



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
“ZARAGOZA”**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO  
PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ALBENDAZOL Y SULFÓXIDO  
DE ALBENDAZOL EN PLASMA POR UHPLC ACOPLADO A  
ESPECTROMETRÍA DE MASAS-MASAS**

***T E S I S***

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**YAMEL HERNÁNDEZ LÓPEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Q.F.B. ALEJANDRA CORTÉS LÓPEZ**

**ASESOR DE TESIS 1:**

**Q.F.B. BLANCA IRENE CRUZ PERALTA**

**ASESOR DE TESIS 2:**

**MTRA. MIREYA GARCÍA CASAS**

**ASESOR TÉCNICO:**

**Q.F.B. ARACELI PÉREZ ZAVALA**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## *Agradecimientos*

*Quiero agradecer en primera instancia a la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la educación y la oportunidad de ser una egresada de la máxima casa de estudios.*

*A la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza" y sus profesores, que con gran esfuerzo me dieron las bases e instrumentos para mi formación profesional, en donde además conocí grandes profesionistas y amigos.*

*A la Unidad de Farmacología Clínica, UNAM y la Q.F.B. Blanca L. Ramírez González, por su apoyo en el presente trabajo y por darme mi primera oportunidad laboral como Q.F.B.*

*A la Q.F.B. Alejandra Cortés López, por su orientación, dirección, apoyo profesional, paciencia y amistad. También por su exigencia en cada una de las etapas en el tiempo de trabajo.*

*A la Mtra. Mireya García Casas, la Mtra. Leticia Huerta Flores y al Dr. Juan Carlos Vázquez Lira por la asesoría, consejos y tiempo brindados durante la elaboración de este trabajo.*

*A la Q.F.B. Blanca Irene Cruz Peralta, por su formación académica práctica y teórica, que permitió darme las bases profesionales y acercarme a la Unidad de Farmacología Clínica para desarrollar prácticas profesionales, así como su apoyo y tiempo brindado.*

*A la Q.F.B. Araceli Pérez Zavala y la Q.F.B. Sonia A. Maya Ponce por los consejos brindados durante el trabajo experimental, así como en el trabajo escrito.*

*Finalmente, al jurado, por la atención proporcionada para mi evaluación.*

## *Dedicatorias*

*A mis padres, que con gran esfuerzo han sido partícipes en todas las etapas de mi formación académica y me han permitido realizar una carrera profesional, además de inculcarme los valores necesarios para este logro. Me siento orgullosa de ustedes que con gran amor nos han educado para convertirnos en las personas que somos ahora. Gracias.*

*A mi hermano, que también ha sido parte fundamental en mi vida y en mi constancia académica, sintiéndome un ejemplo para él. Espero que este trabajo cumpla con tus expectativas para que tú mismo las superes. Gracias por tu ayuda y por tus palabras de aliento. Por siempre sacarme una sonrisa cuando lo he necesitado y por ser mi cómplice. Te amo H.*

*A mis tías, Carmen y Guadalupe, quienes han contribuido en mi formación, dándome su apoyo en los tiempos difíciles y brindándome cariño y consejos a pesar de mis constantes errores.*

*A mi hermana elegida Andrea, que hemos estado la una para la otra desde hace más de 13 años y seguiremos estando, tanto en los momentos buenos como los malos. Gracias por estar en mi vida y por tu amistad que deseo sea duradera.*

*A mis amigos universitarios, Armando, Karen, Lulú, Jessica, Diana, Víctor, José y Luis que fueron partícipes de mi esfuerzo, así como yo del de ustedes, además de compañeros de diversos equipos de trabajo. Espero que todos logren sus objetivos.*

*A mi mejor amiga Mariana, que además de los equipos de trabajo que formamos, has estado apoyándome en algunos de mis momentos más difíciles. Te quiero y espero que sigas creciendo y brillando.*

*Y a cada persona que haya estado en este proceso o en mi vida y hayan contribuido en algo para mi crecimiento personal y profesional.*

## INDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS .....	
ÍNDICE DE FIGURAS .....	
ABREVIATURAS .....	
RESUMEN.....	
INTRODUCCIÓN .....	
1. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Las helmintiasis en México y el mundo. ....	1
1.2. La necesidad de medicamentos genéricos en México .....	4
1.3. Albendazol .....	6
1.4. Bioequivalencia.....	10
1.5. Importancia del desarrollo de métodos analíticos en muestras biológicas (bioanálisis). ..	11
1.6. Extracción de fármacos de una matriz biológica. ....	12
1.7. Cromatografía. ....	17
1.8. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	22
1.9. Espectrometría de masas (EM).....	28
1.10. Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UHPLC).....	39
1.11. Métodos analíticos para la cuantificación.....	39
1.12. Validación de métodos analíticos en muestras biológicas.....	43
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN. ....	51
3. HIPÓTESIS.....	52
4. OBJETIVOS. ....	52

4.1.	Objetivo general .....	52
4.2.	Objetivos particulares .....	52
5.	MATERIAL Y MÉTODO. ....	53
5.1.	Diseño de estudio. ....	53
5.2.	Población. ....	53
5.3.	Variables.....	53
5.4.	Materiales, reactivos, equipos e instrumentos.....	54
5.5.	Método. ....	57
6.	Resultados y discusión .....	79
6.1.	Desarrollo del método analítico.....	79
6.2.	Validación del método bioanalítico. ....	84
7.	CONCLUSIONES. ....	121
8.	REFERENCIAS.....	122

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Casos de ascariasis y otras helmintiasis por entidad federativa hasta la semana 44 del año 2019 y las acumuladas durante el año 2018. <sup>5</sup> .....	3
Cuadro 2. Estructura y masa molar del sulfóxido de albendazol y albendazol. <sup>(8-11)</sup> .....	6
Cuadro 3. Métodos para la cuantificación de albendazol (ALB) y sulfóxido de albendazol (ALBSO) en plasma.....	40
Cuadro 4. Especificaciones de equipos. ....	54
Cuadro 5. Especificaciones de instrumentos. ....	55
Cuadro 6. Especificaciones de reactivos. ....	55
Cuadro 7. Especificaciones de sustancias de referencia.....	56
Cuadro 8. Materiales .....	56
Cuadro 9. Gradiente de prueba 1.....	62
Cuadro 10. Gradiente de prueba 2.....	62
Cuadro 11. Gradiente de prueba 3.....	63
Cuadro 12. Gradiente de prueba 4.....	63
Cuadro 13. Preparación de la curva de calibración y controles en plasma .....	68
Cuadro 14. Condiciones de fragmentación de los analitos y el estándar interno seleccionado. ....	80
Cuadro 15. Condiciones de detección para albendazol y sulfóxido de albendazol.....	81
Cuadro 16. Elución en gradiente. ....	82
Cuadro 17. Resultados de adecuabilidad.....	84
Cuadro 18. Resultados de linealidad de ALB .....	85
Cuadro 19. Resultados de concentración recuperada de ALB en la evaluación de la linealidad del método.....	86
Cuadro 20. Resultados de linealidad de método ALBSO .....	87
Cuadro 21. Resultados de concentración recuperada de ALBSO en la evaluación de la linealidad del método.....	88
Cuadro 22. Resultados de repetibilidad y exactitud de ALB. ....	92

Cuadro 23. Resultados de repetibilidad y exactitud de ALBSO. ....	93
Cuadro 24. Resultados de reproducibilidad de ALB.....	94
Cuadro 25. Resultados de reproducibilidad de sulfóxido de albendazol.....	95
Cuadro 26. Resultados de los blancos inyectados para la prueba de acarreo. ....	96
Cuadro 27. Cromatogramas de la evaluación del efecto de acarreo para albendazol y mebendazol. .....	97
Cuadro 28. Cromatogramas de la evaluación del efecto de acarreo para sulfóxido de albendazol y mebendazol. ....	99
Cuadro 29. Resultados de selectividad a lotes de plasma de ALB, ALB y MBZ. ....	101
Cuadro 30. Cromatogramas de albendazol y mebendazol (E.I.) de la prueba de selectividad a lotes de plasma.....	102
Cuadro 31. Cromatogramas de sulfóxido de albendazol y mebendazol (E.I.) para la prueba de selectividad a lotes de plasma. ....	104
Cuadro 32. Resultados de selectividad a fármacos de uso común de ALB, ALBSO y MBZ.....	106
Cuadro 33. Cromatogramas de la evaluación de selectividad a fármacos de uso común de ALB y MBZ. ....	107
Cuadro 34. Cromatogramas de la evaluación de la prueba de selectividad a fármacos de uso común de ALBSO y MBZ. ....	108
Cuadro 35. Resultados de la evaluación del efecto matriz de Albendazol.....	109
Cuadro 36. Resultados de la evaluación del efecto matriz de sulfóxido de albendazol. ....	110
Cuadro 37. Resultados de estabilidad a temperatura ambiente después de 22.2 horas de albendazol. .....	111
Cuadro 38. Resultados de estabilidad a temperatura ambiente durante 22.2 horas de sulfóxido de albendazol. ....	111
Cuadro 39. Resultados de estabilidad en el automuestreador tras 22.2h a 4°C de albendazol.....	112
Cuadro 40. Resultados de estabilidad en el automuestreador tras 22.2 h a 4°C de sulfóxido de albendazol. ....	112
Cuadro 41. Resultados de la evaluación de la estabilidad a largo plazo para albendazol tras 56 días de almacenamiento en congelación.....	113
Cuadro 42. . Resultados de la evaluación de la estabilidad a largo plazo para sulfóxido de albendazol tras 56 días de almacenamiento en congelación.....	113

Cuadro 43. Resultados de la estabilidad de la muestra procesada tras 5.9 h de almacenamiento en refrigeración de albendazol. ....	114
Cuadro 44. Resultados de la estabilidad de la muestra procesada tras 5.9 h de almacenamiento en refrigeración de sulfóxido de albendazol. ....	114
Cuadro 45. Resultados de la evaluación de estabilidad a ciclos de congelación y descongelación de albendazol .....	115
Cuadro 46. Resultados de la evaluación de estabilidad a ciclos de congelación y descongelación de sulfóxido de albendazol.....	115
Cuadro 47. Resultados de la estabilidad de la muestra evaporada tras 5.8h de almacenamiento en refrigeración de albendazol .....	116
Cuadro 48. Resultados de la estabilidad de la muestra evaporada tras 5.8h de almacenamiento en refrigeración de sulfóxido de albendazol. ....	116
Cuadro 49. Estabilidad de la solución madre de ALB en refrigeración después de 41días. ....	117
Cuadro 50. Estabilidad de la solución madre de ALBSO en congelación después de 53 días. ....	118
Cuadro 51. Estabilidad de la solución madre de mebendazol en refrigeración evaluada después de 41 días de almacenamiento respecto a albendazol. ....	118
Cuadro 52. Estabilidad de la solución madre de mebendazol en refrigeración evaluada después de 41 días de almacenamiento respecto a sulfóxido de albendazol. ....	119
Cuadro 53. Resultados de estabilidad de la solución de trabajo de albendazol evaluada después de 35 días de almacenamiento en congelación .....	119
Cuadro 54. Resultados de estabilidad de la solución de trabajo de sulfóxido de albendazol evaluada después de 35 días de almacenamiento en congelación .....	120
Cuadro 55. Resultados de estabilidad de la solución de trabajo de mebendazol respecto a albendazol evaluada después de 5 días de almacenamiento en congelación.....	120
Cuadro 56. Resultados de estabilidad de la solución de trabajo de mebendazol respecto a sulfóxido de albendazol evaluada después de 5 días de almacenamiento en congelación.....	121

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Extracción líquido- líquido .....	15
Figura 2.Pasos para la extracción en fase sólida .....	17
Figura 3. Diagrama que muestra los componentes de un equipo característico de HPLC.....	23
Figura 4.Reacción de sílice para formación de enlazamiento .....	27
Figura 5.Ionización por electrospray.....	31
Figura 6. Analizador de cuadrupolo.....	34
Figura 7. Analizador de tiempo de vuelo .....	35
Figura 8. Analizador de trampa de iones.....	36
Figura 9. Trayectoria de electrones en un multiplicador de electrones secundario.....	38
Figura 10. Fases en el proceso de desarrollo de un método analítico por UHPLC-MS/MS .....	57
Figura 11..Proceso de extracción .....	83
Figura 12. Gráfica de la concentración nominal contra concentración recuperada de ALB .....	89
Figura 13. Gráfica de la concentración nominal contra concentración recuperada de ALBSO.....	90

## ABREVIATURAS

<b>0</b>	Menos	<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>%</b>	Porcentaje	<b>kV</b>	Kilovolts
<b>+</b>	Más	<b>L</b>	Litros
<b>±</b>	Más menos	<b>LC</b>	Cromatografía de Líquidos
<b>≤</b>	Menor o igual que	<b>LIC</b>	Límite Inferior de Cuantificación
<b>°C</b>	Grados Celsius	<b>LSC</b>	Límite Superior de Cuantificación
<b>μL</b>	Microlitros	<b>m/z</b>	Relación masa-carga
<b>μm</b>	Micrómetros	<b>MBZ</b>	Mebendazol
<b>ABS</b>	Valor absoluto	<b>mg</b>	Miligramo
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>min.</b>	Minutos
<b>ALB</b>	Albendazol	<b>mL</b>	Mililitro
<b>ALBSO</b>	Sulfóxido de albendazol	<b>mm</b>	Milímetros
<b>ALBSO2</b>	Albendazol sulfona	<b>MS</b>	Espectrometría de masas
<b>API</b>	Ionización a Presión Atmosférica	<b>MS-MS</b>	Espectrometría de masas-masas
<b>AUC</b>	Área bajo la curva	<b>ng</b>	Nanogramos
<b>BCOR</b>	Blanco de reactivo	<b>nm</b>	Nanómetros
<b>CC</b>	Corriente Continua	<b>NOM</b>	Norma Oficial Mexicana
<b>CID</b>	Disociación Inducida por Colisión	<b>PCA</b>	Punto control alto
<b>C<sub>máx</sub></b>	Concentración máxima plasmática	<b>PCB</b>	Punto control bajo
<b>COFEPRIS</b>	Comisión Federal Para la Protección de Riesgos Sanitarios	<b>PCD</b>	Punto control diluido
<b>%CV</b>	Coefficiente de variación	<b>PCM</b>	Punto control medio
<b>D.E.</b>	Desviación estándar	<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>Desv. Abs.</b>	Desviación absoluta	<b>psi</b>	Libra por pulgada cuadrada
<b>DLI</b>	Introducción Directa del Líquido	<b>r</b>	Coefficiente de correlación
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido	<b>RF</b>	Radio Frecuencia
<b>E.I.</b>	Estándar interno	<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>EMN</b>	Efecto Matriz Normalizado	<b>s</b>	Segundos
<b>ESI</b>	Electrospray	<b>SI-OH</b>	Silanol
<b>eV</b>	Electrovolts	<b>SOL</b>	Solución
<b>FDA</b>	Administración de Alimentos y Medicamentos	<b>T<sub>máx</sub></b>	Tiempo máximo
<b>GC</b>	Cromatografía de Gases	<b>TOF</b>	Tiempo de Vuelo
<b>h</b>	Horas	<b>UHPLC</b>	Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución
<b>HPLC</b>	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	<b>V</b>	Volts
<b>IUPAC</b>	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada	<b>v/v</b>	Proporción volumen/volumen



## RESUMEN.

El albendazol (ALB) es un antihelmíntico de amplio espectro derivado del benzimidazol. Se utiliza comúnmente en el tratamiento de la equinocosis, los quistes hidatídicos y la neurocisticercosis. En el presente trabajo, se propone un método analítico capaz de cuantificar simultáneamente ALB y sulfóxido de albendazol (ALBSO) en plasma, mediante cromatografía de líquidos de ultra alta presión (Ultra High Pressure Liquid Chromatography o UHPLC por sus siglas en inglés) acoplada a espectrometría de masas- masas (MS-MS).

Se realizó una técnica de extracción líquido-líquido con acetato de etilo, acidificado con ácido fórmico. La columna seleccionada fue una Phenomenex Luna C18 con un diámetro interno de 2.0 mm, longitud de 100 mm y un tamaño de partícula de 3  $\mu\text{m}$ .

La fase móvil fue una mezcla de ácido fórmico 0.1%: metanol con una elución en gradiente a diferentes velocidades de flujo y tiempos de elución. La temperatura de la columna fue de 30°C. Se utilizó una fase de lavado de metanol: isopropanol 50:50 v/v y se seleccionó mebendazol (MBZ) como estándar interno. Los tiempos de retención fueron de 1.8min-2.8min, 0.6min-1.6min y 1.8min-2.8min para ALB, ALBSO y MBZ respectivamente. El método propuesto se validó con base a los parámetros establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. La estabilidad de la muestra se evaluó a largo plazo (durante 56 días en congelación), a temperatura ambiente (durante 22.2 h), en el automuestreador (durante 22.2 h a 4 °C), de la muestra procesada (durante 5.9 h en refrigeración), de la muestra evaporada post-extracción (durante 5.8 h en refrigeración) y se evaluó la estabilidad a tres ciclos de congelación y descongelación.

Se demostró que el método propuesto es selectivo, lineal, preciso y exacto para la cuantificación de albendazol y sulfóxido de albendazol.

## INTRODUCCIÓN

A partir de la década de los noventa se intentó abatir el alto costo de los medicamentos de patente mediante la permisión de medicamentos que fueran genéricos intercambiables. Esto propició que México desarrollara un esquema orientado a la demostración de la equivalencia terapéutica.

Un medicamento genérico contiene un principio activo ya conocido y previamente desarrollado. Su costo es menor que el de patente (o innovador) ya que su desarrollo y comercialización es más sencilla. Pueden diferir en otros componentes, como saborizantes, estabilizadores, otros excipientes y en su proceso de fabricación.

Actualmente, para que un medicamento se considere como genérico, debe de cumplir con las pruebas de intercambiabilidad señaladas por el Consejo de Salubridad General. Entre estas pruebas se encuentran la de bioequivalencia que tiene como objetivo garantizar la seguridad y eficacia de un medicamento genérico al introducirlo al mercado.

En un estudio de bioequivalencia, después de la administración de cada formulación, es necesario saber qué cantidad de fármaco existe en el organismo y cómo va cambiando a lo largo del tiempo, es por esto por lo que se obtienen muestras sucesivas ya que los parámetros sobre los que se basará la afirmación de bioequivalencia (AUC,  $C_{máx}$  y  $T_{máx}$ ) se calculan a partir de la curva de las concentraciones del fármaco durante el tiempo en el que se extraen las muestras.

Una vez extraídas, se procesan y conservan adecuadamente para garantizar que la sustancia o principio activo esté en condiciones óptimas para la cuantificación en la matriz biológica contenida.

Para realizar la cuantificación del analito es necesario desarrollar un método analítico, el cual debe estar validado, ya que debe reunir condiciones de precisión, exactitud y selectividad adecuadas para garantizar que los resultados obtenidos serán los correspondientes a aquello que se desea medir.

Por otro lado, México presenta una alta prevalencia de helmintiasis, sobre todo en zonas de pobreza extrema o con altos índices de desnutrición, por lo que es importante garantizar el acceso a estas poblaciones a medicamentos que ayuden a prevenir o tratar estas enfermedades.

En el presente trabajo, se propone un método analítico capaz de cuantificar albendazol y sulfóxido de albendazol, en plasma humano y se realiza la validación de este método con la finalidad de que pueda ser utilizado en un estudio de bioequivalencia en sujetos de investigación administrando 400 mg de albendazol después de la ingesta de alimentos.



## **1. MARCO TEÓRICO.**

### **1.1. Las helmintiasis en México y el mundo.**

Los helmintos son parásitos invertebrados multicelulares. Son bien tolerados por el hospedero, ya que viven bajo una relación simbiótica. Tienen una alta prevalencia en la población general, indicando que los helmintos han desarrollado métodos moleculares sofisticados de evasión de la respuesta inmune y supresión.<sup>1</sup>

La mortalidad ocasionada por las infestaciones por helmintos es relativamente baja, pero hay un alta prevalencia de estas, lo cual, constituye un serio problema de salud pública. Las helmintiasis son buenos indicadores de pobreza extrema, así como de mala nutrición en comunidades donde ambos coexisten.<sup>1</sup>

Diversos son los agentes que pueden infestar el intestino humano, entre los helmintos que se han aislado con más frecuencia se encuentran a *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Hymenolepis nana*, *Taenia* en sus especies *saginata* y *solium*.<sup>2</sup>

Las manifestaciones clínicas más reportadas cuando existe infestación por estos parásitos son: diarrea, dolor abdominal, estreñimiento, náusea, vómito, prurito anal, distensión abdominal, cefalea, hiporexia, anorexia, meteorismo, anemia, astenia y adinamia.<sup>2</sup>

Las helmintiasis constituyen un importante problema de salud tanto en medicina humana como en veterinaria. Por razones sociales, demográficas y biológicas, la prevalencia de estas parasitosis es más elevada en países en vías de desarrollo donde la mayor parte de la población carece de servicios de salud y condiciones sanitarias apropiadas.<sup>3</sup>

Según la Organización Mundial de la Salud, las parasitosis son enfermedades con un alto índice de morbilidad y se ha estimado que cerca de 3.5 billones de personas están afectadas.<sup>4</sup>

En México se ha encontrado una relación directa entre la prevalencia de las parasitosis intestinales con la deficiencia de las condiciones sanitarias adecuadas, por ejemplo, carencia de agua potable y drenaje o un sistema deficiente de recolección de basura. En el estado de Puebla se ha estimado que hay 1105 con helmintiasis por cada 100,000 habitantes. Debido a la ausencia de servicios de salud e idiosincrasia de las comunidades rurales, se ha propiciado el uso de remedios tradicionales y la automedicación.<sup>4</sup>

En México, en el año 2002, se reportaron 425,494 casos de otras helmintiasis; 210,287 de ascariasis. La prevalencia de parasitosis intestinal se ha descrito en 49.1% de niños y en 53% de la población general. Un estudio describe que 40.2% de los niños en Colima presentan parasitosis intestinal. La mayoría de los estudios transversales de México describen un patrón de ocurrencia alrededor de 40%; sin embargo, en otras investigaciones se ha reportado que más de 69% de las personas presenta parasitosis intestinal por agentes patógenos o comensales.<sup>2</sup>

Entre los factores de riesgo evaluados se ha identificado que en algunas poblaciones el sexo femenino presenta mayor predisposición, así como estado civil soltero, origen del agua de consumo humano proveniente de pozo o entubada (no potabilizada), manipulación inadecuada de alimentos, eliminación de excretas al aire libre y características de la vivienda (piso de tierra).<sup>2</sup>

A continuación, se presentan los casos de ascariasis y otras helmintiasis reportadas por entidad federativa hasta la semana 44 del año 2019 y las acumuladas durante el año 2018:

Cuadro 1. Casos de ascariasis y otras helmintiasis por entidad federativa hasta la semana 44 del año 2019 y las acumuladas durante el año 2018.<sup>5</sup>

ENTIDAD FEDERATIVA	ASCARIASIS				OTRAS HELMINTIASIS			
	2019			2018 acum.	2019			2018 acum.
	Sem.	Acum.			Sem.	Acum.		
		M	F			M	F	
Aguascalientes	2	29	39	47	13	429	444	1033
Baja California	-	14	17	14	35	694	914	1946
Baja California Sur	-	7	11	79	33	399	510	1037
Campeche	4	72	96	220	6	354	383	746
Coahuila	-	15	21	52	32	354	467	807
Colima	5	152	199	466	28	806	990	1951
Chiapas	68	1918	2354	4197	110	2577	3343	2008
Chihuahua	7	104	140	259	26	550	646	1546
Ciudad de México	1	54	56	154	99	2229	2881	5465
Durango	1	61	54	90	6	105	93	235
Guanajuato	2	26	55	76	29	382	496	859
Guerrero	118	2080	2762	4778	139	2862	3085	7370
Hidalgo	24	417	525	1055	49	773	894	2308
Jalisco	3	119	154	365	134	2297	2925	5852
Estado de México	37	252	315	577	261	4880	5981	11288
Michoacán	11	130	275	236	51	1152	1564	3059
Morelos	-	15	14	45	72	1410	1902	3186
Nayarit	30	485	725	864	29	836	1103	2301
Nuevo León	1	59	82	156	30	563	708	1215
Oaxaca	69	864	1150	2097	85	1802	2931	4162
Puebla	48	796	1000	2054	90	2077	2502	4404
Querétaro	1	9	38	58	2	17	18	90
Quintana Roo	19	542	528	1425	55	1362	1776	3298
San Luis Potosí	15	355	430	569	26	693	835	1599
Sinaloa	24	443	574	655	294	4520	6324	13284
Sonora	3	32	47	113	67	1136	1257	2545
Tabasco	29	894	990	1893	178	3289	3802	7295
Tamaulipas	9	544	589	1279	100	2126	3123	5522
Tlaxcala	1	25	20	67	8	274	315	830
Veracruz	146	3103	4166	7573	239	5228	6867	13358
Yucatán	90	1712	2487	5575	67	1803	2202	4584
Zacatecas	2	47	52	99	13	213	273	507
<b>TOTAL</b>	<b>770</b>	<b>15385</b>	<b>19965</b>	<b>37187</b>	<b>2406</b>	<b>48192</b>	<b>61584</b>	<b>115690</b>

Tomado de: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/509528/sem44.pdf>

El control de estas parasitosis se realiza principalmente con compuestos bencimidazólicos del tipo del albendazol y mebendazol.<sup>3</sup>

## **1.2. La necesidad de medicamentos genéricos en México**

Las helmintiasis, al ser un problema de salud característico de zonas de mayor pobreza, es necesario asegurar que se tenga acceso a los medicamentos para el tratamiento y la prevención de contagios.

Los medicamentos son un elemento esencial en la búsqueda del grado máximo de salud, por lo tanto, cualquier dificultad en el acceso a este recurso va a repercutir directamente en la calidad de vida de la población. Las patentes de medicamentos, fundamentadas inicialmente en la protección de la propiedad intelectual, cuando son utilizadas en exceso y sin verdaderas restricciones, llevan al establecimiento de monopolios que determinan los elevados precios del producto. Este elevado costo, es uno de los principales factores que determinan las dificultades en el acceso a los medicamentos en los países en vías de desarrollo. Las políticas de medicamentos genéricos han surgido como una alternativa posible a esta problemática, ya que no sólo se centran en la reducción del precio, si no que a su vez aseguran la calidad del producto.<sup>6</sup>

Desde la perspectiva económica, está claro que la publicidad y la "marca" o "nombre fantasía" es una de las principales diferencias entre el medicamento original y el genérico que determina la diferencia de precios. El laboratorio que introduce por primera vez el producto en el mercado y goza de la protección de patentes durante un tiempo, es quien más invierte en promoción para afianzar su marca comercial. Los segundos oferentes del medicamento, que entran una vez que la patente ha caducado, pueden tener o no un nombre de fantasía, pero, generalmente, no invierten en promoverlo. Compiten, no diferenciándose, sino ofreciendo mejores precios. Cuando se cumplen las dimensiones legales y fármaco-clínicas es cuando se puede

implementar un mercado basado en la competencia por precios, ya que inmediatamente al finalizar la protección por patentes se elimina el precio monopólico.<sup>6</sup>

Además, en la medida que ingresen nuevos oferentes al mercado, la competencia por precios se fortalecerá y estos tenderán a converger con el valor de *commodity* (aquel valor que se determina en función de las condiciones de oferta y demanda del mercado, sí el bien es escaso su precio tenderá a incrementarse y viceversa).<sup>7</sup>

Para que un genérico pueda ser lanzado al mercado debe cumplir con requerimientos de calidad:

El primer nivel en el desarrollo de sistema de aseguramiento de calidad, es el cumplimiento de Buenas Prácticas de Manufactura por todos los fabricantes. Éstas garantizan la uniformidad del comportamiento de las unidades del producto dentro de un lote de producción y entre lotes diferentes e incluyen los aspectos de control de calidad relacionada con la pureza, identidad y potencia.<sup>7</sup>

Un segundo nivel en el aseguramiento de la calidad lo establecen estudios de estabilidad que garantizan la conservación de las propiedades en el tiempo y aseguran la disponibilidad de productos seguros y confiables.<sup>7</sup>

Asimismo, los estudios de biodisponibilidad son críticos para fármacos de acción sistémica o local dado que aportan la evidencia directa de cuando se inicia la respuesta, su duración e intensidad y el comportamiento de los niveles sanguíneos en una terapia crónica o aguda.<sup>7</sup>

### 1.3. Albendazol

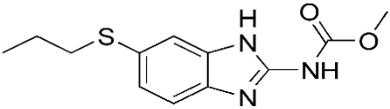
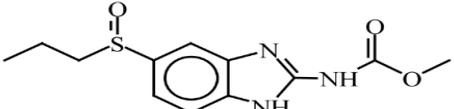
Para desarrollar un método analítico es necesario conocer al analito de interés.

El albendazol es un derivado del benzimidazol, se caracteriza por ser un agente antihelmíntico de amplio espectro y ha demostrado una buena eficacia en el tratamiento de la equinocosis, los quistes hidatídicos y la neurocisticercosis. Puede detectarse en orina, líquido cefalorraquídeo, hígado, plasma o bilis.<sup>4</sup> El albendazol es farmacológicamente inactivo, su principal metabolito es el sulfóxido de albendazol, el cual presenta la actividad farmacológica.<sup>8</sup>

#### 1.3.1. Propiedades fisicoquímicas.

La estructura, nombre IUPAC, fórmula condensada y peso molecular del albendazol y sulfóxido de albendazol se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Estructura y masa molar del sulfóxido de albendazol y albendazol. <sup>(8-11)</sup>

Analito	Estructura	Fórmula condensada	Masa Molar	Nombre IUPAC
Albendazol		$C_{12}H_{15}N_3O_2S$	265.331 g / mol	Metil <i>N</i> - (6-propilsulfanil-1H-benzimidazol-2-il) carbamato
Sulfóxido de albendazol		$C_{12}H_{15}N_3O_3S$	281.33 g / mol	Metil <i>N</i> - (6-propilsulfinil-1H-benzimidazol-2-il) carbamato

El albendazol es un polvo cristalino incoloro con punto de fusión de entre 208 y 210

°C. Es insoluble en agua, ligeramente soluble en metanol, acetonitrilo, cloroformo. Muy soluble en dimetilsulfóxido, ácidos y bases fuertes. Su pKa es de 10.6.

El sulfóxido de albendazol es insoluble en agua y su pKa es de 9.8. Estos valores de pKa se atribuyen a la pérdida del protón del grupo amino de la cadena lateral.<sup>12</sup>

### **1.3.2. Farmacodinamia**

Después de la administración de una dosis de albendazol vía oral, este tiene una pobre absorción, sin embargo, la proporción que alcanza a ser absorbida es rápidamente metabolizada a sulfóxido de albendazol.

La formación de sulfóxido de albendazol se cataliza por la monooxigenasa de flavina microsomal e isoformas del citocromo P450 en el hígado y posiblemente también en el intestino. La actividad de la monooxigenasa de flavina hepática se asocia con la formación de (+) sulfóxido de albendazol, mientras que los citocromos P450 producen preferentemente el metabolito sulfóxido (-). Ambos derivados de sulfóxido se oxidan aún más al metabolito de sulfona no quiral de albendazol, que es farmacológicamente inactivo; esta reacción favorece al (-) sulfóxido y probablemente se convierta en una limitación de la velocidad para determinar el aclaramiento y la vida media en plasma del metabolito de (+) sulfóxido bioactivo. Presenta efecto vermífida, larvífida y ovífida frente a varias especies de nemátodos, céstodos y tremátodos.<sup>8</sup>

El sulfóxido de albendazol provoca cambios degenerativos en las células tegumentarias de los helmintos y protozoarios, se ha propuesto que inhibe la polimerización de la tubulina para formar el microtúbulo nuclear, afectando la división mitótica de la célula. Se suprime, de esta manera, el intercambio metabólico nutricional entre la membrana y las estructuras internas de la célula. También inhibe el fumarato reductasa, enzima que participa activamente en la síntesis de ATP, fuente

de energía indispensable para que la célula pueda llevar a cabo sus múltiples funciones.<sup>12</sup>

### **1.3.3. Farmacocinética**

#### **1.3.3.1. Absorción**

Al ser prácticamente insoluble en agua, el albendazol se absorbe entre el 1 y el 5 % de la dosis administrada en humanos. La absorción se lleva a cabo en el estómago y en el intestino delgado siguiendo cinética de orden cero y un proceso de difusión pasiva. Después de una administración oral de 15 µg/Kg, los niveles plasmáticos máximos del sulfóxido se presentan entre las 2 y 3 horas posteriores a su administración.<sup>6</sup> El sulfóxido total alcanza una concentración plasmática máxima de aproximadamente 300 ng/mL, pero con una amplia variación interindividual.<sup>13</sup>

Se ha encontrado que la absorción del albendazol se incrementa al administrar el fármaco con una dieta rica en lípidos, aparentemente debido a que la presencia de lípidos en el duodeno puede incrementar el flujo biliar y mejorar la absorción por la acción detergente de ácidos biliares. Después de la administración conjunta con dexametasona, los niveles de sulfóxido de albendazol se incrementan en un 50 %.<sup>14</sup>

#### **1.3.3.2. Metabolismo**

El albendazol se metaboliza rápidamente en el hígado y posiblemente también en el intestino a sulfóxido de albendazol, que tiene una potente actividad antihelmíntica. Se forman tanto los enantiómeros (+) como (-) del sulfóxido de albendazol, pero en los seres humanos el enantiómero (+) alcanza un pico mucho más alto de

concentración en plasma y se elimina mucho más lentamente que la forma (-). Tiene una vida media plasmática altamente variable (de entre 4 y 15 horas).<sup>14</sup>

### **1.3.3.3. Distribución**

El sulfóxido de albendazol se distribuye ampliamente a través del organismo, su unión a proteínas oscila entre el 60 % y 70 %. Se une en proporciones iguales a la albúmina y a la alfa glicoproteína. Este grado de unión es independiente de la concentración. También alcanza el líquido cefalorraquídeo. De la concentración que alcanza en la circulación general, alrededor del 50 % atraviesa la barrera hematoencefálica.<sup>13</sup>

Cuando se emplea para el tratamiento de hidatidosis se distribuye incluso en los quistes, donde alcanza una concentración de alrededor de una quinta parte en plasma. Esto probablemente explica porqué el albendazol es más efectivo que el mebendazol para tratar la enfermedad del quiste hidatídico.<sup>13</sup>

### **1.3.3.4. Eliminación**

El tiempo de vida media del albendazol oscila entre 8 y 12 h. La excreción urinaria es una vía menor de eliminación con menos del 1 % de la dosis recuperada en la orina. La eliminación biliar es la que predomina.<sup>10</sup>

Los metabolitos del albendazol se excretan principalmente en la orina.<sup>10</sup>

#### **1.3.4. Efectos adversos**

Se ha producido leucopenia en menos del 1% de los pacientes que reciben albendazol y, rara vez, se han notificado casos de pancitopenia, agranulocitosis o trombocitopenia.<sup>14</sup>

Debido a que el albendazol se ha asociado con aumentos leves a moderados de las enzimas hepáticas en aproximadamente el 16 % de los pacientes que reciben el medicamento en ensayos clínicos, y puede causar hepatotoxicidad, deben realizarse pruebas de función hepática antes de cada ciclo de tratamiento con albendazol y al menos cada 2 semanas durante el tratamiento con el fármaco.<sup>14</sup>

Ocasionalmente aparecen dolor abdominal, diarrea, náuseas, mareos y dolor de cabeza. El efecto secundario más común es un aumento en la actividad de la aminotransferasa sérica; en raras ocasiones, se puede observar ictericia o colestasis química, pero las actividades enzimáticas vuelven a la normalidad una vez que se completa la terapia.<sup>14</sup>

#### **1.4. Bioequivalencia**

El concepto de biodisponibilidad comprende tanto la cantidad de ingrediente activo disponible sistémicamente, como la velocidad a la cual se presenta en la circulación sanguínea una vez cumplida la etapa de absorción desde la forma farmacéutica que lo contenía.<sup>15</sup> Se consideran medicamentos bioequivalentes a aquellos que alcanzan la circulación sistémica de modo similar al de referencia. De esta forma se alcanzan las mismas concentraciones sanguíneas, es decir que son igualmente biodisponibles y en consecuencia la eficacia y seguridad son las mismas.<sup>16</sup>

Para conocer si dos medicamentos son bioequivalentes se realiza un estudio de bioequivalencia, el cual es un ensayo clínico en sujetos de investigación a los que se

les administra el medicamento genérico y el innovador separados por un periodo de lavado. Durante el estudio se toman muestras seriadas de sangre para construir una curva tiempo - concentración plasmática del principio activo. Si ambas curvas se superponen existirá bioequivalencia.<sup>16</sup> Los estudios de bioequivalencia permiten afirmar que un genérico es intercambiable con el producto innovador.<sup>17</sup>

El concepto de bioequivalencia implica semejanza, dentro de ciertos límites estadísticos, entre las biodisponibilidades de dos productos farmacéuticos que poseen un mismo medicamento con la misma dosis.<sup>16</sup>

Previo a la realización de un estudio de bioequivalencia, es necesario desarrollar y validar un método analítico que permita la detección y cuantificación del fármaco, por lo que se requiere conocer las propiedades físicas, químicas y farmacológicas de este.

### **1.5. Importancia del desarrollo de métodos analíticos en muestras biológicas (bioanálisis).**

El bioanálisis es una disciplina de la química analítica enfocada a la medición cuantitativa de agentes xenobióticos y bióticos (proteínas, macromoléculas, ADN, fármacos de gran peso molecular o metabolitos provenientes de seres humanos, animales y vegetales). Los métodos bioanalíticos permiten cuantificar con exactitud y de forma fiable estos analitos.<sup>18</sup> Los métodos analíticos son usados para la determinación cuantitativa de fármacos y otros metabolitos en muestras biológicas, jugando un rol muy importante en la evaluación e interpretación de la biodisponibilidad, bioequivalencia y la información farmacocinética. Se deben considerar las propiedades fisicoquímicas de los analitos, así como las características de la matriz biológica en la que estará presente. Todo esto para seleccionar un proceso de extracción óptimo.<sup>18</sup>

En la industria farmacéutica se aplica principalmente en las áreas de la farmacocinética, toxicocinética, bioequivalencia, así como en las investigaciones forenses.<sup>18</sup>

El área de bioanálisis puede abarcar una gama muy amplia de ensayos que apoyan los estudios clínicos y preclínicos.<sup>18</sup>

En el bioanálisis influyen muchos factores para el desarrollo de métodos, por ejemplo, la composición de las matrices biológicas, el intervalo de concentraciones necesario para la cuantificación de los analitos, el número y las estructuras de los analitos, las propiedades fisicoquímicas de los analitos y la estabilidad de las matrices biológicas y del analito desde el momento de la toma de muestra hasta su análisis. A su vez, es necesario considerar los requerimientos de equipo y costos.<sup>18</sup>

#### **1.6. Extracción de fármacos de una matriz biológica.**

El bioanálisis en la industria farmacéutica provee mediciones cuantitativas del fármaco activo y/o sus metabolitos para propósitos farmacocinéticos, toxicocinéticos, de bioequivalencia y de análisis dosis-respuesta. También se aplica para fármacos de uso ilícito, investigación forense y test de anti-doping en deportes.<sup>19</sup>

Debido a que las matrices biológicas son extremadamente complejas, formadas por muchos componentes que pueden interferir con una buena separación y/o óptimas señales en el espectrómetro de masas, la preparación de la muestra es un aspecto importante para la estimación bioanalítica.<sup>19</sup>

Para realizar el análisis de un analito que se encuentra inmerso en una matriz biológica, es necesario aplicar procedimientos para optimizar la sensibilidad y eliminar contaminantes que pongan en riesgo el equipo de HPLC.<sup>19</sup>

Es recomendable, antes de iniciar el proceso de extracción, eliminar la mayor parte de los componentes de la matriz biológica que puedan interferir en este. Los principales fluidos que son utilizados para determinar un analito en el ámbito farmacocinético son la sangre, el plasma, el suero, la orina, el fluido cerebroespinal, las heces y, en menor medida la bilis, la saliva y otros tejidos como el muscular. Dependiendo del fluido biológico la limpieza de la muestra debe ser más o menos estricta.<sup>20</sup>

La sangre es el fluido más complejo de los antes mencionados. Consiste en un fluido con un sistema de amortiguación de pH, proteínas solubilizadas, grasas disueltas, una gran variedad de sustancias endógenas y células suspendidas como los eritrocitos, entre otros componentes. La separación debe realizarse con especial cuidado, ya que, si la sangre no se trata correctamente, se puede provocar la liberación de sustancias que pueden interferir fuertemente en la extracción del analito, por ejemplo, al cambiar las propiedades osmóticas de la muestra, puede conducir a la lisis celular de los eritrocitos y la liberación de iones hierro, los cuales, dependiendo de la naturaleza del compuesto, pueden formar quelatos con el analito, provocando una pobre extracción en la fase acuosa.<sup>19</sup>

El plasma es uno de los fluidos biológicos preferidos para realizar los estudios farmacocinéticos. Se obtiene fácilmente después de centrifugar la sangre con algún anticoagulante por un determinado tiempo. Sin embargo, algunos fármacos presentan tendencia a unirse firmemente a algunas proteínas plasmáticas como la albúmina y la alfa-glicoproteína.<sup>19</sup>

Los estudios en orina tienen la ventaja de no ser procedimientos invasivos y generalmente, dicho fluido se encuentra libre de proteínas o lípidos.<sup>19</sup>

### **1.6.1. Métodos de extracción en muestras biológicas.**

Los métodos de extracción de muestras tienen distintos objetivos como la concentración, mejorando la cuantificación del analito, y la separación del analito de interés de otros componentes de la muestra.<sup>19</sup>

A continuación, se presentan los diferentes métodos de extracción en muestras biológicas.

#### **1.6.1.1. Precipitación de proteínas.**

Consiste en la adición de un agente precipitante a la matriz biológica y, mediante agitación, desnaturalizar las proteínas presentes en el plasma. Luego de realizar la precipitación, la muestra se centrifuga y se recupera el sobrenadante que será la muestra que se inyectará al sistema cromatográfico.<sup>21</sup>

Existen diferentes métodos de precipitación de proteínas:

- Precipitación con sales: elimina el agua de la proteína hidratada dejando regiones hidrofóbicas expuestas por efecto de solvatación.<sup>21</sup>
- Precipitación isoeléctrica: ocurre por la disminución de la solubilidad a causa de la modificación del pH, llevándolo por debajo o encima del punto isoeléctrico de las proteínas.<sup>21</sup>
- Precipitación con polímeros no iónicos: Esta técnica se utiliza para el fraccionamiento de macromoléculas. Se utiliza un polisacárido (dextrano) o polietilenglicol.<sup>22</sup>

Estos polímeros solubles actúan como precipitantes reduciendo la cantidad de agua disponible para que se disuelvan las proteínas. Este efecto es independiente del pH y de la fuerza iónica. Sólo depende de la concentración del polímero y de las dimensiones de la macromolécula.<sup>22</sup>

- Precipitación con disolventes orgánicos: se disminuye la solubilidad de las proteínas a causa de que el disolvente orgánico presenta una constante dieléctrica menor al agua, lo que provoca un incremento en la atracción de cargas opuestas y disminución en el grado de ionización en los radicales de las proteínas.<sup>21</sup>

### 1.6.1.2. Método de extracción líquido-líquido.

Consiste en la mezcla de dos sustancias líquidas inmiscibles que forman dos fases, generalmente una de ellas es la fase orgánica y la otra es la fase acuosa (Fig. 1). La elección del disolvente orgánico a utilizar en la extracción dependerá de la solubilidad del analito en dicho disolvente, así como el volumen que se debe utilizar. Se debe tomar en cuenta que a mayor volumen de disolvente orgánico se invertirá un mayor tiempo de evaporación, también es importante tomar en cuenta la toxicidad de los disolventes a utilizar.<sup>21</sup>

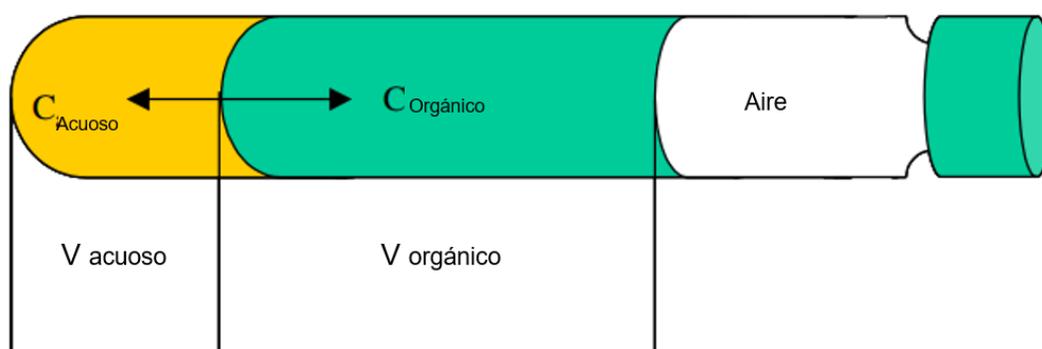


Figura 1. Extracción líquido- líquido.<sup>22</sup>

Para compuestos que se difunden poco en la fase orgánica, la mezcla debe ser vigorosa y con un volumen grande de disolvente (5 a 20 veces el volumen de la

muestra). Las fases pueden ser separadas por gravedad, centrifugación o mediante una membrana semipermeable.<sup>23</sup>

Este método permite la concentración, purificación y aislamiento del analito, sin embargo, se pueden presentar emulsiones al realizar la agitación vigorosa.<sup>21</sup>

### **1.6.1.3. Método de Extracción en Fase Sólida.**

Comparado con la precipitación y la extracción líquido-líquido, el uso de la extracción sólido- líquido es recientemente utilizada.<sup>23</sup>

Este método consiste en el paso de la matriz biológica a través de una membrana con propiedades características que funciona de dos formas, dependiendo de la masa molecular del analito. Uno de ellos es reteniendo el/los analitos y algunos contaminantes o bien, que los analitos eluyan y se retengan los contaminantes de la muestra. Las ventajas de este método son la purificación de la muestra y la concentración del analito de interés.<sup>21</sup>

El primer paso para la extracción sólido-líquido consiste en la activación del cartucho que contiene la membrana. Después continúa con la fase de carga, el lavado y finalmente la elución. En este último paso se recupera el analito de interés concentrado.<sup>21</sup> En la figura 2 se muestran los pasos para realizar la técnica de extracción sólido- líquido.

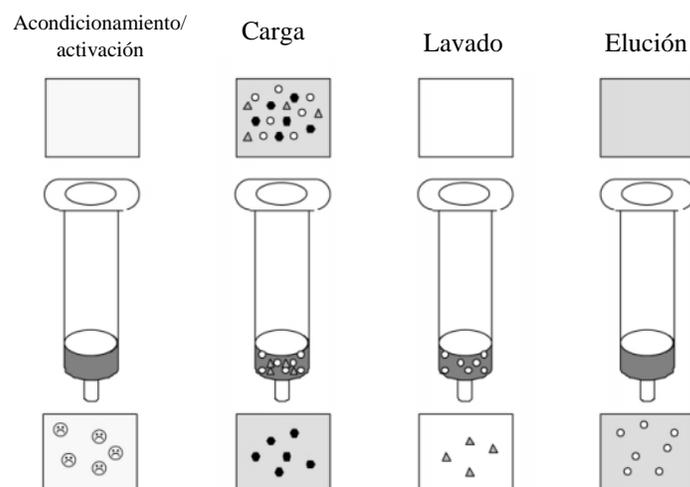


Figura 2. Pasos para la extracción en fase sólida.<sup>24</sup>

## 1.7. Cromatografía.

La cromatografía agrupa un conjunto importante de diversos métodos que facilitan la separación, identificación y determinación de componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas. En todas las separaciones cromatográficas la muestra se disuelve en una fase móvil (gas, líquido o fluido supercrítico) la cual se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible fija en una columna o una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen en grados distintos entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven con mucha lentitud con el flujo de la fase móvil.<sup>25</sup>

### 1.7.1. Tipos de cromatografía.

Los distintos procedimientos que utilizan la cromatografía de líquidos tienden a ser complementarios en lo que se refiere a sus campos de aplicación. A continuación se

describen los distintos tipos de cromatografía de líquidos de acuerdo con los distintos tipos de fases utilizadas para el análisis.

#### **1.7.1.1. Cromatografía de Reparto.**

- **Cromatografía de fase normal:** Consiste en una fase estacionaria de carácter polar y la fase móvil de carácter no polar. El principio de este tipo de cromatografía es la interacción de un analito polar con la fase estacionaria, por lo que el tiempo de elución se ve afectado por el grado de polaridad del analito. La fase estacionaria puede ser un sólido adsorbente como la sílice o alúmina, también puede ser un soporte al que se unen químicamente moléculas orgánicas con grupos de alta polaridad como los grupos ciano, amino, etc.<sup>25</sup>
- **Cromatografía de fase reversa:** Es ampliamente utilizada y consiste en una fase estacionaria no polar, que son cadenas hidrocarbonadas o con grupos fenilo, y una fase móvil polar que utiliza como disolventes principalmente el acetonitrilo, metanol y tetrahidrofurano con agua. La retención está basada en una atracción entre la fase estacionaria y la región no polar del analito.<sup>25</sup>

#### **1.7.1.2. Cromatografía de Adsorción**

La fase estacionaria es un adsorbente polar, dividido finamente. Este tipo de cromatografía se basa en la separación en repetidas etapas de adsorción- desorción, esto debido a que el analito compite con la fase móvil por los sitios sobre la superficie del empaquetamiento y la retención se da por el fenómeno de adsorción.<sup>25</sup>

### **1.7.1.3. Cromatografía de Exclusión Molecular.**

La fase estacionaria consiste en un material poroso, de tamaño de poro controlado, cuyo principio se basa en el tamaño de la molécula ya que el tamaño de poro permite el paso de determinados analitos. Su aplicación principal es para determinar estructuras terciarias y cuaternarias de proteínas y para el cálculo de peso molecular de polisacáridos.<sup>25</sup>

### **1.7.1.4. Cromatografía de Intercambio Iónico.**

En este tipo de cromatografía la fase estacionaria presenta en la superficie grupos ionizados capaces de retener iones con carga contraria que se encuentren en la fase móvil. Una aplicación de este tipo de cromatografía es la purificación de agua.<sup>25</sup>

### **1.7.1.5. Cromatografía de Bio-afinidad.**

Consiste en la formación de un enlace covalente entre un ligando con un soporte sólido de manera reversible, utilizando como principio la selección específica de moléculas como enzimas por sustratos o anticuerpos con antígenos. Esta técnica se utiliza para la purificación de ciertas muestras en las que se encuentra el analito de interés en una mezcla de componentes.<sup>25</sup>

### **1.7.1.6. Cromatografía de Fluidos Supercríticos (SFC).**

La cromatografía de fluidos supercríticos se inventó para ampliar la capacidad de la cromatografía de gases. Esto con la tarea de analizar compuestos más pesados que requerían altas temperaturas para elución pero que no podían soportar tales temperaturas sin descomposición térmica, Klesper et al. emplearon presiones más altas para compensar el requisito de altas temperaturas. Se mantuvieron temperaturas

por encima del punto crítico, posiblemente para asegurar que la presión del gas podría incrementarse continuamente sin pasar por las condiciones bifásicas vapor-líquido.

Este esfuerzo dio origen a la cromatografía de fluidos supercríticos. La principal diferencia entre GC y SFC es el papel que juega la fase móvil, que de ser casi neutro en GC para desempeñar un papel activo en la elución del compuesto en SFC, aumentando la solubilidad del analito a través del aumento de la densidad de la fase móvil.

La CFS moderna no necesariamente emplea un fluido supercrítico como fase móvil. Desarrollos tempranos en la técnica emplearon varios fluidos diferentes en su estado supercrítico (con presión y temperatura por encima de los valores críticos), es decir, los fluorocarbonos, amoníaco o dióxido de carbono. Entre todos los fluidos posibles, el dióxido de carbono es el más utilizado, por varias razones:

- a) Los valores críticos de presión y temperatura son moderados (7,3 MPa y 31 °C)
- b) Tiene características interesantes para la salud y la seguridad, siendo no inflamable, no corrosivo y con toxicidad limitada;
- c) Es barato ya que se obtiene como subproducto de muchas industrias; se puede reciclar cuando se utilizan grandes cantidades
- d) Es miscible con la mayoría de los disolventes orgánicos, lo que permite una amplia posibilidad de optimizar las separaciones cromatográficas y disolver una amplia gama de analitos.

#### **1.7.1.7. Cromatografía de Reparto Centrífugo.**

La cromatografía de reparto centrífugo (CRC) pertenece a los métodos basados en cromatografía de contra-corriente (CCC). La separación se basa en el comportamiento de partición de los componentes de la muestra entre dos líquidos

inmiscibles. Así como en UHPLC, la fase retenida en la columna se denomina fase estacionaria, la otra recibe el nombre de fase móvil. En la CCC existen dos mecanismos de equilibrio para las dos fases inmiscibles. Ambas dependen de las características del campo de fuerza centrífuga el cual permite la retención de la fase estacionaria dentro de la columna. Los dispositivos que equilibran las fases de acuerdo al denominado modo hidrodinámico, emplean una fuerza centrífuga la cual varía en intensidad y dirección.

#### **1.7.1.8. Cromatografía Líquida Micelar**

La Cromatografía Líquida Micelar (MLC, micellar liquid chromatography) es una variante de la cromatografía de líquidos en fase reversa. Emplea como fase móvil disoluciones de un tensoactivo en concentración suficientemente elevada como para formar micelas. La mayoría de los procedimientos de MLC propuestos hacen uso del tensoactivo aniónico dodecilsulfato de sodio (SDS). Los análisis cromatográficos en MLC se llevan a cabo por lo general utilizando columnas C18 o C8.

Cuando se emplea un tensoactivo en una fase móvil y se añade progresivamente hasta alcanzar una cierta concentración denominada concentración micelar crítica (CMC), las moléculas de tensoactivo se agregan espontáneamente para formar estructuras globulares (micelas) en las que la parte hidrofóbica de dichas moléculas se dirige hacia el interior, dejando la parte polar expuesta hacia la disolución.

La adición de tensoactivo a la fase móvil también da lugar a cambios significativos en la columna (fase estacionaria). Cuando se hace circular una fase móvil micelar, la fase estacionaria comienza a absorber monómeros de tensoactivo hasta alcanzar la saturación, permaneciendo una pequeña cantidad de monómeros libres en coexistencia con las micelas. La fase estacionaria modificada afecta la distribución

de los solutos aumentando su retención, modificando notablemente los equilibrios de transferencia de los solutos entre ambas fases.

### **1.8. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).**

La cromatografía de líquidos es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada, esto debido a su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para automatizarla, su capacidad para separar especies no volátiles o termolábiles, pero, sobre todo, a su amplia aplicabilidad a sustancias que son importantes en la industria.<sup>25</sup>

Su principal ventaja es la de poder detectar compuestos en concentraciones muy bajas, del orden de ng/mL, además de que la técnica permite separar las muestras luego de determinar las condiciones más adecuadas en las que el compuesto de interés se encuentre aislado de las impurezas.<sup>25</sup>

La técnica de HPLC tiene aplicaciones importantes en el área farmacéutica, bioquímica, clínica, forense, alimentaria, industria química y ambiental, en la identificación de fármacos, estudios de disolución para la cuantificación, en el biomonitoreo de sustancias tóxicas, determinación de sustancias de abuso en sangre, análisis enzimático en muestras de plasma, análisis de composición de alimentos, entre otras.<sup>25</sup>

La resolución de la cromatografía de líquidos mejora al disminuir el tamaño de partícula de la fase estacionaria. En la cromatografía de líquidos, un aumento correspondiente en la rapidez de equilibrio del soluto entre fases se induce reduciendo las dimensiones de las partículas de la fase estacionaria, lo cual reduce la distancia a la que el soluto puede difundirse en ambas fases. Sin embargo, el precio de utilizar partículas muy finas es la resistencia al flujo. Por tanto, es necesario emplear alta presión para forzar el paso del líquido a través de la columna.<sup>30</sup> Con este principio es

que se mejoró la técnica de cromatografía de líquidos clásica, creando así la Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (HPLC) y la Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Presión (UHPLC).

### 1.8.1. Equipo HPLC

Con el objetivo de alcanzar flujos razonables con rellenos de partícula de entre 3 y 10 $\mu$ m, se requieren presiones de bombeo de varios cientos de atmósferas. Debido a estas elevadas presiones, el equipo necesario para la cromatografía de líquidos de alta resolución tiende a ser más complejo y caro que otros tipos de cromatografía. En la *figura 4* se muestra un esquema de los componentes fundamentales de un cromatógrafo de líquidos.<sup>21, 25</sup>

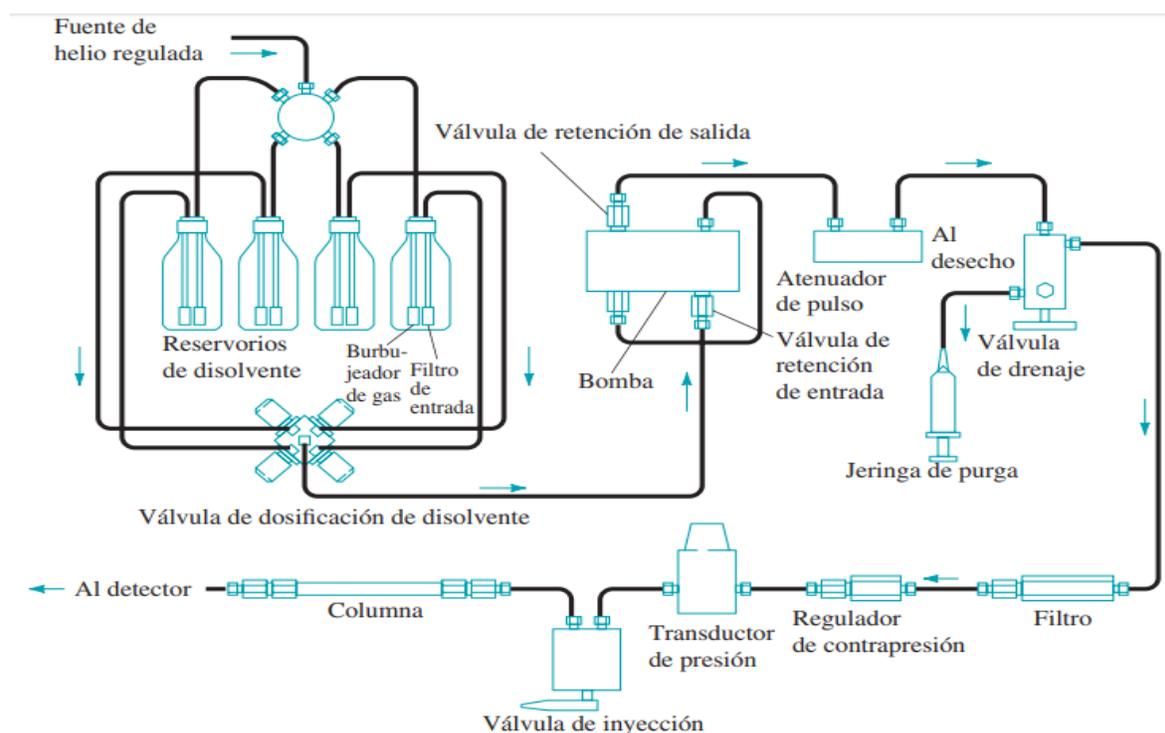


Figura 3. Diagrama que muestra los componentes de un equipo característico de HPLC.<sup>25</sup>

### 1.8.1.1. Fase móvil y sistemas para el tratamiento del disolvente.

La cromatografía de adsorción sobre sílice pura es un ejemplo de cromatografía de fase normal, que se caracteriza por usar una fase estacionaria polar y un eluyente menos polar. Un disolvente más polar tiene fuerza eluyente mayor.<sup>30</sup>

En la cromatografía de fase reversa, que es la más utilizada, se caracteriza por tener la fase móvil más polar que la fase estacionaria. Un disolvente menos polar tiene mayor fuerza eluyente.<sup>30</sup>

Existen diferentes tipos de elución:<sup>30</sup>

- **Elución isocrática:** se lleva a cabo con un único disolvente (o mezcla de disolventes de composición fija).
- **Elución en gradiente:** Si un disolvente no permite una elución suficientemente rápida de todos los componentes se puede utilizar una elución con gradiente. En este caso se van añadiendo cantidades crecientes del disolvente B al disolvente A, produciendo así un gradiente continuo.

En una separación de fase reversa, la fuerza eluyente disminuye a medida que el disolvente se hace más polar.

En HPLC se necesitan disolventes muy puros y caros, de calidad HPLC, para evitar que se degraden por impurezas las columnas y para minimizar el ruido de fondo de las señales del detector debido a las impurezas. Se coloca un filtro en la salida del depósito del disolvente, para impedir el paso de partículas micrométricas.<sup>30</sup>

Los recipientes de vidrio a menudo están equipados con un sistema para eliminar los gases disueltos y el polvo de los líquidos. Los gases disueltos ocasionan flujos inestables y ensanchamiento de bandas; además, las burbujas y el polvo interfieren con el funcionamiento de los detectores.<sup>25</sup>

Cuando se trabaja con elución en gradiente en separaciones de fase reversa, después de cada análisis se debe pasar por la columna un volumen de disolvente igual a 10-20 volúmenes de columna vacía, para acondicionar la fase estacionaria con el disolvente antes del siguiente análisis. El reequilibrio puede durar tanto como una separación.<sup>30</sup>

#### **1.8.1.2. Sistemas de bombeo.**

El sistema de suministro de solvente comprende la bomba, las válvulas de retención, los controladores de flujo, los amortiguadores de pulso y los transductores de presión, que deben mantenerse para garantizar tasas de flujo reproducibles. La bomba debe ser fácil de mantener. Debe ser resistente a la corrosión de los eluyentes empleados y ser capaz de suministrar los caudales requeridos con un volumen de retención mínimo para cambios rápidos de solvente. La entrega de la fase móvil debe estar libre de pulsos para garantizar un ruido de línea de base mínimo de la bomba.<sup>31</sup>

Entre los requisitos para las bombas en cromatografía de líquidos está 1) la generación de presiones de hasta 6000 psi (lb/in<sup>2</sup>) o 414 bares y de hasta 1000 bares en UHPLC, 2) salida libre de pulsos, 3) tasas de flujo de 0.1 a 10 mL/min, 4) reproducibilidad del flujo de 0.5% relativo o mejor y 5) componentes resistentes a la corrosión a causa de la diversidad de disolventes.<sup>25</sup>

#### **1.8.1.3. Sistemas de inyección de la muestra**

El medio que más se usa para la introducción de las muestras en la cromatografía de líquidos se basa en los rizados de muestreo. Con frecuencia, estos dispositivos forman parte del equipo cromatográfico y hay rizados intercambiables que permiten la elección de tamaños de muestra desde 1 hasta 100 µL o más con volumen medidos de manera precisa y exacta.<sup>25</sup>

#### **1.8.1.4. Horno para la columna.**

En algunos sistemas, la columna se coloca en un horno cuya temperatura puede regularse a valores entre 25 y 100°C. Al aumentar la temperatura de la columna disminuye la viscosidad del disolvente, de modo que se requiere menos presión para obtener un gasto dado. El aumento en la temperatura también reduce el tiempo de retención de los analitos.<sup>25</sup>

#### **1.8.1.5. Precolumnas.**

Funcionan para aumentar la vida de la columna analítica. Eliminan no sólo la materia en suspensión, sino también los componentes de la muestra que se unen de manera irreversible a la fase estacionaria. La composición del relleno de la precolumna debería ser semejante al de la columna analítica, pero el tamaño de partícula es mayor para minimizar la caída de presión.<sup>25</sup>

#### **1.8.1.6. Columnas para cromatografía de líquidos de alta resolución.**

Las columnas representan a la fase estacionaria. Su soporte más común son partículas microporosas esféricas de sílice muy pura. Son permeables al disolvente y tienen un área superficial de varios centenares de metros cuadrados por gramo. La sílice, por lo normal, se disuelve en agua a pH superior a 8, por lo que no puede utilizarse por encima de ese pH. Algunas calidades de sílice son estables hasta pH 9 ó 10. Para analizar por cromatografía compuestos básicos a pH entre 8 y 12, se pueden usar soportes poliméricos, como el poliestireno. La fase estacionaria está unida covalentemente al polímero.<sup>30</sup>

La superficie de la sílice tiene hasta 8  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  de grupos silanol (Si-OH). Todos los grupos silanol están prácticamente protonados si el pH es  $\approx 2-3$ . Se disocian formando  $\text{Si-O}^-$  en un amplio intervalo de pH por encima de 3.<sup>30</sup>

La sílice pura se puede utilizar como fase estacionaria en cromatografía de adsorción. Más concretamente, en la cromatografía de reparto líquido-líquido, que se lleva a cabo con fase estacionaria enlazada covalentemente a la sílice.<sup>30</sup>

La mayoría de los empaquetamientos para cromatografía de fase enlazada se preparan por medio de una reacción de un organoclorosilano con los grupos -OH formados en las partículas de sílice mediante la hidrólisis de ácido clorhídrico diluido caliente. El producto es un organosiloxano. La reacción para un sitio SiOH en la superficie de la partícula se puede escribir como:<sup>25</sup>

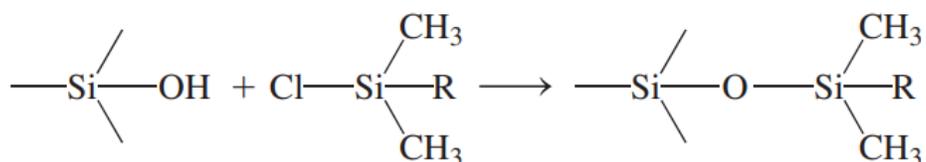


Figura 4. Reacción de sílice para formación de enlazamiento.<sup>25</sup>

Donde R puede ser una cadena recta de octilo o un grupo octadecilo.<sup>25</sup>

Otros grupos funcionales orgánicos que se han unido a superficies de sílice incluyen aminas alifáticas, éteres y nitrilos, así como hidrocarburos aromáticos. Por lo tanto, están disponibles muchas polaridades diferentes para la fase estacionaria enlazada.<sup>25</sup>

Las columnas para HPLC se construyen de ordinario con tubo de acero inoxidable de diámetro interno uniforme. Algunas ocasiones las columnas para HPLC se fabrican con tubos de vidrio de paredes resistentes. La mayoría de las columnas para cromatografía de líquidos miden de 5 a 25 cm de largo. El diámetro interior es a

menudo de 3 a 5 mm; los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes son 3 o 5  $\mu\text{m}$ . Las más utilizadas son las que miden 10 a 15 cm de longitud y 4.6mm de diámetro interior y están rellenas con partículas de 5  $\mu\text{m}$ .<sup>30</sup>

#### **1.8.1.7. Detectores.**

El detector ideal para HPLC debería poseer las siguientes características: Sensibilidad adecuada, buena estabilidad y reproducibilidad, respuesta lineal para los solutos, tiempo de respuesta corto independiente de la tasa de flujo, alta confiabilidad y manejo sencillo, respuesta semejante para todos los solutos, o, por el contrario, una respuesta selectiva y altamente predecible, no debe destruir la muestra y debe ser compatible con el flujo de líquidos. Por desgracia no hay un detector que reúna todas estas características.<sup>25</sup>

Existen varios tipos de sensores como el de fluorescencia, el detector UV-visible, detector de conductividad, el detector PDA, detector de índice de refracción, espectrometría de masas y detectores electroquímicos. La señal tomada desde el sensor se puede registrar como pico, y los datos respectivos pueden ser almacenados en la aplicación.<sup>25</sup>

#### **1.9. Espectrometría de masas (EM).**

La espectrometría de masas es una técnica cualitativa y cuantitativa de identificación que se basa en el cálculo de la masa con relación a la carga del analito. Puede emplearse para definir la masa molecular y la composición de un analito, incluyendo su elucidación estructural. Los elementos principales de un espectrómetro de masas son:<sup>32</sup>

- i. Fuente de ionización e interfaces.
- ii. Analizadores de masas.
- iii. Detector.

### **1.9.1. Ionización / Origen de ionización e interfaces.**

La cromatografía líquida divide la mezcla de diferentes componentes que están presentes en forma líquida, por lo general contiene metanol, acetonitrilo y agua. La mezcla líquida se mueve en la fuente de iones del espectrómetro de masas que permanece bajo alto vacío. Debido a las variaciones de presión, es difícil evaporar los glóbulos del líquido sin pérdida de los diferentes componentes de la mezcla. Por lo tanto, se utilizan diferentes interfaces para solucionar esta dificultad.<sup>32</sup>

#### **1.9.1.1. Introducción directa del líquido (DLI)**

La ionización en directo es generalmente llevada a cabo por evaporación del disolvente como ionización química y gas reactivo. Se han empleado dos sistemas de disolventes de fase normal y reversa. Los disolventes de fase reversa utilizados son el agua, mezcla de acetonitrilo: metanol: agua (con hasta un 60% de agua). La técnica se basa en controlar la energía térmica y la relación del flujo del líquido. El líquido ingresa a la interfaz para reducir sólo la velocidad de flujo. Los iones del analito formados con la ayuda de la energía térmica se transfieren a continuación a la fuente de iones a través de la entrada capilar.<sup>32</sup>

#### **1.9.1.2. Ionización a Presión Atmosférica (API)**

La ionización a presión atmosférica consta de tres pasos significativos: ionización, evaporación y nebulización. Los dos modos principales de API son la Ionización

Química a Presión Atmosférica (APCI) y la Ionización por Electrospray (ESI). En la técnica API, cuando un disolvente que contiene una muestra se mueve a través de un tubo capilar confinado y nebulizado en la cámara, se forma un velo de pequeñas gotas. Se da el proceso de ionización, y la proporción de gotas que llevan una carga de conducta eléctrica positiva o negativa se vuelve excesiva. En la larga cámara de calentamiento, la desecación del disolvente es necesaria para tener éxito. El agua se seca de las gotas para hacerlas aún más diminutas.<sup>32</sup>

### **1.9.1.3. Ionización por Electrospray (ESI).**

La ionización por electrospray es la técnica más utilizada. En esta, la muestra líquida se introduce a través de un capilar al que se aplica un voltaje elevado (generalmente, 2-5 kV). Bajo la influencia del campo eléctrico generado, los iones de la misma polaridad migran hacia el extremo del capilar donde el líquido empieza a formar un cono (cono de Taylor) a partir del cual se generan pequeñas gotas altamente cargadas. Para permitir la formación de un spray estable a flujos de 50-200  $\mu\text{l}/\text{min}$ , este proceso es asistido con un flujo coaxial de nitrógeno (gas de nebulización). A medida que avanzan a lo largo de la fuente de ionización, las gotas se van haciendo cada vez más pequeñas debido a la evaporación del disolvente, aumentando el número de cargas por unidad de superficie. Cuando las fuerzas de repulsión debidas al exceso de cargas superan las fuerzas de cohesión debido a la tensión superficial (límite de Rayleigh), se produce la fisión de las gotas. Este proceso de inestabilidad se repite sucesivamente, llevando a la formación de gotas mucho más pequeñas (3-10 nm) altamente cargadas. Posteriormente, tiene lugar el proceso de ionización de los componentes de la muestra en fase gaseosa, mediante la desorción de los componentes cargados desde la superficie de la gota.<sup>33</sup>

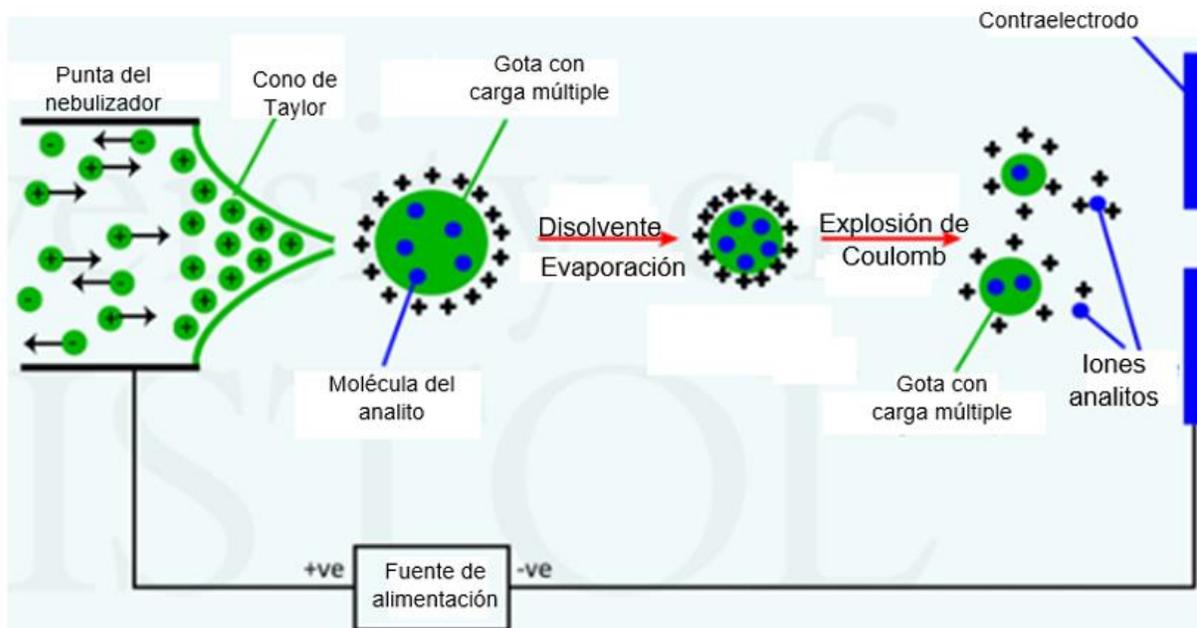


Figura 5. Ionización por electrospray.<sup>33</sup>

#### 1.9.1.4. Ionización Química a presión atmosférica (APCI).

Consiste en dos pasos fundamentales: desolvatación / evaporación de analitos y expulsión cargada en forma de vapor para la creación de iones. En esta ionización el disolvente de la muestra es nebulizado por el tubo capilar y en la cámara de calentamiento. En la cámara de calentamiento se da la dispersión de la solución a presión atmosférica, produciéndose pequeñas gotas. La ionización ocurre generalmente a 250-400°C. Posteriormente los iones mueven la carga de las moléculas mediante reacciones químicas. Los iones resultantes son transferidos a una abertura estrecha del analizador de masas. Se utiliza principalmente para analitos menos polares y no polares que tienen masas moleculares moderadas.<sup>32</sup>

## **1.9.2. Analizadores de masas.**

Una vez que los iones en fase gaseosa se han producido, necesitan ser separados de acuerdo con sus masas. La propiedad física que miden los analizadores de masas es su proporción de masa-carga ( $m/z$ ) en lugar de sólo su masa.<sup>32</sup>

Debido a que hay una gran variedad de fuentes, se han desarrollado varios tipos de analizadores de masas, por lo tanto, la separación de iones de acuerdo con su proporción de masa-carga pueden ser basados en principios diferentes. Todos los analizadores de masas utilizan electricidad estática o dinámica y campos magnéticos que pueden estar en combinación. La mayor parte de las diferencias entre los diversos tipos de analizadores de masas es la manera en que se utilizan dichos principios para la separación.<sup>32</sup>

Cada analizador de masas tiene sus ventajas y limitaciones. Los analizadores se pueden dividir en dos amplias clases de muchas propiedades:<sup>32</sup>

- Analizadores de exploración: transmiten los iones de diferentes masas sucesivamente a lo largo de una escala de tiempo. Son instrumentos magnéticos, con un tubo de vuelo en el campo magnético, permitiendo que solo pasen los iones de una relación masa-carga descrita en un momento dado, o instrumentos cuadrupolo.
- Analizador magnético dispersivo, analizador de masas tiempo de vuelo o los analizadores de masas de iones atrapados: Permiten la transmisión simultánea de todos los iones.

### **1.9.2.1. Analizadores de cuadrupolo.**

El analizador cuadrupolo es un dispositivo que utiliza la estabilidad de las trayectorias en campos eléctricos oscilantes para separar iones según sus relaciones  $m/z$ . Las trampas de iones 2D o 3D se basan en el mismo principio. Los analizadores

cuadrupolo están formados por cuatro barras de sección circular o, idealmente, hiperbólica. Las varillas deben estar perfectamente paralelas. El analizador de masas es el más útil y el más utilizado. Se compone de dos barras planas paralelas que se encuentran entre una fuente de iones y un detector.<sup>32</sup>

El cuadrupolo lineal consta de cuatro barras hiperbólicas o cilíndricas que se colocan paralelas en una matriz radial. Las barras opuestas se cargan positiva o negativamente mediante un potencial de corriente continua (CC) en el que se superpone un voltaje de corriente alterna de radio frecuencia (RF) oscilante. La combinación de radio frecuencia y corriente continua aplicada a las barras, forma trayectorias de los iones de una  $m/z$  particular estables, estos iones se transmiten hacia el detector. Por otro lado, los iones de  $m/z$  inestable se retiran de las barras.<sup>32</sup>

Los iones son introducidos al cuadrupolo por medio de un bajo potencial de aceleración. Los iones están oscilando en un plano perpendicular a la longitud de la barra a medida que pasan a través del cuadrupolo.<sup>32</sup>

Los iones que llevan la  $m/z$  correspondiente, en consecuencia, viajan hacia el detector aplicando voltaje de CC y RF en una relación constante. La resolución depende de la velocidad de los potenciales de CC y RF.<sup>32</sup>

En general, el cuadrupolo funciona a  $<4000$   $m/z$  y la velocidad de exploración es de hasta  $1000$   $m/z$  por paso.<sup>32</sup>

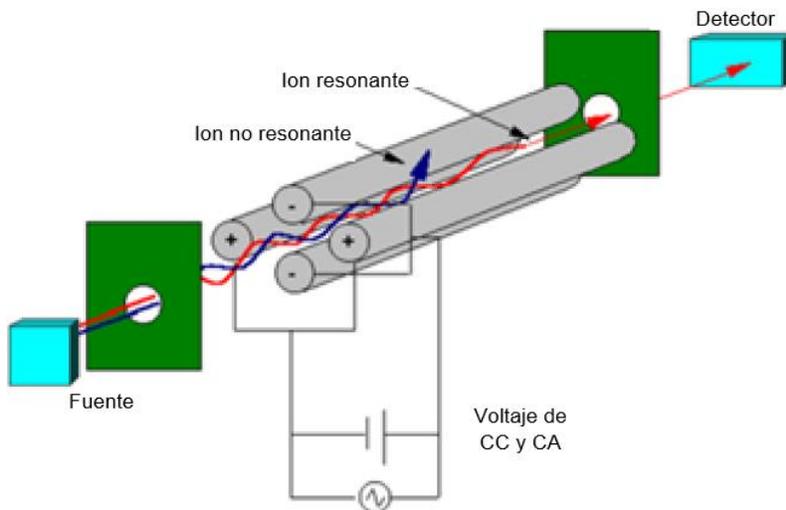


Figura 6. Analizador de cuadrupolo.<sup>35</sup>

### 1.9.2.2. Analizador de tiempo de vuelo.

En un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOF, por sus siglas en inglés), los iones generados en la fuente son acelerados mediante un potencial y viajan a través de un tubo de vuelo para alcanzar el detector de iones. Se mide el tiempo de llegada de iones en el detector, y se relaciona proporcionalmente con los valores  $m/z$ . Los iones pesados tardan más en llegar al detector, mientras que los iones ligeros llegan al detector antes. En esta técnica, más iones energéticos penetran más profundamente en el campo de reflexión para que estos iones tengan una trayectoria de vuelo más grande y tengan lugar en el detector al mismo tiempo que los iones con energía cinética más pequeña.<sup>32</sup>

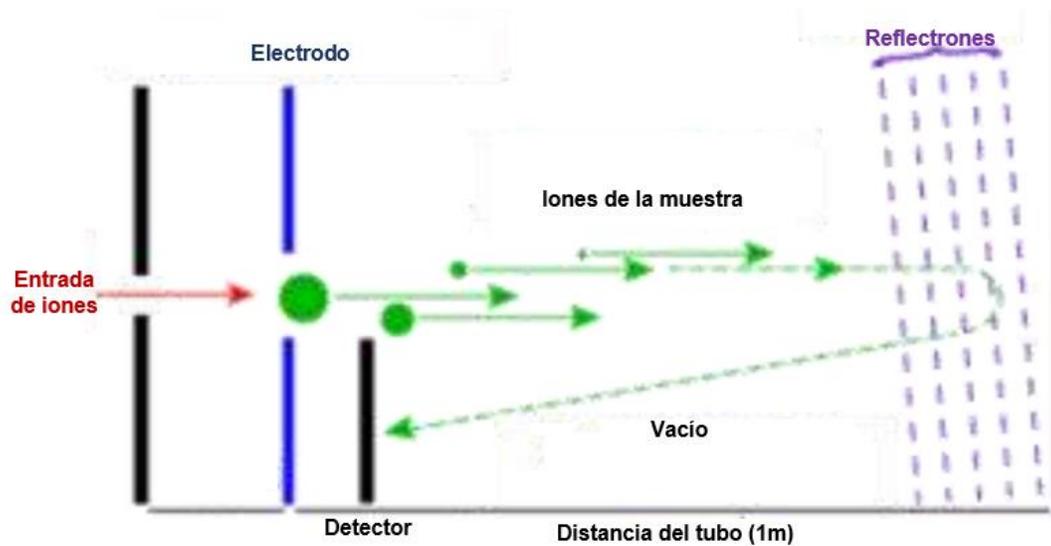


Figura 7. Analizador de tiempo de vuelo.<sup>33</sup>

### 1.9.2.3. Analizador de trampa de iones.

La trampa de iones es un análogo tridimensional del cuadrupolo lineal. Se compone de dos electrodos de extremo con secciones transversales hiperbólicas y un electrodo de anillo ubicado entre los extremos. El voltaje de Radio Frecuencia (RF) se aplica para el electrodo de anillo, y el potencial de tierra generalmente se opera en las tapas de los extremos. Se produce en el cuadrupolo un campo eléctrico de rotación simétrico para atrapar iones con movimientos estables.<sup>32</sup>

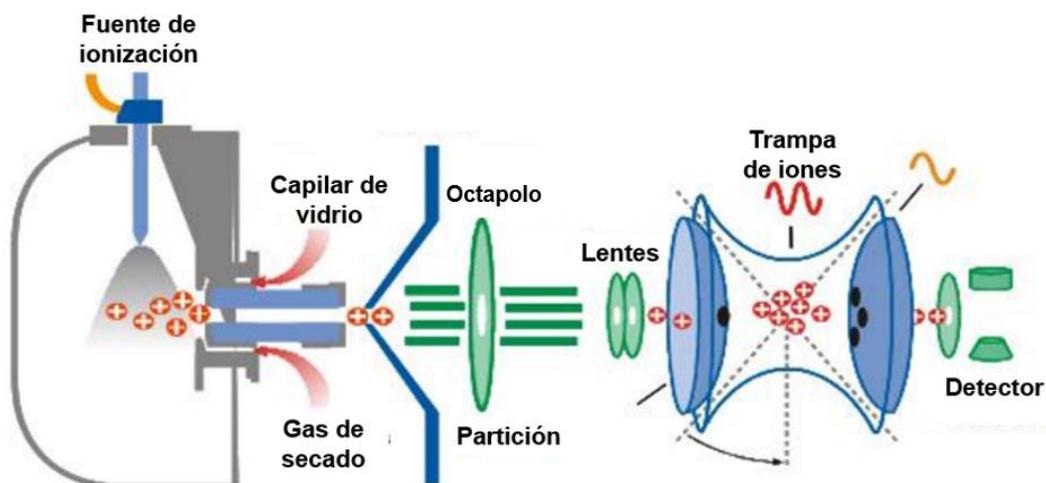


Figura 8. Analizador de trampa de iones.<sup>33</sup>

#### 1.9.2.4. Espectrometría de masas en tándem

En un espectrómetro de masas convencional, la separación de los iones se realiza empleando un solo analizador de masas. Una alternativa a estos tipos de espectrómetros, que permite una mejora sustancial de la especificidad o selectividad de estos y una mayor información estructural de los componentes de una muestra, consiste en la combinación de dos analizadores de masas en un mismo espectrómetro. Esta combinación recibe el nombre de espectrometría de masas en tándem.<sup>33</sup>

La combinación de analizadores de masas más ampliamente utilizada en las ciencias de laboratorio clínico es la llamada espectrometría de masas en tándem de triple cuadrupolo o QQQ. En ella, se utilizan dos analizadores de masas de cuadrupolo separados entre sí por una celda de colisión en la que se induce la disociación de los iones que llegan del primer cuadrupolo. Es la llamada disociación inducida por colisión o CID (acrónimo del inglés collision induced dissociation). Esta combinación de analizadores de tipo cuadrupolo se traduce en una disminución del ruido de fondo respecto a lo que se produce en un espectrómetro de masas convencional y, por tanto, en un aumento de la sensibilidad metrológica, de la

capacidad de detección y de la selectividad o especificidad. En función de cómo operen y se combinen los dos cuadrupolos (modalidad de monitorización selectiva de iones, SIM, modalidad de escaneo o Scan) nos permite trabajar de diferentes maneras.<sup>33</sup>

El modo de exploración más importante en la espectrometría de masas en tándem es la exploración de iones del producto. Los iones de una masa dada se seleccionan con un primer espectrómetro de masas, pasan a través de una celda de colisión donde se fragmentan por colisiones con un gas inerte, y los iones del producto se analizan en el segundo espectrómetro de masas. Alternativamente, puede usarse un instrumento que pueda atrapar iones, principalmente trampas de iones. Los iones se expulsan de la trampa, excepto los que tienen una masa elegida. Estos fragmentos durante un corto tiempo (algunos milisegundos) dentro del espectrómetro, y luego los fragmentos son analizados por el mismo instrumento.<sup>34</sup>

### **1.9.3. Detectores para Espectrometría de Masas.**

Un detector es una herramienta esencial del espectrómetro de masas que produce la corriente que es proporcional al número de iones que lo golpean. Una vez que los iones son formados, pasan a través del analizador de masas y luego son detectados y transformados en una señal utilizable por un detector. Los detectores pueden generar, a partir de los iones incidentes, una corriente eléctrica que es proporcional a su abundancia.<sup>30</sup>

Actualmente existen varios tipos de detectores. La elección del detector depende del diseño del instrumento y de las aplicaciones analíticas que se realizarán. Se utilizan una variedad de enfoques para las detecciones. Sin embargo, la detección de iones siempre se basa en su carga, su masa o su velocidad. Algunos detectores (copa

Faraday) se basan en la medición de la corriente de carga directa que se produce cuando un ion golpea una superficie y se neutraliza.<sup>30</sup>

Los tipos más comunes de detectores de iones se describen a continuación. También se discuten sus especificaciones y sus características.<sup>30</sup>

### 1.9.3.1. Multiplicador de electrones secundario

El multiplicador de electrones secundarios es uno de los detectores que más se utilizan en la espectrometría de masas. Está formado por un cátodo y sucesivos dínodos que presentan una superficie de cobre y berilio de las que se emiten ráfagas de electrones al ser alcanzadas por iones o electrones de elevada energía. El ion detectado choca con el primer dínodo, provocando la emisión de un elevado número de electrones, que incidirán sobre el segundo dínodo. El proceso de multiplicación se repite sucesivamente en los demás dínodos (*figura 9*). Es un detector mucho más sensible que el de copa de Faraday.<sup>33</sup>

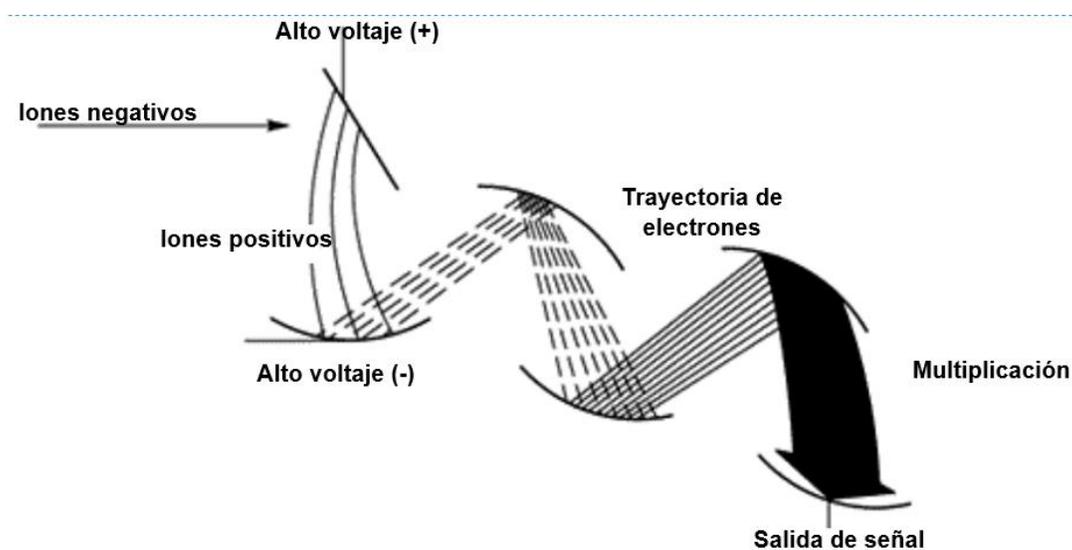


Figura 9. Trayectoria de electrones en un multiplicador de electrones secundario.<sup>35</sup>

### **1.10. Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UHPLC).**

En la última década, UHPLC se ha establecido como una herramienta ideal de separación rápida para el análisis de mezclas complejas en los modos isocrático y de gradiente. De hecho, se ha demostrado que esta tecnología es capaz de lograr una mayor resolución del pico, mayor velocidad y mayor sensibilidad que la HPLC convencional, mediante el uso de partículas de menos de 2  $\mu\text{m}$  y presiones por encima de 400 bar, por lo que el sistema cromatográfico UHPLC está diseñado para soportar altas presiones, permitiendo acortar el tiempo de análisis hasta nueve veces (dependiente de las condiciones de cada metodología), en comparación con el sistema convencional que utiliza columnas analíticas empaquetadas de partículas de 5  $\mu\text{m}$  contra las columnas analíticas empaquetadas con partículas de 2  $\mu\text{m}$  empleadas en UHPLC, con las cuales el análisis se acorta unas tres veces.<sup>36</sup>

Por lo tanto, UHPLC logra analizar una mayor cantidad de muestras en un menor tiempo y empleando menor cantidad de muestra.<sup>36</sup>

### **1.11. Métodos analíticos para la cuantificación**

En el cuadro 3 se presentan diferentes métodos para la cuantificación de albendazol y/o sulfóxido de albendazol encontrados en distintas referencias para la propuesta del método analítico a utilizar durante la fase del desarrollo.

Cuadro 3. Métodos para la cuantificación de albendazol (ALB) y sulfóxido de albendazol (ALBSO) en plasma.

Condiciones	Artículo 1 (X. Chen) <sup>37</sup>	Artículo 2 (N. Saraner) <sup>38</sup> *	Artículo 3 (A. Wojnicz) <sup>39</sup>	Artículo 4 (Lanchote) <sup>4</sup> 0**	Artículo 5 (Chhonkaer, Y.S.) <sup>41</sup>	Tesis 1 (S. Samano) <sup>12</sup> **
Velocidad de flujo	0.5mL/min	0.7mL/min	1mL/min	1.2 mL/min	0.2 mL/min	0.8mL/min
Ionización	ESI	ESI	ESI	-----	ESI	-----
Detector	Espectrometría de masas	Espectrometría de masas	Espectrometría de masas	Fluorescencia $\lambda_{exc}=280$ nm, $\lambda_{em}=320$ nm	Espectrometría de masas	UV-Vis
Voltaje MS	4.5 KV	4.5 KV	3KV	-----	-----	-----
E.I.	Estazolam (5000ng/mL)	Sulfóxido de albendazol-d3 (0.5 $\mu$ g/mL)	Fenacetina(1mg/mL) (trabajo: 10 $\mu$ g/mL)	-----	Oxibendazol	Mebendazol
Presión del nebulizador	80 psi	-----	40 psi	-----	-----	-----
Flujo de gas	3 L/min	2.5 L/min	9.2 L/min	-----	2.0 L/min	-----
Temperatura ms	280 °C	-----	250 °C	-----	375 °C	-----
Transición	ALB: 266-234 ALBSO: 282-240 EI: 295- 267	ALB-SO: 281.7-159 EI: 284.7- 159	ALB: 266-234 ALBSO: 282-240 EI: 180-110	-----	ALB= 266.10>234.4 ALBSO=282.1>240.35	-----
Energía de colisión	ALB: 20 eV ALBSO: 25eV EI: 30 eV	-40V	ALB: 20eV ALBSO: 5eV EI: 15eV	-----	ALB= -20 ALBSO= -14	-----
Disolvente para soluciones	Metanol (400 $\mu$ g/mL para cada analito)	Metanol (500 $\mu$ g/mL)	Metanol (1mg/mL)	Metanol	Metanol	DMSO, metanol

Condiciones	Artículo 1 (X. Chen) <sup>37</sup>	Artículo 2 (N. Saraner) <sup>38 *</sup>	Artículo 3 (A. Wojnicz) <sup>39</sup>	Artículo 4 (Lanchote) <sup>4</sup> 0**	Artículo 5 (Chhonkaer, Y.S.) <sup>41</sup>	Tesis 1 (S. Samano) <sup>12</sup> **
<b>Curva</b>	ALB: 1000, 800, 500, 250, 40, 15, 5 y 2 ng/mL ALBSO:1000, 0, 8000,5000,2500, 1000, 400, 150, 50, 20 ng/mL	3, 6, 50, 250, 500, 750, 1350, 1500 ng/mL	ALB: 5, 10, 20, 30, 50, 100, 500 ng/mL ALBSO: 10, 20, 30, 50, 100, 500, 1000 y 1500 ng/mL	5–2500 ng/mL para ALBSO y 1–500 ng/mL para ALBSO2 .	ALB y ALBSO2= 0.1-200 ng/mL ALBSO=0.5– 1000 ng/mL	ALBSO: 62.5, 125, 250, 500, 1000 y 2000 ng/mL
<b>Soluciones de trabajo</b>	ALB: 0.4-200ng/mL ALBSO: 4-2000ng/mL	1-100 µg/mL	10 µg/mL	ALBSO: 0.2-20 µg/mL ALBSO2: 0.2-2 µg/mL	-----	ALBSO: 1000µg/mL
<b>Estabilidad soluciones de trabajo</b>	4°C	(-70°C)	-80°C (3 meses)	-----	-----	-----
<b>Ciclos de congelación-descongelación</b>	3	3	2	-----	3	-----
<b>Estabilidad a temperatura ambiente</b>	Muestra :0.5 h Reconstituida : 24 h	Muestra: 6 h	-----	-----	8 h	-----
<b>Estabilidad de solución madre</b>	20 días a 4 °C	-20 °C	-80 °C	-----	-----	-----
<b>Estabilidad automuestreador</b>	-----	23h (10 °C)	12h (10 °C)	-----	36h (4 °C)	-----
<b>Estabilidad de la muestra a largo plazo</b>	-----	164 días (-70 °C)	-----	-----	60 días (-80 °C)	-----

Condiciones	Artículo 1 (X. Chen) <sup>37</sup>	Artículo 2 (N. Saraner) <sup>38 *</sup>	Artículo 3 (A. Wojnicz) <sup>39</sup>	Artículo 4 (Lanchote) <sup>4</sup> 0**	Artículo 5 (Chhonkaer, Y.S.) <sup>41</sup>	Tesis 1 (S. Samano) <sup>12</sup> **
<b>Columna</b>	C18 PHENOMENEX (4mm x 3mm)	C18 Waters Xbridge(100x4.6mmx3.5µm)	ZORBAX XDB-CN n (4.6 mm × 150 mm longer and 5 µm particle size)	Chiralpak AD column, 250 mm34.6 mm, Chiral Technologies Inc., Exton, USA. Usando precolumn	Acquity UPLC®BEH C18 column (100 x 2.1 mm, 1.7 µm)	Spherisorb C18 (250x4.6mm, 5µm)
<b>Temperatura columna</b>	20°C	30°C	22°C	-----	-----	22°C
<b>Fase móvil</b>	Metanol-agua-ácido fórmico (80:20:1)	Metanol- agua-hidróxido amonio (25%) (800:200:0.1)	1% ácido acético: Metanol (40:60)	Hexano- isopropanol -etanol (81:14.25:4.75, v/v/v)	Ácido fórmico en metanol 5%: Ácido fórmico 5% (gradiente)	Metanol: Buffer de fosfatos pH= 5.7 (63:37)
<b>Tiempo de retención (min)</b>	ALB: 3.6 min ALBSO: 3.3 EI: 4.6	-----	ALB: 2.9 ALBSO: 2.1 Fenacetina: 2.3	ALB: 8.5 ALBSO(+): 13.7 ALBSO(-): 21.6 ALBSO2: 25.7	ALB= 6.6 ALBSO= 3.8 OXZ= 4.6	-----
<b>Muestra</b>	500 µL	200 µL	200 µL	500 µL	100 µL	-----
<b>Aditivos</b>	Buffer de fosfatos 10mM pH 7.0	Hidróxido de amonio (25 %)	Precolumna Zorbax CN. Cartuchos Bond Elut C-18 50 mg, 3-5 mmHg	Precolumna 4 mm 34 mm CN. 200 µl de una solución de metabisulfito de sodio de 4 µg/mL + 3 mL acetato de etilo	Cartuchos SPE Agilent bond Elute C18	-----

Condiciones	Artículo 1 (X. Chen) <sup>37</sup>	Artículo 2 (N. Saraner) <sup>38</sup> *	Artículo 3 (A. Wojnicz) <sup>39</sup>	Artículo 4 (Lanchote) <sup>4</sup> 0**	Artículo 5 (Chhonkaer, Y.S.) <sup>41</sup>	Tesis 1 (S. Samano) <sup>12</sup> **
<b>Preparación de muestra</b>	0.5 mL plasma+ 100 µL fase móvil+ 100 µL EI+ 0.5 mL buffer de fosfatos	200 µL plasma+50 µL EI	1mL MeOH, 200 µL plasma, 10 µL EI, 790 µL ácido ortofosfórico (1 %)	200 µL metabisulfito de sodio	100 µL plasma+ 10 µL EI + 800 µL agua.	-----
<b>Método de separación</b>	Extracción L-L: n-hexano-diclorometano-isopropanol (100: 50: 5)	Precipitación proteínas (metanol 1 mL)	Ext. S-L	Extracción L-L (3 mL acetato de etilo)	Extracción S-L	Extracción S-L
<b>Temperatura de evaporación</b>	40°C	-----	-----	-----	Al vacío, a temperatura ambiente	40 °C
<b>Volumen de reconstitución</b>	100 µL	-----	-----	-----	100 µL	100 µL
<b>Volumen de inyección</b>	20 µL	5 µL	5 µL	-----	10 µL	25 µL

\* Método que sólo cuantifica el metabolito ALBSO, \*\* método que cuantifica metabolitos ALBSO y ALBSO2.

## 1.12. Validación de métodos analíticos en muestras biológicas.

La validación analítica se puede definir como la recopilación y evaluación de datos generados a partir del proceso / método utilizado para hacer un producto, ya sea comercial, experimental o un estudio científico. La validación analítica establece pruebas experimentales de que un proceso / método / estudio entrega de manera consistente resultados reproducibles, precisos y exactos utilizando una metodología establecida y aceptada.<sup>42</sup>

Los métodos analíticos que se utilizan para la determinación cuantitativa de fármacos y sus metabolitos en muestras biológicas desempeñan un papel importante en la evaluación e interpretación de la biodisponibilidad, la bioequivalencia y los datos farmacocinéticos. Es esencial utilizar métodos analíticos bien caracterizados y validados para obtener resultados confiables que puedan ser interpretados satisfactoriamente.<sup>42,43</sup>

La validación del método incluye todos los procedimientos necesarios para demostrar que un método particular para la determinación cuantitativa de la concentración de un analito (o analitos) en una matriz biológica particular es confiable para la aplicación prevista. Algunas de las técnicas bioanalíticas más utilizadas incluyen métodos químicos (cromatografía GC y HPLC) y diversos procedimientos con MS (MS directa, MSMS y técnicas de combinación como GC-MS y LC-MS) y métodos biológicos (los basados en procedimientos de inmunoensayo y métodos microbiológicos). Muchos de los principios, procedimientos y requisitos son comunes a todos los tipos de métodos analíticos. Los parámetros esenciales para garantizar la aceptabilidad del rendimiento de un método analítico son la estabilidad del fármaco en la matriz bajo las condiciones de almacenamiento del estudio, precisión, exactitud, sensibilidad, selectividad, recobro y reproducibilidad. Aunque hay varias etapas en el desarrollo y la validación de un procedimiento analítico, la validación del método analítico puede considerarse que consista en dos fases distintas: la fase de desarrollo, en la que se define el ensayo, y la fase de aplicación, en la que el método se aplica al análisis real de muestras de estudios de farmacocinética, biodisponibilidad y bioequivalencia.<sup>18</sup>

Los métodos analíticos deben validarse para cumplir con los requisitos que establece la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013 Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de

intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad y en el “Acuerdo que determina el tipo de prueba para demostrar intercambiabilidad de medicamentos genéricos, en donde se especifica que el albendazol, tanto en suspensión oral como en tableta, requiere de una prueba de intercambiabilidad tipo “C” (Prueba de bioequivalencia)”.<sup>44</sup>

### **1.12.1.Principios para validar un método**

Se debe escribir una descripción y un protocolo específicos y detallados del método. Cada paso del método debe investigarse para determinar en qué medida las variables ambientales, matriciales, materiales o de procedimiento, desde el momento de la recolección del material hasta el momento del análisis e incluyendo el tiempo del análisis, pueden afectar la estimación de analito en la matriz. Puede ser necesario considerar la variabilidad de la matriz debido a su estado fisiológico.<sup>18</sup>

Se debe validar un método para el uso previsto con un protocolo aceptable. Todos los experimentos utilizados para hacer declaraciones o sacar conclusiones sobre la validez del método deben presentarse en un informe (informe de validación del método).

Siempre que sea posible, debe usarse la misma matriz biológica para fines de validación que la de las muestras previstas para el estudio (para los tejidos de disponibilidad limitada, como la médula ósea, pueden ser suficientes las matrices fisiológicamente apropiadas). Se debe evaluar la estabilidad del analito (fármaco y/o metabolito) en la matriz durante el proceso de recolección y el período de almacenamiento de la muestra, preferiblemente antes del análisis de muestra. Se recomienda confirmar la estabilidad del analito en la matriz de los sujetos dosificados. La precisión, exactitud, reproducibilidad, recobro, la selectividad y la especificidad

del método con respecto a sustancias endógenas, metabolitos y productos de degradación conocidos deben establecerse con referencia a la matriz biológica. Con respecto a la especificidad, debe haber evidencia de que la sustancia que se cuantifica es el analito deseado.<sup>18</sup>

El intervalo de concentración sobre el cual se determinará el analito debe definirse en el método, sobre la base de la evaluación de muestras estándar reales sobre el rango (incluida su variación estadística). Este procedimiento define la curva estándar.<sup>18</sup>

Es necesario utilizar un número suficiente de estándares para definir adecuadamente la relación entre concentración y respuesta. Se debe demostrar que la relación entre respuesta y concentración es continua y reproducible. El número de estándares que se utilizarán será una función del rango dinámico y la naturaleza de la relación concentración-respuesta. En muchos casos, cinco a ocho concentraciones (excluyendo los valores en blanco) pueden definir la curva estándar. Pueden ser necesarias más concentraciones estándar para las relaciones no lineales que las que serían para las relaciones lineales.<sup>18</sup>

Se debe demostrar la exactitud y precisión con que se pueden determinar las concentraciones conocidas de analito en la matriz biológica. La precisión y exactitud dentro y entre corridas deben calcularse con procedimientos estadísticos comúnmente aceptados. La determinación de la precisión y la exactitud se puede lograr mediante el análisis de conjuntos replicados de muestras de analitos de concentraciones conocidas de una matriz biológica equivalente. Deben estudiarse al menos tres concentraciones que representen el rango completo de la curva de calibración: una cerca del límite inferior de cuantificación (LIC), una cerca del centro y una cerca del límite superior de la curva estándar. Para que un método se considere válido, se deben establecer criterios específicos de precisión y exactitud en el rango de la curva estándar.<sup>18</sup>

### **1.12.2. Características de desempeño de validación de métodos bioanalíticos**

A continuación, se presentan los parámetros para realizar la validación de un método analítico, establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013 Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad.

#### **1.12.2.1. Adecuabilidad del sistema**

La adecuabilidad del sistema se basa en el concepto de que el equipo, la electrónica, las operaciones de análisis y las muestras para ser analizadas constituyen un sistema integral que se puede evaluar y establecer. Los parámetros serán determinados dependiendo del tipo de procedimiento que sea evaluado, resultando importantes en los procedimientos cromatográficos si las medidas son susceptibles a variaciones en las condiciones analíticas.<sup>45</sup>

#### **1.12.2.2. Curva de calibración y linealidad.**

La curva de calibración define la relación entre la respuesta del detector y la concentración de analito en la matriz de la muestra.

Para múltiples analitos, se genera una curva de calibración de muestra para cada analito. Para ajustar la curva estándar, se utiliza el algoritmo más simple que describe la relación concentración / respuesta.

La linealidad se define como la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener una respuesta proporcional a la concentración del compuesto en la muestra.<sup>39</sup> Por lo tanto, el algoritmo puede ser lineal o no lineal, pero debería minimizar el porcentaje de error relativo.<sup>42</sup>

En el caso de la cromatografía líquida con detección de espectrometría de masas en tándem, forzar los datos a una función lineal puede dar lugar a grandes errores en las mediciones de los resultados. La curva de calibración debe constar de cinco a ocho puntos que cubran todo el rango de concentraciones esperadas de analito en las muestras de prueba, es decir, del 0 al 200% del contenido teórico.<sup>43</sup>

### **1.12.2.3. Precisión**

Precisión se define como el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea; se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.<sup>46</sup>

La repetibilidad es la precisión bajo las mismas condiciones de operación de un intervalo corto de tiempo, mientras que la reproducibilidad es la precisión bajo las variaciones que comúnmente pueden ocurrir dentro del laboratorio, por ejemplo, diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos.<sup>46</sup>

Los documentos de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH Q2 R1) y la Organización Internacional de Normalización describen tres niveles de precisión. El primero es la repetibilidad, es decir, la precisión del ensayo en cortos períodos de tiempo. El segundo es la precisión intermedia, que se refiere a las variaciones en los resultados dentro de un laboratorio que ocurren en diferentes días, con diferentes analistas o con diferentes equipos. El tercero es la reproducibilidad y refleja las diferencias en los resultados de análisis entre laboratorios.<sup>42</sup>

#### **1.12.2.4. Exactitud**

Se denomina así a la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.<sup>46</sup>

Para determinar la exactitud, el análisis replicado de las muestras se realiza comparando los valores obtenidos con las muestras replicadas conocidas con el valor verdadero, comparando los resultados del nuevo método con los obtenidos con otro método establecido, añadiendo el analito en diferentes matrices y haciendo uso de adiciones estándar cuando no es posible obtener matrices sin la presencia de analito. La FDA recomienda un mínimo de tres concentraciones en el intervalo de concentraciones esperadas y un mínimo de cinco determinaciones por concentración.<sup>42</sup>

#### **1.12.2.5. Selectividad**

Al evaluar un método, un criterio clave es la capacidad del método para diferenciar el analito de otros componentes de la muestra (interferencias, componentes de la matriz, productos de degradación, etc.). Para determinar la selectividad, la cuantificación del analito en las matrices de prueba que contienen todos los componentes potenciales se compara con la cuantificación del analito en solución sola. La especificidad del ensayo determina que la señal obtenida se debe al analito de interés y que no hay interferencia de otros componentes de la matriz, impurezas o productos de degradación.<sup>42</sup>

#### **1.12.2.6. Efecto matriz**

Los efectos de la matriz ocurren cuando las moléculas que se unen con el (los) compuesto(s) de interés alteran la eficiencia de ionización de la interfaz de electrospray.<sup>47</sup>

Se ha demostrado que los efectos de la matriz son el resultado de la competencia entre los componentes de la matriz no volátil y los iones del analito para acceder a la superficie de la gota y transferirla a la fase gaseosa. Aunque no está claro el mecanismo exacto de la alteración de la liberación de analito en la fase gaseosa por estos componentes no volátiles, se postula una probable lista de efectos relacionados con la fuerza de atracción que mantiene la gota unida y evita que se formen gotas más pequeñas.<sup>47</sup>

Dependiendo del entorno en el que tienen lugar los procesos de ionización y evaporación de iones, esta competencia puede disminuir (comúnmente conocida como supresión de iones) o aumentar (mejora de iones) la eficiencia de formación de los iones analitos deseados presentes en las mismas concentraciones en la interfaz, generando un aumento o disminución de la respuesta. Por lo tanto, la eficiencia de los iones de analito para formar depende mucho de la matriz que ingresa a la fuente de iones de electrospray. Los efectos de la matriz también dependen del compuesto.<sup>47</sup>

La importancia de los efectos de la matriz sobre la fiabilidad de HPLC–ESI-MS/MS se ha demostrado en términos de precisión y exactitud, y cuando se produce la supresión de iones, la sensibilidad y el límite inferior de cuantificación de un método pueden verse afectados negativamente.<sup>47</sup>

#### **1.12.2.7. Estabilidad**

La estabilidad es la capacidad de un fármaco, biofármaco o medicamento de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas, en el envase que

lo contiene durante su periodo de vida útil.<sup>46</sup> Para la validación de métodos bioanalíticos, la estabilidad aplica al analito dentro de la matriz biológica utilizada, las condiciones de manejo y su almacenamiento.

#### **1.12.2.8. Efecto de acarreo**

El efecto de acarreo es un tipo de contaminación atribuido al remanente de una muestra analizada anteriormente que contiene una mayor concentración de analito que la muestra siguiente a esta. Representa uno de los problemas que compromete la exactitud y la precisión de los resultados. Este tipo de contaminación debe de ser evaluado y eliminado durante el desarrollo del método ya que el remanente puede absorberse en los diversos componentes del sistema cromatográfico y comprometer los resultados durante la validación del método.<sup>48</sup>

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.**

A pesar de que dos medicamentos pueden tener el mismo principio activo y dosis, existen variaciones en los parámetros farmacocinéticos debido a la formulación. Los estudios de bioequivalencia permiten demostrar que las variaciones farmacocinéticas entre los medicamentos a analizar (referencia y prueba) son o no significativas. Para demostrar estas variaciones entre los medicamentos a comparar es necesario contar con una metodología precisa, exacta y selectiva para la cuantificación del o los analitos de interés, por lo que es imprescindible realizar el desarrollo de la metodología que permita obtener parámetros analíticos confiables, que serán de manera posterior sometidos a pruebas de desempeño durante la validación, para demostrar y garantizar que se ha obtenido una metodología que arroje resultados inequívocos en cumplimiento con la normatividad aplicable.

¿La validación del método analítico demostrará que el método propuesto cuantificará simultáneamente albendazol y sulfóxido de albendazol de manera precisa, exacta y selectiva en plasma?

### **3. HIPÓTESIS.**

El método desarrollado por cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplado a espectrometría de masas, permitirá cuantificar simultáneamente albendazol y su metabolito principal (sulfóxido de albendazol) en plasma humano de forma lineal, selectiva, precisa y exacta en cumplimiento a los criterios establecidos en la NOM-177-SSA1-2013, permitiendo el uso del método en un estudio de bioequivalencia.

### **4. OBJETIVOS.**

#### **4.1. Objetivo general**

Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación simultánea de albendazol y sulfóxido de albendazol en plasma humano mediante la técnica instrumental UHPLC-MS/MS

#### **4.2. Objetivos particulares**

- Establecer las condiciones instrumentales y cromatográficas óptimas para la cuantificación simultánea de albendazol y sulfóxido de albendazol.

- Desarrollar y seleccionar el mejor proceso de extracción de las muestras contenidas en plasma.
- Validar un método aplicable a un estudio de bioequivalencia.
- Validar la metodología de acuerdo con la normatividad mexicana y con apoyo de guías internacionales.

## **5. MATERIAL Y MÉTODO.**

### **5.1. Diseño de estudio.**

Longitudinal, prospectivo, analítico y experimental.

### **5.2. Población.**

Muestras de plasma con anticoagulante (heparina o citratos) cargadas con analitos.

### **5.3. Variables.**

#### **5.3.1. Variables independientes**

- Técnica de extracción
- Tiempo de elución
- Analista
- Naturaleza de fase móvil
- Temperatura del horno de la columna
- Volumen de inyección
- Velocidad de flujo

#### **5.3.2. Variables dependientes**

- Concentración obtenida
- Tiempo de retención

- Respuesta
- Linealidad
- Selectividad
- Precisión
- Exactitud
- Estabilidad

#### 5.4. Materiales, reactivos, equipos e instrumentos.

En los siguientes cuadros se presentan los materiales, reactivos, equipos e instrumentos a utilizar durante el trabajo experimental.

*Cuadro 4.* Especificaciones de equipos.

Equipo	Marca	Modelo
Generador de nitrógeno	Peak Scientific	NM32LA
Ultracongelador	Thermoscientific	88300A60
Agitador vórtex	Genie 2	G560
Agitador múltiple	Heidol PH	Multireax
Evaporador de nitrógeno	Labconco	Rapid Vap Vertex
Microcentrífuga refrigerada	Hermle	Z 216 MK
Refrigerador	Victor S.A. de C.V.	VPC 10C
Campana de extracción	Tecnolab	SC-152
Baño ultrasónico	Branson	M33800H
Bomba	Agilent Technologies	G4220A
Termostato	Agilent Technologies	G1330B
Automuestreador	Agilent Technologies	G4226A
Horno de columna	Agilent Technologies	G1316C
Detector de masas	Agilent Technologies	G6490A
Computadora	Hewlett Packard	HP Z400 Workstation

Cuadro 5. Especificaciones de instrumentos.

Instrumento	Marca	Modelo
Micropipeta 10-100 µL	Brand	704774
Micropipeta 100-1000 µL	Brand	704780
Micropipeta 500-5000 µL	Brand	704782
Balanza analítica	OHAUS	Pioneer TM PA224
Micropipeta repetitiva	Eppendorf	Multipette M4

Cuadro 6. Especificaciones de reactivos.

Reactivos	Marca
Metanol grado HPLC	TECSIQUIM
Agua grado HPLC	TECSIQUIM
Acetonitrilo	TECSIQUIM
Ácido fórmico	MERCK
Acetato de etilo	TECSIQUIM
Hidróxido de amonio	MERCK
Isopropanol	TECSIQUIM
Ácido acético	MERCK
Metil tert-butil éter	MERCK
Diclorometano	TECSIQUIM
Hexano	TECSIQUIM

Cuadro 7. Especificaciones de sustancias de referencia.

Sustancia	Proveedor	Lote	Pureza
Estándar de Albendazol	USP	R02690	99.20%
Sustancia de trabajo Sulfóxido de Albendazol	PHARMAFIPLIATES	PA/ALB/01702	98.40%
Estándar de mebendazol	USP	R096E0	99.70%
Estándar de ácido salicílico	USP	K0F112	99.80%
Estándar de metoclopramida	USP	R09580	95%
Estándar de cafeína	USP	RO4330	99.80%
Estándar de paracetamol	USP	K2M244	99.80%
Estándar de naproxeno	USP	R03550	99.90%
Estándar de diazóxido	USP	H0F314	99.90%
Estándar de metformina	USP	R069H0	99.70%
Estándar de losartán,	USP	H1M331	99.80%
Estándar de loratadina	USP	R052U0	99.80%
Estándar de fentermina	USP	R06050	100%

Cuadro 8. Materiales

<b>Matraces aforados de 5, 10, 100, 250 y 500 mL</b>
<b>Microtubos de 2 mL</b>
<b>Gradillas</b>
<b>Vasos de precipitados 100, 150 y 250 mL</b>
<b>Pipetas Pasteur</b>
<b>Microviales de vidrio para cromatógrafo</b>
<b>Placa cromatográfica</b>
<b>Reservorio de vidrio de 100, 250, 500 y 1000 mL</b>
<b>Tubos de ensaye 13 X 100 mm</b>
<b>Guantes de nitrilo</b>
<b>Puntas para micropipeta de 10-100 µL, 10-1000 µL y 500-5000 µL</b>
<b>Probetas de 10, 50, 100 y 500 mL</b>

## 5.5. Método.

### 5.5.1. Desarrollo del método analítico para la cuantificación de albendazol y sulfóxido de albendazol.

El desarrollo del método analítico mediante UHPLC-MS/MS consistió en tres fases representadas en la figura 10.

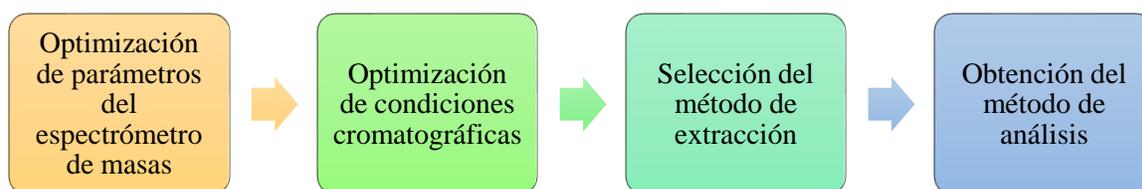


Figura 10. Fases en el proceso de desarrollo de un método analítico por UHPLC-MS/MS

#### 5.5.1.1. Soluciones preparadas durante el desarrollo del método.

Se prepararon las siguientes soluciones para las condiciones cromatográficas durante el desarrollo del método:

- Solución de ácido fórmico 0.1 % v/v.

En un matraz aforado de 250 mL se agregaron aproximadamente 200 mL de agua grado HPLC. Se adicionaron 0.25 mL de ácido fórmico con una pureza de 98 a 100 % y se llevó a aforo. Se transfirieron a un reservorio de capacidad adecuada.

- Solución de ácido fórmico (4 % v/v).

Se transfirieron 400  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico en 5mL de agua y se llevó a volumen en un matraz aforado de 10 mL. La solución se transfirió a un reservorio de capacidad adecuada.

- Solución de hidróxido de amonio (2 % v/v).

Se transfirieron 200  $\mu\text{L}$  de hidróxido de amonio en 5mL de agua y se llevó a volumen en un matraz de 10 mL. Se transfirió la solución a un reservorio de capacidad adecuada.

- Solución Metanol: Agua (80:20) v/v.

Se midieron 20 mL de agua, 80 mL de metanol y se mezclaron. Se transfirió la solución a un reservorio de capacidad adecuada.

- Solución madre de albendazol (1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Se pesaron con exactitud el equivalente a 5.0 mg de la sustancia de referencia de albendazol. Se disolvieron y se llevaron a volumen en un matraz aforado de 5 mL con metanol al 100 % grado HPLC. Se sonicó la solución durante 10 minutos y se almacenó en congelación.

- Solución madre de albendazol (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Se pesaron con exactitud el equivalente a 5.0 mg de la sustancia de referencia de albendazol. Se disolvieron y se llevaron a volumen en un matraz aforado de 10mL con metanol al 100% grado HPLC. Se sonicó la solución durante 10 minutos y se almacenó en congelación.

- Solución madre de albendazol (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Se pesaron con exactitud el equivalente a 5.0 mg de la sustancia de referencia de albendazol. Se disolvieron y se llevaron a volumen en un matraz aforado de 25 mL con metanol al 100% grado HPLC. Se sonicó la solución durante 10 minutos y se almacenó en refrigeración.

- Solución madre de sulfóxido de albendazol (1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Se pesó con exactitud el equivalente a 5mg de Sulfóxido de albendazol, se disolvió y se llevó al aforo con metanol 100 % grado HPLC en un matraz de 5mL. Se almacenó en congelación.

- Fase de lavado acetonitrilo: Agua: Metanol: Isopropanol: Ác. Fórmico (25: 25: 25: 25: 0.1 v/v/v/v/v).

Se midieron 125 mL de agua, 125 mL de metanol, 125 mL de isopropanol, 125mL de acetonitrilo y 500 µL de ácido fórmico. Se mezclaron y se transfirió la solución a un reservorio.

- Fase de lavado metanol 100 %.

Se colocaron 250 mL de metanol grado HPLC en un reservorio de capacidad adecuada.

- Fase de lavado metanol: agua (90:10 v/v).

Se midieron 450 mL de metanol y 50 mL de agua. Se mezclaron y se transfirieron a un reservorio con la capacidad adecuada.

- Fase de lavado acetonitrilo: agua (90:10 v/v).

Se midieron 450 mL de acetonitrilo y 50 mL de agua. Se mezclaron y se transfirieron a un reservorio con la capacidad adecuada.

- Fase de lavado metanol: isopropanol (50:50 v/v).

Se midieron 250 mL de metanol y 250 mL de isopropanol. Se mezclaron y se transfirió la solución a un reservorio de capacidad adecuada.

- Fase de lavado ácido acético (4%v/v).

Se diluyeron 10 mL de ácido acético glacial en 200 mL de metanol y se llevó a volumen en un matraz aforado de 250 mL. Se transfirió la solución a un reservorio de capacidad adecuada.

- Fase de lavado metanol: acetonitrilo: agua (60:20:20 v/v) + ácido fórmico 0.5 % v/v.

Se midieron 300 mL de metanol, 100 mL de acetonitrilo y 100mL de agua. La mezcla se agitó y se adicionaron 2.5 mL de ácido fórmico concentrado. Se mezcló y se transfirió la solución a un reservorio de capacidad adecuada.

- Fase móvil ácido fórmico 0.1 %: Metanol (40:60 v/v).

Se midieron 40 mL de ácido fórmico 0.1 %, 60 mL de metanol. Se mezclaron y se transfirió la solución a un reservorio de capacidad adecuada.

- Solución de extracción metil ter-butil éter: diclorometano (60:40 v/v).  
Se midieron 60 mL de MTBE, 40 mL de DCM. Se mezclaron y se transfirieron a un reservorio de capacidad adecuada.
- Solución de extracción hexano: diclorometano: isopropanol (45:50:5 v/v/v).  
Se midieron 45 mL de hexano, 50 mL de DCM, 5 mL de isopropanol. Se mezclaron y se transfirieron a un reservorio de capacidad adecuada.
- Solución de extracción metanol: acetonitrilo (50:50 v/v).  
Se midieron 50 mL de MeOH, 50 mL de ACN. Se mezclaron y se transfirieron a un reservorio de capacidad adecuada.
- Soluciones madre para mezcla de estándar interno.  
Cada una de las soluciones madre de estándar interno se prepararon a una concentración de 1 mg/mL, pesando de manera independiente el equivalente a 5mg de diazóxido, metformina, losartán, loratadina y fentermina, y transfiriendo cada estándar a un matraz aforado de 5 mL. Se disolvió cada sustancia y se llevó al aforo. Se transfirieron las soluciones a reservorios con capacidad adecuada.
- Mezcla de estándar interno.  
Se tomó una alícuota de 5 µL de las soluciones madre de 1mg/mL previamente preparadas de diazóxido, metformina, losartán, loratadina y fentermina. Se llevó a volumen con la solución de metanol: agua 80:20 v/v en un matraz de 10 mL.
- Solución madre de mebendazol 500 µg/mL.  
Se pesó con exactitud el equivalente a 5mg del estándar Mebendazol. Se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvió y se llevó al aforo con metanol 100 % grado HPLC. Se sonicó la solución por 5 min. y se almacenó en congelación.
- Solución madre de mebendazol 200 µg/mL.  
Se pesó el equivalente a 5 mg del estándar mebendazol. Se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL, se disolvió con metanol y se adicionaron 10 mL

de Acetonitrilo. Se llevó a volumen con metanol. Adicionalmente se sonicó la solución por 5 min y se almacenó en refrigeración.

- Solución de trabajo de mebendazol 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Se tomó una alícuota de 30  $\mu\text{L}$  de la solución madre 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de mebendazol. Se llevó al aforo en un matraz de 5mL con metanol: agua 80:20 v/v.

- Solución de trabajo de mebendazol 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Se tomó una alícuota de 100 $\mu\text{L}$  de la solución madre 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Mebendazol. Se llevó al aforo en un matraz de 10mL con metanol: agua 80:20 v/v.

#### **5.5.1.2. Optimización de parámetros del espectrómetro de masas.**

Se prepararon soluciones individuales de albendazol y sulfóxido de albendazol a una concentración de 500 ng/mL en metanol al 100 %. Para la optimización de las condiciones de fragmentación de cada molécula se utilizó una fase móvil de ácido fórmico 0.1%: acetonitrilo en una proporción 20:80.

Para la optimización de parámetros de detección la ionización fue positiva y se evaluó la energía de colisión, el tiempo de permanencia, la energía de fragmentación y el voltaje de la celda de aceleración. Para la optimización de los parámetros de la fuente se evaluó la velocidad de flujo del gas nebulizador, la presión de nebulización, la temperatura del gas y el voltaje del capilar.

#### **5.5.1.3. Optimización de condiciones cromatográficas.**

A lo largo de todo el desarrollo del método se evaluó una columna cromatográfica C18 como fase estacionaria.

Para la elección de posible fase móvil y estacionaria, se tuvieron las consideraciones necesarias con base en las propiedades de los analitos. Como fase móvil se evaluó ácido fórmico 0.1%: metanol en las proporciones siguientes:

- a) 0: 100 v/v
- b) 20: 80 v/v
- c) 30:70 v/v
- d) 35:65 v/v
- e) 40:60 v/v

Se evaluó una elución isocrática a una velocidad de flujo de 0.3 mL/min y con distintos gradientes. Los gradientes evaluados se muestran en los siguientes cuadros:

*Cuadro 9.* Gradiente de prueba 1.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Fase acuosa (%)</b>	<b>Fase orgánica (%)</b>	<b>Velocidad de flujo (mL/min)</b>
<b>0</b>	80	20	0.3
<b>0.5</b>	80	20	0.3
<b>1.5</b>	40	60	0.3
<b>4.5</b>	40	60	0.3
<b>5</b>	80	20	0.3
<b>6</b>	80	20	0.3

*Cuadro 10.* Gradiente de prueba 2.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Fase acuosa (%)</b>	<b>Fase orgánica (%)</b>	<b>Velocidad de flujo (mL/min)</b>
<b>0.0</b>	40	60	0.35
<b>2.3</b>	40	60	0.35
<b>3.0</b>	0	100	0.50
<b>3.5</b>	0	100	0.50
<b>4.3</b>	40	60	0.35
<b>5.3</b>	40	60	0.35

Cuadro 11. Gradiente de prueba 3.

Tiempo (min)	Fase acuosa (%)	Fase orgánica (%)	Velocidad de flujo (ml/min)
0.0	40	60	0.35
2.3	40	60	0.35
3.0	0	100	0.40
3.5	0	100	0.40
4.3	40	60	0.35
5.3	40	60	0.35

Cuadro 12. Gradiente de prueba 4.

Tiempo (min)	Fase acuosa (%)	Fase orgánica (%)	Velocidad de flujo (mL/min)
0.0	40	60	0.35
2.3	40	60	0.35
3.0	0	100	0.60
3.5	0	100	0.60
4.3	40	60	0.35
5.3	40	60	0.35

Se consideraron las siguientes soluciones de lavado con diferentes tiempos de permanencia en puerto (desde 10 hasta 30 s):

- a) Metanol: isopropanol (50:50 v/v).
- b) Metanol 100 %.
- c) Acetonitrilo: Agua: Metanol: Isopropanol: Ácido Fórmico (25:25:25:25:0.1 v/v/v/v/v)
- d) Metanol: agua (90:10 v/v).
- e) Acetonitrilo: agua (90:10 v/v).
- f) Ácido acético (4%v/v).

g) Metanol: acetonitrilo: agua (60:20:20 v/v) + ácido fórmico 0.5% v/v.

Se determinaron las condiciones de almacenamiento óptimas y la concentración de la solución madre de albendazol.

Para la selección de estándar interno se preparó una mezcla de fentermina, losartán, diazóxido, loratadina y metformina comparando la mejor extracción y tiempos de retención similares a los de los analitos. De manera independiente se preparó una solución de mebendazol para evaluarlo también como estándar interno.

La selección del volumen de inyección se realizó de tal manera que la señal presentada de los analitos fuera suficiente, y a su vez evitar interferencias en la selectividad del método debido a saturación de la columna cromatográfica. Se propusieron los siguientes volúmenes:

- a) 1  $\mu$ L
- b) 2  $\mu$ L
- c) 3  $\mu$ L
- d) 5  $\mu$ L

#### **5.5.1.4. Selección de la técnica de Extracción**

Para la selección de la técnica de extracción se evaluó la linealidad y reproducibilidad de cada método propuesto.

Se probaron técnicas de precipitación de proteínas (metanol 100 %, acetonitrilo 100 % y metanol: acetonitrilo 50:50 v/v) y por extracción líquido-líquido (con hexano: diclorometano: isopropanol 45:50:5 v/v/v, metil ter-butil éter 100 %, metil ter-butil éter: diclorometano 60:40 v/v, acetato de etilo 100 % y éter 100 %) en diferentes medios (ácido, básico y neutro) tomando en cuenta tanto las propiedades de los analitos como las sustancias endógenas de la matriz biológica.

## 5.5.2. Validación del Método Bioanalítico.

### 5.5.2.1. Soluciones preparadas durante la validación del Método.

- Solución madre de albendazol (200 µg/mL). **Solución A.**

Se pesaron 5.0 mg de la sustancia de referencia de albendazol. Se disolvieron y se llevaron a volumen en un matraz aforado de 25 mL con metanol al 100% grado HPLC. Se sonicó la solución durante 10 minutos y se almacenó en refrigeración.
- Solución madre de sulfóxido de albendazol (1000 µg/mL). **Solución B.**

Se pesó el equivalente a 5.0 mg de sulfóxido de albendazol, se disolvió y se llevó a aforo en un matraz aforado de 5 mL con metanol al 100% grado HPLC. Se almacenó en congelación.
- Solución de albendazol (50 µg/mL). **Solución C.**

Se tomaron 2500 µL de la solución madre de albendazol y se transfirieron a un matraz aforado de 10 mL. Se llevó a volumen con la solución de metanol: agua 80:20 v/v. Se almacenó en congelación.
- Solución de albendazol (10 µg/mL). **Solución D.**

Se tomaron 500 µL de la solución madre de albendazol y se transfirieron a un matraz aforado de 10 mL. Se llevó a volumen con la solución de metanol: agua 80:20 v/v. Se almacenó en congelación.
- Solución de sulfóxido de albendazol (200 µg/mL). **Solución E.**

Se tomaron 2000 µL de la solución madre de albendazol y se transfirieron a un matraz aforado de 10 mL. Se llevó a volumen con la solución de metanol: agua 80:20 v/v. Se almacenó en congelación.
- Solución de trabajo de albendazol/sulfóxido de albendazol 5000-30000 ng/mL. **Solución F.**

Se tomaron 500  $\mu\text{L}$  de la solución C y 750  $\mu\text{L}$  de la solución E. Se transfirieron a un matraz aforado de 5 mL. Se llevó a volumen con metanol: agua 80:20 v/v y se almacenó en congelación.

- Solución de trabajo de albendazol/ sulfóxido de albendazol 4200-30000 ng/mL. **Solución G.**

Se tomaron 420  $\mu\text{L}$  de la solución C y 750  $\mu\text{L}$  de la solución E. Se transfirieron a un matraz aforado de 5 mL. Se llevó a volumen con metanol: agua 80:20 v/v y se almacenó en congelación.

- Solución de trabajo de albendazol/ sulfóxido de albendazol 4200-26000 ng/mL. **Solución H.**

Se tomaron 420  $\mu\text{L}$  de la solución C y 650  $\mu\text{L}$  de la solución E. Se transfirieron a un matraz aforado de 5 mL. Se llevó a volumen con metanol: agua 80:20 v/v y se almacenó en congelación.

- Solución de trabajo de albendazol/ sulfóxido de albendazol 1500-10000 ng/mL. **Solución I.**

Se tomaron 150  $\mu\text{L}$  de la solución C y 250  $\mu\text{L}$  de la solución E. Se transfirieron a un matraz aforado de 5 mL. Se llevó a volumen con metanol: agua 80:20 v/v y se almacenó en congelación.

- Solución de trabajo de albendazol/ sulfóxido de albendazol 1000-8000 ng/mL. **Solución J.**

Se tomaron 500  $\mu\text{L}$  de la solución D y 200  $\mu\text{L}$  de la solución E. Se transfirieron a un matraz aforado de 5 mL. Se llevó a volumen con metanol: agua 80:20 v/v y se almacenó en congelación.

- Solución de trabajo de albendazol/ sulfóxido de albendazol 200-2000 ng/mL. **Solución K.**

Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de la solución D y 50  $\mu\text{L}$  de la solución E. Se transfirieron a un matraz aforado de 5 mL. Se llevó a volumen con metanol: agua 80:20 v/v y se almacenó en congelación.

- Solución de trabajo de albendazol/ sulfóxido de albendazol 20-1000 ng/mL.

**Solución L.**

Se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de la solución D y 50  $\mu\text{L}$  de la solución E. Se transfirieron a un matraz aforado de 10 mL. Se llevó a volumen con metanol: agua 80:20 v/v y se almacenó en congelación.

- Muestra para control diluido 1:2 (PCD 1:2).

Se colocó en un microtubo: una alícuota de 30  $\mu\text{L}$  de la solución de Albendazol/Sulfóxido de Albendazol 5000/30000 ng/mL (SOL F) y 470 $\mu\text{L}$  de plasma. Se tomaron 75  $\mu\text{L}$  del plasma cargado, se adicionaron 75  $\mu\text{L}$  de la mezcla de matriz biológica libre de fármaco y se procesó de acuerdo con el método propuesto.

A partir de las soluciones F, G, H, I, J, K y L se preparó la curva de calibración y los puntos control necesarios durante la validación. La curva de calibración contó con ocho puntos. La preparación de los puntos de la curva y controles se representa en el cuadro 13 con las concentraciones finales en plasma.

Cuadro 13. Preparación de la curva de calibración y controles en plasma

NIVEL	Solución de trabajo ALB/ALBSO 20/1000 ng/mL (SOL L)	Solución de trabajo ALB/ALBSO 200/2000 ng/mL (SOL K)	Solución de trabajo ALB/ALBSO 1000/8000 ng/mL (SOL J)	Solución de trabajo ALB/ALBSO 1500/10000 ng/mL (SOL I)	Solución de trabajo ALB/ALBSO 4200/30000 ng/mL (SOL H)	Solución de trabajo ALB/ALBSO 4200/26000 ng/mL (SOL G)	Solución de trabajo ALB/ALBSO 5000/30000 ng/mL (SOL F)	Alicuota diluyente metanol:agua 80:20 v/v (µL)	Volumen de plasma (µL)	Volumen final de muestra (µL)	Concentración final en plasma ALBENDAZOL (ng/mL)	Concentración final en plasma SULFÓXIDO DE ALBENDAZOL (ng/mL)
CC1	10	-	-	-	-	-	-	40	950	1000	0.200	10.000
CC2	10	-	-	-	-	-	-	15	475	500	0.400	20.000
CC3	-	25	-	-	-	-	-	0	475	500	10.000	100.000
CC4	-	-	25	-	-	-	-	0	475	500	50.000	400.000
CC5	-	-	-	-	10	-	-	15	475	500	84.000	600.000
CC6	-	-	-	-	-	15	-	10	475	500	126.000	780.000
CC7	-	-	-	-	-	20	-	5	475	500	168.000	1040.000
CC8	-	-	-	-	-	-	20	5	475	500	200.000	1200.000
PCB	30	-	-	-	-	-	-	20	950	1000	0.600	30.000
PCM	-	-	-	50	-	-	-	0	950	1000	75.000	500.000
PCA	-	-	-	-	-	-	30	20	950	1000	150.000	900.000

\* ALB: Albendazol, ALBSO: Sulfóxido de albendazol, PCB: punto control bajo, PCM: punto control medio, PCA: punto control alto.

### **5.5.2.2. Proceso de análisis durante la validación del método.**

La validación del método analítico para cuantificar albendazol y sulfóxido de albendazol consistió en corridas analíticas realizadas en cinco diferentes días, las cuales incluyeron adecuabilidad del sistema, curva de calibración, puntos control (PCB, PCM, PCA) por quintuplicado y las pruebas a evaluar diarias.

#### **5.5.2.2.1. Adecuabilidad del sistema.**

Al iniciar cada corrida analítica se inyectó en seis ocasiones el PCM (punto control medio) para demostrar que el sistema cromatográfico se encontraba estable.

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación del valor promedio para el área relativa deberá ser  $\leq 5 \%$  y para el tiempo de retención deberá ser  $\leq 2 \%$ .

#### **5.5.2.2.2. Linealidad del método.**

Cada día de análisis se preparó y procesó una curva de calibración con ocho concentraciones. En ella se interpolaron los resultados generados de los parámetros evaluados en el día de validación. Cada curva de calibración incluyó una muestra de blanco de matriz (muestra procesada sin la adición del analito y del EI) y muestra cero (muestra procesada con la adición del EI).

Tiene la finalidad de demostrar que la linealidad de las curvas es reproducible en el intervalo de trabajo. Se determinó con tres curvas, para lo cual se preparó una curva de calibración a partir de pesada independiente durante 3 días.

Criterio de aceptación: Para cada curva de calibración, el coeficiente de correlación ( $r$ ) debe ser mayor o igual a 0.99 y las diferencias entre los valores de concentración

recuperada y el valor nominal en términos porcentuales, no deben ser mayor al 15 % en cada nivel de concentración a excepción del LIC que no debe ser mayor al 20 %. Para la evaluación de la linealidad al menos el 75 % del total de los niveles de concentración deben cumplir. En caso de excluir dos puntos, estos no deben ser los límites inferior y superior de la curva de calibración, y no deben encontrarse contiguos.

Del total de las curvas evaluadas, al menos el 50% de cada nivel de concentración debe ser menor o igual al 15 % de la concentración nominal, excepto para el LIC, el cual debe ser menor o igual al 20 %, adicionalmente el %CV del valor promedio de las pendientes de las curvas evaluadas debe ser menor o igual al 15 %.

#### **5.5.2.2.3. Precisión del método.**

Se evaluó con la determinación de la repetibilidad y reproducibilidad mediante puntos control de calidad, los cuales se prepararon a partir de las soluciones madre obtenidas de pesadas independientes.

##### **5.5.2.2.3.1. Repetibilidad**

Se prepararon por quintuplicado en un solo día de análisis el LIC, PCB, PCM, PCA y PCD (1:2). Los puntos control de este parámetro fueron independientes a las utilizadas en otras determinaciones. La dilución para el PCD fue realizada en la matriz biológica exenta de fármaco y la concentración obtenida se multiplicó por el factor de dilución para obtener la concentración real.

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación del promedio de cada nivel debe ser menor o igual al 15 %, excepto para el LIC, el cual debe ser menor o igual al 20 %. No se puede excluir ningún punto dentro de cada nivel de concentración.

#### 5.5.2.2.3.2. Reproducibilidad.

Esta prueba se preparó con pesadas independientes y se procesaron por quintuplicado el LIC, PCB, PCM y PCA en tres corridas analíticas diferentes en 3 días. Se determinó la concentración recuperada de las muestras control interpolando en la curva de calibración de cada día de análisis. Se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los puntos control de los tres días de validación.

Criterio de aceptación: El %CV del valor promedio debe ser menor o igual al 15 % para cada nivel de concentración, excepto para el LIC, el cual debe ser menor o igual que 20 %. No se pueden excluir puntos dentro de cada nivel de concentración.

#### 5.5.2.2.4. Exactitud del método.

La exactitud se evaluó de los resultados obtenidos en la prueba de repetibilidad y de los resultados obtenidos en la prueba de reproducibilidad. Se calculó el porcentaje de desviación absoluta empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ desviación} = 100 \times ABS \left( \frac{(\text{Concentración adicionada})(\text{Concentración obtenida})}{\text{Concentración adicionada}} \right)$$

Criterio de aceptación: La concentración recuperada para cada muestra y del promedio de cada nivel de concentración debe presentar desviación absoluta menor o igual al 15 % de su concentración, excepto para el límite inferior de cuantificación que debe ser menor o igual al 20 %. Y no se puede excluir ningún punto control de ningún nivel de concentración.

#### **5.5.2.2.5. Selectividad del método analítico.**

Se verificó que la cuantificación del analito de interés no era afectada por la presencia de compuestos endógenos en la matriz biológica analizada como metabolitos, productos de degradación, fármacos de uso común, productos liberados por la hemólisis, interferencias por muestras lipémicas, etc. Las selectividades evaluadas para albendazol y sulfóxido de albendazol durante la validación fueron:

##### **5.5.2.2.5.1. Selectividad a lotes de plasma**

Se evaluaron seis lotes de plasma, una muestra de cada uno y la mezcla. Se procesaron de manera individual de acuerdo con el método propuesto.

##### **5.5.2.2.5.2. Selectividad a hemólisis.**

Para la obtención de plasma hemolizado se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de sangre total y se diluyó con 900  $\mu\text{L}$  de plasma sin fármacos. Se procesó una muestra de acuerdo con el método propuesto.

##### **5.5.2.2.5.3. Selectividad a lipemia.**

Se evaluó una muestra b lanco que presentó lipemia y se procesó conforme al método propuesto.

##### **5.5.2.2.5.4. Selectividad a fármacos y/o metabolitos.**

Se preparó una muestra a la concentración máxima reportada para los fármacos cafeína, ácido salicílico, naproxeno, paracetamol y metoclopramida (2.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,

24 µg/mL, 94 µg/mL, 20 µg/mL y 47.5 ng/mL respectivamente). Se procesaron las muestras con forme a el método propuesto.

Criterio de aceptación: Las muestras evaluadas no deben presentar interferencias en el tiempo de retención del analito de interés ni en el del estándar interno. En caso de que se presente alguna señal, esta debe ser menor o igual al 20 % de la respuesta de la concentración del LIC y para el estándar interno no debe ser mayor del 5 % de su respuesta. En caso de que alguno de los seis lotes no cumpla, se realizará una prueba confirmatoria, de no cumplir, entonces el número de lotes de matriz biológica puede incrementarse a 10 de los cuales el 90 % debe cumplir con el criterio inicial.

#### **5.5.2.2.6. Efecto matriz.**

Se analizaron de manera independiente y unitaria seis lotes de matriz, la mezcla de la matriz biológica y la matriz biológica lipémica y hemolizada.

Se extrajeron muestras blanco de cada lote de matriz, se adicionó el analito y estándar interno en solución para obtener la respuesta analítica correspondiente. Se compararon las respuestas analíticas obtenidas respecto a las respuestas del analito y el estándar interno en solución inyectando por quintuplicado.

Se calculó el efecto matriz normalizado (EMN) por estándar interno promedio para cada unidad de matriz biológica de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Efecto matriz normalizado} = \left( \frac{\text{Área relativa de muestra postextracción}}{\text{Área relativa de muestra en solución}} \right)$$

Se evaluó el EMN a los niveles bajo y alto de concentración.

Criterio de aceptación: El porcentaje del coeficiente de variación del EMN de los lotes analizados y por nivel de concentración no debe ser mayor al 15 %. No se puede excluir ningún punto de la prueba.

#### **5.5.2.2.7. Prueba de acarreo.**

Se realizaron tres inyecciones de muestra blanco de reactivo siendo una antes y dos después de una inyección del límite superior de cuantificación (LSC). La prueba anterior se realizó por duplicado y se compararon las respuestas obtenidas en los blancos de reactivos contra la respuesta obtenida en el LIC.

Criterio de aceptación: Los blancos de reactivo inyectados posterior a punto alto, no deben presentar interferencias en el tiempo de retención del analito de interés, ni en el del estándar interno. En caso de que se presente alguna señal, esta deberá de ser menor al 20 % de la respuesta del LIC y para el estándar interno deberá ser menor al 5 % de su respuesta.

#### **5.5.2.2.8. Estabilidades**

##### **5.5.2.2.8.1. Estabilidad de las soluciones.**

Durante el desarrollo y parte de la validación se almacenaron, en diferentes condiciones, soluciones madre y de trabajo de los analitos de interés y el estándar interno. Después del periodo establecido para la realización de la prueba de estabilidad de las soluciones, se inyectó por quintuplicado la muestra en sistema a la concentración del PCM con cada una de las soluciones almacenadas y se compararon

las respuestas obtenidas de cada analito con la concentración del PCM en sistema preparado con soluciones estándar de pesada reciente.

A continuación, se describen los periodos de almacenamiento para cada solución:

➤ Solución madre de albendazol.

El día 30-ABR-2019 se almacenó en refrigeración la solución madre de albendazol. Después de 41 días (el día 10-JUN-2019) de almacenamiento, se preparó la concentración PCM en sistema por quintuplicado para la evaluación de la estabilidad.

➤ Solución madre de sulfóxido de albendazol.

El día 15-ABR-2019 se almacenó en congelación la solución madre de sulfóxido de albendazol. Después de 53 días (el día 07-JUN-2019) de almacenamiento, se preparó la concentración PCM en sistema por quintuplicado para la evaluación de la estabilidad.

➤ Solución madre de mebendazol.

El día 30-ABR-2019 se almacenó en refrigeración la solución madre de mebendazol. Después de 41 días (el día 10-JUN-2019) de almacenamiento, se preparó la concentración PCM en sistema por quintuplicado para la evaluación de la estabilidad.

➤ Solución de trabajo de albendazol.

El día 06-MAY-2019 se almacenó en congelación la solución de trabajo de albendazol. Después de 35 días (el día 10-JUN-2019) de almacenamiento, se preparó la concentración PCM en sistema por quintuplicado para la evaluación de la estabilidad.

➤ Solución de trabajo de sulfóxido de albendazol

El día 06-MAY-2019 se almacenó en congelación la solución de trabajo de sulfóxido de albendazol. Después de 35 días (el día 10-JUN-2019) de almacenamiento, se preparó la concentración PCM en sistema por quintuplicado para la evaluación de la estabilidad.

➤ Solución de trabajo de mebendazol.

El día 07-JUN-2019 se almacenó en congelación la solución de trabajo de mebendazol. Después de 5 días (el día 12-JUN-2019) de almacenamiento, se preparó la concentración PCM en sistema por quintuplicado para la evaluación de la estabilidad.

Criterio de aceptación: Las respuestas relativas promedio obtenidas de las muestras preparadas con las soluciones almacenadas deben presentar una desviación absoluta menor o igual al 10 % del promedio obtenido de los controles en sistema de soluciones recién preparadas. El porcentaje del coeficiente de variación del valor promedio debe ser menor o igual al 10 %. No se debe excluir ningún resultado para los cálculos.

**5.5.2.2.8.2. Estabilidad de la muestra en automuestreador.**

Se prepararon por quintuplicado muestras control a nivel bajo, medio y alto en la matriz biológica. Se procesaron de acuerdo con la técnica de extracción propuesta y se inyectaron al sistema cromatográfico. Posteriormente, las muestras se almacenaron en el automuestreador durante 22.2 h a 4 °C para albendazol y sulfóxido de albendazol y se reinyectaron al concluir el tiempo establecido.

Criterio de aceptación: Por lo menos el 80 % de las muestras control por nivel de concentración deben presentar una desviación absoluta menor o igual al 15 % con respecto a la concentración nominal. La concentración promedio de las muestras de estabilidad que cumplen por nivel de concentración, deberá presentar desviación absoluta menor o igual al 15 % del valor nominal y el coeficiente de variación no deberá ser mayor al 15 %.

#### **5.5.2.2.8.3. Estabilidad a temperatura ambiente o corto plazo.**

Se prepararon por quintuplicado muestras control a nivel bajo, medio y alto en plasma y se realizó el proceso de extracción después de 22.2 h.

Criterio de aceptación: Por lo menos el 80 % de las muestras control por nivel de concentración deben presentar una desviación absoluta menor o igual al 15 % con respecto a la concentración nominal. La concentración promedio de las muestras de estabilidad que cumplen por nivel de concentración, deberá presentar desviación absoluta menor o igual al 15 % del valor nominal y el coeficiente de variación del valor promedio no deberá ser mayor al 15 %.

#### **5.5.2.2.8.4. Estabilidad de la muestra procesada.**

Se prepararon por quintuplicado muestras control a nivel bajo, medio y alto en plasma y se procesaron de acuerdo con el método de extracción propuesto. Se almacenaron las muestras en refrigeración (4°C a 8°C) durante 5.9 h y finalizado el periodo de almacenamiento se inyectaron las muestras en el sistema cromatográfico.

Criterio de aceptación: Por lo menos el 80 % de las muestras control por nivel de concentración deben presentar una desviación absoluta menor o igual al 15 % con respecto a la concentración nominal. La concentración promedio de las muestras de estabilidad que cumplen por nivel de concentración, deberá presentar desviación absoluta menor o igual al 15 % del valor nominal y el coeficiente de variación del valor promedio no deberá ser mayor al 15 %.

#### **5.5.2.2.8.5. Estabilidad ciclos de congelación-descongelación.**

Se cargaron por quintuplicado los controles bajo, medio y alto. Se almacenaron en congelación (-70°C ± 10°C) por al menos 12 horas. Se descongelaron completamente

a temperatura ambiente y se repitió este ciclo otras dos veces. Se realizó el análisis al finalizar el último ciclo.

Criterio de aceptación: Por lo menos el 80 % de las muestras control por nivel de concentración deben presentar una desviación absoluta menor o igual al 15 % con respecto a la concentración nominal. La concentración promedio de las muestras de estabilidad que cumplen por nivel de concentración, deberá presentar desviación absoluta menor o igual al 15 % del valor nominal y el coeficiente de variación del valor promedio no deberá ser mayor al 15 %.

#### **5.5.2.2.8.6. Estabilidad a largo plazo (en congelación).**

Se prepararon por quintuplicado los puntos control bajo, medio y alto y se almacenaron en congelación ( $-70^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ ). Las muestras de albendazol y sulfóxido de albendazol se almacenaron durante 56 días. En el último día de validación se evaluó la serie de controles de acuerdo con el método propuesto.

Criterio de aceptación: Por lo menos el 80 % de las muestras control por nivel de concentración deben presentar una desviación absoluta menor o igual al 15 % con respecto a la concentración nominal. La concentración promedio de las muestras de estabilidad que cumplen por nivel de concentración, deberá presentar desviación absoluta menor o igual al 15 % del valor nominal y el coeficiente de variación del valor promedio no deberá ser mayor al 15 %.

#### **5.5.2.2.8.7. Estabilidad de la muestra evaporada.**

Se prepararon por quintuplicado muestras control con nivel bajo, medio y alto en plasma y se procesaron de acuerdo con el método de extracción propuesto. Posterior

a la evaporación, las muestras sin reconstituir se almacenaron en refrigeración (4°C a 8°C) durante 5.8 horas.

Criterio de aceptación: Por lo menos el 80 % de las muestras control por nivel de concentración deben presentar una desviación absoluta menor o igual al 15 % con respecto a la concentración nominal. La concentración promedio de las muestras de estabilidad que cumplen por nivel de concentración, deberá presentar desviación absoluta menor o igual al 15 % del valor nominal y el coeficiente de variación del valor promedio no deberá ser mayor al 15 %.

## **6. Resultados y discusión**

### **6.1. Desarrollo del método analítico.**

Para el desarrollo del método analítico se realizó previamente una investigación bibliográfica para recopilar información acerca de propiedades fisicoquímicas de los analitos y métodos previamente propuestos por diferentes autores para la cuantificación de estos. Los métodos encontrados tenían diferentes técnicas de extracción y condiciones cromatográficas, los cuales se presentaron en el cuadro 3.

Para la preparación de las soluciones madre fue necesario considerar la solubilidad de los analitos y el estándar interno. El albendazol y mebendazol demostraron tener menor solubilidad que el sulfóxido de albendazol, por lo que se tuvieron consideraciones especiales para estas soluciones madre. La solución madre de albendazol se preparó pesando el equivalente a 5 mg del estándar de albendazol y disolviendo en 25 mL en metanol para posteriormente sonicar la solución por 5 min y se almacenó en refrigeración para evitar que se formara un sedimento.

La solución madre de mebendazol fue preparada pesando el equivalente a 5 mg del estándar de mebendazol y disolviendo con metanol, agregando 10 mL de acetonitrilo

y posteriormente llevando a volumen con metanol en un matraz aforado de 25 mL. Se sonicó la solución y también se almacenó en refrigeración para evitar la formación de sedimento.

A continuación, se muestran las condiciones que se consideraron como óptimas durante el desarrollo analítico ya que fueron aquellas en las que se presentó mayor simetría y resolución en los picos y/o mejor respuesta.

### 6.1.1. Parámetros del espectrómetro de masas.

Las condiciones de fragmentación de los analitos y el estándar interno se presentan en el cuadro 14. Se observó una señal de mayor intensidad con una ionización positiva para ambos analitos y para el estándar interno. Los fragmentos se determinaron a partir de los iones precursores con base en la abundancia de la señal.

*Cuadro 14.* Condiciones de fragmentación de los analitos y el estándar interno seleccionado.

Analito	Ion precursor	Ion producto	Dwell	Energía de Fragmentación (V)	Energía de colisión	Voltaje de celda de aceleración	Polaridad
ALB	266	234.1	300	380	20	7	Positiva
ALBSO	282.1	240.1	300	380	15	5	Positiva
MBZ	296.1	264.1	300	380	15	5	Positiva

\*ALB: Albendazol, ALBSO: Sulfóxido de albendazol, MBZ: Mebendazol

El mebendazol se seleccionó como estándar interno durante el desarrollo del método ya que presenta mayor similitud en propiedades fisicoquímicas y estructurales con los analitos, además, la respuesta fue semejante al PCM y se logró recuperar con la misma técnica de extracción propuesta.

Después de la identificación de los iones producto se determinaron las condiciones de detección, nuevamente con base en la intensidad de la señal. En el cuadro 15 se muestran las condiciones para la detección.

Cuadro 15. Condiciones de detección para albendazol y sulfóxido de albendazol.

Parámetro	Valor
Temperatura del gas (°C)	200
Flujo de gas (L/min)	16
Nebulizador (psi)	30
Calentador del gas de revestimiento	300
Flujo del gas de revestimiento	10
Capilar (V)	2500
Carga (V)	1500

### 6.1.2. Condiciones cromatográficas

La fase estacionaria con la que se presentó una mejor separación de analitos fue una columna Phenomenex Luna C18 con un diámetro interno de 2.0 mm, longitud de 100 mm y un tamaño de partícula de 3 µm. La temperatura del horno de la columna se mantuvo en 30°C durante todo el análisis.

Se seleccionó ácido fórmico 0.1 %: metanol con elución en gradiente como fase móvil, ya que resultó ser óptima debido a los problemas de selectividad durante el desarrollo. En el cuadro 16 se encuentra el gradiente, con los tiempos de permanencia de cada proporción y las velocidades de flujo.

Cuadro 16. Elución en gradiente.

Tiempo (min)	Fase acuosa (%)	Fase orgánica (%)	Velocidad de flujo (mL/min)
0.0	40	60	0.35
2.3	40	60	0.35
3.0	0	100	0.50
3.5	0	100	0.50
4.3	40	60	0.35
5.3	40	60	0.35

El principal inconveniente durante el desarrollo fue la selectividad, ya que constantemente se presentaba una señal mayor al 20 % del LIC de los analitos (principalmente albendazol) en los blancos por lo que fue necesario considerar varias fases de lavado. La fase de lavado que mejoró la selectividad fue la compuesta por metanol: isopropanol en proporción 50:50 v/v por un tiempo de permanencia en puerto de 30 s.

El volumen de inyección seleccionado fue el de 3  $\mu$ L ya que presentó una buena señal y no interfirió en la selectividad del método.

### 6.1.3. Técnica de extracción

La técnica para la extracción con mejores resultados en linealidad y reproducibilidad fue por extracción líquido- líquido con acetato de etilo acidificando el medio con 40  $\mu$ L de ácido fórmico al 4%. A continuación, se presenta el proceso para la extracción.

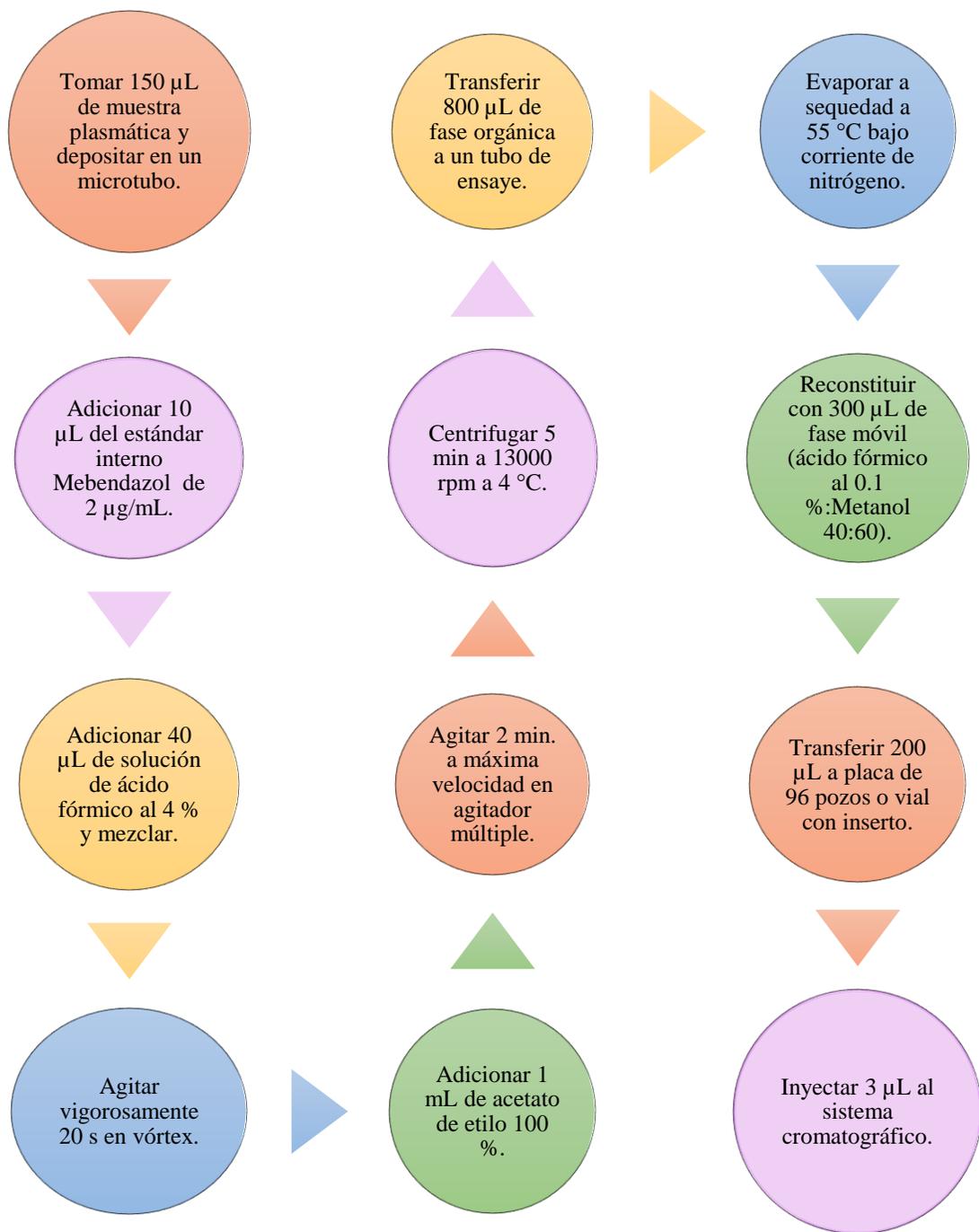


Figura 11..Proceso de extracción.

## 6.2. Validación del método bioanalítico.

A continuación, se muestran los resultados de la validación del método.

### 6.2.1. Adecuabilidad del sistema.

El cuadro 17 muestra los resultados de adecuabilidad en donde se presenta el %CV del valor promedio de tiempos de retención y área relativa por día de validación de cada analito.

Cuadro 17. Resultados de adecuabilidad

Día de validación	Albendazol		Sulfóxido de albendazol		Mebendazol
	Área relativa (%CV)	Tiempo de retención (%CV)	Área relativa (%CV)	Tiempo de retención (%CV)	Tiempo de retención (%CV)
06-jun-19	1.031	0.128	0.669	0.108	0.166
07-jun-19	0.405	0.084	1.085	0.073	0.176
10-jun-19	0.560	0.178	0.906	0.084	0.183
11-jun-19	1.046	0.108	2.093	0.108	0.130
12-jun-19	0.804	0.064	1.186	0.053	0.106
17-jul-19	0.540	0.156	0.487	0.108	0.207

En cada día de análisis, los %CV del área relativa fueron menores al 5 % y los del tiempo de retención fueron menores al 2 %, por lo que se verificó que el sistema funcionó constantemente en los días establecidos.

### 6.2.2. Linealidad.

El modelo matemático de cada curva de calibración de albendazol y sulfóxido de albendazol se ajustó por medio de un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados. Se realizó una ponderación  $1/x^2$  para el caso de albendazol y una ponderación  $1/x$  para sulfóxido de albendazol.

Los siguientes cuadros y figuras presentan los resultados de linealidad con las 3 curvas de calibración seleccionadas para la prueba.

Cuadro 18. Resultados de linealidad de ALB

Curva	Punto de la curva	Concentración nominal	Respuesta	Concentración recuperada	%Desviación	Pendiente	Ordenada al origen	r
1	1	0.200	660.504	0.200	0.181	0.0114	0.0007	0.9986
	2	0.400	1187.927	0.399	-0.159			
	3	10.000	22741.394	9.480	-5.197			
	4	50.000	118827.196	49.230	-1.539			
	5	84.000	219935.108	84.372	0.443			
	6	126.000	334431.611	132.482	5.144			
	7	168.000	386379.100	156.107	-7.079			
	8	200.000	594279.426	216.414	8.207			
2	1	0.200	541.184	0.193	-3.410	0.0131	0.0002	0.9993
	2	0.400	1151.264	0.428	6.953			
	3	10.000	25602.259	9.728	-2.715			
	4	50.000	129166.232	48.349	-3.302			
	5	84.000	217761.138	82.471	-1.821			
	6	126.000	348964.112	127.036	0.822			
	7	168.000	465075.306	170.165	1.289			
	8	200.000	571925.871	204.367	2.184			
3	1	0.200	565.500	0.200	0.148	0.0136	0.0001	0.9992
	2	0.400	*0.600	*50.109	50.109			
	3	10.000	27440.039	9.226	-7.743			
	4	50.000	139577.935	48.709	-2.581			
	5	84.000	259641.785	87.012	3.586			
	6	126.000	369234.554	130.329	3.436			
	7	168.000	503421.295	169.816	1.081			
	8	200.000	623001.737	204.147	2.074			
<b>Promedio</b>						0.0127	0.0003	0.9990
<b>D.E.</b>						0.0012	0.0003	0.0004
<b>%C.V.</b>						9.1697	96.4365	0.0379

\* Puntos de la curva que no cumplen con criterios de aceptación no considerados en la estadística

Cuadro 19. Resultados de concentración recuperada de ALB en la evaluación de la linealidad del método.

Concentración nominal (ng/mL)	Concentración recuperada (ng/mL)			Promedio	D.E.	%CV
	Curva 1	Curva 2	Curva 3			
0.200	0.200	0.193	0.200	0.198	0.004	2.085
0.400	0.399	0.428	*0.600	0.414	0.020	4.864
10.000	9.480	9.728	9.226	9.478	0.251	2.652
50.000	49.230	48.349	48.709	48.763	0.443	0.909
84.000	84.372	82.471	87.012	84.618	2.281	2.695
126.000	132.482	127.036	130.329	129.949	2.743	2.110
168.000	156.107	170.165	169.816	165.363	8.017	4.848
200.000	216.414	204.367	204.147	204.147	7.020	3.438

\* Puntos de la curva que no cumplen con criterios de aceptación no considerados en la estadística

Cuadro 20. Resultados de linealidad de método ALBSO

Curva	Punto de la curva	Concentración nominal	Respuesta	Concentración recuperada	% Desviación	Pendiente	Ordenada al origen	r
1	1	10	3563.404	9.412	-5.879	0.0015	0.0018	0.9991
	2	20	7078.364	19.469	-2.657			
	3	100	34809.447	108.998	8.998			
	4	400	133647.066	417.139	4.285			
	5	600	193577.530	559.575	-6.738			
	6	780	262208.684	782.976	0.382			
	7	1040	356026.642	1084.675	4.296			
	8	1200	425267.687	1167.756	-2.687			
2	1	10	3496.110	9.663	-3.367	0.0019	-0.0003	0.9997
	2	20	7271.388	19.860	-0.700			
	3	100	39329.488	105.310	5.310			
	4	400	146672.698	385.900	-3.525			
	5	600	228124.868	607.082	1.180			
	6	780	311863.071	797.642	2.262			
	7	1040	408481.856	1049.976	0.959			
	8	1200	467907.707	1174.566	-2.119			
3	1	10	4092.241	9.361	-6.391	0.0020	0.0012	0.9998
	2	20	10042.715	22.345	11.726			
	3	100	42399.310	95.325	-4.675			
	4	400	168099.870	394.040	-1.490			
	5	600	270486.190	609.187	1.531			
	6	780	321341.511	762.405	-2.256			
	7	1040	462318.493	1048.484	0.816			
	8	1200	548674.867	1208.852	0.738			
<b>Promedio</b>						0.0018	0.0009	0.9995
<b>D.E.</b>						0.0003	0.0011	0.0004
<b>%C.V.</b>						14.699	120.185	0.038

Cuadro 21. Resultados de concentración recuperada de ALBSO en la evaluación de la linealidad del método.

Concentración nominal (ng/mL)	Concentración recuperada (ng/mL)			Promedio	D.E.	%CV
	Curva 1	Curva 2	Curva 3			
10	9.412	9.663	9.361	9.479	0.162	1.708
20	19.469	19.860	22.345	20.558	0.277	1.407
100	108.998	105.310	95.325	103.211	7.074	6.854
400	417.139	385.900	394.040	399.027	16.205	4.061
600	559.575	607.082	609.187	591.948	28.056	4.740
780	782.976	797.642	762.405	781.008	17.701	2.266
1040	1084.675	1049.976	1048.484	1061.045	20.478	1.930
1200	1167.756	1174.566	1208.852	1183.725	22.026	10.789

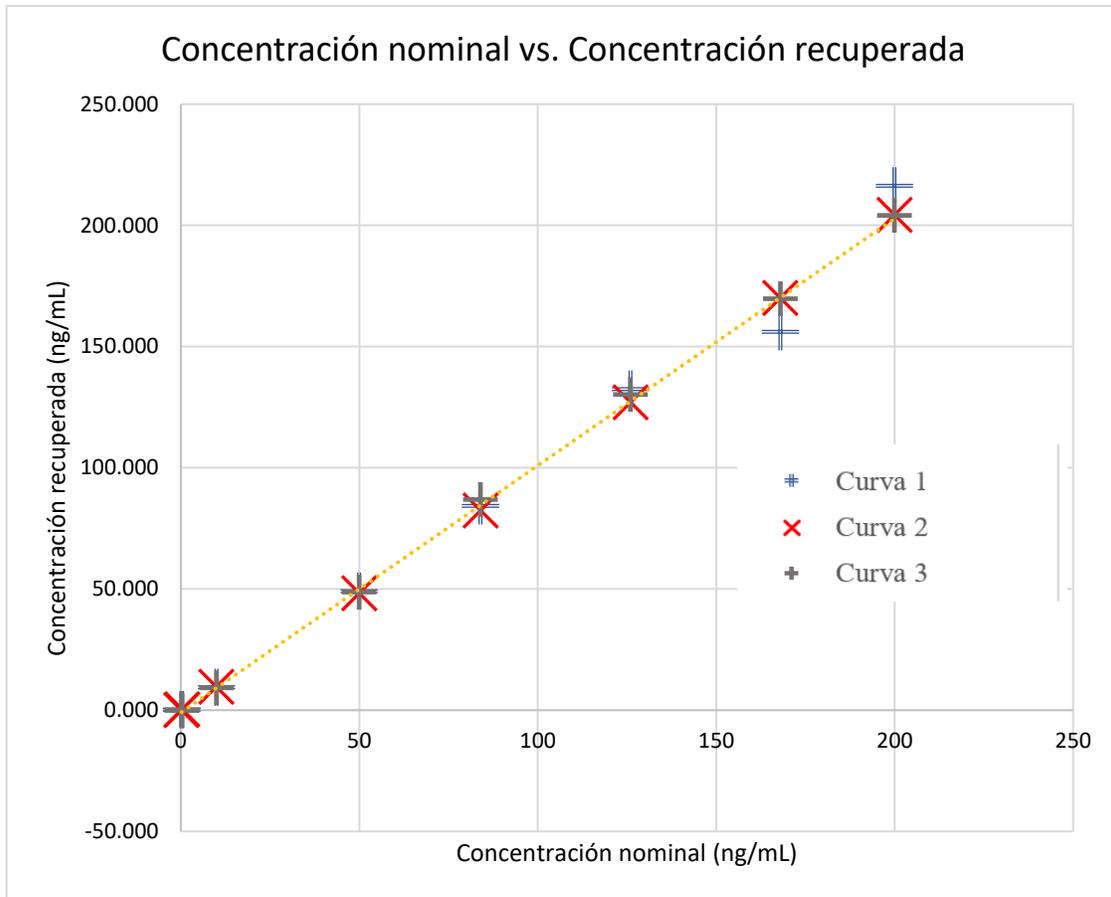


Figura 12. Gráfica de la concentración nominal contra concentración recuperada de ALB.

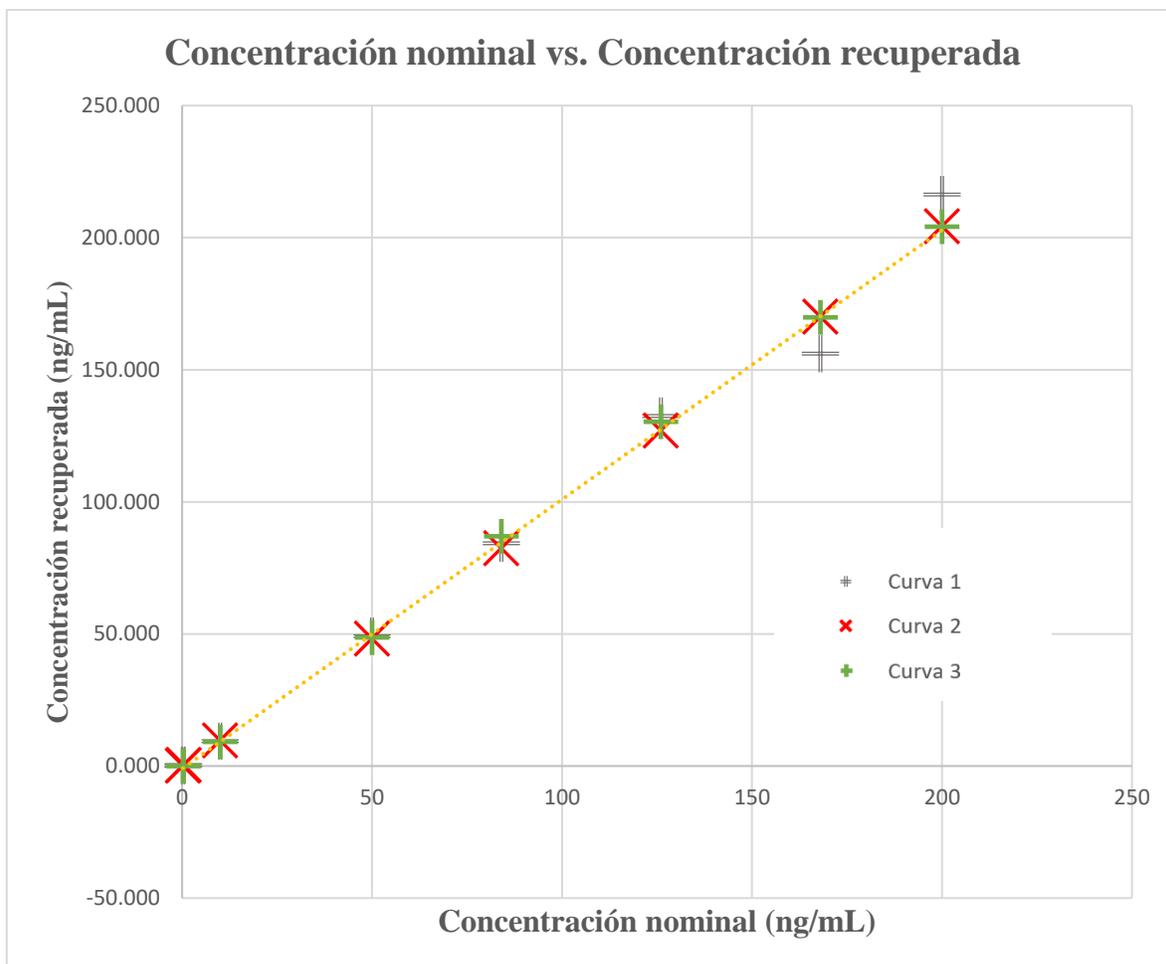


Figura 13. Gráfica de la concentración nominal contra concentración recuperada de ALBSO.

La linealidad del método fue determinada a partir del coeficiente de correlación ( $r$ ), el cual tuvo un valor mayor al 0.99 en el caso de las tres curvas para cada analito, cumpliendo con el criterio de aceptación.

Con base a lo anterior mencionado, se considera que el método es lineal en el intervalo de concentraciones de 0.200 – 200 ng/mL para albendazol y en el intervalo de concentraciones de 10- 1200 ng/mL para sulfóxido de albendazol.

En cada punto de la curva de cada analito se cumplió con los criterios de aceptación para exactitud y precisión, con excepción del nivel 2 (0.400 ng/mL) de la curva 3 de

ALB, el cual presentó una desviación absoluta mayor al 15% por lo cual se descartó del tratamiento estadístico.

### **6.2.3. Precisión y exactitud del método.**

Esta prueba se evaluó como repetibilidad y reproducibilidad.

#### **6.2.3.1. Repetibilidad y exactitud.**

Los cuadros 22 y 23, presentan los resultados obtenidos de la evaluación de la repetibilidad y exactitud para albendazol y sulfóxido de albendazol, en las cuales se observa que el coeficiente de variación y desviación absoluta en cada nivel de concentración son menores al 15 % para ambos analitos.

Cuadro 22. Resultados de repetibilidad y exactitud de ALB.

Muestra	Concentración (ng/mL)	Área E.I.	Promedio Concentración (ng/mL)	D.E.	%CV	% Desv. Abs.
LIC_1	0.199	214910.735	0.205	0.008	3.680	2.653
LIC_2	0.211	218499.778				
LIC_3	0.215	226885.669				
LIC_4	0.204	215434.200				
LIC_5	0.197	207965.735				
PCB_1	0.602	223420.850	0.618	0.015	2.493	2.919
PCB_2	0.623	223624.525				
PCB_3	0.604	220242.269				
PCB_4	0.618	213793.307				
PCB_5	0.640	220056.125				
PCM_1	75.432	215044.476	74.005	1.991	2.690	1.327
PCM_2	72.827	217515.715				
PCM_3	71.208	198042.530				
PCM_4	74.456	210397.291				
PCM_5	76.102	227808.282				
PCA_1	148.712	217660.667	147.654	8.088	5.477	1.564
PCA_2	133.539	222390.509				
PCA_3	152.674	213918.000				
PCA_4	153.051	212750.902				
PCA_5	150.293	210027.266				
PCD_1	303.500	222948.564	296.112	5.363	1.811	1.296
PCD_2	291.718	211418.207				
PCD_3	295.502	208269.692				
PCD_4	299.277	205091.042				
PCD_5	290.563	221495.606				

Cuadro 23. Resultados de repetibilidad y exactitud de ALBSO.

Muestra	Concentración (ng/mL)	Área E.I.	Promedio Concentración (ng/mL)	D.E.	%CV	% Desv. Abs.
LIC_1	9.450	214910.735	9.544	0.329	3.450	4.561
LIC_2	9.469	218499.778				
LIC_3	9.156	226885.669				
LIC_4	9.582	215434.200				
LIC_5	10.061	207965.735				
PCB_1	28.245	223420.850	28.151	0.654	2.325	6.165
PCB_2	28.294	223624.525				
PCB_3	27.502	220242.269				
PCB_4	29.123	213793.307				
PCB_5	27.588	220056.125				
PCM_1	467.901	215044.476	467.692	14.340	3.066	6.462
PCM_2	464.910	217515.715				
PCM_3	467.350	198042.530				
PCM_4	489.278	210397.291				
PCM_5	449.019	227808.282				
PCA_1	884.587	217660.667	889.151	11.940	1.343	1.205
PCA_2	896.002	222390.509				
PCA_3	902.070	213918.000				
PCA_4	892.035	212750.902				
PCA_5	871.061	210027.266				
PCD_1	1729.703	222948.564	1753.877	27.864	1.589	2.562
PCD_2	1762.406	211418.207				
PCD_3	1758.967	208269.692				
PCD_4	1793.556	205091.042				
PCD_5	1724.754	221495.606				

### 6.2.3.2. Reproducibilidad.

En los siguientes cuadros se muestran los resultados de la reproducibilidad de albendazol y sulfóxido de albendazol.

Cuadro 24. Resultados de reproducibilidad de ALB.

Día	LIC (0.2 ng/mL)	PCB (0.6 ng/mL)	PCI (30 ng/mL)	PCM (75 ng/mL)	PCA (150ng/mL)
<b>1</b> (06-JUN-2019)	0.185	0.554	29.138	73.230	160.840
	0.175	0.560	29.031	69.352	165.671
	0.162	0.526	29.705	72.027	160.498
	0.173	0.559	29.854	74.122	153.637
	0.161	0.546	28.858	77.050	152.834
<b>2</b> (07-JUN-2019)	0.237	0.594	28.419	76.225	151.571
	0.200	0.601	27.678	76.647	154.424
	0.204	0.567	28.856	74.778	155.361
	0.211	0.615	29.337	74.611	156.326
	0.210	0.532	29.542	74.800	169.512
<b>3</b> (08-JUN-2019)	0.236	0.546	28.257	75.017	152.513
	0.186	0.568	26.892	76.383	152.635
	0.223	0.580	27.474	72.253	150.350
	0.213	0.571	28.264	75.691	150.710
	0.210	0.566	28.060	76.716	147.468
<b>Promedio</b>	0.199	0.566	28.624	74.593	155.623
<b>D.E.</b>	0.025	0.025	0.862	2.133	6.048
<b>%C.V.</b>	12.309	4.335	3.013	2.860	3.886
<b>%Desv. Abs.</b>	0.446	5.728	4.586	0.542	3.749

Cuadro 25. Resultados de reproducibilidad de sulfóxido de albendazol.

Día	LIC (10 ng/mL)	PCB (30 ng/mL)	PCI (240 ng/mL)	PCM (500 ng/mL)	PCA (900ng/mL)
<b>1</b> (06-JUN-2019)	9.778	31.156	240.977	488.559	907.504
	9.633	31.275	241.593	480.778	939.181
	9.757	31.817	231.986	508.333	905.381
	9.558	31.656	227.609	503.880	899.039
	9.575	31.885	240.481	510.903	874.188
<b>2</b> (07-JUN-2019)	10.326	29.402	216.172	480.587	865.169
	10.008	28.040	214.866	470.240	820.161
	10.215	28.099	220.721	481.495	824.623
	10.065	28.529	211.420	477.895	839.324
	9.760	27.964	219.364	474.054	922.776
<b>3</b> (08-JUN-2019)	9.405	29.100	227.305	505.351	897.745
	9.244	28.860	223.660	492.447	887.714
	9.340	28.248	225.510	476.171	867.587
	9.495	27.673	232.507	480.617	874.038
	9.235	28.002	224.962	484.829	855.787
<b>Promedio</b>	9.693	29.447	226.609	487.743	878.681
<b>D.E.</b>	0.340	1.619	9.509	13.299	34.615
<b>%C.V.</b>	3.509	5.497	4.196	2.727	3.939
<b>%Desv. Abs.</b>	3.071	0.230	5.580	2.451	2.369

Los coeficientes de variación entre los diferentes días de trabajo para ambos analitos fueron menores al 15 % en los niveles de concentración evaluados.

#### 6.2.4. Prueba de acarreo.

En el cuadro 26 se encuentran los resultados de la prueba de acarreo. Con los cuadros 27 y 28 se demuestra que en ningún blanco hubo respuesta en los tiempos de retención de los analitos y estándar interno, lo que demuestra que no se presenta arrastre de estos durante el análisis.

Cuadro 26. Resultados de los blancos inyectados para la prueba de acarreo.

Analito	Serie de blancos	Muestra	% Respuesta 1	% Respuesta 2	% Respuesta E.I.	Área CC1 (ALB)	Área E.I. en LIC
ALB	1	BCOR1_1	0.000	0.000	0.000	660.504	222630.753
		BCOR1_2	0.000	0.000	0.000		
		BCOR1_3	0.000	0.000	0.000		
	2	BCOR2_1	0.000	0.000	0.000		
		BCOR2_2	0.000	0.000	0.000		
		BCOR2_3	0.000	0.000	0.000		
ALBSO	1	BCOR1_1	0.000	0.000	0.000	712.681	222630.753
		BCOR1_2	0.000	0.000	0.000		
		BCOR1_3	0.000	0.000	0.000		
	2	BCOR2_1	0.000	0.000	0.000		
		BCOR2_2	0.000	0.000	0.000		
		BCOR2_3	0.000	0.000	0.000		

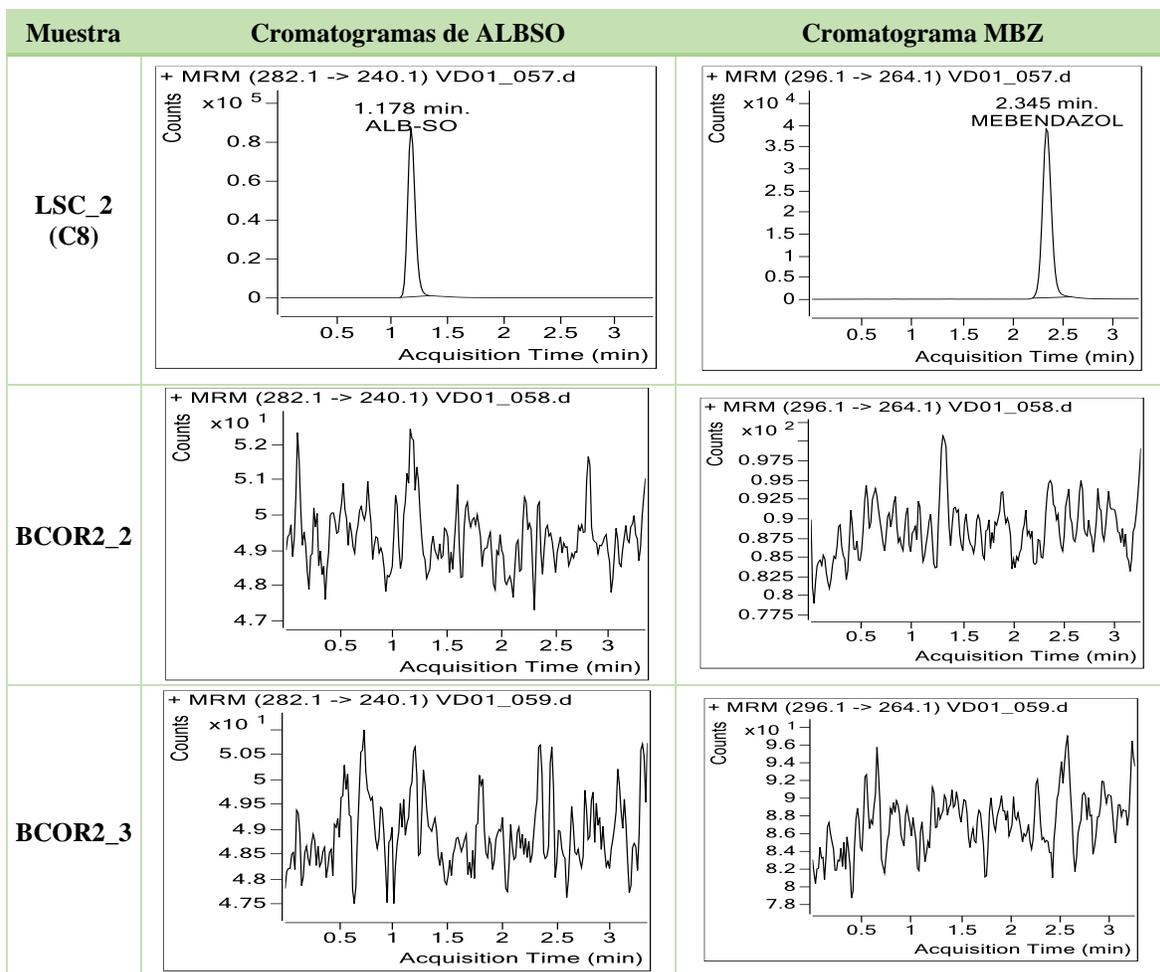
Cuadro 27. Cromatogramas de la evaluación del efecto de acarreo para albendazol y mebendazol.

Muestra	Cromatograma ALB	Cromatograma MBZ
<b>BCOR1_1</b>	<p>+ MRM (266.0 -&gt; 234.1) VD01_052.d Sm...</p>	<p>+ MRM (296.1 -&gt; 264.1) VD01_052.d</p>
<b>LSC_1 (C8)</b>	<p>+ MRM (266.0 -&gt; 234.1) VD01_053.d Sm... 2.347 min. ALBENDAZOL</p>	<p>+ MRM (296.1 -&gt; 264.1) VD01_053.d 2.353 min. MEBENDAZOL</p>
<b>BCOR1_2</b>	<p>+ MRM (266.0 -&gt; 234.1) VD01_054.d Sm...</p>	<p>+ MRM (296.1 -&gt; 264.1) VD01_054.d</p>
<b>BCOR1_3</b>	<p>+ MRM (266.0 -&gt; 234.1) VD01_055.d Sm...</p>	<p>+ MRM (296.1 -&gt; 264.1) VD01_055.d</p>
<b>BCOR2_1</b>	<p>+ MRM (266.0 -&gt; 234.1) VD01_056.d Sm...</p>	<p>+ MRM (296.1 -&gt; 264.1) VD01_056.d</p>

Muestra	Cromatograma ALB	Cromatograma MBZ
LSC_2 (C8)		
BCOR2_2		
BCOR2_3		

Cuadro 28. Cromatogramas de la evaluación del efecto de acarreo para sulfóxido de albendazol y mebendazol.

Muestra	Cromatogramas de ALBSO	Cromatograma MBZ
<b>BCOR1_1</b>	<p>+ MRM (282.1 -&gt; 240.1) VD01_052.d</p>	<p>+ MRM (296.1 -&gt; 264.1) VD01_052.d</p>
<b>LSC_1 (C8)</b>	<p>+ MRM (282.1 -&gt; 240.1) VD01_053.d</p> <p>1.182 min. ALB-SO</p>	<p>+ MRM (296.1 -&gt; 264.1) VD01_053.d</p> <p>2.353 min. MEBENDAZOL</p>
<b>BCOR1_2</b>	<p>+ MRM (282.1 -&gt; 240.1) VD01_054.d</p>	<p>+ MRM (296.1 -&gt; 264.1) VD01_054.d</p>
<b>BCOR1_3</b>	<p>+ MRM (282.1 -&gt; 240.1) VD01_055.d</p>	<p>+ MRM (296.1 -&gt; 264.1) VD01_055.d</p>
<b>BCOR2_1</b>	<p>+ MRM (282.1 -&gt; 240.1) VD01_056.d</p>	<p>+ MRM (296.1 -&gt; 264.1) VD01_056.d</p>



### 6.2.5. Selectividad del método analítico.

La evaluación de posibles interferencias del método se muestra en los siguientes apartados.

#### 6.2.5.1. Selectividad a lotes de plasma, hemólisis y lipemia.

Los resultados de la selectividad a lotes de plasma, hemolizado y lipémico para albendazol y sulfóxido de albendazol se muestran en el cuadro 29.

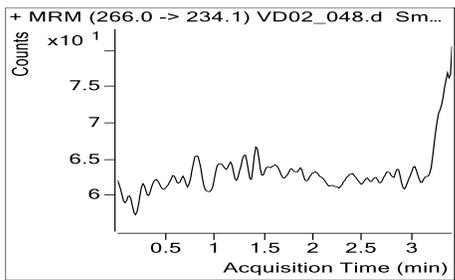
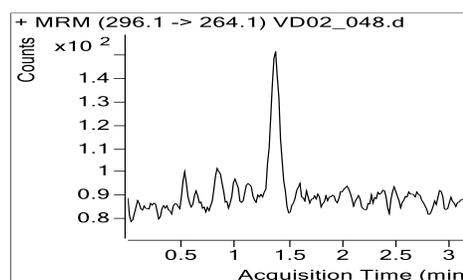
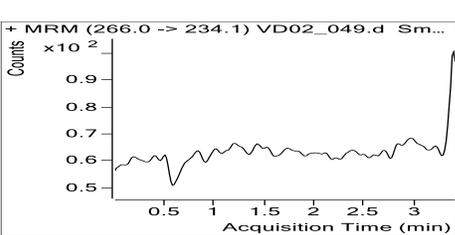
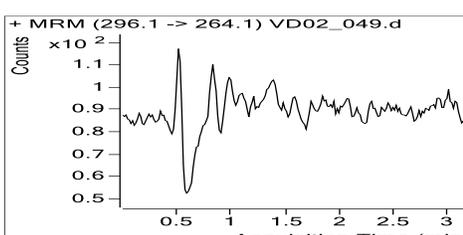
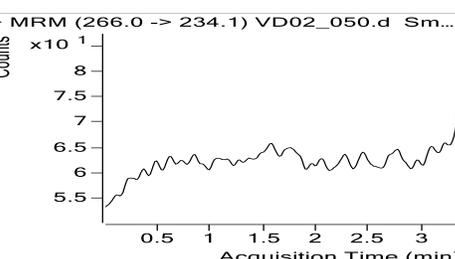
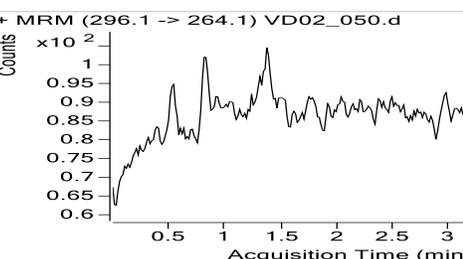
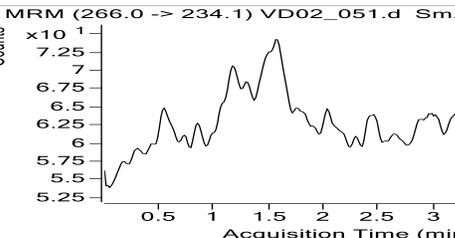
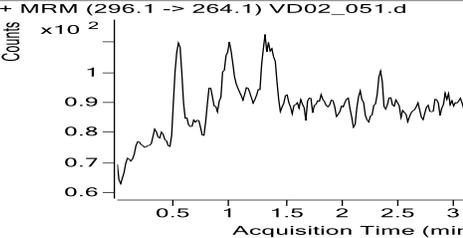
Cuadro 29. Resultados de selectividad a lotes de plasma de ALB, ALB y MBZ.

Muestra	Respuesta ALB	Respuesta ALB-SO	Respuesta EI	Respuesta ALB (LIC)	Respuesta ALBSO (LIC)	% de respuesta respecto al LIC ALB/ALBSO
Lote 1	0.000	0.000	0.000	541.184	3496.110	0.000/0.000
Lote 2	0.000	0.000	0.000			0.000/0.000
Lote 3	0.000	0.000	0.000			0.000/0.000
Lote 4	0.000	0.000	0.000			0.000/0.000
Lote 5	0.000	0.000	0.000			0.000/0.000
Lote 6	0.000	0.000	0.000			0.000/0.000
Mezcla de matriz	0.000	0.000	0.000			0.000/0.000
Muestra lipémica	0.000	0.000	0.000			0.000/0.000
Muestra hemolizada	0.000	0.000	0.000			0.000/0.000

En los siguientes cuadros se presentan los cromatogramas como evidencia de la no existencia de señal significativa en los tiempos de retención de los analitos y del estándar interno, por lo que se determina que el método fue selectivo.

Cuadro 30. Cromatogramas de albendazol y mebendazol (E.I.) de la prueba de selectividad a lotes de plasma.

Lote de plasma	Cromatograma de ALB	Cromatograma de MBZ
Lote 1		
Lote 2		
Lote 3		
Lote 4		
Lote 5		

Lote de plasma	Cromatograma de ALB	Cromatograma de MBZ
<b>Lote 6</b>		
<b>Mezcla de lotes</b>		
<b>Matriz lipémica</b>		
<b>Matriz hemolizada</b>		

Cuadro 31. Cromatogramas de sulfóxido de albendazol y mebendazol (E.I.) para la prueba de selectividad a lotes de plasma.

Lote de plasma	Cromatograma de ALBSO	Cromatograma de MBZ
Lote 1		
Lote 2		
Lote 3		
Lote 4		
Lote 5		

Lote de plasma	Cromatograma de ALBSO	Cromatograma de MBZ
<b>Lote 6</b>		
<b>Mezcla de lotes</b>		
<b>Matriz lipémica</b>		
<b>Matriz hemolizada</b>		

### 6.2.5.2. Selectividad a fármacos de uso común.

El cuadro 32 muestra los resultados de la evaluación de la selectividad a fármacos de uso común para ambos analitos.

Cuadro 32. Resultados de selectividad a fármacos de uso común de ALB, ALBSO y MBZ.

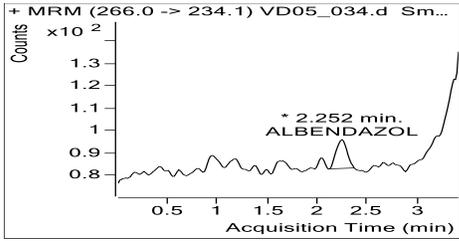
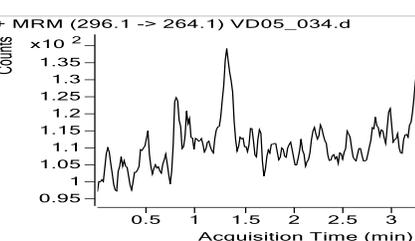
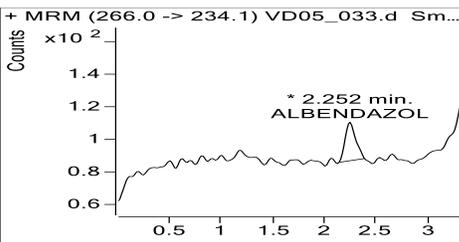
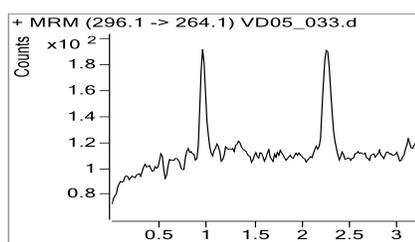
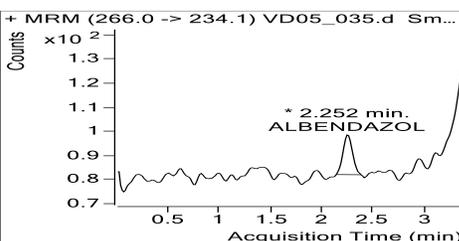
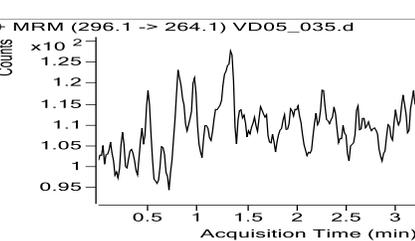
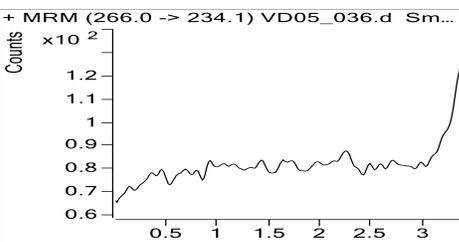
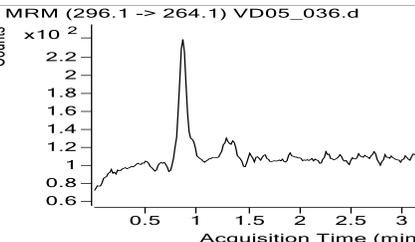
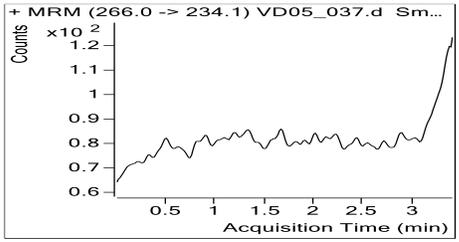
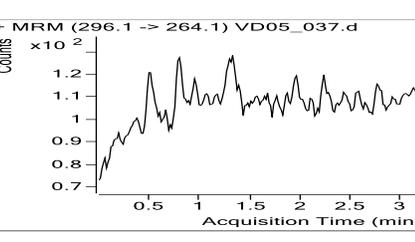
Muestra	Albendazol			Sulfóxido de albendazol			Mebendazol (E.I.)		
	Respuesta	Respuesta LIC	% Respuesta de LIC	Respuesta	Respuesta LIC	% respuesta de LIC	Respuesta	Respuesta LIC	% respuesta de LIC E.I.
Cafeína	168.093	916.393	18.343	0.000	5148.312	0.000	0.000	275773.238	0.000
Ác. Salicílico	97.880		10.681	0.000		0.000	0.000		
Naproxeno	107.246		11.703	0.000		0.000	0.000		
Paracetamol	0.000		0.000	0.000		0.000	0.000		
Metoclopramida	0.000		0.000	0.000		0.000	0.000		

A pesar de que se presentó una señal en el tiempo de retención de albendazol en la evaluación de la selectividad en presencia de cafeína, ácido salicílico y naproxeno, ninguna fue significativa ya que son menores al 20% de la respuesta del LIC.

No existió respuesta en ninguno de los fármacos evaluados para sulfóxido de albendazol y mebendazol, por lo que se considera que el método fue selectivo en presencia de fármacos de uso común.

En los siguientes cuadros se presentan los cromatogramas como evidencia de la no interferencia de fármacos de uso común.

Cuadro 33. Cromatogramas de la evaluación de selectividad a fármacos de uso común de ALB y MBZ.

Muestra	Albendazol	Mebendazol (E.I.)
<b>Ác. salicílico</b>		
<b>Cafeína</b>		
<b>Naproxeno</b>		
<b>Paracetamol</b>		
<b>Metoclopramida</b>		

Cuadro 34. Cromatogramas de la evaluación de la prueba de selectividad a fármacos de uso común de ALBSO y MBZ.

Muestra	Sulfóxido de albendazol	Mebendazol (E.I.)
Ác. salicílico		
Cafeína		
Naproxeno		
Paracetamol		
Metoclopramida		

### 6.2.6. Efecto matriz.

En el cuadro 35 y 36 se presentan los resultados de la evaluación del efecto matriz.

Cuadro 35. Resultados de la evaluación del efecto matriz de Albendazol.

Nivel de concentración	Muestra	Área relativa	EMN	Promedio EMN	D.E.	%C.V.
PCB	Lote 1	0.008	1.212	1.235	0.035	2.848
	Lote 2	0.008	1.220			
	Lote 3	0.009	1.253			
	Lote 4	0.008	1.217			
	Lote 5	0.009	1.313			
	Lote 6	0.008	1.197			
	Mezcla	0.009	1.258			
	Lipémico	0.008	1.234			
	Hemolizado	0.008	1.213			
PCA	Lote 1	2.199	0.999	1.014	0.010	0.945
	Lote 2	2.224	1.011			
	Lote 3	2.238	1.017			
	Lote 4	2.238	1.017			
	Lote 5	2.253	1.024			
	Lote 6	2.243	1.019			
	Mezcla	2.219	1.009			
	Lipémico	2.260	1.027			
	Hemolizado	2.204	1.002			

Cuadro 36. Resultados de la evaluación del efecto matriz de sulfóxido de albendazol.

Nivel de concentración	Muestra	Área relativa	EMN	Promedio EMN	D.E.	%C.V.
PCB	Lote 1	0.056	0.997	1.009	0.014	1.380
	Lote2	0.057	1.009			
	Lote 3	0.057	1.004			
	Lote 4	0.057	1.001			
	Lote 5	0.058	1.032			
	Lote 6	0.058	1.026			
	Mezcla	0.058	1.020			
	Lipémico	0.056	0.994			
	Hemolizado	0.056	0.997			
PCA	Lote 1	1.686	1.004	1.034	0.014	1.308
	Lote 2	1.733	1.032			
	Lote 3	1.724	1.027			
	Lote 4	1.741	1.037			
	Lote 5	1.750	1.042			
	Lote 6	1.767	1.052			
	Mezcla	1.754	1.045			
	Lipémico	1.737	1.034			
	Hemolizado	1.733	1.032			

El efecto matriz afectó principalmente a la ionización del PCA de albendazol, sin embargo, esta alteración es constante y no interfiere en la precisión del método ya que el coeficiente de variación para el efecto matriz normalizado fue menor al 15%.

### 6.2.7. Estabilidades.

Los resultados de las pruebas de estabilidad se presentan a continuación:

#### 6.2.7.1. Estabilidad de la muestra.

Los resultados de las estabilidades de las muestras indican que son estables en las condiciones y tiempos de almacenamiento ya que el coeficiente de variación y la desviación absoluta son menores al 15% para ambos analitos.

### 6.2.7.1.1. Estabilidad a temperatura ambiente.

Los cuadros 39 y 40 muestran los resultados de la estabilidad para ambos analitos.

Cuadro 37. Resultados de estabilidad a temperatura ambiente después de 22.2 horas de albendazol.

Control	PCB (0.6ng/mL)	PCM (75ng/mL)	PCA (150 ng/mL)
1	0.575	65.796	141.064
2	*0.502	68.774	142.776
3	0.513	66.337	140.990
4	0.523	65.533	149.874
5	0.512	66.838	143.106
<b>Promedio</b>	0.531	66.656	143.562
<b>D. E.</b>	0.030	1.287	3.658
<b>%CV</b>	5.652	1.930	2.548
<b>% Desv. Abs.</b>	11.509	11.125	4.292

\* Valor que no cumple con criterio de aceptación y por lo tanto no es considerado para la estadística.

Cuadro 38. Resultados de estabilidad a temperatura ambiente durante 22.2 horas de sulfóxido de albendazol.

Control	PCB (30 ng/mL)	PCM (500ng/mL)	PCA (900 ng/mL)
1	28.107	433.908	796.231
2	28.545	435.281	812.385
3	28.765	436.545	803.809
4	28.313	444.061	806.839
5	27.948	439.445	802.126
<b>Promedio</b>	28.283	437.848	804.278
<b>D. E.</b>	0.354	4.030	5.956
<b>%CV</b>	1.252	0.920	0.741
<b>% Desv. Abs.</b>	5.723	12.430	10.636

### 6.2.7.1.2. Estabilidad en el automuestreador.

Los cuadros 41 y 42 presentan los resultados para la estabilidad en el automuestreador evaluada después de 22.2 h a 4°C.

Cuadro 39. Resultados de estabilidad en el automuestreador tras 22.2h a 4°C de albendazol.

Control	PCB (0.600ng/mL)	PCM (75.000ng/mL)	PCA (150.000 ng/mL)
1	0.519	70.690	143.817
2	0.514	71.785	143.423
3	0.516	66.593	142.387
4	0.558	71.007	141.374
5	0.522	71.737	144.381
<b>Promedio</b>	0.526	70.362	143.076
<b>D. E.</b>	0.018	2.159	1.198
<b>%CV</b>	3.501	3.068	0.838
<b>% Desv. Abs.</b>	12.365	6.625	4.616

Cuadro 40. Resultados de estabilidad en el automuestreador tras 22.2 h a 4°C de sulfóxido de albendazol.

Control	PCB (30.000ng/mL)	PCM (500.000ng/mL)	PCA (900.000ng/mL)
1	28.513	497.022	855.536
2	28.147	466.427	848.500
3	29.411	471.950	812.218
4	27.875	468.522	854.595
5	28.134	483.774	852.320
<b>Promedio</b>	28.416	477.539	844.634
<b>D. E.</b>	0.601	12.791	18.323
<b>%CV</b>	2.114	2.679	2.169
<b>% Desv. Abs.</b>	5.279	4.492	6.152

### 6.2.7.1.3. Estabilidad a largo plazo.

Los cuadros 43 y 44 presentan los resultados de la estabilidad a largo plazo de los analitos, evaluada después de 56 días de almacenamiento en congelación.

Cuadro 41. Resultados de la evaluación de la estabilidad a largo plazo para albendazol tras 56 días de almacenamiento en congelación.

Control	PCB (0.600ng/mL)	PCM (75.000ng/mL)	PCA (150.000 ng/mL)
1	0.650	84.249	167.128
2	0.645	82.812	167.308
3	*1.098	81.779	169.505
4	0.682	82.111	*72.388
5	0.672	82.091	167.223
<b>Promedio</b>	0.662	82.608	167.791
<b>D. E.</b>	0.018	0.992	1.145
<b>%CV</b>	2.683	1.201	0.682
<b>% Desv. Abs.</b>	10.409	10.144	11.861

\*Resultados que no cumplen con criterios de aceptación y no son considerados para la estadística.

Cuadro 42. . Resultados de la evaluación de la estabilidad a largo plazo para sulfóxido de albendazol tras 56 días de almacenamiento en congelación.

Control	PCB (30.000ng/mL)	PCM (500.000ng/mL)	PCA (900.000ng/mL)
1	30.506	486.535	878.768
2	29.903	493.202	854.329
3	30.565	489.739	888.373
4	31.540	484.645	1025.476
5	30.132	493.233	875.577
<b>Promedio</b>	30.529	489.471	904.504
<b>D. E.</b>	0.627	3.875	68.759
<b>%CV</b>	2.054	0.792	7.602
<b>% Desv. Abs.</b>	1.764	2.106	0.500

#### 6.2.7.1.4. Estabilidad de la muestra procesada.

En los cuadros 45 y 46 se muestran los resultados de la evaluación de la estabilidad de la muestra procesada después de 5.9 h almacenamiento en refrigeración.

*Cuadro 43. Resultados de la estabilidad de la muestra procesada tras 5.9 h de almacenamiento en refrigeración de albendazol.*

Control	PCB (0.600ng/mL)	PCM (75.000ng/mL)	PCA (150.000ng/mL)
1	0.626	81.686	150.550
2	0.607	76.744	151.127
3	0.607	80.161	153.849
4	0.544	80.544	154.903
5	0.596	75.650	153.256
<b>Promedio</b>	0.596	78.957	152.737
<b>D. E.</b>	0.031	2.610	1.842
<b>%CV</b>	5.165	3.306	1.206
<b>% Desv. Abs.</b>	0.665	5.276	1.825

*Cuadro 44. Resultados de la estabilidad de la muestra procesada tras 5.9 h de almacenamiento en refrigeración de sulfóxido de albendazol.*

Control	PCB (30.000ng/mL)	PCM (500.000ng/mL)	PCA (900.000ng/mL)
1	28.947	476.333	852.477
2	28.999	477.607	844.396
3	29.446	478.148	845.071
4	29.177	461.156	895.600
5	28.924	483.722	860.376
<b>Promedio</b>	29.099	475.393	859.584
<b>D. E.</b>	0.218	8.448	21.152
<b>%CV</b>	0.750	1.777	2.461
<b>% Desv. Abs.</b>	3.005	4.921	4.491

### 6.2.7.1.5. Estabilidad de la muestra a ciclos de congelación-descongelación.

En los siguientes cuadros se presentan los resultados de la evaluación de la estabilidad de los analitos después de 3 ciclos de congelación-descongelación.

*Cuadro 45. Resultados de la evaluación de estabilidad a ciclos de congelación y descongelación de albendazol*

Control	PCB (0.600ng/mL)	PCM (75.000ng/mL)	PCA (150.000ng/mL)
1	0.599	75.265	146.394
2	0.575	77.917	148.867
3	0.567	74.360	151.866
4	0.571	70.940	147.805
5	0.598	73.155	148.606
<b>Promedio</b>	0.582	74.328	148.708
<b>D. E.</b>	0.015	2.579	2.011
<b>%CV</b>	2.602	3.470	1.352
<b>% Desv. Abs.</b>	3.005	0.896	0.862

*Cuadro 46. Resultados de la evaluación de estabilidad a ciclos de congelación y descongelación de sulfóxido de albendazol*

Control	PCB (30.000ng/mL)	PCM (500.000ng/mL)	PCA (900.000ng/mL)
1	27.011	432.054	*752.734
2	27.491	440.287	775.999
3	27.539	440.250	787.166
4	27.810	430.872	779.949
5	26.941	427.268	768.577
<b>Promedio</b>	27.359	434.146	777.923
<b>D. E.</b>	0.370	5.860	7.758
<b>%CV</b>	1.354	1.350	0.997
<b>% Desv. Abs.</b>	6.773	13.171	13.564

### 6.2.7.1.6. Estabilidad de la muestra evaporada.

Los cuadros 49 y 50 muestran los resultados de la estabilidad de la muestra evaporada, evaluada después de 5.8 h de almacenamiento en refrigeración.

*Cuadro 47. Resultados de la estabilidad de la muestra evaporada tras 5.8h de almacenamiento en refrigeración de albendazol*

Control	PCB (0.600ng/mL)	PCM (75.000ng/mL)	PCA (150.000ng/mL)
1	0.583	76.098	140.527
2	0.552	77.194	156.655
3	0.579	75.976	141.651
4	0.563	75.629	145.922
5	0.540	72.980	150.643
<b>Promedio</b>	0.564	75.575	147.080
<b>D. E.</b>	0.018	1.565	6.673
<b>%CV</b>	3.223	2.071	4.537
<b>% Desv. Abs.</b>	6.067	0.767	1.947

*Cuadro 48. Resultados de la estabilidad de la muestra evaporada tras 5.8h de almacenamiento en refrigeración de sulfóxido de albendazol.*

Control	PCB (30.000ng/mL)	PCM (500.000ng/mL)	PCA (900.000ng/mL)
1	29.523	487.049	894.497
2	29.050	492.566	914.533
3	29.069	484.568	873.060
4	29.190	475.530	853.323
5	29.388	471.990	898.100
<b>Promedio</b>	29.244	482.340	886.703
<b>D. E.</b>	0.206	8.444	23.799
<b>%CV</b>	0.704	1.751	2.684
<b>% Desv. Abs.</b>	2.520	3.352	1.478

### 6.2.7.2. Estabilidad de las soluciones.

Los resultados de las estabildades evaluadas para las soluciones se presentan en los siguientes cuadros. Los coeficientes de variación y la desviación absoluta son menores al 10%, por lo que se considera que las soluciones son estables en las condiciones almacenadas.

#### 6.2.7.2.1. Estabilidad de las soluciones madre

Los cuadros que se muestran a continuación presentan los resultados de la evaluación de la estabilidad de las soluciones madre de los analitos y el estándar interno.

*Cuadro 49. Estabilidad de la solución madre de ALB en refrigeración después de 41 días.*

Muestra	Referencia	Solución prueba
1	3.722	3.703
2	3.750	3.735
3	3.685	3.751
4	3.759	3.719
5	3.767	3.818
<b>Promedio</b>	3.737	3.745
<b>D.E.</b>	0.034	0.045
<b>%C.V.</b>	0.900	0.012
% Desv. Abs.	0.234	

Cuadro 50. Estabilidad de la solución madre de ALBSO en congelación después de 53 días.

Muestra	Referencia	Solución prueba
1	0.754	0.765
2	0.752	0.765
3	0.747	0.743
4	0.752	0.759
5	0.743	0.769
<b>Promedio</b>	0.750	0.760
<b>D.E.</b>	0.004	0.010
<b>%C.V.</b>	0.597	1.349
% Desv. Abs.	1.414	

Cuadro 51. Estabilidad de la solución madre de mebendazol en refrigeración evaluada después de 41 días de almacenamiento respecto a albendazol.

Muestra	Referencia	Solución prueba
1	3.722	3.452
2	3.750	3.488
3	3.685	3.495
4	3.759	3.485
5	3.767	3.500
<b>Promedio</b>	3.737	3.484
<b>D.E.</b>	0.034	0.019
<b>%C.V.</b>	0.900	0.538
% Desv. Abs.	6.756	

*Cuadro 52. Estabilidad de la solución madre de mebendazol en refrigeración evaluada después de 41 días de almacenamiento respecto a sulfóxido de albendazol.*

<b>Muestra</b>	<b>Referencia</b>	<b>Solución prueba</b>
1	3.405	3.526
2	3.519	3.560
3	3.479	3.570
4	3.467	3.575
5	3.455	3.541
<b>Promedio</b>	3.465	3.554
<b>D.E.</b>	0.042	0.020
<b>%C.V.</b>	1.200	0.572
% Desv. Abs.	2.585	

#### **6.2.7.2.2. Estabilidad de las soluciones de trabajo.**

Los siguientes cuadros muestran los resultados de la evaluación de las estabildades de las soluciones de trabajo de los analitos y el estándar interno.

*Cuadro 53. Resultados de estabilidad de la solución de trabajo de albendazol evaluada después de 35 días de almacenamiento en congelación*

<b>Muestra</b>	<b>Referencia</b>	<b>Solución prueba</b>
1	3.722	3.941
2	3.750	3.875
3	3.685	3.859
4	3.759	3.903
5	3.767	3.880
<b>Promedio</b>	3.737	3.891
<b>D.E.</b>	0.034	0.032
<b>%C.V.</b>	0.900	0.008
% Desv. Abs.	4.144	

Cuadro 54. Resultados de estabilidad de la solución de trabajo de sulfóxido de albendazol evaluada después de 35 días de almacenamiento en congelación

Muestra	Referencia	Solución prueba
1	3.405	3.791
2	3.519	3.818
3	3.479	3.780
4	3.467	3.808
5	3.455	3.805
<b>Promedio</b>	3.465	3.801
<b>D.E.</b>	0.042	0.015
<b>%C.V.</b>	1.200	0.396
<b>% Desv. Abs.</b>	9.694	

Cuadro 55. Resultados de estabilidad de la solución de trabajo de mebendazol respecto a albendazol evaluada después de 5 días de almacenamiento en congelación.

Muestra	Referencia	Solución prueba
1	1.133	1.068
2	1.115	1.063
3	1.117	1.076
4	1.123	1.075
5	1.114	1.087
<b>Promedio</b>	1.120	1.074
<b>D.E.</b>	0.008	0.009
<b>%C.V.</b>	0.684	0.008
<b>% Desv. Abs.</b>	4.155	

Cuadro 56. Resultados de estabilidad de la solución de trabajo de mebendazol respecto a sulfóxido de albendazol evaluada después de 5 días de almacenamiento en congelación.

Muestra	Referencia	Solución prueba
1	0.956	1.002
2	0.959	1.030
3	0.962	1.010
4	0.966	1.027
5	0.953	1.039
<b>Promedio</b>	0.959	1.022
<b>D.E.</b>	0.005	0.015
<b>%C.V.</b>	0.524	1.486
<b>% Desv. Abs.</b>	6.485	

## 7. CONCLUSIONES.

Se desarrolló un método analítico para la cuantificación simultánea de albendazol y sulfóxido de albendazol en plasma por UHPLC acoplado a espectrometría de masas-masas. Este método analítico es confiable al evaluar los parámetros establecidos en la NOM-177-SSA1-2013, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados, centros de investigación o instituciones hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad.

El método propuesto además de tener similitudes con otros y ser confiable para la cuantificación de ambos analitos, tiene una técnica de extracción sencilla, requiere un volumen de muestra pequeño y el tiempo de corrida es medianamente corto, lo que representa ventajas en el costo y tiempo del análisis.

La validación demostró que el método es lineal, preciso, exacto y selectivo en los rangos de concentración establecidos para cada analito ya que se cumplieron con los criterios de aceptación de cada parámetro. Se determinaron las estabildades de las soluciones y de la muestra en las diferentes condiciones de almacenamiento evaluadas, garantizando la integridad de la cuantificación de los analitos, tanto en solución como en la matriz biológica durante todo el proceso de análisis. El método fue tolerante al cambio de temperatura del horno de la columna de 30°C a 35°C, lo que indica mayor confiabilidad ante la posibilidad de pequeñas variaciones de temperatura durante el análisis.

Con lo anterior descrito, se determinó que el método para la extracción y cuantificación de ambos analitos es confiable y, por tanto, puede ser utilizado en un estudio de bioequivalencia en sujetos de investigación administrando 400mg de albendazol.

## **8. REFERENCIAS.**

1. Preciado A. Helminthiasis y atopias en pacientes pediátricos. [Tesis para obtener el grado de especialista en pediatría]. Ciudad de México: Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México; 2008. 45
2. Velázquez OJ, Kuri P. Epidemiología de la parasitosis intestinal en México. Sistema Nacional de vigilancia epidemiológica. SSA. [Internet]; 2003. [Consultado el 13 de noviembre de 2019]; (20) 20. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/16076/2003\\_sem20.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/16076/2003_sem20.pdf)
3. Coria DM. Evaluación del efecto del albendazol y del derivado bencimidazólico GNV-14 sobre el citoesqueleto de la larva muscular de *Trichinella spiralis*.

[Tesis para obtener el título de biólogo]. Ciudad de México: Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México; 2014; 72

4. Gutierrez-Godinez J, Torres-Jácome J, Herrera EV, Albarado A, Poce D, López-López JG. Seguimiento farmacoterapéutico de antiparasitarios para pacientes pediátricos de Santa María Acuexcomac-México. Seguimiento Farmacoterapéutico 2005; 3(3): 150-153.
5. .Boletín epidemiológico. Sistema nacional de vigilancia epidemiológica. SS. [Internet]. 2019 [consultado el 14 de noviembre de 2019]; 44 (36): 20-21. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/509528/sem44.pdf>
6. Lema Spinelli Sebastián. Acceso a los medicamentos: las patentes y los medicamentos genéricos: las consecuencias de considerar al medicamento como un bien de mercado y no social. Rev. Bioética y Derecho [Internet]. 2015 [citado el 16 de noviembre de 2019]; (34): 81-89. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1886-58872015000200008&lng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1886-58872015000200008&lng=es). <http://dx.doi.org/10.1344/rbd2015.34.12068>.
7. Tobar F, Sánchez D. El impacto de las políticas de medicamentos genéricos sobre el mercado de medicamentos en tres países del MERCOSUR. Montevideo: Fundación Carolina ceALCI; 2005. Disponible en: [https://www.fundacioncarolina.es/wp-content/uploads/2014/07/Avance\\_Investigacion\\_12.pdf](https://www.fundacioncarolina.es/wp-content/uploads/2014/07/Avance_Investigacion_12.pdf)
8. GlaxoSmithKline. Prescribing information Albenza [Internet] U.S. Food and Drug Administration [citado 06 de Abril de 2019]. Disponible en

[https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2009/020666s005s0061bl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/020666s005s0061bl.pdf)

9. Rathod DM, Patel KR, Mistri HN, Jangid AG, Shrivastav PS, Sanyal M. Liquid chromatography--tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of albendazole and albendazole sulfoxide in human plasma for bioequivalence studies. J Pharm Anal [Internet]. Ago 2016 [citado el 5 Abr de 2019];6(4):226–34. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177916300065>
10. Hardman JG, Limbird LE, PB, Gilman AG. Goodman y Gilman: La base farmacológica de la terapéutica. 11ª ed. Nueva York, NY: McGraw-Hill, 2011. 1449-50.
11. Pinto P.P., Tratamiento médico de la enfermedad hidatídica. Cuadernos de cirugía. [Internet] 2018 [consultado el 10 de noviembre de 2019];(18)1: 57-61. Disponible en: <http://revistas.uach.cl/pdf/cuadcir/v18n1/art10.pdf>
12. Samano SM. Influencia de una dieta con alto contenido en grasas en la biodisponibilidad del albendazol. [Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias]. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2004.
13. Link Jung Cook H, Aspectos biofarmaceuticos del albendazol. [Tesis Doctoral]. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México; 1998.
14. McEvoy, GK (ed.). Servicio de Formulario de American Hospital . Información sobre medicamentos AHFS . Sociedad Americana de Farmacéuticos del Sistema de Salud , Bethesda, MD (2006.); 46.

15. Fagiolino P, Vázquez M, Ibarra M. Biodisponibilidad y bioequivalencia de medicamentos. En: Beas-Zárate C, et. al. Tópicos de actualización en neurobiología. México: Universidad de Guadalajara; 2010. 339-54.
16. Palma-Aguirre JA. Medicamentos genéricos, biodisponibilidad y bioequivalencia. Gac Med Mex 1998;134: 491-94.
17. Huayanay-Falconí Leandro. Bioequivalencia en medicamentos. Rev Med Hered [Internet]. Oct 2012[citado el 02 Ago de 2019]; 23 (4): 221-222. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1018-130X2012000400001&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2012000400001&lng=es).
18. Cruz MB. Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de glimepiride en plasma de rata por HPLC. [Tesis para obtener el título de químico farmacéutico biólogo]. Ciudad de México: Facultad de química. Universidad Nacional Autónoma de México; 2015. 86p.
19. Lakshmana S, Suriyaprakash TNK. Extraction of drug from the biological matrix: a review. En: G.R. Naik (Editor), Applied Biological Engineering-Principles and Practice. Croatia; 2012. p. 479-506.
20. Alonso RC. Desarrollo y validación de métodos bioanalíticos para cuantificar casiopeína IIGLY en plasma y sangre de perro Beagle por HPLC-MS y su aplicación para un estudio farmacocinético. [Tesis Doctoral]. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2013.
21. Ibarra JL. Desarrollo de un método analítico por HPLC para la determinación de un nuevo análogo de anfotericina en plasma. [Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo]. Ciudad de México: Universidad nacional Autónoma de México; 2019.

22. Valcárcel M, Gómez A. Técnicas analíticas de separación. Barcelona, España: Reverté; 1988. p. 76–80.
23. Chang, MS, Ji, Q., Zhang, J. y El-Shourbagy, TA. Historical review of sample preparation for chromatographic bioanalysis: pros and cons. *Drug Development Research*: 2007;68 (3), 107-133. doi: 10.1002 / ddr.20173
24. Camel V. Solid phase extraction of trace elements. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc* [Internet]. Jul 2003 [consultado el 16 de Oct de 2019];58(7):1177–233. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S05848547030007274>
25. Skoog D, Holler F, Nieman T. Principios de Análisis Instrumental. 10ª ed. España: McGrawHill; 2007.
26. Abhijit T, Metamorphosis of supercritical fluid chromatography to SFC: An Overview, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [Internet]. 2016 [consultado el 22 de Nov 2020]; 81: 3-10. Disponible en: [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993616000029](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993616000029)
27. West C. Tendencias actuales en cromatografía de fluidos supercríticos. *Anal Bioanal Chem*. 2018; 410: 6441–6457. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1267-4>
28. López O. Propuesta de un método para el análisis de nimesulida por cromatografía de líquidos de alta resolución [ tesis que para obtener el título de Licenciado en Química Farmacéutico Biológica]. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2013.

29. Vargas A. Modelización y optimización de la separación de b-bloqueantes mediante cromatografía micelar. [tesis que para obtener el título de Licenciado en Química Farmacéutico Biológica]. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2019.
30. Harris D. Análisis Químico Cuantitativo. 3ª ed. España: Reverté; 2013.
31. Weston A, Brown P. HPLC and CE Principles and Practice. U.S.A.: Academic Press; 1997.
32. Mishra S, Majee C. A review on liquid chromatography-mass spectroscopy and it's applications. World J Pharm Res. 2018;7(11):1476–503.
33. Bonnin RR. L'espectrometria de masses com a principi de mesura: fonaments i aplicació en les ciències de laboratori clínic. Vitro Verit. 2013;14:161–83.
34. Hoffmann E. Mass Spectrometry. En: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 5ª ed. John Wiley & Sons; 2005. p. 1–20.
35. Plascencia G, Espectrometría de masas. Curso de métodos. [Internet]. Maestría en ciencias bioquímicas. Instituto de Biotecnología. 2003 [consultado el 9 de noviembre de 2019]. Disponible en: [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Spec\\_Masas.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Spec_Masas.pdf)
36. Nováková L, Svoboda P, Pavlík J. Ultra-highperformance liquid chromatography. Liq Chromatogr [Internet]. Enero 2017 [consultado el 6 de abril de 2019]; 719-69. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128053935000294?via%3Dihub>

37. Chen X, Zhao L, Xu H, Zhong D. Simultaneous determination of albendazole and its major active metabolite in human plasma using a sensitive and specific liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method. *J Pharm Biomed Anal.* 2004;35(4):829–36.
38. Saraner N, Özkan GY, Güney B, Alkan E, Burul-Bozkurt N, Sağlam O, et al. Determination of albendazole sulfoxide in human plasma by using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2016;1022: 1–5.
39. Wojnicz A et. al. A simple assay for the simultaneous determination of human plasma albendazole and albendazole sulfoxide levels by high performance liquid chromatography in tandem mass spectrometry with solid-phase extraction. *Clin Chim Acta* [Internet]. Nov 2013 [consultado el 16 Abr de 2019];426:58–63. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S000989811300329X>
40. Lanchote VL, et. al. Simultaneous determination of albendazole sulfoxide enantiomers and albendazole sulfone in plasma. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1998;709(2):273–9.
41. Chhonker YS, Edi C, Murry DJ. LC–MS/MS method for simultaneous determination of diethylcarbamazine, albendazole and albendazole metabolites in human plasma: Application to a clinical pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. Mar 2018 [consultado el 30 Abr de 2019]; 151:84–90. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708517319441>
42. McMillan J. Principles of Analytical Validation. *Proteomic Profiling Anal Chem* [Internet]. 2016 [Consultado el 12 de Abr de 2019];239–51. Disponible

en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444636881000136?via%3Dihub>

43. Guidance for Industry. Method validation U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration; 2018.
44. Rodriguez A, Sánchez J, Tepoz S. Acuerdo que determina el tipo de prueba para demostrar intercambiabilidad de medicamentos genéricos y se definen los criterios que deberán aplicárseles. Secretaría de Gobernación. México; 2017.
45. Comisión de validación de métodos. Guía de validación de métodos analíticos. Colegio Nacional de químicos Biológicos A.C. México.
46. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013 [en línea], Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad. Diario Oficial de la Federación. 20 sep 2013. [Consultado el 20 may 2019]. Disponible en: [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013)
47. Taylor, PJ. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*;2005;38(4), 328–334.
48. Cervantes JA. Desarrollo y Validación de un Método Analítico para la Cuantificación de Isotretinoína en Plasma humano Mediante UHPLC Acoplado

a MS/MS. [Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo].  
Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2017.

49. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. Diario Oficial de la Federación. 1998 [consultado el 20 may 2019].  
Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/177ssa18.html>