



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO EMPLEANDO LA
TÉCNICA DE UPLC-ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA
DETERMINACIÓN DE CLEMBUTEROL Y AMBROXOL EN MUESTRAS DE ORINA
HUMANA.**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO**

PRESENTA

ÁNGEL LÓPEZ SÁNCHEZ

CIUDAD DE MÉXICO

AÑO 2021



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.



JURADO ASIGNADO

Presidente: FRANCISCO ROJO CALLEJAS

Vocal: MARGARITA ROMERO ÁVILA

Secretario: BENJAMÍN VELASCO BEJARANO

1er Suplente: REINA GARCÍA SÁNCHEZ

2do Suplente: JOSÉ OSCAR HUMBERTO PÉREZ DÍAZ

LUGAR DONDE SE DESARROLLA LA TESIS:

Laboratorio L-122 de la Sección de Química Orgánica, Facultad de Estudios Superiores
Cuautitlán y Laboratorio Nacional de Prevención y Control del Dopaje-CONADE

ASESOR:

Dr. BENJAMÍN VELASCO BEJARANO.

SUSTENTANTE:

ANGEL LOPEZ SÁNCHEZ



ÍNDICE

1. RESUMEN.....	5
2. ANTECEDENTES.	6
3. INTRODUCCIÓN	8
3.1. GENERALIDADES DE LOS AGONISTAS –ADRENERGICOS.	8
3.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS B ₂ -AGONISTAS.	9
3.3. GENERALIDADES DEL CLEMBUTEROL.....	10
3.4. PROPIEDADES FISICO- QUÍMICAS DEL CLEMBUTEROL.	11
3.5. USOS Y EFECTOS DEL CLEMBUTEROL.	11
3.6. EI CLEMBUTEROL EN EL DOPAJE.	13
4. CROMATOGRAFÍA.....	14
4.1. TIPOS DE CROMATOGRAFÍA.....	14
4.2. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (HPLC).....	15
4.3. CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ULTRA EFICIENCIA (UPLC).	16
4.4. COLUMNAS	16
4.5. FASES ESTACIONARIAS.	17
4.6. DISOLVENTES EMPLEADOS EN HPLC.....	18
5. ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	19
6. FUENTE DE IONIZACIÓN.....	20
6.1. IONIZACIÓN ELECTRÓNICA.....	21
6.2. IONIZACIÓN QUÍMICA.	22
6.3. IONIZACIÓN POR ELECTROSPRAY (ESI).....	23
6.4. IONIZACIÓN QUÍMICA A PRESIÓN ATMOSFERICA.....	24
6.5. DESORCIÓN/IONIZACIÓN POR LÁSER (MALDI).....	25
7. DETECTORES.....	26
7.1. TIEMPO DE VUELO	26
7.2. TRIPLE CUADRUPOLO	27
7.3. TRAMPA DE IONES.	28
8. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	29
10. OBJETIVOS.....	32
11. HIPÓTESIS.....	33
12. MATERIALES E INSTRUMENTOS.....	34
13. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	35



13.1. DESARROLLO DEL MÉTODO POR LC/MS (CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS	37
13.2. CONDICIONES DE ANÁLISIS.....	37
13.3. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.	38
13.4. OPTIMIZACION DEL METODO DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	39
14. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.	40
14.1. LINEALIDAD.	40
14.2. SELECTIVIDAD.....	41
14.3. ARRASTRE.	41
14.4. LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.	42
14.5. PORCENTAJE DE RECOBRO.	43
14.6. REPETIBILIDAD.	44
14.7. PRECISIÓN INTERMEDIA (REPRODUCIBILIDAD).....	47
14.8. INCERTIDUMBRE.....	47
15. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	48
15.1. SELECTIVIDAD.....	48
15.2. ARRASTRE.	49
15.3. LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN..	50
15.4. PORCENTAJE DE RECOBRO.....	51
15.5. PRECISIÓN.	51
15.6. EXACTITUD.....	52
15.7. INCERTIDUMBRE.....	53
16. CONCLUSIÓN.	55
17. REFERENCIAS.....	56
18. ANEXO.....	62



❖ RESUMEN

La Agencia Mundial Antidopaje, es la encargada de controlar y mantener el juego limpio en competencias deportivas, para lo cual cuenta con el apoyo de laboratorios acreditados, que se encargan del análisis de muestras biológicas de control antidopaje con la finalidad de detectar sustancias dopantes, sus metabolitos o marcadores biológicos de su uso. En este sentido uno de los problemas a que se enfrenta al detectar sustancias como el clenbuterol, es identificar su posible vía de acceso al organismo del atleta. Se sabe que esta sustancia es empleada por los atletas con la finalidad de incrementar su rendimiento deportivo. Por otro lado, el clenbuterol es empleado de manera ilícita para alimentar ganado destinado a uso humano que en algunos casos es consumido por la población y de manera no intencional por atletas y que al final pueden presentar un resultado analítico adverso por esta sustancia, con el consiguiente trastorno en su carrera deportiva. A este respecto, se hace necesario contar con información analítica que permita a las autoridades deportivas tomar una mejor decisión al momento de aplicar una sanción deportiva por la presencia de esta sustancia en una muestra de control antidopaje. Por lo que, en este trabajo de tesis se presenta el desarrollo y validación de una metodología analítica para la identificación simultánea de clenbuterol y ambroxol, los cuales se encuentran presentes en formas farmacéuticas de uso terapéutico. La aplicación de esta metodología en el caso de un resultado analítico adverso por clenbuterol, podría aportar una evidencia si se detectan estas dos sustancias de un posible consumo de una forma farmacéutica con estas sustancias como ocurrió con una atleta en los Juegos Deportivos Centroamericanos y del Caribe Mayaguez 2010. La metodología aquí desarrollada involucra los siguientes procesos: hidrólisis con enzima, centrifugación, evaporación, reconstitución de la muestra y el análisis por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC/MS/MS). Los parámetros analíticos que se evaluaron son: Selectividad/especificidad, Límite de detección, Linealidad, Recobro, Precisión y Exactitud.



❖ ANTECEDENTES

La competencia deportiva se inicia por muchas motivaciones diferentes como la excelencia, la perfección, el disfrutar de las competencias, los beneficios financieros y sociales que son asociados a las victorias y el éxito logrado en eventos deportivos, estas son algunas de las razones por lo que atletas modernos han hecho intentos esporádicos de aumentar artificialmente el rendimiento deportivo.

Los primeros registros que se tienen acerca del consumo de sustancias data del siglo II y III a.c, en donde se utilizaba ciertos hongos como ayuda psicogénica, en siglo I hay registros que los atletas consumían un pan preparado con jugo de la planta adormidera mejor conocida como amapola.

Además de los competidores humanos, los caballos también fueron objeto de tratamiento para que aumentaran su resistencia física, los primeros registros que se tiene son de la antigua Roma donde a los caballos se le administraba una mezcla de agua y miel llamada “hidromel”, está mezcla se la administraban a los caballos que competían en las carreras de carruajes.

Se tiene evidencia de uso de drogas dentro del deporte practicado por el humano a partir del año 1865, cuando los nadadores del canal de Ámsterdam competían bajo la influencia de agentes dopantes, sin embargo, la identificación de los fármacos administrados nunca fue revelados. En este sentido el maratonista Thomas Hicks, gana la medalla de oro en los juegos olímpicos en San Luis, Misuri, Estados Unidos en el año 1904, este deportista usaba drogas como la estricnina.

Los agentes dopantes han sido utilizados en varias en diversos deportes como ciclismo, maratones, carreras, boxeo, natación, gimnasia, boxeo, futbol, etc. Por esta razón la Agencia Mundial de Antidopaje (WADA-AMA) al inicio de cada año emite una lista de sustancias que son consideradas como prohibidas.

En el Código Mundial Antidopaje, define “dopaje” como la presencia de una sustancia prohibida, metabolitos o marcadores biológicos encontrados en una muestra biológica obtenida de un atleta, siendo este mismo el responsable de la presencia de cualquier sustancia en su organismo.

Existen un grupo de laboratorios analíticos los cuales se encuentran acreditados por WADA-AMA para realizar el análisis de muestras biológicas recolectadas de los controles antidopaje con la finalidad de detectar y en algunos casos cuantificar las sustancias que están descritas en la lista de sustancias prohibidas.



◆ **LISTA DE SUSTANCIAS PROHIBIDAS**

Desde el 2004 la agencia mundial anti-dopaje, la WADA-AMA es la responsable de la publicación anual de la lista de sustancias prohibidas y métodos prohibidos, en la que se describe una relación de categorías de sustancias y métodos que se encuentran prohibidos o controlados por la WADA-AMA, estos son prohibidos en competición o fuera de ella en algunos casos en deportes específicos. A continuación, se presenta la clasificación de sustancias prohibidas para el año 2020, dentro y fuera de competencia.

● **SUSTANCIAS PROHIBIDAS**

Sustancias y métodos prohibido en todo momento (dentro y fuera de competición)	
S0	Sustancias no Aprobadas
S1	Agentes Anabólicos
S2	Hormonas peptídicas, factores de crecimiento, sustancias relacionadas y miméticos
S3	Beta-2 agonista
S4	Hormonas y moduladores metabólicos
S5	Diuréticos y agentes enmascararte
Métodos prohibidos	
M1	Manipulación de la sangre y componentes de la sangre
M2	Manipulación física y química
M3	Dopaje genético
Sustancias y métodos prohibidos en competición	
S6	Estimulantes
S7	Narcóticos
S8	Cannabinoïdes
S9	Glucocorticoides
Sustancias prohibidas en deportes particulares	
P1	Beta Bloqueadores



❖ INTRODUCCIÓN

• GENERALIDADES DE LOS AGONISTAS-ADRENERGICOS

La familia de los β_2 -agonistas está estrechamente relacionada con las catecolaminas endógenas, con una estructura fenil-etanol-amina la cual presenta diferentes sustituyentes en el átomo nitrógeno de la amina (en la mayoría de los casos presentan un grupo tert-butil o isopropilo), así como diferentes sustituyentes en diferentes posiciones del anillo aromático (como -OH, -Cl, -NH₂, -CN, y CF₃). Hay dos características que influyen principalmente en el comportamiento químico de los β_2 -agonistas y tienen, por lo tanto, importantes consecuencias analíticas: **a)** la presencia en estos fármacos del nitrógeno de la amina le aporta un carácter básico y **b)** el grupo β -hidroxilo, relativamente responsable de su alta polaridad, que aumenta aún más cuando otros grupos hidroxilo aromáticos o alifáticos están presentes en la molécula [1]. La presencia de uno o más grupos fenólicos modifica la distribución de carga en la molécula, esto hace que la molécula tenga serias complicaciones para realizar la extracción a un pH altamente básico (≥ 12), en el caso del clenbuterol y otros β_2 -agonistas este pH es adecuado para su extracción, en el caso del salbutamol o la terbutalina no se puede extraer satisfactoriamente a este pH [1].

Con respecto a sus características farmacocinética, los β_2 -agonistas se pueden dividir en dos grupos principales: **I)** Baja polaridad [2]. Los β_2 -agonistas (por ejemplo, clenbuterol) son terapéuticamente activos en dosis muy bajas (20-40 $\mu\text{g/mL}$) y se distribuyen a niveles plasmáticos muy por debajo de los ng/mL después de una dosis terapéutica, la semivida es relativamente larga (aproximadamente 30 h en el caso del clenbuterol), se excretan principalmente en cantidades significativamente en forma no modificada y en una baja proporción como metabolitos de fase I, los niveles urinarios después de dosis terapéuticas nunca exceden los niveles de 10-20 ng/mL [3].

II) Altamente polares. Los β_2 -agonistas (por ejemplo, salbutamol y ritodrina) se caracterizan por dosis orales terapéuticas notablemente más altas (2-10 mg) con niveles correspondientemente plasmáticos más altos (1 a 40 ng/mL). La vida media en plasma es significativamente más corta (1-7 h). La excreción urinaria representa del 35 al 90% de la dosis administrada y los metabolitos de fase II (glucurónido y sulfato) son frecuentes [4,5].

En específico el clenbuterol pertenece a la familia de los β_2 -agonistas adrenérgicos (β_2 -agonistas) se deriva de la estructura química de la adrenalina y son usados tradicionalmente para el tratamiento del broncoespasmo asociado con el asma [6]. Basado en sus propiedades broncodilatadoras, estos son generalmente clasificados como de corta acción β_2 -agonistas (clenbuterol, fenoterol, salbutamol, también llamado albuterol) [7], con una duración de 3 – 6 horas de acción, β_2 -agonistas de acción larga (formoterol, salmeterol)

con una duración de 12 horas de acción y β_2 -agonistas de ultra acción larga (indacaterol) con una duración de 24 horas de acción [8].

• **MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS B2-AGONISTAS**

Los receptores de los β -adrenérgico agonistas son moléculas orgánicas que se unen a los receptores β -adrenérgicos de manera que el complejo agonista-receptor activa la proteína G_s . La subunidad de la proteína G_s activa la adenililciclase, la enzima que produce el mono fosfato de adenosina cíclico (cAMP), una de las principales moléculas de señalización intracelular [9,10]. El amplio interés en β -AR en la comunidad biomédica llevó a la síntesis de miles de moléculas orgánicas que se unen a β -AR, algunos de estos ligandos son agonistas, mientras que algunos antagonistas se unen al receptor, pero no activan las proteínas G_s , por lo tanto, bloquean la función del receptor [11,12]. Gran parte del interés en los agonistas y antagonistas β -AR, se ha centrado en la producción de compuestos que tienen una especificidad relativa para estimular el musculo branquial, causando relajación y dilatación de las vías respiratorias, tienen una especificidad relativa para cambiar la función cardiovascular al moderar la frecuencia cardíaca, la contractilidad o la presión arterial [13] ver Figura 1.

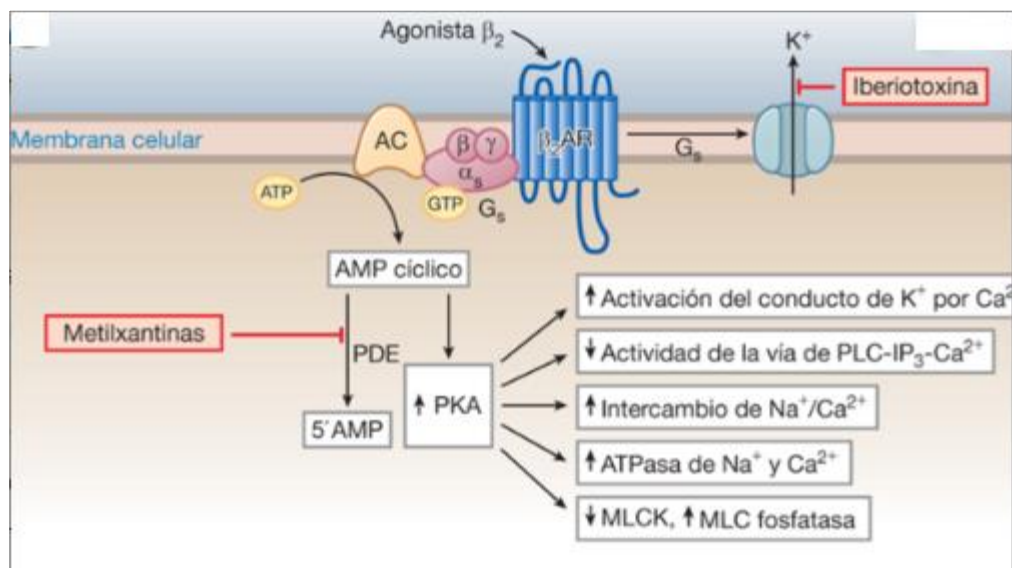


Figura 1. Esquema del mecanismo de acción los β_2 -agonistas
Fuente: <https://quizlet.com/es/411675584/bloque-ii-flash-cards/>



- **GENERALIDADES DEL CLEMBUTEROL**

El agente terapéutico clenbuterol (RS)-1(4-amino-3,5-dicloro-fenil)-2(tert-butilamino) etanol, Figura 1, es una droga sintética pertenece a la clase de los β_2 -agonistas adrenérgicos debido a su actividad simpatomimética, el clenbuterol a menudo se utiliza en medicamentos [14], para el uso humano y veterinario como broncodilatador, cardiotónico y ticolítico [15]. Los β_2 -agonistas se unen a los receptores en las membranas celulares para producir efectos fisiológicos como un aumento de la frecuencia cardíaca y relajación muscular en los bronquios, el útero o la pared intestinal [16]. Estudios preclínicos y clínicos han demostrado que el clenbuterol induce hipertrofia en el músculo esquelético [17] y cardíaco asociados a cambios marcados en la expresión genética [18], acoplamiento de excitación contracción y metabolismo celular [19], en algunos de los casos reportados se informa que hay mejoras en la función ventricular con el clenbuterol en pacientes que presentan insuficiencia cardíaca.

El clenbuterol es un broncodilatador selectivo utilizado para tratar los broncoespasmos y aliviar los síntomas de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, se han realizado investigaciones a fondo donde el clenbuterol puede emplearse como un medio potencial en la terapia para diferentes afecciones como, por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular e insuficiencia cardíaca [20]. Además, el clenbuterol tiene efectos fisiológicos parecidos a los esteroides anabólicos, promueve el crecimiento del tejido muscular, por lo que se ha utilizado en la industria ganadera para aumentar la producción de carne magra [21], aunque su uso está prohibido en México desde el 2006 [22].

• PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL CLEMBUTEROL

El clenbuterol (RS)-1(4-amino-3,5-dicloro-fenil)-2(tert-butilamino) etanol; fórmula molecular es: $C_{12}H_{18}N_2Cl_2O$; peso molecular de 277 g/mol, es un sólido de color blanco, es muy soluble en agua, metanol y etanol, es ligeramente soluble en cloroformo, presenta un intervalo de fusión entre $174^{\circ}C$ a $175.5^{\circ}C$.

El clenbuterol químicamente es una arilamina, tiene una acción prolongada, se almacena en el hígado y riñón. La biotransformación del clenbuterol incluye un metabolismo de fase I y fase II produciendo hasta 8 metabolitos que se pueden detectar en orina de diferentes animales. Entre ellos están ácido 4-amino-3,5-dicloromandelico, el ácido 3-amino-3,5-diclorobenzoico y el ácido 4-amino-3,5-diclorohipúrico. Además, en la orina y el hígado del ganado, un metabolito de clenbuterol importante es el ácido 4-amino-3,5-diclorobenzoico Figura 2 [23].

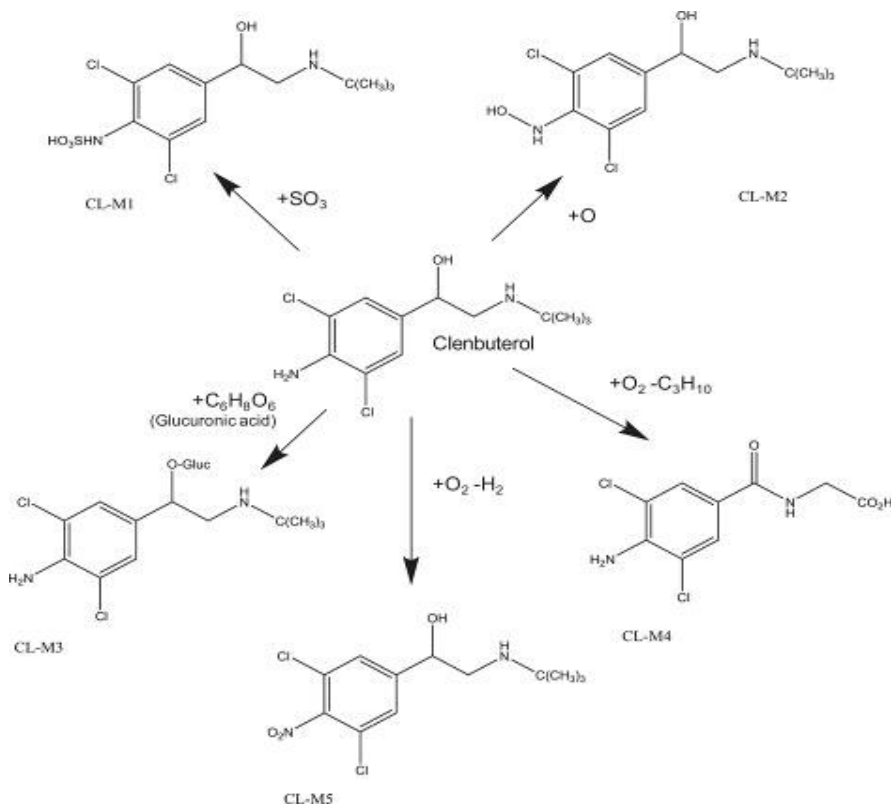


Figura 2. Estructura química del Clenbuterol (RS)-1(4-amino-3,5-dicloro-fenil)-2(tert-butilamino) etanol y metabolitos.



- **USOS Y EFECTOS DEL CLEMBUTEROL**

El clenbuterol se ha utilizado como un suplemento alimenticio para la producción de ganado en varios países de América, Asia, etc. En varios países europeos, este fármaco β_2 -selectivo más bien está aprobado en animales como agente broncoespasmolítico en caballos, terneros y ticolítico en vacas [24]. Internacionalmente el clenbuterol está prohibido como promotor en la producción de ganado, sin embargo, a consecuencia de las ganancias adquirida por los productores ganaderos se sigue utilizando ilegalmente. A principios de la década de 1980, los trabajos de American Cyanamid Co. publicaron datos sobre la modulación del crecimiento de animales alimentados con clenbuterol, un agonista β -AR. En el ganado vacuno, pollos, cerdos y ovejas, al ser administrado el clenbuterol aumentó la masa muscular y disminuyó el tejido graso. Como resultado del uso ilegal del clenbuterol en el ganado, se han reportado varios casos de intoxicación humana tanto en México como en otros países [25].

Varios estudios han reportado que una dosis baja de clenbuterol es suficiente para producir efectos farmacológicos en el corazón como una respuesta inotrópica y cronotrópica, en el pulmón como broncodilatación y en el sistema muscular como temblores musculares. Así misma el consumo de carne contaminada con clenbuterol puede provocar un aumento de la frecuencia cardíaca, la presión arterial, la ansiedad, así como de palpitations además de temblores del músculo esquelético. [26].

El clenbuterol también es usado en la terapia en donde es preinscrito para problemas de salud en personas que padecen desorden respiratorio como asma este medicamento se emplea para facilitarles la respiración. Este fármaco es distribuido en forma farmacéutica sólida como tabletas, así como también en jarabes [27].



• **EL CLEMBUTEROL EN EL DOPAJE**

El clenbuterol es una sustancia β 2-adrenérgica, sin embargo, en la lista de sustancias prohibidas emitida por la WADA-AMA lo clasifica como un agente anabólico. El clenbuterol se emplea para tratar enfermedades que afectan el sistema respiratorio como el caso del asma, la hiperactividad bronquial [28]. En el caso del ambroxol tiene una importancia significativa como potente expectorante y se utiliza como agente mucolítico [29]. La combinación de estos fármacos se prescribe en el tratamiento de enfermedades agudas y crónicas del tracto respiratorio, la estenosis espasmolítica y el asma [30].

La WADA-AMA (Agencia Mundial Antidopaje) clasifica al clenbuterol en el grupo S1.2 (otros agentes anabolizantes), de la lista de sustancias prohibidas WADA-AMA (Agencia Mundial Antidopaje) [31]. La WADA-AMA establece que el nivel de rendimiento mínimo requerido (MRPL) para la detección de clenbuterol es 2 ng/mL en orina. Debido a que el clenbuterol es un compuesto exógeno, no debe permanecer en el organismo por lo que el compuesto pudo haber entrado al organismo por administración intencionada o por el consumo de carne contaminada, o por algún medicamento Figura 3.

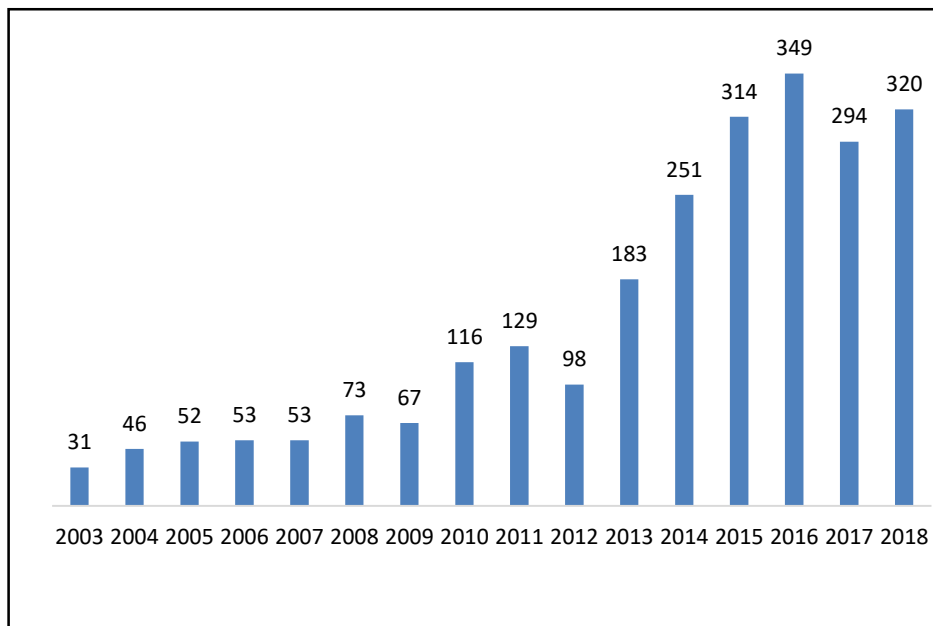


Figura 3. Gráfico de los casos reportados de clenbuterol por WADA-AMA del 2003 al 2018



❖ CROMATOGRAFÍA

El término de cromatografía proviene del término griego (chroma que significa color y graphein que significa escribir) y sus principios fueron descubiertos por primera vez por Mikhail Tswett. La cromatografía es uno de los métodos fisicoquímicos ampliamente utilizados de separación de sustancias inorgánicas y orgánicas relacionadas con su composición y propiedades, en general, la cromatografía es un método eficaz de separación de elementos por su distribución no uniforme entre una fase móvil y una fase estacionaria [32], para sustancias individuales o muestras complejas.

Los factores para llevar a cabo la separación dependen de las características moleculares relacionadas con la adsorción (líquido-sólido), la partición (líquido-sólido), también se basa en las afinidades diferenciales de los solutos, entre dos fases miscibles, una de ellas es la fase estacionaria, es una fase fija de gran área superficial esta se encuentra fija en la columna, mientras que la otra fase móvil es un líquido, gas o un fluido supercrítico, la fase móvil se mueve a través de la fase estacionaria [33, 34]. Algunos componentes de la mezcla permanecen más tiempo ya que son fuertemente retenidos en la fase estacionaria y se mueven lentamente, los componentes que no se retienen fuertemente en la fase estacionaria se mueven rápidamente en la fase móvil y dejan el sistema más rápido, provocando la separación de los componentes de la mezcla.

La fase estacionaria se compone de sólido poroso o finamente dividido, en los mejores casos también está compuesta por un líquido que ha sido colocado en una capa delgada de un material de soporte inerte. La fase móvil puede ser un líquido, gas o un fluido supercrítico. Si la fase móvil es líquida, se denomina cromatografía líquida (LC) y si es gas, se denomina cromatografía de gases (GC). La cromatografía de gases se aplica para gases y mezclas de líquidos volátiles y material sólido. La cromatografía líquida se utiliza especialmente para muestras inestables térmicas y no volátiles [35].

• TIPOS DE CROMATOGRAFÍA

La cromatografía de adsorción usa una fase estacionaria sólida (alúmina, sílice y gel) y una fase móvil líquida o gaseosa. El soluto se adsorbe en la superficie de las partículas sólidas. Los componentes adsorbidos se eluyen haciendo pasar los adecuados disolventes o eluyentes (fase móvil; líquido) a través de la columna [36].

La cromatografía de reparto, Se utiliza una fase estacionaria líquida, en forma de una capa fina de alto punto de ebullición sobre la superficie de un soporte sólido, en cromatografía de gases se emplea, es la cara interna de la cromatografía de sílice. El soluto se encuentra en equilibrio con el líquido estacionario y la fase móvil, en cromatografía de gases la fase móvil es el gas que fluye [37].



La cromatografía en capa fina. Es un tipo especial de cromatografía de adsorción en la que una placa de vidrio recubierta con una capa delgada del adsorbente (silica gel o alúmina) se usa como fase estacionaria [38].

La cromatografía de intercambio iónico. Este tipo de cromatografía existen aniones ($-\text{SO}_3$) o cationes ($-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$, covalentemente unidos a la fase estacionaria sólida, que es una resina. Las resinas de intercambio iónico consisten de materiales orgánicos altamente polimerizados, reticulados, contienen un gran número de grupos ácidos o básicos. La separación se realiza con una resina de intercambio iónico con carga opuesta, que la forma iónica del soluto [39].

Cromatografía de exclusión molecular. Esta técnica que es llamada también cromatografía de filtración por gel o de permeación por gel, separa moléculas por su tamaño. La cromatografía de filtración por gel usa poros de partículas de polímeros hidrófilicos o sílice para la separación en disolventes acuosos. La cromatografía de permeación por gel usa poros de partículas de polímeros hidrofóbicos para la separación en disolventes orgánicos [40].

Cromatografía de afinidad. Esta cromatografía es más selectiva, utiliza interacciones específicas entre las moléculas que se encuentran en el soluto y una segunda molécula que se encuentra unida covalentemente (inmovilizada) en la fase estacionaria [41].

- **CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)**

La Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPCL) es uno de los varios métodos cromatográficos para la separación y análisis de mezclas químicas [42]. El equipo de HPLC consta de un sistema de suministro de disolvente, una válvula de inyección de muestra, una columna de alta presión, un detector y un sistema de cómputo para controlar el equipo y visualizar los resultados, en algunos casos muchos de los equipos cuentan con horno para controlar la temperatura de la columna. Además, esta automatizado todo el proceso, la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) se caracteriza por el uso de bombas de alta presión para una separación más rápida, columnas reutilizables. Más efectivas para una mejor separación y un mejor control del proceso general para generar resultados más precisos y reproducibles. Utiliza una presión elevada que forzar a pasar el disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo como objetivo la separación de los componentes que se encuentran en la mezcla con una gran resolución. Para la cromatografía de alta resolución no es factible el uso de columnas tubulares abiertas, porque el diámetro de la vena líquida del disolvente es demasiado grande para que atravesase una molécula del soluto en tan poco tiempo. La cromatografía de líquidos en este caso se realiza en columnas empaquetadas [43].



- **CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ULTRA EFICIENCIA (UPLC)**

Los usos de presiones por arriba de los 6000 psi no se pueden lograr con el sistema convencional de HPLC (con un máximo de 6000 psi o 400 bar) por lo que se desarrolló una cromatografía líquida ultra eficiencia o UPLC. Los equipos de UPLC utilizan presiones > 6000 psi, se puede usar para una mejor resolución (valores más altos de N (platos teóricos)) o un tiempo de análisis reducido [44].

En los equipos de UPLC la viscosidad de la fase móvil aumenta con la presión, por lo que la presión ya no aumenta proporcionalmente con el caudal. Los valores de K (factor de capacidad) y α (factor de separación) se vuelven dependientes de la presión, por lo tanto, dependen de las condiciones de la columna: esto no se nota a presiones más bajas. Los cambios en la temperatura dentro de la columna pueden tener consecuencias adversas sobre la forma del pico y el número de platos teóricos N, así como también cambios en los valores de K (factor de capacidad) y α (factor de separación) [45].

La operación a alta presión tiene ventajas potenciales muy definidas, se requiere equipos y columnas especiales para el uso de altas presiones. Los factores que se ven afectados por el uso de UPLC son: los valores de K, los coeficientes de difusión D_m , la viscosidad de la fase móvil y otras propiedades que afectan la separación, porque estas se vuelven dependientes de la presión.

- **COLUMNAS**

Las columnas el “corazón” del sistema de HPLC han cambiado mucho desde el comienzo de HPLC a mediados de 1960. Las columnas se han mejorado para una mayor velocidad y eficiencia de separación, así como una mayor estabilidad y reproducibilidad. En HPLC se utilizan columnas de acero o de plástico de una longitud de 5-30cm, con un diámetro interno de 1-5 mm. El tamaño de partícula que compone la columna es de 3-10 μm , el tamaño de partícula es especialmente importante, esto determina en gran medida la eficiencia de la columna empacada. El tamaño de partícula representa un buen compromiso en términos de eficiencia, caída de presión, conveniencia, requisitos del equipo y vida útil de la columna [46].

La razón porque se utiliza partículas pequeñas es para obtener una mejor resolución, permite que el flujo sea más uniforme a través de la columna. La desventaja que propicia al utilizar pequeñas partículas es la resistencia que ofrece el flujo del disolvente.

Las columnas son caras y se degradan con facilidad por el polvo, o las partículas de las muestras o del disolvente. Por eso, se protege la entrada de la columna con una columna corta llamada pre-columna que contiene la misma fase estacionaria que la columna analítica. La separación por HPLC se lleva habitualmente a temperatura ambiente, las separaciones más complejas a menudo pueden optimizarse aumentando la temperatura. Se ha sugerido el uso de temperaturas de separación más altas como un medio para acortar



el tiempo de retención y mejorar la resolución porque aumenta la velocidad de difusión de los solutos, un aumento de N (platos teóricos), disminuye la viscosidad del disolvente reduciendo la presión requerida y permitiendo un mayor caudal. Sin embargo, aumentar la temperatura se puede degradar la fase estacionaria y reducir la vida útil de la columna [47].

• FASES ESTACIONARIAS

El soporte más común en HPLC son las partículas microporosas esféricas de sílice, que son muy permeables al disolvente, tienen un área superficial de varios centenares de metros cuadrados por gramo. La sílice es el soporte más utilizado para la producción de columnas para HPLC. La alta resistencia mecánica es una gran ventaja que presentan las partículas de sílice, ya que permite la formación de lechos compactos que son estables durante largos períodos y una alta presión de funcionamiento. Las columnas de sílice también proporcionan valores más altos de N en comparados con otros soportes. Las partículas que esféricas que presentan pueden ser sintetizadas con una amplia selección de tamaño de poro (por ejemplo 10, 30, 100 nm), otra ventaja que presenta la sílice es que esta puede ser enlazada con diferentes ligandos (por ejemplo, C₈, C₁₈, fenilo, y ciano) estos ligandos podemos utilizarlos en diferentes muestras y para llevar a cabo una separación selectiva. Las columnas hechas a base sílice son compatibles con solventes orgánicos y agua [48].

La sílice se disuelve en agua a pH superiores a 8, por lo que no se puede utilizar por encima de ese pH, algunas calidades de sílice pueden ser estables hasta pH de 9 o 10. En el caso que se quiera realizar cromatografía de compuestos básicos a pH entre 8 y 12 podemos utilizar soportes poliméricos como el poliestireno [49].

Las fases más comunes que podemos utilizar para cromatografía son:

Fases Polares		Fases no Polares	
R=(CH ₂) ₃ NH ₂	Amino	R=(CH ₂) ₁₇ CH ₃	Octadecil
R=(CH ₂) ₃ C≡N	Ciano	R=(CH ₂) ₇ CH ₃	Octil
R=(CH ₂) ₂ OCH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	Diol	R=(CH ₂) ₃ C ₆ H ₅	Fenil



• DISOLVENTES EMPLEADOS EN HPLC

En cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) se utilizan ciertos disolventes que contengan las siguientes características: que disuelvan la muestra, no puedan disolver o degradar la fase estacionaria de la columna, tener la polaridad adecuada para permitir la retención de la muestra en la columna. Los disolventes deben cumplir con ciertas características como la pureza debe ser grado HPLC ya que con esto se minimiza que se degrade la fase estacionaria de la columna, así como el ruido de fondo de las señales del detector debido a las impurezas.

La serie elutropica es la ordenación de los disolventes según su capacidad relativa para desplazar solutos de un determinado adsorbente. La fuerza eluyente \mathcal{E}^0 es una medida de la energía de adsorción del disolvente, a continuación, se mencionan algunos de los disolventes empleados para la cromatografía de líquidos HPLC.

- Hexano.
- Metanol.
- Tolueno.
- Cloroformo.
- Acetonitrilo.
- 2- Propanol.
- Acetato de etilo.
- Diclorometano.
- Heptano.
- Pentano.

La cromatografía de adsorción es un ejemplo de cromatografía de fase normal, se caracteriza por usar una fase estacionaria polar y un eluyente menos polar. En este caso el disolvente más polar tiene una fuerza eluyente mayor. La cromatografía de fase inversa, es la más empleada, se caracteriza porque se emplea una fase estacionaria no polar o en su caso débilmente polar y el disolvente es más polar. El disolvente menos polar tiene mayor fuerza eluyente [50].



❖ ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas, es una técnica de análisis cualitativo, cuantitativo además permite la separación de las moléculas basada en su relación masa/carga (m/z), en diferentes matrices (líquidas, sólidas), después de ionización. La espectrometría de masas tiene una amplia aplicación para la elucidación de estructuras orgánicas e inorgánicas, esta técnica se puede encontrar por sí sola o en combinación con otras técnicas.

Una de las diferencias esenciales que presenta la espectrometría de masas con relación a las espectroscopias clásicas, es que los procesos que se originan por las espectroscopias clásicas son puramente físicos no son destructivos de tal forma que la muestra utilizada para la obtención del espectro no se modifica químicamente y esta misma se vuelve a recuperar. Por el contrario, en la espectrometría de masas cuando se obtiene un espectro de masas o la sustancia se destruye y no se vuelve a recuperar, además, los procesos que se llevan a cabo son químicos.

Un equipo de espectrometría de masas está formado por cinco módulos fundamentales: 1) sistema de introducción de la muestra, 2) fuente de ionización, 3) analizador de masas, 4) detector y 5) procesador de datos. Como sistema de introducción de la muestra existen dos métodos que emplean que son cromatografía de líquidos (LC) y de gases (GC) [51].

La función de la fuente de ionización en el equipo de espectrometría de masas es aplicar energía para que la molécula se fragmente y genere moléculas cargadas ya sea positivamente o negativamente, necesarias para ser monitoreadas eléctricamente cargadas (iones).

Existen técnicas de ionización en las que la energía impartida hace que solo la molécula adquiera carga (ionización suave), y hay otras técnicas de ionización en las que la energía impartida es mayor, por lo que la molécula tiende a fragmentarse y formar fragmentos cargados. Las moléculas que solo adquieren carga sin que estas se hayan fragmentado se conocen como iones moleculares, las moléculas que además de ionizarse se fragmentaron se conocen como productos o fragmentos iónicos [52].

Los iones provenientes de la fuente de ionización pasan al analizador de masas, su función es separarlos y ordenarlos en base a su m/z . El intervalo de m/z depende del tipo de analizador que se utilice. El detector registra y amplifica la señal proveniente del analizador de masas, posteriormente se registra y amplifica la señal, se envía la información a un procesador de datos en donde la información se registra en forma de espectro de masas. El espectro de masas es solamente una representación gráfica de los iones separados por su valor de m/z y ajustados de acuerdo al porcentaje de las especies más abundantes en la muestra. Los detectores más empleados son el electromultiplicador y el fotomultiplicador.

❖ FUENTE DE IONIZACIÓN

La función principal de la fuente de ionización ver Figura 4, es aplicar energía ya sea térmica o eléctrica para generar moléculas cargadas positivamente o negativamente (iones) ya que es necesario que se encuentren así para registrar o medir las moléculas por espectrometría de masas.

En muchos de los casos se pueden utilizar fuentes de fase gaseosa donde primero la muestra es volatilizada y después ionizada. Las fuentes de fase gaseosa se utilizan para compuestos no volátiles y térmicamente inestables, el uso de esta fuente se restringe para compuestos que pesen menos de 103 daltones, sean térmicamente estables y tengan puntos de ebullición menores a los 500°C. La fuente de desorción transmite energía directamente a la fase sólida o líquida, produciéndose la ionización y la transferencia de los iones al estado gaseoso, esta fuente de ionización se utiliza para compuestos no volátiles y térmicamente inestables, también para compuestos con pesos moleculares superiores a los 100000 daltones.

El uso de la fuente de ionización depende también de método de introducción de la muestra ya sea por GC, LC o electroforesis capilar, dependiendo de método de introducción de la muestra podemos utilizar por mencionar algunas fuentes de ionización como son: Fuente de ionización por campo (FI), ionización por impacto electrónico (EI), ionización química (CI), ionización por electrospray (ESI), ionización química a presión atmosférica (APCI), desorción/ionización por láser (MALDI).

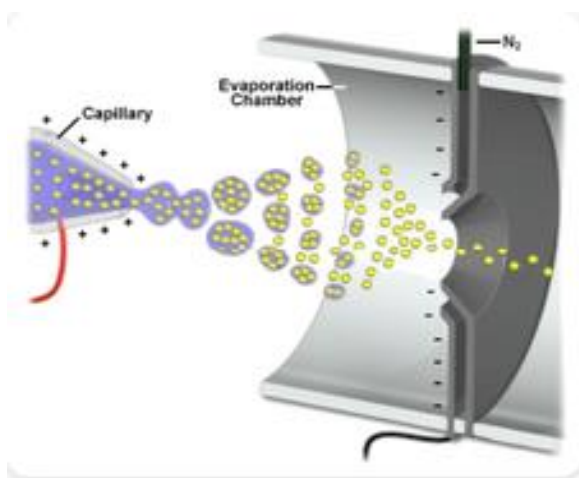


Figura 4. Esquema de la fuente de ionización.

Fuente: <https://proteomeplus.wordpress.com/2012/12/>

- IONIZACIÓN ELECTRÓNICA

En esta fuente de ionización las moléculas que se encuentran dentro de una muestra son ionizadas por un haz de electrones que contienen una elevada energía, el haz de electrones que se emplean para la ionización son emitidos por un filamento caliente, se aceleran por medio de una diferencia de potencial de 70 eV, esta diferencia de potencial se encuentra tanto en el filamento y en la fuente de iones ver Figura 5. El fundamento de esta técnica está basado en la interacción de los electrones emitidos con la muestra de interés, la energía de los electrones emitidos es mayor que los enlaces de la molécula, se produce la ionización. Al emitir un exceso de energía esta puede romper los enlaces de la molécula de una manera caracterizada tanto que el resultado obtenido es la formación de fragmentos identificables que nos ayudan a deducir la identidad de la molécula.

La mayoría de las moléculas estables tienen un número par de electrones en la capa externa. A partir de la capa externa de la molécula se extrae un electrón para formar un catión que se designa M^{+} posteriormente este catión se le asigna el nombre de ion molecular.

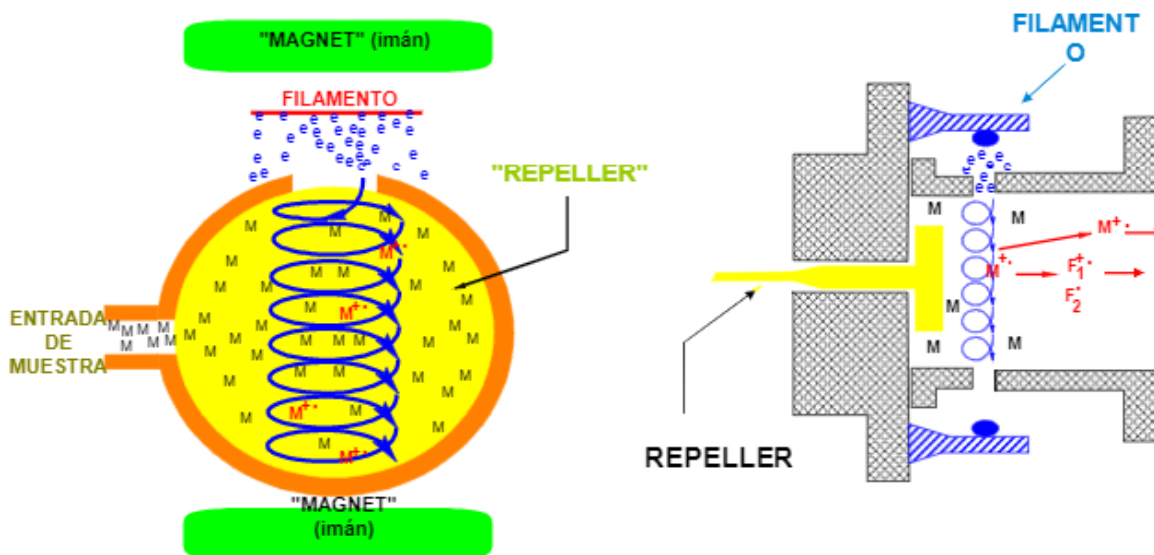


Figura 5. Esquema de la ionización electrónica.

Fuente: <https://docplayer.es/6721885-Seminario-de-espectrometria-de-masas-para-usuarios-del-suic.html>

- **IONIZACIÓN QUÍMICA**

En la ionización química se forman nuevas especies cuando las moléculas gaseosas de interés interactúan con los iones, con esta técnica se puede llevar a cabo la transferencia de electrones o protones. En la ionización química se produce menos fragmentos que en la ionización por impacto electrónico por lo tanto en la ionización química se puede mayor abundancia del ion molecular que la de los fragmentos.

La técnica utiliza un gas reactivo para la formación del ion molecular, los gases que se utilizan para la formación ion-molecular son: metano, isobutano y amoniaco.

La muestra se introduce en una fuente (EI). En la primera etapa, este gas reactivo se ioniza a una alta presión que va desde 0,1 y 1 torr, posteriormente la molécula es bombardeada con un haz que emite electrones que contienen un voltaje de 200-500 eV. Como segundo paso los iones más estables del gas reactivos reaccionan con la molécula formando un ion-molecular, en alguno de los casos los iones del gas reactivo que se forman al principio son inestables. Para la formación de más fragmentos se debe elevar la presión del gas que se esté trabajando ver Figura 6.

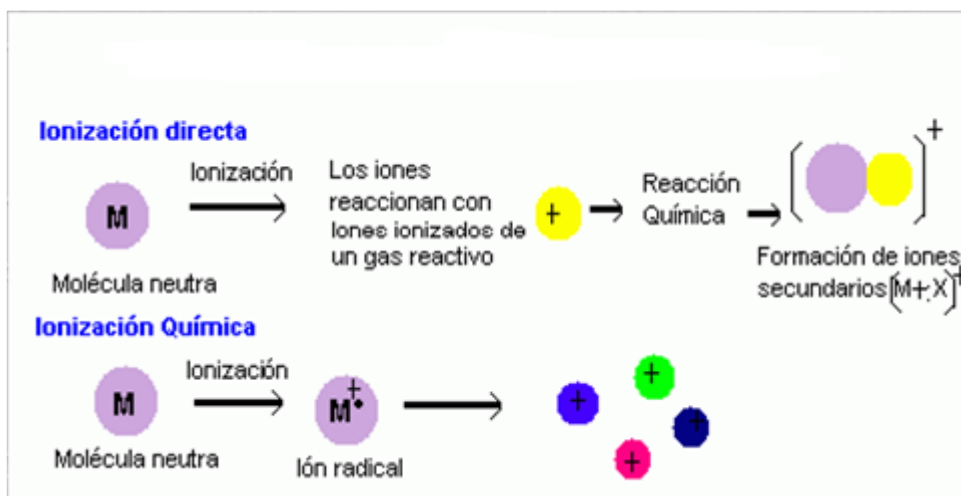


Figura 6. Esquema de la ionización química.

Fuente: <https://www.um.es/LEQ/Atmosferas/Ch-V-2/F52s10p1.htm>

- IONIZACIÓN POR ELECTROSPRAY (ESI)

La técnica de ionización por electrospray (ESI) se emplea para la caracterizar o determinar moléculas de alto peso molecular como son: biomoléculas y péptidos. El fundamento de esta técnica se basa en la formación de una fina niebla de partículas cargadas.

Una de las condiciones fundamentales para emplear la ionización por electrospray es que el analito debe encontrarse disuelto en un solvente adecuado, para introducir la muestra dentro de la fuente se debe emplear una bomba inyectora o una fuente de elución, la fuente de elución que se emplea para introducir la muestra en la interface es a través de un cromatógrafo de líquidos (LC) ya que este mecanismo mantiene un flujo constante, el analito que se encuentra disuelto en la fase líquida proveniente del cromatógrafo de líquidos ingresa a un filamento de acero inoxidable o de cuarzo, el filamento genera un campo eléctrico que al combinarse con el flujo coaxial del gas genera un fino aerosol de partículas cargadas. El filamento genera un campo eléctrico que tiene una diferencia de potencial que va de los 2.5 a 6 kv.

El campo generado en el filamento fuerza a que se lleve la nebulización de las gotas, las gotas previamente se encuentran cargadas, la formación de las gotas en el capilar entra en el cono de la fuente de muestreo con ayuda de la elevación de la temperatura y nitrógeno, las gotas se van introduciendo en espectrómetro de masas donde termina su recorrido en el analizador ver Figura 7.

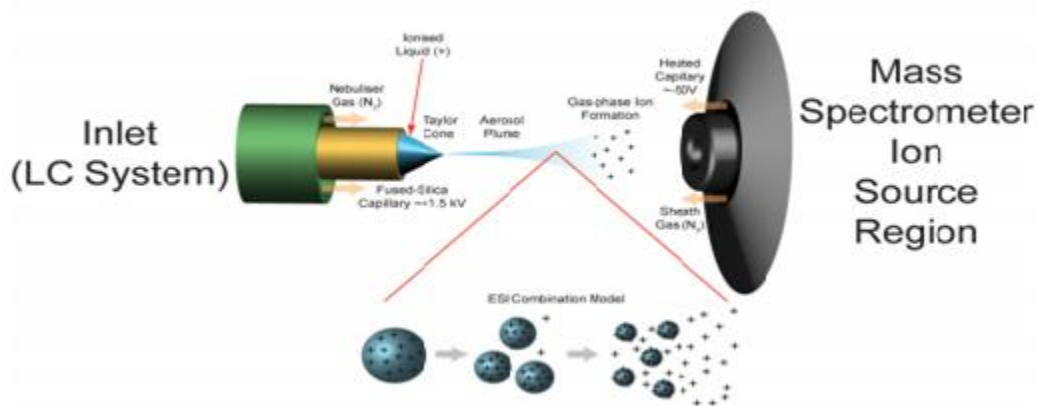


Figura 7. Esquema de la ionización por electro spray (ESI).

Fuente:

<https://www.cbm.uam.es/images/servicios/proteomica/documentos/espectrometria-de-masas-ESI-MSMS.pdf>



- **IONIZACIÓN A PRESIÓN ATMOSFERICA**

La Ionización a presión atmosférica (API) es una de las formas de análisis para una muestra no volátil, pasa a un estado líquido a gaseoso. La muestra puede desintegrarse directamente en la fuente de iones. La fuente está desarrollada originalmente para el análisis de compuestos volátiles tales como los que proviene de las columnas de GC, presente en el aire del ambiente o introducida en el flujo del gas acarreador.

El API puede funcionar en dos modos: (1) ionización química a presión atmosférica (APCI) y (2) de ionización por electrospray. La técnica APCI comúnmente para el análisis de muestras que contienen compuestos polares que tienen una masa molecular muy baja.

En la presión atmosférica se emplea calor y una corriente de un gas coaxial es este caso N_2 para obtener finalmente una fina niebla de la cual se evapora tanto el disolvente y analito de interés, esta técnica crea nuevos iones en la fase gaseosa por las reacciones entre los iones y las moléculas de esta se dice que la ionización química a presión atmosférica (APCI) es idéntico a la ionización química (CI) donde la ionización se lleva a cabo a través de reacciones ion-molécula en fase gaseosa la reacción se produce entre los iones del gas reactivo y la molécula del analito, este mismo proceso descrito es similar al que se lleva a cabo en la técnica de la presión atmosférica las diferencia que podemos encontrar entre ambas técnicas son las condiciones de presión que se trabajan una técnica de otra.

Una de las características que podemos encontrar al trabajar con Ionización Química a Presión Atmosférica es que aplica altos voltajes a la aguja de metal donde forma el fino aerosol a esto también se le conoce como corona eléctrica que se forma alrededor de la aguja.

- **DESORCIÓN/IONIZACIÓN POR LÁSER (MALDI)**

Las fuentes de desorción se emplean para muestras no volátiles y termodinámicamente inestables. En esta técnica preside la volatilización de la muestra para posteriormente llevar a cabo la ionización. La muestra se le aplica una energía esto provoca que se lleve a cabo la formación directa de iones en su forma gaseosa.

La técnica de Desorción/Ionización por láser (MALDI) nos permite calcular pesos moleculares exactos de las moléculas como por ejemplo extractos de biopolímeros polares que se encuentran en un intervalo de masas de miles de Daltons. Para emplear esta técnica se debe mezclar la muestra con una disolución (acuosa/alcohólica), esta disolución nos permite que la muestra absorba la radiación emitida por el láser. La disolución resultante se evapora en la superficie de una sonda metálica que se utiliza para introducir la muestra. La mezcla se expone a la acción de un haz de láser pulsante, provocando la sublimación del analito, los iones son introducidos en un espectrómetro de tiempo de vuelo para llevar a cabo el análisis de masas, ver esquema en la Figura 8.

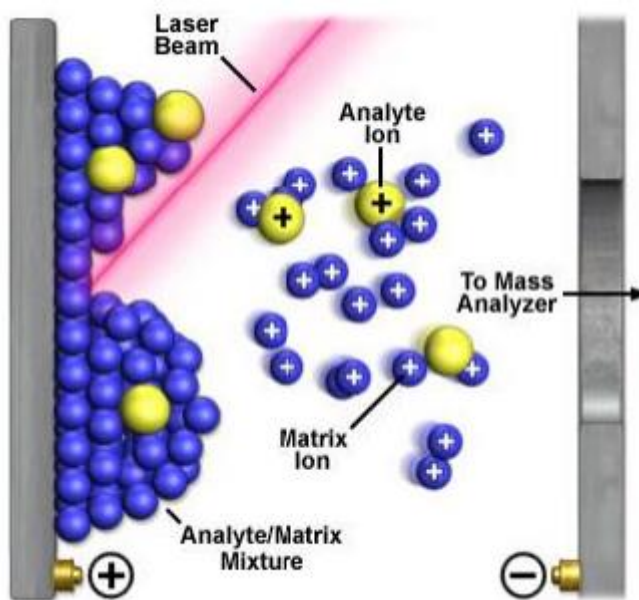


Figura 8. Esquema de la Desorción/Ionización por láser. Fuente: <http://ufq.unq.edu.ar/Docencia-Virtual/BQblog/MALDI-ESI-TOF.pdf>

❖ DETECTORES

• TIEMPO DE VUELO

En un analizador de tiempo de vuelo, los iones generados por la fuente son acelerados mediante un pulso de potencial eléctrico, que proporciona a todos los iones una misma energía.

En un analizador de tiempo de vuelo típico ver Figura 9, la muestra es vaporizada y sometida durante un periodo de aproximadamente $1 \mu\text{s}$ por un pulso de electrones que da lugar a la ionización, se aplica un potencial de aceleración durante un tiempo menor (100 ns) que es utilizado para la generación de iones, de forma que todos los iones son acelerados de forma simultánea, los iones que contienen un peso molecular muy bajo viajan más rápido los iones que contiene un peso molecular más alto, los iones alcanzan una zona libre de campo a lo largo de la cual se mueven a velocidad constante hasta alcanzar el detector.

El espectrómetro de masa solo es un tubo, largo y evacuado con una fuente en un extremo y en el otro lado está posicionado el detector además de presentar un doble enfoque y funciona con una potencia de resolución constante la única limitante que presenta es no todos los iones que son emitidos por la fuente de ionización tiene la misma energía cinética.

Los espectrómetros de tiempo de vuelo ofrecen dos importantes ventajas: en primer lugar, su tiempo de análisis es corto, por otra parte, no existen limitaciones de masa en los iones que pueden ser separados. Los espectrómetros de tiempo de vuelo se utilizan para realizar análisis de sustancias con elevado peso molecular.

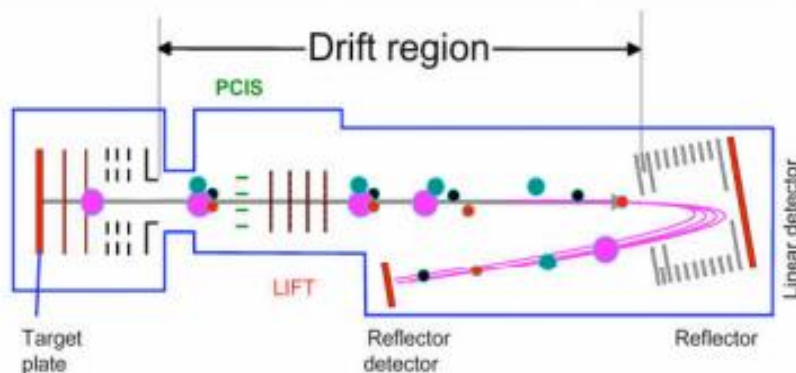


Figura 9. Esquema del analizador de tiempo de vuelo. Fuente:

<https://www.cbm.uam.es/images/servicios/proteomica/documentos/espectrometria-de-masas-MALDI-TOF.pdf>

- **TRIPLE CUADRUPOLO**

La espectrometría de masas triple cuadrupolo (QQQ) Figura 10, consta de tres cuadrupolos, que se encuentran en línea recta. El primer cuadrupolo cumple con la función (Q_1) seleccionar el analito de interés (ion padre o precursor), el segundo cuadrupolo (Q_2) se utiliza como una celda de colisión donde se lleva a cabo la fragmentación del ion precursor, en este cuadrupolo se emplea un gas inerte para llevar a cabo la fragmentación al gas inerte también se le conoce como gas colisionador, este proceso es mejor conocido como disociación inducida por colisión (CID). Los iones obtenidos a partir de la fragmentación que realiza en cuadrupolo (Q_2) son escaneados en tercer cuadrupolo (Q_3) la principal función de este cuadrupolo es proporcionar la información estructural de los iones moleculares.

Este análisis que se realiza en este tipo de detector se le conoce como MS^n en donde “n” significa el número de etapas de análisis del analito de interés. Los análisis MS/MS proporcionan información estructural a partir del ion precursor y los fragmentos obtenidos de la disociación inducida por colisión, la información acerca de los analitos de interés se puede observar en un espectro de masas.

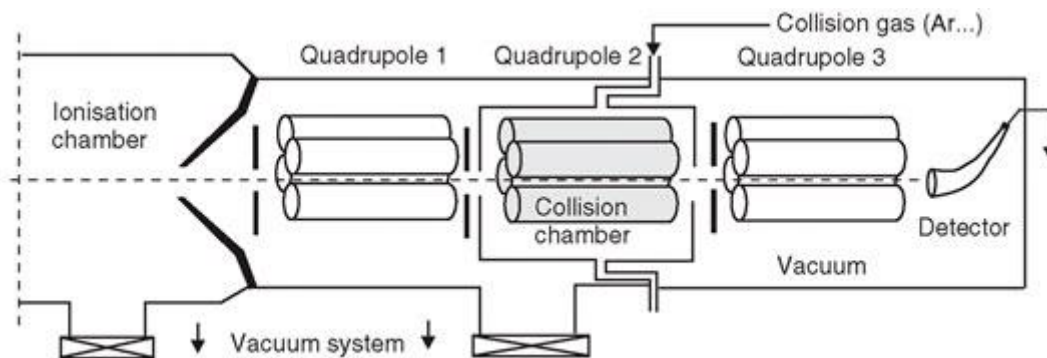


Figura 10. Esquema del analizador triple cuádrupolo.

Fuente: <https://www.spectroscopyeurope.com/td-column/new-approach-identifying-unknown-trace-level-analytes-tandem-mass-spectrometry-without>

- **TRAMPA DE IONES**

Una trampa de iones es un dispositivo que utiliza un campo eléctrico oscilante para almacenar iones. La trampa de iones funciona mediante el uso de un campo cuadrupolar de radio frecuencia (RF) que atrapa iones. Las trampas de iones se pueden clasificar en dos tipos: la trampa de iones 3D o la trampa de iones 2D Figura 11.

Las primeras trampas de iones fueron las 3D. Están formadas por un electrodo circular, con dos tapas elipsoides en la parte inferior y superior que crea un campo cuadrupolar 3D. Se conocen también trampa de iones cuadrupolo (QTI). En los instrumentos de cuadrupolo, los potenciales se ajustan de modo que solo iones con una masa seleccionada a través de varillas.

Los iones de diferentes masas están presentes juntos dentro de la trampa, y se expulsan de acuerdo con sus masas para obtener el espectro. Su frecuencia es constante, pero su amplitud V puede variar. Se pueden aplicar voltajes de RF adicionales de frecuencias y amplitudes seleccionadas. A medida que los iones se repelen entre sí en la trampa, sus trayectorias se expanden en función del tiempo. El instrumento es muy simple y relativamente económico.

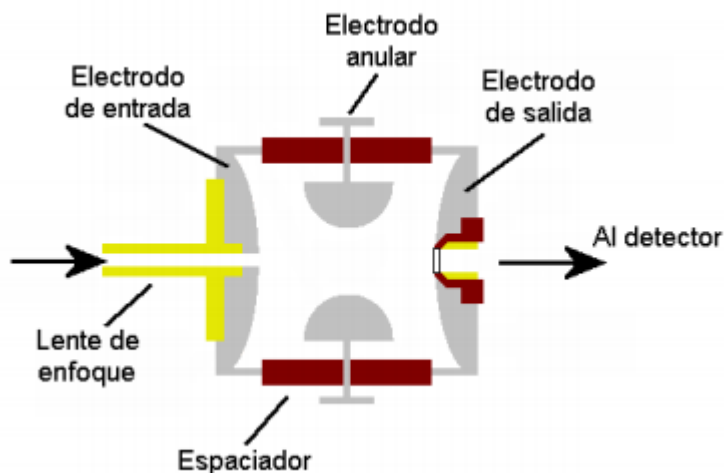


Figura 11. Esquema del analizador trampa de iones.

Fuente: https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf



❖ VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

El validar un método básicamente es el proceso para definir un requisito analítico y la confirmación de que cuenta con las capacidades requeridas, en algunos de los sectores utilizan los conceptos de “validación primaria” y “validación secundaria” esta última adquiere el sentido de verificación, existe una diferencia entre validación y verificación de acuerdo con la ISO 9000 define verificación como “confirmación, a través de la aportación de evidencias objetivas, de que cumplen con los requisitos especificados” mientras que validación la define como “confirmación, a través de la aportación de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos para un uso o aplicación específico previsto”.

El termino verificación se refiere a métodos normalizados que son aquellos publicados en Normas Oficiales Mexicanas, Normas Mexicanas o los emitidos por organizaciones de normalización, extranjeras, regionales internacionales, tales como ISO, EN, ASTM, AOAC, EPA y USP, mientras que validación se aplica a métodos no normalizados que son aquellos métodos propio o desarrollado por el laboratorio, métodos obtenidos de publicaciones científicas, así como los métodos normalizados modificados. Un método debe ser validado para demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para su uso

Blanco de reactivos: Los reactivos utilizados durante el proceso analítico (disolventes para la extracción o disolución)

Blanco de muestra: Se trata de muestras matriz sin presencia del analito de interés, los blancos de muestra son difíciles de obtener, pero necesarios para tener una estimación real de las interferencias.

Patrones de medida: Los materiales de referencia pueden ser los materiales empleados como valor de referencia, ya sean reactivos de pureza conocida, productos industriales u otros dispositivos. Los materiales de referencia certificados se controlan de manera más rigurosa que los materiales de referencia, el valor proporcionado por los MRC (Materiales de referencia certificados) se certifica en un documento que demuestra su trazabilidad metrológica y se declara la incertidumbre asociada.

Estadística: Las técnicas de estadística son fundamentales para la agrupación de los datos obtenidos y el realizar un análisis objetivo de los datos obtenidos.

Los parámetros a evaluar en una validación se mencionan a continuación:

- ◆ Linealidad
- ◆ Arrastre
- ◆ Selectividad.
- ◆ Límite de Detección



- ◆ Límite de Cuantificación.
- ◆ Porcentaje de recobro.
- ◆ Repetibilidad.
- ◆ Precisión intermedia (Reproducibilidad).
- ◆ Incertidumbre

- **LINEALIDAD**

Capacidad de un método de ensayo para generar valores de la magnitud medida, proporcionales a los valores de concentración del analito de interés. La linealidad es la demostración que la relación de concentración del analito (x) es proporcional a la respuesta (y) del método y se ajusta a la ecuación de tipo $y = mx + b$, donde m y b son parámetros propios de la ecuación, además de obtener un coeficiente de correlación (R^2) mayor 0.99.

- **SELECTIVIDAD**

La selectividad analítica se relaciona con el grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar.

- **ARRASTRE**

Es la capacidad del método analítico de para producir resultados de una muestra independiente de concentración de las muestras anteriormente analizadas. El arrastre se puede comprobar al analizar una muestra que contenga los analitos de interés y posteriormente una muestra que no los contenga.

- **LÍMITE DE DETECCIÓN**

Mínima concentración de un analito o sustancia en una muestra, la cual puede ser detectada pero no cuantificada bajo las condiciones en que se lleva a cabo el método. Para determinar el límite de detección se toma en cuenta la señal mínima y_L del analito que puede ser detectable, se calcula con la siguiente ecuación:

$$y_{LB} = y_B + k_{SK}$$

Donde y_B es la medida de las mediciones del blanco, s_B es la desviación estándar de las mediciones del blanco y K es el factor numérico elegido para el nivel de confianza.

- **PORCENTAJE DE RECOBRO**

Es la relación existente entre la respuesta obtenida cuando la cantidad del analito se determina prescindiendo de tantas etapas del procedimiento analítico como sea posible, excepto la propia medida, y cuando se analiza siguiendo el procedimiento analítico completo.



$$\%R = \frac{y-x_i}{x_a} * 100$$

Donde y es la concentración de la muestra más el estándar interno, x_i es la concentración inicial de la muestra y x_a concentración del patrón añadido.

- **LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN**

Es la capacidad del método analítico para determinar la concentración más baja de un analito de interés que puede determinar con un nivel aceptable de presión y una veracidad en la repetibilidad. Se define comúnmente el límite de cuantificación como:

$$y_{LC} = y_{Blanco} + K_{SB}$$

Donde y_{Blanco} son las mediciones del blanco, S_B es la desviación estándar de las mediciones del blanco y K es el factor numérico elegido para el nivel de confianza.

- **REPETIBILIDAD**

Para el método analítico es esencial la repetibilidad para obtener estimaciones fiables de las características de desempeño que presenta el método, tal como son la precisión y el sesgo.

- **PRECISIÓN INTERMEDIA**

Es la capacidad del método analítico para dar un resultado de concentración medida experimentalmente y realizar la comparación con el valor verdadero de la concentración del analito. Se dice que una medición es más exacta cuanto más pequeño es el error de medida.



❖ OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y validar una metodología analítica para confirmar de manera simultánea la presencia de Clembuterol y Ambroxol en orina humana, así como cuantificadas mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC) acoplada a espectrometría de masas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ◆ Establecer las condiciones cromatograficas para la determinación simultánea en Clembuterol y Ambroxol, así como el tiempo de retención, concentraciones y tratamiento de la muestra.
- ◆ Adquirir el espectro de masas de Clembuterol y Ambroxol para confirmar la presencia de ambos analitos.

- ◆ Validar el método analítico con base a los siguientes parámetros establecidos:
 - Selectividad/especificidad
 - Contaminación entre muestras
 - Homo/heteroscedasticidad
 - Intervalo de trabajo
 - Linealidad
 - Límite de cuantificación
 - Porcentaje de Recuperación
 - Precisión (repetibilidad)
 - Precisión- Intermedia (reproducibilidad)
 - Estabilidad frente a los ciclos congelación-descongelación
 - Incertidumbre asociada a los resultados
 - Contar con un método analítico validado para la detección simultanea de Clembuterol y Ambroxol.



❖ HIPÓTESIS

El número de muestras con resultado analítico adverso a clenbuterol se ha incrementado en los últimos años, esto de acuerdo a la información publicada por la agencia mundial antidopaje es su página electrónica.

Estos resultados por clenbuterol han tenido que ser en muchos casos no sancionados debido a que no es posible conocer el origen por el cual esta sustancia pudo haber entrado en el organismo del atleta. Se han considerado varias alternativas a) que el atleta lo haya consumido de manera intencional con fines de dopaje, b) que haya sido por el consumo de carne contaminada con clenbuterol o c) que haya estado presente en algún medicamento ingerido por algún padecimiento médico sin contar con una autorización previa de uso terapéutico.

En este sentido dado la evidencia analítica reportada por los laboratorios de dopaje, no es posible poder discriminar alguna de estas vías de entrada al organismo, por lo que no se sanciona al atleta. Solo algunos casos han sido sancionados en donde ha quedado clara la vía de administración de este β_2 -agonista.

Al respecto en este trabajo de tesis se plantea el desarrollo de una metodología analítica que permita discriminar una de estas potenciales vías de consumo de Clenbuterol. En el mercado mexicano, así como en varios otros países es posible adquirir una presentación farmacéutica que contiene clenbuterol en conjunto con Ambroxol, como la han descrito algunos autores [53].

Por lo que sí, se desarrollará y validará una metodología analítica para la identificación simultánea de clenbuterol y Ambroxol en muestras de orina humana, entonces será posible por medio de la información generada discriminar alguna de las posibilidades de entrada del Clenbuterol al organismo del atleta dada la alta probabilidad de encontrar esta sustancia junto con Ambroxol.



❖ METODOLOGÍA

• MATERIALES E INSTRUMENTOS

Reactivos

- ◆ Enzima β -Glucuronidasa de la marca Roche
- ◆ Disolución de Hidróxido de Potasio 5 M.
- ◆ Disolución metanólica de Clembuterol-*d*9 concentración 1000 $\mu\text{g/mL}$
- ◆ Disolución metanólica de Clembuterol de concentración 1000 $\mu\text{g/mL}$
- ◆ Disolución metanólica de Ambroxol de concentración 1000 $\mu\text{g/mL}$
- ◆ Disolución metanólica de Brombuterol de concentración 1000 $\mu\text{g/mL}$
- ◆ Disolución de buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.0
- ◆ Metil tert-butil éter marca Fisher Scientific pureza $\leq 99.9\%$
- ◆ Metanol pureza $\leq 99.9\%$ marca Sigma Aldrich
- ◆ Agua milli-Q.
- ◆ Acetonitrilo Tipo I pureza $\leq 99.9\%$ marca J.T. Baker.
- ◆ Ácido fórmico pureza $\leq 99.9\%$ marca Waters.

Materiales

- ◆ Tubos de ensayo de 100 x 12 mm marca Pyrex
- ◆ Inserto de vidrio, 150 μL de volumen, marca phenomenex®
- ◆ Viales de 2 mL, marca Waters.
- ◆ Tapas para viales de la marca Waters.
- ◆ Matraces volumétricos de 50 mL.
- ◆ Pipetas de volumen variable, 50 μL - 500 μL , 20 μL -200 μL , 20 μL - 300 μL y 100 μL -1000 μL .
- ◆ Centrifuga.
- ◆ Evaporador.
- ◆ Congelador criogénico.
- ◆ Agitador vortex.
- ◆ Agitador orbital.
- ◆ Columna UPLC BEH C₁₈ de 100 mm de longitud, 2.1 mm de diámetro interno y 1.7 μm de tamaño de partícula, marca Waters.

Instrumento

- ◆ Cromatógrafo de líquidos Waters Acquity™ Ultra Performance LC acoplado a espectrómetro de masas Xevo™ TQ marca Waters.
- ◆ Software Mass Lynx V.4.1 marca Waters.

❖ **DESARROLLO EXPERIMENTAL**

• **DESARROLLO DEL MÉTODO POR LC/MS (CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS)**

El análisis cromatográfico se realizó empleando un cromatógrafo de líquidos Acquity™ Ultra Performance LC acoplado a un espectrómetro de masas Xevo™ TQ marca Waters Figura 12. Las inyecciones de la curva de calibración se realizaron por triplicado, así como las muestras control que se prepararon, la validación consta de cuatro ensayos realizados en diferente día para evaluar los parámetros de validación.



Figura 12. Cromatógrafo de líquidos Acquity™ Ultra Performance LC acoplado a un espectrómetro de masas Xevo™ TQ marca Waters.



Para la identificación del Clembuterol, Clembuterol-*d9*, Ambroxol y Brombuterol se empleó un espectrómetro de masas triple cuádruplo, el modo de adquisición de los datos fue MRM para cada analito. La cuantificación del Clembuterol y Ambroxol se realizó mediante la adición de estándar interno Clembuterol-*d9* y Brombuterol respectiva. Los iones diagnósticos empleados se representan en la Tabla 1 así como el modo de ionización para cada analito.

Tabla 1. Iones diagnósticos y modo de ionización para cada analito.

Analito	Ion diagnostico (<i>m/z</i>)	Modo de ionización
Clembuterol	203	Positivo
Clembuterol- <i>d9</i>	204	Positivo
Ambroxol	263	Positivo
Brombuterol	132	Positivo

En la Figura 13 se muestra el cromatograma con las transiciones siguientes: Brombuterol 367 > 132; Ambroxol 379 > 263; Clembuterol-*d9* 286 > 204; Clembuterol 277 > 203.

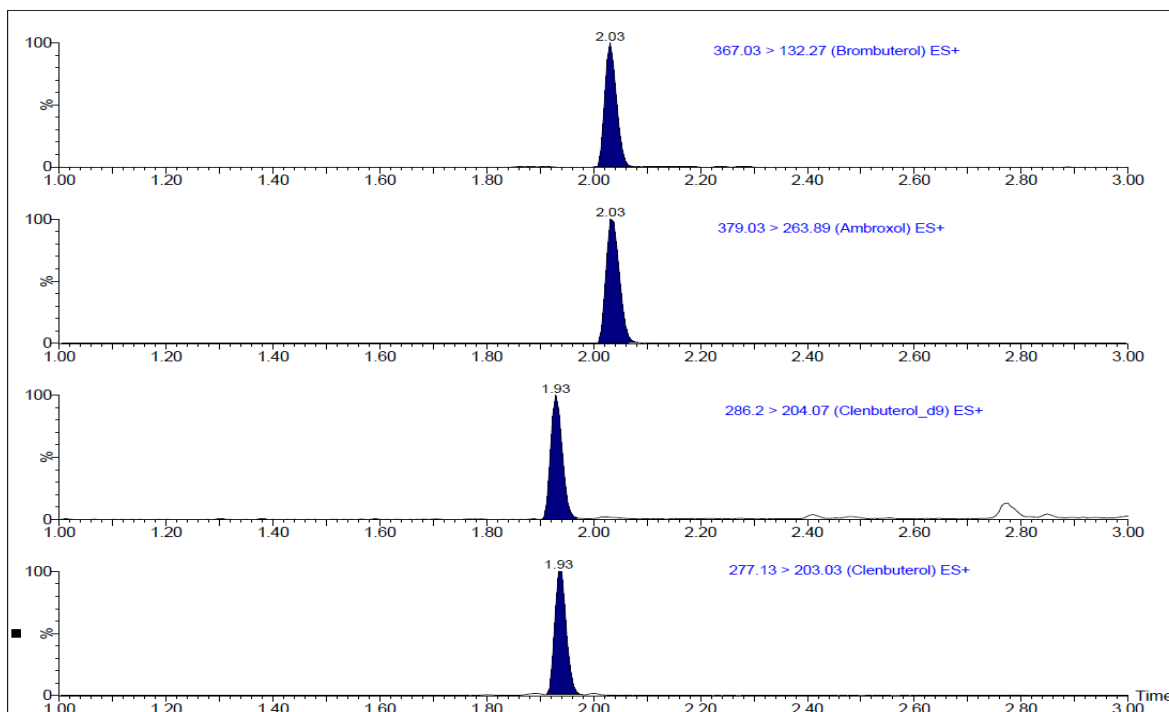


Figura 13. Cromatograma de iones diagnóstico para Clembuterol, Clembuterol-*d9*, Ambroxol y Brombuterol.



• **CONDICIONES DE ANÁLISIS**

- ◆ Columna de UPLC BEH C18 de 100 mm de longitud, 2.1 mm de diámetro interno y 1.7 μm de tamaño de partícula.
- ◆ Fase móvil: A: Agua con ácido fórmico 0.01 %.
 B: Acetonitrilo con ácido fórmico 0.01 %.
- ◆ Temperatura del inyector 10 °C.
- ◆ Volumen de inyección 10 μL .
- ◆ Temperatura de la columna 40 °C.
- ◆ Temperatura de la cámara de ionización 150 °C.
- ◆ Programa de elución por gradiente Tabla 2.

Tabla 2. Programa de elución cromatografica.

	Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% A	% B
	0.0	0.6	95	5
	0.6	0.6	95	5
	3.8	0.6	10	90
	4.0	0.6	10	90
Estabilización	4.5	0.6	95	5
Estabilización	5.0	0.6	95	5

- ◆ Tiempo de análisis 5 minutos.
- ◆ Modo de ionización positivo.
- ◆ Modo de adquisición MRM (Monitorear múltiple reacción).

• TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

En la Figura 14 se muestran los pasos que se siguieron para la preparación de la muestra para su análisis. Esta metodología se empleó para muestras usadas en la validación la validación del método.

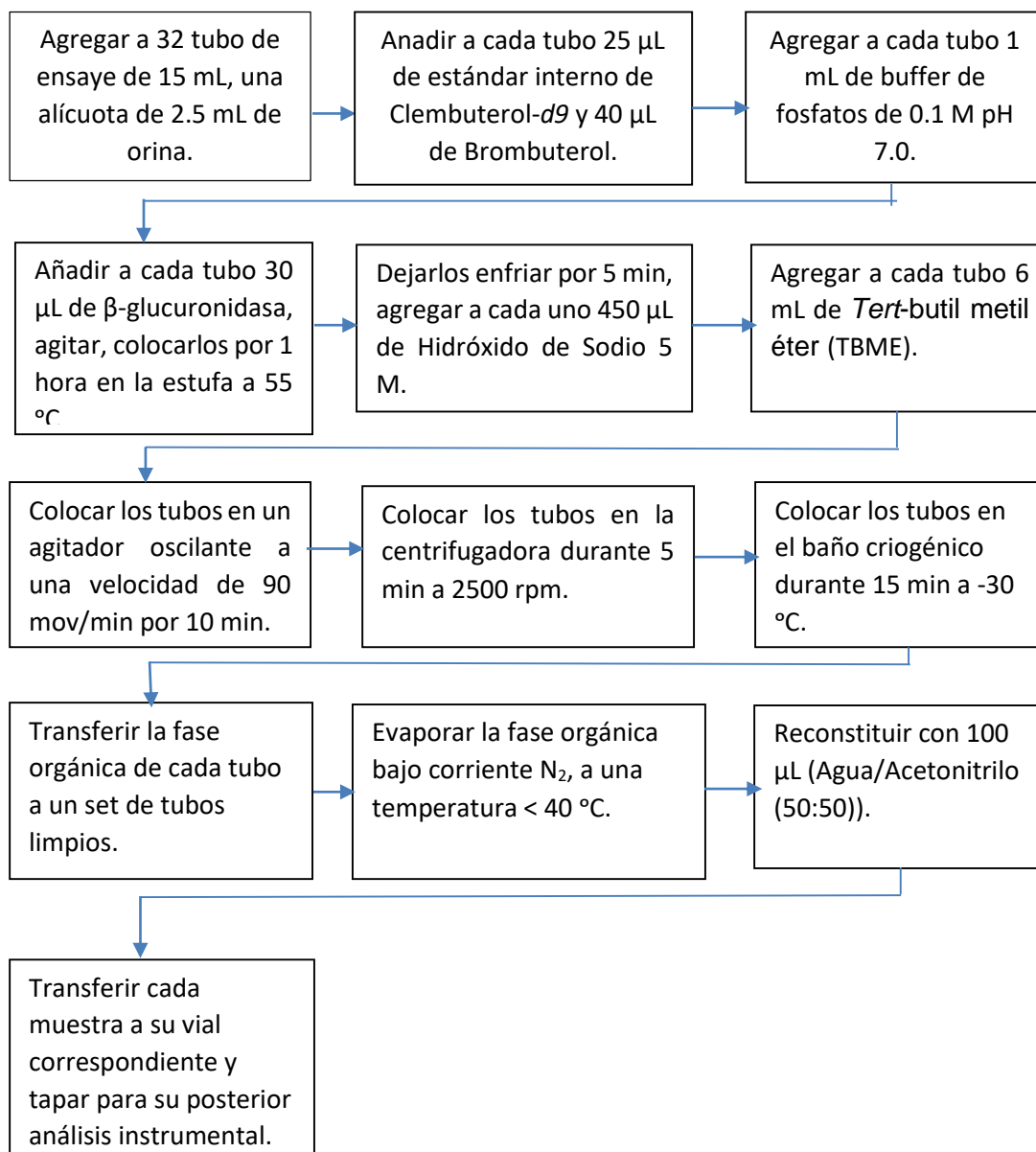


Figura 14. Diagrama de flujo que se empleó para la preparación de las muestras.



- **OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

La optimización del método de espectrometría de masas se desarrolló en base al ajuste de las energías de cono y colisión, así como la temperatura de la cámara de ionización para la obtención de los iones diagnósticos de Clembuterol y Ambroxol, así como los estándares internos empleados para el análisis. En la Tabla 3 se presenta un resumen de estos datos para cada analito.

Tabla 3. Energías y temperatura para obtener los iones diagnósticos.

Analito	Energía de Cono (eV)	Energía de Colisión (eV)	Temperatura de la cámara de ionización °C .
Clembuterol	18	16	150
Ambroxol	22	20	150
Clembuterol- <i>d</i> 9	18	16	150
Brombuterol	22	28	150

Las energías de cono, colisión y la temperatura de la cámara de ionización que se representan la Tabla 3 fueron las empleadas para generar los iones diagnósticos de cada una de las moléculas analizadas mencionados en la Tabla 2.



❖ VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Para la validación del método se obtuvieron los datos de los siguientes parámetros.

• LINEALIDAD.

Para la evaluación de la linealidad se realizaron las curvas de calibración empleando como estándares internos Clembuterol-*d*9 y Brombuterol, se realizaron empleando las concentraciones que se muestran en la Tabla 4 y Tabla 5.

Tabla 4. Intervalo de concentraciones empleadas en la curva de calibración.

Niveles	Concentración de Clembuterol pg/mL.	Concentración de Ambroxol ng/mL.
1	20	3
2	50	7.5
3	100	15
4	200	30
5	500	75

Tabla 5. Concentraciones de los controles para la evaluación de parámetros.

Niveles	Concentración de Clembuterol pg/mL.	Concentración de Ambroxol ng/mL.
inferior (CI)	20	3
Medio (CM)	100	15
Superior (CS)	500	75

Cada punto de la curva así como los controles se realizaron por cuadruplicado, se emplearon las condiciones óptimas del método analítico para la validación del método analítico. La linealidad se obtuvo a partir del coeficiente de correlación y el modelo lineal $Y = mx + b$, a partir de las concentraciones que se representan en la Tabla 4 para cada analito.



- **SELECTIVIDAD**

Para la determinación de la selectividad se analizaron 5 muestras de orina humana blanco de diferente origen. Se verificará la magnitud de las posibles interferencias calculando el porcentaje de interferencia a partir del nivel de concentración menor, tanto para los analitos como para el estándar interno, es decir:

$$Int \%_{an} = \frac{YMB1}{YM1} * 100$$

$$Int \%_{stdint} = \frac{YMB1}{Yis} * 100$$

Los criterios de evaluación de la especificidad deben cumplir con los siguientes valores que son:

$$Int \%_{analito} < 10 \%$$

$$Int \%_{Estándar\ interno} < 1 \%$$

- **ARRASTRE**

El arrastre se evaluó con 2 muestras blanco que se prepararon junto con la curva y los controles, las muestras blanco se colocaron dentro del set de la secuencia, las muestras blanco se analizaron después de analizar el control superior de la curva, esto se realizó con el fin de observar si al analizar el control superior y después analizar una muestra blanco se observa si hay un arrastre por parte de la muestra blanco. Para determinar el parámetro se empleó la respuesta del analito en las muestras blanco y la respuesta del analito en la muestra control superior. Se verificará si hay ausencia de respuesta para los analitos en la muestra blanco, analizada inmediatamente después de la muestra de concentración superior de la curva.

En el caso de encontrar respuesta del analito, se utilizará la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de arrastre de cada analito.

$$AR\%_{an} = \frac{YMB2\ an}{YM51\ an} * 100$$

$$Ct\%_{an} = \frac{YMB2\ an}{YM1\ an} * 100$$

$$AR\%_{StdInt} = \frac{YMB2\ P\ int}{YM51\ P\ int} * 100$$



Los criterios de evaluación del arrastre deben cumplir que el analito presente un porcentaje menor al 1 %, que la contaminación entre muestras por el analito sea menor al 10 % y por último que el arrastre del estándar interno se menor al 1%, a continuación, se presentan los valores:

$$AR \%_{analito} < 1 \%$$

$$Ct \%_{analito} < 10 \%$$

$$AR \%_{StdInt} < 1 \%$$

- **LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN**

El límite de detección y cuantificación se obtuvo a partir de la estimación de 3 y 10 veces la señal/ruido del método, esta se toma como la desviación estándar (S_{y1}) de los valores de respuesta obtenidos del nivel de concentración inferior que se debe multiplicar ya seas 3 y 10 veces. El factor 3.3 se toma del valor de la t de student cuando se tiene $\alpha=\beta=0.05$. En el límite de cuantificación se utiliza el valor 10 cuando la desviación estándar es constante a bajas concentraciones y se tiene una desviación estándar relativa (RSD) de 10%.

$$LD = \frac{3.3 * SY_{1j}}{b}$$

$$LC = \frac{10 * SY_{1j}}{b}$$

El criterio de evaluación para el límite de detección y cuantificación debe ser menor a la concentración inferior de la curva de calibración.

$$LC \text{ y } LD < LCi$$



- **PORCENTAJE DE RECOBRO**

El parámetro de recobro se obtuvo a partir de las muestras control que se analizaron por triplicado (CI, CM, CS) previamente preparadas con matriz y procesadas solo con las concentraciones (CI, CM, CS) de la curva de calibración, a partir de estas concentraciones se calcula el porcentaje de recobro del analito y del estándar interno.

$$R_{an} = \frac{Y_M}{Y_{Pint}} * 100$$

$$R_{int} = \frac{Y_M}{Y_S} * 100$$

Donde:

Y_{Pint} : Es la media de todos los valores de respuesta obtenidos para el patrón interno en las muestras con matriz extraídas

Y_M : Es la media de todos los valores de respuesta obtenidos para el patrón interno en las muestras con matriz extraídas.

Y_S : Es la media de los valores de respuesta obtenidos para el patrón interno en las muestras analizadas en ausencia de matriz o con la matriz previamente extraída.

R_{an} =Porcentaje de recobro del analito.

R_{int} =Porcentaje de recobro del estándar interno.

Los criterios de evaluación que debe cumplir el parámetro son:

Recomendable R_{an} o $R_{int} > 70\%$



- **REPETIBILIDAD**

La repetibilidad se calculará a partir de los resultados obtenidos para las muestras sometidas a tantos ciclos de congelación y descongelación.

Para cada nivel de concentración de las muestras control (CI, CM y CS) se debe calcular la desviación estándar relativa y se expresará porcentualmente como (RSD %), para este caso se empleará los valores de concentración estimada a partir de la curva de calibración para el cálculo se usará la siguiente fórmula:

$$RSD \% = \frac{S_{x_{iest}}}{X_{iest}}$$

Donde:

$S_{x_{iest}}$: Es la desviación estándar estimada obtenida a partir de las muestras control.

X_{iest} : Son los valores de concentración estimada a partir de la curva de calibración.

Los criterios para los niveles medio y superior no deben ser mayor al 15%, mientras que para el nivel inferior no debe ser mayor al 20%, a continuación, representan de la siguiente manera.:

$$RSD\% < 15 \% \text{ (para controles medio (CM) y superior (CS)).}$$

$$RSD\% < 20 \% \text{ (para el control inferior).}$$



- **PRECISIÓN INTERMEDIA (REPRODUCIBILIDAD)**

Se calculará la precisión intermedia (reproducibilidad) a partir de los resultados obtenidos para las muestras sometidas a tantos ciclos de descongelación. Para cada nivel de concentración de las muestras de control (CI, CM y CS) se calculará el error expresado porcentualmente ERR% de los valores de concentración estimados a partir de la curva de calibración.

$$ERR\%_{ij} = \frac{x_{ij} - x_i}{x_i} * 100$$

Los criterios de evaluación son:

$$ERR\%i < 15\% \text{ (para controles medio (CM) y superior (CS)).}$$

$$ERR\%i < 20\% \text{ (para el control inferior (CI))}$$

- **INCERTIDUMBRE**

Se calculará el intervalo de confianza a 95% de probabilidad ($\alpha=0.05$) de cada uno de los valores obtenidos para cada muestra control CI, CM y CS. Primero se calculará la incertidumbre estándar combinada de la concentración de cada analito, esta es expresada de la siguiente manera para cada analito.

$$u_{C_{Clembuterol}} = C_{Clembuterol} * \sqrt{\left(\frac{u_{Rep}}{C_{Rep}}\right)^2 + \left(\frac{u_{C_{curva}}}{C_{curva}}\right)^2 + \left(\frac{u_{F_{d1}}}{F_{d1}}\right)^2 + \dots + \left(\frac{u_{F_{dn}}}{F_{dn}}\right)^2}$$

$$u_{C_{Ambroxol}} = C_{Ambroxol} * \sqrt{\left(\frac{u_{Rep}}{C_{Rep}}\right)^2 + \left(\frac{u_{C_{curva}}}{C_{curva}}\right)^2 + \left(\frac{u_{F_{d1}}}{F_{d1}}\right)^2 + \dots + \left(\frac{u_{F_{dn}}}{F_{dn}}\right)^2}$$

El cálculo de la incertidumbre expandida se desarrolla tomando en cuenta la incertidumbre combinada y multiplica por un factor de cobertura $K=2$ que representa el 95% de confiabilidad, este debe ser menor al 20%.

$$U_{C_{Analito}} = u_{C_{Analito}} * K$$

Dónde:

$$U_{C_{Analito}} = \text{Incertidumbre expandida.}$$

$$u_{C_{Analito}} = \text{Incertidumbre combinada.}$$

K = Factor de cobertura.



❖ RESULTADOS Y DISCUSION

La linealidad del método se evaluó mediante la preparación de la curva de calibración para cada analito preparada con estándares, para la evaluación del Clembuterol se utilizó Clembuterol-*d9* como estándar interno con una concentración de 50 ng/mL y para la determinación de Ambroxol se utilizó Brombuterol como estándar interno con una concentración de 1000 ng/mL. En las Figuras 12 y 13 se presentan la correspondiente curva de calibración para Ambroxol y Clembuterol respectivamente En cada gráfico (ver figura 15 y 16) obtenido para cada analito se obtiene la ecuación de la recta $Y= mx +b$ con un coeficiente de correlación.

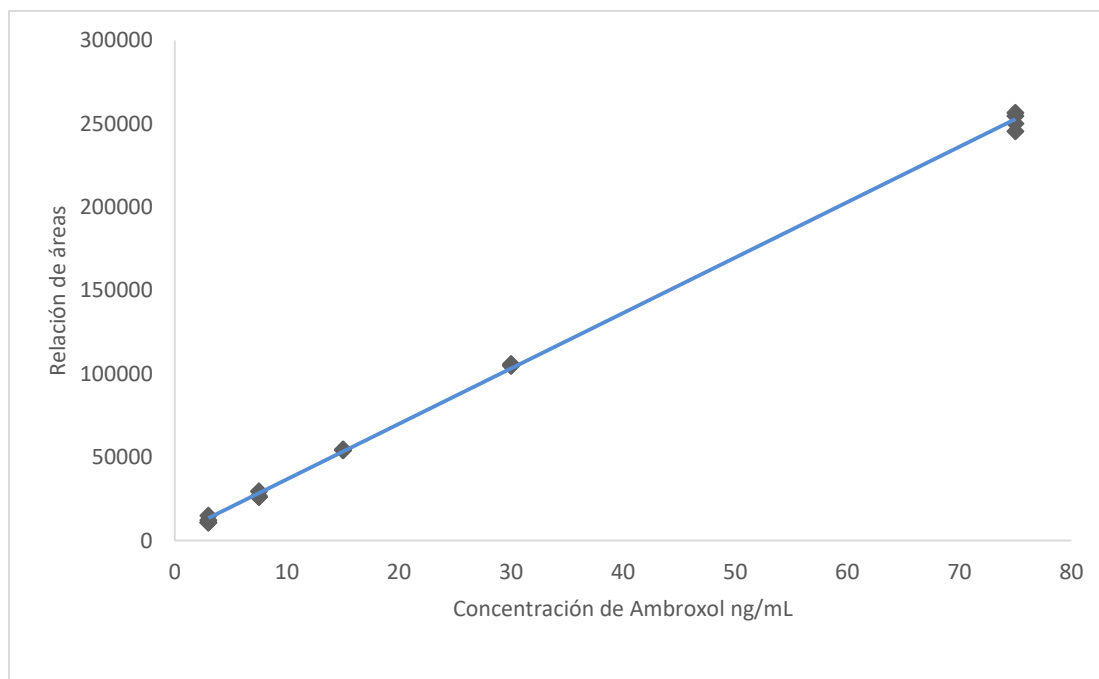


Figura 15. Curva de calibración para Ambroxol.

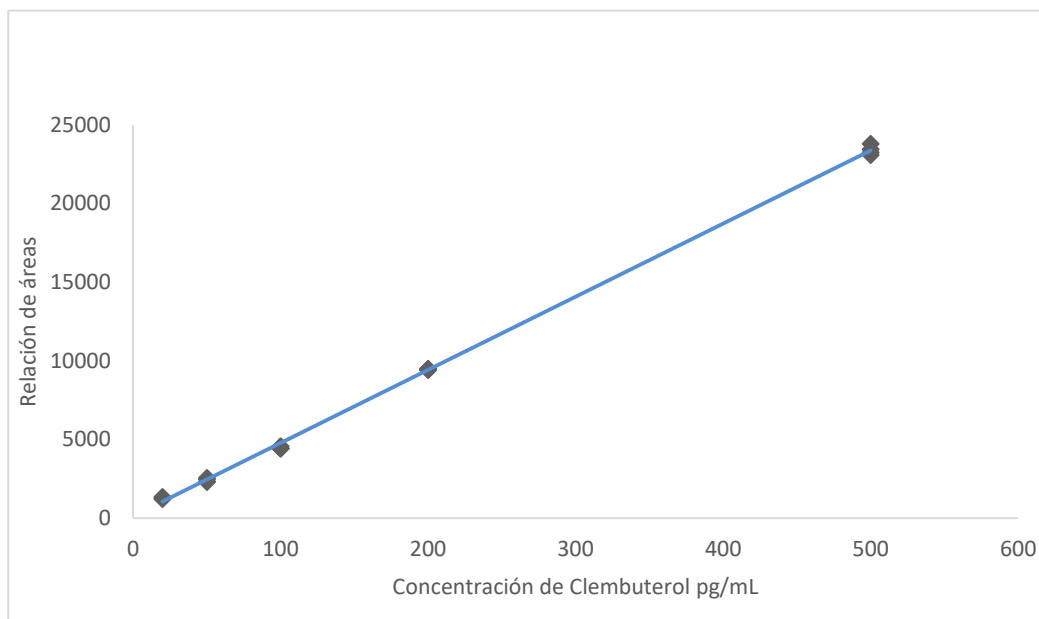


Figura 16. Curva de calibración para Clembuterol.

En la siguiente Tabla 6 se resumen los intervalos de trabajo empleados en la preparación de la curva de calibración y sus respectivas de concentraciones así como las ecuaciones obtenidas de cada analito.

Tabla 6. Intervalos de concentración y modelo lineal de cada analito.

Intervalos de la curva	Ecuación de la recta.
Clembuterol 20-500 (pg/mL)	$Y = 0.0153x + 0.0565.$ $R^2 = 0.9986$
Ambroxol 3-75 (ng/mL)	$Y = 0.22x + 0.7852.$ $R^2 = 0.9994$

Como se observa en la Tabla 6, el método cumple con un modelo lineal y el coeficiente de mayor a 0.99, por lo tanto método es lineal para ambos analitos.



• **SELECTIVIDAD**

La selectividad se evaluó a partir de los resultados del análisis de 5 muestras de orinas blanco junto con la curva de calibración con la finalidad de detectar la presencia o no de potenciales interferencias endógenas de la matriz biológica que modifique en la respuesta de los analitos de interés Tablas 7,8 no se obtiene un valor de intensidad para los analitos y los estándares internos en las 5 muestras de orina blanco, las 5 muestras evaluadas para la selectividad presentan ausencia de interferentes dentro del tiempo de retención del Clembuterol y el Ambroxol, El método analítico cumple con el parámetro de selectividad y sus criterios de evaluación.

Tabla 7. Resultados de selectividad para Ambroxol.

	Analito			Estándar interno		
	y_{MBi}	y_{M1}	$Int\%$ <i>analito</i>	y_{MBi}	$y_{I.S.}$	$Int\%$ <i>Estándar Interno.</i>
MB1	0	198290	0.00	0	187360	0.00
MB2	0	198290	0.00	0	187360	0.00
MB3	0	198290	0.00	0	187360	0.00
MB4	0	198290	0.00	0	187360	0.00
MB5	0	198290	0.00	0	187360	0.00

Tabla 8. Resultados de selectividad para Clembuterol.

	Analito			Estándar interno		
	y_{MBi}	y_{M1}	$Int\%$ <i>analito</i>	y_{MBi}	$y_{I.S.}$	$Int\%$ <i>Estándar interno.</i>
MB1	0	3238	0.00	0	14307	0.00
MB2	0	3238	0.00	0	14307	0.00
MB3	0	3238	0.00	0	14307	0.00
MB4	0	3238	0.00	0	14307	0.00
MB5	0	3238	0.00	0	14307	0.00

Y_{M1} = Área obtenida del analito en las muestras.

$Y_{I.S.}$ = Área obtenida del estándar interno en las muestras.



• **ARRASTRE**

La evaluación del arrastre en las muestras se realizó a partir de los datos obtenidos del análisis de 2 muestras blanco y el control superior de la curva de calibración. En las tablas 9 y 10, se presentan los valores de arrastre para Clembuterol y Ambroxol. Para el caso del Clembuterol y su estándar interno Clembuterol-*d*9 no presentan un valor de porcentaje de arrastre, mientras para el Ambroxol y su estándar interno Brombuterol presenta valores menores a los establecidos. Ambos analitos cumplen con los criterios de aceptación establecidos.

Tabla 9. Resultados de arrastre para Ambroxol.

Analito Ambroxol		
YMB analito	YM analito	AR% analito
7136	3097009	0.2
YMB analito	YM analito	Ct% analito
7136	199478	3.6
Estándar interno		
YMB Estándar Interno.	YM Estándar Interno.	AR% Estándar Interno.
0	180674	0.0

Tabla 10. Resultados de arrastre para Clembuterol.

Analito Clembuterol		
YMB analito	YM analito	AR% analito
0	84969	0.0
YMB analito	YM analito	Ct% analito
0	3623	0.0
Estándar Interno		
YMB Estándar Interno.	YM Estándar Interno.	AR% Estándar Interno.
0	11152	0.0



- **LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN**

El límite de detección y cuantificación se obtuvo por medio de la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración y los controles (CI, CM y CS), con estos datos se realizó la interpolación para determinar los límites de detección y cuantificación para Clembuterol y Ambroxol. Los valores obtenidos de cada analito se describen en la Tabla 11 y 12, se observa que se encuentran por debajo del control inferior que tiene una concentración de 20 pg/mL para Clembuterol y 3 ng/ mL para Ambroxol por lo tanto cumplen con los criterios de evaluación.

Tabla 11. Resultados del LD y LC de Ambroxol.

Límites de detección y cuantificación para Ambroxol	
LD	0.29 ng/mL
LC	0.89 ng/mL

Tabla 12. Resultados del LD y LC del Clembuterol.

Límites de detección y cuantificación para Clembuterol	
LD	1.57 pg/mL
LC	4.75 pg/mL



- **PORCENTAJE DE RECOBRO**

Los valores de recobro obtenidos para cada analito se muestran en la Tabla 13, donde los valores de recobro obtenidos para el Clembuterol y Ambroxol son mayores al criterio de evaluación del 70%, por lo tanto se considera que el método de extracción es eficiente para ambos analitos de interés.

Tabla 13. Resultados del recobro para Clembuterol y Ambroxol.

Analito	% de recobro
Clembuterol	100
Clembuterol- <i>d9</i>	98
Ambroxol	100
Brombuterol	96

- **PRECISIÓN**

La precisión se determinó a partir de las muestras control (CI, CM y CS) que se sometieron a ciclos de congelación y descongelación (C/D). En las Tablas 14 y 15 se observan los resultados obtenidos para cada uno de los analitos, los valores obtenidos de cada analito son menores a el criterio establecido que es: nivel inferior RSD% < 20% y para los niveles medio y superior RSD% < 15%, por lo tanto, los resultados obtenidos cumplen con el criterio de aceptación para los niveles de concentración (CI, CM y CS).

Tabla 14. Resultados de precisión para Ambroxol.

Concentración de Ambroxol ng/mL	RSD %
3	5.56
15	0.83
75	1.86



Tabla 15. Resultados de precisión para Clembuterol.

Concentración de Clembuterol pg/mL	RSD %
20	5.5
100	1.5
500	2.8

- **EXACTITUD**

La exactitud se determinó a partir de las muestras control (CI, CM y CS) que se sometieron a tantos ciclos de congelación y descongelación (C/D), en las Tablas 16 y 17 se observan los resultados obtenidos para cada nivel de control, los valores obtenidos son menores a los criterios establecidos para cada uno de los niveles, el criterio para el nivel inferior debe ser $RSD\% < 20\%$ y para los niveles medio y superior $RSD\% < 15\%$, por lo tanto, los resultados obtenidos cumplen con el criterio de aceptación para los niveles de concentración (CI, CM y CS).

Tabla 16. Resultados de exactitud para Ambroxol.

Concentración de Ambroxol ng/mL	RSD %
3	9.9
15	2.9
75	1.7



Tabla 17. Resultados de exactitud del Clembuterol.

Concentración de Clembuterol pg/mL	RSD %
20	5.5
100	1.5
500	2.8

• **INCERTIDUMBRE**

A partir de los resultados obtenidos de la validación del método se le asocia una incertidumbre para cada analito que representa en la siguiente Tabla 18.

Los resultados de incertidumbre asociada para cada analito cumplen con el criterio de aceptación que sea inferiores al 20% para los ensayos cuantitativos aplicados a los controles antidopaje.

Para obtener la incertidumbre expandida se calculó primero la incertidumbre estándar combinada, esta involucran las fuentes de incertidumbre asociadas, aportadas por la toma de alícuota, el volumen de aforo, la incertidumbre asociada al material de referencia, la incertidumbre de la regresión lineal, la disolución intermedia empleada, la repetibilidad del analista y la reproducibilidad del analista, por último la incertidumbre estándar combinada se multiplica por el factor $K=2$ para tener como resultado la incertidumbre expandida para cada analito.

Tabla 18. Valores de incertidumbre obtenidos para Ambroxol y Clembuterol.

Analito	Incertidumbre Expandida
Clembuterol	$\pm 13.2\%$
Ambroxol	$\pm 7.4 \%$

Los resultados obtenidos de cada uno de los parámetros se pueden observar en las hojas de cálculo en la parte de anexos, el anexo 1 son los resultados de Clembuterol y en anexo 2 se encuentran los resultados para Ambroxol.



- **ANÁLISIS DE RESULTADOS**

De acuerdo a los resultados obtenidos en la validación del método analítico desarrollado para la identificación simultánea de Clembuterol y Ambroxol en muestras de orina humana, se considera que este método cumple con los criterios indicados en la Guía para la validación de métodos analíticos EURACHEM.

Este método es útil para la identificación de las sustancias de interés dado que es específico, dado que no se observó la presencia de alguna sustancia endógena que pudiese eluir en mismo tiempo de retención de los analitos de interés, así como no se observa un incremento de la respuesta de los analitos de interés que fueron adicionados a las muestras blanco lo que también nos indica que la extracción es adecuada dado que no coeluyen otras sustancias que afecten o que alteren los resultados.

En este método no se observa que hay arrastre de los analitos de interés en la concentración superior empleada en cada caso. Estas concentraciones pueden aparecer en una muestra de control antidopaje y con esto se asegura que no se contaminaran las muestras que se encuentran cercanas en un set de análisis.

Los límites de detección y cuantificación cumplen con los criterios de aceptación. El porcentaje de recobro obtenido de cada analito cumplen con los criterios de aceptación, por lo tanto, el método de extracción es eficiente. En cuanto a los valores obtenidos en la precisión y exactitud cumplen con los criterios de aceptación establecidos.



❖ CONCLUSIÓN

Se desarrolló y validó un método analítico para identificar de manera simultánea la presencia de Clembuterol y Ambroxol en orina humana mediante la técnica de cromatografía de líquidos de ultra resolución (UPLC) acoplada a espectrometría de masas.

El método cumple con los criterios de aceptación para cada parámetro determinado durante la validación, por lo cual, este método es confiable para su uso posterior para la determinación de Clembuterol y Ambroxol.

Se cumple con la hipótesis planteada “Desarrollo de un método analítico” que aporte evidencia analítica para la determinación del posible origen del Clembuterol ya que hasta la fecha no es posible poder discriminar la vía de entrada al organismo, por lo cual no se sanciona a los atletas, con la ayuda de este método se aporta información que puede ser útil para las autoridades WADA-AMA (Agencia Mundial de Antidopaje) para poder abrir una investigación para aclarar la vía de entrada del Clembuterol al organismo de un atleta y poder sancionar a los atletas.



❖ REFERENCIAS

1. Oliver R. Joassard, Anne-Cecile Durieux, Damien G. Freyssenet. (2013) β 2-Adrenergic agonists and the treatment of skeletal muscle wasting disorders. *Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45:2309-2321.
2. Aldo Poletini. (1996) Bioanalysis of β 2-agonists by hyphenated chromatographic and mass spectrometric techniques. *Journal of Chromatography B*, 687: 27-42.
3. Battram C, Charlton SJ, Cuenoud B, Dowling MR, Fairhurst RA, Farr D. (2006) In vitro and in vivo pharmacological characterization of 5-[(R)-2-(5,6-diethyl-indan-2-ylamino)-1-hydroxy-ethyl]-8-hydroxy-1H-quinolin-2-o (indacaterol), a novel inhaled beta (2) adrenoceptor agonist with a 24-h duration of action. *Journal of pharmacology and Experimental therapeutics* 317:762-770.
4. Meyer, H.H.D; Rinke, L. M. (1991) The pharmacokinetic and residues of clenbuterol in veal calves. *Journal of Animal Science* 69:4538-4544.
5. Smith, D.J; Paulson, G.D. (1997) Distribution, elimination and residues of [14 C] Clenbuterol HCl in Holstein calves. *Journal of Animal Science* 75: 454-461.
6. Priscilla M. Clarkson and Heather S. Thompson. (1997) Drug and sport research findings and limitations. *Sports medicine*. 24:366-384.
7. Chen M, Feng HZ, Gupta D, Kelleher J, Dickerson KE, Wang J. (2009) Gs {alpha} deficiency in skeletal muscle leads to reduced muscle mass, fiber-type switching, and glucose intolerance without insulin resistance or deficiency. *American Journal of Physiology-Cell physiology*. 296:930-940.
8. Berdeaux R. Stewart R. (2012) cAMP signaling in skeletal muscle adaptation: hypertrophy, metabolism, and regeneration. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 303:1-17.
9. Harry J. Mersmann. (1998) Overview of the effects of β -Adrenergic Receptor Agonists on animal growth including mechanisms of action. *Journal of Animal Science*.76:160-172.
10. Brambilla G, Cenci T, Franconi F, Galarini R, Macri A, Rondoni F, Strozzi M, Loizzo A. (2000) Clinical and pharmacological profile in a clenbuterol epidemic poisoning of contaminated beef meat in Italy. *Toxicology*. 114:7-53.



11. Mitchell G, Dunnavan G. (1998) Illegal use of beta-adrenergic agonists in the United States. *Journal Animal Science*. 76:208-211.
12. Duncan, N, D., Williams, D, A., Lynch, G, S., (2000) Deleterious effects of chronic clenbuterol treatment on endurance and sprint exercise performance in rats. *Clinical Science*. 98:339-347.
13. Ramos, F., Baeta, M., Reis, J. Silveira, M. (2009) Evaluation of the ilegal use of clebuterol in portuguese cattle farms from drinking wáter, urine, hair and feed sample. *Food additives contaminants*. 26:814-820.
14. Raul Nicoli, Michael Petrou, Flavia Badoud, Jiri Dvorak, Martial Saugy, Norbert Baume. (2013) Quantification of clenbuterol at trace level in human urine by ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 1292:142-150.
15. Ana Vulic, Ksenija Durgo, Jelka Pleadin, Luka Herceg, Nevenka Kopjar. (2015) Mutagenicity and DNA-damaging potential of clenbuterol ans its metabolite 4-amino-3, 5-dichlorobenzoic acid in vitro. *Food and Chemical Toxicology*. 77: 82-92.
16. Luca Amendola, Cristiana Colamonici, Francesca Rossi, Francesco Botre. (2002) Determination of clenbuterol in human urine by GC-MS-MS-MS: confirmation analysis in antidoping control. *Journal of Chromatography B*, 773:7-16.
17. Mersmann, H.J. (1989) Influence of infused β -adrenergic agonists on porcine blood metabolites and catecholamines. *Journal of Animal Science*. 67: 2633-2645.
18. M. Machnik, H. Horning, A. Breidbach, P. Delahaut, W. Schanzer. (1999) Long-term detection of clenbuterol in human scalp hair by gas chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 723: 147-155.
19. J. Buyse, E. Decuypere, G.L. Huyghebaert, M. Herremans, *Poultry Science* 1990; 70: 993-1002.
20. L.O. Fiems, B.G. Cottyn, C.V. Boucque. *Animal Biotechnology and the Quality of meat Production*. Elsevier, Oxford, 1991,31-48.
21. Juan C. Domínguez-Romero, Juan F. García-Reyes, Rubén Martínez–Romero, Esther Martínez-Lara, María L. Del Moral-Leal, Antonio Molina-Díaz. (2013) Detection of main urinary metabolites of β_2 -agonists clenbuterol, salbutamol and terbutaline by liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 923-924:128-135.



22. Diario Oficial de la Federación. Acuerdo por el que se da a conocer el listado de sustancias o productos prohibidos para uso o consumo en animales destinados al abasto. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5531469&fecha=13/07/2018. Fecha de Consulta 01 junio del 2020.
23. Ricks, C, A. Dalrymple, R. Baker, P, K. Ingle, D. Use of a β -Agonist to alter fat and muscle deposition in stters. *Journal of Animal Science*. 1984 59:1247-1255.
24. Fan Feng, Jianwu, Peng Qin, Tao Han, Dayun Zhan. (2017) A novel quartz crystal microbalance sensor array based on molecular imprinted polymers for simultaneous detection of clenbuterol and its metabolites. *Talanta*, 167, 94-102.
25. Yong-Ge Yang, Li-Xue Song, Nan Jiang, Xue-Ting Xu, Xiao-Hui Di, Mei Zhang. (2015) Pharmacokinetics of ambroxol and clenbuterol tablets in healthy Chinese volunteers. *Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 8(10):18744-18750.
26. D. Nagavalli, G. Abirami, S. Kranthi. (2011) Validated HPLC method for the simultaneous estimation of gemifloxacin mestylate and ambroxol hydrochloride in bulk and tablet dosage form. *Journal of Pharmacy Research*. 4(6):1701-1703.
27. Gianfranco Brambilla, Simone di Bez, Donatella Pietraforte, Maurizio Minetti, Luigi Campanella, Alberto Loizzo. (2007) Ex vivo formation of gastric metabolites of clenbuterol: Preliminary characterisation of their chemical structure. *Analytica Chimical*. 586:426–431.
28. Philippe A. Guy, Marie-Claude Savoy, Richard H. Stadler. (1999) Quantitative analysis of clenbuterol in meat product using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 736:209-219.
29. S. Guddat, G. Fußh ller, H. Geyer, A. Thomas, H. Braun, N. Haenelt, A. Schwenke, C. Klose, M. Thevis and W. Sch nzer. (2012) Clenbuterol – regional food contamination a possible source for inadvertent doping in sports. *Drug Test. Analysis*. 4:534–538.
30. Benjamín Velasco-Bejarano, Jahir Bautista, Martha E Rodríguez, Raquel López-Arellano, Roberto Arregu n-Espinosa, Ricardo Velasco Carrillo. (2020) Quantification and Stereochemical Composition of R- (–) and S- (+)-Clenbuterol Enantiomers in Bovine Urine by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*. 44:237–244.



31. https://www.wadaama.org/sites/default/files/wada_2020_spanish_prohibited_list.pdf
f. Consultada 01 Junio del 2020
32. B.K. Sharma Chromatography. (2007) Department of Chemistry. Editor Krishna Prakashan Media Fifth Edition pp. 9-11.
33. Lloyd R. Snyder. Joseph J. Kirkland. John W. Dolan. (2010) Introduction to Modern Liquid Chromatography. Published by John Wiley & Sons, Inc., Hobken, New Jersey. Third Edition pp. 25-34.
34. Daniel C. Harris. Análisis Químico Cuantitativo. (2007) Tercera Edición (Sexta edición original) Barcelona: Reverte pp.609.
35. Mu. Naushard. Mohammed Rizwan Khan. Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry. Evaluation and Applications in Food Analysis pp.10-11.
36. Miriam Barquero Quirós. (2004) Mecanismos y aplicaciones de la cromatografía de líquida de alto desempeño. Editorial Universidad de Costa Rica pp. 33-35.
37. David Freifelder. (2003) Técnicas de bioquímica y biología molecular. Editorial Reverte S.A. pp 183-184.
38. Harold F. Walton. Jorge Reyes. (2005) Análisis químico e instrumental moderno. Editorial Reverte S.A. pp. 323-325.
39. Jeremy M. Berg. John L. Tymoczko. Lubert Stryer. (2007) Bioquímica. Sexta edición, Editorial Reverte S.A. pp. 69-70.
40. M. Valcárcel Cases, A. Gómez Hens. (1988) Técnicas analíticas de separación. Editorial Reverte S.A. pp. 573.
41. Werner Müller-Esterl. (2008) Bioquímica, Fundamentos para medicina y ciencias de la vida. Editorial Reverte S.A. pp.107-108.
42. Ana Luisa Anaya, Francisco Espinosa-García, Rocío Cruz-Ortega. (2001) Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación. Editorial plaza y Valdés, S.A. de C.V. pp.186.
43. Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler. (2001) Fundamentos de química analítica, Editorial Reverte S.A. 4 edición. pp. 709-711.



44. Andrea Heras Salguero. **(2009)** Separación de micotoxinas mediante cromatografía de líquidos de ultrapresión acoplada a espectrometría de masas en tándem. Estudios (Edición Electrónica) Núm. en colección: 54 pp.13.
45. Monika Waksmundzka-Hajnos, Joseph Sherma. **(2010)** High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis. pp. 498.
46. Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler. **(2001)** Fundamentos de química analítica, Editorial Reverte S.A. 4 edición. pp.670-673.
47. Guía de selección de columnas Agilent J&W para GC <https://www.agilent.com/cs/library/selectionguide/Public/5990-5488ES.pdf> U. Fecha de Consulta 01 junio del 2020.
48. Alicia Lamarque. **(2008)** Fundamentos teórico-prácticos de química orgánica. Grupo editor Pag.55-57.
49. Pilar Roca, Jordi Oliver, Ana María Rodríguez. **(2003)** Bioquímica: técnicas y métodos. Editorial elite pp. 115-119.
50. M. en C. Edgar Ernesto Esquivel Soto, Q.F.B. Lidia Irene Leal Guadarrama. **(2004)** cromatografía de fase reversa. Trabajo de investigación.pp. 11-12.
51. Q.F.B Cynthia Fernández- Laínez, Dra. Marcela Vela-Amieva, M. en C. Isabel Ibarra-González. **(2009)** Espectrometría de masas en tándem: una nueva herramienta para el estudio de la metabolómica en pediatría. *Acta Pediatría México* 30(5):258-263.
52. Christopher G. Herbert. Robert A.W. Johnstone. **(2003)** Mass Spectrometry Basics. CRC Press.pp.1-5.
53. Nan Lin, Xiao-Yan Chen, Bo Song, Da-Fang Zhong. **(2007)** Determination of ambroxol and clenbuterol in human plasma by LC-MS/MS method. *Chinese Academy of Sciences.* 42:308-313.

❖ ANEXOS.

- ANEXO 1. HOJA DE CÁLCULO PARA DETERMINAR LINEALIDAD, PRECISIÓN, EXACTITUD, LD Y LC Y PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN PARA CLEMBUTEROL

VALIDACIÓN DE MÉTODO ANALÍTICO			
DETERMINACIÓN	Clembuterol y ambroxol en orina Humana	CÓDIGO DETERMINACIÓN	Va-1 2018
TÉCNICA ANALÍTICA	LC/MS/MS	CÓDIGO PNT	LNA-MC019E04
ANÁLITO	Clembuterol		
ISTD	Clembuterol d9		

ENSAYO 1 SELECTIVIDAD, CONTAMINACIÓN ENTRE MUESTRAS (arrastre), VALORES ABERRANTES S, HOMO/HETEROSCEDASTICIDAD, LINEALIDAD

MUESTRAS DE CALIBRACIÓN						
ID.	CONC.	TIEMPO		ÁREAS		RATIO
		INYECCIÓN	MS	ISTD	ANÁLITO	
M01	0	21:48:00	102	6399	0	
M02	0	22:44:53	159	7032	0	
MB1	0	20:05:41	0	0	0	
MB2	0	22:39:12	154	0	0	
M11	2.0	20:17:01	11	10777	3513	0.3259
M12	2.0	21:30:57	35	11127	3573	0.3211
M13	2.0	22:22:08	136	11097	3746	0.3376
M14	2.0	23:01:57	176	10885	3661	0.3363
M21	5.0	20:22:42	17	11058	8418	0.7612
M22	5.0	21:02:30	57	10817	8361	0.7730
M23	5.0	22:27:49	142	11332	8416	0.7427
M24	5.0	23:30:25	205	11438	8617	0.7534
M31	100	20:34:03	28	10870	16477	1.6959
M32	100	21:42:19	97	11184	18864	1.6867
M33	100	22:10:46	125	11028	18692	1.6949
M34	100	23:24:43	199	10403	17560	1.6879
M41	200	20:39:44	34	11730	36768	3.1345
M42	200	21:19:33	74	12097	36738	3.0369
M43	200	22:33:29	148	11734	37014	3.1544
M44	200	22:30:33	165	11680	37174	3.1828
M51	500	20:51:08	45	11152	84969	7.6190
M52	500	21:13:53	68	10825	85330	7.8824
M53	500	21:39:24	114	10869	85000	7.8207
M54	500	23:13:21	188	11384	84870	7.4553
				9871.6	MEDIA	
				3.7	CV%	

VALORES ABERRANTES		
RATIO	Test de Dixon	
	Q_u	Q_l
0.3211		
0.3259		
0.3363	0.079	0.294
0.3376		
0.7427		
0.7534	0.389	0.353
0.7612		
0.7730		
1.6867		
1.6879		
1.6949	0.377	0.091
1.6999		
3.0369		
3.1345	0.195	0.669
3.1544		
3.1828		
7.4553		
7.6190	0.145	0.383
7.8207		
7.8824		

CRITERIOS DE EVALUACIÓN:
 Q_u o $Q_l > 0.765$ - valor aberrante

HOMO/HETEROSCEDASTICIDAD																					
TEST DE LEVENE	TEST F																				
<p>Analizar</p> <p>Comparar medias</p> <p>ANOVA de un factor...</p> <p>Variable dependiente: respuesta (ratio)</p> <p>Factor: nivel de concentración (1,...,5)</p> <p>tabla de ANOVA</p> <table border="1"> <thead> <tr><th></th><th>p</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>Inter-grupos</td><td></td></tr> </tbody> </table> <p>CRITERIOS DE EVALUACIÓN: $p < 0.05$ - procedimiento heteroscedástico. La recta se calcula por el método de mínimos cuadrados ponderados por la inversa de la concentración.</p> <p>$p > 0.05$ - procedimiento homoscedástico. La recta se calcula por el método de mínimos cuadrados no ponderados.</p>		p	Inter-grupos		<table border="1"> <thead> <tr><th></th><th>S^2</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>M1</td><td>6.438E-05</td></tr> <tr><td>M2</td><td>1.638E-04</td></tr> <tr><td>M3</td><td>3.839E-05</td></tr> <tr><td>M4</td><td>4.010E-03</td></tr> <tr><td>M5</td><td>3.805E-02</td></tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr><th>F_{calc}</th><th>991.13</th></tr> </thead> <tbody> <tr><th>F_{tab} 0.05</th><th>9.277</th></tr> </tbody> </table> <p>CRITERIOS DE EVALUACIÓN: $F_{calc} > F_{tab}$ - procedimiento hetero</p>		S^2	M1	6.438E-05	M2	1.638E-04	M3	3.839E-05	M4	4.010E-03	M5	3.805E-02	F _{calc}	991.13	F _{tab} 0.05	9.277
	p																				
Inter-grupos																					
	S^2																				
M1	6.438E-05																				
M2	1.638E-04																				
M3	3.839E-05																				
M4	4.010E-03																				
M5	3.805E-02																				
F _{calc}	991.13																				
F _{tab} 0.05	9.277																				

DAD, IDONEIDAD DE LA PRECISIÓN, IDONEIDAD DE LA EXACTITUD, LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN ESTIMADOS, RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

LINEALIDAD

REGRESIÓN LINEAL

Homocedasticidad - mínimos cuadrados no ponderados
 Analizar
 Regresión
 Lineal
 Heterocedasticidad - mínimos cuadrados ponderados por la inversa de la concentración.
 Analizar
 Regresión
 Estimación ponderada
 Variable dependiente: respuesta (ratio)
 Variable independiente: concentración
 Variable de ponderación: concentración
 Rango de potencias: 1 hasta 1 por 0

Variable	Valor	Err. st.	Sig T
Ordenada en el origen	-0.01480	0.018500	
Pendiente	0.01690	0.000200	
r^2	0.99660		

LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN ESTIMADOS

LD_{est} 1.57

LC_{est} 4.75

CRITERIOS DE EVALUACIÓN:

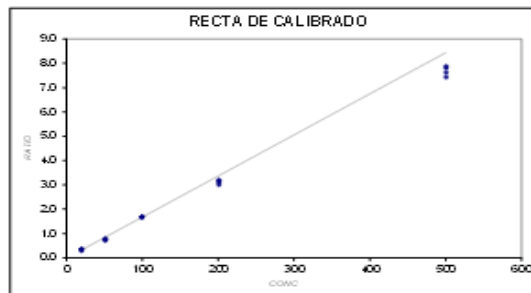
LD_{est} y $LC_{est} < LOI$

TEST F DE FALTA DE AJUSTE

F _{calc}	13773.08
F _{tab}	(k-2=3, n-k=15) 3.287

CRITERIOS DE EVALUACIÓN:

$r^2 > 0.990$
 $F_{calc} < F_{tab}$ } modelo lineal



SELECTIVIDAD

analito

Y_{lim-an}	Y_{lim}	$int\%_{an}$
0	3622.99	0.0

patrón interno

Y_{lim-an}	Y_{lim}	$int\%_{is}$
0	1117.4	0.0

CRITERIOS DE EVALUACIÓN:

$int\%_{an} < 10\%$
 $int\%_{is} < 1\%$

ARRASTRE

analito

Y_{lim-an}	Y_{lim-an}	$AR\%_{an}$
0	8496.9	0.0

Y_{lim-an}	Y_{lim-an}	$CR\%_{an}$
0	3623	0.0

patrón interno

Y_{lim-is}	Y_{lim-is}	$AR\%_{is}$
0	1115.2	0.0

CRITERIOS DE EVALUACIÓN:

$AR\%_{an} < 1\%$ $CR\%_{an} < 10\%$
 $AR\%_{is} < 1\%$

ÓN, ESTABILIDAD I, CONTAMINAC

Estimaciones

RATIO	CONC.
0.3232	20.16
0.3232	19.87
0.3232	20.85
0.3232	20.77
0.8302	45.92
0.8302	46.62
0.8302	44.82
0.8302	45.45
1.6752	101.46
1.6752	100.68
1.6752	101.17
1.6752	100.75
3.3652	186.35
3.3652	180.58
3.3652	187.53
3.3652	189.21
8.4352	451.70
8.4352	467.29
8.4352	463.64
8.4352	442.02

IDONEIDAD DE LA PRECISIÓ

$X_{i\text{est}}$	$S_{i\text{est}}$	RSD%
20.42	0.4748	2.3
45.70	0.7572	1.7
101.02	0.3666	0.4
185.91	3.7470	2.0
456.16	11.5429	2.5

CRITERIOS DE EVALUACIÓN:
 RSD% < 15% (para niveles de conc 2 a 5).
 RSD% < 20% (para nivel de conc 1).

IDONEIDAD DE LA EXACTITUD

ERR%
0.8
-0.6
4.3
3.9
-8.2
-6.8
-10.4
-9.1
1.5
0.7
1.2
0.8
-6.8
-9.7
-6.2
-5.4
-9.7
-6.5
-7.3
-11.6

CRITERIOS DE EVALUACIÓN:
 ERR% < 15% (para niveles de conc 2 a 5).
 ERR% < 20% (para nivel de conc 1).

ESTABILIDAD INTRA-EN SAYO

ANÁLISIS DE LA VARIANZA

Análisis
 Modelo lineal general
 Univariable
 Variable dependiente: respuesta (área, altura...)
 Factor: nivel de concentración (1-5)
 Covariable: tiempo

análisis

tabla de A NOVA

	F	sig
Covariable (tiempo)	1.22	9.28
Factor (nivel de conc.)		

CRITERIOS DE EVALUACIÓN:

No debe haber correlación significativa (p<0.05) entre la respuesta y:
 - el tiempo (Independencia del resultado y el tiempo)

patrón interno

tabla de A NOVA

	F	sig
Covariable (tiempo)	0.13	3.49
Factor (nivel de conc.)		

CRITERIOS DE EVALUACIÓN:

No debe haber correlación significativa (p<0.05) entre la respuesta y:
 - el tiempo (Independencia del resultado y el tiempo)
 - el nivel de concentración (ausencia de influencia mutua)

UNIDADES: pg/mL

FECHA: 19/12/2018

MUESTRAS DE CALIBRACIÓN SIN EXTRACCIÓN						
ID.	CONC.	TIEMPO		ÁREAS		RATIO
		hh:mm:ss	min	ISTD	ANALITO	
881	0	19:59:33	0	0	0	
882	0	22:39:12	160	0	0	
811	20	20:11:21	12	124.44	336.7	0.27
812	20	21:25:16	86	116.09	353.7	0.30
813	20	22:16:28	137	117.61	338.4	0.29
814	20	22:56:16	177	118.61	364.0	0.31
831	100	20:28:22	29	110.21	1853.0	1.68
832	100	21:36:28	97	105.75	1855.5	1.75
833	100	22:05:04	126	106.74	1854.2	1.74
834	100	23:19:02	199	108.63	1816.0	1.67
861	500	20:45:26	46	122.60	8662.4	7.07
862	500	21:08:11	69	122.00	8735.9	7.16
863	500	21:53:42	114	118.82	8854.0	7.45
864	500	23:07:37	188	121.78	8859.4	7.27
				995.2	MEDIA	
				5.7	QA%	

VALORES ABERRANTES

RATIO	Test de Dixon	
	Q _u	Q _l
0.2706		
0.3046	0.529	0.938
0.2877		
0.3069		
1.6814		
1.7546	6.704	-7.507
1.7371		
1.6717		
7.0657		
7.1604	-0.845	0.453
7.4515		
7.2749		

CRITERIOS DE EVALUACIÓN:

Q_u o Q_l > 0.765 - valor aberrante

RECUPERACIÓN

analito			patrón interno	
	R _i (%)	R _i	R _{is} (%)	96.2
R ₁₁	100.9			
R ₁₂	102.6	104.1		
R ₁₃	107.6			
R ₁₄	105.1			
R ₁₄	100.2			
R ₃₁	102.3	99.7		
R ₃₂	101.3			
R ₃₃	95.2			
R ₃₄	96.8			
R ₅₁	97.2	96.9		
R ₅₂	96.8			
R ₅₃	96.7			
R ₅₄	96.7			
MEDIA		100.2		
D.E.		3.6		
CV (%)		3.6		

REGRESIÓN LINEAL

Análisis
Regresión
Lineal

Variable dependiente: R_i
Variable independiente: Concentración

analito			
Variable	Valor	Err. st.	Sig T
Ordenada en el origen	0.13	0.064	
Pendiente	0.095	0.001	
r ²	0.996		

CRITERIOS DE EVALUACIÓN:

recomendable R_{is} (o R_{is}) > 70%

pendiente no significativa para p = 0.05 (p > 0.05)

• ANEXO 2. HOJA DE CÁLCULO PARA DETERMINAR LINEALIDAD, PRECISIÓN, EXACTITUD, LD Y LC Y PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN PARA AMBROXOL.

VALIDACIÓN DE MÉTODO ANALÍTICO

DETERMINACIÓN	Clenbuterol y ambroxol en orina Humana	CÓDIGO DETERMINACIÓN	Val-I-2016
TECNICA ANALITICA	LC/MS/MS	CÓDIGO PNT	LNA-MCO19E04
ANALITO	Ambroxol		
ISTD	Brombuterol		

ENSAYO 1 SELECTIVIDAD, CONTAMINACIÓN ENTRE MUESTRAS (arrastre), VALORES ABERRANTES, HOMO/HETEROSCEDASTICIDAD, LINEALIDAD, IDONE

MUESTRAS DE CALIBRACIÓN						
ID.	CONC.	TIEMPO		ÁREAS		RATIO
		hh:mm:ss	min	ISTD	ANALITO	
M01	0	21:48:00	102	108349	3110	0.0287
M02	0	22:44:53	159	116078	1524	0.0131
M01	0	20:05:41	0	0	1152	#[DIV]0!
M02	0	22:39:12	154	0	7136	#[DIV]0!
M11	3.0	20:17:01	11	144392	197919	1.37
M12	3.0	21:30:57	86	145905	195208	1.34
M13	3.0	22:22:06	136	148701	205571	1.38
M14	3.0	23:01:57	176	144922	199215	1.37
M21	7.5	20:22:44	17	195351	458184	2.35
M22	7.5	21:02:30	57	196804	450367	2.29
M23	7.5	22:27:49	142	196536	473374	2.41
M24	7.5	23:30:25	205	197617	472117	2.39
M31	15	20:34:03	26	197604	803196	4.06
M32	15	21:42:19	97	202103	824508	4.08
M33	15	22:10:46	125	197318	802030	4.06
M34	15	23:24:43	199	196290	799651	4.07
M41	30	20:39:44	34	191063	1479633	7.74
M42	30	21:19:33	74	193443	1479789	7.65
M43	30	22:33:29	148	194428	1473508	7.58
M44	30	22:50:33	186	193480	1473197	7.61
M51	75	20:51:08	46	180674	3097009	17.14
M52	75	21:13:53	68	182171	3123569	17.15
M53	75	21:59:24	114	177836	3068424	17.25
M54	75	23:13:21	188	178656	3079366	17.24
				182766.2	Media	
				11.0	CV%	

VALORES ABERRANTES

RATIO	Test de Dixon	
	Q _u	Q _d
1.34		
1.37	0.175	0.737
1.37		
1.38		
2.29		
2.35	0.163	0.472
2.39		
2.41		
4.06		
4.06	0.389	0.001
4.07		
4.06		
7.58		
7.61	0.571	0.215
7.65		
7.74		
17.14		
17.15	0.159	0.044
17.24		
17.25		

CRITERIOS DE EVALUACIÓN:
Q_u o Q_d > 0.765 - val aberrante

HOMO/HETEROSCEDASTICIDAD

TEST DE LEVENE

Análisis
Compara medias
ANOVA de un factor...
Variable dependiente: respuesta (n.º)
Factor: nivel de concentración (1...5)

Tabla de ANOVA	
	p
Inter-grupos	

CRITERIOS DE EVALUACIÓN:
p < 0.05 - procedimiento heteroscedástico.
La recta se calcula por el método de mínimos cuadrados ponderados por la inversa de la concentración.
p > 0.05 - procedimiento homoscedástico.
La recta se calcula por el método de mínimos cuadrados no ponderados.

TEST F

	s ²
M1	3.851E-04
M2	2.845E-03
M3	5.418E-05
M4	5.067E-03
M5	3.484E-03

F _{calc}	93.51
F _{tab} 0.05	9.277

CRITERIOS DE EVALUACIÓN:
F_{calc} > F_{tab} - procedimiento heteroscedástico

IDAD DE LA PRECISIÓN, IDONEIDAD DE LA EXACTITUD, LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN ESTIMADOS, RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN, E I

LINEALIDAD

REGRESIÓN LINEAL

Homocedasticidad - mínimos cuadrados no ponderados

Análisis

Regresión

Lineal

Heterocedasticidad - mínimos cuadrados ponderados por la inversa de la concentración.

Análisis

Regresión

Estimación ponderada

Variable dependiente: respuesta (ratio)

Variable independiente: concentración

Variable de ponderación: concentración

Rango de potencia: 1 hasta 1 por 0

Variable	Valor	Err. st	sig T
Ordenada en el origen	0.74810	0.001100	
Pendiente	0.22110	0.017900	
r ²	0.99960		

LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN ESTIMADOS

LD_{est} 0.29

LC_{est} 0.89

CRITERIOS DE EVALUACIÓN:

LD_{est} y LC_{est} < LOD

TEST F DE FALTA DE AJUSTE

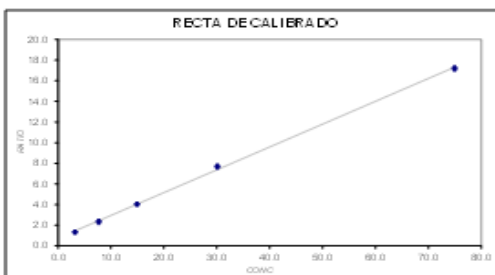
F _{calc}	87463.82
F _{tab} 99%	(k-2=3, n-k=15) 3.28

CRITERIOS DE EVALUACIÓN:

r² > 0.990

F_{calc} < F_{tab}

modo lineal



SELECTIVIDAD

análisis

Y _{iso an}	Y _{iso is}	Int% _{iso}
1152	199478.19	0.8

patrón interno

Y _{iso is}	Y _{iso is}	Int% _{iso}
0	182786	0.0

CRITERIOS DE EVALUACIÓN:

Int%_{iso} < 10%

Int%_{iso} < 1%

ARRASTRE

análisis

Y _{iso an}	Y _{iso an}	ARR% _{iso}
7136	3097009	0.2

Y _{iso an}	Y _{iso an}	CR% _{iso}
7136	199478	3.8

patrón interno

Y _{iso is}	Y _{iso is}	ARR% _{iso}
0	180674	0.0

CRITERIOS DE EVALUACIÓN:

ARR%_{iso} < 1%

CR%_{iso} < 10%

ARR%_{iso} < 1%

UNIDADES: ng/mL

FECHA: 19/12/2018

MUESTRAS DE CALIBRACIÓN SIN EXTRACCIÓN						
ID.	CONC.	TIEMPO		AREAS		RATIO
		hh:mm:ss	min	ISTD	ANALITO	
s01	0.00	19:59:33	0	0	641	#jDIVI01
s02	0.00	22:39:12	160	0	3104	#jDIVI01
s11	3.0	20:11:21	12	205168	194941	0.95
s12	3.0	21:25:16	86	201199	199438	0.99
s13	3.0	22:16:28	137	199298	191620	0.96
s14	3.0	22:36:16	177	201908	196048	0.97
s21	15.0	20:28:22	29	185447	800067	4.31
s22	15.0	21:36:38	97	186695	807179	4.32
s23	15.0	22:05:04	126	183628	802322	4.37
s24	15.0	23:19:02	199	186450	807742	4.33
s31	7.5	20:45:26	46	182132	3087835	16.95
s32	7.5	21:08:11	89	181124	3099252	17.11
s33	7.5	21:53:42	114	183987	3048098	16.57
s34	7.5	23:07:37	188	182458	3088020	16.92
				16282.1	MEDIA	
				4.8	CV%	

VALORES A BERRANTES

RATIO	Test de Dixon	
	Q _u	Q _l
0.9502	0.493	0.275
0.9615		
0.9710		
0.9912		
4.3143	0.673	0.168
4.3235		
4.3322		
4.3693		
16.5669	0.289	0.657
16.9246		
16.9538		
17.1112		

CRITERIOS DE EVALUACIÓN:

Q_u o Q_l > 0.765 -valor aberrante

RECUPERACIÓN

analito			patrón interno	
	R _i (%)	R	R _{is} (%)	96.2
R ₁₁	101.2			
R ₁₂	99.8	102.0		
R ₁₃	105.1			
R ₁₄	101.9			
R ₁₅	99.9			
R ₂₁	102.5	100.4		
R ₂₂	99.7			
R ₂₃	99.4			
R ₂₄	100.5			
R ₂₅	101.4	100.4		
R ₃₁	99.6			
R ₃₂	100.5			
R ₃₃	100.9			
R ₃₄	100.0			
MEDIA		100.9		
D.E		1.0		
CV(%)		0.9		

REGRESIÓN LINEAL

Análisis
Regresión
Lineal

Variable dependiente: R_i
Variable independiente: Concentración

Variable	Valor	Err. st.	Sig T
Ordenada en el origen	1.20	0.104	
Pendiente	0.210	0.002	
r*	0.999		

CRITERIOS DE EVALUACIÓN:

recomendable R_u (o R_u) > 70%

pendiente no significativa para p = 0.05 (p < 0.05)

STABILIDAD I, CONTAMINAC

Estimaciones

RATIO	CONC.
1.4114	2.82
1.4114	2.67
1.4114	2.87
1.4114	2.83
2.4064	7.22
2.4064	6.97
2.4064	7.51
2.4064	7.42
4.0646	15.00
4.0646	15.07
4.0646	15.00
4.0646	15.04
7.3811	31.64
7.3811	31.21
7.3811	30.89
7.3811	31.05
17.3306	74.14
17.3306	74.17
17.3306	74.65
17.3306	74.57

IDONEIDAD DE LA PRECISIÓN

$x_{i,med}$	$s_{i,med}$	RSD%
2.80	0.0868	3.2
7.28	0.2412	3.3
15.03	0.0333	0.2
31.20	0.3219	1.0
74.38	0.2670	0.4

CRITERIOS DE EVALUACIÓN:
 RSD% < 15% (para niveles de conc 2 a 5).
 RSD% < 20% (para nivel de conc 1).

IDONEIDAD DE LA EXACTITUD

ERR%
-6.1
-11.1
-4.4
-5.5
-3.7
-7.1
0.1
-1.0
0.0
0.5
0.0
0.3
5.5
4.0
3.0
3.5
-1.1
-1.1
-0.5
-0.6

CRITERIOS DE EVALUACIÓN:
 ERR% < 15% (para niveles de conc 2 a 5).
 ERR% < 20% (para nivel de conc 1).

ESTABILIDAD INTRA-ENSAYO

ANÁLISIS DE LA VARIANZA

Analizar:
 Modelo: lineal general
 Un variante
 Variable dependiente: respuesta (área, altura...)
 Factor: nivel de concentración (1-5)
 Covariable: tiempo

análisis

tabla de ANOVA	F	Sig.
Covariable (tiempo)	0.52	3.49
Factor (nivel de conc.)		

CRITERIOS DE EVALUACIÓN:
 No debe haber correlación significativa ($p < 0.05$) entre la respuesta y:
 - el tiempo (independencia del resultado y el tiempo)

patrón interno

tabla de ANOVA	F	Sig.
Covariable (tiempo)	0.13	3.49
Factor (nivel de conc.)		

CRITERIOS DE EVALUACIÓN:
 No debe haber correlación significativa ($p < 0.05$) entre la respuesta y:
 - el tiempo (independencia del resultado y el tiempo)
 - el nivel de concentración (ausencia de influencia mutua)