



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

---

**TESIS**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA  
LA CUANTIFICACIÓN DE TRES FÁRMACOS  
ANTIHIPERGLUCÉMICOS: METFORMINA, VILDAGLIPTINA Y  
GLIMEPIRIDA, EN PLASMA HUMANO POR HPLC-MS/MS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**ARTURO RUELAS DURÁN**



**CDMX**

**AÑO 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: LAURO MISAEL DEL RIVERO RAMIREZ

**VOCAL:** Profesor: JUAN MANUEL RODRIGUEZ

**SECRETARIO:** Profesor: LUIS JESÚS GARCÍA AGUIRRE

**1° SUPLENTE:** Profesor: MARCELA MIRELLE MARÍN AGUILAR

**2° SUPLENTE:** Profesor: TANIA ROJO PORTILLO

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**INVESTIGACIÓN FARMACOLÓGICA Y BIOFARMACÉUTICA, S.A.P.I DE C.V.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**M. en F. Luis Jesús García Aguirre**

**SUSTENTANTE:**

**Arturo Ruelas Durán**

# Contenido

Introducción .....	5
Objetivos .....	7
Abreviaturas .....	8
Generalidades.....	13
Diabetes Mellitus .....	13
Metformina.....	15
Vildagliptina .....	16
Glimepirida .....	17
Matriz biológica.....	18
Métodos de extracción.....	20
Cromatografía de líquidos.....	21
Espectrometría de masas .....	27
Validación bioanalítica .....	33
Materiales y métodos .....	38
Materiales .....	38
Instrumentos y equipos .....	39
Metodología .....	46
Resultados y discusiones.....	56
Desarrollo .....	56

Elección de las condiciones espectrométricas.....	56
Elección del método de extracción y de las condiciones iniciales de trabajo .	59
Elección de los valores LIC y LSC.....	63
Elección de las condiciones cromatográficas.....	64
Validación .....	70
Adecuabilidad.....	70
Efecto matriz .....	71
Curva de calibración, linealidad y modelo matemático .....	71
Precisión y exactitud.....	72
Estabilidad.....	72
Acarreo o arrastre.....	74
Reproducibilidad de la reinyección .....	74
Resumen de la validación.....	74
Conclusiones .....	77
Referencias.....	78
ANEXOS .....	87

## Introducción

La Diabetes Mellitus (DM) es un conjunto de trastornos metabólicos traducidos en una enfermedad crónica caracterizada por el ineficiente aprovechamiento de la glucosa, incrementando su concentración a un grado tal que genera daños a corto y largo plazo en el organismo<sup>1</sup>. Se pueden destacar dos tipos de DM: la insulino dependiente (DM1) y la insulino resistente (DM2). Según la OCDE, en México la prevalencia de DM solo en adultos es del 13.5% de la población, la más alta entre los países valorados<sup>2</sup> y la segunda causa de muerte en nuestro país<sup>3</sup>. La obesidad y la mala alimentación facilitan su aparición<sup>4</sup>

Entre los medicamentos más utilizados para controlar la DM2 se encuentran metformina (MTF), vildagliptina (VLD) y glimepirida (GLM). A pesar de que existen medicamento innovador que puede incluir a MTF, VLD o GLM en la misma forma farmacéutica, el precio de algunas de ellas puede convertirse en un verdadero lujo para la población con escasos recursos y la alternativa es la generación de medicamento genérico con precios más accesibles. Sin embargo, para que estos puedan salir a la venta requieren cumplir con la regulación sanitaria, siendo una de ellas la bioequivalencia<sup>5</sup>.

Para ello, se comparan perfiles y parámetros farmacocinéticos entre el medicamento innovador y el de prueba. Para obtenerlos, es necesario un método que permita extraer, separar, detectar y cuantificar los fármacos contenidos para determinar su concentración en una matriz biológica.

---

<sup>1</sup> Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Fauci AS, Longo DL, Loscalzo J (2015) Harrison. Principios de medicina interna Vol. 2 19ª Ed. PP 2422

<sup>2</sup> OECD (2021), Health at a Glance 2021: OECD Indicators, OECD Publishing, París. <https://doi.org/10.1787/ae3016b9-en>. Pag 23

<sup>3</sup> INEGI (2022) Comunicado de prensa Núm. 29/23. Pag 9.

<sup>4</sup> American Diabetes Association (2014). Standards of Medical Care in Diabetes-2014 Vol 37 (S1) Página S16

<sup>5</sup> Diario Oficial de la Federación (2013) Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. PP 11-13 y 15-20

Existen métodos analíticos capaces de realizar la cuantificación de estos tres fármacos de manera individual o con al menos dos de ellos contenidos en plasma humano mediante HPLC-MS/MS, pero no existe todavía alguno que permita cuantificar los tres bajo el mismo método de extracción y en un solo análisis. Esto representa una mayor inversión para la investigación y gastos de operación que pueden reducirse considerablemente.

La presente investigación tendrá como objetivo el desarrollo de un método analítico que permita bajo un solo proceso la extracción, separación por HPLC y cuantificación por MS/MS de MTF, VLD y GLM contenidos en plasma.

## Objetivos

### General

Desarrollar y validar un método analítico que permita bajo un solo proceso la extracción, separación por HPLC y cuantificación por MS/MS de MTF, VLD y GLM contenidos en plasma humano.

### Específicos

Elegir el método de extracción más apropiado probando técnicas de menor a mayor costo o grado de dificultad.

Determinar las condiciones cromatográficas y espectrométricas para la separación, detección y cuantificación de MTF, VLD y GLM en plasma.

Validar la metodología bioanalítica desarrollada conforme a los criterios establecidos por la NOM-177-SSA1-2013

## Abreviaturas

Abreviatura	Significado
$\sum ER\%$	Suma de porcentajes de error relativo
%	Por ciento
%m/v	Por ciento en masa/volumen
%v/v	Porcentaje en volumen
°C	Temperatura en grados Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
AD	Muestra de adecuabilidad
ACN	Acetonitrilo grado cromatográfico
APCI	Ionización Química a Presión Atmosférica
ATP	Trifosfato de adenosina
B	Blanco o muestra cero
BR	Blanco de reactivos
C18	Octadecilsilano
C8	Octilsilano
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CC	Curva de Calibración Rutinaria
CCA	Control Calidad Alto
CCB	Control Calidad Bajo
CCBB	Control Calidad Bajo B
CCD	Control Calidad Diluido
CCM	Control Calidad Medio
CE	Energía de Colisión
CEP	Potencial de entrada a la celda de colisión
CG	Courtain Gas
CID	Disociación inducida por Colisión
Cl <sub>T</sub>	Depuración total
cm	Centímetro

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
CN	Grupo ciano
cps	Cuentas por segundo
CV%	Coeficiente de Variación
CP1	Muestra Punto 1 de la Curva de Calibración
CP2	Muestra Punto 2 de la Curva de Calibración
CP3	Muestra Punto 3 de la Curva de Calibración
CP4	Muestra Punto 4 de la Curva de Calibración
CP5	Muestra Punto 5 de la Curva de Calibración
CP6	Muestra Punto 6 de la Curva de Calibración
CP7	Muestra Punto 7 de la Curva de Calibración
CP8	Muestra Punto 8 de la Curva de Calibración
CP9	Muestra Punto 9 de la Curva de Calibración
CP10	Muestra Punto 10 de la Curva de Calibración
CPs	Muestra Punto Curva de Calibración
CXP	Potencial de salida de la celda de colisión
D%	Porcentaje de desviación
DB	Doble blanco o muestra blanco
D"n"	Deuterado en "n" posiciones
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo I
DM2	Diabetes Mellitus tipo II
DP	Potencial de disgregación
DPP IV	Dipeptidil peptidasa tipo IV
EFS	Extracción en Fase Sólida
EI	Estandar Interno
ELL	Extracción Líquido-Líquido
ER%	Porcentaje de error relativo
EP	Potencial de Entrada
EPP	Extracción por Precipitación de Proteínas
ESI	Ionización por electronebulización
eV	Electrón volt.
Extend	Protección con bidentado de grupos silano.

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
FM	Fase móvil
FMN	Factor Matriz Normalizado
FS	Fase estacionaria
FT-ICR	Resonancia Ciclotrón de Iones Transformada de Fourier
g	Gramo
g/mol	Gramos por mol
GLB	Glibenclamida
GIP	Polipéptido Inhibidor Gástrico
GLM	Glimepirida
GLP-1	Péptido similar al glucagon tipo 1
GS1	Gas Nebulizador
GS2	Gas de secado
h	Hora
H2O	Agua grado cromatográfico
ISP	Potencial de nebulización de iones
K	Coefficiente de reparto
L	Litro
LIC	Límite Inferior de Cuantificación
LogP	Logaritmo del coeficiente de reparto para compuestos no
LSC	Límite Superior de Cuantificación
m	Masa
M	Concentración Molar
MeOH	Metanol grado cromatográfico
MCCs	Muestras Control de Calidad
mg	Miligramo
min	Minuto
mL/min	Mililitros por minuto
mm	Milímetro
mM	Concentración milimolar
MRM	Monitoreo de Reacción Múltiple
ms	Milisegundos
MTF	Metformina

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
MTF*HCL	Clorhidrato de metformina
n	Número de voluntarios/Número
N2	Gas nitrógeno
NaCl	Cloruro de sodio
ng/mL	Nanogramos por mililitro
nm	Nanómetro
Ph	Grupo fenilo
pH	Potencial de Hidrógeno
pKa	Coeficiente de disociación ácida
RP	Fase reversa
RT	Tiempo de retención
s	Segundo
S	Solución
SB	Ligado estable. Protección con diisobutil o diisopropilsilano
SR	Solución reactivo
ST	Solución de trabajo
SRef	Sustancia de referencia
T, TEM	Temperatura
t <sub>1/2</sub>	Tiempo de vida media
tc	Tiempo de Corrida
TFA	Ácido trifluoroacético
TG	Gas Turbo
V	Volt
Vd	Volumen de distribución aparente
Viny	Volumen de inyección
VLD	Vildagliptina
XDB	Ligado extra denso. Doble desactivado con trimetilsilano.
z	Carga

# SECCIÓN TEÓRICA

## Generalidades

### Diabetes Mellitus

#### Definición

Es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por niveles elevados de glucosa en sangre. Con el tiempo conduce a daños graves en el corazón, los vasos sanguíneos, los ojos, los riñones y los nervios<sup>6</sup>.

#### Fundamento

Debido a la deficiente secreción de insulina, la ineficiente internalización de glucosa dentro de las células, su baja degradación e inapropiada síntesis dentro del organismo, eleva las concentraciones de glucosa en sangre. Esto puede deberse a fallos en los mecanismos neurales y/o humorales relacionados con la insulina<sup>7</sup>.

#### Tipos de Diabetes Mellitus

DM1. Se presenta principalmente cuando más del 90% de las células  $\beta$  pancreáticas son destruidas. Ocurre frecuentemente antes de los veinte años<sup>8</sup>.

DM2. Ocurre cuando el organismo pierde sensibilidad a la insulina y se vuelve resistente a ella, provocando una secreción anormal de la misma hasta que las células  $\beta$  pancreáticas se vuelven incapaces de compensar tal resistencia<sup>8</sup>.

En un grado mucho menor, pueden llegar a presentarse otros tipos, sea por defectos genéticos del desarrollo o de la función de las células beta por diversas mutaciones, por defectos genéticos en la acción de la insulina o por alteraciones metabólicas generadas al final del embarazo<sup>9</sup>.

---

<sup>6</sup> Organización Panamericana de la salud (2023). Diabetes. <https://www.paho.org/es/temas/diabetes#:~:text=La%20diabetes%20es%20una%20enfermedad,los%20ri%C3%B1ones%20y%20los%20nervios>.

<sup>7</sup> Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Fauci AS, Longo DL, Loscalzo J (2015) Harrison. Principios de medicina interna Vol. 2 19ª Ed. 2399

<sup>8</sup> Lorenzo-Fernandez P [et al] (2017). Velázquez Farmacología Básica y Clínica 19ª ed. Editorial médica panamericana. 597

<sup>9</sup> American Diabetes Association (2014). Standards of Medical Care in Diabetes-2014. Diabetes Care 37 (S1). S14-S62

## Consecuencias

Los afectados por esta enfermedad pueden presentar poliuria, polifagia, polidipsia, hormigueo en extremidades, letargo y dificultad para cicatrizar heridas, además de facilitar infecciones fúngicas o bacterianas en vías urinarias<sup>10</sup>. Si la enfermedad no es controlada, a largo plazo se pueden presentar complicaciones tales como retinopatía, glaucoma, cataratas, arterioesclerosis, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, neuropatías, nefropatías, pérdida de audición, entre otras<sup>11</sup>.

## Tratamiento y control

Estilo de vida. Alimentación hipocalórica baja en carbohidratos, ejercicio mayor a 90 minutos a la semana y la vigilancia rutinaria de los niveles de glucosa<sup>12</sup>.

Insulina. Promueve la translocación de transportadores GLUT4, que internalizan la glucosa. Se clasifican en hormonas de acción corta o de acción larga. Se usa tanto en pacientes con DM1 como con DM2<sup>13</sup>

Biguanidas. Actúan en el hígado y a nivel de la entrada de glucosa en los tejidos. Disminuyen la producción hepática de glucosa y mejora su uso periférico, reduce la glucosa plasmática y la insulina en ayunas, mejora el perfil lipídico y auxilia en la pérdida de peso<sup>14</sup>.

Sulfonilureas. Estimulan la secreción de insulina a través de la interacción con canales de potasio sensible a ATP de las células beta. Reducen tanto la glucosa en ayunas como la posprandial<sup>15</sup>.

Fármacos que intensifican las señales del receptor para GLP-1. Amplifican la secreción de insulina estimulada por la glucosa. Se clasifican en agonistas del receptor para GLP-1 y en inhibidores de DPP-IV<sup>16</sup>.

---

<sup>10</sup> Instituto Nacional de la Diabetes y las Enfermedades Digestivas y Renales (2023) Síntomas y causas de la diabetes. <https://www.niddk.nih.gov/health-information/informacion-de-la-salud/diabetes/informacion-general/sintomas-causas>

<sup>11</sup> Biblioteca Nacional de Medicina (2023). Complicaciones de la diabetes. <https://medlineplus.gov/spanish/diabetescomplications.html>

<sup>12</sup> Kasper DL [et al] (2015) Harrison. Principios de medicina interna Vol. 2 19ª Ed. 2408, 2409

<sup>13</sup> Rang HP [et al] (2016). Farmacología 8ª ed. Elsevier Masson. 382,387

<sup>14</sup> Duran-Hortola M [et al] (2008). Farmacología para fisioterapeutas. Editorial Médica Panamericana. 159

<sup>15</sup> Flórez J, Almijo JA, Mediavilla A (2014). Farmacología humana 6ª ed. Elsevier Masson. 854

<sup>16</sup> Katzung, BG (2019). Farmacología básica y clínica 14ª ed. McGraw-Hill Education. 174-176

A continuación, se presentará información relacionada a la metformina, la vildagliptina y la glimepirida: tres fármacos comúnmente utilizados para el control de la hiperglucemia en pacientes con este padecimiento.

## Metformina

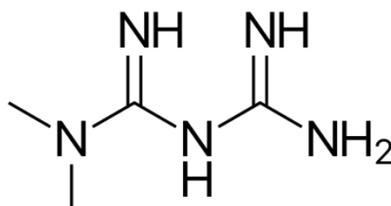


Figura 1. Estructura molecular de metformina.

**Clasificación farmacológica.** Biguanida.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de metformina

Propiedades	Valor	Referencia
Masa molecular (g/mol)	165.62 (Clorhidrato)	USP
Masa monoisotópica (g/mol)	129.10	PubChem
Solubilidad	Fácilmente soluble en agua	FEUM
LogP	-2.6	Chhetri 2014
pKa	12.4	FDA
Descripción	Polvo cristalino blanco	FEUM
Punto de fusión (°C)	222-226	Drugbank

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos de metformina

Parámetro	GLUMETZA® <sup>17</sup>	RIOMET® <sup>18</sup>
Biodisponibilidad (%)	35	-
C <sub>max</sub> (ng/mL)	-	1885.1±498.5
T <sub>max</sub> (h)	7-8	2.5±0.6
Unión a proteínas (%)	Despreciable	-
V <sub>d</sub> (L)	654±358	654±358
Biotransformación	Inalterada	Inalterada
t <sub>1/2</sub> (h)	6.2	6.2
Cl <sub>T</sub> (L/h)	-	-

**Farmacodinamia.** Reduce la producción de glucosa hepática, disminuye su absorción intestinal e incrementa la sensibilidad a la insulina sin que su secreción sea afectada<sup>19</sup>. Inhibe el complejo mitocondrial I generando un aumento tanto en la

<sup>17</sup> Federal Drug Administration (1995). Highlights of prescribing information GLUMETZA®. Pag 9

<sup>18</sup> Federal Drug Administration (1995). Highlights of prescribing information RIOMET®. Pag 9

<sup>19</sup> Rena G, Pearson ER, Sakamoto K (2013). Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? Diabetologia. Sep;56(9):1898-906. doi: 10.1007/s00125-013-2991-0

relación AMP: ATP, lo que activa AMPK e inhibe la fructosa-6-fosfatasa y con ella la gluconeogénesis<sup>20</sup>. La AMPK activada fosforila dos isoformas de la enzima acetil-CoA carboxilasa, disminuyendo así la síntesis de lípidos y provocando su oxidación. Esto reduce las reservas de lípidos hepáticos e incrementa a sensibilidad a la insulina<sup>21</sup>.

## Vildagliptina

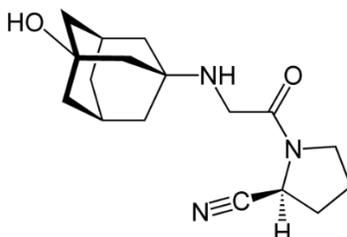


Figura 2. Estructura molecular de vildagliptina

### Clasificación farmacológica. Inhibidor de la DPP IV

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de vildagliptina

Propiedades	Valor	Referencia
Masa molecular (g/mol)	303.4	PubChem
Masa monoisotópica (g/mol)	303.19	PubChem
Solubilidad (mg/mL)	1.75 en agua y 16 en metanol	ALOGPS, Cayman Chem.
LogP	-0.22	ALOGPS
pKa	9.03, 14.71	ChemAxon
Descripción	Polvo cristalino blanco	TGA
Punto de fusión (°C)	148-151	Drugbank

Tabla 4. Parámetros farmacocinéticos de vildagliptina

Parámetro	Galvus <sup>22</sup>	Jalra <sup>23</sup>	Xiliarx <sup>24</sup>
Biodisponibilidad (%)	85	85	85
Cmax (ng/mL)	-	-	-
Tmax (h)	1.7	1.7	1.7
Unión a proteínas (%)	9.3	9.3	9.3
V <sub>d</sub> (L)	71	71	71
Biotransformación	Hidrólisis	Hidrólisis	Hidrólisis
t <sub>1/2</sub> (h)	3	3	3
Cl <sub>T</sub> (L/h)	-	13	13

<sup>20</sup> Rena G, Hardie DG, Pearson ER (2017). The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. Sep;60(9): 1577-1585. doi: 10.1007/s00125-017-4342-z.

<sup>21</sup>Idem.

<sup>22</sup> European Medicines Agency. Summary of Product Characteristics: Galvus (vildagliptin) oral tablets. 12,13

<sup>23</sup> European Medicines Agency. Summary of Product Characteristics: Jalra (vildagliptin) oral tablets. 15,16

<sup>24</sup> European Medicines Agency. Summary of Product Characteristics: Xiliarx (vildagliptin) oral tablets. 13,14

**Farmacodinamia.** Inhibe la actividad de la dipeptidil peptidasa tipo cuatro (DPP-IV), prolongando la vida media de GLP-1 y GIP, aumentando los niveles de hormonas activas de incretina circulante. Cuando esto ocurre, incrementa el cociente insulina/glucagón durante la hiperglucemia, disminuye la liberación hepática de glucosa en la fase postprandrial o en ayunas y se reduce la glucemia<sup>25</sup>.

## Glimepirida

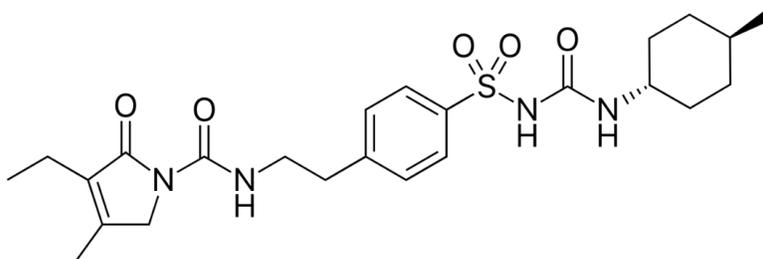


Figura 3. Estructura molecular de glimepirida.

### Clasificación farmacológica: Sulfonilurea

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de glimepirida

Propiedades	Valor <sup>26</sup>
Masa molecular (g/mol)	490.62
Masa monoisotópica (g/mol)	490.22
Solubilidad	Insoluble en agua
LogP	3.5
pKa	6.2±0.1 a 37°C
Descripción	Polvo cristalino blanco.
Punto de fusión (°C)	207

Tabla 6. Parámetros farmacocinéticos de glimepirida

Parámetro	Amaryl <sup>27</sup>	Duetact <sup>28</sup>	Tandemact <sup>29</sup>
Biodisponibilidad (%)	100 <sup>30</sup>	-	100
Cmax (ng/mL)	-	319±95.3	-
Tmax (h)	2-3	1.53±0.81	2.5
Unión a proteínas (%)	99.5	99.5	>99
V <sub>d</sub> (L)	8.8	8.8	8.8

<sup>25</sup> Ahren B (2007): DPP-4 inhibitors. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. Dec;21(4):517-33. doi: 10.1016/j.beem.2007.07.005

<sup>26</sup> National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 3476, Glimepiride, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glimepiride>

<sup>27</sup> Federal Drug Administration (1995). Highlights of prescribing information Amaryl®. 11

<sup>28</sup> Federal Drug Administration (2011). Duetact®. 5,6

<sup>29</sup> European Medicines Agency. Summary of Product Characteristics: Tandemact® oral tablets 15,16

<sup>30</sup> Badian M, Korn A, Lehr KH [et al] (1994). Absolute bioavailability of glimepiride (Amaryl) after oral administration. Drug Metabol Drug Interact. 11(4):331-9

Parámetro	Amaryl <sup>27</sup>	Duetact <sup>28</sup>	Tandemact <sup>29</sup>
<b>Biotransformación</b>	Oxidativa	Oxidativa	Oxidativa
<b>t<sub>1/2</sub> (h)</b>	3-6 <sup>31</sup>	10.88±4.71	5-8
<b>Cl<sub>T</sub> (L/h)</b>	47.8	-	-

**Farmacodinamia.** Reduce la glucosa en sangre al estimular la liberación de insulina de las células  $\beta$  pancreáticas. Se une al receptor de sulfonilureas en la membrana plasmática de las células  $\beta$  del páncreas, causando cierre del canal de potasio sensible al ATP y, con ello, estimulando la liberación de insulina<sup>27</sup>.

Una vez dispuesta la información relacionada a los analitos que nos interesan, debe tomarse en cuenta que estos se encontrarán inmersos en mezclas complejas con características intrínsecas propias, las cuales pueden interferir en su detección. Por ello, abordaremos esta cuestión a continuación.

## Matriz biológica

Se define como un componente o sustancia producida por los seres vivos que contiene un analito de interés y que es preparado en una forma reproducible<sup>32</sup>. La detección y valoración de ese analito puede variar dependiendo de la matriz biológica, aunque se ha observado que factores externos a ella también pueden hacerlo<sup>33</sup>. Entre algunas matrices biológicas, se encuentran las siguientes.

### Sangre total

Es el tejido conectivo líquido, obtenido por vía venosa o vía arterial, que se almacena junto con un agente anticoagulante. Está compuesta de eritrocitos, plaquetas, granulocitos, factores de coagulación y plasma. Dependiendo de donde se obtenga, el color varía de un rojo brillante a un rojo oscuro, con un pH aproximado de 7.4<sup>34</sup>

<sup>31</sup> Sola D, Rossi L, Schianca GP [et al] (2015): Sulfonylureas and their use in clinical practice. Arch Med Sci. 2015 Aug 12;11(4):840-8. doi: 10.5114/aoms.2015.53304.

<sup>32</sup> Diario Oficial de la Federación (2013) Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. 6,41

<sup>33</sup> Mei H, Hsieh Y, Nardo C [et al] (2003). Investigation of matrix effects in bioanalytical high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: application to drug discovery. Rapid Commun. Mass Spectrom (17) 97-103. doi: 10.1002/rcm.876.

<sup>34</sup> Hillyer DC, Shaz BH, Zimring JC, Abshire TC (2009). Transfusion Medicine and Hemostasis: Clinical and Laboratory Aspects. Elsevier. 45

## Plasma

Fracción líquida de la sangre total a la cual se le ha extraído todo componente celular. Es una solución amarillenta constituida principalmente por agua, en la que se encuentran disueltos varios compuestos tales como lípidos, proteínas, vitaminas, hormonas, iones y gases. Representa aproximadamente el 55% del volumen de la sangre total.<sup>35</sup>

## Suero

Similar al plasma sanguíneo, con la diferencia de que se le han retirado los factores de coagulación mediante una coagulación previa y la posterior remoción del coágulo<sup>36</sup>. De utilidad en ensayos en los que el anticoagulante puede hacer interferencia.

## Orina

Es una solución de desecho formada a partir de una ultrafiltración del plasma en los glomérulos de los riñones y está conformada en su mayoría por agua (95%) y solutos, principalmente urea. Es el más fácil y económico de obtener y usar, pero requiere que el analito se encuentre en altas concentraciones para ser analizado<sup>37</sup>.

## Elección de la matriz biológica

La elección de la matriz biológica debe basarse en la probabilidad de encontrar los analitos en la mayor concentración posible, con la menor cantidad de sustancias que puedan interferir en su detección. Si bien las técnicas de separación por sí solas pueden ser capaces de retener aquellos componentes que pueden interferir, en ocasiones podría no ser conveniente si esto resulta en un incremento de la variabilidad en la detección. Es debido a esto que se prefiere llevar a cabo un procesamiento previo de la muestra con la finalidad de extraer los analitos con la menor cantidad de impurezas posible. Esta situación será planteada a continuación.

---

<sup>35</sup> Cediel JF, Cárdenas MH, García A, [et al] (2009). Manual de histología: tejidos fundamentales. Universidad del Rosario. 210-212

<sup>36</sup> Instituto Nacional del Cáncer (2023). Suero. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/suero>

<sup>37</sup> Strasinger SK y Di Lorenzo MS (2010). Análisis de orina y de los fluidos corporales. 5ª edición. Medica Panamericana. 30-32.

## Métodos de extracción

### Extracción por Precipitación de proteínas (EPP)

Modifica las interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y de Van der Waals de las proteínas contenidas en una muestra procesada para volverlas insolubles. Se usan compuestos salinos o disolventes orgánicos. De sencilla aplicación y relativo bajo costo, pero con mayor probabilidad de dejar sustancias que produzcan interferencias.<sup>38</sup>

### Extracción Líquido-Líquido (ELL)

Se basa en el reparto del analito entre la muestra procesada y un disolvente orgánico de baja o nula polaridad. El pH de la muestra es modificado para desplazar el equilibrio hacia la forma no ionizada para incrementar su solubilidad en el disolvente y, con ello, separarlo. Más costoso que la EPP, pero más barato, sencillo y rápido que la EFS. Se pueden obtener extractos con bajas interferencias y buena selectividad. Los disolventes utilizados son volátiles y representan un riesgo a la salud.<sup>39</sup>

### Extracción en Fase Sólida (EFS)

Se hace pasar la muestra que contenga el analito de interés por una columna rellena con agentes adsorbentes que puedan retenerlo mientras se retira el resto de los constituyentes. Tales columnas se seleccionan según las propiedades fisicoquímicas del analito. Da extractos muy selectivos con altos recobros y buena reproducibilidad. Más costoso, tardado y complicado de realizar que la ELL.<sup>40</sup>

### Elección del método de extracción

La elección depende de las propiedades fisicoquímicas del analito, de la selectividad deseada y de la relación costo-beneficio. Cuanto más sencillo sea el desarrollo de la técnica, menos costosa y riesgosa podrá llegar a ser.

---

<sup>38</sup> Prabu SL, Suriyaprakash NK (2012). Extraction of Drug from the Biological Matrix: A Review, Applied Biological Engineering - Principles and Practice, Dr. Ganesh R. Naik. 497-499

<sup>39</sup> Ibid. 487-491

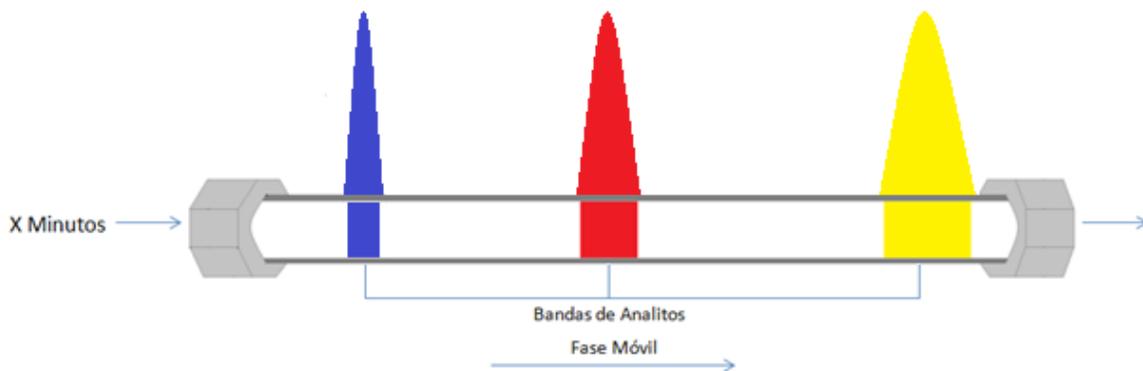
<sup>40</sup> Ibid. 491-497

## Cromatografía de líquidos

Elegida la matriz biológica y la técnica de extracción más apropiada, queda pendiente definir de qué forma se podrán separar las diferentes sustancias extraídas para que posteriormente pueda ser detectado y cuantificado el compuesto de interés. La cromatografía es una de las opciones más viables.

### Definición

Del griego “chrom” color y “graphe” escritura, se traduce como “registro de colores”. Es un método físico de separación basado en la extracción y el reparto de un compuesto contenido en una mezcla, entre un disolvente dinámico llamado fase móvil y un componente estático conocido como fase estacionaria<sup>41</sup>.



**Figura 4. Separación por cromatografía de tres analitos y la distribución gaussiana que cada uno de ellos tendría al pasar por un detector. La edición es propia.**

### Fundamento

Al agregar fase móvil, los solutos se desplazan a lo largo de la fase estacionaria llevándose a cabo múltiples equilibrios de reparto entre ambas fases. Dependiendo de las características fisicoquímicas individuales de los componentes de una mezcla, mostrarán una mayor afinidad por alguna de ellas. Tal afinidad se mide por medio del coeficiente de reparto “K”, definido como

<sup>41</sup> Skoog DA, Holler EJ, Crouch SR (2008). Principios de análisis instrumental 6a edición. Cengage Learning. 762

$$K = \frac{|S|_{movil}}{|S|_{estacionaria}}$$

Donde  $|S|$  es la concentración del soluto<sup>42</sup>. Cuando  $K > 1$ , el soluto es más afín a la fase móvil y se desplazará más rápido y con menor dilución a través de la fase estacionaria. El soluto separado se difunde y se diluye presentando en la mayoría de los casos una distribución gaussiana, de la cual se puede obtener la desviación estándar. Esto se conoce como altura de plato teórico y se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$H = \frac{\sigma^2}{L}$$

Donde  $H$  es la altura de plato teórico,  $\sigma$  es la desviación estándar y  $L$  es la longitud de la fase estacionaria utilizada<sup>43</sup>, y se usa como indicativa de la eficiencia de la separación. Sin embargo, esta ecuación es demasiado simple y no es indicativa de los factores que generan el ensanchamiento de bandas. En 1956 Jan Jozef van Deemter y sus colaboradores, a partir de sus observaciones experimentales<sup>44</sup>, desarrollaron la siguiente ecuación:

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_M}{u} + u\left(\frac{f(k)d_f^2}{D_S} + \frac{f'(k)d_p^2}{D_M}\right)$$

Con la cual se indica que el ensanchamiento de bandas depende de la composición y disposición de la fase estacionaria ( $\gamma$ ,  $\lambda$ ), el diámetro de las partículas del relleno ( $d_p$ ), la capacidad de la fase móvil para difundir ( $D_M$ ), la velocidad lineal impuesta ( $u$ ), la afinidad por la fase estacionaria [ $f(k)$  y  $f'(k)$ ], al revestimiento líquido en la fase estacionaria ( $d_f$ ) y a la difusión en la fase estacionaria  $D_s$ . Por conveniencia, la ecuación se reduce a la siguiente expresión

$$H = A + \frac{B}{u} + u(C_S + C_M)$$

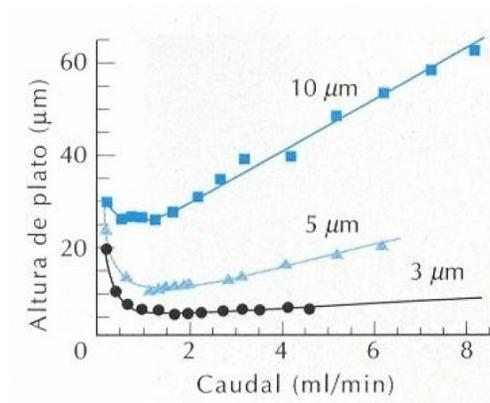
Que relaciona la eficiencia de la separación con las trayectorias múltiples que puede tomar el analito a través de la fase móvil ( $A$ ), la facilidad que tiene la fase móvil para

<sup>42</sup> Skoog DA, Holler EJ, Crouch SR (2008). Principios de análisis instrumental 6a edición. Cengage Learning. 766

<sup>43</sup> Harris DC (2010). Chemical Quantitative Analysis 8ª ed. W. H. Freeman. 551

<sup>44</sup> Van Deemter JJ, Zuiderweg FJ, Klinkenberg A (1956) Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. Chem Engng Sci. 3877

difundir a lo largo de la fase estacionaria (B) y los múltiples repartos entre fases ( $C_s$ ,  $C_M$ ) y la velocidad de elución ( $u$ )<sup>45</sup>.



**Figura 5. Relación entre el tamaño de partícula y la velocidad lineal de flujo con respecto a la altura de plato teórico. Adaptado de Harris DC (2001) Análisis Químico Cuantitativo 2a edición. Reverté. Página 695**

### Instrumentación del sistema cromatográfico

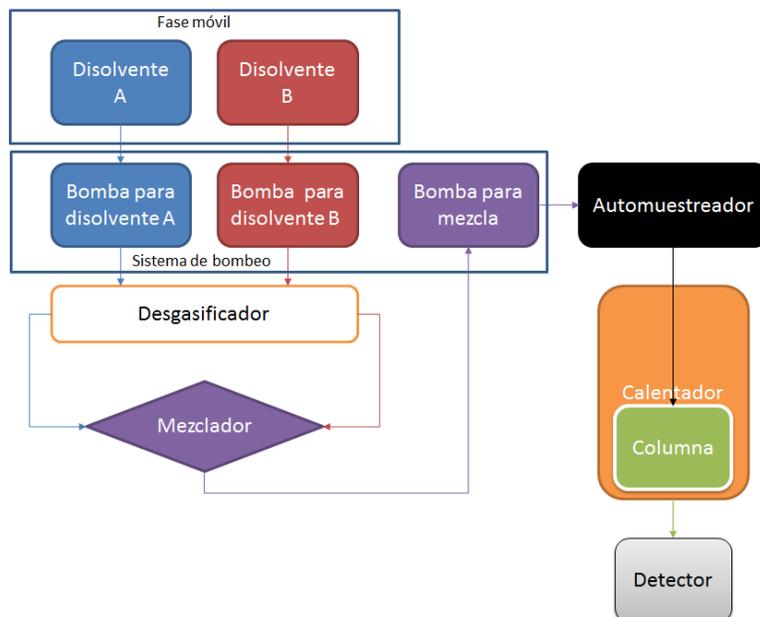
La fase móvil y la fase estacionaria son componentes esenciales para el funcionamiento de los sistemas cromatográficos, pero para la cromatografía de líquidos no son los únicos. Gracias a los descubrimientos de Van Deemter, se han agregado varios que han permitido incrementar la eficiencia del proceso.

### Bombas de inyección

Son motores adaptados a pistones que ejercen fuerza para provocar el movimiento de la fase móvil. Al controlar la fuerza a aplicar se determina la velocidad de flujo. Antes de entrar a la columna, los pulsos que pueden darse por los cambios en la presión son amortiguados. Desde dos hasta cuatro disolventes pueden ser bombeados independientemente al mismo tiempo e incluso mezclarse en una proporción dada previamente programada<sup>46</sup>.

<sup>45</sup> Skoog DA, Holler EJ, Crouch SR (2008). Principios de análisis instrumental 6a edición. Cengage Learning. 772

<sup>46</sup> Skoog DA, Holler EJ, Crouch SR (2008). Principios de análisis instrumental 6a edición. Cengage Learning. 819-821



**Figura 6. Simplificación de la instrumentación de la cromatografía de líquidos. El diseño es propio.**

### Automuestreador

Es una pieza robotizada que con una aguja toma un volumen de muestra, lo inyecta en el sistema cromatográfico, lleva a cabo la limpieza de la aguja y se coloca en posición para repetir el proceso una vez más. Todo con la mínima intervención humana posible, haciendo que el proceso sea más eficaz y seguro. Este proceso se repite tantas veces como sea necesario.<sup>47</sup>

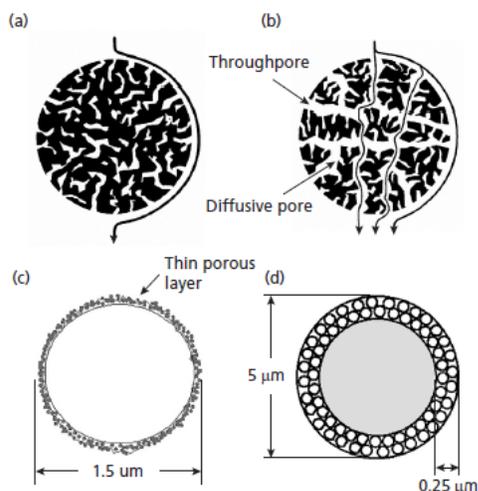
### Fase estacionaria

Columnas elaboradas con base en acero inoxidable, plástico o vidrio, de longitudes que van desde 5 a 30cm con diámetro interno de 1 a 5cm, empacadas con diferentes materiales en forma sólida rígida, gel duro o blando.

Cuando las columnas son constituidas con sílice intacta o modificada con grupos polares se practicará una cromatografía en fase normal y utilizará disolventes de baja o nula polaridad; si es con compuestos con grupos no polares, será una cromatografía en fase inversa y usará disolventes polares<sup>48</sup>.

<sup>47</sup> Agilent Technologies (2006). Inyector automático de alto rendimiento y microinyector automático con placa de pocillos Agilent Series 1200. 218-224

<sup>48</sup> Harris DC (2010). Chemical Quantitative Analysis 8ª ed. W. H. Freeman. 602,603



**Figura 7. Material de empacado. a) totalmente poroso, b) poroso perfusivo, c) no poroso y d) núcleo sólido con superficie porosa. Adaptado de Majors, RE (2003) Advances in HPLC Column Packing Design. LCGC Europe. Página 2**

La cromatografía de líquidos puede ser clasificada según la función que vaya a cumplir la fase estacionaria, entre las cuales se encuentran

- De adsorción, cuando la fase estacionaria es sólida y el soluto se adsorbe en la misma.
- De reparto, cuando la fase estacionaria es sólida o líquida de alta viscosidad y en ella se encuentra distribuida una fina película de un compuesto en la que el soluto forma equilibrios múltiples.
- De intercambio iónico, cuando la fase estacionaria es sólida y está constituida por grupos catiónicos o aniónicos, siendo capaz de retener un soluto en su forma ionizada.
- De exclusión molecular, cuando la fase estacionaria es sólida porosa que no adsorbe al analito. Separa los compuestos con base en su tamaño.
- De afinidad, cuando la fase estacionaria está conformada por una resina que tiene enlazada covalentemente moléculas de una especie química dada que es muy afín al analito, y que puede liberarlo cuando se altera el pH o la fuerza iónica<sup>49</sup>.

## Fase móvil

Constituida por uno o varios disolventes en diferentes proporciones, contiene y desplaza los analitos a través de la fase estacionaria. La velocidad de desplazamiento dependerá de la afinidad del analito por la fase móvil. Tal afinidad puede alterarse dependiendo de los cambios en la polaridad de la mezcla de disolventes, la cual depende de las proporciones en las que se encuentren. Para determinar tal polaridad, se hace uso de la siguiente ecuación:

<sup>49</sup> Harris DC (2006) Quantitative Chemical Analysis 8a ed. Reverté. Pag 543

$$P' = \sum_{i=1}^n \varphi_n P_n$$

Donde P' es la polaridad de la mezcla de disolventes, "n" es un disolvente determinado,  $\varphi$  es la proporción en la que está ese disolvente y P es su polaridad.

Ahora bien, si la elución es isocrática las proporciones de los disolventes se mantendrán constantes durante la corrida analítica; si es en gradiente, irán cambiando de forma gradual según como se programe. El uso de una u otra dependerá de las necesidades del proceso<sup>50</sup>.

### Horno o calentador

Permite incrementar y mantener la temperatura de la columna cromatográfica a una temperatura deseada, provocando que la viscosidad de los disolventes disminuya y la fluidez sea mayor a menores presiones. La temperatura debe ser constante para obtener cromatogramas reproducibles<sup>51</sup>.

### Detectores

Permiten al cromatógrafo "ver" los analitos separados durante la elución. Dependiendo de las condiciones cromatográficas se debe elegir el detector más apropiado, acercándose lo más que se pueda a las propiedades de un detector ideal. Tal detector:

- 1) Obtiene una respuesta rápida, alta y predecible de un analito a bajas concentraciones (es sensible)
- 2) Detecta solamente el analito sin que otros componentes interfieran (es selectivo),
- 3) Posee amplios intervalos de linealidad,
- 4) No se ve afectado por cambios en la temperatura, de fase móvil o su flujo,
- 5) Debe ser confiable y conveniente de usar,
- 6) No debe degradar el analito,

---

<sup>50</sup> Harris DC (2010). Chemical Quantitative Analysis 8ª ed. W. H. Freeman. 603,604

<sup>51</sup> García-De-Marina-Bayo A; Yusa-Marco DJ. (2016). HPLC INSTRUMENTAL. Universitat Politècnica de València. 281 <http://hdl.handle.net/10251/67705>

- 7) Debe tener el volumen interno más bajo posible para reducir el ensanchamiento de banda<sup>52</sup>

Existen dos tipos de detectores: los que se basan en las propiedades de la fase móvil y los que se basan en las propiedades de los solutos. Entre los principales detectores utilizados se encuentran los espectrométricos, que emplean la intensidad con la que se presenta una radiación, así como la frecuencia con la cual aparece, y que es generada por el compuesto a analizar bajo condiciones controladas<sup>53</sup>. Dada su sensibilidad y su selectividad, es conveniente su uso en prácticas bioanalíticas, motivo por el cual se abordará con más detalle a continuación.

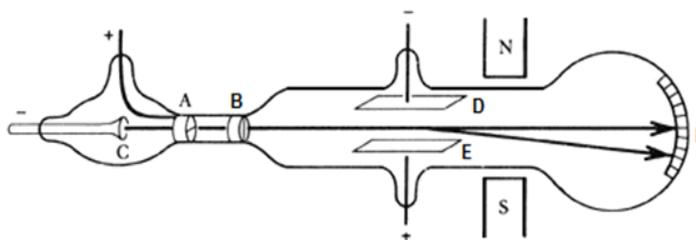
## Espectrometría de masas

### Definición

Es una metodología que permite estudiar la masa de las partículas utilizando de la energía de ionización que, tras ser detectada, genera una respuesta. Esta, al ser procesada, produce un registro gráfico colocado en una relación masa/carga ( $m/z$ ) que se utiliza para determinar los isótopos presentes en un compuesto, encontrar los fragmentos moleculares más estables, así como para conocer sus masas.

### Fundamento

Los electrones provenientes de un cátodo (C) se desplazan en un medio al vacío (flechas) y son filtrados por dos rejillas conectadas a tierra (A y B), atravesando un campo un campo eléctrico generado



**Figura 8. Espectrógrafo de parábola elaborado por Thomson y sus colegas. Adaptado de Thomson JJ (1897) Cathode Rays. Philosophical Magazine and Journal of Science. Página 296**

entre dos placas de aluminio (D y E) y uno magnético generado por un imán (N y S). Dependiendo de la intensidad de los campos, las partículas son desplazadas en

<sup>52</sup> Skoog DA, Holler EJ, Crouch SR (2008). Principios de análisis instrumental 6a edición. Cengage Learning. 793, 823

<sup>53</sup> Harris DC (2006) Quantitative Chemical Analysis 8a ed. Reverté. Pag 612-617

una dirección, la cual se detecta por medio de una pantalla fluorescente o en una placa fotográfica (F), que muestra una respuesta debida al choque. La ecuación que describe tal comportamiento es la siguiente:

$$\frac{m}{z} = \frac{eB^2r^2}{2V}$$

Donde “e” es la carga elemental, “B” es el campo magnético, “r” es el radio de la trayectoria desviada y “V” el potencial eléctrico aplicado en la generación del campo eléctrico. El control sobre el campo magnético y el potencial eléctrico aplicado permite filtrar las partículas deseadas, pues aquellas que no cumplen con las condiciones establecidas son desviadas.<sup>54</sup>

### Tipos de espectrómetros de masas

Entre algunos de ellos se encuentran los siguientes.

- Analizador por cuadrupolo de trampa iónica. Controla el campo eléctrico para capturar partículas, desviar las que no cumplan con una relación masa/carga determinada y la salida de aquellas que la cumplan. Utiliza un electrodo tapa de entrada, electrodos anulares y un electrodo tapa de salida.
- Analizador por cuadrupolo de transmisión. Controla el campo eléctrico y la radiofrecuencia para desviar las partículas que no cumplen con la relación masa/carga y permitir el paso de aquellas que la cumplan. Las partículas atraviesan un campo eléctrico generado por cuatro varillas cilíndricas o hiperbólicas dispuestas en paralelo por pares encontrados.<sup>55</sup>

### Instrumentación del espectrómetro de masas en tándem

#### Sistema de entrada

Permite insertar la muestra para ser procesada por la fuente de iones. En HPLC, la columna debe estar conectada al sistema de entrada controlando la velocidad de flujo.

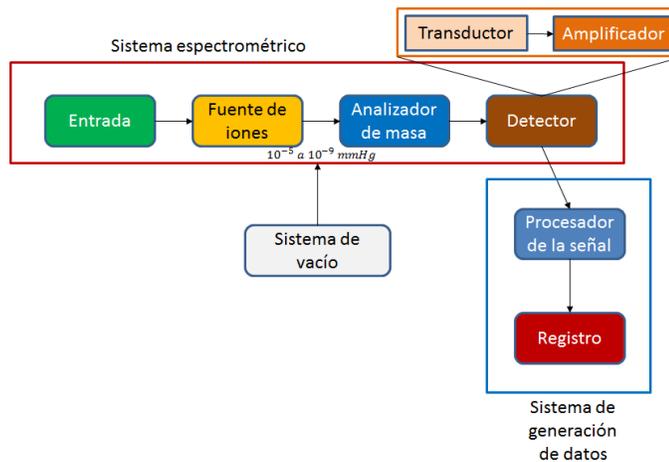
---

<sup>54</sup> Thomson JJ (1897) Cathode Rays. Philosophical Magazine and Journal of Science. 296

<sup>55</sup> Skoog DA, Holler EJ, Crouch SR (2008). Principios de análisis instrumental 6a edición. Cengage Learning.287-291, 566-573

## Fuente de iones

Forman iones gaseosos de los componentes a ser analizados. Se dividen en fuentes duras cuando la energía aportada genera varios fragmentos iónicos tras la excitación y relajación de la molécula a ionizar; fuentes blandas, cuando la energía aportada produce una baja fragmentación. En HPLC la fuente blanda es la que se usa y se encuentran los siguientes tipos.



**Figura 9. Simplificación de las partes que integran al espectrómetro de masas por cuadrupolo de transmisión. El diseño es propio.**

Ionización por electronebulización (ESI). Se realiza bajo presión atmosférica, a temperaturas entre 100 y 500 °C. El eluato pasa a través de una aguja capilar de acero inoxidable o de sílica metalizada y se somete a un voltaje mayor a los 3kV, junto con gas nitrógeno que fluye de forma coaxial a la aguja. El eluato se micronebuliza y cada microgota formada se encuentra eléctricamente cargada y se fracturan de forma sucesiva hasta que solo queda el disolvente en forma gaseosa junto con el analito previamente ionizado.

Ionización química a presión atmosférica (APCI). Parecido a ESI, con la diferencia de que es capaz de generar nuevos iones a partir de reacciones químicas en fase gaseosa entre iones y moléculas. Un alto voltaje a una aguja metálica que se encuentra en el camino que toma la micronebulización y posterior disociación de las microgotas, donde se forma una corona eléctrica donde se proveen los electrones para generar una serie de reacciones químicas y dar origen a iones tanto positivos como negativos.<sup>56</sup>

## Sistema de vacío

Bombas y tuberías selladas herméticamente conectadas con el sistema espectrométrico que extraen el aire presente. Reduce las colisiones que pueden

<sup>56</sup> Harris DC (2006) Quantitative Chemical Analysis 8a ed. Reverté. 519-522

darse con compuestos químicos presentes en el aire y que neutralicen los iones formados, que pueden generar otros compuestos que interfieran con el análisis o que puedan dañar el equipo.<sup>57</sup>

### Analizador de masa por cuadrupolos

Conformados por cuatro varillas cilíndricas o hiperbólicas dispuestas en paralelo por pares encontrados, cada uno conectado a un polo eléctrico. Esto permite hacer fluir, contener y mantener suspendidas las partículas para ser filtradas mediante variaciones en el voltaje y la radiofrecuencia para, finalmente, salir hacia el detector.<sup>58</sup>

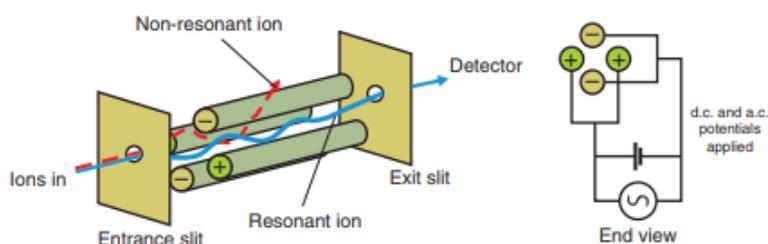


Figura 10. Analizador de masa por cuadrupolo. Adaptado de Flanagan 2007

### Analizador de masa por cuadrupolos en tándem

Utiliza dos o más cuadrupolos del tipo anteriormente expuesto, en el que cada uno cumple con una función específica. Uno de ellos es selector de la relación masa/carga de la partícula ionizada de interés (ion precursor); otro, concentra los iones operando a una radiofrecuencia constante y en ausencia de un voltaje aplicado y se le hace fluir un gas inerte para producir colisiones y generar fragmentos ionizados; un tercer cuadrupolo actúa como un filtro más selectivo que permite solamente el paso al detector del fragmento ionizado (ion producto) que cumpla con una relación masa/carga deseada (Figura 13).<sup>59</sup>

<sup>57</sup> Skoog DA, Holler EJ, Crouch SR (2008). Principios de análisis instrumental 6a edición. Cengage Learning. 283-284

<sup>58</sup> Harris DC (2006) Quantitative Chemical Analysis 8a ed. Reverté. 516

<sup>59</sup> Harris DC (2006) Quantitative Chemical Analysis 8a ed. Reverté. 524,526

## Detector

Encargado de percibir a las partículas ionizadas seleccionadas por los analizadores de masas generando una señal que pueda ser interpretada por el sistema de generación de datos. Está integrado por:

- Transductor. Convierte la energía cinética de las partículas ionizadas en una señal eléctrica.
- Amplificador. Magnifica la señal recibida a un nivel cuantitativo adecuado para el procesador.<sup>60</sup>

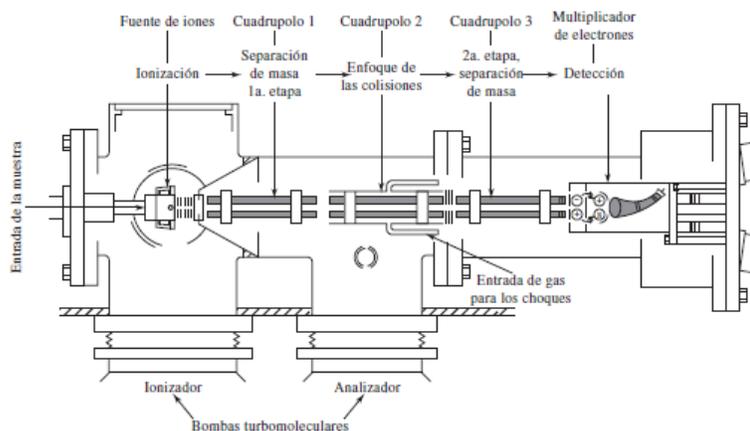


Figura 11. Analizador de masa por cuadrupolo de transmisión en tándem. Adaptado de Skoog 2008.

## Sistema de generación de datos.

Utiliza las señales generadas detectadas y las transformarlas en datos. Está compuesto del procesador de señales y por el registro de datos. El software incluido en los equipos computacionales que se venden junto con los espectrómetros de masas realiza ambas funciones.

## Parámetros del espectrómetro de masas

Para controlar la eficiencia con la cual los compuestos separados a analizar van a ser ionizados, fragmentados, analizados y cuantificados, deben tomarse en cuenta los valores que se muestran a continuación.

Temperatura de la fuente de iones (TEM). Temperatura a la cual se debe encontrar la fuente para facilitar la evaporación del disolvente sin que se degrade el analito.

<sup>60</sup> Skoog DA, Holler EJ, Crouch SR (2008). Principios de análisis instrumental 6a edición. Cengage Learning. 283-285.

Flujo del gas para nebulizar (GS1). Velocidad a la cual debe salir de la aguja el gas utilizado para nebulizar la disolución entrante.

Flujo del gas de secado (GS2). Velocidad a la cual debe salir de los calentadores de cerámica el gas utilizado para evaporar las microgotas con carga.

Potencial de nebulización (IS). Energía aplicada a la aguja del nebulizador para generar cargas en las microgotas de disolvente.

Potencial de disgregación (DP). Energía que le debe dar el equipo para prevenir la agrupación de iones para que entren al sistema espectrométrico separados.

Potencial de entrada (EP). Energía que el equipo debe darle a los iones para concentrarlos y enfocarlos para la entrada al primer cuadrupolo.

Energía de colisión (CE). Energía que se le debe dar a los iones que pasaron por el primer cuadrupolo para enfocarlos y acelerarlos antes de entrar al segundo cuadrupolo, con el fin de que puedan fragmentarse al colisionar con el gas destinado para ese fin.

Potencial de salida de la celda de colisiones (CXP). Energía que se les debe dar a los iones fragmento producidos en el segundo cuadrupolo para enfocarlos hacia el tercer cuadrupolo, facilitando tanto la salida como la entrada.<sup>61</sup>

Una vez que las condiciones cromatográficas y espectrométricas han sido establecidas, queda pendiente valorar si el método hasta este punto desarrollado será lo suficientemente competente para poder llevar a cabo estudios más exigentes. Esto conlleva a realizar una actividad más conocida como validación, la cual será abordada a continuación.

---

<sup>61</sup> AB Sciex Pte. Ltd (2013). AB SCIEX 4500 Series of Instruments System User Guide. 57-61

## Validación bioanalítica<sup>62</sup>

### Importancia

Permite demostrar que el método desarrollado para medir cuantitativamente un analito contenido en una matriz biológica es lo suficientemente robusto para dar resultados confiables y reproducibles.

La validación del método puede ser

- Completa, si se desea desarrollar e implementar un nuevo método
- Parcial, cuando solo se desea evaluar si modificaciones hechas a un método existente no alteran su confiabilidad y reproducibilidad,
- Cruzada, si se realiza una comparativa de parámetros de validación entre dos o más métodos existentes aplicados en el mismo estudio.

### Pruebas de validación bioanalítica completa

#### Adecuabilidad del sistema

Permite establecer que el sistema opera correctamente y que es apto para realizar sus actividades antes de que las muestras sean procesadas, lo que brinda confiabilidad a lo largo del proceso.

#### Prueba de selectividad

Demuestra que el método analítico es capaz de distinguir y cuantificar al analito en presencia de otros componentes de la muestra sin que estos interfieran. Son las siguientes.

#### Selectividad de inicio

Asegura que el procesamiento y transvasado de las muestras fue limpio, por lo que no se deben presentar señales debidas a contaminaciones que puedan alterar resultados posteriores. Hace uso de una muestra blanco de reactivos (BR), una muestra blanco o doble blanco (DB) y una muestra cero o blanco (B)

---

<sup>62</sup> Secretaría de Salud (2013). Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. 1-17

### **Selectividad a la matriz biológica**

Prueba que los componentes endógenos de la matriz biológica no interfieren con la detección y cuantificación del analito.

### **Selectividad a fármacos de uso común y concomitantes**

Demuestra que los fármacos contenidos en algunos alimentos o medicamentos de uso común, así como los que se administran junto con el medicamento que contiene al analito, no interfieren con la detección y cuantificación.

### **Selectividad a fármacos coformulados**

Prueba que los fármacos contenidos en la misma forma farmacéutica que el analito no generan interferencias en su detección y cuantificación.

### **Prueba de arrastre o acarreamiento**

Demuestra que entre muestreos no se produce interferencia en los resultados obtenidos en muestreos posteriores. Determina el grado de limpieza durante la corrida analítica.

### **Curva de calibración**

Evalúa si un conjunto de concentraciones dado se puede utilizar como un intervalo con el cual obtener un modelo matemático con el cual establecer una relación entre valores de respuesta analítica y valores de concentración de analito.

### **Precisión y exactitud**

Demuestra si el método desarrollado es capaz de generar resultados que sean muy parecidos entre sí (precisión) y el grado en que se acercan a un valor de referencia (exactitud). Se basa en dos pruebas

### **Repetibilidad**

Evalúa la capacidad del método para obtener resultados precisos bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo.

### **Reproducibilidad**

Valora la capacidad del método para obtener resultados repetibles en condiciones de operación distintas.

## Linealidad y modelo matemático

Evalúa la capacidad del método analítico para obtener resultados proporcionales a las concentraciones en las que se encuentra el compuesto contenido en las muestras por medio de un modelo matemático y una ponderación.

## Estabilidad

Demuestra la capacidad del analito de mantenerse dentro de especificaciones de calidad establecidas en el envase que lo contenga durante su periodo de vida útil en distintas condiciones durante su manejo.

### Estabilidad en la matriz biológica

Valora la integridad del analito contenido en un material biológico bajo distintas condiciones.

- A corto plazo, cuando el periodo de tiempo a evaluar comprende el tiempo suficiente en el que se realizará el procesamiento de las muestras.
  - o *A temperatura ambiente*, cuando va de los 15°C a los 30°C.
  - o *En refrigeración*, cuando va desde los 2°C a los 8°C
  - o *En congelación*, cuando va de -20°C a -70°C
- A ciclos de congelación-descongelación, cuando se mantienen por 12 horas seguidas en congelación a -70°C, se colocan a temperatura ambiente hasta descongelarse y se almacenan nuevamente en congelación a -70°C.
- A largo plazo, cuando el periodo de tiempo a evaluar comprende desde la toma de la muestra biológica hasta su análisis, y se realiza bajo las condiciones de almacenamiento en las que se encontrarán las muestras.

### Estabilidad de la muestra procesada

Evalúa la integridad del analito dentro de especificaciones tras completar el proceso desarrollado. Son los siguientes.

- En el automuestreador, a la temperatura proporcionada por el inyector automatizado.
- En refrigeración, cuando va desde los 2°C a los 8°C

### **Estabilidad en solución**

Valora la integridad del analito disuelto en los disolventes utilizados. Se divide en los siguientes rubros.

- A temperatura ambiente, cuando va de los 15°C a los 30°C.
- En refrigeración, cuando va desde los 2°C a los 8°C

### **Efecto matriz**

Determina el grado de interferencia en la detección y cuantificación del analito generada por los componentes del material biológico. Puede presentarse como:

- Supresión, cuando la señal se ve disminuida.
- Mejora, cuando la señal se ve incrementada.

### **Reproducibilidad de la reinyección**

Evalúa si se puede volver a analizar una serie de muestras con la misma confiabilidad en caso de que se dé un incidente que interrumpa el estudio analítico.

Satisfechos estos criterios, el método desarrollado se puede considerar como confiable para llevar a cabo estudios más exigentes.

-

A lo largo de esta sección se ha procurado brindar claridad tanto a las diversas teorías como a sus respectivos conceptos, con la idea de alcanzar dos fines: el primero, corresponde a mostrar la forma en que se condujo el razonamiento y, con ello, evitar confusiones en el manejo de la información; el segundo, para determinar los límites prácticos de la propuesta experimental que será mostrada a continuación.

# SECCIÓN EXPERIMENTAL



## Materiales y métodos

### Materiales

#### Disolventes y reactivos

- Acetato de amonio 5M grado MS ( $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ ) CAS 631-61-8 Sigma-Aldrich.
- Acetonitrilo grado HPLC ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) CAS75-05-8 J.T. Baker
- Ácido acético glacial grado reactivo ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) CAS 64-19-7 J.T. Baker
- Agua grado HPCL ( $\text{H}_2\text{O}$ ) CAS-7732-18-5. Proveniente del purificador de agua Milli-Q Integral 10.

#### Sustancias de referencia

- Clorhidrato de metformina (SR-MTF\*HCL). Sustancia de Referencia Primaria. Proveedor USP. Lote R069H0. Pureza 99.70%
- Metformina-D6 clorhidrato (SR-MTF\*HCL-D6). Sustancia de Referencia Primaria. Proveedor TRC. Lote 4-ELZ-101-5. Pureza 99.70%
- Vildagliptina (SR-VLD). Sustancia de Referencia Primaria. Proveedor TRC. Lote 1-MLM-173-1. Pureza 97%
- Vildagliptina-D3 (SR-VLD-D3). Sustancia de Referencia Primaria. Proveedor TRC. Lote 16-QFY-49-1. Pureza 95%
- Glimepirida (SR GLM). Sustancia de Referencia Primaria. Proveedor USP. Lote G0K135. Pureza 99.60%
- Glibenclamida o gliburida (SR-GLB). Sustancia de referencia Primaria. Proveedor USP. Lote R022S0. Pureza 99.4%
- Nicotina. Sustancia de Referencia Primaria. Proveedor TLC. Lote 2198-076<sup>a</sup>1. Pureza 97.10%

#### Matriz biológica

- Plasma humano fresco con CPDA como anticoagulante, proveniente de 6 voluntarios sanos del Instituto Nacional de Cardiología, folios F-2975, F-3022, F-3023, F-3040, F-3140 y F-3141

- Mezcla en mismas proporciones de los plasmas anteriormente mencionados, nombrada M-472.
- Dos fuentes de plasma lipémico obtenidas en IFaB de dos donadores por toma de muestras postprandial, nombradas F-3160 y F-3161
- Dos fuentes de plasma hemolizado obtenidas en IFaB de dos donadores por toma de muestra, nombradas F-2989 y F-3162.

## Instrumentos y equipos

### Instrumentos

- Matraces volumétricos de 1, 5, 10, 25 y 1000 mL
- Probeta graduada de 10, 100, 500 y 1000 mL
- Vasos de precipitados de vidrio de 100, 250, 600 y 1000 mL
- Vasos de precipitado de polipropileno de 50, 100, 250 y 1000 mL
- Frascos de vidrio reservorio con tapa de rosca de 100, 250, 500, 1000 y 2000 mL
- Placas de polipropileno de 96 posos con tapa de silicona
- Puntas para micropipeta de 100-1000  $\mu$ L
- Puntas para micropipeta de 20-200  $\mu$ L
- Puntas para micropipeta de 10-100  $\mu$ L
- Puntas para pipeta repetidora de 500  $\mu$ L, 1.0, 2.5, 5.0 y 10.0 mL
- Viales de vidrio de 2 mL
- Insertos de polipropileno de 200  $\mu$ L para viales de vidrio de 2 mL
- Microtubos de 2 mL
- Perilla de succión
- Nave para pesar
- Pipetas Pasteur
- Gradillas de polietileno de alta densidad
- Espátulas de acero inoxidable
- Espátulas de polipropileno.

## Equipos

- Agitador vórtex marca Bransted International. Modelo M37615. No. De serie 1254051116895.
- Agitador vórtex multitubos o de gran capacidad marca VWR, modelo M945063. No. De Serie 120723002.
- Agitador vórtex multitubos o de gran capacidad marca VWR, modelo M945063. No. De Serie 101104004.
- Balanza analítica marca OHAUS, modelo EP214C. No. De serie I239 1125333712P.
- Balanza analítica marca OHAUS, modelo EP214C. No. De serie K219 1127243741P.
- Balanza analítica semimicro marca Sartorius, modelo CPA225D. No. De serie 28208016.
- Balanza granataria marca Ohaus, modelo Adventurer Pro AV3102C. No. De serie 8027491132.
- Baño de ultrasonido marca Crest Ultrasonics, modelo 1875TA. No. De serie 18TS 04 178.
- Centrífuga marca Hettich Zentrifugen, modelo Rotanta 460. No. De serie 0000291-04-01.
- Centrífuga marca Hettich Zentrifugen, modelo Rotanta 460. No. De serie 0000292-04-01.
- Centrífuga marca Hettich Zentrifugen, modelo Rotanta 460R. No. De serie 0000308-04-01.
- Centrífuga marca Hettich Zentrifugen, modelo Rotanta 460R. No. De serie 0000204-01-01.
- Congelador marca Frigidare, modelo GLFC1326FW1. No. De serie WB94039405.
- Contenedor plástico para almacenamiento marca León.
- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Shimadzu Prominence UFLC acoplado a un detector de MS-MS. Marca AB Sciex, Modelo API 4500 QTrap No. De serie B120251203

- Medidor de pH de sobremesa marca Thermo Scientifica, modelo Orion Star A211.
- Micropipeta de volumen variable de 1-100  $\mu\text{L}$
- Micropipeta de volumen fijo de 200  $\mu\text{L}$
- Micropipeta de volumen variable de 100 a 1000  $\mu\text{L}$
- Parrilla de calentamiento con agitación magnética marca IKA modelo C-MAG HS7
- Pipeta repetidora electrónica de 5  $\mu\text{L}$  a 10 mL marca eppendorf.
- Purificador de agua Milli-Q Integral 10 marca Merck, modelo ZRXQ010T0. No. De serie F8DA42942E.
- Refrigerador marca Thermology Corporation, modelo ULT2186-5-A40. No. De serie Z01-235885-ZR.
- Ultracongelador marca REVCO, modelo ULT2186-5-A40. No. De serie Z01R-235885-ZR.

## Preparación de soluciones

### Fase móvil

- Ácido acético 0.1%
  - o En un matraz volumétrico de 1 L con 200 mL de H<sub>2</sub>O, transferir 1 mL de ácido acético glacial, agitar por bamboleo y llevar a volumen con H<sub>2</sub>O. Agitar por inversión y transferir a un reservorio de 1L previamente etiquetado y desgasificar en baño de ultrasonido por 10 min.
- Acetato de amonio 5 mM, pH 4
  - o En un vaso de precipitado de 1 L con 900 mL de H<sub>2</sub>O, transferir 1 mL de acetato de amonio 5 M y homogeneizar con un agitador magnético. Bajo agitación media y utilizando el medidor de pH, colocar gota a gota ácido acético 0.1% hasta que marque de forma estable, en no más de un minuto, un pH de 4.00. Deslizando por las paredes de un matraz volumétrico de 1 L, transferir la solución evitando hacer burbujas, llevar a volumen con H<sub>2</sub>O y agitar suavemente por inversiones consecutivas durante un minuto. Transferir a un reservorio de 1L previamente etiquetado y desgasificar en baño de ultrasonido por 10 min.

- Solución ACN
  - Transferir directamente del contenedor 1L de ACN a un reservorio de 1L previamente etiquetado y desgasificar en baño de ultrasonido por 10 min.
- Solución de lavado
  - Transferir 500 mL de H<sub>2</sub>O y 500 mL de ACN a una probeta graduada de 1 L. Transvasar esta mezcla a un reservorio de 1L previamente etiquetado y agitar por sacudidas bruscas. Desgasificar en baño de ultrasonido por 10 min.

### Soluciones reactivo de trabajo

- Solución reactivo 1 (SR1)
  - Transferir 50 mL de H<sub>2</sub>O y 50 mL de ACN a una probeta graduada de 100 mL. Transvasar esta mezcla a un reservorio de 100 mL previamente etiquetado y agitar.
- Solución reactivo 2 (SR2)
  - Transferir 50 mL de acetato de amonio 5 mM pH 4 y 50 mL de ACN a una probeta graduada de 100 mL. Transvasar esta mezcla a un reservorio de 100 mL previamente etiquetado y agitar.
- Agente precipitante.
  - Transferir 200 mL de ACN a un reservorio de 250 mL previamente etiquetado. Conservar a temperatura ambiente hasta su uso.
- Agente diluyente
  - Transferir 100 mL de H<sub>2</sub>O a un reservorio de 100 mL previamente etiquetado. Conservar a temperatura ambiente hasta su uso.

### Soluciones estándar

#### Principales

- Solución estándar principal de glimepirida 100 µg/mL (GLM-A)
  - Utilizando una balanza analítica, pesar con exactitud 2.0 mg de SR-GLM y transferir a un matraz volumétrico de 20 mL. Con SR1, disolver y llevar a volumen. Agitar con vórtex hasta su completa solubilización.
- Solución estándar principal de vildagliptina (VLD-C)

- Utilizando una balanza analítica, pesar con exactitud 2.0 mg de SR-VLD y transferir a un matraz volumétrico de 20 mL. Con SR1, disolver y llevar a volumen. Agitar con vórtex hasta su completa solubilización.
- Solución estándar principal de metformina 800 µg/mL (MTF-E)
  - Utilizando una balanza analítica, pesar con exactitud 10.2 mg de SR-MTF\*HCL y transferir a un matraz volumétrico de 10 mL. Con SR1, disolver y llevar a volumen. Agitar hasta su completa solubilización.
- Solución estándar principal de glibenclamida o gliburida (GLB-I) 100 µg/mL
  - Utilizando una balanza analítica, pesar con exactitud 2.0 mg de SR-GLB y transferir a un matraz volumétrico de 20 mL. Con SR1, disolver y llevar a volumen. Agitar con vórtex hasta su completa solubilización
- Solución estándar principal de vildagliptina-d3 (VLD-D3-II) 100 µg/mL
  - Utilizando una balanza analítica, pesar con exactitud 1.0 mg de SR-VLD-D3 y transferir a un matraz volumétrico de 10 mL. Con SR1, disolver y llevar a volumen. Agitar con vórtex hasta su completa solubilización
- Solución estándar principal de metformina-d6 (MTF-D6-III) 200 µg/mL
  - Utilizando una balanza analítica, pesar con exactitud 2.0 mg de SR-MTF\*HCL-D6 y transferir a un matraz volumétrico de 10 mL. Con SR1, disolver y llevar a volumen. Agitar con vórtex hasta su completa solubilización.

#### **De trabajo**

- Solución estándar de trabajo de glimepirida (GLM-B) 10 µg/mL
  - Transferir 1 mL de GLM-A a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con SR1. Agitar con vórtex.
- Solución estándar de trabajo de vildagliptina (VLD-D) 10 µg/mL
  - Transferir 1 mL de VLD-C a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con SR1. Agitar con vórtex.
- Solución estándar de trabajo de metformina (MTF-F) 40 µg/mL
  - Transferir 0.5 mL de MTF-E a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con SR1. Agitar con vórtex.
- Solución estándar de trabajo de glimepirida, vildagliptina y metformina, a 1 µg/mL, 1 µg/mL y 4 µg/mL, respectivamente (GVM-G)

- Transferir 0.1 mL, 0.1 mL y 0.1 mL de las soluciones GLM-B, VLD-D y MTF-E, respectivamente, a un matraz volumétrico de 1 mL y llevar a volumen con SR1. Agitar con vórtex.
- Solución de estándar interno de metformina-d6, vildagliptina-d3 y gliburida, a 20 µg/mL, 3 µg/mL y 5 µg/mL, respectivamente. (EI-IV)
  - Transferir 0.250 mL, 0.150 mL 0.5 mL, y de las soluciones GLB-I, VLD-D3-II y MTF-D6-III, respectivamente, a un matraz volumétrico de 5 mL y llevar a volumen con SR1. Agitar con vórtex.
- Solución a 100 ng/mL para las pruebas de ionización.
  - Transferir 0.1 mL, 0.1 mL, 0.025 mL y 0.05 mL de GLM-B, VLD-D, MTF-F y EI-IV respectivamente, a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con SR2. Agitar con vórtex.
- Solución para evaluar la adecuabilidad del sistema: glimepirida 60 ng/mL, glibenclamida 100 ng/mL, vildagliptina 50 ng/mL, vildagliptina-d3 60 ng/mL, metformina 400 ng/mL y metformina d6 400ng/mL (S-AD)
  - Transferir 0.2 mL de EI-IV, 0.060 mL de GLM-B, 0.05 mL de VLD-D y 0.1 mL de MTF-F, a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con ACN. Fraccionar esta solución en varias alícuotas y almacenarlas bajo refrigeración. Por cada día de trabajo retirar una alícuota.
- Solución para realizar la evaluación de soluciones principales de glimepirida, vildagliptina y metformina, a 60 ng/mL, 40 ng/mL y 480 ng/mL, respectivamente (SP-GVM-LSC)
  - Transferir 0.015 mL de GLM-A, 0.010 mL de VLD-C y 0.015 mL de MTF-E, a un matraz volumétrico de 25 mL y llevar a volumen con SR2.
- Solución para realizar la evaluación de soluciones de trabajo de glimepirida, vildagliptina y metformina, a 60 ng/mL, 40 ng/mL y 480 ng/mL, respectivamente (ST-GVM-LSC)
  - Transferir 0.060 mL de GLM-B, 0.04 mL de VLD-D y 0.12 mL de MTF-F, a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con SR2
- Solución para realizar la evaluación de solución principal de glibenclamida o gliburida a 60 ng/mL (SP-GLB-LSC).

- Transferir 0.012 mL de GLB-III a un matraz volumétrico de 20 mL y llevar a volumen con SR2
- Soluciones de trabajo para preparar muestras estándar para curva de calibración y muestras control de calidad (ST-CP y ST-MCC)
  - Transferir los volúmenes indicados de las soluciones indicadas en la tabla 11 a microtubos nuevos previamente identificados. Agitar con vórtex multitubos a 2500 rpm por 1 min.

**Tabla 7. Rango de concentraciones de las soluciones de trabajo**

ST	Alícuota (µL)						Volumen final (µL)	Concentración teórica (ng/mL)			
	MTF		VLD		GLM			Disolvente	MTF	VLD	GLM
	B	A	D	C	F	E					
CP1	10		10		10		970	1000	400	100	100
CP2	20		20		20		940	1000	800	200	200
CCB	30		30		30		910	1000	1200	300	300
CP3	50		40		80		830	1000	2000	400	800
CP4	75		80		180		665	1000	3000	800	1800
CCBB	125			10		25	840	1000	5000	1000	2500
CP5	250			30		30	690	1000	10000	3000	3000
CP6		25		40		50	885	1000	20000	4000	5000
CCM		50		50		60	840	1000	40000	5000	6000
CP7		75		70		85	770	1000	60000	7000	8500
CP8		125		90		120	665	1000	100000	9000	12000
CCA		150		110		135	605	1000	120000	11000	13500
CP9		175		120		155	550	1000	140000	12000	15500
CP10		200		140		180	480	1000	160000	14000	18000
CCD		250		280		360	110	1000	200000	28000	36000

### Muestras

- Muestras estándar para CP y MCC en plasma.
  - Transferir los volúmenes indicados de las soluciones indicadas en la tabla 7 a microtubos nuevos previamente identificados. Agitar con vórtex multitubos a 2500 rpm por 1 minuto y centrifugar a 4500 rpm por 5 minutos.
- Muestras estándar para CP y MCC en solución (S-CP y S-MCC)
  - Repetir mismo procedimiento que en el punto anterior utilizando H2O en vez de plasma.
- Blanco de reactivos (BR)

- Procesar, sin añadir EI-IV, 100 µL de H<sub>2</sub>O como si fuera plasma por medio de la extracción establecida.
- Doble blanco o matriz blanco (DB)
  - Procesar, sin añadir EI-IV, 100 µL de plasma M-472 por medio de la extracción establecida.
- Blanco o blanco cero (B)
  - Procesar 100 µL de plasma M-472 por medio de la extracción establecida.
- Muestra de adecuabilidad (AD)
  - Procesar, adicionando 400 µL de S-AD en vez de EI-IV y el último agente utilizado la extracción, 100 µL de plasma M-472 por medio de la extracción establecida.

## Metodología

### Desarrollo

#### Ionización y MRM

Cargar la jeringa de infusión con la solución para las pruebas de ionización. Mediante el software, activar el perfil del espectrómetro de masas, configurar el equipo para infundir a una velocidad de 10 µL/min y, utilizando los valores por default de los parámetros DP, EP, CUR, CAD, IS, TEM, GS1 y GS2, monitoreando con el primer cuadrupolo, obtener el espectro de iones presentes en el intervalo m/z donde serán detectados los iones precursores.

Una vez realizada esta actividad, vaciar la jeringa de infusión y cargar con la solución para las pruebas de ionización realizando la misma operación. A partir de la información bibliográfica, seleccionar del espectro obtenido el valor m/z con el que será detectado el ion precursor. Para seleccionar los parámetros DP y EP más adecuados para la entrada de los iones, monitoreando con el primer cuadrupolo, hacer un barrido variando un parámetro y dejando constante el otro. Elegir los valores que ofrezcan una mayor respuesta.

Hecho esto, utilizando la información obtenida en la bibliografía y configurando el equipo para monitorear con el tercer cuadrupolo, obtener un espectro con los iones presentes en el intervalo  $m/z$  donde se espera encontrar el ion producto y elegir el valor con el que éste será detectado. Posteriormente, realizar un barrido variando un parámetro y dejando constante los demás para obtener la CE, CAD y CXP más adecuadas.

Criterio de aceptación. El espectrómetro de masas debe ser capaz de generar señal solamente en la transición establecida con la mayor intensidad posible.

### **Elección del método de extracción y de las condiciones iniciales de trabajo**

Obtener y revisar bibliografía de desarrollos de métodos analíticos previos bajo las siguientes condiciones:

- 1) Seis desarrollos por cada analito para procesar, separar, detectar y cuantificar individualmente MTF, VLD o GLM, dando preferencia a aquellos que
  - a. Requirieron de un solo tipo de extracción, independientemente de si se realizaron o no junto con alguna otra sustancia que no fuera MTF, VLD o GLM
  - b. Requirieron dos tipos de extracción, pero solo una separación.
  - c. No dependieran de alguna modificación química
- 2) Al menos seis desarrollos para procesar, separar, detectar y cuantificar conjuntamente bajo una sola extracción y separación MTF, VLD y/o GLM, dando preferencia a aquellos que
  - a. Requirieron de un solo tipo de extracción, independientemente de si se realizaron o no junto con alguna otra sustancia.
  - b. Requirieron dos tipos de extracción, pero solo una separación.
  - c. No dependieran de alguna modificación química.

Contrastar la bibliografía obtenida para encontrar coincidencias y diferencias de los desarrollos 1) para el mismo analito, 2) individuales entre analitos y 3) entre individuales y combinados.

Probar dos propuestas de técnicas de extracción, seleccionando al menos dos agentes precipitantes, dos volúmenes del agente precipitante elegido y dos soluciones diluyentes, mediante pruebas t de Student de 2 colas, con 95% de confianza, realizando 5 valoraciones por cada caso.

### Elección del rango de concentraciones a utilizar como CP y MCC

Obtener las propuestas para límites de cuantificación inferior y superior a partir del Cmax reportado en la bibliografía para cada uno de los fármacos, haciendo uso de las siguientes ecuaciones:

$$LIC_{propuesto} = |(Cmax_{m\acute{a}s\ bajo\ reportado} - Desviaci\acute{o}n\ m\acute{a}s\ alta_{Cmax})| * 0.05$$

**Ecuaci3n 1**

$$LSC_{propuesto} = |(Cmax_{m\acute{a}s\ alto\ reportado} + Desviaci\acute{o}n\ m\acute{a}s\ alta_{Cmax})| * 2.00$$

**Ecuaci3n 2**

Adem\acute{a}s de esto, deben tomarse en cuenta los siguientes aspectos

- Todos los valores propuestos deben ser redondeados al m\acute{u}ltiplo de 5 m\acute{a}s cercano.
- El CP1 a utilizar debe ser cercano al LIC calculado.
- EL CP10 a usar debe ser cercano al LSC calculado.
- El CP2 debe tener el doble de la concentraci3n del CP1.
- El CCB debe tener el triple de la concentraci3n del CP1.
- El CCM debe tener una concentraci3n cercana a la del Cmax m\acute{a}s alto reportado.
- El CCBB debe tener una concentraci3n entre el CCM y el CCB.
- Los puntos CP3 y CP4 deben estar contenidos entre el CCB y el CCBB.
- Los puntos CP5 y CP6 deben estar contenidos entre el CCBB y el CCM.
- El CCA debe tener una concentraci3n entre el CP10 y el CCM o, en su defecto, cercana a su 75%.
- Los puntos CP7 y CP8 deben estar contenidos entre el CCM y el CCA.
- El punto CP9 debe estar contenido entre el CCA y el CP10.
- El CCD debe ser cercano al doble del CP10, de modo que est\acute{e} a una concentraci3n tal que, tras diluirse una parte en tres, se encuentre a otra contenida entre el CCM y el CCA.

## Elección de las condiciones cromatográficas

Basándose en la información obtenida en la bibliografía, proponer una fase móvil y realizar un barrido de proporciones de fase acuosa/fase orgánica de 20:80 a 80:20, fijando la temperatura de columna, la fase estacionaria y la velocidad de flujo, obteniendo en cada caso los tiempos de retención por cada analito.

Posteriormente, elegir un nivel bajo y un nivel alto de proporciones de fase móvil, tomando en cuenta para el primero los más bajo tiempos de retención y para el segundo, el último más alto tiempo de retención por debajo de 10 minutos. Realizar un diseño experimental de tres factores y dos niveles ( $3^2$ ) comparando el número de platos teóricos entre las proporciones de fase móvil, entre fases móviles y entre los analitos que hayan tenido los mayores y menores tiempos de retención. Simular las variaciones en el número de platos teóricos entre factores y niveles y elegir las condiciones que mejor convengan.

Usando como guía lo indicado en la bibliografía, proponer y probar dos fases estacionarias de distinta polaridad bajo las condiciones elegidas y seleccionar aquella que brinde la mejor resolución posible. Optimizar el tipo de elución y la velocidad de esta para reducir el tiempo de retención más alto a menos de 5 minutos.

## Validación

### Adecuabilidad

Haciendo uso de una AD, tomar una muestra de 2 mL y colocar en un vial de vidrio de 2 mL. Reinyectar 10 veces de forma sucesiva el contenido de este vial y someter a análisis. Los primeros cuatro resultados son para el acondicionamiento del equipo, mientras que los últimos seis son para valorar esta prueba.

Criterio de aceptación de adecuabilidad. Para las últimas seis inyecciones:

- El CV% del promedio obtenido en la relación de áreas es menor o igual que 10%
- El CV% del promedio el obtenido para el tiempo de retención es menor o igual al 2%

## Selectividad

### Selectividad de inicio

En tres viales de vidrio de dos mililitros previamente etiquetados, con inserto de 200  $\mu$ L, colocar los extractos de BR, DB y B. Inyectar en ese orden y someter a análisis.

### Selectividad a la matriz biológica

En una placa de polipropileno de 96 pozos, colocar los extractos de un quintuplicado de LIC, seis folios individuales de plasma normal, un folio con plasma lipémico y un folio con plasma hemolizado. Inyectar y someter a análisis. Obtener el promedio de la respuesta obtenida para las LIC y con él comparar la respuesta obtenida en los demás preparados.

### Selectividad a fármacos de uso común

En una placa de polipropileno de 96 pozos, colocar los extractos de cinco DB enriquecidas con fármacos de uso común tales como el ácido salicílico (300  $\mu$ g/mL), paracetamol (20  $\mu$ g/mL), naproxeno (50  $\mu$ g/mL), cafeína (4  $\mu$ g/mL) y nicotina (50 ng/mL), así como un quintuplicado de LIC. Inyectar y someter a análisis. Obtener el promedio de las respuestas obtenidas para las LIC y con él comparar las respuestas obtenidas en los demás preparados.

### A fármacos coformulados

En una placa de polipropileno de 96 pozos, colocar los extractos de tres DB enriquecidos con MTF, VLD y GVM respectivamente, a la concentración del LSC o CP10, así como de un quintuplicado de LIC. Inyectar y someter a análisis. Obtener el promedio de las respuestas obtenidas para las LIC y con él comparar las respuestas obtenidas en los demás preparados.

### Criterio de aceptación para selectividad

- Las respuestas analíticas próximas al tiempo de retención establecido debidas a interferencias son menores o iguales al 20% de las obtenidas en la LIC.
- Las respuestas analíticas próximas al tiempo de retención establecido debidas a interferencias son menores o iguales al 5% de las obtenidas para el EI.

## Efecto matriz

En una placa de 96 pozos, colocar una serie de extractos enriquecidos con ST-CCB y EI-IV y otra con ST-CCA y EI-IV de seis folios individuales de plasma normal, dos folios con plasma lipémico, otros dos con plasma hemolizado. Inyectar y someter a análisis. De la información resultante de esta prueba y de la de selectividad a la matriz biológica, calcular el FMN para cada uno de los folios en su respectivo nivel utilizando la siguiente ecuación.

$$FMN = \frac{\text{Respuesta del analito en matriz} / \text{Respuesta del EI en matriz}}{\text{Respuesta del analito en solución} / \text{Respuesta del EI en solución}}$$

**Ecuación 3**

Criterio de aceptación para efecto matriz. El efecto matriz será considerado como despreciable si el CV% del FMN calculado de las 6 unidades de la matriz normal, el de las 2 lipémicas y el de las 2 hemolizadas tanto en el nivel bajo como en el nivel alto es menor al 15%. Si no se cumple con este criterio, pero se demuestra que es efecto de las muestras hemolizadas, debe ser indicado.

## Curva de calibración, linealidad y modelo matemático

En una placa de 96 pozos, colocar de forma ordenada los extractos de tres series de DB, B y CP. Inyectar en ese orden y someter a análisis. De la información obtenida, construir cuatro curvas: una sin ponderar y las demás con ponderación  $1/x$ ,  $1/y$ ,  $1/x^2$ . Por cada modelo matemático resultante de la regresión lineal, calcular las concentraciones para las CP, obtener su promedio, la desviación estándar, el CV%, los ER% y de estos últimos el  $\sum ER\%$ . El ER% se calcula utilizando la siguiente ecuación.

$$ER\% = \left| \frac{\text{Concentración nominal} - \text{concentración recuperada}}{\text{Concentración nominal}} \right| * 100$$

**Ecuación 4**

## Criterios de aceptación

- El coeficiente de correlación (r) debe ser mayor o igual a 0.99
- Del total de curvas evaluadas, al menos el 50% de cada nivel de concentración debe cumplir con el criterio de que la exactitud debe quedar dentro del intervalo 80% a 120% para el LIC y 85% a 115% para el resto de CP

- Del total de curvas evaluadas, Al menos el 75% de las CP deben cumplir con el criterio de que la exactitud debe quedar dentro del intervalo 80% a 120% para el LIC y 85% a 115% para el resto de CP.
- Si un CP no cumple con el criterio de aceptación, debe ser rechazado y la curva debe ser recalculada sin modificar la ponderación. Esta operación puede realizarse con un máximo de 2 estándares de calibración por curva siempre y cuando no pertenezcan al mismo nivel ni que sean CP1 (LIC) o CP10 (LSC).
- $\sum ER\%$  debe ser el más bajo posible.
- Las respuestas analíticas de las interferencias que se encuentren cercanas al tiempo de retención de los analitos deben ser menor al 20% de la mostrada para el LIC y del 5% para sus respectivos EI.
- Si el modelo matemático lineal no es adecuado, se debe usar un modelo matemático no lineal considerando curvas de calibración con al menos 8 puntos, con especial atención en las concentraciones más altas.

## Precisión

### **Repetibilidad**

En una placa de polipropileno de 96 pozos, colocar los extractos de una serie de muestras correspondientes a un DB, B, CPs y quintuplicados de LIC, así como para cada nivel de MCC. Para la muestra CCD, aplicar una dilución con cuatro volúmenes de M-472, ausente de los analitos y sus EI, por cada volumen de esa muestra. Inyectar en ese orden y someter a análisis. Calcular el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración recuperada.

### **Reproducibilidad.**

Llevar a cabo lo descrito en repetibilidad cada día, por tres días.

### Criterio de aceptación para precisión

- El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto para el LIC (CP1), el cual debe ser menor o igual que 20%

## Exactitud

Con base en la información obtenida en la prueba de precisión, calcular el porcentaje de desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal utilizando la siguiente ecuación.

$$\%Desviación = \left| \frac{\text{Concentración nominal} - \text{Concentración obtenida}}{\text{Concentración nominal}} \right| * 100\%$$

**Ecuación 5**

### Criterio de aceptación para exactitud

- Se puede considerar al método como exacto si el valor promedio del %D es menor o igual al 20% para el LIC y menor o igual al 15% para los demás CP y MCC.

## Estabilidad

### **En la matriz biológica**

#### A corto plazo

- En refrigeración (2°C a 8°C)

En una placa de polipropileno de 96 pozos, colocar de forma ordenada los extractos de una serie DB, B, CP, así como de un triplicado de CCB y un triplicado de CCA que han sido colocadas en reposo dentro del refrigerador. Inyectar en ese orden y someter a análisis. Con la información resultante, calcular el porcentaje de desviación con respecto a la concentración nominal utilizando la siguiente ecuación. Evaluar el porcentaje de desviación utilizando la siguiente ecuación.

$$\%Desviación = \left| \frac{\text{Concentración en fresco} - \text{Concentración de prueba}}{\text{Concentración en fresco}} \right| * 100\%$$

**Ecuación 6**

#### A ciclos de congelación-descongelación

En una placa de polipropileno de 96 pozos, colocar de forma ordenada los extractos de una serie de DB, B, CP, así como de un triplicado de CCB y un triplicado de CCA que han sido tomadas en la tercera descongelación por completo de tres ciclos de congelación a -70°C por doce horas continuas y sus correspondientes

descongelaciones a temperatura ambiente. Inyectar en ese orden y someter a análisis. Evaluar el porcentaje de desviación con la ecuación 6.

#### A largo plazo

En una placa de polipropileno de 96 pozos, colocar de forma ordenada los extractos de una serie de DB, B, CP, así como de un triplicado de CCB y un triplicado de CCA que han sido tomadas de la descongelación por completo después de una congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  por un tiempo equivalente al que pasará desde que las muestras serán obtenidas hasta el final del estudio. Inyectar en ese orden y someter a análisis. Evaluar el porcentaje de desviación con la ecuación 6.

#### **En la muestra procesada**

##### En el automuestreador ( $10^{\circ}\text{C}$ )

En una placa de polipropileno de 96 pozos, colocar de forma ordenada los extractos de una serie de DB, B, CP, así como un triplicado de CCB y un triplicado de CCA dejadas en reposo dentro del automuestreador del equipo cromatográfico configurado para mantener la temperatura indicada, por 48 horas continuas. Cumplidas las 24 horas, inyectar en ese orden y someter a análisis. Cumplidas las 48 horas, reinyectar en ese orden y someter a análisis. Evaluar el porcentaje de desviación con la ecuación 6.

##### En refrigeración ( $2-8^{\circ}\text{C}$ )

Seguir el mismo procedimiento anterior, solo que almacenando las muestras procesadas en refrigerador y solo por 24 horas.

##### Criterio de aceptación de estabilidad en muestras

El D% promedio para cada nivel debe ser menor o igual al 20% para el LIC y al 15% para CCB y CCA.

#### **En solución**

##### A temperatura ambiente ( $15^{\circ}\text{C}$ a $30^{\circ}\text{C}$ ) por siete días

Utilizando 24 viales de vidrio de 2 mL previamente etiquetados, colocar respectivamente un triplicado de 2 mL de

- Una solución ST-GVM-LSC preparada en fresco.

- Una solución ST-GVM-LSC que, preparada en fresco, se dejó reposar dentro del refrigerador por 24 horas.
- Una solución SP-GLB-LSC preparada en fresco.
- Una solución SP-GLB-LSC que, preparada en fresco, se dejó reposar dentro del refrigerador por 24 horas.

Inyectar en ese orden y someter a análisis. Evaluar el porcentaje de desviación con la siguiente ecuación

$$\%Desviación = \left| \frac{Respuesta\ en\ fresco - Respuesta\ de\ prueba}{Respuesta\ en\ fresco} \right| * 100\%$$

**Ecuación 7**

### Criterio de aceptación

Los porcentajes de desviación promedio de las soluciones recién preparadas y las usadas para la prueba deben ser menores o iguales al 10%.

### Prueba de arrastre

En viales de vidrio de dos mililitros previamente etiquetados, con inserto de 200 µL, colocar los extractos obtenidos por EPP en fresco de un quintuplicado de LIC, un triplicado de DB y un LSC, ordenándolos de tal modo que quede un DB entre los LIC y el LSC, y dos DB después del LSC. Inyectar y someter a análisis.

### Criterio de aceptación para prueba de arrastre

- Las respuestas analíticas próximas al tiempo de retención establecido debidas a interferencias deben ser menores o iguales al 20% de la obtenida en el LIC.
- Las respuestas analíticas próximas al tiempo de retención establecido debidas a interferencias deben ser menores o iguales al 5% de la obtenida para el EI.

### Reproducibilidad de la reinyección

Reinyectar el DB, B, CPs y, por triplicado, CCB, CCM y CCA utilizadas en la repetibilidad. Someter a análisis.

### Criterio de aceptación para reproducibilidad de la reinyección

- El CV% de la concentración recuperada en cada nivel se encuentra dentro del 15%
- El valor promedio del D% para cada nivel se encuentra dentro del 15%

## Resultados y discusiones

### Desarrollo

#### Elección de las condiciones espectrométricas

El modo ionización positiva fue seleccionado debido a que los tres analitos y sus correspondientes estándares internos contienen grupos funcionales en su estructura química, como son las aminas, amidas y ésteres que son capaces de aceptar un protón [H<sup>+</sup>], además de que, según lo observado en la bibliografía, brinda las respuestas más estables. Dado a que el pKa más bajo encontrado corresponde al de GLB (pKa = 5.3 [91]) se decidió utilizar la solución amortiguadora de ácido acético/acetato de amonio ya que tiene un pKa por debajo de ese valor (pKa = 4.76 [92]) y, al ajustar a pH 4, se aseguró la protonación de los analitos.

Tras realizar el barrido espectrométrico con los parámetros por default, se observaron respuestas (picos) en los puntos reportados en otros desarrollos (figura 12), lo que sugirió los valores de m/z para los iones precursores mostrados en la tabla 10.

**Tabla 10. Parámetros espectrométricos de trabajo dependientes del analito**

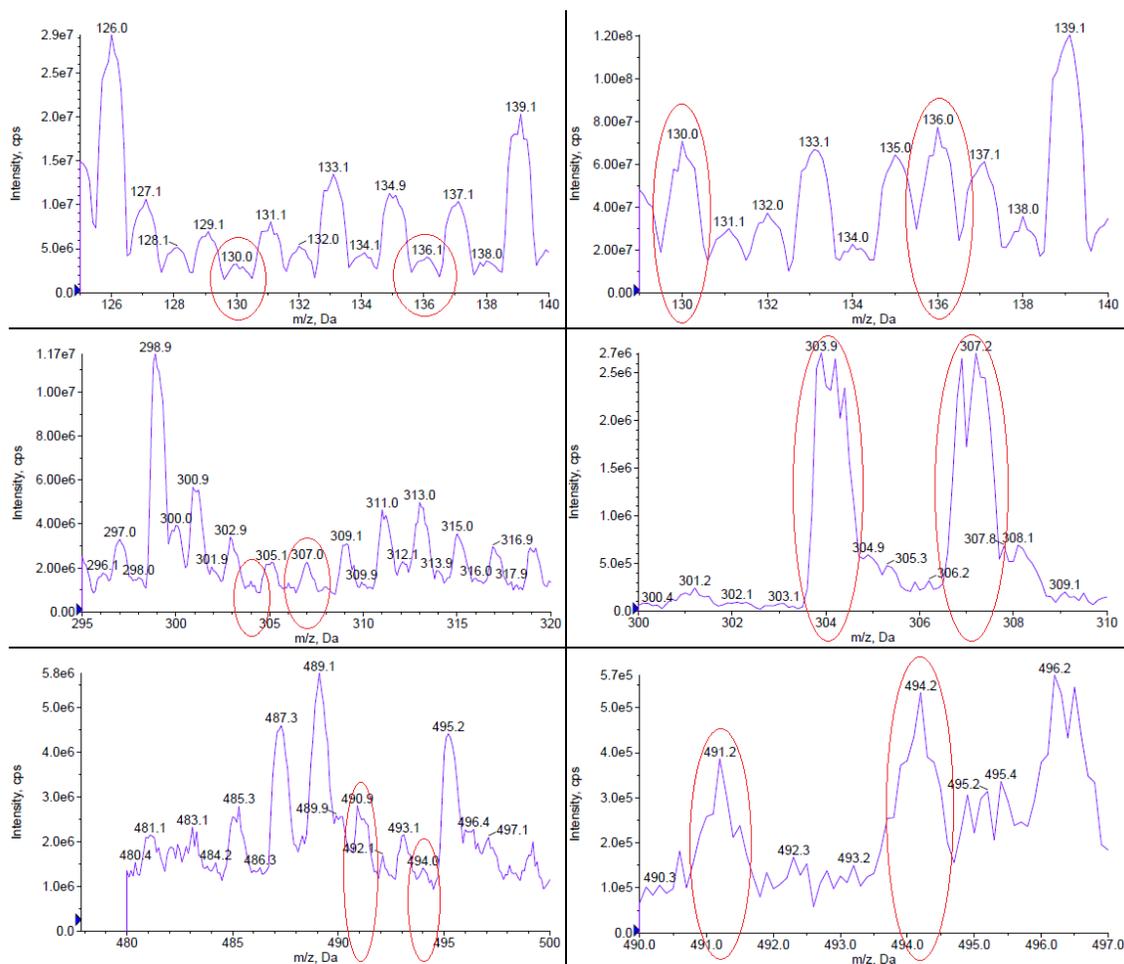
Parámetro	MTF	MTF-D6	VLD	VLD-D3	GLM	GLB
Modo o carga	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Ion precursor	130.0	136.0	304.2	307.2	491.2	494.2
Ion producto	71.1	77.1	154.0	157.1	352.2	369.1
Dwell (ms)	500	500	500	500	300	300
DP (V)	53	50	22	24	33	21
EP (V)	5	3	2	2	4	2
CE (V)	26	26	21	21	20	18
CPX (V)	6	7	5	5	11	13

Un nuevo barrido espectrométrico fue realizado para observar los valores m/z del ion producto para cada uno de los analitos. Se observaron respuestas (picos) en los puntos reportados en otros desarrollos, lo que sugirió los valores mostrados en la tabla 10 para las transiciones a utilizar (figura 13).

La optimización de los parámetros espectrométricos dependientes del analito fueron realizados manteniendo fijos los valores por default del aquellos que son dependientes del flujo (tabla 11). Fue realizado una serie de barridos en los que se variaba un parámetro y se fijaban los demás, cambiando y fijando el valor que marcara el 100% de intensidad. Un ejemplo de ello se muestra en la figura 14. Al repetir este procedimiento por tercera ocasión se observó que todos los valores se mantuvieron constantes, lo que sugirió que los valores obtenidos (tabla 10) son los óptimos.

**Tabla 11. Parámetros espectrométricos de trabajo dependientes del flujo**

CUR (psi)	CAD	IS (V)	TEM (°C)	GS1 (psi)	GS2 (psi)
35	Media	4500	500	40	45



**Figura 12. Espectros obtenidos para la detección y selección de los valores m/z de los iones precursores para MTF/MTF-D6 (arriba), VLD/VLD-D3 (en medio) y GLM/GLB (abajo).**

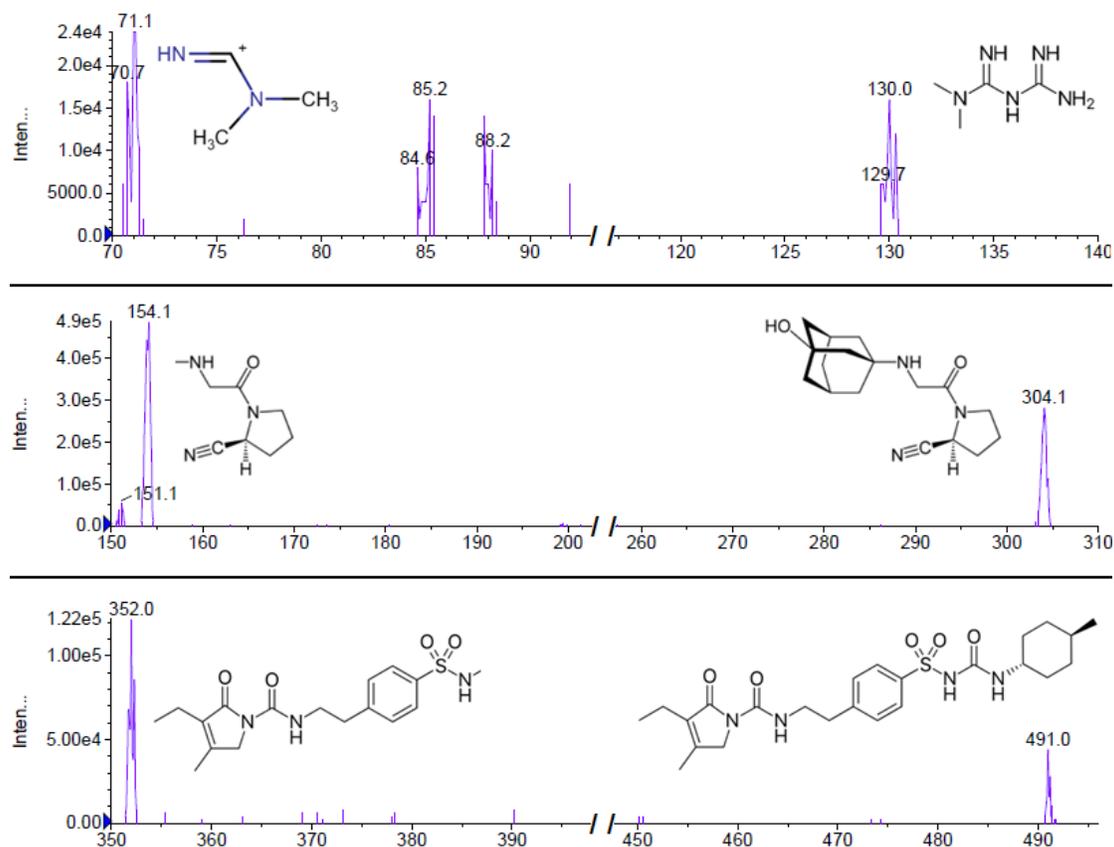


Figura 13. Espectros correspondientes a las transición detectada y seleccionada para MTF (arriba), VLD (en medio) y GLM (abajo).

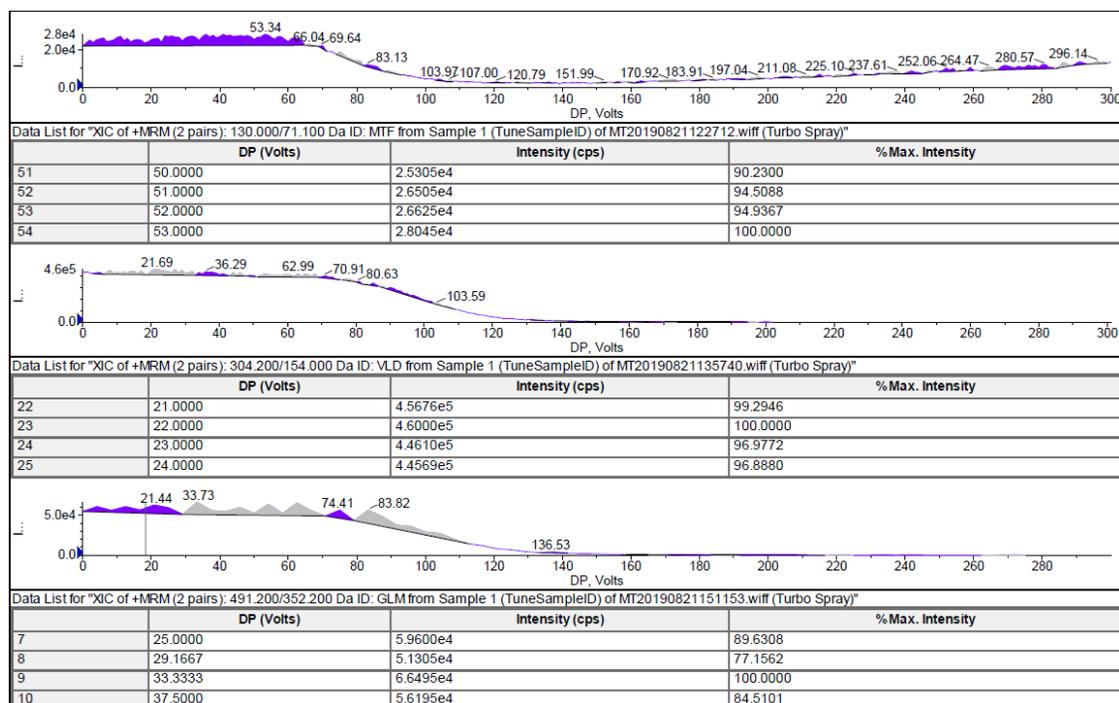


Figura 14. Barrido de intensidad de respuesta obtenido a diferentes DP para MTF (arriba), VLD (en medio) y GLM (abajo).

## Elección del método de extracción y de las condiciones iniciales de trabajo

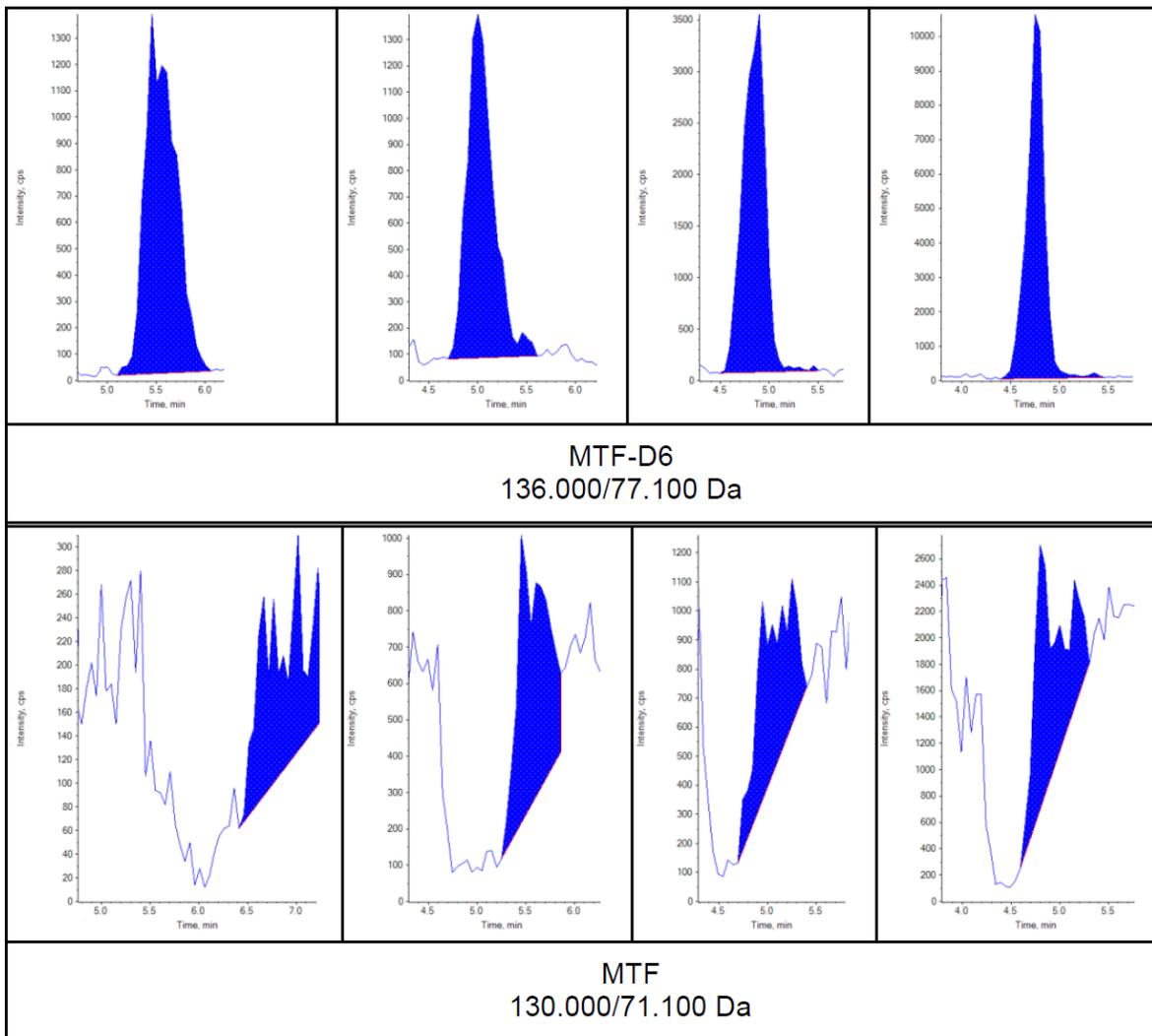
Para elegir el método de extracción más apropiado se recurrió a analizar la frecuencia con la que fueron utilizados la EPP, la ELL y la EFS tanto en los desarrollos con un solo analito de interés como en los que tuvieron 2 o más. Para MTF, de los 6 desarrollos observados, 6 utilizaron la EPP como método de extracción (100%) [63-68]; para VLD, de 6, 2 usaron EPP (33%), 1 usó ELL (17%) y 3 usaron EFS (50%) [69-74] y para GLM de 6, 5 usaron ELL (83%) y 1 usó EFS (17%) [75-80]. Para MTF y VLD de 4, 3 usaron EPP y 1 usó ELL/EFS [81-84]; para MTF y GLM/GLB de 3, 3 utilizaron EPP (100%) [85-87] y para VLD y GLM solo se encontró un desarrollo y se usó ELL para llevar a cabo la extracción [88]. Si bien GLB no es parte del desarrollo, es conveniente tomarlo en cuenta debido a su similitud con GLM. Solo para este compuesto, se encontraron cuatro desarrollos, de los cuales 2 utilizaron EPP [89-90], uno uso ELL [91] y otro EFS [92].

De lo anterior se observó que, siempre y cuando en los desarrollos no incluyeran MTF, las técnicas más utilizadas eran ELL (50%) y EFS (36%). Al incluirlo, el 92% de las veces fue utilizada la EPP. Si bien la extracción de VLD y GLM se dio preferentemente con ELL o EFS, tras incluir MTF en el desarrollo, la preferencia cambió a EPP debido a las dificultades experimentales que implicaba la adaptación de la ELL o EFS a causa de su alta polaridad ( $\text{LogP} = -2.64$ ). Esto sugiere que la presencia de MTF en el desarrollo es determinante en la elección de la técnica de extracción y que es preferente la EPP, motivo por el cual no se consideró conveniente probar otra técnica de extracción.

Posteriormente, se seleccionaron las condiciones de prueba tomando como referencia las técnicas de extracción indicadas en la bibliografía para EPP [63-68, 70, 72, 81-83, 85-87, 93]. En la mayoría de los casos fueron utilizados como agentes precipitantes ACN y ACN/ácido fórmico 0.1% v/v. Los volúmenes utilizados iban desde los de 400 mL hasta los 2 mL. Después de centrifugar, la mayoría no reconstituyó o diluyó y de aquellos que lo hicieron, fue con 1 mL o con menos, siendo ácido fórmico 0.1%/Formiato de amonio la solución diluyente más utilizada. Las alícuotas de muestra procesadas en su mayoría fueron de 200 mL o más. Los

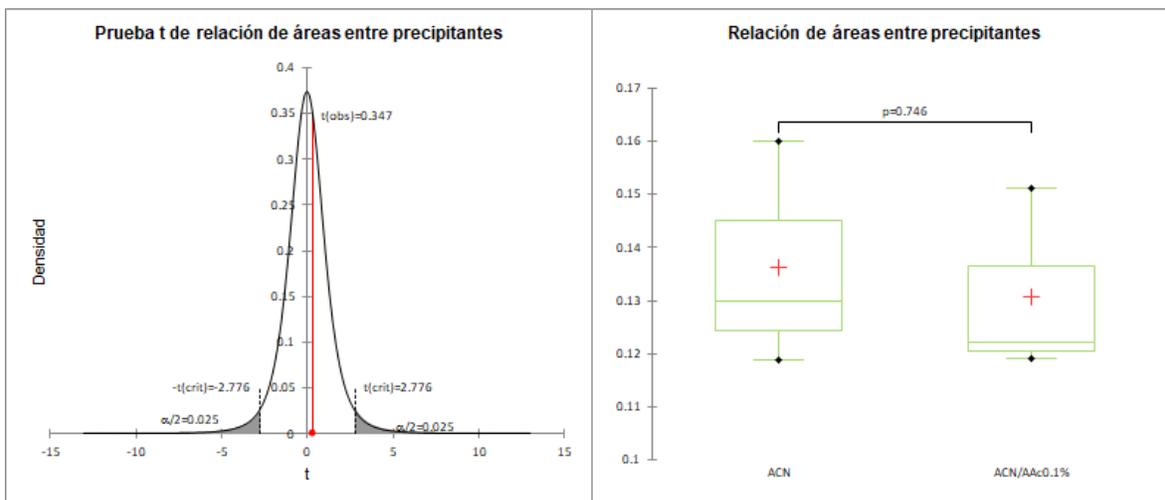
volúmenes de inyección fueron variables, aunque dependientes de las alícuotas tomadas.

Se realizó una prueba rápida de 100  $\mu$ L de una muestra CP1 tanto en plasma como en solución mediante precipitación de proteínas con 1 mL de ACN, variando solamente la proporción acuosa de 20% a 80%. Aunque no se observaron problemas en la obtención de respuesta a VLD y GLM, en MTF fue observada supresión iónica, lo que reforzó el hecho de considerar la elección de las condiciones de extracción de MTF como determinante y preferente. Bajo esta condición, la proporción acuosa 50% mostró una mejor detección de MTF con un tiempo de retención cercano al de su estándar interno sin que los otros analitos se vieran afectados (figura 15).



**Figura 15. Comportamiento en la detección de MTF-D6 (arriba) y MTF (abajo) en una muestra CP1 en plasma, a diferentes proporciones acuosas (20 a 50%, de izquierda a derecha), al inyectar 5  $\mu$ L de muestra.**

Se probaron las condiciones de extracción seleccionadas mediante la observación de diferencias significativas entre las relaciones de área MTF/MTF-D6 obtenidas, siendo la primera aquellas dadas al utilizar ACN como agente precipitante respecto a las obtenidas con ACN/Ácido acético 0.1%. No se encontró evidencia estadísticamente significativa para demostrar diferencia entre la primera condición y la segunda (figura 16), por lo cual se optó por utilizar ACN como agente precipitante.



**Figura 16. Prueba t de Student de la relación de áreas MTF/MTF-D6 entre agentes precipitantes. Diferencias significativas no fueron detectadas.**

Después, se probaron aquellas diferencias dadas al utilizar 1.5 mL de ACN con respecto al uso de 0.4 mL de ACN. Se encontró evidencia estadísticamente significativa para demostrar diferencia entre la primera condición respecto a la segunda, indicando que el uso de 0.4 mL de ACN brindaba una mayor relación de áreas (figura 17), motivo por el cual se decidió utilizar este volumen de agente precipitante.

A continuación, se observó que el uso de la dilución permitió disminuir el ruido base en los cromatogramas, por lo cual se decidió realizar una dilución tras la extracción de dos partes en tres para dar un volumen final de 0.6 mL sin que esto disminuyera la respuesta al analito. Se probó aquellas diferencias dadas al utilizar H<sub>2</sub>O como diluyente con respecto al uso de Acetato de amonio 5 mM pH 4. Se encontró

evidencia estadísticamente significativa para demostrar diferencia entre la primera condición respecto a la segunda, indicando que el uso de H<sub>2</sub>O como diluyente brindaba una mayor relación de áreas (figura 18), motivo por el cual se decidió utilizar este diluyente.

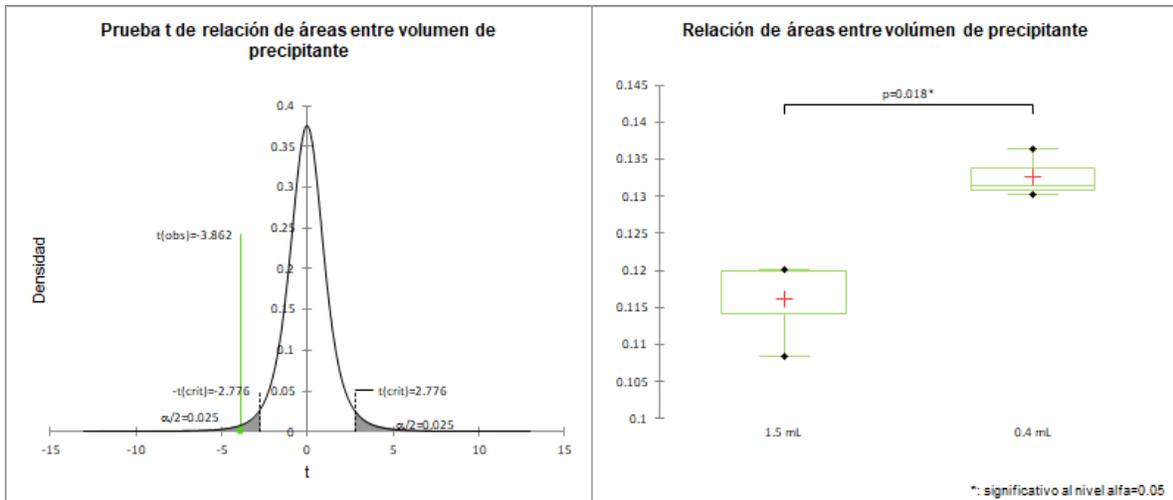


Figura 17. Prueba t de Student de la relación de áreas MTF/MTF-D6 entre agentes precipitantes. Diferencias significativas fueron detectadas siendo la primera condición menor que la segunda condición.

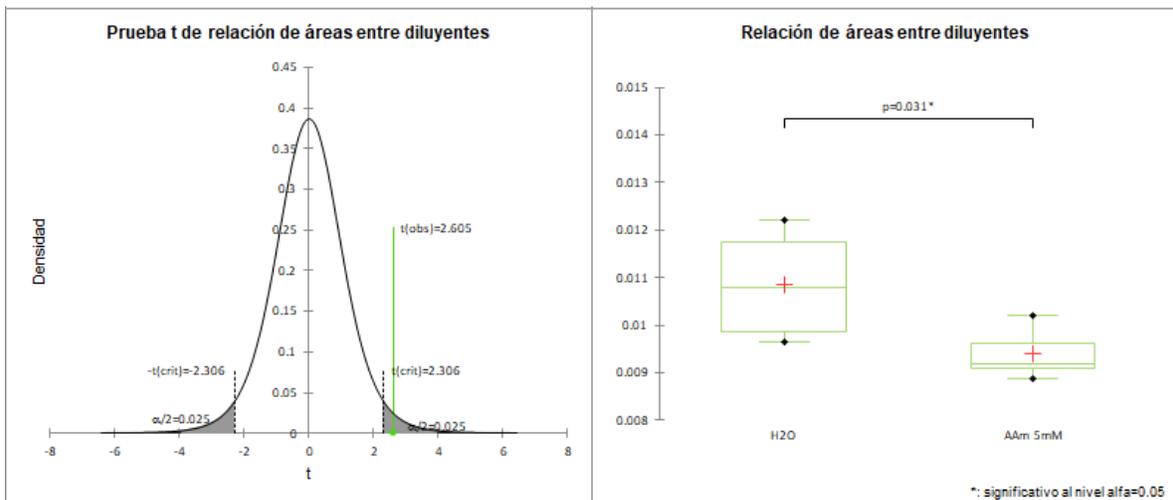


Figura 18. Prueba t de Student de la relación de áreas MTF/MTF-D6 entre agentes precipitantes. Diferencias significativas fueron detectadas siendo la primera condición mayor que la segunda condición.

En resumen, se pueden obtener los tres analitos y sus estándares internos mediante una sola extracción mediante la precipitación de proteínas utilizando ACN siguiendo los pasos que se muestran a continuación:

- Se deben transferir 100  $\mu\text{L}$  de una muestra preparada en fresco, así como 10  $\mu\text{L}$  de la solución EI-IV, a microtubos nuevos previamente etiquetados, y adicionar 400  $\mu\text{L}$  del agente precipitante.
- Agitar estos preparados a 2500 rpm por un minuto en vórtex multitubos y centrifugar a 14000 rpm, 4°C, por 5 minutos. Transferir 100  $\mu\text{L}$  a microtubos nuevos previamente etiquetados, añadir 200  $\mu\text{L}$  del agente diluyente y agitar a 2500 rpm por 1 minuto.
- De la solución resultante, transferir en orden creciente de concentración 200  $\mu\text{L}$  de cada procesado a placas de polipropileno de 96 pozos para inyectarse y someterse a análisis.

### Elección de los valores LIC y LSC

Para MTF con dosis de 1000 mg se encontró como que el  $C_{\text{max}}$  más bajo reportado es de 1101 ng/mL [63], el más alto fue de 3187.6 ng/mL y la DE más alta de 1316.2 ng/mL [64]; para VLD con dosis de 50 mg, fueron 245 ng/mL [73], 308 ng/mL y 87 ng/mL [74], respectivamente; para GLM con dosis de 4 mg fueron 244.37 ng/mL [75], 319 ng/mL y 95.3 ng/mL [28], respectivamente. Tras utilizar la ecuación 1 y 2 se obtuvieron los valores mostrados en la tabla 12. Los CP1 y CP10 propuestos correspondieron a la necesidad de mantenerlos dentro de los límites de cuantificación calculados.

**Tabla 12. Valores LIC y LSC propuestos para la elaboración de CP y MCC**

<b>Analito</b>	<b>LIC calculado (ng/mL)</b>	<b>LSC calculado (ng/mL)</b>	<b>CP1 propuesto (ng/mL)</b>	<b>CP10 propuesto (ng/mL)</b>
MTF	10.76	9007.60	20	8000
VLD	7.90	664.00	5	700
GLM	7.45	828.60	5	900

Se decidió que las muestras CP y MCC en plasma tuvieran un volumen final de 500  $\mu\text{L}$  como mínimo necesario para realizar al menos tres repeticiones en caso de errores de procesamiento. Las cantidades de la solución de trabajo y de plasma a utilizar se fijaron en 475  $\mu\text{L}$  y 25  $\mu\text{L}$ , respectivamente, para cumplir con lo establecido en la normativa [62] y para hacer más sencilla la preparación de los CPs y CCMs (tabla 13).

**Tabla 13. Rango diluciones y concentraciones de CP y MCC en plasma y en solución**

Solución de trabajo	Alícuota de ST (µL)	Alícuota plasma (µL)	Volumen final (µL)	Muestra plasma preparada	Concentración teórica (ng/mL)		
					MTF	VLD	GLM
CP1	25	475	500	CP1	20	5	5
CP2	25	475	500	CP2	40	10	10
CCB	25	475	500	CCB	60	15	15
CP3	25	475	500	CP3	100	20	40
CP4	25	475	500	CP4	150	40	90
CCBB	25	475	500	CCBB	250	50	125
CP5	25	475	500	CP5	500	150	150
CP6	25	475	500	CP6	1000	200	250
CCM	25	475	500	CCM	2000	250	300
CP7	25	475	500	CP7	3000	350	425
CP8	25	475	500	CP8	5000	450	600
CCA	25	475	500	CCA	6000	550	675
CP9	25	475	500	CP9	7000	600	775
CP10	25	475	500	CP10	8000	700	900
CCD	25	475	500	CCD	10000	1400	1800

### Elección de las condiciones cromatográficas

De los 13 desarrollos revisados en los que MTF fue procesado [63-68, 81-83, 85-87, 93], 9 utilizaron la elución isocrática (69%) y 4 en gradiente (31%), dependiendo de la cantidad de analitos a separar. Como fase móvil, fueron usados ácido fórmico/ACN, ácido fórmico/formiato de amonio/ACN y ácido acético/acetato de amonio/ACN (23%). El rango de proporciones de la fase acuosa/fase orgánica en la elución isocrática va de 20:80 a 80:20, siendo 50:50 y 30:70 los más ocupados; en la elución en gradiente, la fase acuosa va de 0 a 100%. Como fase estacionaria, se utilizaron columnas C18, CN e HILIC. Las temperaturas de columna más utilizadas fueron 20, 25 y 40°C, aunque se ha detectado que entre 20 y 30°C no hay diferencias importantes [82]. El rango de pH utilizado va de 3.0 a 4.5

Se eligió como fase móvil acetato de amonio 5 mM pH 4 : ACN con el fin de hacerla compatible con los disolventes utilizados en las pruebas anteriores y con ello, además de no introducir más variables, mantener lo más sencillo posible el procedimiento. Tras los barridos con proporciones de 20:80 a 80:20, fijando la

temperatura de columna en 35°C, la fase estacionaria con una columna Zorbax eclipse XDB-Phenyl 250x4.6 mm, 5µm, la velocidad de flujo en 0.3 mL/min y elución isocrática, se observó que a partir de 60% de fase acuosa, la retención de GLM superó los 10 min y que los tiempos de retención de MTF y GLM actuaron de forma recíproca, mientras que para VLD aparentó ser indiferente (tabla 14). Lo que sugirió que, además de reducir el valor máximo de esta proporción a 50%, el desarrollo debía contemplar la variación entre estos dos analitos.

**Tabla 14. Tiempos de retención obtenidos tras variar dos proporciones de acetato de amonio 5mM pH 4**

Proporción de fase acuosa (%)	Tiempo de retención (min)					
	MTF	MTF-D6	VLD	VLD-D3	GLM	GLB
20	4.470	4.460	2.190	2.190	1.730	1.724
50	1.729	1.700	1.830	1.810	7.211	7.04
Diferencia	2.741	2.760	0.360	0.380	5.481	5.316

Tras el análisis del número de platos mediante el diseño experimental 3<sup>2</sup> (tabla 15), se observaron varias diferencias entre tratamientos, siendo las más significativas la interacción del analito con las proporciones (AC), el analito (C), la proporción de la fase acuosa (A) y la interacción del analito con la fase acuosa (BC). La interdependencia entre los tres factores fue despreciable (tabla 16).

**Tabla 15. Diseño experimental de tres factores, dos niveles, y los resultados obtenidos**

Diseño experimental 3 <sup>2</sup>	3	Factores	con	2	niveles
	Diseño experimental 3 <sup>2</sup>	A	Proporción fase acuosa		A-
A+					50
B		Fase acuosa		B-	AAm(5mM):ACN
				B+	AFo(0.1%):ACN
C		Analito		C-	MTF
				C+	GLM

Nivel codificado	Factor			Número de platos teóricos (N)			Nobs	Media
	A	B	C	1	2	3		
-1	-1	-1	-1	1579	1587	1570	3	1579
1	-1	-1	-1	425	421	433	3	426
-1	1	-1	-1	546	527	518	3	530

	Factor			Número de platos teóricos (N)			Nobs	Media
	A	B	C	1	2	3		
	1	1	-1	299	291	294	3	295
	-1	-1	1	532	534	530	3	532
	1	-1	1	2555	2564	2563	3	2561
	-1	1	1	1208	1203	1213	3	1208
	1	1	1	4109	4162	4143	3	4138

Tabla 16. Resultados del ANOVA que valoró la proporción de la fase acuosa, la fase acuosa, el analito y sus interacciones.

ANOVA con probabilidad de 99.9%			
Factor	Fcalc	Fcrit	Significativo
A	<b>34007.4</b>	16.1	Sí
B	3069.1	16.1	Sí
AB	8816.3	16.1	Sí
C	<b>83910.9</b>	16.1	Sí
AC	<b>107420.5</b>	16.1	Sí
BC	<b>31440.8</b>	16.1	Sí
ABC	0.7	16.1	No

Al simular los comportamientos de los analitos conforme al diseño factorial, se observó que las interacciones AC y BC de MTF son recíprocas a las de GLM, reforzando el hecho de que la mejora en la eficiencia de separación del primero implicaba empeorar la del segundo y viceversa. Para VLD (C = -0.21) se detectó que los cambios en los factores no representaron diferencias importantes (figura 19). Existe una mayor libertad con GLM para modificar las condiciones cromatográficas sin que el número de platos teóricos sea menor a 2000, en comparación con MTF. Esto, junto con lo ya mostrado en los anteriores puntos, sugirió elegir condiciones cromatográficas que permitieran mejorar eficiencia de separación de MTF hasta donde la de GLM lo permitiera. Se optó por utilizar como fase acuosa acetato de amonio 5 mM pH 4 y una elución en gradiente en la que la mayor parte del tiempo la proporción acuosa fuera del 80%.

Posteriormente, fue probado el comportamiento de MTF y GLM en dos columnas cromatográficas (Zorbax SB-CN y Polaris C18-A, ambas de 150x4.6, 5µm) El tiempo de las pruebas se fijó en 10 minutos y el flujo en 0.3 mL/min, bajo elución isocrática.

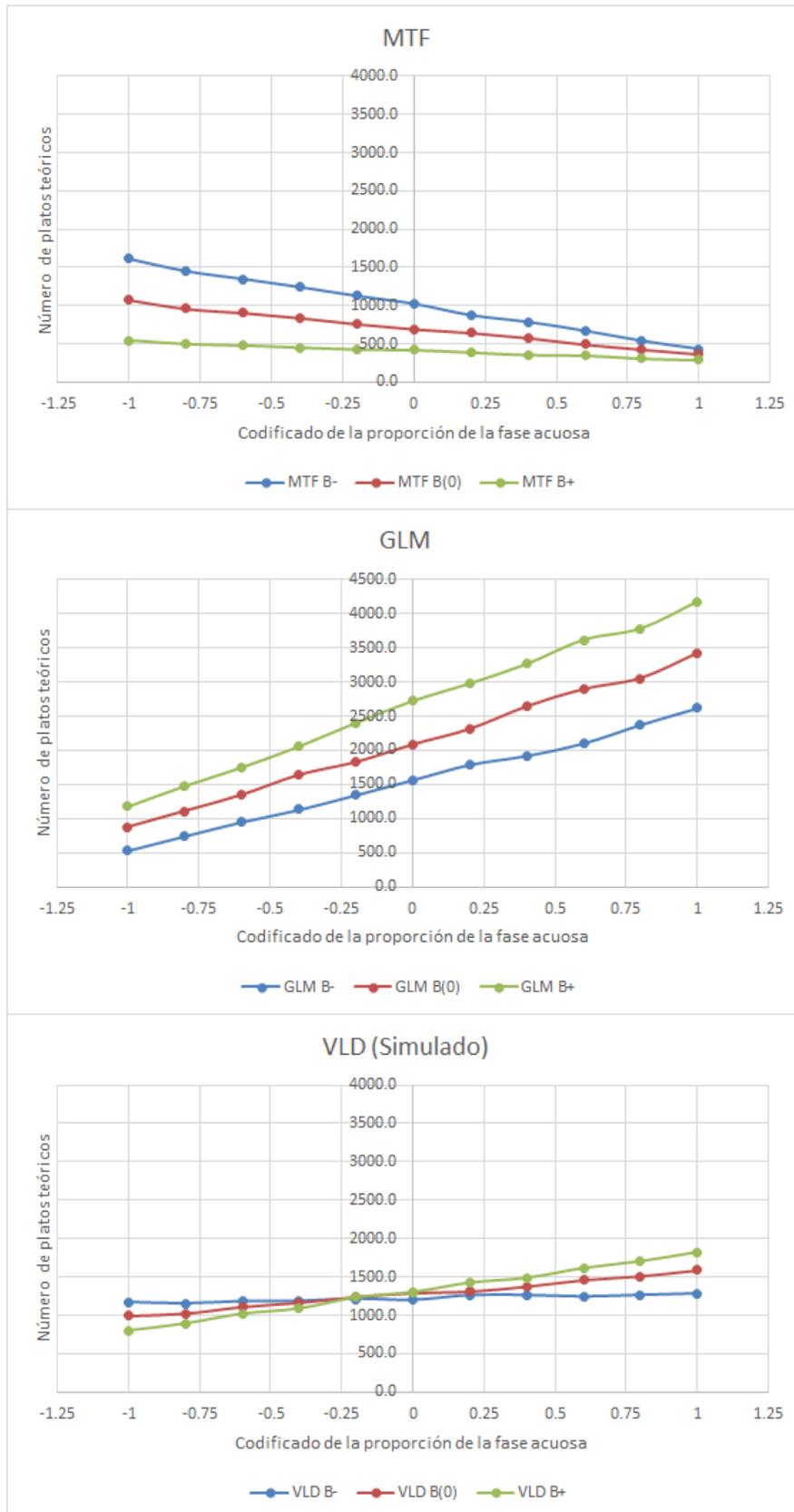


Figura 19. Comportamiento simulado por analito del número de platos teóricos al variar tanto la proporción de la fase móvil de 20% (-1) al 50% (+1) como la fase acuosa en sí, donde B- corresponde a acetato de amonio 5 mM pH 4 y B+ a ácido fórmico 0.1%, C- a MTF y C+ a GLM.

Se observó que con la columna SB-CN la retención de GLM fue cercana a los 2 minutos e incrementó al disminuir la proporción acuosa; para MTF, fue cercana a los 8 minutos y fue disminuyendo conforme incrementó la proporción acuosa. Con la columna C18-A, se invirtió el comportamiento, siendo parecido al del experimento anterior. El tiempo de retención más bajo para MTF fue con la proporción acuosa 50%, mientras que para GLM fue con 20%. El número de platos teóricos fue mayor para ambos analitos con la columna C18-A (figura 20). La regularidad en la respuesta fue mayor con la columna C18-A. El ruido base fue menor con la columna C18-A.

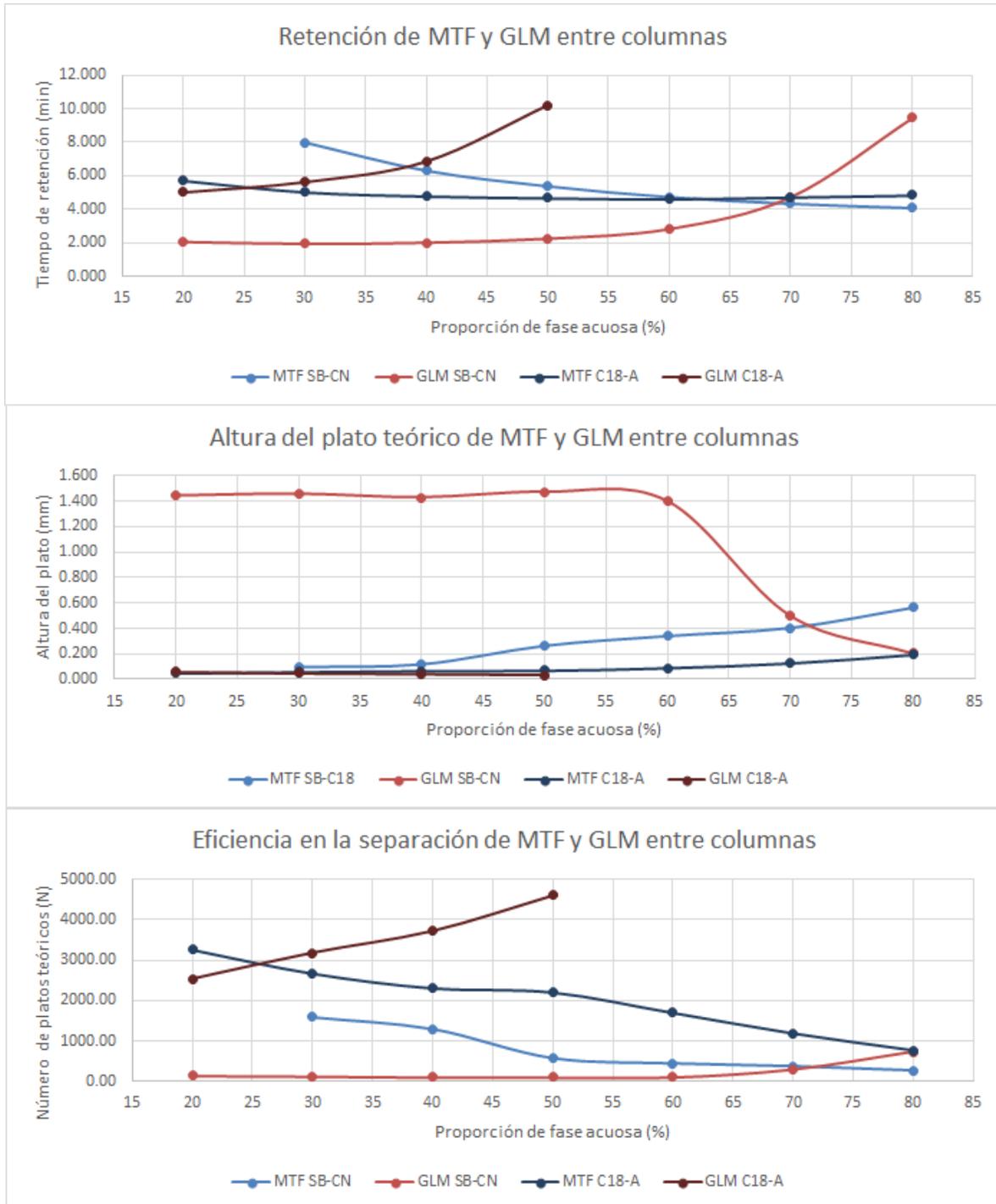
Esto sugirió que la columna Polaris C18-A podría ser la fase estacionaria más apropiada para la separación de los tres analitos, usando acetato de amonio 5mM pH 4 : ACN como fase móvil, en una proporción de fase acuosa de 50% para MTF y 20% para GLM. Una elución en gradiente podría mejorar la separación.

Se probó la elución en gradiente con una velocidad de flujo de 0.8 mL/min y temperatura de columna a 40°C, logrando con ello disminuir la retención de MTF, VLD y GLM, quedando en 1.74, 1.82 y 4.16 minutos, respectivamente (figura 21). Para incrementar la intensidad de respuesta de la muestra extraída del plasma, sobre todo para MTF, se decidió inyectar 10 µL de muestra en vez de 5 µL.

A manera de resumen, en la tabla 12 se muestran las condiciones cromatográficas elegidas.

**Tabla 17. Parámetros cromatográficos de trabajo**

Parámetro	MTF	MTF-D6	VLD	VLD-D3	GLM	GLB
Fase estacionaria	Polaris C18-A					
Medidas (mm,µm)	150x4.6, 5					
Fase móvil	Acetato de amonio 5mM (pH 4): ACN					
Proporción (v/v%)	50:50			20:80 --> 50:50		
Periodo (min)	0 --> 1.7			1.7 -->	3.8 -->	
				3.80	5.0	
Fase de lavado	H2O:ACN (50:50 v/v%)					
Flujo (mL/min)	0.8					
Vinyección (µL)	10					
Tcolumna (°C)	40					
tr (min)	1.74	1.73	1.82	1.82	4.17	4.03



**Figura 20. Comportamientos en el tiempo de retención (arriba), en la altura del plato (en medio) y en la eficiencia en la separación (abajo) de MTF (azules) y GLM (rojos), con las columnas SB-CN (claros) y C18-A (oscuros), a diferentes proporciones de fase acuosa.**

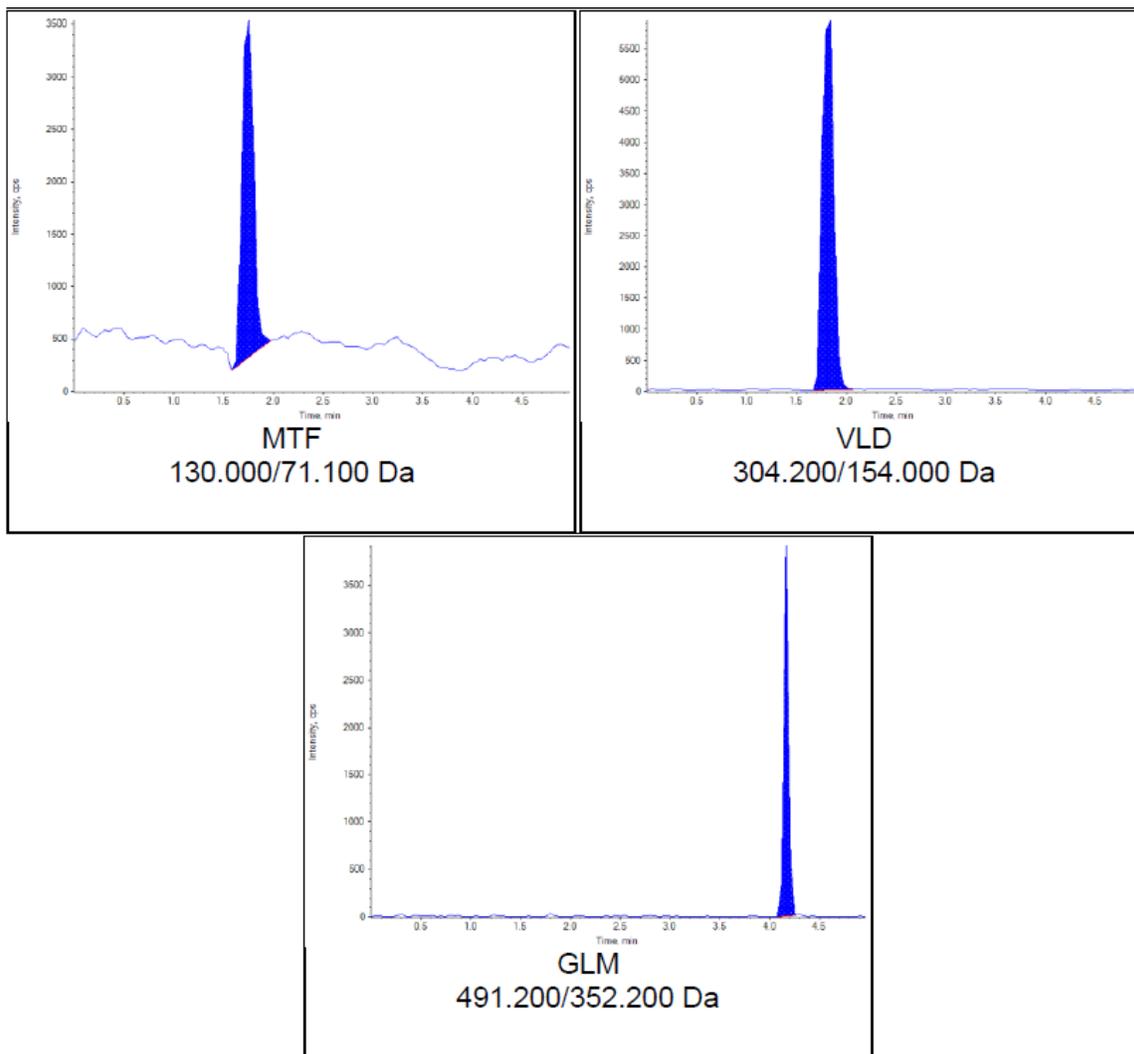


Figura 21. Cromatogramas obtenidos para MTF, VLD y GLM al utilizar acetato de amonio 5 mM pH 4 como fase móvil, la columna Polaris C18-A como fase estacionaria y elución en gradiente 50%-80%-50% de fase acuosa, con velocidad de flujo de 0.7 mL/min.

## Validación

### Adecuabilidad

Se probó la adecuabilidad en los siete días de la validación del método desarrollado mediante el porcentaje de variación en la relación de áreas y los tiempos de retención de MTF, VLD y GLM.

No se observó que el coeficiente de variación superara el límite del 10% establecido por la norma (tabla 18).

**Tabla 18. Porcentajes de variación en las pruebas de adecuabilidad a lo largo de la validación del método**

Prueba de adecuabilidad a lo largo de la validación										
Día de prueba	Relación de áreas (CV%)			Criterio	Dictamen	Tiempo de retención (CV%)			Criterio	Dictamen
	MTF	VLD	GLM			MTF	VLD	GLM		
1	2.91	1.12	9.93	CV%≤10%	Cumple	0.057	0.055	0.07	CV%≤10%	Cumple
2	1.36	2.95	6.73	CV%≤10%	Cumple	0.114	0.055	0.07	CV%≤10%	Cumple
3	2.79	1.80	2.15	CV%≤10%	Cumple	0.228	0.164	0.047	CV%≤10%	Cumple
4	3.72	1.40	1.37	CV%≤10%	Cumple	0.057	0.109	0.047	CV%≤10%	Cumple
5	3.94	4.43	2.73	CV%≤10%	Cumple	0.112	0.054	0.141	CV%≤10%	Cumple
6	2.64	5.24	2.82	CV%≤10%	Cumple	0.113	0.108	0.094	CV%≤10%	Cumple
7	2.58	4.04	5.29	CV%≤10%	Cumple	0.057	0.108	0.024	CV%≤10%	Cumple

### Efecto matriz

Se probó el efecto de la matriz biológica normal, lipémica y hemolizada mediante el porcentaje de variación del factor matriz normalizado (FMN) obtenido de la relación de áreas en cada uno de los analitos.

No se observó que el coeficiente de variación superara el límite del 15% establecido por la norma (Anexo 2).

### Curva de calibración, linealidad y modelo matemático

Se probó la correlación entre las concentraciones propuestas y la respuesta obtenida, así como la exactitud de la regresión de cuatro modelos matemáticos para cada uno de los analitos, mediante el coeficiente de correlación, el porcentaje de variación y el porcentaje de error.

Respecto a la correlación, no se observó que el coeficiente de correlación fuera menor a lo establecido en la norma para ningún analito en alguno de los modelos probados (Anexo 3).

En la exactitud de la regresión se observó que el modelo sin ponderar no cumplió con lo establecido en la normativa para ninguno de los analitos y en los tres restantes no se observaron valores que excedieran lo establecido (Anexo 4). La menor  $\sum ER\%$  se observó en la ponderación  $1/x^2$  con valores de 21.9%, 36.5% y 18.9% para MTF, VLD y GLM, respectivamente, siendo significativo el cambio de

modelo para VLD. Por tanto, se consideró apropiado el uso de este modelo matemático.

### Precisión y exactitud

Se probó la precisión y la exactitud mediante el porcentaje de variación y el porcentaje de desviación, respectivamente, utilizando la información obtenida en las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad.

En la repetibilidad no se observó que, para los tres analitos, el porcentaje de variación excediera lo establecido en la normativa (Anexo 5), por lo que se consideró repetible. Lo mismo fue observado para la prueba de reproducibilidad (Anexo 6).

En la exactitud, no se observó que, para los tres analitos, el porcentaje de desviación excediera lo establecido en la normativa (tabla 19).

**Tabla 19. Porcentajes de desviación promedio correspondientes a la información obtenida en las pruebas de repetibilidad (1 set) y reproducibilidad (3 sets)**

Muestra	Porcentaje de desviación (%D)				Dictamen
	MTF	VLD	GLM	Criterio	
CP1	9.13	7.09	6.08	D%≤20	Cumple
CCB	4.39	7.47	6.10	D%≤15	Cumple
CCBB	5.28	6.83	4.22	D%≤15	Cumple
CCM	4.30	3.87	4.32	D%≤15	Cumple
CCA	3.19	3.67	5.89	D%≤15	Cumple
CCD	4.00	4.37	3.82	D%≤15	Cumple

### Estabilidad

#### En solución

Se probó la estabilidad de los analitos en solución tanto a temperatura ambiente (21-25°C) como bajo refrigeración (4-8°C) mediante el porcentaje de desviación entre la respuesta analítica de soluciones recién preparadas (referencia) y soluciones sometidas a tales condiciones por siete días (prueba), obtenido del promedio de respuestas generadas por triplicado.

No se observó que en algún analito se excediera el límite establecido por la normativa para la solución de trabajo bajo estas condiciones (Anexo 7).

## A corto plazo

### En matriz biológica

Se probó la estabilidad de los analitos en matriz biológica bajo refrigeración por 24 h, así como bajo 3 ciclos de congelación-descongelación (a -70°C y a 21-24°C) mediante el porcentaje de desviación respecto a la concentración nominal.

No se observó que en algún analito se superara el límite establecido en la normativa bajo estas condiciones (Anexo 7)

### En muestra procesada

Se probó la estabilidad de los analitos en muestra procesada bajo automuestreador (10°C) y bajo refrigeración mediante el porcentaje de desviación respecto a la concentración nominal. No se observó que en algún analito se excediera el límite establecido por la normativa bajo estas de las condiciones (Anexo 8).

## A largo plazo

Se probó la estabilidad de los analitos en muestra procesada bajo ultracongelación (-70°C) a tres meses mediante el porcentaje de desviación respecto a la concentración nominal.

No se observó que en algún analito se excediera el límite establecido por la normativa bajo alguna de las condiciones (tabla 20).

**Tabla 20. Porcentajes de desviación respecto a la concentración nominal obtenidos para la prueba de estabilidad a largo plazo bajo ultracongelación**

Estabilidad	Nivel	Analito	Concentración (ng/mL)		D%	Criterio	Dictamen
			Nominal	Prueba			
En ultra-congelación (-70°C) por 3 meses	Bajo	MTF	60.00	54.46	9.23	D%≤15%	Cumple
		VLD	15.00	14.68	2.16	D%≤15%	Cumple
		GLM	15.00	14.51	3.24	D%≤15%	Cumple
	Alto	MTF	6000.00	5945.28	0.91	D%≤15%	Cumple
		VLD	550.00	506.32	7.94	D%≤15%	Cumple
		GLM	675.00	626.05	7.25	D%≤15%	Cumple

## Acarreo o arrastre

Se probó el efecto de acarreo o arrastre en la corrida analítica mediante el porcentaje de respuesta a los analitos y sus respectivos estándares internos respecto al CP1 o LIC.

No se observó que en algún analito se superara el límite establecido por la normativa para alguno de los tres doble blanco probados (tabla 21).

**Tabla 21. Respuesta obtenida durante la prueba de acarreo y los porcentajes de respuesta respecto al LIC o CP1 de los doble blanco probados.**

Muestra	Área del pico (cps)					
	MTF	VLD	GLM	MTF-D6	VLD-D3	GLB
CP1	12335.81	11684.52	6783.30	1173342.72	961249.99	530967.81
DB1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
CP10	3157073.37	2199685.27	1466585.42	763119.20	888858.71	568969.09
DB2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
DB3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Muestra	Porcentaje de respuesta respecto al LIC (R%)					
	MTF	VLD	GLM	MTF-D6	VLD-D3	GLB
DB1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
DB2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
DB3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Criterio	R%≤20%	R%≤20%	R%≤20%	R%≤5%	R%≤5%	R%≤5%
Dictamen	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple

## Reproducibilidad de la reinyección

Se probó la reproducibilidad de la reinyección en el mismo día mediante los porcentajes de variación y de desviación respecto a la concentración nominal en seis niveles de concentración: LIC, CCB, CCBB, CCM, CCA y CCD (Anexo 9).

No se observó que en algún analito se excedieran los límite establecido por la normativa para alguno de los seis niveles probados (Anexo 10).

## Resumen de la validación

A manera de resumen, se muestran en la tabla 22 las pruebas realizadas, los criterios de aceptación, los resultados por analito y el dictamen correspondiente. En todos los casos se cumple con lo establecido por la normativa.

**Tabla 22. Pruebas, criterios de aceptación y dictámenes de la prueba de validación**

Prueba		Criterio NOM-177	Analito			Dictamen
			MTF	VLD	GLM	
Adecuabilidad		%CVA ≤ 10%	2.91	1.12	9.93	Cumple
		%CV <sub>tr</sub> ≤ 2%	0.057	0.055	0.07	
Selectividad	De inicio	%R <sub>(BR,DB,B)</sub> ≤ 0.20*%R <sub>LIC</sub>	0.00	0.32	0.00	Cumple
		%R <sub>(BR,DB,B)</sub> ≤ 0.05*%R <sub>EI</sub>	0.00	0.00	0.00	
	A la matriz biológica	%R <sub>(BR,DB,B)</sub> ≤ 0.20*%R <sub>LIC</sub>	0.00	0.00	0.00	Cumple
		%R <sub>(BR,DB,B)</sub> ≤ 0.05*%R <sub>EI</sub>	0.00	0.00	0.00	
	A fármacos de uso común y concomitantes	%R <sub>(BR,DB,B)</sub> ≤ 0.20*%R <sub>LIC</sub>	0.00	0.00	0.00	Cumple
		%R <sub>(BR,DB,B)</sub> ≤ 0.05*%R <sub>EI</sub>	0.00	0.00	0.00	
A fármacos coformulados	%R <sub>(BR,DB,B)</sub> ≤ 0.20*%R <sub>LIC</sub>	0.00	0.00	0.00	Cumple	
	%R <sub>(BR,DB,B)</sub> ≤ 0.05*%R <sub>EI</sub>	0	0	0		
Efecto matriz	Plasma normal, lipémico y hemolizado	%CV <sub>FMN(CCB)</sub> ≤ 10%	5.76	4.90	5.28	Cumple
		%CV <sub>FMN(CCA)</sub> ≤ 10%	3.30	3.90	4.67	
Curva de calibración, linealidad y modelo matemático		NP, 1/x, 1/y, 1/x <sup>2</sup>	1/x <sup>2</sup>	1/x <sup>2</sup>	1/x <sup>2</sup>	NA
		r ≥ 0.99	0.9973	0.9982	0.9956	Cumple
		∑ER%	21.90	36.50	18.90	
Precisión	Repetibilidad	%CV <sub>CP1</sub> ≤ 20%	8.67	3.32	3.86	Cumple
		%CV <sub>CCB</sub> ≤ 15%	3.38	3.69	11.56	
		%CV <sub>CCBB</sub> ≤ 15%	6.82	7.50	6.81	
		%CV <sub>CCM</sub> ≤ 15%	4.94	4.15	3.88	
		%CV <sub>CCA</sub> ≤ 15%	2.62	2.34	1.87	
	Reproducibilidad	%CV <sub>CCD</sub> ≤ 15%	5.28	4.19	4.53	Cumple
		%CV <sub>CP1</sub> ≤ 20%	10.20	8.18	7.54	
		%CV <sub>CCB</sub> ≤ 15%	5.39	5.29	7.67	
		%CV <sub>CCBB</sub> ≤ 15%	5.77	6.25	5.82	
		%CV <sub>CCM</sub> ≤ 15%	4.87	4.10	5.81	
Exactitud		%CV <sub>CCA</sub> ≤ 15%	3.79	4.28	6.63	Cumple
		%CV <sub>CCD</sub> ≤ 15%	4.00	4.88	4.91	
		%D <sub>CP1</sub> ≤ 20%	9.80	8.19	5.97	
		%D <sub>CCB</sub> ≤ 15%	4.24	5.69	5.99	
		%D <sub>CCBB</sub> ≤ 15%	4.89	5.10	4.16	
		%D <sub>CCM</sub> ≤ 15%	4.63	3.08	4.28	
Estabilidad en matriz biológica	A corto plazo	%D <sub>CCA</sub> ≤ 15%	3.28	3.96	5.96	Cumple
		%D <sub>CCD</sub> ≤ 15%	3.53	3.79	3.86	
		%D <sub>CP1</sub> ≤ 20%	4.03	3.09	5.06	
	%D <sub>CCB</sub> ≤ 15%	2.94	37.85	6.02		
	En refrigeración	%D <sub>CCA</sub> ≤ 15%	4.89	0.04	4.73	Cumple
		%D <sub>CP1</sub> ≤ 20%	4.03	3.09	5.06	

Prueba		Criterio NOM-177	Analito			Dictamen
			MTF	VLD	GLM	
	Ciclos de congelación-descongelación	%DCCB ≤ 15%	6.49	9.40	2.17	Cumple
		%DCCA ≤ 15%	2.60	6.42	5.19	
		%D <sub>CP1</sub> ≤ 20%	2.47	0.00	4.05	
		%DCCB ≤ 15%	0.00	0.00	0.00	
	A largo plazo	%D <sub>CP1</sub> ≤ 20%	1.57	3.68	2.56	Cumple
		%DCCB ≤ 15%	0.00	0.00	0.00	
		%DCCA ≤ 15%	0.00	0.00	0.00	
		%D <sub>CP1</sub> ≤ 20%	4.03	3.09	5.06	
Estabilidad en la muestra procesada	En el auto-muestreador	%DCCB ≤ 15%	8.08	2.11	9.63	Cumple
		%DCCA ≤ 15%	1.10	9.86	6.02	
		%D <sub>CP1</sub> ≤ 20%	2.47	0.00	4.05	
	En refrigeración	%DCCB ≤ 15%	4.58	0.07	11.18	Cumple
		%DCCA ≤ 15%	0.09	6.96	5.94	
		%D <sub>ST-LSC</sub> ≤ 15%	0.71	4.94	0.44	
A temperatura ambiente por 7 días	%D <sub>ST-LSC</sub> ≤ 15%		0.71	4.94	0.44	Cumple
		%D <sub>SP-GLB-LSC</sub> ≤ 15%		5.42		Cumple
	En refrigeración por 7 días	%D <sub>ST-LSC</sub> ≤ 15%	7.89	4.05	6.38	Cumple
		%D <sub>SP-GLB-LSC</sub> ≤ 15%		4.88		Cumple
Arrastre	%R <sub>DB</sub> ≤ 20%	0.00	0.00	0.00	Cumple	
	%R <sub>DB</sub> ≤ 5%	0.00	0.00	0.00		
Reproducibilidad de la reinyección	%CV <sub>CP1</sub> ≤ 20%	6.03	5.83	8.44	Cumple	
	%CV <sub>CCB</sub> ≤ 15%	4.86	5.14	6.70		
	%CV <sub>CCBB</sub> ≤ 15%	3.42	3.87	5.82		
	%CV <sub>CCM</sub> ≤ 15%	3.35	4.03	5.66		
	%CV <sub>CCA</sub> ≤ 15%	3.03	5.02	6.79		
	%CV <sub>CCD</sub> ≤ 15%	4.27	5.39	8.17		
	%D <sub>CP1</sub> ≤ 20%	1.27	5.47	5.09	Cumple	
	%DCCB ≤ 15%	1.74	2.54	6.02		
	%DCCBB ≤ 15%	6.46	0.76	0.31		
	%DCCM ≤ 15%	0.19	1.53	2.13		
	%DCCA ≤ 15%	2.55	0.82	1.45		
	%DCCD ≤ 15%	0.59	0.55	0.36		

## Conclusiones

Se desarrolló un método analítico que permite bajo la misma extracción y corrida analítica, la cuantificación de metformina, vildagliptina y glimepirida en plasma humano a través de HPLC-MS/MS, utilizando un equipo Shimadzu Prominence UFLC acoplado a un espectrómetro de masas AB Sciex QTrap API 4500.

La técnica de extracción utilizada fue la precipitación de proteínas utilizando 400  $\mu$ L de acetonitrilo, diluyendo con agua grado HPLC hasta un volumen final de 600  $\mu$ L. Las condiciones cromatográficas con las cuales separar los analitos del resto de componentes presentes en el plasma correspondieron a una elución en gradiente de 10  $\mu$ L de la muestra procesada partiendo de una proporción 50:50 %v/v a 20:80 %v/v de acetato de amonio 5 mM pH 4/acetonitrilo como fase móvil, con una velocidad de flujo de 0.8 mL/min, usando la columna Polaris C18-A 150x4.6mm, 5 $\mu$ m, a 40°C, utilizando como detector un equipo MS/MS. Este desarrollo tiene como principales ventajas que es relativamente sencillo, que puede llevarse a cabo por una sola persona y que es rentable, pues permite ahorrar una mayor cantidad de materiales y de tiempo en comparación con otros métodos, brindando resultados confiables a muy bajas concentraciones.

Bajo las condiciones cromatográficas y espectrométricas especificadas, se cumplieron satisfactoriamente los parámetros de desempeño del método establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM 177-SSA1-2013. Con esto queda respaldada la confiabilidad del método desarrollado para ser utilizado en las pruebas bioanalíticas que lo requieran.

## Referencias

- 1) Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Fauci AS, Longo DL, Loscalzo J (2015) Harrison. Principios de medicina interna Vol. 2 19ª Ed. 2422
- 2) OECD (2021), Health at a Glance 2021: OECD Indicators, OECD Publishing, París. <https://doi.org/10.1787/ae3016b9-en>. 23
- 3) INEGI (2022) Comunicado de prensa Núm. 29/23, 9
- 4) American Diabetes Association (2014). Standards of Medical Care in Diabetes-2014 Vol 37 (S1), S16
- 5) Diario Oficial de la Federación (2013) Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. 11-13, 15-20
- 6) Organización Panamericana de la salud (2023). Diabetes. <https://www.paho.org/es/temas/diabetes#:~:text=La%20diabetes%20es%20una%20enfermedad,los%20ri%C3%B1ones%20y%20los%20nervios>.
- 7) Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Fauci AS, Longo DL, Loscalzo J (2015) Harrison. Principios de medicina interna Vol. 2 19ª Ed. 2399
- 8) Lorenzo-Fernandez P [et al] (2017). Velázquez Farmacología Básica y Clínica 19ª ed. Editorial médica panamericana. 597
- 9) American Diabetes Association (2014). Standards of Medical Care in Diabetes-2014. Diabetes Care 37 (S1). S14-S62
- 10) Instituto Nacional de la Diabetes y las Enfermedades Digestivas y Renales (2023) Síntomas y causas de la diabetes. <https://www.niddk.nih.gov/health-information/informacion-de-la-salud/diabetes/informacion-general/sintomas-causas>
- 11) Biblioteca Nacional de Medicina (2023). Complicaciones de la diabetes. <https://medlineplus.gov/spanish/diabetescomplications.html>

- 12) Kasper DL [et al] (2015). Harrison. Principios de medicina interna Vol. 2 19ª Ed. 2408, 2409
- 13) Rang HP [et al] (2016). Farmacología 8ª ed. Elsevier Masson. 382,387
- 14) Duran-Hortola M [et al] (2008). Farmacología para fisioterapeutas. Editorial Médica Panamericana. 159
- 15) Flórez J, Almijo JA, Mediavilla A (2014). Farmacología humana 6ª ed. Elsevier Masson. 854
- 16) Katzung, BG (2019). Farmacología básica y clínica 14ª ed. McGraw-Hill Education. 174-176
- 17) Federal Drug Administration (1995). Highlights of prescribing information GLUMETZA®. 9
- 18) Federal Drug Administration (1995). Highlights of prescribing information RIOMET®. 9
- 19) Rena G, Pearson ER, Sakamoto K (2013). Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? Diabetologia. Sep 56(9):1898-1906. doi: 10.1007/s00125-013-2991-0
- 20,21) Rena G, Hardie DG, Pearson ER (2017). The mechanisms of action of metformin. Diabetologia. Sep 60(9): 1577-1585. doi: 10.1007/s00125-017-4342-z.
- 22) European Medicines Agency. Summary of Product Characteristics: Galvus (vildagliptin) oral tablets. 12,13
- 23) European Medicines Agency. Summary of Product Characteristics: Jalra (vildagliptin) oral tablets. 15,16
- 24) European Medicines Agency. Summary of Product Characteristics: Xiliarx (vildagliptin) oral tablets. 13,14
- 25) Ahren B (2007): DPP-4 inhibitors. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. Dec 21(4):517-533. doi: 10.1016/j.beem.2007.07.005

- 26) National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 3476, Glimepiride, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glimepiride>
- 27) Federal Drug Administration (1995). Highlights of prescribing information Amaryl®. 11
- 28) Federal Drug Administration (2011). Duetact®. 5,6
- 29) European Medicines Agency. Summary of Product Characteristics: Tandemact® oral tablets 15,16
- 30) Badian M, Korn A, Lehr KH [et al](1994). Absolute bioavailability of glimepiride (Amaryl) after oral administration. *Drug Metabol Drug Interact.* 11(4): 331-339
- 31) Sola D, Rossi L, Schianca GP [et al] (2015). Sulfonylureas and their use in clinical practice. *Arch Med Sci.* 2015 Aug 12;11(4):840-848. doi: 10.5114/aoms.2015.53304.
- 32) Diario Oficial de la Federación (2013) Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. 6,41
- 33) Mei H, Hsieh Y, Nardo C [et al] (2003). Investigation of matrix effects in bioanalytical high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: application to drug discovery. *Rapid Commun. Mass Spectrom* (17) 97-103. doi: 10.1002/rcm.876.
- 34) Hillyer DC, Shaz BH, Zimring JC, Abshire TC (2009). *Transfusion Medicine and Hemostasis: Clinical and Laboratory Aspects.* Elsevier. 45
- 35) Cediell JF, Cárdenas MH, García A, [et al] (2009). *Manual de histología: tejidos fundamentales.* Universidad del Rosario. 210-212
- 36) Instituto Nacional del Cáncer (18 marzo 2023). Suero. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/suero>
- 37) Strasinger SK y Di Lorenzo MS (2010). *Análisis de orina y de los fluidos corporales.* 5ª edición. Medica Panamericana. 30-32.

- 38, 39, 40) Prabu SL, Suriyaprakash NK (2012). Extraction of Drug from the Biological Matrix: A Review, Applied Biological Engineering - Principles and Practice, Dr. Ganesh R. Naik. 487-499
- 41) Skoog DA, Holler EJ, Crouch SR (2008). Principios de análisis instrumental 6a edición. Cengage Learning. 762
- 42) Skoog DA, Holler EJ, Crouch SR (2008). Principios de análisis instrumental 6a edición. Cengage Learning. 766
- 43) Harris DC (2010). Chemical Quantitative Analysis 8<sup>a</sup> ed. W. H. Freeman. 551
- 44) Van Deemter JJ, Zuiderweg FJ, Klinkenberg A (1956) Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. Chem Engng Sci  
Página 3877
- 45) Skoog DA, Holler EJ, Crouch SR (2008). Principios de análisis instrumental 6a edición. Cengage Learning. 772
- 46) Skoog DA, Holler EJ, Crouch SR (2008). Principios de análisis instrumental 6a edición. Cengage Learning. 819-821
- 47) Agilent Technologies (2006). Inyector automático de alto rendimiento y microinyector automático con placa de pocillos Agilent Series 1200. 218-224
- 48) Harris DC (2010). Chemical Quantitative Analysis 8<sup>a</sup> ed. W. H. Freeman. 602,603
- 49) Harris DC (2010). Chemical Quantitative Analysis 8<sup>a</sup> ed. W. H. Freeman. 543
- 50) Harris DC (2010). Chemical Quantitative Analysis 8<sup>a</sup> ed. W. H. Freeman. 603,604
- 51) García-De-Marina-Bayo A; Yusa-Marco DJ. (2016). HPLC INSTRUMENTAL. Universitat Politècnica de València. 281 <http://hdl.handle.net/10251/67705>
- 52) Skoog DA, Holler EJ, Crouch SR (2008). Principios de análisis instrumental 6a edición. Cengage Learning. 793, 823

- 53) Harris DC (2006) Quantitative Chemical Analysis 8a ed. Reverté. 612-617
- 54) Thomson JJ (1897) Cathode Rays. Philosophical Magazine and Journal of Science. 296
- 55) Skoog DA, Holler EJ, Crouch SR (2008). Principios de análisis instrumental 6a edición. Cengage Learning. 287-291, 566-573
- 56) Harris DC (2006) Quantitative Chemical Analysis 8a ed. Reverté. 519-522
- 57) Skoog DA, Holler EJ, Crouch SR (2008). Principios de análisis instrumental 6a edición. Cengage Learning. 283-284
- 58) Harris DC (2006) Quantitative Chemical Analysis 8a ed. Reverté. 516
- 59) Harris DC (2006) Quantitative Chemical Analysis 8a ed. Reverté. 524,526
- 60) Skoog DA, Holler EJ, Crouch SR (2008). Principios de análisis instrumental 6a edición. Cengage Learning. 283-285
- 61) AB Sciex Pte. Ltd (2013). AB SCIEX 4500 Series of Instruments System User Guide. 57-61
- 62) Secretaría de Salud (2013). Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. 1-17
- 63) Dias BCL, Fachi MM, de Campos ML [et al] (2019). A new HPLC–MS/MS method for the simultaneous quantification of SGLT2 inhibitors and metformin in plasma and its application to a pharmacokinetic study in healthy volunteers. Biomed Chroma 33:e4663 <https://doi.org/10.1002/bmc.4663>
- 64) Kang YJ, Jeong HC, Kim TE, Shin KH (2020). Bioanalytical Method Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled with High-Resolution Mass Spectrometry (UHPL-CHRMS) for the Detection of Metformin in Human Plasma. Molecules. Oct 11;25(20):4625. doi: 10.3390/molecules25204625
- 65) Marques MA, Soares Ade S, Pinto OW [et al] (2007). Simple and rapid method determination for metformin in human plasma using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetic studies. J

Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. Jun 1;852(1-2):308-316. doi: 10.1016/j.jchromb.2007.01.030

66) Reddy S, Ahmed I, Ahmad I [et al] (2015). Development and Validation of a Method for Simultaneous Estimation of Metformin and Sitagliptin in Human Plasma by LC-MS-MS and Its Application in a Bioequivalence Study. J Chromatogr Sci. Oct;53(9):1549-1556. doi: 10.1093/chromsci/bmv055

67) Heinig K, Bucheli F (2004). Fast liquid chromatographic-tandem mass spectrometric (LC-MS-MS) determination of metformin in plasma samples. J Pharm Biomed Anal. Mar 10;34(5):1005-1011. doi: 10.1016/j.jpba.2003.11.017

68) Chen X, Gu Q, Qiu F, Zhong D (2004). Rapid determination of metformin in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. Apr 5;802(2):377-381. doi: 10.1016/j.jchromb.2003.12.017

69) Sakthimanigandan K, Ganesh M, Kanthikiran VS, [et al] (2015). Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the determination of Vildagliptin in rat plasma. Acta Chromatographica, June;27(2):295-307. doi: 10.1556/AChrom.27.2015.2.7

70) He H, Tran P, Yin H [et al] (2009). Absorption, metabolism, and excretion of [14C]vildagliptin, a novel dipeptidyl peptidase 4 inhibitor, in humans. Drug Metab Dispos. Mar;37(3):536-544. doi: 10.1124/dmd.108.023010

71) He YL, Wang Y, Bullock JM [et al] (2007). Pharmacodynamics of vildagliptin in patients with type 2 diabetes during OGTT. J Clin Pharmacol. May;47(5):633-641. doi: 10.1177/0091270006299137

72) Pharne AB, Santhakumari, B. Ghemud, AS [et al] (2012). Bioanalytical method development and validation of vildagliptin a novel dipeptidyl peptidase iv inhibitor by RP-HPLC method. Inter J Pharm and Pharma Sci. 4. 119-123.

73) Sunkara G, Sabo R, Wang Y [et al] (2007). Dose proportionality and the effect of food on vildagliptin, a novel dipeptidyl peptidase IV inhibitor, in healthy volunteers. J Clin Pharmacol. Sep;47(9):1152-1158. doi: 10.1177/0091270007304313

- 74) Hu P, Yin Q, Deckert F [et al] (2009). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of vildagliptin in healthy Chinese volunteers. *J Clin Pharmacol.* Jan;49(1):39-49. doi: 10.1177/0091270008325152
- 75) Pistos C, Koutsopoulou M, Panderi I (2005). Improved liquid chromatographic tandem mass spectrometric determination and pharmacokinetic study of glimepiride in human plasma. *Biomed Chromatogr.* Jun;19(5):394-401. doi: 10.1002/bmc.465
- 76) Chakradhar L, Kallem R, Karthik A [et al] (2008), A rapid and highly sensitive method for the determination of glimepiride in human plasma by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry: application to a pre-clinical pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.*, 22: 58-63. doi: 10.1002/bmc.896
- 77) Kundlik ML, Zaware BH, Kuchekarand SR (2012). Rapid and Specific Approach for Direct Measurement of Glimepiride in Human Plasma by LC–ESI–MS–MS Employing Automated 96 Well Format: Application to a Bioequivalence Study. *J Chroma Sci.* Ene 50(1): 64–70. doi:10.1093/chromsci/bmr005
- 78) Yüzüak N, Özden T, Eren S [et al] (2007). Determination of Glimepiride in Human Plasma by LC–MS–MS. *Chroma* 66 (Suppl 1): 165–168. doi:10.1365/s10337-007-0368-6
- 79) Salem II, Idrees J, Al Tamimi JI (2004). Determination of glimepiride in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* Ene 5;799(1):103-109. doi: 10.1016/j.jchromb.2003.10.024
- 80) Kim H, Chang K, Park C [et al] (2004). Determination of Glimepiride in Human Plasma by LC-MS-MS and Comparison of Sample Preparation Methods for Glimepiride. *Chromatographia* 60: 93–98. doi:10.1365/s10337-004-0351-4
- 81) Pontarolo R, Gimenez AC, de Francisco TM [et al] (2014). Simultaneous determination of metformin and vildagliptin in human plasma by a HILIC-MS/MS method. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* Aug 15;965:133-141. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.06.023

- 82) Al Bratty M, Alhazmi HA, Javed SA [et al] (2017). Development and Validation of LC–MS/MS Method for Simultaneous Determination of Metformin and Four Gliptins in Human Plasma. *Chromatographia* **80**, 891–899. doi:10.1007/s10337-017-3288-0
- 83) ElBagary RI, Azzazy HME, ElKady EF, Farouk F (2016) Simultaneous determination of metformin, vildagliptin, and 3-amino-1-adamantanol in human plasma: Application to pharmacokinetic studies, *J Liq Chroma Rel Technol*, 39(4):195-202 doi:10.1080/10826076.2016.1144202
- 84) He YL, Sabo R, Picard F [et al] (2009) Study of the pharmacokinetic interaction of vildagliptin and metformin in patients with type 2 diabetes. *Curr Med Res Op*, 25(5):1265-1272, doi: 10.1185/03007990902869102
- 85) Georgita C, Albu F, David V, Medvedovici A (2007). Simultaneous assay of metformin and glibenclamide in human plasma based on extraction-less sample preparation procedure and LC/(APCI)MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. Jul 1;854(1-2):211-218. doi: 10.1016/j.jchromb.2007.04.032
- 86) Polagani SR, Pilli NR, Gajula R, Gandu V (2013). Simultaneous determination of atorvastatin, metformin and glimepiride in human plasma by LC-MS/MS and its application to a human pharmacokinetic study. *J Pharm Anal*. Feb;3(1):9-19. doi: 10.1016/j.jpba.2012.09.002
- 87) Mistri HN, Jangid AG, Shrivastav PS (2007). Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of antidiabetic drugs metformin and glyburide in human plasma. *J Pharm Biomed Anal*. Sep 21;45(1):97-106. doi: 10.1016/j.jpba.2007.06.003
- 88) Hess, C., Musshoff, F. & Madea, B. Simultaneous identification and validated quantification of 11 oral hypoglycaemic drugs in plasma by electrospray ionisation liquid chromatography–mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 400, 33–41 (2011). <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4698-8>

- 89) Chen BM, Liang YZ, Guo FQ [et al] (2004). Rapid, simple, specific liquid chromatographic-electrospray mass spectrometry method for the determination of glibenclamide in human plasma, *Analytica Chimica Acta*. 514(2):185-191. doi: 10.1016/j.aca.2004.03.044
- 90) Tiller PR, Land AP, Jardine I [et al] (1998). Application of liquid chromatography-mass spectrometry(n) analyses to the characterization of novel glyburide metabolites formed in vitro. *J Chromatogr A*. Jan 23;794(1-2):15-25. doi: 10.1016/s0021-9673(97)00881-9
- 91) Moura MR, de Nucci G, Rath S, Reyes FG (2004). LC-APCI-MS-MS methodology for determination of glybenclamide in human plasma. *Anal Bioanal Chem*. Jan;378(2):499-503. doi: 10.1007/s00216-003-2248-8
- 92) Hsieh S, Selinger K (2002). High-throughput bioanalytical method using automated sample preparation and liquid chromatography-atmospheric pressure ionspray mass spectrometry for quantitative determination of glybenclamide in human serum. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. Jun 5;772(2):347-56. doi: 10.1016/s1570-0232(02)00133-2
- 93) Fachi MM, Cerqueira LB, Leonart LP [et al] (2016) Simultaneous Quantification of Antidiabetic Agents in Human Plasma by a UPLC-QToF-MS Method. *PLoS ONE* 11(12): e0167107. doi:10.1371/journal.pone.0167107

# ANEXOS

Pruebas de selectividad a lo largo de la validación											
Prueba		%Respuesta			Criterio	Dictamen	%Respuesta			Criterio	Dictamen
		MTF	VLD	GLM			MTF-D6	VLD-D3	GLB		
De inicio	Al reactivo	0.00	0.00	0.00	R%≤20%	Cumple	0.00	0.00	0.00	R%≤5%	Cumple
	Al plasma	0.00	0.00	0.00	R%≤20%	Cumple	0.00	0.00	0.00	R%≤5%	Cumple
	Al EI	0.00	1.09	0.00	R%≤20%	Cumple	NA	NA	NA	R%≤5%	Cumple
A la matriz	Normal	0.00	0.00	0.00	R%≤20%	Cumple	0.00	0.00	0.00	R%≤5%	Cumple
	Lipémica	0.00	0.00	0.00	R%≤20%	Cumple	0.00	0.00	0.00	R%≤5%	Cumple
	Hemolizada	0.00	0.00	0.00	R%≤20%	Cumple	0.00	0.00	0.00	R%≤5%	Cumple
Fármacos de uso común	AAS	0.00	0.00	0.00	R%≤20%	Cumple	0.00	0.00	0.00	R%≤5%	Cumple
	Paracetamol	0.00	0.00	0.00	R%≤20%	Cumple	0.00	0.00	0.00	R%≤5%	Cumple
	Naproxeno	0.00	0.00	0.00	R%≤20%	Cumple	0.00	0.00	0.00	R%≤5%	Cumple
	Cafeína	0.00	0.00	0.00	R%≤20%	Cumple	0.00	0.00	0.00	R%≤5%	Cumple
	Nicotina	0.00	0.00	0.00	R%≤20%	Cumple	0.00	0.00	0.00	R%≤5%	Cumple
Fármacos co-formulados	MTF	NA	0.00	0.00	R%≤20%	Cumple	0.00	0.00	0.00	R%≤5%	Cumple
	VLD	0.00	NA	0.00	R%≤20%	Cumple	0.00	0.00	0.00	R%≤5%	Cumple
	GLM	0.00	0.00	NA	R%≤20%	Cumple	0.00	0.00	0.00	R%≤5%	Cumple

## Anexo 2

Valoración del Factor Matriz Normalizado para cada nivel							
Muestra	FMN nivel bajo			Muestra	FMN nivel alto		
	MTF	VLD	GLM		MTF	VLD	GLM
Normal 1	1.067	1.089	1.162	Normal 1	1.019	1.028	0.965
Normal 2	1.067	1.051	1.332	Normal 2	0.972	0.962	1.030
Normal 3	1.021	0.992	1.356	Normal 3	1.026	1.032	0.961
Normal 4	0.998	1.051	1.235	Normal 4	0.963	1.036	0.957
Normal 5	0.951	1.051	1.186	Normal 5	0.984	1.055	0.975
Normal 6	0.928	1.012	1.211	Normal 6	1.026	0.996	0.981
Hemolizada 1	1.067	1.089	1.186	Hemolizada 1	0.947	0.974	0.968
Hemolizada 2	0.951	1.012	1.308	Hemolizada 2	0.972	1.089	1.085
Lipémica 1	0.974	0.934	1.235	Lipémica 1	0.953	0.988	0.955
Lipémica 2	0.928	0.973	1.235	Lipémica 2	1.030	0.991	0.922
Promedio	0.995	1.025	1.245	Promedio	0.989	1.015	0.980
DE	0.057	0.050	0.066	DE	0.033	0.040	0.046
CV%	5.757	4.903	5.284	CV%	3.305	3.899	4.674
Criterio	CV%≤15%			Criterio	CV%≤15%		
Dictamen	Cumple	Cumple	Cumple	Dictamen	Cumple	Cumple	Cumple

<b>Coefficiente de correlación por curva por analito</b>				
<b>Analito</b>	<b>MTF</b>			
<b>Curva</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>Media</b>
Sin ponderar	0.9994	0.9997	0.9995	0.9995
1/y	0.9993	0.9997	0.9995	0.9995
1/x	0.9993	0.9997	0.9995	0.9995
1/x <sup>2</sup>	0.9978	0.9987	0.9989	0.9985
<b>Analito</b>	<b>VLD</b>			
<b>Curva</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>Media</b>
Sin ponderar	0.9988	0.9981	0.9998	0.9989
1/y	0.9989	0.9987	0.9997	0.9991
1/x	0.9990	0.9987	0.9997	0.9991
1/x <sup>2</sup>	0.9972	0.9976	0.9988	0.9979
<b>Analito</b>	<b>GLM</b>			
<b>Curva</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>Media</b>
Sin ponderar	0.9987	0.9997	0.9977	0.9987
1/y	0.9992	0.9998	0.9987	0.9992
1/x	0.9992	0.9998	0.9988	0.9993
1/x <sup>2</sup>	0.9984	0.9992	0.9989	0.9988

Curvas de calibración, linealidad y modelo matemático													
MTF													
CP	[MTF] ng/mL	Sin ponderar (1)						1/y					
		Media	DE	CV%	%ER	Criterio	Dictamen	Media	DE	CV%	%ER	Criterio	Dictamen
1	20	12.6	8.2	64.8%	36.8%	D%≤20%	No cumple	20.3	1.7	8.4%	1.3%	D%≤20%	Cumple
2	40	33.9	7.3	21.6%	15.3%	D%≤15%	No cumple	41.3	2.5	6.1%	3.2%	D%≤15%	Cumple
3	100	86.1	20.3	23.5%	13.9%	D%≤15%	No cumple	99.4	1.8	1.8%	0.6%	D%≤15%	Cumple
4	150	146.2	17.9	12.2%	2.6%	D%≤15%	Cumple	142.4	10.0	7.0%	5.1%	D%≤15%	Cumple
5	500	547.3	9.1	1.7%	9.5%	D%≤15%	Cumple	476.4	13.6	2.9%	4.7%	D%≤15%	Cumple
6	1000	986.1	66.8	6.8%	1.4%	D%≤15%	Cumple	1036.4	60.9	5.9%	3.6%	D%≤15%	Cumple
7	3000	3001.6	249.3	8.3%	0.1%	D%≤15%	Cumple	2947.6	180.3	6.1%	1.7%	D%≤15%	Cumple
8	5000	4869.3	148.8	3.1%	2.6%	D%≤15%	Cumple	4884.0	69.8	1.4%	2.3%	D%≤15%	Cumple
9	7000	7161.6	421.8	5.9%	2.3%	D%≤15%	Cumple	6974.4	26.0	0.4%	0.4%	D%≤15%	Cumple
10	8000	7778.9	305.6	3.9%	2.8%	D%≤15%	Cumple	7997.1	289.6	3.6%	0.0%	D%≤15%	Cumple
		Σ%ER(1)			87.2%			Σ%ER(1/y)			23.1%		
CP	[MTF] ng/mL	1/x						1/x <sup>2</sup>					
		Media	DE	CV%	%ER	Criterio	Dictamen	Media	DE	CV%	%ER	Criterio	Dictamen
1	20	20.1	1.7	8.3%	0.7%	D%≤20%	Cumple	19.7	0.3	1.6%	1.7%	D%≤20%	Cumple
2	40	41.1	2.5	6.2%	2.8%	D%≤15%	Cumple	40.8	1.7	4.1%	2.0%	D%≤15%	Cumple
3	100	99.2	1.8	1.8%	0.8%	D%≤15%	Cumple	99.2	1.9	1.9%	0.8%	D%≤15%	Cumple
4	150	142.1	9.9	7.0%	5.2%	D%≤15%	Cumple	142.2	9.1	6.4%	5.2%	D%≤15%	Cumple
5	500	475.8	13.7	2.9%	4.8%	D%≤15%	Cumple	478.2	21.0	4.4%	4.4%	D%≤15%	Cumple
6	1000	1035.4	60.6	5.9%	3.5%	D%≤15%	Cumple	1040.2	47.4	4.6%	4.0%	D%≤15%	Cumple
7	3000	2944.8	179.3	6.1%	1.8%	D%≤15%	Cumple	2959.3	123.9	4.2%	1.4%	D%≤15%	Cumple
8	5000	4879.4	69.2	1.4%	2.4%	D%≤15%	Cumple	4907.1	77.8	1.6%	1.9%	D%≤15%	Cumple
9	7000	6968.0	24.0	0.3%	0.5%	D%≤15%	Cumple	7008.2	113.5	1.6%	0.1%	D%≤15%	Cumple
10	8000	7989.8	291.5	3.6%	0.1%	D%≤15%	Cumple	8040.1	444.3	5.5%	0.5%	D%≤15%	Cumple
		Σ%ER(1/x)			22.8%			Σ%ER(1/x <sup>2</sup> )			21.9%		

### Curvas de calibración, linealidad y modelo matemático

#### VLD

CP	[VLD] ng/mL	Sin ponderar						1/y					
		Media	DE	CV%	%ER	Criterio	Dictamen	Media	DE	CV%	%ER	Criterio	Dictamen
1	5	5.8	1.1	18.3%	15.2%	D%≤20%	Cumple	5.6	0.3	5.6%	11.1%	D%≤20%	Cumple
2	10	7.5	4.8	<b>64.2%</b>	25.1%	D%≤15%	No cumple	9.9	0.2	2.1%	1.3%	D%≤15%	Cumple
3	20	16.5	3.8	<b>22.7%</b>	17.3%	D%≤15%	No cumple	18.2	0.9	5.1%	8.8%	D%≤15%	Cumple
4	40	37.7	0.9	2.5%	5.9%	D%≤15%	Cumple	35.7	1.2	3.5%	10.6%	D%≤15%	Cumple
5	150	153.5	5.5	3.6%	2.3%	D%≤15%	Cumple	138.8	8.3	6.0%	7.5%	D%≤15%	Cumple
6	200	191.4	8.7	4.6%	4.3%	D%≤15%	Cumple	198.2	4.4	2.2%	0.9%	D%≤15%	Cumple
7	350	338.4	27.4	8.1%	3.3%	D%≤15%	Cumple	332.9	23.7	7.1%	4.9%	D%≤15%	Cumple
8	450	447.7	4.4	1.0%	0.5%	D%≤15%	Cumple	437.8	10.3	2.4%	2.7%	D%≤15%	Cumple
9	600	581.2	31.3	5.4%	3.1%	D%≤15%	Cumple	587.2	17.8	3.0%	2.1%	D%≤15%	Cumple
10	700	672.2	26.2	3.9%	4.0%	D%≤15%	Cumple	688.9	25.8	3.7%	1.6%	D%≤15%	Cumple
		$\Sigma\%ER(1)$			81.1%			$\Sigma\%ER(1/y)$			51.6%		
CP	[VLD] ng/mL	1/x						1/x <sup>2</sup>					
		Media	DE	CV%	%ER	Criterio	Dictamen	Media	DE	CV%	%ER	Criterio	Dictamen
1	5	5.6	0.3	6.2%	11.4%	D%≤20%	Cumple	5.0	0.1	2.3%	0.4%	D%≤20%	Cumple
2	10	9.9	0.2	2.0%	1.3%	D%≤15%	Cumple	9.5	0.4	3.8%	5.1%	D%≤15%	Cumple
3	20	18.2	0.9	5.0%	8.8%	D%≤15%	Cumple	18.1	1.0	5.3%	9.6%	D%≤15%	Cumple
4	40	35.7	1.2	3.4%	10.7%	D%≤15%	Cumple	36.0	1.4	4.0%	10.1%	D%≤15%	Cumple
5	150	138.6	8.3	6.0%	7.6%	D%≤15%	Cumple	141.8	7.7	5.4%	5.5%	D%≤15%	Cumple
6	200	197.9	4.5	2.3%	1.0%	D%≤15%	Cumple	202.7	2.3	1.1%	1.4%	D%≤15%	Cumple
7	350	332.4	23.7	7.1%	5.0%	D%≤15%	Cumple	340.6	25.9	7.6%	2.7%	D%≤15%	Cumple
8	450	437.0	10.0	2.3%	2.9%	D%≤15%	Cumple	448.5	11.8	2.6%	0.3%	D%≤15%	Cumple
9	600	586.2	17.8	3.0%	2.3%	D%≤15%	Cumple	602.2	21.2	3.5%	0.4%	D%≤15%	Cumple
10	700	687.7	25.5	3.7%	1.8%	D%≤15%	Cumple	707.3	28.3	4.0%	1.0%	D%≤15%	Cumple
		$\Sigma\%ER(1/x)$			52.9%			$\Sigma\%ER(1/x^2)$			36.5%		

**Curvas de calibración, linealidad y modelo matemático**

**GLM**

CP	[GLM] ng/mL	Sin ponderar						1/y					
		Media	DE	CV%	%ER	Criterio	Dictamen	Media	DE	CV%	%ER	Criterio	Dictamen
1	5	9.9	0.1	0.6%	97.5%	D%≤20%	No cumple	5.1	0.4	7.0%	2.1%	D%≤20%	Cumple
2	10	14.8	1.4	9.3%	47.8%	D%≤15%	No cumple	9.8	0.7	7.1%	1.8%	D%≤15%	Cumple
3	40	35.7	3.8	10.8%	10.7%	D%≤15%	Cumple	40.6	2.2	5.5%	1.5%	D%≤15%	Cumple
4	90	86.2	5.6	6.5%	4.2%	D%≤15%	Cumple	88.6	3.7	4.2%	1.6%	D%≤15%	Cumple
5	150	159.3	17.3	10.9%	6.2%	D%≤15%	Cumple	147.6	5.6	3.8%	1.6%	D%≤15%	Cumple
6	250	262.5	8.9	3.4%	5.0%	D%≤15%	Cumple	252.7	0.7	0.3%	1.1%	D%≤15%	Cumple
7	425	405.2	22.7	5.6%	4.7%	D%≤15%	Cumple	426.1	17.7	4.2%	0.3%	D%≤15%	Cumple
8	600	617.7	47.7	7.7%	3.0%	D%≤15%	Cumple	569.1	19.5	3.4%	5.2%	D%≤15%	Cumple
9	775	738.2	42.5	5.8%	4.7%	D%≤15%	Cumple	804.5	14.1	1.7%	3.8%	D%≤15%	Cumple
10	900	915.7	60.1	6.6%	1.7%	D%≤15%	Cumple	892.4	13.7	1.5%	0.8%	D%≤15%	Cumple
		Σ%ER(1)			185.5%			Σ%ER(1/y)			19.8%		
CP	[GLM] ng/mL	1/x						1/x^2					
		Media	DE	CV%	%ER	Criterio	Dictamen	Media	DE	CV%	%ER	Criterio	Dictamen
1	5	5.1	0.3	6.6%	1.7%	D%≤20%	Cumple	5.0	0.2	4.0%	0.5%	D%≤20%	Cumple
2	10	9.8	0.7	7.3%	2.1%	D%≤15%	Cumple	9.7	0.8	8.3%	2.6%	D%≤15%	Cumple
3	40	40.5	2.2	5.5%	1.4%	D%≤15%	Cumple	40.6	2.2	5.4%	1.4%	D%≤15%	Cumple
4	90	88.4	3.6	4.1%	1.8%	D%≤15%	Cumple	88.6	4.0	4.5%	1.6%	D%≤15%	Cumple
5	150	147.4	5.6	3.8%	1.7%	D%≤15%	Cumple	147.7	4.9	3.3%	1.5%	D%≤15%	Cumple
6	250	252.3	0.5	0.2%	0.9%	D%≤15%	Cumple	252.9	1.7	0.7%	1.2%	D%≤15%	Cumple
7	425	425.5	17.8	4.2%	0.1%	D%≤15%	Cumple	426.7	20.4	4.8%	0.4%	D%≤15%	Cumple
8	600	568.3	20.0	3.5%	5.3%	D%≤15%	Cumple	569.7	20.0	3.5%	5.0%	D%≤15%	Cumple
9	775	803.4	13.3	1.6%	3.7%	D%≤15%	Cumple	805.5	13.2	1.6%	3.9%	D%≤15%	Cumple
10	900	891.2	13.1	1.5%	1.0%	D%≤15%	Cumple	893.4	9.7	1.1%	0.7%	D%≤15%	Cumple
		Σ%ER(1/x)			19.6%			Σ%ER(1/x^2)			18.9%		

Resultados obtenidos para la prueba de repetibilidad						
MTF (ng/mL)						
Muestra	Nominal	Media	DE	CV%	Criterio	Dictamen
LIC	20	21.27	1.84	8.67	CV%≤20	Cumple
CCB	60	58.13	1.96	3.38	CV%≤15	Cumple
CCBB	250	252.31	17.20	6.82	CV%≤15	Cumple
CCM	2000	2065.30	101.96	4.94	CV%≤15	Cumple
CCA	6000	5939.55	155.89	2.62	CV%≤15	Cumple
CCD	10000	9740.70	514.42	5.28	CV%≤15	Cumple
VLD (ng/mL)						
Muestra	Nominal	Media	DE	CV%	Criterio	Dictamen
LIC	5	4.73	0.16	3.32	CV%≤20	Cumple
CCB	15	13.22	0.49	3.69	CV%≤15	Cumple
CCBB	50	45.56	3.42	7.50	CV%≤15	Cumple
CCM	250	240.60	9.98	4.15	CV%≤15	Cumple
CCA	550	534.62	12.52	2.34	CV%≤15	Cumple
CCD	1400	1358.98	57.00	4.19	CV%≤15	Cumple
GLM (ng/mL)						
Muestra	Nominal	Media	DE	CV%	Criterio	Dictamen
LIC	5	4.89	0.19	3.86	CV%≤20	Cumple
CCB	15	14.82	1.71	11.56	CV%≤15	Cumple
CCBB	125	119.57	8.14	6.81	CV%≤15	Cumple
CCM	300	279.17	10.84	3.88	CV%≤15	Cumple
CCA	675	634.67	11.88	1.87	CV%≤15	Cumple
CCD	1800	1725.75	78.11	4.53	CV%≤15	Cumple

Resultados obtenidos para la prueba de reproducibilidad						
MTF (ng/mL)						
Muestra	Nominal	Media	DE	CV%	Criterio	Dictamen
LIC	20	21.56	2.20	10.20	CV%≤20	Cumple
CCB	60	59.02	3.18	5.39	CV%≤15	Cumple
CCBB	250	241.34	13.94	5.77	CV%≤15	Cumple
CCM	2000	2043.62	99.47	4.87	CV%≤15	Cumple
CCA	6000	5980.44	226.43	3.79	CV%≤15	Cumple
CCD	10000	9760.69	390.51	4.00	CV%≤15	Cumple
VLD (ng/mL)						
Muestra	Nominal	Media	DE	CV%	Criterio	Dictamen
LIC	5	5.16	0.42	8.18	CV%≤20	Cumple
CCB	15	13.88	0.73	5.29	CV%≤15	Cumple
CCBB	50	46.91	2.93	6.25	CV%≤15	Cumple
CCM	250	243.33	9.97	4.10	CV%≤15	Cumple
CCA	550	549.48	23.49	4.28	CV%≤15	Cumple
CCD	1400	1370.57	66.88	4.88	CV%≤15	Cumple
GLM (ng/mL)						
Muestra	Nominal	Media	DE	CV%	Criterio	Dictamen
LIC	5	4.84	0.37	7.54	CV%≤20	Cumple
CCB	15	14.83	1.14	7.67	CV%≤15	Cumple
CCBB	125	124.55	7.25	5.82	CV%≤15	Cumple
CCM	300	296.29	17.23	5.81	CV%≤15	Cumple
CCA	675	684.44	45.35	6.63	CV%≤15	Cumple
CCD	1800	1791.39	88.03	4.91	CV%≤15	Cumple

Resultados obtenidos para las pruebas de estabilidad en solución						
Estabilidad	Analito	Media (cps)		D%	Criterio	Dictamen
		Referencia	Prueba			
Temperatura ambiente (21-25°C)	MTF	6711037.58	6663822.35	0.70	D%≤10%	Cumple
	VLD	2136285.22	2035633.93	4.71	D%≤10%	Cumple
	GLM	1060652.73	1065323.60	0.44	D%≤10%	Cumple
En refrigeración (4-8°C)	MTF	6357118.42	6901946.55	7.89	D%≤10%	Cumple
	VLD	1431966.06	1492432.14	4.05	D%≤10%	Cumple
	GLM	1225562.50	1309148.72	6.38	D%≤10%	Cumple

Resultados obtenidos para las pruebas de estabilidad en matriz biológica a corto plazo							
Estabilidad	Nivel	Analito	Concentración (ng/mL)		D%	Criterio	Dictamen
			Nominal	Prueba			
En refrigeración (4-8°C) por 24 h	Bajo	MTF	60.00	58.00	3.34	D%≤15%	Cumple
		VLD	15.00	13.30	11.36	D%≤15%	Cumple
		GLM	15.00	14.83	1.14	D%≤15%	Cumple
	Alto	MTF	6000.00	5790.48	3.49	D%≤15%	Cumple
		VLD	550.00	538.85	2.03	D%≤15%	Cumple
		GLM	675.00	658.56	2.44	D%≤15%	Cumple
3 ciclos de congelación-descongelación	Bajo	MTF	60.00	54.46	9.23	D%≤15%	Cumple
		VLD	15.00	14.68	2.16	D%≤15%	Cumple
		GLM	15.00	14.51	3.24	D%≤15%	Cumple
	Alto	MTF	6000.00	5945.28	0.91	D%≤15%	Cumple
		VLD	550.00	506.32	7.94	D%≤15%	Cumple
		GLM	675.00	626.05	7.25	D%≤15%	Cumple

Resultados obtenidos para las pruebas de estabilidad de la muestra procesada							
Estabilidad	Nivel	Analito	Concentración (ng/mL)		D%	Criterio	Dictamen
			Nominal	Prueba			
En auto-muestreador (10°C) 24 h	Bajo	MTF	60.00	58.86	1.89	D%≤15%	Cumple
		VLD	15.00	14.99	0.09	D%≤15%	Cumple
		GLM	15.00	15.91	6.07	D%≤15%	Cumple
	Alto	MTF	6000.00	6010.86	0.18	D%≤15%	Cumple
		VLD	550.00	556.26	1.14	D%≤15%	Cumple
		GLM	675.00	663.75	1.67	D%≤15%	Cumple
En auto-muestreador (10°C) 48 h	Bajo	MTF	60.00	60.74	1.23	D%≤15%	Cumple
		VLD	15.00	15.10	0.68	D%≤15%	Cumple
		GLM	15.00	16.04	6.91	D%≤15%	Cumple
	Alto	MTF	6000.00	6014.22	0.24	D%≤15%	Cumple
		VLD	550.00	529.24	3.77	D%≤15%	Cumple
		GLM	675.00	685.74	1.59	D%≤15%	Cumple
En refrigeración (4-8°C) 24 h	Bajo	MTF	60.00	56.96	5.07	D%≤15%	Cumple
		VLD	15.00	14.67	2.23	D%≤15%	Cumple
		GLM	15.00	16.14	7.58	D%≤15%	Cumple
	Alto	MTF	6000.00	5950.92	0.82	D%≤15%	Cumple
		VLD	550.00	541.57	1.53	D%≤15%	Cumple
		GLM	675.00	663.27	1.74	D%≤15%	Cumple

## Anexo 9

Datos obtenidos para la prueba de reproducibilidad en la reinyección									
Muestra	Concentración calculada (ng/mL)								
	MTF			VLD			GLM		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
LIC1	20.70	20.25	20.20	4.99	4.75	5.22	4.12	5.37	5.20
LIC2	19.67	21.29	23.36	4.70	5.24	4.57	4.19	4.74	4.05
LIC3	20.67	19.41	21.47	4.56	4.92	4.58	5.11	5.02	4.69
LIC4	19.12	20.50	19.54	4.67	4.79	4.64	4.66	4.97	4.76
LIC5	20.41	18.77	18.46	4.18	4.58	4.52	4.61	5.11	4.58
CCB1	59.52	63.32	61.52	14.13	14.89	14.74	13.42	13.93	14.26
CCB2	58.82	56.22	58.69	13.52	14.81	13.64	13.95	12.12	13.23
CCB3	60.42	53.20	62.54	14.97	15.15	13.66	14.37	15.60	14.34
CCB4	57.71	59.45	54.67	15.69	13.98	14.75	15.44	14.78	15.16
CCB5	57.45	58.60	62.21	15.45	15.84	14.07	14.35	13.42	13.10
CCBB1	242.76	229.38	217.00	47.50	48.16	48.62	126.28	125.87	127.78
CCBB2	250.01	228.58	230.83	48.60	53.16	48.31	123.45	125.89	117.00
CCBB3	231.04	233.21	236.48	53.28	52.32	51.23	120.13	118.07	113.24
CCBB4	231.50	244.53	229.38	47.70	48.99	49.60	133.03	138.93	113.87
CCBB5	235.51	228.47	239.08	48.99	48.90	48.99	126.83	133.11	125.81
CCM1	2067.03	1918.64	1972.13	238.77	267.65	237.41	288.53	313.24	295.99
CCM2	2005.03	1962.37	2070.06	245.12	263.11	241.73	293.87	307.45	271.72
CCM3	1935.52	1957.12	2040.21	259.29	260.02	259.55	282.00	297.41	290.79
CCM4	1928.68	1883.51	2109.99	259.87	265.22	244.99	318.30	287.48	267.24
CCM5	2074.39	2026.06	1990.91	254.00	263.06	247.73	303.85	317.44	268.88
CCA1	5870.84	5761.32	5624.01	524.69	570.19	557.29	705.28	646.61	681.71
CCA2	5855.14	5716.32	5832.81	537.22	584.22	548.15	669.42	705.44	761.35
CCA3	5767.47	5730.81	5725.82	539.64	520.63	614.98	669.40	781.23	680.26
CCA4	5852.09	5815.71	6245.47	566.24	589.62	518.47	670.87	576.97	674.10
CCA5	6181.21	5693.16	6030.39	527.66	554.43	563.83	685.91	668.03	695.54
CCD1	10201.51	10544.81	11003.92	1530.35	1412.90	1556.65	1864.72	2059.73	1899.74
CCD2	9788.63	9657.46	9444.86	1315.70	1331.46	1378.02	1759.84	1574.70	1704.89
CCD3	9802.88	9701.60	9723.76	1391.21	1437.35	1381.89	1790.58	1895.86	1783.68
CCD4	9734.06	9695.98	9951.78	1493.07	1382.42	1320.99	1800.87	1733.04	1743.41
CCD5	10031.41	10347.89	9481.26	1348.25	1357.01	1477.21	1902.08	1532.28	2050.78

Resultados obtenidos para la prueba de reproducibilidad en la reinyección									
Analito	Muestra	Concentración (ng/mL)			CV%	D%	Criterio 1	Criterio 2	Dictamen
		Nominal	Promedio	DE					
MTF	LIC	20	20.25	1.22	6.03	1.27%	CV%≤20%	D%≤20%	Cumple
	CCB	60	58.95	2.86	4.86	1.74%	CV%≤15%	D%≤15%	Cumple
	CCBB	250	233.85	8.00	3.42	6.46%	CV%≤15%	D%≤15%	Cumple
	CCM	2000	1996.11	66.91	3.35	0.195%	CV%≤15%	D%≤15%	Cumple
	CCA	6000	5846.84	176.93	3.03	2.55%	CV%≤15%	D%≤15%	Cumple
	CCD	10000	9940.79	424.57	4.27	0.592%	CV%≤15%	D%≤15%	Cumple
VLD	LIC	5	4.73	0.28	5.83	5.47%	CV%≤20%	D%≤20%	Cumple
	CCB	15	14.62	0.75	5.14	2.54%	CV%≤15%	D%≤15%	Cumple
	CCBB	50	49.62	1.92	3.87	0.76%	CV%≤15%	D%≤15%	Cumple
	CCM	250	253.84	10.22	4.03	1.53%	CV%≤15%	D%≤15%	Cumple
	CCA	550	554.48	27.86	5.02	0.82%	CV%≤15%	D%≤15%	Cumple
	CCD	1400	1407.63	75.88	5.39	0.545%	CV%≤15%	D%≤15%	Cumple
GLM	LIC	5	4.75	0.40	8.44	5.09%	CV%≤20%	D%≤20%	Cumple
	CCB	15	14.10	0.94	6.70	6.02%	CV%≤15%	D%≤15%	Cumple
	CCBB	125	124.62	7.26	5.82	0.31%	CV%≤15%	D%≤15%	Cumple
	CCM	300	293.61	16.63	5.66	2.13%	CV%≤15%	D%≤15%	Cumple
	CCA	675	684.81	46.52	6.79	1.45%	CV%≤15%	D%≤15%	Cumple
	CCD	1800	1806.41	147.51	8.17	0.356%	CV%≤15%	D%≤15%	Cumple