque subóhmico</p>	<ul style="list-style-type: none"> • El tanque subóhmico (contiene bobinas de una resistencia menor a 1.0 Ω), está diseñado para crear una nube grande (aerosol) con un suministro mayor de nicotina u otras sustancias.
4°	 <p>Cápsula <i>mod</i>.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • La cápsula <i>mod</i> es un <i>e-cigarette</i> con un cartucho de cápsula prellenado o rellenable con un sistema modificable. • Viene en muchas presentaciones. • Las marcas comunes de cápsulas mod son JUUL® y Suorin®. • Son compatibles con cartuchos rellenables de THC o CBD y nicotina, con o sin saborizantes.

1.1.3. Situación actual en México del cigarrillo electrónico.

Como se mencionó con anterioridad, el comercio e importación de cigarrillos electrónicos en el país está prohibido por el presidente de la república actual, derivado del decreto presidencial publicado en el DOF en 2020.

A pesar de que se exprese explícitamente en la ley dicha prohibición, las penalizaciones son solamente de manera administrativa, provocando que los distribuidores continúen con la venta de sus productos. Esto genera un alto ingreso económico y ampliando la demanda de estos dispositivos. Además, los cigarrillos electrónicos siguen en circulación a través del mercado negro, poniendo en riesgo la salud del consumidor dado el desconocimiento que se tiene sobre la manufacturación, tanto del dispositivo, como de los cartuchos. Tampoco se cuenta con una regulación que asegure la calidad de estos dispositivos electrónicos, ni estudios de los *e-liquids* acerca de sus componentes, producidos de manera clandestina en México. Además, hay una ausencia de investigaciones que demuestren las consecuencias a la salud para la población.

1.2. Efecto en la salud humana proveniente del acetato de vitamina E en los cigarrillos electrónicos.

1.2.1. Características del acetato de vitamina E.

La vitamina E es un conjunto de ocho tococromanoles, cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles como se ve en la **figura 4**, estos antioxidantes se encuentran en la naturaleza por la biosíntesis que se produce en algunas plantas (Meléndez -Martínez, 2017).

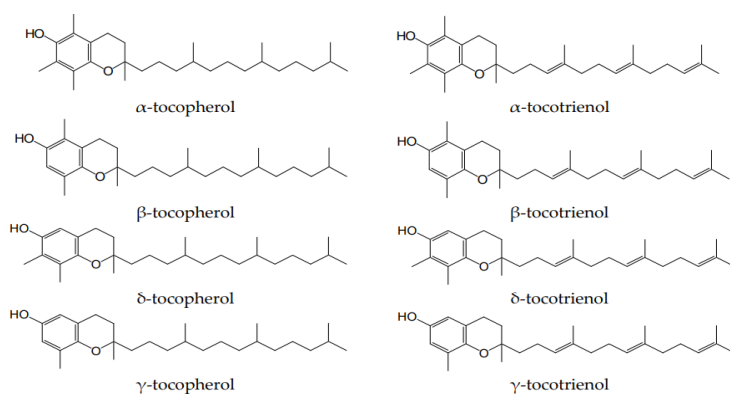


Figura 4. Tococromanoles que componen a la vitamina E. Tomada de Meléndez-Martínez (2017).

Los tocoferoles están compuestos por un grupo hidroxicromano en el que se fija una cadena saturada lateral. Dentro de los tocoferoles, se tienen diferentes isómeros mostrados en la **figura 5**. Debido a los tres centros quirales en su estructura, se tiene un total de ocho estereoisómeros posibles, siendo el estereoisómero *RRR*- α -tocoferol el más encontrado en la naturaleza y se considera que tiene la mayor actividad biológica (Górnaś *et al.*, 2022).

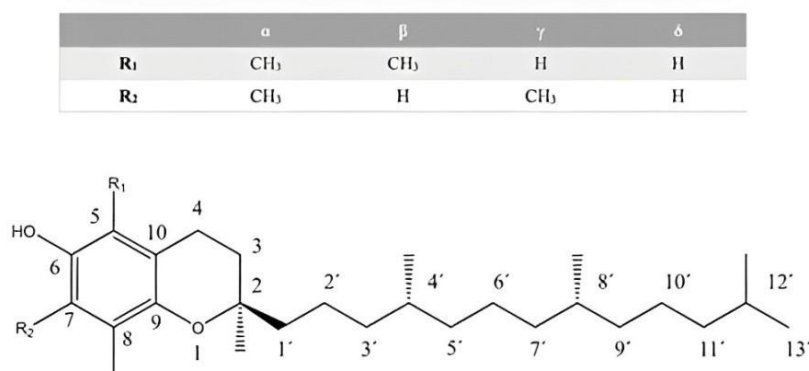


Figura 5. Estructuras de la familia de los tocoferoles. Tomada de Kröpfel *et al.* (2022).

Para formar el acetato de α -tocoferol, mejor conocido como acetato de vitamina E, se parte del *RRR*- α -tocoferol. Este producto es utilizado como antioxidante; ayuda a nutrir y proteger la piel de los daños causados por los radicales libres. También reduce las probabilidades de sufrir enfermedades cardíacas, cáncer, problemas de visión y trastornos cerebrales. Hasta este punto su interacción en el sistema respiratorio es algo que no se había estudiado desde su aparición en los cigarrillos electrónicos.

El acetato de vitamina E es un compuesto utilizado, de manera ilícita en *e-cigarettes*, como aditivo y agente espesante para mejorar su apariencia y así, disminuir costos de la fabricación de productos para cigarrillos electrónicos con THC (Blount *et al.*, 2020).

Es importante mencionar que el compuesto es termolábil, llevando a su descomposición a partir de los 200 °C (Ushikusa *et al.*, 1991), y además, es fotolábil, la exposición de luz UV-C provoca la descomposición de este (Tiburcio-Moreno *et al.*, 2012). Algunas propiedades fisicoquímicas del acetato de vitamina E se enlistan en la **tabla 2**.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del acetato de vitamina E.

Propiedad fisicoquímica	Descripción
Masa molar	472.74 g/mol
Soluble en	Etanol, metanol, hexano.
Densidad	0.9533 g/cm ³ .
Punto de ebullición	224 °C.
Punto de fusión	27.7 °C.
Log P	10.690 ± 0.355 a 20 °C.
Longitud de onda de absorbancia	285 nm en etanol.
Aspecto	Líquido viscoso amarillento.

1.2.2. Patología de *EVALI* y repercusiones a la salud por inhalación de acetato de vitamina E.

En 2019, dado el brote y aumento de casos de *EVALI* en Estados Unidos, la *FDA* reportó un análisis de 34 muestras de cartuchos de THC utilizados por pacientes con esta condición pulmonar. En la mayoría de las muestras, se encontró al acetato de vitamina E, entre otros compuestos. Gracias a este estudio se comenzaron a realizar investigaciones para conocer la interacción de *VEA* con el sistema respiratorio, uno de ellos fue el realizado por Blount *et al.* (2020) como parte de un diagnóstico clínico, analizando los residuos del líquido broncoalveolar recolectados de un total de 29 pacientes con *EVALI* hospitalizados, detectando acetato de vitamina E en todas las muestras; por tanto, la pregunta es clara, ¿cómo es que afecta este compuesto al sistema respiratorio?

El acetato de vitamina E es utilizado comúnmente como suplemento alimenticio y cremas para la piel, sin causar daños a la salud, pero su interacción con el sistema respiratorio debido a la inhalación es parcialmente desconocida. Para comprobar la relación entre acetato de Vitamina E y *EVALI*, se realizaron diferentes investigaciones, uno de los estudios para conocer dicha interacción es el reportado por Bhat *et al.* (2020), donde se realizó un estudio muestra la retención de acetato de vitamina E en los pulmones en ratones. Por otra parte, DiPasquale *et al.* (2020) aportan evidencias que sugieren que el

acetato de vitamina E es capaz de reducir las propiedades elásticas del surfactante pulmonar, empeorando el mecanismo de respiración, provocando una disfunción pulmonar. Una forma de explicar los síntomas es lo siguiente: el acetato de vitamina E, aumenta significativamente la viscosidad superficial de los surfactantes pulmonares en los alvéolos provocando fallas respiratorias, asociada a *EVALI* (Lee, 2020).

Además, las repercusiones a los pulmones que experimentan los usuarios de *e-cigarette* y la inhalación de acetato de vitamina E son la irritación de la mucosa pulmonar, los bronquios e hipoxia crónica (disminución de oxígeno en un tejido) (Thanavala & Goniewicz, 2019), los síntomas reportados de manera general son: sibilancias, tos, dificultad para respirar, ardor en la boca, la garganta o el pecho (Duffy *et al.*, 2020). Es claro que las repercusiones por inhalación de *VEA* no solo involucran a los pulmones, sino que afectan a cada parte del cuerpo humano en su camino hacia los pulmones.

Desde el final de la década pasada en Estados Unidos, donde ocurrió el brote de *EVALI*, una de las técnicas instrumentales para la detección y cuantificación de acetato de vitamina E, fue la cromatografía, tanto de líquidos como de gases, por lo que es importante su estudio y comprensión, en específico de la cromatografía de líquidos.

1.3. Cromatografía.

La cromatografía es un método físico de separación donde los componentes a separar se distribuyen en dos fases, una es la fase estacionaria (FE) que permanece en reposo y la otra es la fase móvil (FM) que fluye en una dirección definida. La combinación de estos dos lleva a una separación por la migración de los componentes entre ambas fases (Polo Díez, 2015). En este estudio, la cromatografía tomó un papel primordial a la hora de desarrollar el método analítico para la cuantificación de *VEA*; por lo que se estudiaron algunas particularidades de dicha técnica

1.3.1. Cromatografía de líquidos.

Para este trabajo nos centramos en la cromatografía de líquidos, esta es una técnica de separación sólido-líquido, donde se tienen dos fases: la fase estacionaria, de composición sólida y la fase móvil de naturaleza líquida, la separación de los componentes de la

muestra ocurre debido a los coeficientes de distribución entre dichas fases, es decir, cuando un soluto entra al sistema de separación, de forma inmediata se reparte entre la fase móvil y la fase estacionaria, dicho soluto establece un “equilibrio” entre ambas fases, la concentración de soluto en cada fase está definida por un equilibrio de distribución, pero al ser un sistema dinámico, se le conoce como coeficiente de distribución o reparto, dado que el sistema no llega al equilibrio debido a que la separación es dinámica y no estática. El coeficiente de reparto de un soluto determina la velocidad en la que avanza, junto con la fase móvil, a lo largo de la columna cromatográfica (Polo Díez, 2015). Una selección adecuada de fase móvil y estacionaria brinda una mejor separación de los componentes de una muestra.

La forma moderna de la cromatografía de líquidos (CL) es la cromatografía de líquidos de alta eficiencia, logrando columnas con menor tamaño de partícula donde pasa la fase móvil a altas presiones (Dong, 2006).

1.3.2. Cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

Diferentes tipos de cromatografía de líquidos se ha desarrollado a través de la historia, en la **figura 6** se ilustra un panorama general de todos los tipos de *HPLC* existentes, cada uno tiene un fundamento de diferente, pero el principio es el mismo, la separación sólido-líquido.

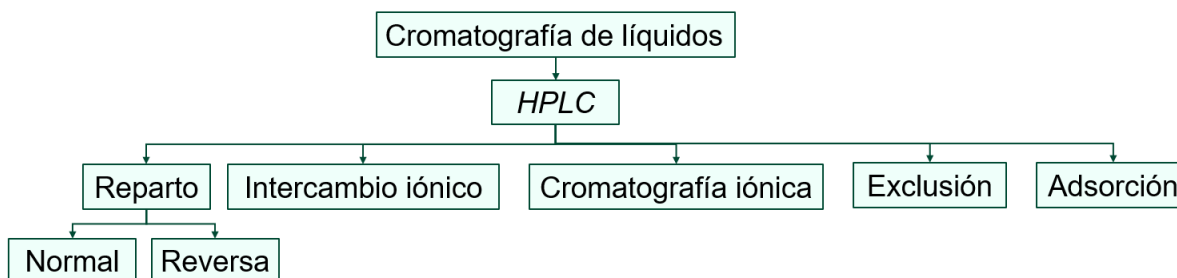


Figura 6. Tipos de cromatografía de líquidos.

En este trabajo se utilizó la modalidad de reparto en fase reversa. De manera general, la fase estacionaria es de naturaleza no polar (sílice funcionalizada con grupos no polares) y, la fase móvil es polar (disolventes como agua, MeOH, ACN o THF son los más

utilizados). La técnica resulta adecuada para analitos orgánicos neutros polares, ya que muchos de estos compuestos poseen solubilidad limitada en la fase móvil polar acuosa, pero se contrarresta por las pequeñas cantidades de muestra inyectadas del orden de micro o nanogramos (Polo Díez, 2015).

1.3.3. Instrumentación típica de un equipo de HPLC.

La instrumentación típica se divide en cinco módulos: reservorios o disolventes, sistema de bombeo, inyector, columna y detector, en la **figura 7** se muestra un esquema ilustrativo correspondiente de un equipo de HPLC, posteriormente se describen las características principales de cada módulo.

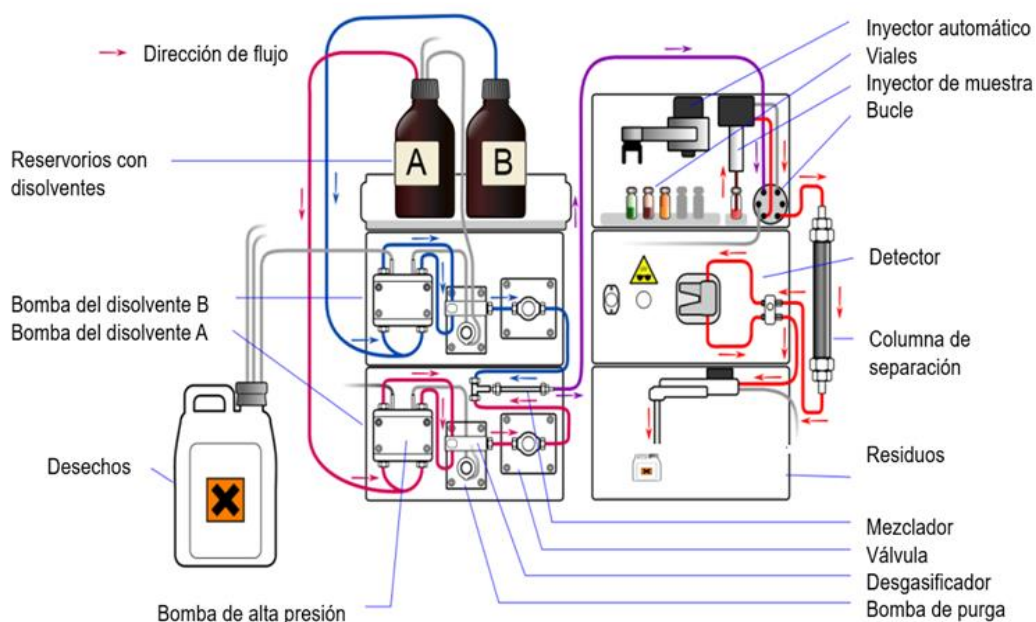


Figura 7. Esquema general de la instrumentación de un HPLC. Tomada de Castaños (2015).

Reservorios: en los reservorios se encuentran las fases móviles de dos naturalezas: disolventes orgánicos y disolvente acuoso (por sí solo o con algún modificador de pH). Están hechos comúnmente de vidrio y contienen tapones para cuidar que contaminantes como polvo o partículas suspendidas en el aire entren al sistema. Antes de ser utilizados, los disolventes se desgasifican para evitar la entrada de aire, al sistema de bombeo.

Sistema de bombeo: su función es proporcionar un flujo constante y libre de perturbaciones de la fase móvil a través de la columna. Dado que las columnas utilizadas son de pequeño diámetro de partícula (del orden de μm), las presiones generadas son altas, por lo que las bombas utilizadas se diseñan para soportar una alta presión (400-600 psi) y mantener dicha presión a un flujo constante y reproducible. Dentro de este módulo se encuentra el mezclador, cuya función es mezclar los disolventes en la proporción deseada, y debido a esta variación en la proporción es que existen dos formas en la que el sistema de bombeo trabaja, dependiendo de la composición de la fase móvil:

- **Isocrática:** la composición de la fase móvil se mantiene constante durante todo el análisis.
- **Gradiente:** la composición de la fase móvil es variable con respecto al tiempo durante el análisis.

La composición de la fase móvil contribuye al aumento o disminución de la “fuerza del disolvente”, la cual permite la salida de los analitos del sistema cromatográfico. Esta “fuerza del disolvente” o “fuerza de elución” (ϵ°) es una medida de la energía de adsorción de un disolvente (utilizando como disolvente de referencia al pentano, al cual se le asigna el valor de cero). Esta indica el grado de adsorción del disolvente con la fase estacionaria, y a su vez, la capacidad del disolvente de formar puentes de hidrógeno con los analitos a separar (Cazes, 2010). Para la modalidad de reparto en fase reversa, si se desea reducir el tiempo de elución de un análisis, se necesita una fuerza de elución mayor, para eso es necesario tener una fase móvil con una polaridad baja, con respecto al agua.

Inyector: se encarga de introducir un volumen determinado de la muestra a la columna. En la actualidad se utilizan inyector con una válvula de 6 pasos o bucle, donde se permite realizar la carga de la muestra a un volumen determinado y posteriormente hacerlo pasar hacia el sistema de separación. El volumen de inyección debe ser constante y va comúnmente en el intervalo de (0.5-500) μL .

Columna: dentro de la columna existen diferentes variables que influyen en la separación: longitud y diámetro de columna, diámetro de partícula y composición de la fase

estacionaria. A partir de la naturaleza del analito (polar o no polar) se selecciona el tipo de modalidad a utilizar, ya que la separación depende no solo de la FM, sino también de la interacción con la FE. Por otra parte, es necesario considerar en el desarrollo de un método analítico, en que modalidad se realiza el análisis. Dependiendo de la modalidad (fase reversa o fase normal) se selecciona la composición de la columna; en fase normal se utiliza sílice funcionalizada con grupos polares (por ejemplo: ciano, diol, y amino), en la fase reversa se utiliza sílice funcionalizada con grupos apolares (C8, C18 y fenilos, siendo los más comunes).

Detector: la función de un detector es registrar a los analitos conforme salen de la columna, el registro se plasma en cromatograma en forma de señales o picos cromatográficos, el tamaño de estos picos es proporcional a la concentración de los analitos, a mayor concentración, mayor será el pico con respecto a su altura.

Este registro es posible gracias a que los analitos presentan una propiedad fisicoquímica afín al detector, conocido como respuesta fisicoquímica, por ejemplo, si se desea detectar un compuesto que absorbe radiación en la región UV, es posible utilizar un detector UV-vis.

Existen una gran variedad de detectores: índice de refracción, UV-vis, conductividad, fluorescencia, electroquímico y dispersión de luz por evaporización, cada uno de ellos está fundamentado en una propiedad fisicoquímica del analito, su selección depende del problema a resolver, ya que cada uno de ellos tiene diferentes límites de detección y selectividad.

Uno de los detectores de mayor importancia y que es utilizado en muchas ramas de la química, es el detector de masas; en el estudio de los compuestos de cigarrillo electrónico, no es ajeno su uso, ya que sirve no solo para registrar, sino también para identificar los diferentes componentes de una muestra a través de su masa molecular; por tanto, es una herramienta útil para un análisis tanto cuantitativo como cualitativo, en diversos trabajos se ha utilizado para la identificación de acetato de vitamina E, cannabinoides, además de diferentes compuestos de degradación de los mismos.

1.4. Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas (*MS*) es una técnica analítica destructiva (es decir, que consume al analito), que se fundamenta en la formación de iones de uno o varios compuestos, siendo separados dada su relación masa-carga (m/z) y detectados con respecto a su abundancia en función de su relación m/z , con el propósito de la identificación de moléculas. Esta técnica brinda directamente la masa molecular de uno o varios compuestos. Para conseguir lo anterior, un espectrómetro de masas se compone de tres elementos principales: la fuente de iones, el analizador de masas y un detector, operados a condiciones de alto vacío, en la **figura 8** se muestra un esquema general de un espectrómetro de masas; dichos instrumentos no se encuentran por si solos comúnmente, sino que se suelen acoplar a un cromatógrafo ya sea de gases o líquidos (Gross, 2017).

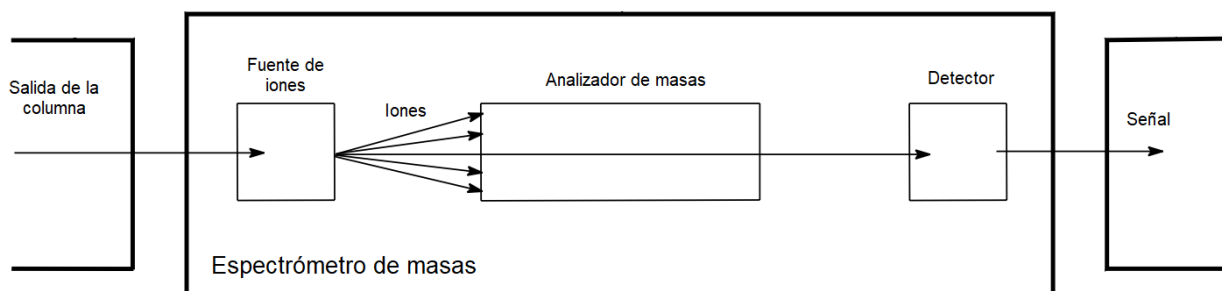


Figura 8. Esquema general de un espectrómetro de masas. Tomada de Smith, 2004.

La introducción de la muestra es un paso importante para un análisis adecuado, ya que, si la muestra presenta una baja pureza, la presencia de diferentes compuestos en la fuente de iones crea una situación en la que los iones de todos los compuestos sean analizados de manera simultánea, sin poder diferenciar entre uno u otro compuesto; es aquí donde la cromatografía tiene un papel importante, logrando realizar una separación de la muestra previo al análisis por *MS*. A continuación, se da una breve explicación de cada parte del espectrómetro de masas.

Fuente de iones: esta se encarga de la formación de iones en fase gaseosa a presión atmosférica o en condiciones de alto vacío (10^{-9} bar o $10^{-7.84}$ psi), los componentes de muestra se ionizan ya sea simultáneamente, o por procesos separados. El método de

ionización depende ampliamente de la aplicación, ya que cada método favorece la identificación de diferentes tipos de compuestos, por ejemplo, la ionización suave puede producir iones de biomacromoléculas (Gross, 2017), en la **tabla 3** se muestran algunos ejemplos de métodos de ionización en espectrometría de masas.

Tabla 3. Métodos de ionización en espectrometría de masas. Tomada de Smith (2004).

Tipo de ionización	Agente ionizante	Presión de la fuente	Usos
Impacto electrónico (<i>EI</i>)	Electrones (50-70 eV)	($10^{-5.7}$ - $10^{-7.7}$) psi	Determinación de estructura debido a la fragmentación (<i>GC/MS</i>)
Ionización química (<i>CI</i>)	Iones en fase gaseosa	~0.2 psi	Determinación de la masa molar (<i>GC/MS</i>)
Ionización por electrospray (<i>ESI</i>)	Campo eléctrico, iones en disolución	Atmosférica o presión reducida	Método de ionización suave (<i>HPLC/MS</i>)

Analizador de masas: un analizador de masas se encarga de separar la mezcla de iones o fragmentos iónicos generados, mediante electromagnetismo, de acuerdo con su relación m/z , mientras mejor sean separados los iones, más conocimiento e información se obtendrá de los analitos. Existe una amplia cantidad de analizadores de masas, cada uno con un funcionamiento diferente, entre los más comunes se encuentra: tiempo de vuelo (*ToF*, por sus siglas en inglés), cuadrupolo (Q) y cuadrupolo de trampa de iones (*QIT*, por sus siglas en inglés) (Smith, 2004).

Detectores: el detector convierte la energía del haz de iones en una corriente eléctrica tras impactar con un electromultiplicador, el cual registra y amplifica la señal proveniente del analizador de masas, posteriormente la traduce para dar como resultado un gráfico de abundancia de los iones en función de su relación m/z (Kraj *et al.*, 2008). Este gráfico se le conoce como espectro de masas, el cual da información útil de la molécula analizada,

como la masa molecular, patrón de fragmentación y en algunos casos, información estructural.

La espectrometría de masas ha sido una técnica utilizada en los análisis cualitativos que determinan la presencia del analito en los líquidos de relleno de e-cigarettes, en emisiones de e-liquids, y en las muestras biológicas analizadas. Además, en algunos estudios se han detectado productos de degradación de acetato de vitamina E (Li *et al.*, 2022).

Para que un método analítico, cuantitativo y/o cualitativo, de resultados confiables y reproducibles, es necesario validarlo para que cumpla con diferentes parámetros, para esto la validación de métodos analíticos es fundamental para brindar esta propiedad, por lo que su estudio es vital a lo largo de este trabajo.

1.5. Validación de métodos analíticos.

Existen muchas definiciones de validación y no se puede decir que una es más adecuada que otra, por ejemplo, según la *ISO 9000*, la validación es “la confirmación, a través de la aportación de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos para un uso o aplicación específico previsto”; para la *ISO 17025* es la “confirmación, a través del examen y aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto” y para la *EURACHEM*, “validar un método es básicamente el proceso para definir un requisito analítico, y la confirmación de que cuenta con capacidades consistentes con las aplicaciones requeridas”. Una definición más completa es la que brinda la *USP*: “la validación de un procedimiento analítico es el proceso por el cual se establece, mediante ensayos de laboratorio, que las características de funcionamiento del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas”.

Todas las definiciones tienen aspectos en común: cumplir requisitos y demostrarlo con evidencia objetiva. A partir de estas definiciones se comprende la importancia de la validación de métodos fisicoquímicos, ya que ésta le da confiabilidad a un método analítico de que sirve para su propósito y para lo que fue diseñado.

1.5.1. Parámetros de desempeño.

Los parámetros de desempeño, según la *IUPAC*, son pruebas cuantificables necesarias de un método que demuestran si el método es adecuado para un cierto fin (Thompson *et al.*, 2002). A continuación, se describen brevemente dichos parámetros, tomadas de EURACHEM (2016), a menos que se indique lo contrario:

- **Selectividad:** el grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar.
- **Límite de detección (LOD):** concentración mínima del analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A. C., S/A).
- **Límite de cuantificación (LOC):** concentración mínima del analito que se puede determinar con precisión y veracidad aceptables (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A. C., S/A).
- **Linealidad:** capacidad para asegurar que los resultados son directamente proporcionales a la concentración del analito (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A. C., S/A).
- **Veracidad:** la veracidad de un procedimiento analítico es la proximidad de los resultados obtenidos por ese procedimiento al valor real o valor de referencia (*USPC Oficial*, 2021). Se evalúa de dos maneras:
 - **Sesgo:** se basa en la comparación de la media de los resultados del método con un valor de referencia adecuado.
 - **Recobro:** es el porcentaje de recuperación de la cantidad de analito añadida conocida a un placebo adicionado. (*USP Oficial*, 2021).
- **Precisión:** medida de la cercanía de los resultados entre sí. Se evalúa a tres niveles:
 - **Repetibilidad:** es una medida de la variabilidad en los resultados cuando una medición se lleva a cabo por un solo analista utilizando el mismo equipo en un corto plazo de tiempo.

- **Precisión intermedia:** es una estimación de la reproducibilidad en los resultados cuando las mediciones se realizan en un solo laboratorio, variando factores como analista, instrumento o día.
- **Reproducibilidad:** medida de la variación en los resultados entre laboratorios utilizando el mismo método.
- **Robustez:** capacidad que tiene un método analítico para permanecer inalterable por pequeñas variaciones premeditadas en las características del método.

1.5.2. Tipos de métodos y selección de parámetros de desempeño.

En la validación de métodos, los parámetros de desempeño obligatorios a evaluar varían dependiendo de en qué categoría se clasifique el método a validar, las categorías se enlistan a continuación (*USP Oficial, 2021*):

- Categoría I: procedimientos analíticos para la cuantificación de los principales componentes.
- Categoría II: procedimientos analíticos para la determinación de impurezas o compuestos de degradación.
- Categoría III: procedimientos analíticos para determinar características fisicoquímicas.
- Categoría IV. procedimientos analíticos para realizar pruebas de identificación.

En la **tabla 4** se enlistan los parámetros de desempeño a evaluar en una validación, dependiendo de la categoría en la que se incluya el método analítico.

Tabla 4. Parámetros de desempeño a evaluar en una validación, dependiendo de la categoría (USP Official, 2021) (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A. C., S/A).

Parámetros de desempeño	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Cuantitativo	Impurezas límite		
Selectividad	SÍ	SÍ	SÍ	*	SÍ
Linealidad			NO		NO
Límite de detección	NO	SÍ			
Límite de cuantificación		SÍ			
Veracidad	SÍ	SÍ	*	SÍ	NO
Precisión			NO		
Robustez	*	*	*	*	

*Puede ser requerido, dependiendo de la naturaleza del método.

Cabe aclarar que estas categorías fueron diseñadas para el giro farmacéutico, pero pueden ser extrapoladas e implementadas para todos los sectores de la industria química.

En algunos sectores, la legislación exige que los métodos estén "completamente validados" y por validación "completa" de un método analítico se entiende como la examinación de las características del método en un estudio interlaboratorios de rendimiento del método. Existen protocolos internacionalmente aceptados para la validación "completa" de un método de análisis mediante un ensayo colaborativo, que exigen que se incluya un número mínimo de laboratorios y materiales de ensayo (Thompson *et al.*, 2002). Dados los grandes costos que involucra la validación completa de un método analítico suele preferirse que un solo laboratorio sea el encargado de realizar la validación, ya dependerá del alcance del método, al igual que los estándares de calidad y legislación aplicables.

CAPÍTULO II MÉTODOLOGÍA

2.1. Materiales y equipos.

2.1.1. Reactivos.

- Metanol grado *LC-MS* marca J.T. Baker®.
- Agua desionizada obtenida con un desionizador marca Millipore modelo WaterPro BT®.
- Ácido fórmico ≥ 95 % marca Sigma-Aldrich®.
- Acetato de DL- α -tocoferol grado HPLC ($\geq 96\%$), estándar de acetato de vitamina E marca Sigma-Aldrich®.
- Propilenglicol marca Sigma-Aldrich®.
- Glicerol marca Sigma-Aldrich®.

2.1.2. Equipos.

- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia con automuestreador marca Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity. Software Agilent MassHunter Data Acquisition y Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.007.00 para adquisición de cromatogramas.
- Balanza analítica marca AND modelo GH-202. con capacidad de 220 g y resolución de 0.1 mg.

2.1.3. Instrumentos y aparatos.

- Matraces volumétricos de 2.0 mL, 5.0 mL, 10.0 mL, 20.0 mL y 50.0 mL, clase A.
- Micropipeta de 100-1000 μ L marca Accumax®.
- Micropipeta de 10-100 μ L marca Accumax®.
- Micropipeta de 2-20 μ L marca Eppendorf™.
- Pipetas Pasteur.
- Frascos ámbar con tapón de 20 mL, 40 mL y 50 mL
- Viales para cromatografía transparentes de 2 mL con tapa.

2.1.4. Preparación de disoluciones.

- VEA stock de 12394 mg/L. Se pesaron 645.5 mg de acetato de vitamina E, se trasvasaron a un matraz volumétrico de 50.0 mL y se llevó a la marca de aforo con metanol grado *LC-MS*. (VEA₁₂).
- VEA stock de 9470 mg/L. Se pesaron 197.3 mg de acetato de vitamina E, se trasvasaron a un matraz volumétrico de 20.0 mL y se llevó a la marca de aforo con metanol grado *LC-MS*. (VEA₉).
- VEA stock de 332 mg/L. Se pesaron 17.3 mg de acetato de vitamina E, se trasvasaron a un matraz volumétrico de 50.0 mL y se llevó a la marca de aforo con metanol grado *LC-MS* (VEA₃).
- Placebo. Se preparó una disolución de 50 mL en una proporción 70:30 de propilenglicol:glicerol, mezclando 35 mL de propilenglicol y 15 mL de glicerol en una probeta de 50 mL, se agitó hasta que la disolución fue homogénea y se almacenó en un frasco de vidrio.
- KNO₃ de 107 mg/L. Se pesaron 10.7 mg de nitrato de potasio, se trasvasaron a un matraz de 10.0 mL y se llevó a la marca de aforo con agua desionizada, de la primera disolución se tomó 100 µL y se entregó en un matraz volumétrico de 1.0 mL, se llevó a la marca de aforo con agua desionizada.

Todas las disoluciones stock de VEA y de muestra se almacenaron en frascos ámbar de diferentes volúmenes. Además, para todas las disoluciones durante el desarrollo y validación del método analítico, se utilizó metanol grado *HPLC-MS* como disolvente principal.

La fase móvil consta de una disolución de ácido fórmico al 0.1 % v/v en agua desionizada, esta se preparó cada vez que se requería y dependiendo de la cantidad a utilizar, por ejemplo, para preparar 600 mL de ácido fórmico al 0.1 % v/v, se tomó un volumen de 630 µL de ácido fórmico al 95 % y se mezclaban con agua desionizada, se pasaban a un reservorio ámbar y se llevaba a la marca de 600 mL con agua desionizada.

2.2. Desarrollo del método analítico.

2.2.1. Condiciones de detección y separación.

Se realizó una inyección de una disolución de 100.0 ppm de *VEA*, sin columna y directo al espectrómetro de masas (cuyo detector másico es un *Q-ToF*) para conocer el espectro de masas del estándar del acetato de vitamina E. Las condiciones del instrumento en las que se introdujo el analito y tras observar el espectro de masas se establecieron como las condiciones definitivas se muestran a continuación:

- **Ionización:** electrospray en modo positivo
- **Temperatura del gas:** 350 °C
- **Flujo del gas:** 7 L/min
- **Presión del nebulizador:** 40 psi
- **Voltaje de ionización:** 5500 V
- **Voltaje de la boquilla:** 1000 V
- **Temperatura del gas de vaina:** 300 °C
- **Flujo del gas de vaina:** 12 L/min

Una vez obtenido el espectro de masas del analito, se procedió a definir las condiciones de separación. La metodología analítica se basó en primera instancia, en el trabajo de Puetz, Espinosa, *et al.* (2021), los cuales desarrollaron y validaron un método, por *HPLC-MS* para cuantificar acetato de vitamina E y diversos tocoferoles en emisiones de cigarrillo electrónico. De este artículo se tomó la proporción de la fase móvil (las cuales con condiciones isocráticas) y la composición de la columna, más no sus dimensiones de esta. Se inyectó una disolución de 100.0 ppm de *VEA* partiendo de la disolución de *VEA*₃. Teniendo las condiciones cromatográficas mostradas en la **tabla 5**.

Tabla 5. Primeras condiciones cromatográficas empleadas para cuantificar acetato de vitamina E.

Fase móvil (condiciones isocráticas)	A	0.1 % de ácido fórmico en H ₂ O: 10 %
	B	MeOH: 90 %
Columna	C18 2.7 mm (3.0 x 50) mm	
Temperatura	30 °C	
Flujo	0.5 mL/min	
Volumen de inyección	25.00 µL	
Longitud de onda de absorción	278 nm	
Tiempo de análisis	10 minutos	

Una vez analizados los resultados se plantearon las segundas condiciones de análisis. Se modificó la fase móvil a una proporción inicial MeOH: 95 % y 5 % de H₂O con ácido fórmico al 0.1 % manteniendo una corrida de tipo isocrática. Una vez determinada la nueva proporción de la fase móvil, se realizó una inyección de 5.00 µL de 100.0 ppm del estándar.

Como última parte del desarrollo de método, se inyectaron 5.00 µL de una disolución de 100.0 ppm de VEA y se analizó a dos diferentes longitudes de onda: 278 nm y 284 nm. Las condiciones cromatográficas definitivas se muestran en la **tabla 6**.

Tabla 6. Condiciones cromatográficas finales.

Fase móvil (Condiciones isocráticas)	A	0.1 % de ácido fórmico en H ₂ O: 5%
	B	MeOH: 95%
Columna	C18 2.7 mm (3.0 x 50) mm	
Temperatura	30 °C	
Flujo	0.5 mL/min	
Volumen de inyección	5.00 µL	
Longitud de onda de absorción	284 nm	
Tiempo de análisis	10 minutos	

2.2.2. Parámetros cromatográficos.

Con las condiciones definitivas, se analizó una muestra comercial de cigarrillo electrónico que presuntamente contiene THC de la siguiente manera: se pesaron aproximadamente 13 mg de muestra, se trasvasó a un matraz de 10.0 mL y se llevó a la marca de aforo con metanol, de esta disolución se tomaron 475 µL, se trasvasaron a un matraz de 5.0 mL y se llevó a la marca de aforo con metanol. En la sección **2.3.1.** se profundiza más acerca de la preparación de muestra.

Una vez obtenido el cromatograma de la muestra, se calcularon los siguientes parámetros cromatográficos: factor de retención (k'), selectividad (α), resolución (R_s) y eficiencia (N) a partir de las siguientes ecuaciones.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1)$$

Donde t_R es el tiempo de retención y t_0 tiempo muerto. El tiempo muerto se determinó inyectando al sistema de análisis una disolución de 100.0 ppm de nitrato de potasio en agua desionizada.

$$\alpha = \frac{t_{R_2} - t_0}{t_{R_1} - t_0} \quad (2)$$

Donde t_{R_2} es el tiempo de retención del compuesto 2 y t_{R_1} es el tiempo de retención del compuesto 1.

$$R_s = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{w_{b_1} + w_{b_2}} \quad (3)$$

Donde w_{b_2} es el ancho a la base del pico del compuesto 2 y w_{b_1} es el ancho a la base del pico del compuesto 1.

En caso de que no se tenga el ancho a la base, se puede utilizar el ancho a la base a la mitad de la altura para calcular w_b , haciendo uso de la siguiente relación (Dong, 2019).

$$w_b = \frac{4w_{\frac{1}{2}}}{2.355} \quad (4)$$

$$N = 5.545 \left(\frac{t_R}{w_{\frac{1}{2}}} \right)^2 \quad (5)$$

Donde $w_{\frac{1}{2}}$ es el ancho a la base a la mitad de la altura del pico del analito. Cabe destacar que los parámetros cromatográficos se calcularon para el analito de interés y el pico observado en la muestra más cercano al acetato de vitamina E.

2.2.3. Intervalo de trabajo.

Con la disolución stock VEA_3 y el método analítico estandarizado, se preparó una curva de calibración en el intervalo de (100.0-2.0) ppm y se inyectó una sola vez cada disolución. En la **tabla 7** se muestran los datos necesarios para la construcción de la curva de calibración de (100.0-2.0) ppm.

Tabla 7. Datos para la preparación de la curva de calibración de 100.0 ppm a 2.0 ppm de VEA.

Concentración inicial (ppm)	Volumen de alícuota (mL)	Volumen de matraz (mL)	Concentración (ppm)
332	0.605	2.0	100.43
	0.485		80.51
	0.365		60.59
	0.245		40.67
	0.125		20.75
	0.030		4.98
	0.018		2.99
	0.012		1.99

Con las áreas obtenidas, se graficó el número de iones en función de la concentración en ppm y un segundo gráfico de absorbancia en función de la concentración en ppm. Adicionalmente, se determinó la relación señal/ruido (S/R) del punto de 2.0 ppm haciendo uso del software MassHunter®.

Una vez analizados los resultados, se preparó otra curva de calibración en el intervalo de (100.0-1.0) ppm y se inyectó por triplicado cada preparación, la concentración de 1.0 ppm de VEA se preparó tomando 0.006 mL de la disolución stock VEA₃, se entregaron en un matraz de 2.0 mL y se llevaron a la marca de aforo con metanol. El resto de las disoluciones se prepararon como ya se indicó en la **tabla 7**. Para esta segunda curva sólo se graficó los valores de absorbancia en función de la concentración en ppm y, se realizó una regresión lineal de la misma.

2.3. Validación del método analítico.

2.3.1. Preparación de muestra.

Previo a la validación, se analizó una muestra comercial, en la **figura 9** se esquematiza la preparación de muestra. Es importante mencionar que todas las muestras comerciales analizadas siguieron el mismo proceso de preparación de muestra.

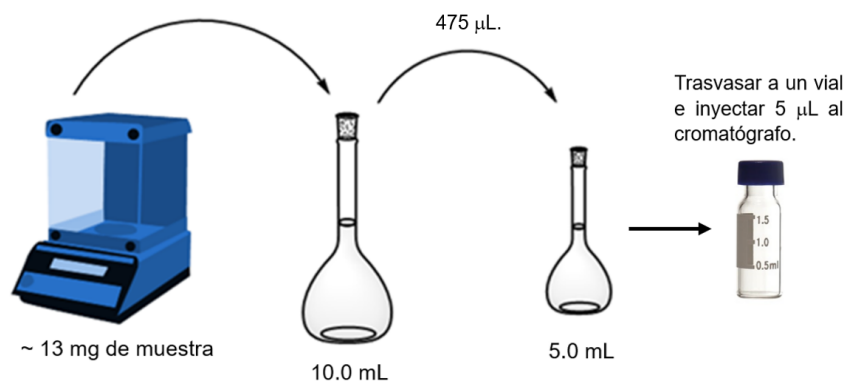


Figura 9. Preparación de muestra para cartucho con cigarrillo electrónico.

2.3.2. Parámetros de desempeño.

a) Selectividad.

Se prepararon 5 disoluciones para cumplir con el parámetro de selectividad:

- **Blanco de disolvente:** se trasvasó en un vial para cromatografía ~1 mL de metanol grado *HPLC-MS* y se inyectó al cromatógrafo.
- **Blanco de proceso:** se pesaron 10.2 mg de placebo en un matraz de 10.0 mL y se llevó a la marca de aforo con metanol. Se tomó una alícuota de 475 µL, se entregó a un matraz de 5.0 mL, se llevó a la marca de aforo con metanol y se inyectó al cromatógrafo.
- **Placebo fortificado a 40 ppm:** se pesaron 15.3 mg de placebo en un matraz de 10.0 mL, se fortificó con 475 µL de la disolución de *VEA₉* y se llevó a la marca de aforo con metanol. Se tomó una alícuota de 475 µL, se entregó a un matraz de 5.0 mL, se llevó a la marca de aforo con metanol y se inyectó al cromatógrafo.
- **Muestra:** se pesaron 13.2 mg de muestra, se trasvasaron a un matraz volumétrico de 10.0 mL y se llevó a la marca de aforo con metanol. Se tomó una alícuota de 475 µL y se entregó a un matraz de 5.0 mL, se llevó a la marca de aforo con metanol y se inyectó al cromatógrafo.
- **Muestra fortificada a 40 ppm:** se pesaron 13.7 mg de muestra K en un matraz de 10.0 mL, se fortificó con 475 µL de la disolución de *VEA₉* y llevó a la marca de aforo

con metanol. Se tomó una alícuota de 475 μL , se entregó a un matraz de 5.0 mL, se llevó a la marca de aforo con metanol y se inyectó al cromatógrafo.

b) Repetibilidad del sistema.

Se inyectó por sextuplicado a nivel central de la curva de calibración, una misma disolución de 40.69 ppm de VEA, y se determinó el porcentaje del coeficiente de variación (% CV) de la respuesta del instrumento.

$$\% CV = \frac{\text{Desviación estándar muestral}}{\text{Promedio}} \times 100 \quad (6)$$

c) Linealidad.

Se realizó inyectando por triplicado cada disolución preparada en el intervalo de 100.0 ppm a 1.0 ppm. Se realizó el gráfico de área en función de la concentración, de esta curva, se realizó el análisis de datos de la regresión lineal por mínimos cuadrados, obteniendo la ecuación de la recta y las estadísticas de la regresión con ayuda de Excel®.

Se realizó una prueba de hipótesis para comprobar la significancia de la regresión, donde se plantean las siguientes hipótesis:

$$H_0: r = 0, \quad \text{la correlación no es significativa}$$

$$H_a: r \neq 0, \quad \text{la correlación es significativa}$$

Como estadístico de prueba se usó el estadístico t (t de *Student*). Se utilizó el siguiente criterio de aceptación: si t_{exp} es mayor que t_{crit} , se rechaza H_0 , de lo contrario, se acepta H_0 .

Para calcular la t_{exp} de la regresión, se hizo uso de la siguiente ecuación:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (7)$$

donde r es el coeficiente de correlación, r^2 es el coeficiente de determinación y n es el número de observaciones (puntos totales de la curva de calibración). Para el cálculo de

t_{crit} se utilizó la siguiente función en Excel®: “INV.T.2C(0.05,22)”, donde “0.05” es el nivel de confianza y “22” son los grados de libertad (n-2).

Además, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para la regresión, con ayuda de Excel®, para comprobar la significancia de la regresión, las hipótesis planteadas fueron las siguientes:

$$H_0: \beta_1 = 0, \quad \text{la regresión no es significativa}$$

$$H_a: \beta_1 \neq 0, \quad \text{la regresión es significativa}$$

Donde β_1 es la pendiente de la regresión y, el estadístico de prueba fue el estadístico F (distribución F). Se utilizó el siguiente criterio de aceptación: si F_{exp} es mayor que F_{crit} , se rechaza H_0 , de lo contrario, se acepta H_0 .

d) Veracidad.

Se prepararon 6 disoluciones independientes de la siguiente forma: se pesaron ~ 12 mg de placebo y se trasvasó a un matraz de 10.0 mL, en el mismo matraz se entregaron 475 μ L disolución VEA_9 , se llevó a la marca de aforo con metanol. De esta primera disolución se tomaron 475 μ L y se entregaron a un matraz de 5.0 mL, se llevó a la marca de aforo con metanol.

Se analizaron las 6 disoluciones preparadas de manera independiente. Una vez obtenidos los resultados, se determinó la cantidad concentración recuperada y el % de recuperación con las ecuaciones 8 y 9.

$$C_{recuperada} = \frac{A_x - b}{m} \quad (8)$$

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{C_{recuperada}}{C_{adicionada}} \quad (9)$$

donde A_x es el área obtenida, b y m es la ordenada al origen y la pendiente de la ecuación obtenida en la prueba de linealidad, respectivamente. La $C_{adicionada}$ es la calculada debido a los factores de dilución, siendo 42.74 ppm de VEA . Además, se calculó el intervalo de confianza (IC) del porcentaje de recuperación de los resultados con la siguiente ecuación:

$$IC = \bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{n}} \quad (11)$$

Donde \bar{x} es el promedio del recobro ($C_{recuperada}$), t es el valor de t de *Student* al 95 % de confianza y 5 grados de libertad, s es la desviación estándar muestral y n es el número de datos. El signo positivo se usa para calcular el Intervalo de Confianza Superior (ICS) y, el negativo para el Intervalo de Confianza Inferior (ICI).

➤ **Linealidad del método.**

Una vez analizados los resultados de la prueba de veracidad, se preparó otra curva de calibración, colocando diferentes cantidades de acetato de vitamina E a una cantidad constante de placebo, de tal forma que se obtienen diferentes concentraciones para cada punto de la curva, teniendo una cantidad total de 24 disoluciones (3 por cada punto de la curva).

La cantidad de placebo pesado fue de aproximadamente 12 mg, los cuales se trasvasaron a un matraz de 10.0 mL, en el mismo matraz se entregó un volumen de alícuota de VEA₁₂, dependiendo del punto de la curva, y se llevó a la marca de aforo con metanol. De esta primera disolución se tomaron 475 μ L, se entregaron a un matraz de 5.0 mL y se llevó a la marca de aforo con metanol. En la **tabla 8** se muestra los datos necesarios para preparar las disoluciones correspondientes.

Tabla 8. Datos para construir la curva de calibración de la prueba de linealidad del método.

Concentración inicial (ppm)	Volumen de alícuota 1 (mL)	Volumen de matraz 1 (mL)	Volumen de alícuota 2 (mL)	Volumen de matraz 2 (mL)	Concentración de trabajo (ppm)
12394	0.850	10.0	0.475	5.0	100.08
					100.08
					100.08
	0.680				80.06
					80.06
					80.06
	0.510				60.05
					60.05
					60.05
	0.340				40.03
					40.03
					40.03
	0.170				20.02
					20.02
					20.02
	0.043				5.06
5.06					
5.06					
0.026	3.06				
	3.06				
	3.06				
0.009	1.06				
	1.06				
	1.06				

Con los resultados se trazó la curva de calibración, graficando área en función de la concentración, y se realizó su respectiva regresión, los resultados estadísticos fueron obtenidos a través de Excel® (análisis de varianza y residuales de la regresión, de la misma forma que en el **inciso c**).

A esta curva de calibración en la que se adiciona analito a la disolución placebo, se le conoce como linealidad del método. Adicional a los estadísticos mencionados, se realizó la prueba de Durbin-Watson con el complemento de Excel®: *Real Statistics*.

Además, se calculó el intervalo de confianza (IC) del porcentaje de recuperación en todo el intervalo de trabajo de acuerdo con la ecuación 11, al igual que en veracidad.

Para conocer si se presenta un efecto matriz, se realizó una comparación de pendientes de las curvas de calibración de linealidad y linealidad del método a través de una prueba de hipótesis t (Miller & Miller, 2002), planteando lo siguiente:

$$H_0: \hat{\beta} = \beta_0, \quad \text{no existe efecto matriz}$$

$$H_a: \hat{\beta} \neq \beta_0, \quad \text{existe efecto matriz}$$

Como estadístico de prueba se usó el estadístico t (t de *Student*), donde la t_{exp} se calcula siguiendo la ecuación 10. Donde $\hat{\beta}$ es la pendiente de la curva de linealidad o linealidad del sistema, β_0 es la pendiente de linealidad del método, n es el número de puntos de ambas curvas, SSE es la suma de cuadrados de los residuales de ambas curvas, x_i son las concentraciones de ambas curvas y \bar{x} es el promedio de las concentraciones de ambas curvas.

Se utilizaron los siguientes criterios de aceptación: si t_{exp} es mayor que t_{crit} se rechaza H_0 , de lo contrario, se acepta H_0 .

$$t_{exp} = \frac{(\hat{\beta} - \beta_0)\sqrt{n-2}}{\sqrt{\frac{SSE}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}} \quad (10)$$

➤ **Veracidad evaluada con regresión.**

Con el modelo matemático obtenido a partir del estudio de la linealidad del método, se determinó la concentración recuperada siguiendo la ecuación 8, utilizando las áreas obtenidas de la segunda curva. Una vez determinada la concentración recuperada en cada uno de los niveles de concentración, estos valores se graficaron en función de la concentración adicionada y a partir de esto se realizó una regresión con sus respectivos análisis estadísticos (análisis de varianza y residuales de la regresión), obtenidos a través de Excel®.

e) Repetibilidad del método.

A partir de los resultados obtenidos de las primeras seis disoluciones preparadas de manera independiente en la sección de veracidad (**inciso d**), se determinó el porcentaje

de recuperación interpolando las áreas con el modelo matemático obtenido de la prueba de linealidad del método. Finalmente se calculó el % CV de los recobros calculados.

f) Precisión intermedia.

Se analizaron disoluciones de placebos fortificados a punto central, que equivalen a una concentración de 40.03 ppm de VEA, preparada a partir de la disolución stock de VEA₁₂. Dichas disoluciones se prepararon por dos analistas, en dos días diferentes. Se determinó el % CV global del % de recuperación y se realizó una ANOVA de dos vías con ayuda de Excel®.

g) Límite de detección y límite de cuantificación.

Dado que el instrumento permite medir la relación señal/ruido (S/R), se realizaron disoluciones a menor concentración de 1.0 ppm de VEA, siendo 0.5 ppm, 0.6 ppm, 0.8 ppm y 0.88 ppm y se determinaron su S/R con ayuda del software MassHunter®. En la **tabla 9** se muestra la manera en que se prepararon dichas disoluciones.

Tabla 9. Disoluciones de VEA para determinar los límites de cuantificación y detección.

Concentración inicial (ppm)	Volumen de alícuota (mL)	Volumen de matraz (mL)	Concentración (ppm)
332	0.0075	5.0	0.50
	0.0090		0.60
	0.0120		0.80
	0.0133		0.88

2.4. Cuantificación de acetato de vitamina E en muestras comerciales.

Se determinó la cantidad de acetato de vitamina E de cuatro muestras comerciales de cartuchos de cigarrillo electrónico, dos de tipo regular (saborizantes con o sin nicotina) y dos que contienen presuntamente THC.

CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Desarrollo del método analítico.

3.1.1. Condiciones de separación y detección.

Para conocer el espectro de masas y establecer las condiciones de ionización del analito, se realizó un análisis por espectrometría de masas, obteniendo el espectro de masas mostrado en la **figura 10**. De esta forma se puede identificar al analito entre los diferentes componentes de la muestra.

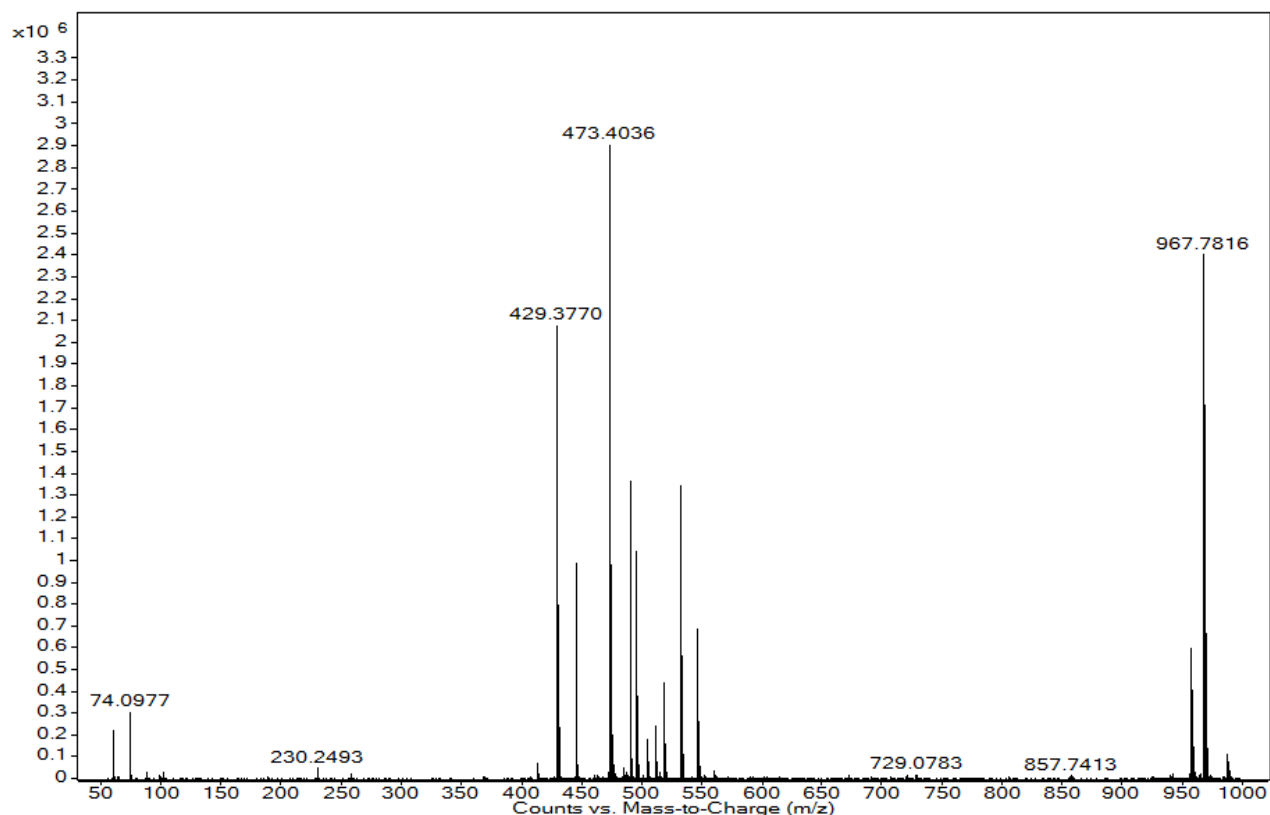


Figura 10. Espectro de masas del estándar de acetato de vitamina E.

En él podemos observar diferentes picos característicos, la masa molar del analito es 472.76 g/mol [M], los picos más representativos del espectro de masas son: $[M+H]^+ = 473.40 m/z$, $[M+H_2O] = 490.43 m/z$, $[2M+Na]^+ = 967.78 m/z$. Al tratarse de una ionización por electrospray, es normal encontrar picos en su gran mayoría con masas mayores que

la masa molar del compuesto de interés, ya que la particularidad de la ionización por *ESI*, es formar iones a través de aductos.

Una vez conocido el espectro de masas, que ayuda a identificar al analito a lo largo del cromatograma, se procedió a desarrollar el método cromatográfico. El método desarrollado toma como base el trabajo de Puetz, Espinosa, *et al.* (2021), arrojando los resultados presentes en la **figura 11** cuando se inyectó una disolución de 100.0 ppm de *VEA*. Para todos los experimentos presentados en esta sección se inyectó una disolución de 100.0 ppm de *VEA*.

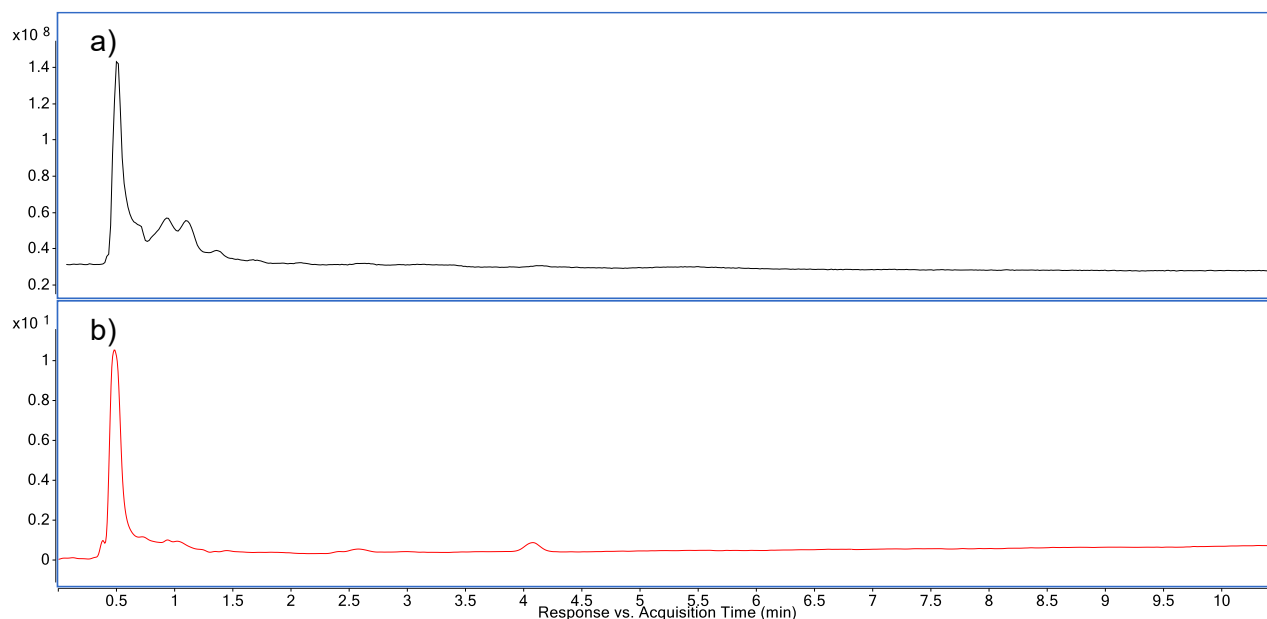


Figura 11. Cromatogramas de 100.0 ppm de *VEA* con a) detector de masas y, b) detector UV con las primeras condiciones de separación.

Gracias a que se tiene el espectro de masas del analito, podemos afirmar que los picos que se observan en la **figura 11** no representan al acetato de vitamina E, dado que no corresponden al espectro de masas del analito. Lo anterior nos indica que el analito se encuentra muy retenido en la columna, la fase móvil no tiene la capacidad de eluir al analito en un tiempo de retención deseado, menor a 10 minutos; por lo que es necesario aumentar la fuerza de elución, disminuyendo la polaridad de la fase móvil.

Debido a lo anterior, se realizó un análisis aumentando la fuerza de elución de la fase móvil, como ya se mencionó, disminuyendo su polaridad, es decir, disminuyendo la cantidad de agua, por lo que la fase móvil se modificó a una proporción de MeOH: 95 % y H₂O al 5 % acidulada con ácido fórmico al 0.1 %, el cromatograma obtenido se muestra en la **figura 12**.

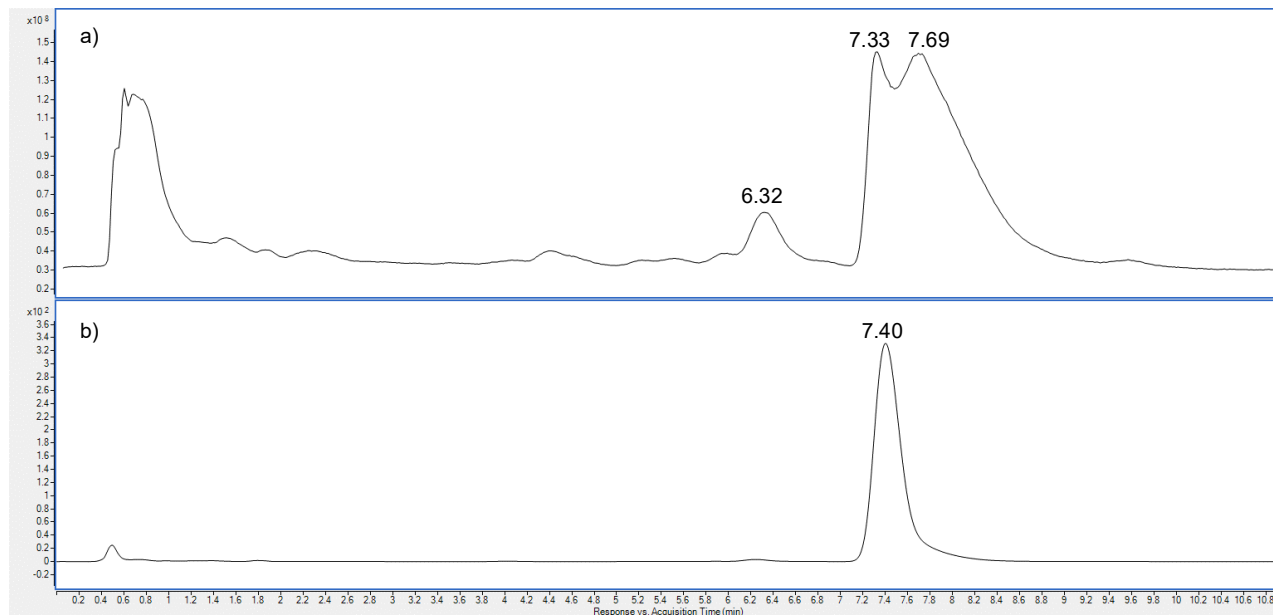


Figura 12. a) cromatograma de número de iones en función del tiempo y, b) cromatograma de absorbancia en función del tiempo, de 100.0 ppm de VEA.

En la **figura 12b** podemos observar un compuesto en un tiempo de retención de 7.40 minutos, y por el detector másico podemos afirmar que se trata del acetato de vitamina E, por lo que dicha composición de fase móvil tiene la suficiente fuerza elutrópica para eluir al analito del sistema cromatográfico, posteriormente, se definió el volumen de inyección para disminuir el doblete presente en el detector de masas, debido a un efecto de concentración. La **figura 13** muestra el cromatograma con ambos detectores, inyectando 5.00 μ L de la disolución estándar.

Es importante mencionar la razón por la que el análisis se hizo en fase reversa: una de las características del compuesto es que, hablando de polaridad, está dividido en dos secciones, teniendo una parte polar correspondiente al grupo hidroxicromano, y la parte

hidrofóbica siendo la cadena alquílica lateral; debido a esta composición, es posible hacer un análisis ya sea tanto en fase normal como en fase reversa, pero es beneficioso realizar el análisis en fase reversa dado que el THC (proveniente de las muestras de *e-liquids*) es soluble en disolventes polares, como lo es la fase móvil; por otro lado, la columna C18 se seleccionó dado que es posible que la parte alquílica del analito interaccione con los grupos octadecilsilano, favoreciendo la separación entre el analito y el THC.

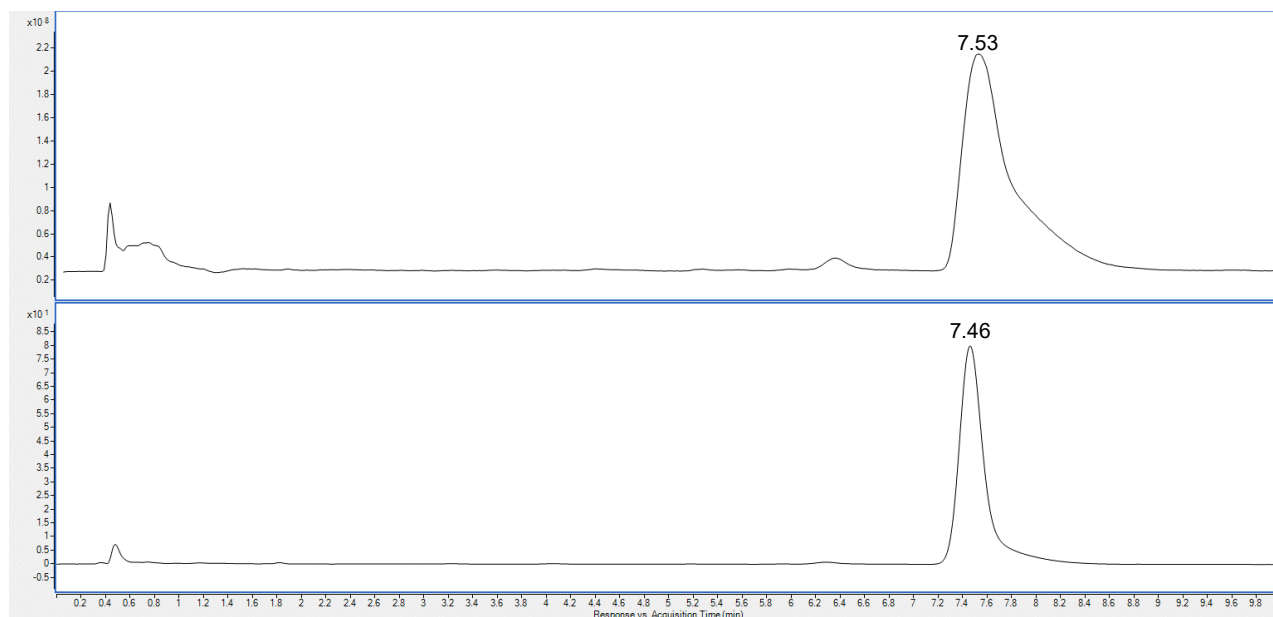


Figura 13. a) cromatograma de número iones en función del tiempo y, en la parte inferior absorbancia en función del tiempo, de 100.0 ppm de VEA, inyectando 5.00 μ L.

Una vez que el volumen de inyección se definió en 5.0 μ L, se realizó un último análisis para definir la longitud de onda de absorbancia que se utilizará a lo largo de la validación, como se muestra en la **figura 14**, se obtuvieron los cromatogramas a 278 nm y 284 nm. Estas longitudes de onda fueron seleccionadas debido a que en el espectro UV del analito, ambas presentan una mayor absorbancia, y para discernir entre una u otra, se prueban en un mismo experimento.

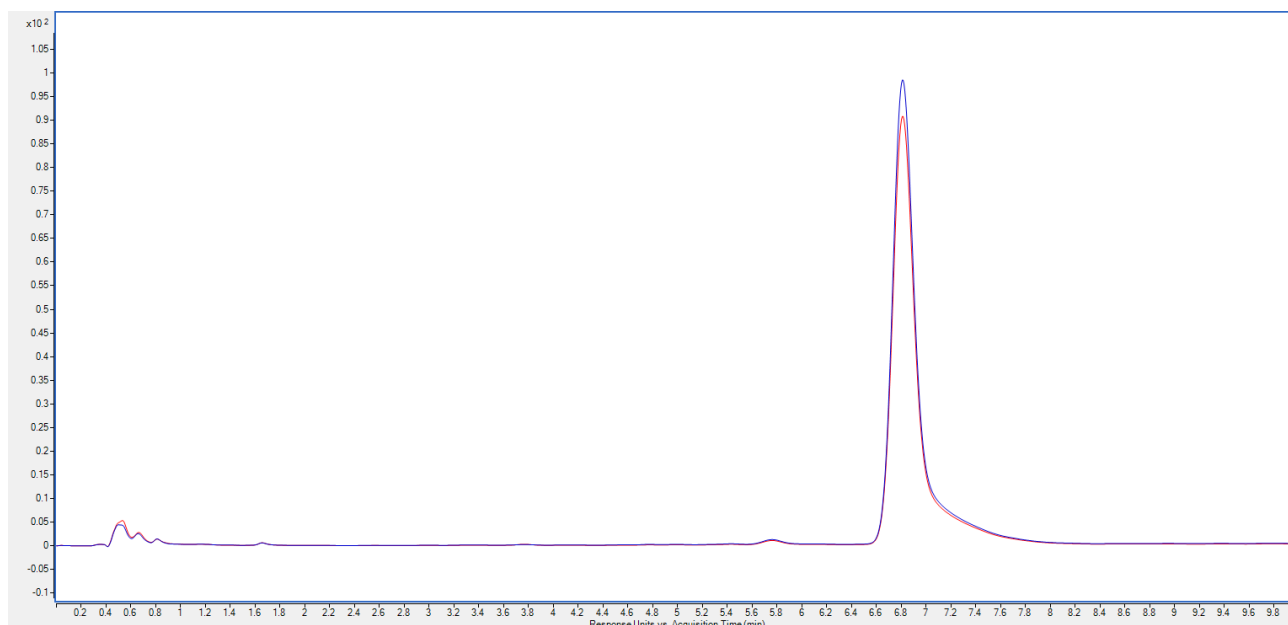


Figura 14. Cromatograma de absorbancia en función de tiempo de 100.0 ppm de VEA, a dos longitudes de onda: 278 nm (rojo) y 284 nm (azul).

Como se aprecia en la **figura 14**, a 284 nm el analito tiene una respuesta mayor con respecto a 278 nm, por lo que 284 nm será la longitud de onda de trabajo, el seleccionar longitud de onda con máxima respuesta, permite obtener límites de detección más pequeños.

3.1.2. Parámetros cromatográficos.

Para el cálculo de los parámetros cromatográficos, se determinó el tiempo muerto con una disolución 100.0 ppm de KNO_3 . Se seleccionó el nitrato de potasio para medir el tiempo muerto, en la **figura 15** se muestra el espectro UV del nitrato de potasio en agua bidestilada, a dos diferentes concentraciones. El cromatograma del tiempo muerto se muestra en la **figura 16**. El tiempo muerto (t_0) para el sistema cromatográfico fue de 0.5 min.

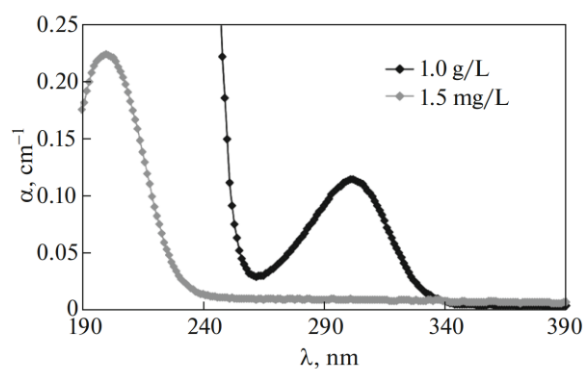


Figura 15. Espectro UV del nitrato de potasio. Tomada de Aluker *et al.* (2019).

Como se observa en la **figura 15**, el nitrato de potasio absorbe alrededor de la longitud de onda de trabajo (284 nm); al ser un compuesto iónico, no interacciona con la columna, siendo el primero en eluir, además de ser detectado por el detector UV, cumpliendo con los requisitos para ser utilizado para medir el tiempo muerto del sistema cromatográfico.

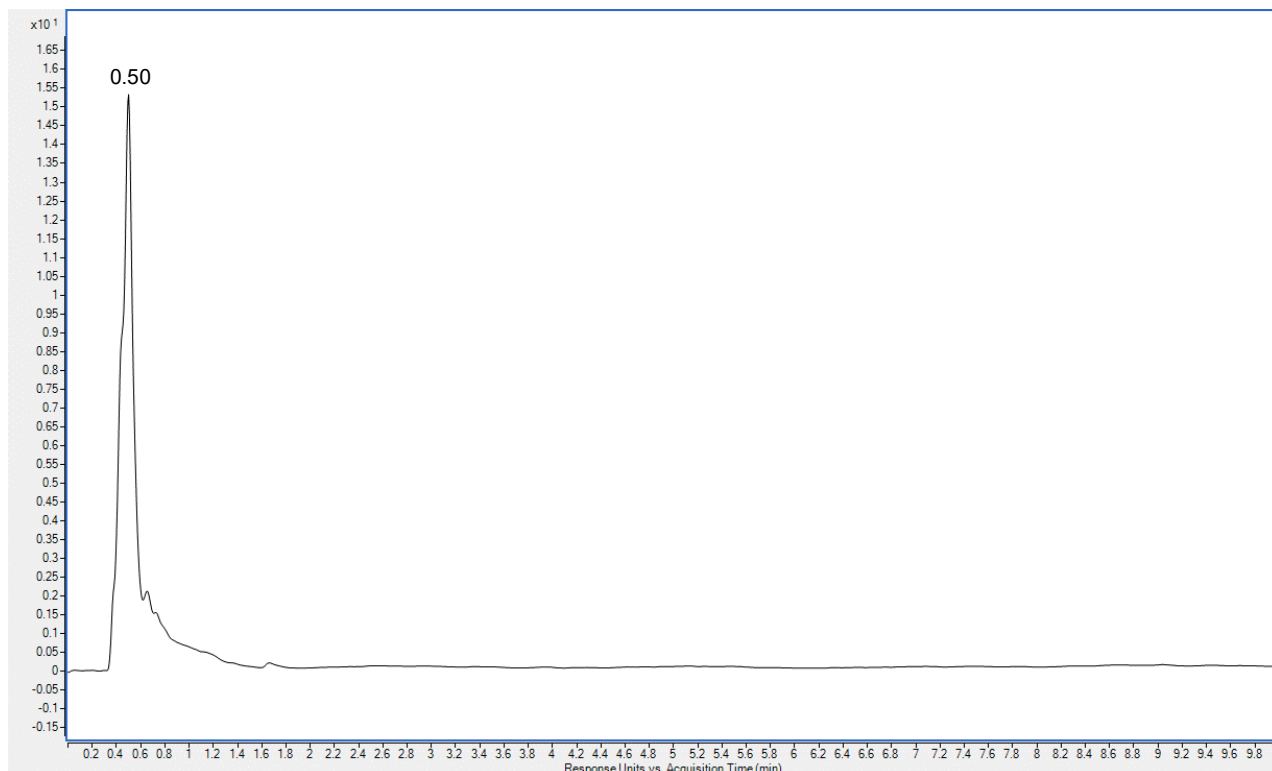


Figura 16. Cromatograma de absorbancia en función del tiempo para una disolución 100.0 ppm de KNO₃.

Es importante tener separados e identificados los componentes de la muestra del analito; por lo anterior, los parámetros cromatográficos se determinaron a partir del análisis de una muestra comercial, en la **figura 17** se observa el cromatograma de la muestra identificada con la letra K.

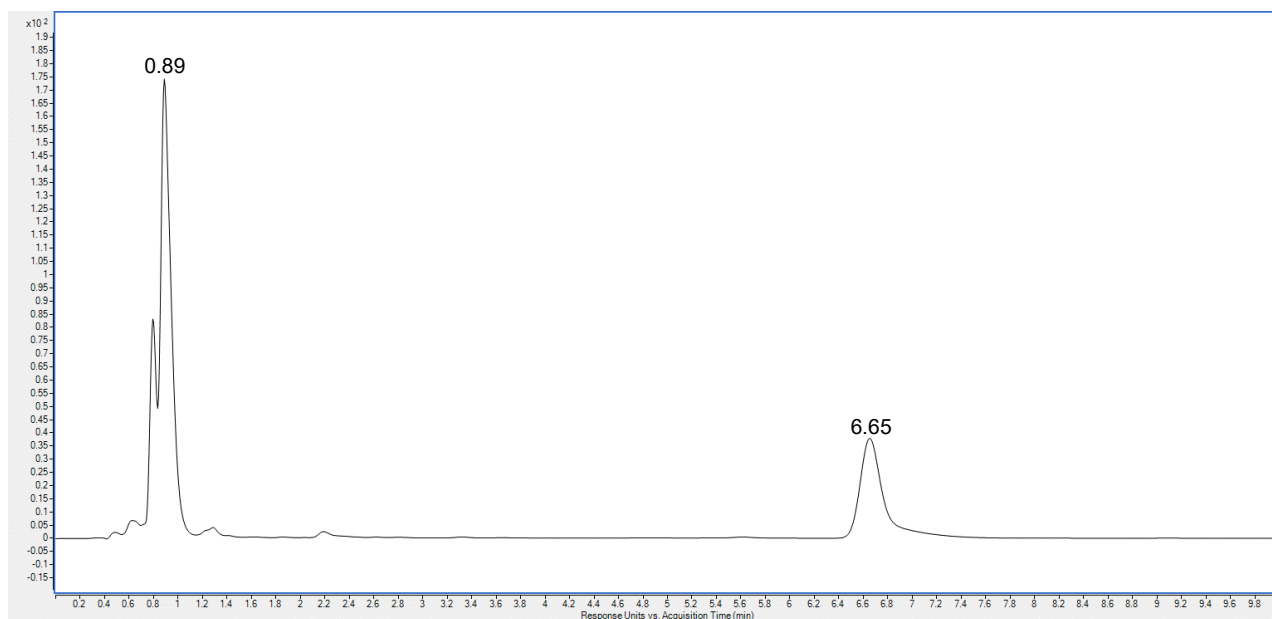


Figura 17. Cromatograma de absorbancia en función del tiempo, de la muestra K.

A continuación, se muestran los cálculos para los parámetros cromatográficos.

- **Factor de retención.** Teniendo que $t_0 = 0.5 \text{ min}$ y que el tiempo de retención del analito es de 6.65 min (t_R) se obtuvo lo siguiente:

$$k' = \frac{6.65 \text{ min} - 0.50 \text{ min}}{0.50 \text{ min}} = 12.31$$

- **Selectividad.** Teniendo el tiempo de retención del analito 2 de 6.65 min (t_{R_2}) y que el tiempo de retención del analito 1 es de 0.887 min (t_{R_1}) se obtuvo lo siguiente:

$$\alpha = \frac{6.65 \text{ min} - 0.50 \text{ min}}{0.89 \text{ min} - 0.50 \text{ min}} = 15.90$$

- **Resolución.** Dado que el pico 1 no está resuelto, se utilizó el ancho a la base a la mitad de la altura ($w_{\frac{1}{2}}$), igual a 0.092 min , para calcular w_{b_1} :

$$w_{b_1} = \frac{4(0.092 \text{ min})}{2.355} = 0.156 \text{ min}$$

Teniendo $w_{b_1} = 0.156 \text{ min}$ y $w_{b_2} = 0.820 \text{ min}$, se obtuvo lo siguiente:

$$R_s = \frac{2(6.65 \text{ min} - 0.89 \text{ min})}{0.156 \text{ min} + 0.820 \text{ min}} = 11.82$$

- **Eficiencia.** Teniendo que el ancho a la base a la mitad de la altura ($w_{\frac{1}{2}}$) del acetato de vitamina E es 0.179 min y su t_R es 6.653 min, se obtuvo lo siguiente:

$$N = 5.545 \left(\frac{6.65 \text{ min}}{0.179 \text{ min}} \right)^2 = 7660$$

Con los valores de estos cuatro parámetros cromatográficos, se puede afirmar que la separación del analito es correcta, ya que cumple con lo siguiente: el analito está separado de los componentes de la muestra, dado el valor alto de α , que señala que tan separado está el máximo de un pico con respecto al otro; la resolución nos indica que se distinguen perfectamente el ancho a la base de los picos mostrados, y el valor de eficiencia nos indica que la forma del pico, a pesar de esa asimetría, es aceptable, además, la columna es capaz de separar a los componentes de la muestra.

Los parámetros cromatográficos se determinaron únicamente con el cromatograma con detector UV, esta decisión se discutirá en la siguiente sección.

3.1.3. Intervalo de trabajo.

Se inyectó la curva de calibración preparada en el intervalo de 2.0 ppm a 100.0 ppm, donde se obtuvieron los resultados mostrados en la **tabla 10**.

Tabla 10. Resultados de la primera curva de calibración de 100.0 ppm a 2.0 ppm de VEA.

Concentración inicial (ppm)	Volumen de alícuota (mL)	Volumen de matraz (mL)	Concentración (ppm)	Área (No. de iones)	Área (ua)
332	0.605	2.0	100.43	7.70E+09	1358.41
	0.485		80.51	6.42E+09	1091.58
	0.365		60.59	5.71E+09	794.47
	0.245		40.67	4.57E+09	480.90
	0.125		20.75	3.16E+09	245.01
	0.030		4.98	1.29E+09	58.66
	0.018		2.99	8.95E+08	31.08
	0.012		1.99	6.07E+08	19.36

Con los resultados de la **tabla 10**, se realizaron las curvas de calibración de número de iones en función de la concentración y de absorbancia en función de la concentración (**Figura 18**).

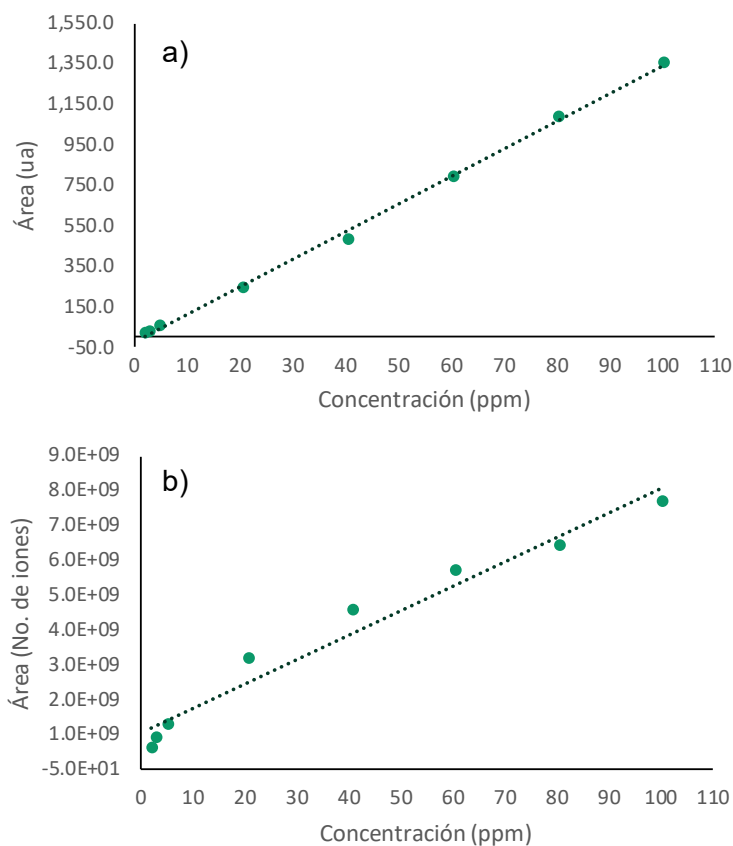


Figura 18. Curva de calibración de 100.0 ppm a 2.0 ppm de a) absorbancia en función de la concentración y b) número de iones en función de la concentración.

Como se observa en la **figura 18a**, la respuesta del analito con el detector UV da como resultado una tendencia lineal, es decir, la absorbancia es directamente proporcional a la concentración del acetato de vitamina E. No se puede afirmar lo mismo de la respuesta del analito con el detector de masas, ya que como se observa en la **figura 18b** la respuesta del instrumento, en el intervalo seleccionado, no es directamente proporcional a la concentración. Para concentraciones de 5 a 2 ppm pareciese que la respuesta del detector es lineal, lo que indica que se podría trabajar en un intervalo de bajas concentraciones.

Sin embargo, se tiene reportado que el porcentaje masa/masa de acetato de vitamina E de un *e-liquid* oscila entre 57 % y 16 % (Duffy *et al.*, 2020); por tanto un análisis a un intervalo bajo de concentraciones es innecesario. Dado lo anterior, se priorizó tener un intervalo de trabajo amplio, por la heterogeneidad en la composición del acetato de vitamina E en los *e-liquid*.

El método analítico se validó solamente con el detector UV dado que éste presenta una respuesta lineal en un intervalo más amplio, mientras que el detector de masas se utilizó como método cualitativo, dada la importancia del analito y los posibles componentes adicionales a nivel de salud pública nacional.

La relación S/R mínima para considerar un pico como señal estadísticamente distinta del ruido es de 3.3 (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A. C., S/A), por lo que se calculó la relación señal/ruido (S/R) del cromatograma de concentración 2.0 ppm, con ayuda del software MassHunter®, dando 41.9, lo cual nos dice que aún se puede tener un nivel de concentración más bajo que reemplace a 2.0 ppm, el cual fue de 1.0 ppm.

Se inyectó por triplicado cada nivel de concentración para una nueva curva de calibración de (100.0-1.0) ppm, las respuestas obtenidas se muestran en la **tabla 11**, y la curva de calibración de absorbancia en función de la concentración se muestra en la **figura 19**. Con esta experimentación se estableció el intervalo de trabajo, siendo este de 100.0 ppm a 1.0 ppm.

Tabla 11. Áreas a 284 nm de la curva de calibración de 100.0 ppm a 1.0 ppm de VEA.

Concentración (ppm)	Área ₂₈₄ (ua)
100.48	1385.65
100.48	1392.77
100.48	1388.10
80.55	1103.31
80.55	1106.15
80.55	1104.73
60.62	846.70
60.62	846.88
60.62	848.87
40.69	525.16
40.69	522.12
40.69	522.65
20.76	260.10
20.76	261.71
20.76	260.68
4.98	60.48
4.98	61.79
4.98	61.10
2.99	36.37
2.99	35.42
2.99	34.64
1.00	6.87
1.00	6.90
1.00	6.80

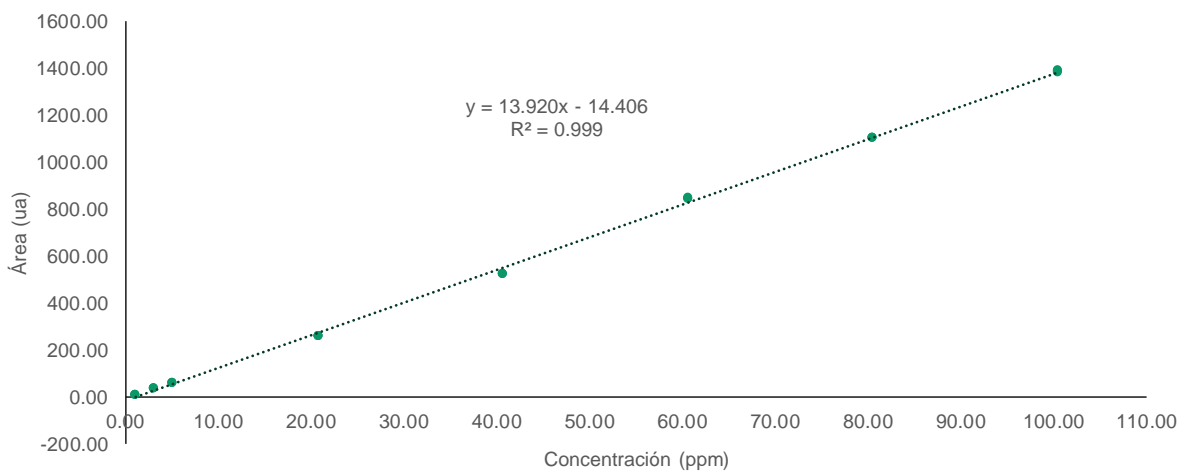


Figura 19. Curva de calibración de 100.0 ppm a 1.0 ppm de VEA.

Observando la **figura 19**, se puede decir que los datos se ajustan a un modelo lineal, en el que la respuesta del analito, por el detector UV, es directamente proporcional a la concentración. Además, se puede hablar de la calidad del ajuste de la regresión lineal, con el valor del coeficiente de determinación (r^2), se puede decir que el 99.9% de la variabilidad del el área (ua) es explicada por el modelo.

Con los resultados de esta sección se puede decir que se cuenta con un método analítico estandarizado, ya que se obtienen las condiciones experimentales particulares necesarias para detectar y cuantificar el analito de interés en la muestra.

3.2. Validación del método analítico.

3.2.1. Preparación de muestra.

La preparación de la muestra se definió a lo largo de la experimentación, en un principio, se planteó pesar 50 mg de muestra y trasvasarlos a un matraz de 2.0 mL, debido a que en el trabajo de Kosarac *et al.* (2021) se realizó de esta forma, además de se planteó realizar una preparación de muestra más selectiva para no aumentar la variabilidad de ésta. Por otro lado, la primera preparación de muestra fue complicada de realizar dado que la muestra era difícil de extraer del recipiente comercial, tanto por su alta viscosidad como por la baja accesibilidad que se tiene de esta. El cartucho del líquido de relleno es demasiado angosto como para que se obtuviera una gran cantidad; por tanto, se optó por definir la masa de la muestra como 13 mg, ya que es la mínima cantidad que puede pesarse con exactitud y veracidad en un balanza analítica con resolución de 0.0001 g.

Otro factor que contribuyó a realizar la preparación de muestra con una doble dilución fue que la muestra tiene un contenido muy alto de acetato de vitamina E, esto fue determinado en una primera aproximación, inyectando una disolución de muestra K como se menciona en el párrafo anterior (~50 mg en 2.0 mL), obteniendo un área mostrada en la **figura 20**.

El área obtenida no se encuentra en el intervalo de trabajo de la curva de calibración (100.0 ppm a 1.0 ppm), esto provoca que la determinación de la concentración, obtenida por una extrapolación, carezca de precisión. Como dato informativo, se calculó la concentración por una extrapolación, donde se obtuvo una concentración aproximada de 4000 ppm de

VEA. Por otra parte, es importante mencionar que el pico cromatográfico adopta esa forma debido a la alta concentración de analito, por lo que satura ambos detectores.

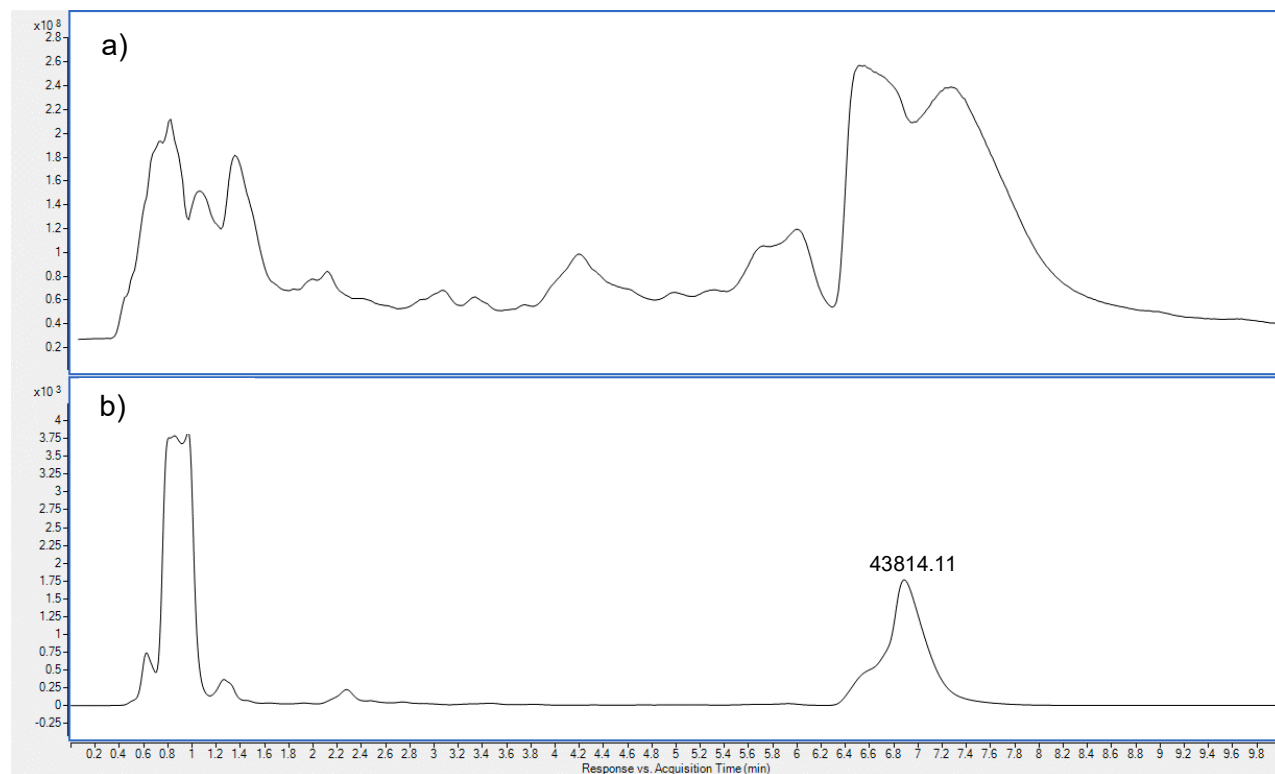


Figura 20. Cromatograma de a) detector másico y b) detector UV, de la disolución muestra realizada con la primera preparación de muestra.

Por último, para que la concentración de VEA en la muestra esté cercana al centro de la curva de calibración, se definieron las diluciones presentadas con anterioridad. La cantidad cuantificada de acetato de vitamina E en la muestra K se presenta en la **sección 3.4**.

3.2.2. Parámetros de desempeño.

Una vez con el método analítico estandarizado y el intervalo de trabajo definido, se procedió a evaluar los parámetros de desempeño para validar dicho método.

a) Selectividad.

Para demostrar que el método analítico es selectivo, fue necesario analizar una serie de blancos, empezando por el blanco de disolvente, cuyo cromatograma es mostrado en la **figura 21**.

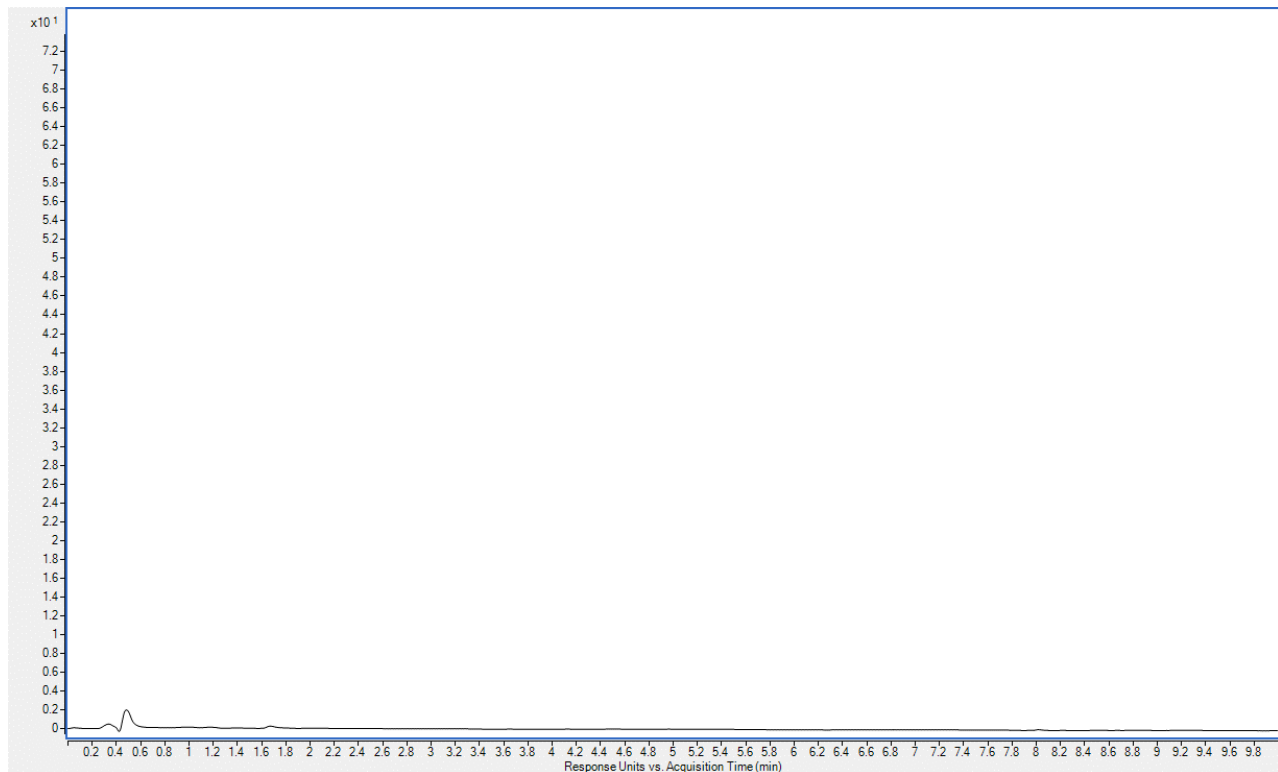


Figura 21. Cromatograma del blanco de disolvente.

El cromatograma anterior sirve para visualizar el estado en el que se encuentra el sistema de cromatográfico y para corroborar que el disolvente utilizado (metanol) no afecte a la detección. Ya que no se observa ninguna señal en el tiempo de retención de interés, se puede afirmar que el disolvente no afecta a la separación ni detección del analito, además que muestra que el sistema se encuentra libre de interferentes. Como segunda evidencia, se necesita el cromatograma del blanco de proceso, mostrado en la **figura 22**.



Figura 22. Cromatograma de blanco de proceso.

El blanco de proceso se prepara con una disolución de placebo, la disolución placebo tiene como función simular los componentes mayoritarios de la muestra, este blanco se realiza siguiendo la preparación de la muestra; por tanto, este cromatograma muestra que los componentes de la muestra no afectan a la detección ni la separación del analito, teniendo solo la señal del frente de disolvente. Con esto queda demostrado que los componentes mayoritarios de la muestra no afectan a la detección del acetato de vitamina E.

Posteriormente, fue necesario fortificar una disolución placebo para conocer si estos componentes del placebo afectan en la separación y detección del analito de interés, en la **figura 23** se muestra un cromatograma de la disolución de placebo fortificado con una concentración adicionada de 40.0 ppm de VEA. Además, se muestra en la **figura 24** un cromatograma de disolución estándar de VEA a 40.0 ppm como referencia para los comparativos realizados.

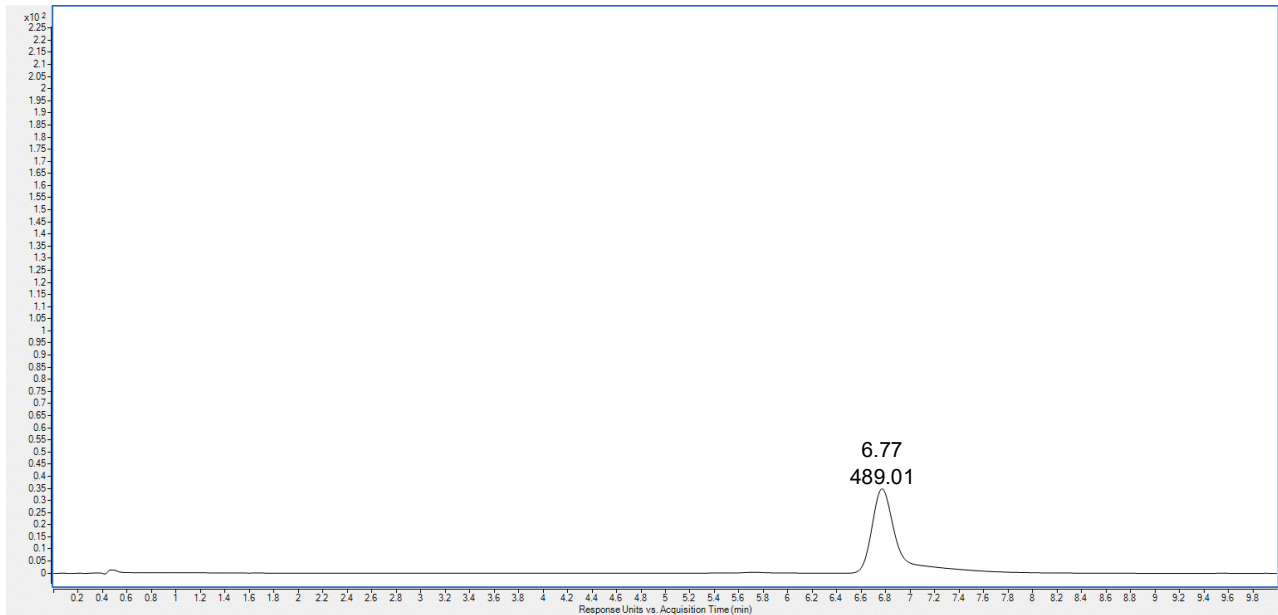


Figura 23. Cromatograma de placebo fortificado a 40.0 ppm de VEA.

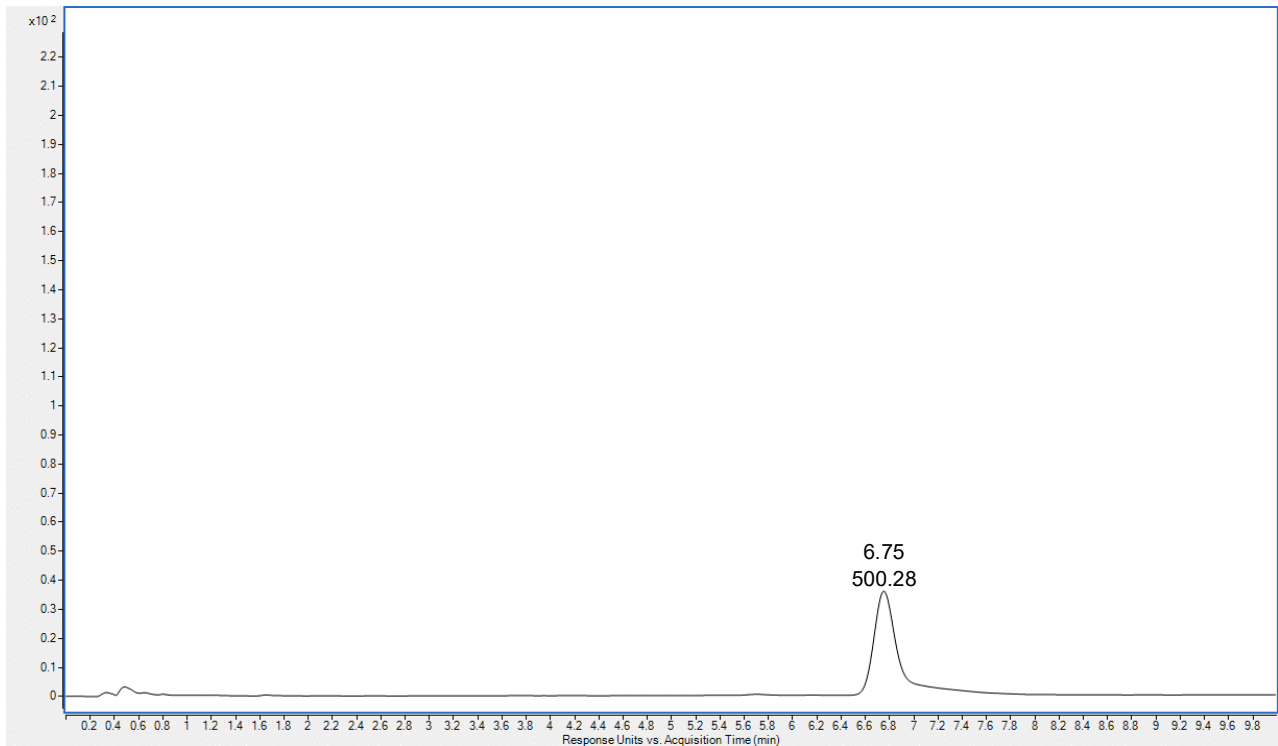


Figura 24. Cromatograma de disolución estándar de VEA a 40.0 ppm.

La similitud entre los tiempos de retención y las áreas del analito en las disoluciones de placebo fortificado y estándar a 40.0 ppm, nos permite decir que los componentes del

placebo no afectan a la detección y separación del analito. Una vez que se definió lo anterior, para poder evaluar la selectividad de manera completa, fue necesario realizar el análisis de una muestra comercial y otra inyección de la misma muestra comercial adicionada con el acetato de vitamina E a la misma concentración que el placebo, en la **figura 25 y 26** se muestra el cromatograma de la muestra y de la muestra fortificada a 40.0 ppm, respectivamente.

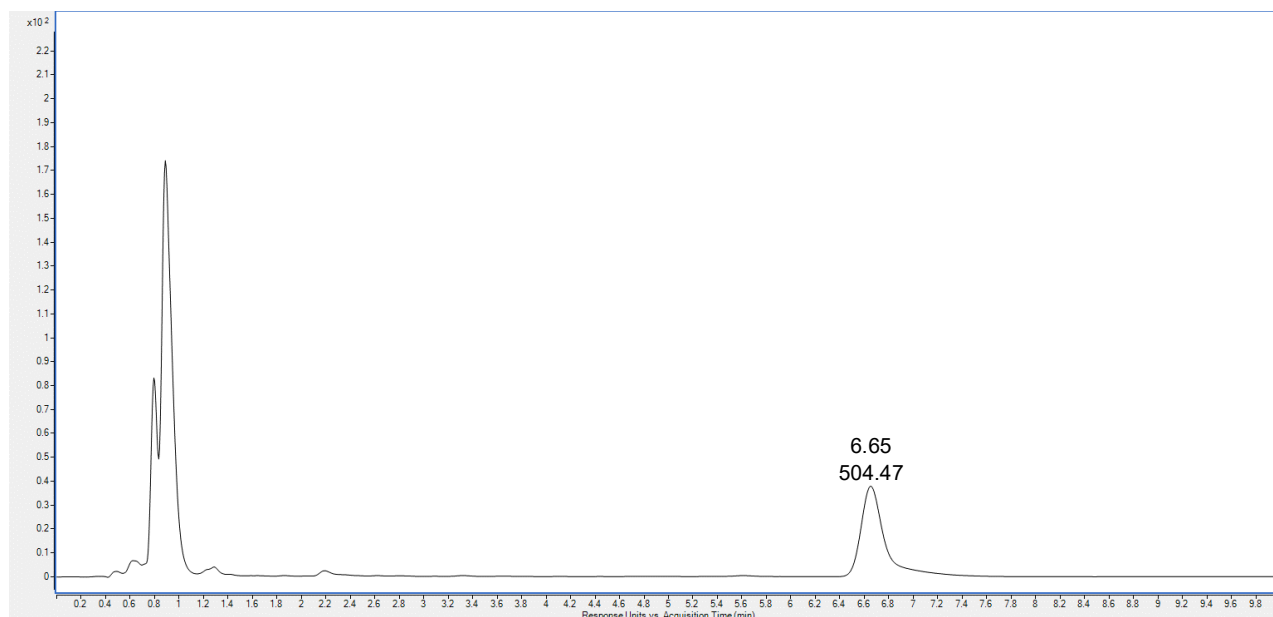


Figura 25. Cromatograma de muestra de *e-liquid* con THC.

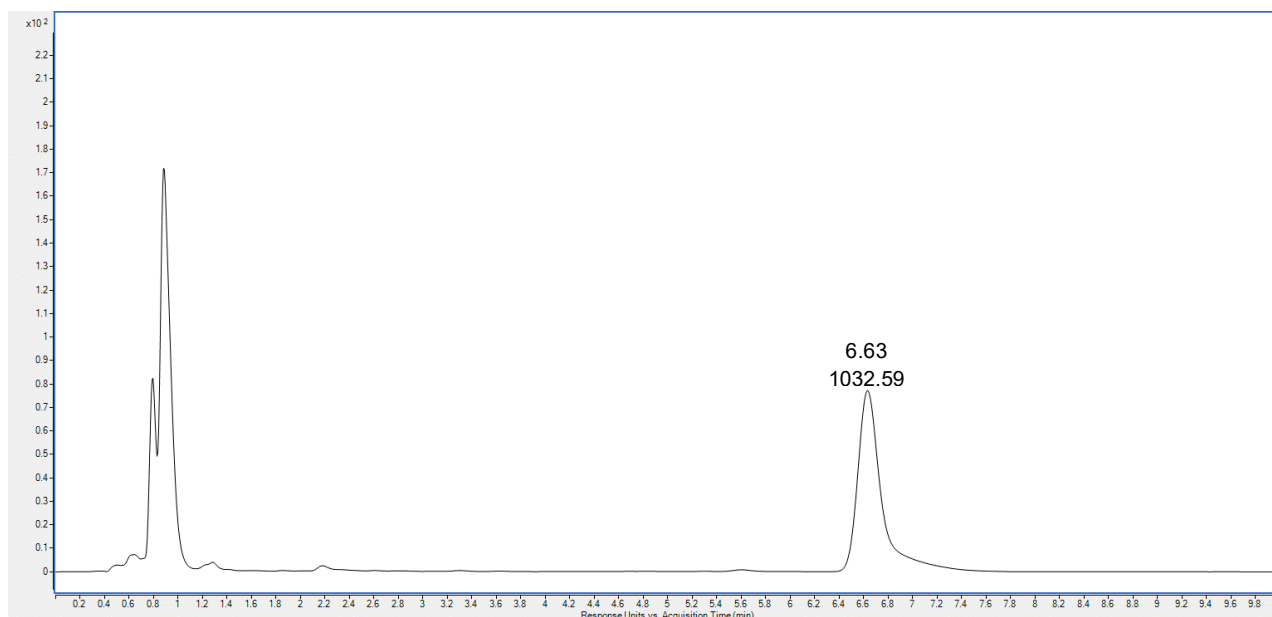


Figura 26. Cromatograma de muestra de *e-liquid* THC fortificada con 40.0 ppm de VEA.

Para las últimas dos figuras, el área de la muestra fortificada aumenta al doble aproximadamente, con respecto a la muestra sin fortificar. Además, los componentes de la muestra no interfieren en la detección ni en la separación del analito de interés. Con esta evidencia se concluye que el método es selectivo, diferenciando al analito de los componentes de la muestra y que la respuesta obtenida está libre de interferencias.

b) Repetibilidad del sistema.

En la **tabla 12** se muestran los resultados de la prueba de repetibilidad del sistema.

Tabla 12. Resultados en área y % CV de la prueba de repetibilidad del sistema.

Concentración inicial (ppm)	Volumen de alícuota (mL)	Volumen de matraz (mL)	Concentración teórica (ppm)	Concentración de trabajo (ppm)	Área ₂₈₄ (ua)	%CV
332	0.245	2.0	40	40.69	460.43	0.48
			40	40.69	461.49	
			40	40.69	457.66	
			40	40.69	455.85	
			40	40.69	460.87	
			40	40.69	460.68	

Como se observa, la variación de la respuesta (área) que se obtiene cumple con el criterio de aceptación, siendo $\% CV < 2 \%$. Dado el valor del porcentaje de coeficiente de variación, se puede afirmar que el sistema cromatográfico brinda una respuesta repetible.

c) Linealidad.

La linealidad puede ser evaluada a nivel sistema, haciendo uso de disoluciones estándar del analito o analitos de interés disueltos en un disolvente de alta pureza; ésta evalúa que el modelo matemático obtenido, a partir del análisis de estas disoluciones en el sistema cromatográfico, este libre de variabilidad sistemática y que toda variabilidad presente sea de tipo aleatoria. Aunado a esto, la regresión que se realiza es una regresión tipo I, donde se hace el supuesto de que la variabilidad de las disoluciones estándar (eje X) se desprecia frente a la variabilidad de la respuesta fisicoquímica que brinda el sistema cromatográfico (eje Y). Con esta prueba se comprobó que el intervalo de trabajo está libre de variabilidad sistemática.

Con el intervalo de trabajo y la curva de calibración ya definido en la sección **3.1.3.**, se obtuvieron los siguientes resultados del análisis de varianza de la regresión y la correlación, mostrados en la **tabla 13**, además se muestra en la **figura 27** el gráfico de residuales de la curva de calibración. Se obtuvo el coeficiente de correlación y determinación, con el cual se realizó una prueba de hipótesis, con el fin de demostrar la significancia de la correlación, para esto se calculó la t_{exp} y la t_{crit} , obteniendo lo siguiente: $t_{exp} = 168.1556$ y $t_{crit} = 2.0739$.

Tabla 13. Resumen de los resultados de la ANOVA de una vía de la regresión.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	
Regresión	1	5933251.18	5933251.18	28276.31	1.05E-35	
Residuos	22	4616.29	209.83			
Total	23	5937867.46				
	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción (ua)	-14.406	4.378	-3.290	0.003	-23.486	-5.326
Pendiente (ua/ppm)	13.920	0.083	168.156	1.055E-35	13.748	14.092

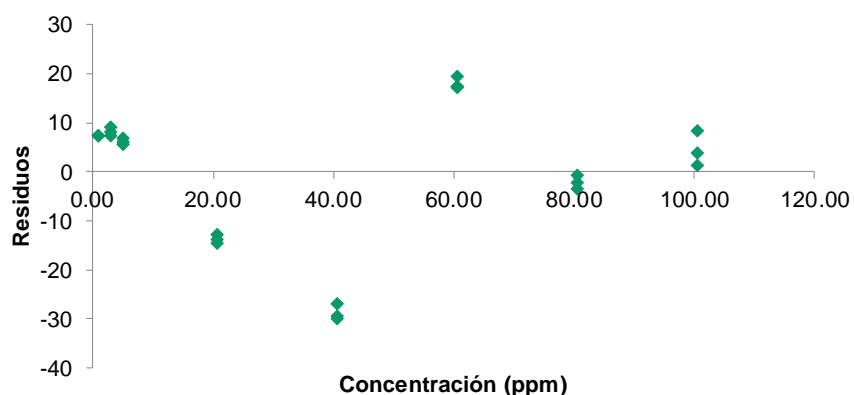


Figura 27. Gráfico de residuos de la curva de calibración.

De los resultados proporcionados anteriormente, se concluye lo siguiente:

- Para comprobar la significancia de la correlación, se tiene que $t_{exp} > t_{crit}$, se rechaza la hipótesis nula, la correlación es significativa; por tanto, el modelo matemático lineal explica los datos.
- Con la prueba F que realiza el análisis de varianza, se tiene que $F_{exp} > F_{crit}$, por tanto se rechaza la hipótesis nula, por lo que la regresión es significativa.
- El gráfico de residuos de la **figura 27** no presenta, a simple vista, tendencia alguna ni correlación entre ellos; por tanto, se puede decir que el modelo está libre de variabilidad sistemática, y lo que no explica el modelo (residuales) se atribuye a la variación aleatoria.

- Los IC de la pendiente no incluyen al cero, por lo que se puede afirmar que la respuesta del instrumento es directamente proporcional a la concentración.

Con lo anterior se demuestra que la curva de linealidad del sistema se encuentra libre de variabilidad sistemática, además que cumple con los criterios de aceptación: $r^2 \geq 0.98$, el intervalo de confianza de la pendiente no incluye al cero y no se observa tendencia alguna en el gráfico de residuales.

d) Veracidad.

La veracidad evalúa que tanto los resultados se aproximan a un valor considerado como verdadero, para este caso en particular, nos interesa que la respuesta que brinda el instrumento de una disolución con concentración conocida se acerque lo más posible a la misma concentración. Esta es determinada a través del modelo matemático de una curva de calibración. Este parámetro se evaluó a punto central, es decir, a una concentración de 40.0 ppm por sextuplicado, y utilizando el porcentaje de recuperación como el resultado del método, obteniendo los resultados presentes en la **tabla 14**.

Tabla 14. Resultados de la prueba de veracidad como porcentaje de recuperación.

Concentración inicial (ppm)	Masa de placebo (mg)	Volumen de alícuota (mL)	Volumen de matraz 1 (mL)	Volumen de matraz 2 (mL)	Concentración de trabajo (ppm)	Área ₂₈₄ (ua)	Concentración recuperada (ppm)	% de recuperación
9470	12.4	0.475	10.0	5.0	42.74	494.28	36.54	85.51
	11.8					481.37	35.62	83.34
	12.8					482.04	35.66	83.45
	13.2					475.87	35.22	82.42
	13.6					489.16	36.18	84.65
	14.2					490.78	36.29	84.92

El criterio de aceptación de la prueba es que el promedio del porcentaje de recuperación se encuentre entre (95 - 100) %. Como se observa, en ninguna de las repeticiones el % de recuperación cumple con el criterio de aceptación, por lo que existe una pérdida del analito al implementar la metodología desarrollada, dejando en evidencia que hay un efecto sistemático que no se está controlando. Por la forma en que se evalúa la veracidad se tuvo la hipótesis que la variabilidad sistemática observada era debida a un posible efecto matriz, en consecuencia, se decidió realizar la linealidad del método.

➤ **Linealidad del método.**

La linealidad del método, a diferencia de la linealidad de sistema, suma la variabilidad del sistema cromatográfico y de la preparación de la muestra. La curva de calibración de la linealidad del método se obtiene a partir de disoluciones fortificadas con el analito sobre el placebo, siguiendo la preparación de la muestra. Al realizar la experimentación, la respuesta fisicoquímica obtenida del instrumento ya incluye la variabilidad total del método, lo que se busca es que dicha variabilidad sea de naturaleza aleatoria. Esta prueba se realiza ya que la curva de linealidad del sistema no cuantifica de la manera esperada.

Se construyó la curva de calibración con los resultados de área obtenidos en función de la concentración, presentes en la **tabla 15**. Se obtuvieron los resultados estadísticos de la regresión que demuestran su validez, mostrados en la **tabla 16** y **17**, además se muestra en la **figura 28** el gráfico de residuales obtenido de la curva de calibración para la linealidad del método.

Tabla 15. Resultados de área de cada nivel para la prueba de linealidad del método.

Concentración inicial (ppm)	Volumen de alícuota 1 (mL)	Volumen de matraz 1 (mL)	Volumen de alícuota 2 (mL)	Volumen de matraz 2 (mL)	Concentración de trabajo (ppm)	Área ₂₈₄ (ua)
12394	0.850	10.0	0.475	5.0	100.08	1115.13
					100.08	1106.10
					100.08	1071.63
	0.680				80.06	878.90
					80.06	920.69
					80.06	896.01
	0.510				60.05	626.73
					60.05	651.25
					60.05	655.22
	0.340				40.03	423.65
					40.03	428.38
					40.03	427.06
	0.170				20.02	219.95
					20.02	214.06
					20.02	209.47
	0.043				5.06	55.74
					5.06	62.43
					5.06	60.35
0.026	3.06	32.79				
	3.06	37.75				
	3.06	36.44				
0.009	1.06	7.52				
	1.06	9.54				
	1.06	7.50				

Tabla 16. Resultados estadísticos de la regresión para la curva de la prueba de linealidad del método.

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación múltiple (r)	0.9996
Coeficiente de determinación (r ²)	0.9992
t _{exp}	128.3878
t _{crítica}	2.0739

Tabla 17. Resumen de los resultados de la ANOVA de una vía, de la regresión para la prueba de linealidad del método.

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>	
Regresión	1	3681540.14	3681540.14	16483.42	3.97E-33	
Residuos	22	4913.66	223.35			
Total	23	3686453.80				
	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Intercepción (ua)	-3.173	4.509	-0.704	0.489	-12.524	6.178
Pendiente (ua/ppm)	11.021	0.086	128.388	3.97E-33	10.843	11.199

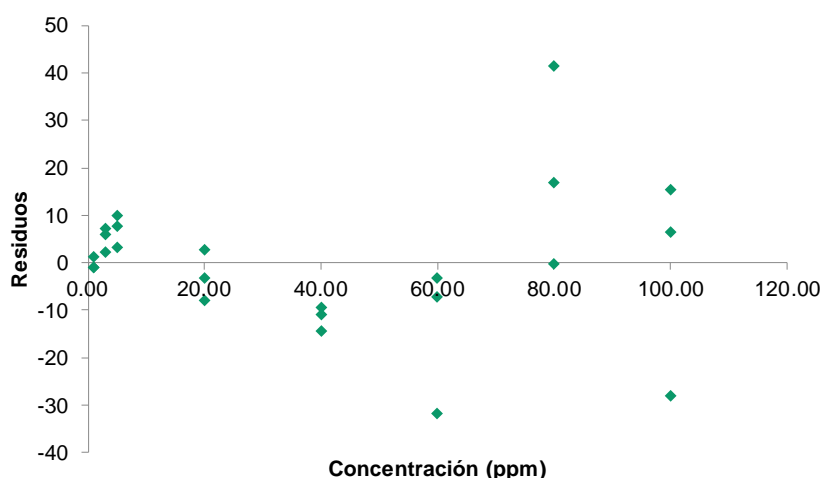


Figura 28. Gráfico de residuales de la curva de calibración para la linealidad del método.

De los resultados proporcionados anteriormente, se concluye lo siguiente:

- Para comprobar la significancia de la correlación, se tiene que $t_{exp} > t_{crit}$, se rechaza la hipótesis nula, la correlación es significativa; lo que significa que el modelo matemático lineal explica los resultados.
- Con la prueba F proveniente del análisis de varianza, se tiene que $F_{exp} > F_{crit}$; por lo que, se rechaza la hipótesis nula, se afirma que la regresión es significativa.

- El intervalo de confianza de la ordenada al origen incluye al cero; por tanto, la respuesta del instrumento en ausencia de analito es debida a variación aleatoria del método.
- El intervalo de confianza de la pendiente no incluye al cero; en consecuencia, la respuesta del instrumento es directamente proporcional a la concentración. Dado que este nuevo modelo matemático fue el empleado para cuantificar el acetato de vitamina E en las muestras comerciales, se presenta la sensibilidad analítica del método, siendo la pendiente de la curva de linealidad del método: 11.021 ua/ppm.
- El gráfico de residuales de la **figura 28** no presenta tendencia alguna; por ende, se puede decir que el modelo está libre de variabilidad sistemática. Es importante tener otra forma de corroborar este hecho, dado que dicha curva será utilizada para cuantificar; por tanto, se realizó una prueba de Durbin-Watson. Los resultados se muestran en la **tabla 18**, teniendo que el estadístico $D > 0.05$; se concluye que no existe correlación serial entre los residuos, lo que afirma de manera objetiva que el modelo lineal está libre de variación sistemática.

Tabla 18. Prueba de Durbin-Watson.

Prueba de Durbin-Watson	
Alfa	0.05
D-stat	1.6392
D-lower	1.2728
D-upper	1.4458
Significativo	No

Con lo anterior se demuestra que la curva de linealidad del método se encuentra libre de variabilidad sistemática en un intervalo de 1.0 ppm a 100.0 ppm, además que cumple con los criterios de aceptación: $r^2 \geq 0.98$, el intervalo de confianza de la pendiente no incluye al cero, el IC de la ordenada al origen incluye al cero, además de no observar tendencia en el gráfico de residuales.

Con los datos de la prueba de linealidad y linealidad del método, se realizó una prueba de contraste t, comparando las pendientes de ambas curvas de calibración (sistema y método), para comprobar la hipótesis efectuada de que la variabilidad sistemática

observada era debido a un posible efecto matriz, los resultados de la prueba de hipótesis se muestran en la **tabla 19**.

Tabla 19. Resultados de la prueba t para comprobar efecto matriz.

n	48
$\hat{\beta}$	12.829
β_0	11.021
$\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$	60931.847
SSE	9529.943
t_{exp}	30.997
t_{crit}	2.013

De esta prueba se concluye lo siguiente: $t_{exp} > t_{crit}$, se rechaza la hipótesis nula, las pendientes son estadísticamente diferentes y existe un efecto matriz significativo, esto quiere decir que la matriz de trabajo afecta a los resultados que arroja el método. Debido a esto, es fundamental que para la evaluación del resto de los parámetros de desempeño se utilice el modelo matemático obtenido del estudio de linealidad del método, incluyendo la cuantificación del acetato de vitamina E de las muestras comerciales, ya que como se demostró con la evidencia suministrada, el modelo matemático obtenido tras el estudio completo de linealidad del método está libre de efectos sistemáticos, es decir, el efecto matriz ya está considerado en los resultados y éste se encuentra controlado.

➤ **Veracidad evaluada con regresión.**

Ahora que se cuenta con un nuevo modelo matemático que en su pendiente incluye la variabilidad tanto del sistema como del método, es necesario poner a prueba el modelo matemático y comprobar si cumple con el criterio de aceptación de veracidad. Cuando se hace un estudio de linealidad del método, la veracidad se puede evaluar con una regresión donde se grafica la concentración recuperada en cada nivel de concentración en función de la concentración adicionada en los mismos niveles. A continuación, se muestran los resultados de la prueba en la **figura 29, tabla 20 y tabla 21**.

Tabla 20. Resultados de concentración adicionada, concentración recuperada y % de recuperación.

Concentración adicionada (ppm)	Área ₂₈₄ (ua)	Concentración recuperada (ppm)	% de recuperación
100.08	1115.13	101.47	101.39
100.08	1106.10	100.65	100.57
100.08	1071.63	97.52	97.45
80.06	878.90	80.03	99.96
80.06	920.69	83.83	104.70
80.06	896.01	81.59	101.90
60.05	626.73	57.15	95.18
60.05	651.25	59.38	98.89
60.05	655.22	59.74	99.49
40.03	423.65	38.73	96.74
40.03	428.38	39.16	97.82
40.03	427.06	39.04	97.52
20.02	219.95	20.24	101.15
20.02	214.06	19.71	98.48
20.02	209.47	19.29	96.39
5.06	55.74	5.35	105.58
5.06	62.43	5.95	117.57
5.06	60.35	5.76	113.84
3.06	32.79	3.26	106.59
3.06	37.75	3.71	121.30
3.06	36.44	3.59	117.41
1.06	7.52	0.97	91.56
1.06	9.54	1.15	108.86
1.06	7.50	0.97	91.39

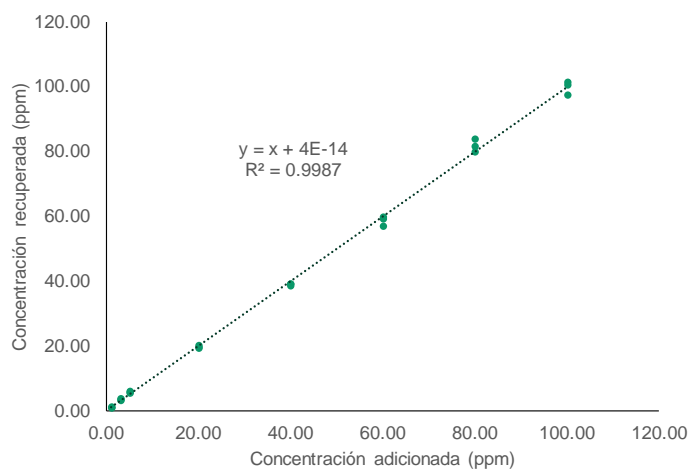


Figura 29. Regresión para la prueba de veracidad.

Retomando un poco el significado de la pendiente en una ecuación de la recta, este es un valor que indica la proporción en la que aumenta o disminuye el valor en el eje **Y** con respecto a la variable **X**. Para el caso particular de la pendiente mostrada en la ecuación de la recta en la **figura 29**, su valor es cercano a la unidad lo que nos indica que la concentración recuperada (eje Y) y la concentración adicionada (eje X) son directamente proporcionales entre sí; por tanto, aumentan en la misma proporción, lo que quiere decir que la cantidad de analito que se adicione será igual a la cantidad de analito recuperado.

Tabla 21. Resultados de la regresión y evaluación del % de recuperación de la prueba de veracidad.

	Promedio (%)	102.57	
	Desviación estándar (%)	8.06	
	t_{crit}	2.07	
	ICI (%)	99.17	
	ICS (%)	105.98	
	<i>Coeficientes</i>	<i>Inferior</i> 95.0%	<i>Superior</i> 95.0%
Intercepción	4.00E-14	-0.848	0.848
Pendiente	1.00	0.984	1.016

De lo anterior se concluye lo siguiente:

- Para la evaluación de la veracidad, el intervalo de confianza incluye al 100 %; por ende, la cuantificación está libre de variabilidad sistemática, la variabilidad observada es debida a variación aleatoria. El promedio del porcentaje de recuperación es estadísticamente 100 %.
- Como el intervalo de confianza de la ordenada al origen incluye al 0, la ordenada al origen, estadísticamente, es cero; por tal razón, en ausencia del analito, no se tiene respuesta fisicoquímica del mismo.
- Como el intervalo de confianza de la pendiente incluye a la unidad, el % de recuperación es estadísticamente 100 %.

La prueba cumple con los criterios de aceptación. El método es veraz, en el intervalo de concentración de trabajo.

e) Repetibilidad del método.

La repetibilidad del método evalúa la variabilidad del sistema cromatográfico junto con la preparación de la muestra. En la **tabla 22** se muestran los resultados del % CV del porcentaje de recobro para el punto central de la curva de calibración.

Tabla 22. Resultados del parámetro de repetibilidad del método.

Concentración de trabajo (ppm)	Área ₂₈₄ (ua)	Concentración recuperada (ppm)	% de recuperación	% CV
42.74	494.28	45.14	105.62	1.42
	481.37	43.96	102.88	
	482.04	44.03	103.02	
	475.87	43.47	101.71	
	489.16	44.67	104.53	
	490.78	44.82	104.88	

Como se observa, se cumple con el criterio de aceptación: % CV < 2 %; por tanto, se puede afirmar que el método brinda una respuesta repetible.

f) Precisión intermedia.

En este parámetro, se decidieron evaluar los factores de día y analista y su interacción entre ellos, estos factores son de interés debido a que el método debe poder realizarse en todo momento (cualquier día), por cualquier analista, y sin importar si realizan la experimentación de manera aleatoria u ordenada, en la **tabla 23**, se muestran los resultados del % CV global del % de recuperación, para cada factor.

Tabla 23. Resultados del parámetro de precisión intermedia.

		En el mismo laboratorio								
	% CV _{Global}	3.76	Día 1				Día 2			
			Concentración adicionada (µg/mL)	Concentración recuperada (µg/mL)	% recuperado		Concentración adicionada (µg/mL)	Concentración recuperada (µg/mL)	% recuperado	
Instrumento A	Analista x	Repetición 1	40.03	41.81	104.45	Repetición 1	40.03	41.89	104.65	
		Repetición 2	40.03	39.04	97.52	Repetición 2	40.03	40.54	101.27	
		Repetición 3	40.03	44.52	111.21	Repetición 3	40.03	41.85	104.54	
				%CV	6.560			%CV	1.857	
	Analista y	Repetición 1	40.03	42.49	106.15	Repetición 1	40.03	39.27	98.10	
		Repetición 2	40.03	42.19	105.40	Repetición 2	40.03	42.84	107.02	
		Repetición 3	40.03	43.23	107.99	Repetición 3	40.03	42.46	106.06	
			%CV	1.250			%CV	4.723		

Dado que porcentaje CV global del % de recobro es menor al 5 %. El resultado no se ve afectado por el día en que se haga el análisis, ni depende del analista que lo realice.

Además, en la **tabla 24** se muestran los resultados del análisis de varianza de dos vías, realizado en Excel®.

Tabla 24. Resumen estadístico del análisis de varianza de dos factores.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Analista	4.186	1	4.186	0.219	0.652	5.318
Días	10.250	1	10.250	0.537	0.485	5.318
Interacción	2.644	1	2.644	0.138	0.719	5.318
Dentro del grupo	152.742	8	19.093			
Total	169.822	11				

Dado que el valor $F_{exp} < F_{crit}$ para los factores de día, analista y su interacción, la variabilidad no es significativa. Los resultados no se ven afectados por el día en que se haga, ni que analista lo realice, además los factores no son dependientes uno de otro, no afecta si se realiza la experimentación en un día específico o por un analista en concreto, que es lo que se busca, que sean factores independientes.

g) Límite de detección y límite de cuantificación.

Los límites de cuantificación y detección se determinaron de manera experimental. Para esto se presentan diferentes concentraciones y su relación S/R en la **tabla 25**. Estos límites nos muestran la mínima concentración detectable y cuantificable por el método, con precisión y veracidad.

Tabla 25. Relación señal/ruido para diferentes concentraciones.

Concentración (ppm)	S/R
0.5	3.4
0.6	5.4
0.75	7.7
0.85	9.7

Con los resultados obtenidos, se puede decir que el límite de detección instrumental es 0.5 ppm ya que su S/R es cercano a 3, y el límite de cuantificación se toma como 0.85 ppm ya que su relación S/R es cercana a 10 (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A. C., S/A). A continuación, se muestra el cálculo para expresar ambos límites en términos de μg de VEA/mg de muestra.

$$LD: 0.5 \frac{\mu\text{g VEA}}{\text{mL}} \times 5.0 \text{ mL} \times \frac{10.0 \text{ mL}}{0.475 \text{ mL}} \times \frac{1}{13 \text{ mg muestra}} = 4.05 \frac{\mu\text{g VEA}}{\text{mg muestra}}$$

$$LC: 0.85 \frac{\mu\text{g VEA}}{\text{mL}} \times 5.0 \text{ mL} \times \frac{10.0 \text{ mL}}{0.475 \text{ mL}} \times \frac{1}{13 \text{ mg muestra}} = 6.88 \frac{\mu\text{g VEA}}{\text{mg muestra}}$$

Es importante mencionar que el límite de detección es menor al de cuantificación, y estos valores reportados son menores a los puntos que se utilizaron para el estudio de regresión en el parámetro de linealidad del método. Finalmente, estos números obtenidos no se comparan con una referencia, ya que no es un método que tenga límite de decisión, o se tenga un valor estimado de las muestras comerciales.

Para fines del método descrito, se concluye que en caso de presentarse una concentración menor a $6.88 \frac{\mu\text{g VEA}}{\text{mg muestra}}$ en muestras, este analito no podrá ser cuantificado, ya que carecería de exactitud (precisión y veracidad).

3.3. Declaración de la validación.

Para culminar la presentación de evidencia objetiva de validación, en la **tabla 26** se muestra el resumen de la validación del método analítico.

Tabla 26. Resumen de la validación del método analítico.

Método	Desarrollo de un método por HPLC-UV-MS para la cuantificación de acetato de vitamina E en líquidos rellenables de cigarrillo electrónico			
Referencia	Guía de validación de métodos analíticos: La adecuación al uso de los métodos analíticos. Una guía de laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados de la EURACHEM. (2016). Guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A. C. (S/A).			
Período de realización	Junio de 2023. Analista 1 (principal), analista 2 (precisión intermedia)			
Parámetros de desempeño	Parámetro	Valor obtenido	Criterio de aceptación	Veredicto
	Selectividad	Se distingue al analito.	La respuesta físico-química, debe ser sólo por el analito y se debe conocer.	Cumple
	Reptibilidad del sistema (%)	0.48	% CV < 2 %	Cumple
	Intervalo lineal del método	[1.0-100.0] mg/mL, $r^2=0.9992$	$r^2 \geq 0.98$	Cumple
	Sensibilidad analítica	11.021 ua/ppm	El IC de la pendiente incluya al cero.	Cumple
	Linealidad del método	$r^2=0.9986$ Área = 11.021Conc - 3.173 IC _m no incluye al 0. IC _b incluye al 0.	$r^2 \geq 0.98$ Intervalo de confianza de la pendiente no debe incluir al cero e IC para la ordenada al origen debe incluir al cero. No se deben observar tendencia en residuales.	Cumple
	LD (mg/g)	4.05	Solo informativo.	N/A
	LC (mg/g)	6.88	Solo informativo.	N/A
	Veracidad	Promedio: 102.57 % IC _{recobro} = (99.17-105.98) % IC _m incluye a la unidad. IC _b incluye al 0.	Recobro promedio: 95-105 % El IC del recobro incluya al 100 % IC _m debe incluir la unidad. IC _b debe incluir al 0.	Cumple
	Precisión	Repetibilidad del método (%)	1.42	% CV < 2 %
Repetibilidad intermedia (%)		3.76 Factores no significativos.	% CV < 5 %. Factores estudiados no significativos (ANOVA).	Cumple
Declaración de validación	El método es adecuado para su propósito.			

3.4. Cuantificación de acetato de vitamina E en muestras comerciales.

A continuación, se muestran los resultados del análisis de cuatro muestras comerciales de cigarrillo electrónico, dos de tipo regular, y dos de tipo cannábico. Es importante mencionar que las muestras fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Salud Pública, y por

razones de confidencialidad y ética, no se presentan las marcas de dichas muestras. En la **figura 30** se muestran los cromatogramas de las muestras de *e-liquid* regulares.

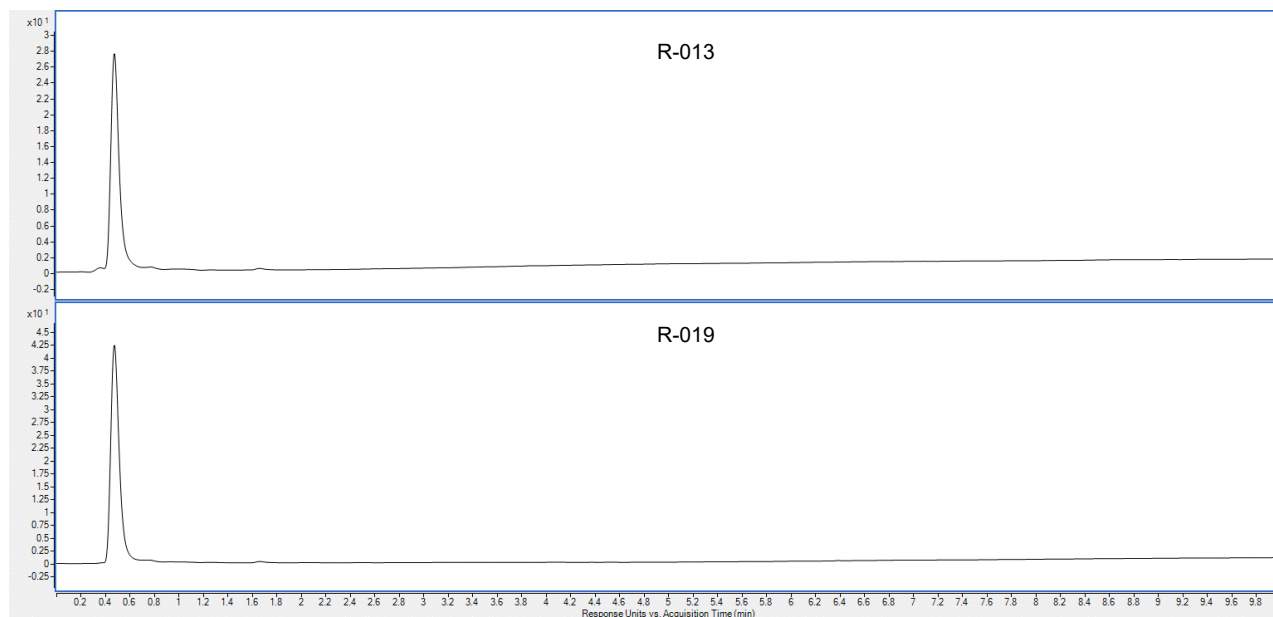


Figura 30. Cromatogramas de las muestras R-013 y R-019.

Como se observa en la **figura 30**, en estas dos muestras de *e-liquids* comerciales de tipo regular, no hay presencia de acetato de vitamina E. Dicha afirmación es corroborada por el espectro de masas a un t_R de 6.65 minutos mostrada en la **figura 31**, donde no se observa el ion molecular del analito. Además, se presenta el espectro de masas del único pico detectado en los cromatogramas (**figura 32**), los cuales no corresponden al acetato de vitamina E.

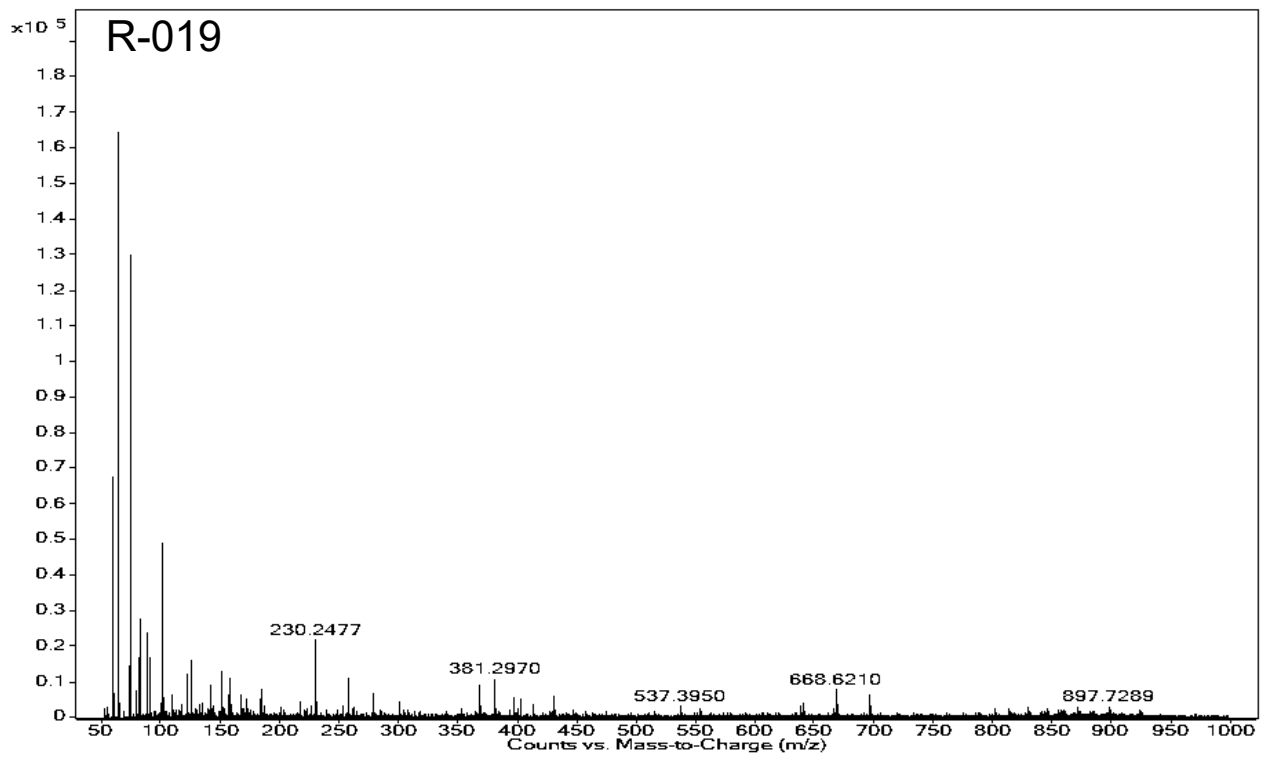
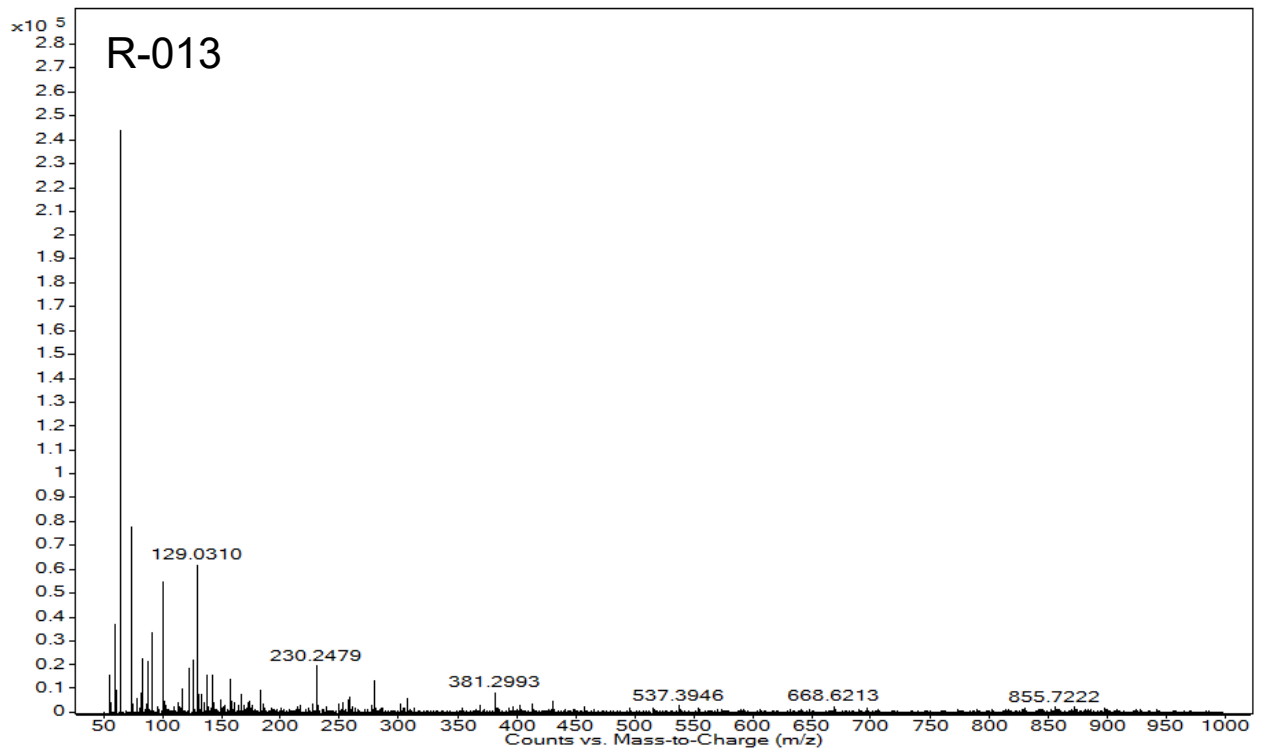


Figura 31. Espectro de masas de las muestras R-013 y R-019, a un tiempo de retención de 6.65 min.

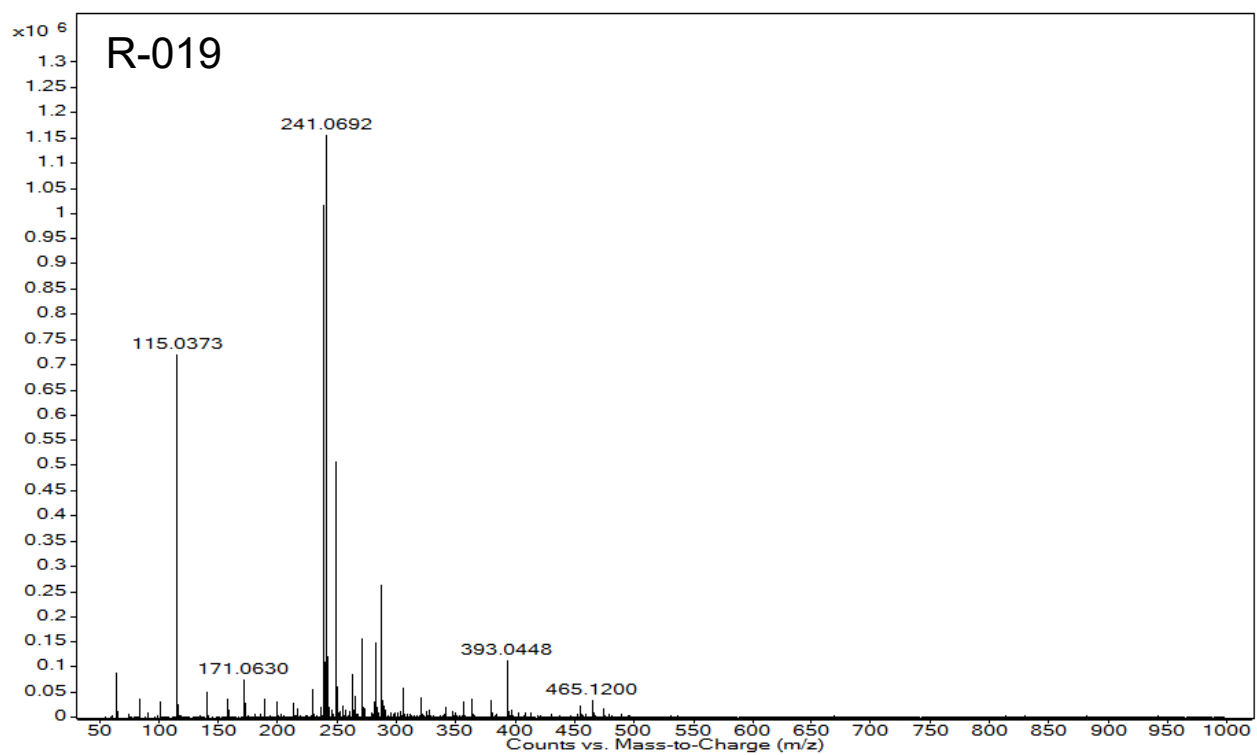
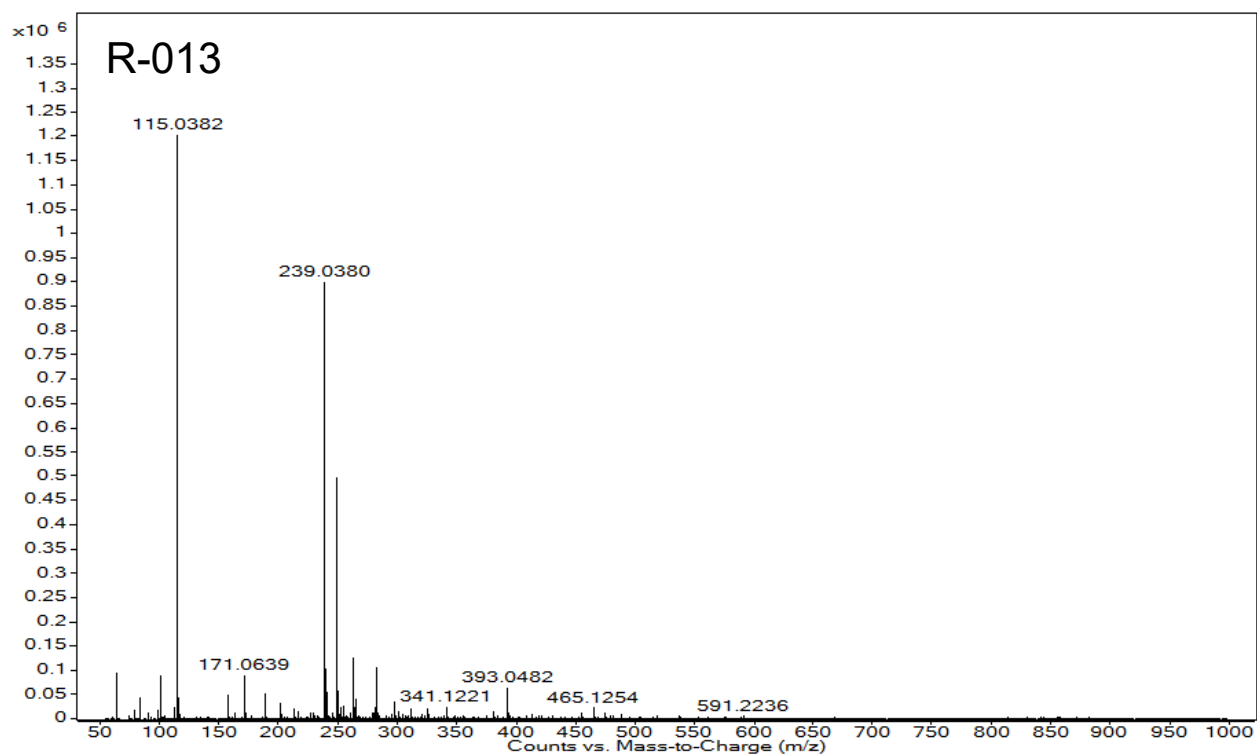


Figura 32. Espectro de masas del primer pico de las muestras R-013 y R-019.

Para el caso de las muestras cannábicas, los resultados se muestran en la **figura 33**, donde solo la muestra K contiene acetato de vitamina E; en la muestra J no se detectó el analito de interés, el espectro de masas de la muestra J a un t_R de 6.65 minutos se presenta en la **figura 34** como evidencia de la afirmación anterior.

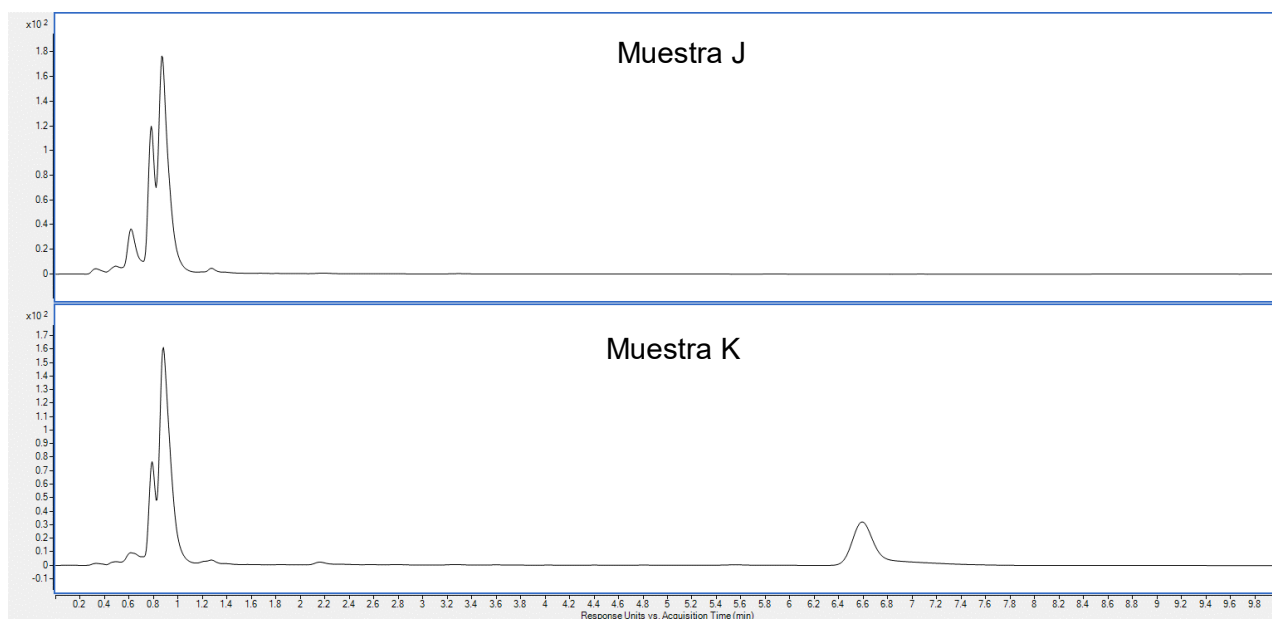


Figura 33. Cromatogramas de las muestras J y K.

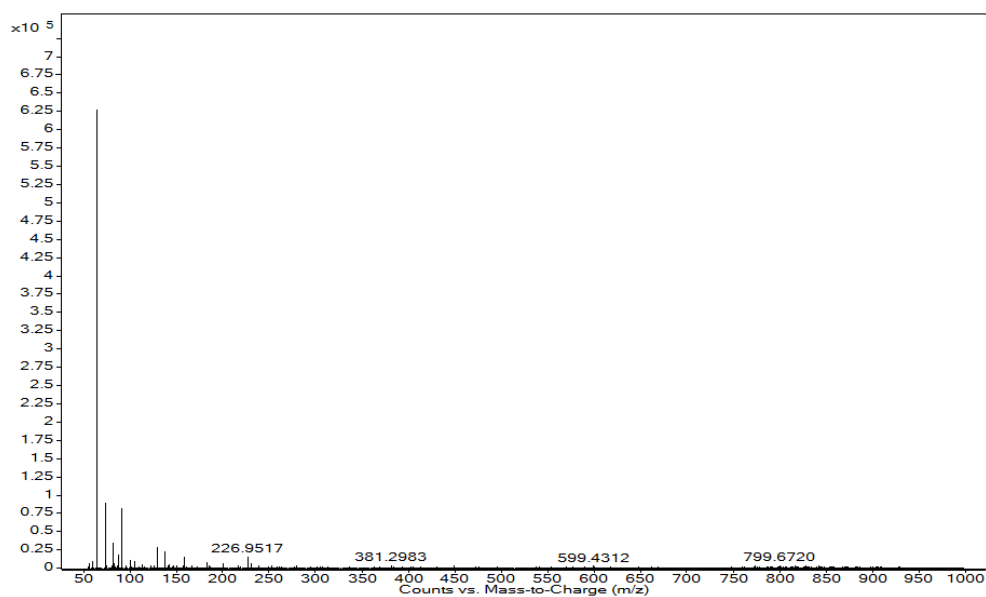


Figura 34. Espectro de masas de la muestra J, a un tiempo de retención de 6.65 min.

Además, se muestra el espectro de masas de los primeros picos observados en el cromatograma, de la muestra J y K, plasmadas en la **figura 35**.

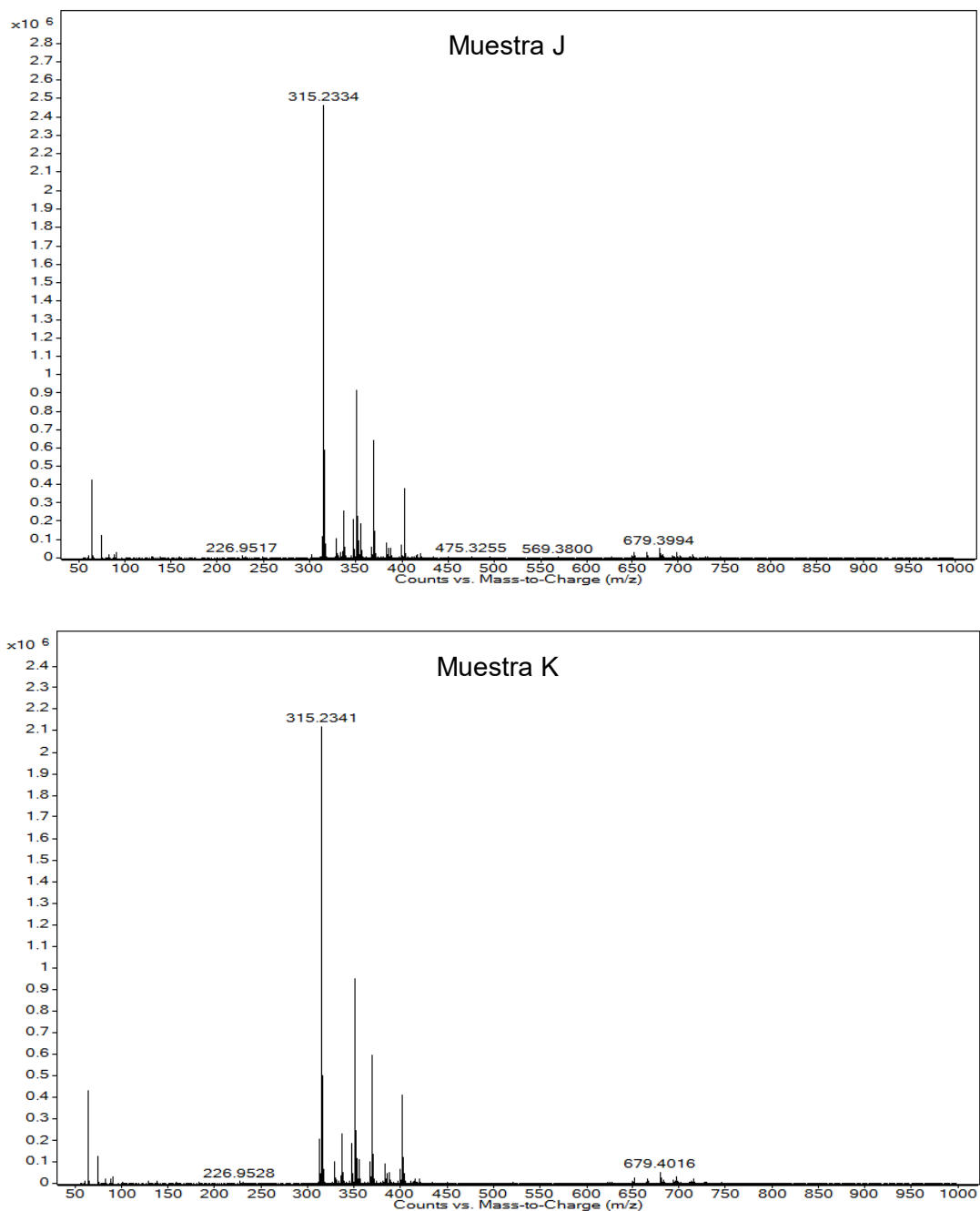


Figura 35. Espectro de masas de los primeros picos para las muestras J y K.

Gracias a lo presentado anteriormente, se puede afirmar que las muestras analizadas contienen THC, cuya masa molar 314.45 g/mol [M], el pico que confirma su identidad en el

espectro de masas es: $[M+H]^+ = 315.23 \text{ m/z}$, siendo el aducto que forma con un protón en modo positivo.

Los consumidores de THC, a través de cigarrillo electrónico, están ante el riesgo latente de que los productos que adquieren no solo contengan THC, sino que algunos pueden contener acetato de vitamina E, el cual impacta de manera negativa en la salud. La falta de regulación con estos productos pone en riesgo a la población mexicana, ya que hay evidencia de que en algunos lugares se están generando estos líquidos de relleno, sin ninguna seguridad y farmacovigilancia necesaria.

Para la muestra K, el área obtenida de acetato de vitamina E es 491.11 ua, la muestra se cuantificó con la ecuación obtenida en la prueba de linealidad del método, a continuación, se presenta el cálculo para obtener cantidad de acetato de vitamina E en la muestra.

$$\text{Concentración } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{491.11 - (-3.17)}{11.02} = 44.85 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$
$$44.85 \frac{\mu\text{g VEA}}{\text{mL}} \times 5.0 \text{ mL} \times \frac{10.0 \text{ mL}}{0.475 \text{ mL}} \times \frac{1}{13.2 \text{ mg muestra}} = 357.64 \frac{\mu\text{g VEA}}{\text{mg muestra}}$$

Existen varios aspectos a destacar de estos resultados, la cantidad encontrada de VEA en la muestra K, representa alrededor de una tercera parte del total de la muestra. De acuerdo con Duffy *et al.*, 2020, el acetato de vitamina E tiene propiedades similares al tetrahidrocannabinol, como son el color y su viscosidad, por lo que al realizar mezclas de VEA y THC en cualquier proporción, hace que el acetato de vitamina E sea imperceptible para el consumidor, volviéndolo un diluyente ideal para productos cannábicos vaporizables, con el propósito de maximizar la oferta, reducir costos al “cortar” el producto con un material más barato e indetectable para el usuario. Además, desde la parte química, como ya se mencionó, el acetato de vitamina E es un antioxidante, misma propiedad puede ayudar a que el contenido presente de THC no se oxide a lo largo de su manufactura, almacenamiento y hasta llegar a las manos del consumidor.

No se tiene un estudio que mencione la cantidad necesaria de VEA para provocar los daños a la salud ya mencionados, pero se debe considerar que cualquier cantidad puede

provocar efectos negativos a la salud del consumidor, dado que el acetato de vitamina E se utiliza en cantidades altas con respecto al total del producto (Duffy *et al.*, 2020). Por otra parte, se conoce que el acetato de vitamina E es un compuesto termolábil, a partir de 200 °C se piroliza (Ushikusa *et al.*, 1991), una temperatura clave para el proceso de vapeo; la pirólisis provoca que VEA se descomponga a compuestos más dañinos, como son el α -tocoferilquinona, y duroquinonas, por lo que es posible que durante el vapeo, el acetato de vitamina E se convierte en un precursor de compuestos citotóxicos que pueden contribuir a lesiones pulmonares.

Desde un punto de vista comercial, la muestra K que contiene VEA se encontró que es de origen extranjero gracias a la etiqueta en el producto, en específico del estado de California, E.U.; la marca la muestra J no se logró rastrear en línea. Las etiquetas nos brindan información tanto de su posible origen, como de su contenido y advertencias pertinentes a considerar por el consumidor. En la **figura 36** se exponen las etiquetas de ambas muestras.



Figura 36. Etiquetas de las muestras K y J.

Respecto al contenido de *VEA* la muestra J indica “sin diluyentes peligrosos”, por lo que cumple con su aviso con respecto al acetato de vitamina E, pero no se descarta que esté libre de otros compuestos peligrosos; caso contrario de la muestra K, donde sí se encuentra *VEA* pero no lo expresa en sus ingredientes, lo único que indica para el usuario es que puede provocar cáncer y provocar daños reproductivos, pero esconden este compuesto dañino conocido hasta ahora, aunque no se descartan sus demás componentes.

A partir de lo anterior, se puede comenzar un debate y planes de acción acerca del origen de los productos que llegan al país, siendo necesario realizar investigaciones más estrictas, de cuáles son las marcas que se distribuyen en la nación, que contienen acetato de vitamina E con el propósito de retirarlas del mercado.

CAPÍTULO IV CONCLUSIONES

- Se desarrolló y validó un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, con detector UV-visible, para la cuantificación de acetato de vitamina E (VEA) en líquidos de relleno de cigarrillo electrónico.
- El método analítico con el detector de masas sirve como un método cualitativo para confirmar la presencia o ausencia de acetato de vitamina E en líquidos de relleno de cigarrillo electrónico. Además de identificar la presencia de compuestos cannábicos, como el THC o CBD.
- Se implementó una preparación de muestra sencilla y rápida, teniendo así un método de análisis accesible que puede reproducirse y adaptarse en cualquier laboratorio del país.
- El método cumplió con todos los parámetros de validación, concluyendo que el método es adecuado para su propósito.
- Las muestras analizadas dan una base para comenzar un camino a la regulación adecuada de productos de cigarrillo electrónico de THC que circulan en el mercado nacional. Ante el brote de *EVALI* en el mundo, el pueblo y gobierno mexicano no puede ser ajeno a dicha problemática; la implementación de medidas que contribuyan al cuidado y promoción de la salud es necesaria. Además, visibilizar a través de evidencia, los efectos secundarios negativos a la salud provocados por el consumo de cigarrillos electrónicos son fundamentales. El trabajo presentado es la evidencia del primer método analítico desarrollado y validado en el país y será utilizado para el análisis de una gran cantidad de productos que son de libre venta en México, dando los primeros pasos para tener una mayor investigación de estos productos, con el fin de salvaguardar la salud e integridad de la población.

REFERENCIAS

- [1]. Agencia de Protección Sanitaria del Gobierno de la Ciudad de México. (2022). SEGOB y COFEPRIS emiten alerta sanitaria máxima para vapeadores y nuevas acciones para proteger la salud. <https://www.agepsa.cdmx.gob.mx/comunicacion/nota/segob-y-cofepris-alerta-sanitaria-maxima-para-vapeadores-y-nuevas-acciones-para-proteger-la-salud>
- [2]. Aluker, N. L., Herrmann, M., & Suzdaltseva, Y. M. (2019). A spectrophotometric study of nitrate and nitrite salts and their aqueous solutions. *Optics and Spectroscopy*, 127(6), 991-996. <https://doi.org/10.1134/s0030400x19120026>
- [3]. Bhat, T. A., Kalathil, S. G., Bogner, P. N., Blount, B. C., Goniewicz, M. L., & Thanavala, Y. (2020). An Animal Model of Inhaled Vitamin E Acetate and EVALI-like Lung Injury. *The New England Journal of Medicine*, 382(12), 1175-1177. <https://doi.org/10.1056/nejmc2000231>
- [4]. Blount, B. C., Karwowski, M. P., Morel-Espinosa, M., Rees, J., Sosnoff, C. S., Cowan, E., Gardner, M., Wang, L., Valentin-Blasini, L., Silva, L. K., De Jesús, V. R., Kuklennyik, Z., Watson, C., Seyler, T. H., Xia, B., Chambers, D. W., Briss, P. A., King, B., Delaney, L. J., . . . Pirkle, J. L. (2019). Evaluation of Bronchoalveolar Lavage Fluid from Patients in an Outbreak of E-cigarette, or Vaping, Product Use–Associated Lung Injury — 10 States, August–October 2019. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 68(45), 1040–1041. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6845e2>
- [5]. Blount, B. C., Karwowski, M. P., Shields, P. G., Morel-Espinosa, M., Valentin-Blasini, L., Gardner, M., Braselton, M. E., Brosius, C. R., Caron, K. T., Chambers,

- D. W., Corstvet, J., Cowan, E., De Jesús, V. R., Espinosa, P., Fernandez, C., Holder, C., Kuklenyik, Z., Kusovschi, J. D., Newman, C. A., . . . Pirkle, J. L. (2020). Vitamin E Acetate in Bronchoalveolar-Lavage Fluid Associated with EVALI. *The New England Journal of Medicine*, 382(8), 697-705. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1916433>
- [6]. Castaños, E. (2015). Instrumentación en HPLC. *Cienciadelux*. <https://lidiakonlaquimica.wordpress.com/2015/08/10/instrumentacion-en-hplc/>
- [7]. Cazes, J. (2010). *Encyclopedia of chromatography*. CRC Press: Taylor & Francis Group.
- [8]. CDC. (2019). E-cigarette, or vaping, products visual dictionary (U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention).
- [9]. CDC. (2021). Outbreak of Lung Injury Associated with the Use of E-Cigarette, or Vaping, Products. Centers for Disease Control and Prevention. https://www.cdc.gov/tobacco/basic_information/e-cigarettes/severe-lung-disease.html
- [10]. CDC Health Alert Network. (2019). Severe Pulmonary Disease Associated with Using E-Cigarette Products | HAN Archive – 00421. Centers for Disease Control and Prevention. <https://emergency.cdc.gov/han/han00421.asp>
- [11]. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A. C. (S/A). Guía de validación de métodos analíticos.
- [12]. Diario Oficial de la Federación. (2022). DECRETO por el que se prohíbe la circulación y comercialización en el interior de la República, cualquiera que sea su

procedencia, de los Sistemas Electrónicos de Administración de Nicotina, Sistemas Similares sin Nicotina, Sistemas Alternativos de Consumo de Nicotina, cigarrillos electrónicos y dispositivos vaporizadores con usos similares, así como las soluciones y mezclas utilizadas en dichos sistemas.
https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5653845&fecha=31/05/2022#gs.c.tab=0

- [13]. DiPasquale, M., Gbadamosi, O., Nguyen, M., Castillo, S. R., Rickeard, B. W., Kelley, E., Nagao, M., & Marquardt, D. (2020). A Mechanical Mechanism for Vitamin E Acetate in E-cigarette/Vaping-Associated Lung Injury. *Chemical Research in Toxicology*, 33(9), 2432-2440. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00212>
- [14]. Dong, M. W. (2006). *Modern HPLC for Practicing Scientists*. Wiley-Interscience.
- [15]. Dong, M. W. (2019). *HPLC and UHPLC for practicing scientists, second edition*. Wiley-Interscience.
- [16]. Duffy, B. C., Li, L., Lu, S., Durocher, L. A., Dittmar, M. A., Delaney-Baldwin, E., Panawennage, D., LeMaster, D. M., Navarette, K. A., & Spink, D. C. (2020). Analysis of Cannabinoid-Containing Fluids in Illicit Vaping Cartridges Recovered from Pulmonary Injury Patients: Identification of Vitamin E Acetate as a Major Diluent. *Toxics*, 8(1), 8. <https://doi.org/10.3390/toxics8010008>
- [17]. EURACHEM. (2016). *La adecuación al uso de métodos analíticos, una guía de laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados*.
- [18]. Górnas, P., Baškirovs, G., & Siger, A. (2022). Free and Esterified Tocopherols, Tocotrienols and Other Extractable and Non-Extractable Tocochromanol-Related

- Molecules: Compendium of Knowledge, Future Perspectives and Recommendations for Chromatographic Techniques, Tools, and Approaches Used for Tocochromanol Determination. *Molecules*, 27(19), 6560. <https://doi.org/10.3390/molecules27196560>
- [19]. Gross, J. (2017). *Mass Spectrometry*. En Springer eBooks. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-54398-7>
- [20]. Kosarac, I., Kubwabo, C., Katuri, G. P., Petraccone, D., & Mischki, T. (2021). Vitamin E acetate determination in vaping liquids and non-targeted analysis of vaping emissions of diluents of concern, vitamin E acetate and Medium-Chain triglycerides oil. *Frontiers in Chemistry*, 9. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.756745>
- [21]. Kraj, A., Desiderio, D. M., & Nibbering, N. M. (2008). *Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications*. Wiley.
- [22]. Kröpfl, A., Schweizer, S., & Vetter, W. (2022). Quantification of tocochromanols in vitamin E dietary supplements by instrumental thin-layer chromatography. *European Food Research and Technology*, 248(6), 1653-1662. <https://doi.org/10.1007/s00217-022-03993-1>
- [23]. Layden, J. E., Ghinai, I., Pray, I. W., Kimball, A., Layer, M., Tenforde, M. W., Navon, L., Hoots, B. E., Salvatore, P. P., Elderbrook, M., Haupt, T., Kanne, J. P., Patel, M. T., Saathoff-Huber, L., King, B., Schier, J., Mikosz, C. A., & Meiman, J. (2020). Pulmonary Illness Related to E-Cigarette Use in Illinois and Wisconsin — Final Report. *The New England Journal of Medicine*, 382(10), 903–916. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1911614>

- [24]. Lee, H. (2020). Vitamin E acetate as linactant in the pathophysiology of EVALI. *Medical Hypotheses*, 144, 110182. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110182>
- [25]. Li, Y., Dai, J., Tran, L. N., Pinkerton, K. E., Spindel, E. R., & Nguyen, T. B. (2022). Vaping aerosols from vitamin E acetate and tetrahydrocannabinol oil: chemistry and composition. *Chemical Research in Toxicology*, 35(6), 1095-1109. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.2c00064>
- [26]. Llambí, L., Rodríguez, D., Soto, E., & Parodi, C. (2020). Cigarrillo electrónico y otros sistemas electrónicos de liberación de nicotina, revisión de evidencias sobre un tema controversial. *Revista médica del Uruguay*. <https://doi.org/10.29193/rmu.36.1.7>
- [27]. Meléndez-Martínez, A. J. (2017). Vitamin E Bioavailability: Mechanisms of Intestinal Absorption in the Spotlight. *Antioxidants*, 6(4), 95. <https://doi.org/10.3390/antiox6040095>
- [28]. Miller, J. N., & Miller, J. C. (2002). *Estadística y quimiometría para química analítica*. Prentice Hall.
- [29]. Polo Díez, L. M. (2015). *Fundamentos de cromatografía*. Dextra Editorial.
- [30]. PubChem Compound Summary—Alpha-Tocopherol Acetate. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/alpha-Tocopherol-acetate>
- [31]. Puetz, A., Espinosa, M. P., Watson, C. H., Blount, B. C., & Valentin-Blasini, L. (2021). Development, Validation, and Application of a Novel Method for the Analysis of Vitamin E Acetate and Other Tocopherols in Aerosol Emissions of E-Cigarettes,

- or Vaping Products Associated With Lung Injury. *Frontiers in Chemistry*, 9. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.730954>
- [32]. Smith, R. M. (2004). *Understanding Mass Spectra: A Basic Approach*. Wiley-Interscience.
- [33]. Snyder, L. R., & Kirkland, J. J. (1979). *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Wiley-Interscience.
- [34]. Thanavala, Y., & Goniewicz, M. L. (2019). Vaping-induced severe respiratory disease outbreak: what went wrong? *The Lancet Respiratory Medicine*, 7(12), 1014-1015. [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(19\)30350-9](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(19)30350-9)
- [35]. Thompson, M., Ellison, S. L. R., & Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *International Union of Pure and Applied Chemistry*, 74(5), 835-855. <https://doi.org/10.1351/pac200274050835>
- [36]. Tiburcio-Moreno, J. A., Marcelín-Jiménez, G., Leanos-Castaneda, O. L., Yáñez-Limón, J. M., & Alvarado-Gil, J. J. (2012). Study of the Photodegradation Process of Vitamin E Acetate by Optical Absorption, Fluorescence, and Thermal Lens Spectroscopy. *International Journal of Thermophysics*. <https://doi.org/10.1007/s10765-012-1311-0>
- [37]. U.S. Food and Drug Administration. (2016). FDA takes significant steps to protect Americans from dangers of tobacco through new regulation.

<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-takes-significant-steps-protect-americans-dangers-tobacco-through-new-regulation>

- [38]. Ushikusa, T., Maruyama, T., & Niiya, I. (1991). Pyrolysis behavior and thermostability of tocopherols. *Journal of Japan Oil Chemists Society*, 40(12), 1073-1079. <https://doi.org/10.5650/jos1956.40.1073>
- [39]. USP Official. (2021). <1225> VALIDATION OF COMPENDIAL PROCEDURES. USPC Official. https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-E2C6F9E8-EA71-4B72-A7BA-76ABD5E72964_4_en-US
- [40]. Vapo. (2022). La Historia del ECIG y su Inventor. En VAPO.es. <https://vapo.es/historia-del-cigarro-de-vapor.html>
- [41]. World Health Organization. (2013). OMS | Los distribuidores de cigarrillos electrónicos deben dejar de reivindicar efectos terapéuticos no demostrados. <https://apps.who.int/mediacentre/news/releases/2008/pr34/es/index.html>