

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**ESTUDIOS DE DISOLUCIÓN EN MEDIO BIORRELEVANTE DE UN MEDICAMENTO
ANTIDIABÉTICO**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB Ricardo Díaz de León Ortega

TUTOR: M en C Juan Manuel Rodríguez
Facultad de Química, UNAM

México DF, Marzo 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

TEMA DE TESIS

**ESTUDIOS DE DISOLUCIÓN EN MEDIO BIORRELEVANTE DE UN
MEDICAMENTO ANTIDIABÉTICO**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB Ricardo Díaz de León Ortega



TUTOR: M en C Juan Manuel Rodríguez marzo 2014
FACULTAD DE QUÍMICA

AGRADECIMIENTOS

- A la UNAM por permitirme hacer estudios de maestría en el Posgrado en Ciencias Químicas.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de estos estudios (No de becario: 271102).
- Al M. en C. Juan Manuel Rodríguez por su asesoría, orientación, guía y enseñanzas.
- A los miembros del Jurado: Dra. Adriana Flora Ganem Rondero, Dra. Helgi Jung Cook, Dra. Marta Menjívar Iraheta, Dra. Luz María Melgoza Contreras y al Dr. José Fausto Rivero Cruz por sus aportaciones para la corrección y la mejora de este trabajo de tesis.
- A la QFB Leticia Romero Ponce de la maestría en Ciencias Químicas por su colaboración inestimable para la realización de este trabajo.
- Al QFB Ernesto Salgado Olvera de la Facultad de Química por su asesoría técnica.

Lugar donde se desarrolló la tesis

Laboratorio 112, Conjunto E, Departamento de Farmacia
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

PRESENTACIÓN EN CONGRESOS

Este trabajo se presentó en los siguientes congresos:

En la modalidad de cartel en el XLVI Congreso Nacional y V Internacional de Ciencias Farmacéuticas con el título: "Desarrollo de un método por RP-HPLC para cuantificar glimepirida en distintas matrices". Octubre de 2013.

En la modalidad de cartel en el evento QUIMIUNAM 2013 con el título: "Analytical method development for glimepiride quantification by RP-HPLC in a pharmaceutical matrix". Noviembre de 2013.

Dedicado a mi mamá y a Angélica Chavarría, gracias por todo.

Índice

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Disolución	3
2.1.1 Proceso de disolución	3
2.1.2 Pruebas de disolución	3
2.1.3 Tecnología de disolución	4
2.1.4 Perfiles de disolución	7
2.1.4.1 Modelos matemáticos para los perfiles de disolución	8
2.1.4.2 Comparación de perfiles de disolución	11
2.2 "Bioexención" de estudios de bioequivalencia	14
2.2.1 Correlación <i>in vitro in vivo</i>	16
2.2.2 Niveles de correlación	17
2.2.3 Software para establecer correlaciones <i>in vitro in vivo</i>	18
2.3 Condiciones del tracto gastrointestinal	18
2.3.1 Composición de los fluidos gastrointestinales humanos	22
2.4 Medios biorrelevantes	23
2.4.1 Composición de los medios biorrelevantes actuales	24
2.4.2 Predicción <i>in vivo</i> del desempeño de una formulación	26
2.5 Glimepirida	27
2.5.1 IVIVC para la glimepirida	29
2.5.2 Análisis cuantitativo de la glimepirida	29
2.5.3 Extracción en fase sólida	32
2.5.4 Diseño de experimentos	32
3. Objetivo e hipótesis	33
3.1 Objetivo	33
3.1.1 Objetivo General	33
3.1.2 Objetivos específicos	33
3.2 Hipótesis	33
4. Metodología Experimental	34
4.1 Desarrollo del método analítico	34
4.1.1 Análisis Cromatográfico de acuerdo a USP	34

4.1.2	Diseño experimental para las condiciones cromatográficas	35
4.1.3	Diseño experimental para la extracción en fase sólida	36
4.2	Validación del método analítico	37
4.2.1	Validación del sistema	37
4.2.2	Validación del método	38
4.3	Estudios de disolución	41
4.3.1	Estudios de disolución en medio farmacopeico	42
4.3.2	Estudios de disolución en medio biorrelevante	42
4.4	Análisis de los perfiles de disolución	42
4.4.1	Modelaje matemático de los perfiles	42
4.4.2	Comparación de perfiles	42
4.5	Correlación <i>in vitro in vivo</i>	43
4.5.1	Obtención de niveles de concentración plasmática	43
4.5.2	IVIVC para los perfiles de los productos A y B en medio de disolución farmacopeico	43
4.5.3	IVIVC para los perfiles de los productos A y B en medio de disolución biorrelevante	44
5.	Resultados y discusión	45
5.1	Desarrollo del método analítico	45
5.1.1	Análisis Cromatográfico de acuerdo a USP	45
5.1.2	Diseño experimental para las condiciones cromatográficas	46
5.1.3	Diseño experimental para la extracción en fase sólida	49
5.2	Validación del método analítico	52
5.2.1	Validación del sistema	52
5.2.2	Validación del método	54
5.3	Estudios de disolución	60
5.3.1	Estudios de disolución en medio farmacopeico	60
5.3.2	Estudios de disolución en medio biorrelevante	60
5.4	Análisis de los perfiles de disolución	61
5.4.1	Modelaje matemático de los perfiles	61
5.4.2	Comparación de perfiles	65
5.5	Correlación <i>in vitro in vivo</i>	69

5.5.1 Obtención de niveles de concentración plasmática	69
5.5.2 IVIVC para los perfiles de los productos A y B en medio de disolución farmacopeico	70
5.5.3 IVIVC para los perfiles de los productos A y B en medio de disolución biorrelevante	73
5.5.4 Comparación de las correlaciones obtenidas de los perfiles de disolución farmacopeico y biorrelevante	75
6. Conclusiones	77
7. Referencias	78
Anexo 1. Cromatogramas típicos de validación del sistema	82
Anexo 2. Cromatogramas típicos de validación del método	86
Anexo 3. Cromatogramas típicos de los perfiles de disolución	95

Índice de figuras

Figura 1. Especificaciones del aparato 1.	5
Figura 2. Especificaciones del aparato 2.	5
Figura 3. Especificaciones del aparato 3.	6
Figura 4. Especificaciones del aparato 4.	7
Figura 5. Anfifilo y micela.	20
Figura 6. Estructura de las sales biliares	21
Figura 7. Comparación de perfiles de disolución de tabletas de glibenclamida en FaSSIF y en FeSSIF, y en FaSSIF-V2 y en FeSSIF-V2	26
Figura 8. Molécula de la glimepirida	27
Figura 9. Cromatogramas obtenidos bajo las condiciones establecidas por USP para tabletas de glimepirida.	45
Figura 10. Cromatogramas obtenidos con las condiciones que se propusieron para el diseño experimental.	46
Figura 11. Efecto del pH y el porcentaje de acetonitrilo de la fase móvil sobre el tiempo de retención de la glimepirida.	47
Figura 12. Diagrama de Pareto para el tiempo de retención de la glimepirida.	47
Figura 13. Gráfico de respuesta para resolución	48
Figura 14. Diagrama de Pareto estandarizado para el área corregida de la glimepirida.	49
Figura 15. Gráficos de respuesta para los efectos en las mejores condiciones para obtener: el mayor recobro de glimepirida, y la mayor reducción de metformina.	50
Figura 16. Efecto del cambio en el pH sobre la carga en la glimepirida	51
Figura 17. Cromatogramas típicos para el estándar de glimepirida; tableta glimepirida/metformina en medio de disolución farmacopeico y tableta glimepirida/metformina en medio de disolución biorrelevante.	51
Figura 18. Curva de calibración del sistema y sus coeficientes.	52
Figura 19. Selectividad para la glimepirida.	53
Figura 20. Curva de calibración para la glimepirida a partir de tabletas en	55

medio farmacopeico y sus coeficientes.	
Figura 21. Selectividad para la glimepirida.	56
Figura 22. Curva de calibración para la glimepirida a partir de tabletas en medio FaSSIF V2 y sus coeficientes.	58
Figura 23. Selectividad para la glimepirida.	59
Figura 24. Perfiles de disolución del producto A y B en el medio de disolución farmacopeico.	60
Figura 25. Perfiles de disolución del producto A y B en el medio de disolución biorrelevante.	60
Figura 26. Gráfica de tiempo vs fracción disuelta para el modelo matemático del producto A en el medio farmacopeico.	61
Figura 27. Gráfica de tiempo vs fracción disuelta para el modelo matemático del producto B en el medio farmacopeico.	63
Figura 28. Gráfica de tiempo vs fracción disuelta para el modelo matemático del producto A en el medio biorrelevante.	64
Figura 29. Gráfica de tiempo vs fracción disuelta para el modelo matemático del producto B en el medio biorrelevante.	65
Figura 30. Comparación de los perfiles del Producto A vs el Producto B en medio farmacopeico.	66
Figura 31. Comparación de los perfiles del Producto A en medio farmacopeico (AF) vs el Producto A en medio biorrelevante (AB).	67
Figura 32. Comparación de los perfiles del Producto B en medio farmacopeico (BF) vs el Producto B en medio biorrelevante (BB).	68
Figura 33. Comparación de los perfiles del Producto A en medio biorrelevante vs el Producto B en medio biorrelevante.	68
Figura 34. Resultados de la IVIVC en medio de disolución farmacopeico	72
Figura 35. Resultados de la IVIVC en medio de disolución biorrelevante	75

Índice de tablas

Tabla 1. Modelos matemáticos de disolución	9
Tabla 2. Composición del medio que simula las condiciones de ayuno en el estómago (Fasted-State Simulated Gastric Fluid (FaSSGF)	24
Tabla 3. Composición del medio que simula el estado de ayuno de la parte proximal del intestino delgado Versión 2 (Fasted-State Simulated Intestinal Fluid Versión 2: FaSSIF V2)	25
Tabla 4. Composición del medio que simula el estado después de alimentos de la parte proximal del intestino delgado Versión 2 (Fed-State Simulated Intestinal Fluid Versión 2: FeSSIF V2)	25
Tabla 5. Condiciones establecidas por USP para tabletas de glimepirida	34
Tabla 6. Niveles para el diseño factorial para las condiciones cromatográficas	35
Tabla 7. Condiciones cromatográficas del análisis	36
Tabla 8. Niveles y factores para las condiciones de la SPE.	36
Tabla 9. Curva de calibración para el fármaco	38
Tabla 10. Curva de calibración para el medicamento en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.8	40
Tabla 11. Curva de calibración para el medicamento en buffer FaSSIF V2	40
Tabla 12. Condiciones cromatográficas	48
Tabla 13. Condiciones seleccionadas para el SPE	50
Tabla 14. Linealidad y precisión	52
Tabla 15. Estabilidad	53
Tabla 16. Resumen de validación	54
Tabla 17. Linealidad y exactitud	55
Tabla 18. Repetibilidad y reproducibilidad	56
Tabla 19. Resumen de validación	57
Tabla 20. Linealidad y exactitud	57
Tabla 21. Repetibilidad y reproducibilidad	58
Tabla 22. Resumen de validación	59
Tabla 23. Parámetros comparativos para elegir modelo para el perfil del producto A en medio farmacopeico.	61

Tabla 24. Parámetros del modelo matemático del producto A en el medio farmacopeico	62
Tabla 25. Parámetros comparativos para elegir modelo para el perfil del producto B en medio farmacopeico.	62
Tabla 26. Parámetros del modelo para el modelo matemático del producto B en el medio farmacopeico	62
Tabla 27. Parámetros comparativos para elegir modelo para el perfil del producto A en medio biorrelevante.	63
Tabla 28. Parámetros del modelo para el modelo matemático del producto A en el medio farmacopeico	63
Tabla 29. Parámetros comparativos para elegir modelo para el perfil del producto A en medio biorrelevante.	64
Tabla 30. Parámetros del modelo para el modelo matemático del producto B en el medio biorrelevante	64
Tabla 31. Perfiles de disolución del producto A y B, en los dos diferentes medios de disolución.	66
Tabla 32. Niveles plasmáticos calculados para la ingesta de una tableta de 4mg de glimepirida	70
Tabla 33. Resultados para los valores observados del producto A en medio de disolución farmacopeico.	70
Tabla 34. Resultados para los valores predichos del producto A en medio de disolución farmacopeico.	70
Tabla 35. Resultados para los valores observados del producto B en medio de disolución farmacopeico.	71
Tabla 36. Resultados para los valores predichos del producto B en medio de disolución farmacopeico	72
Tabla 37. Resultados para los valores observados del producto A en medio de disolución biorrelevante.	73
Tabla 38. Resultados para los valores predichos del producto A en medio de disolución biorrelevante.	73
Tabla 39. Resultados para los valores observados del producto B en medio de disolución biorrelevante.	74

Tabla 40. Resultados para los valores predichos del producto B en medio de disolución biorrelevante.	74
Tabla 41. Comparación de los parámetros obtenidos para cada correlación.	75

Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Weibull	9
Ecuación 2. Korsmeyer – Peppas	9
Ecuación 3. Korsmeyer – Peppas con tiempo de retardo	10
Ecuación 4. Factor de diferencia f1	11
Ecuación 5. Factor de similitud	12
Ecuación 6. Error de la regresión	37
Ecuación 7. Error relativo debido a la regresión	37
Ecuación 8. Modelo abierto de un compartimiento para la administración oral con datos plasmáticos	43

Lista de abreviaturas

ABC	Área Bajo la Curva
ACN	Acetonitrilo
AIC	Criterio de Información de Akaike
BCS	Sistema de Clasificación Biofarmacéutico
C _{máx}	Concentración plasmática máxima
DAD	Detector de Arreglo de Diodos
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
FDA	Administración de alimentos y fármacos
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FaSSGF	Fuido estomacal en estado de ayunas simulado
FaSSIF	Fluido intestinal en estado de ayuno simulado
FeSSIF	Fluido intestinal en estado postprandial simulado
IC	Intervalo de confianza
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
IVIVC	Correlación <i>in vitro in vivo</i>
MDT	Tiempo Medio de Disolución
MRT	Tiempo Medio de Residencia
MSD	Distancia Estadística Multivariada
MSE	Error del Cuadrado Medio
OMS	Organización Mundial de la Salud
SPE	Extracción en fase sólida
SSR	Suma del cuadrado de los residuos
t _{máx}	Tiempo en que se alcanza la concentración plasmática máxima
USP	Farmacopea de los Estados Unidos

1. INTRODUCCIÓN

En México, uno de los principales problemas de salud pública es la diabetes. En el mundo se han desarrollado medicamentos para tratar esta enfermedad, entre ellos la glimepirida, que es una sulfonilurea de segunda generación para tratar la diabetes tipo II. Aún en la actualidad se siguen desarrollando nuevos tratamientos, como la administración conjunta de dos fármacos. El desarrollo de formas de dosificación sólida oral es un proceso largo y costoso. La mejora continua de la formulación puede requerir cambios en la composición de la formulación, en el proceso de fabricación, en los equipos o tamaños de los lotes. Si se realizaran estos cambios, deben hacerse estudios en voluntarios para probar la bioequivalencia con la formulación anterior.

Ciertamente, esto incrementa el tiempo y el dinero invertido. Así que el desarrollo de pruebas que reflejen la información de la biodisponibilidad, sin la necesidad de estos estudios, serían de gran utilidad [1].

Las pruebas de disolución de fármacos son pruebas *in vitro* que cuantifican la disolución del fármaco en una forma sólida de dosificación oral; usualmente en un medio acuoso bajo condiciones especificadas.

Uno de los objetivos que se han trazado para las pruebas de disolución es el de la predicción del comportamiento *in vivo* de las formas farmacéuticas de dosificación oral a partir de la información *in vitro* dada por una correlación apropiada, llamadas correlación *in vitro in vivo* (IVIVC) [2].

Esta correlación se refiere a la relación entre las características de disolución y los parámetros apropiados de biodisponibilidad [1].

Las soluciones amortiguadoras acuosas pueden ser utilizadas para simular las condiciones de pH en el estómago y en el intestino delgado, pero no pueden utilizarse para simular la influencia de la ingesta de comida en la liberación del fármaco.

Es crucial realizar las pruebas de disolución en condiciones que simulen estrechamente los parámetros de la fisiología gastrointestinal humana, ya que

la disolución del fármaco en condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal es el paso principal en la absorción de las formas farmacéuticas [3].

En 1998 Dressman propuso dos medios "biorrelevantes" para simular condiciones en el duodeno: FaSSIF y FeSSIF. Estos medios han ido actualizándose conforme se sabe más sobre los fluidos intestinales, y ahora ya se han descrito las versiones actuales de estos mismos: FaSSIF V2 y FeSSIF V2 [4].

Para los fármacos que son poco solubles pero altamente permeables (BCS Clase II), el paso limitante para la absorción es la disolución, así que para predecir su comportamiento *in vivo*, deben realizarse pruebas de disolución con los medios de disolución adecuados [5].

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es investigar si existe una correlación *in vitro in vivo* para la glimepirida a partir de los datos de disolución en un medio biorrelevante; basados en la hipótesis de que la glimepirida, al ser un fármaco de BCS Clase II, el paso limitante en la absorción es la disolución.

2. ANTECEDENTES

2.1 Disolución

2.1.1 Proceso de disolución

De acuerdo con la IUPAC, el término "disolución" se define como "la mezcla de dos fases con la formación de una nueva fase homogénea (es decir, la solución)".

En el caso de una partícula de fármaco sólido, que se disuelve en una solución acuosa o fluido corporal, una de las fases es el fármaco (por ejemplo, en la forma de un cristal o partícula amorfa) y la otra fase es una fase acuosa (considerando agua por razones de simplicidad).

Noyes y Whitney (1897) y otros investigadores estudiaron la velocidad de disolución de fármacos sólidos. De acuerdo con sus observaciones, los pasos de disolución incluyen el proceso de disolución del fármaco en la superficie de la partícula sólida, formando de esta manera una solución saturada alrededor de la partícula. El fármaco disuelto en esta solución saturada, conocida como la capa estancada, se difunde al disolvente de las regiones de alta a las regiones de baja concentración de fármaco.

Factores que afectan a la disolución del fármaco de una forma de dosificación oral sólida incluyen la naturaleza física y química del fármaco, la naturaleza de los excipientes y el método de fabricación [2, 6].

2.1.2 Pruebas de disolución

Las pruebas de disolución de fármacos son pruebas *in vitro* que cuantifican la disolución del fármaco en una forma sólida de dosificación oral; usualmente en un medio acuoso bajo condiciones especificadas. La prueba de disolución es un procedimiento importante de control de calidad. Los estudios de disolución *in vitro* de los fármacos son usualmente utilizados para el monitoreo de la estabilidad del producto y para el control del proceso de fabricación.

La prueba debe ser lo suficientemente sensible para mostrar cualquier pequeña variación en el proceso de producción. También es referente esencial al momento de decidir que formulación de prueba es la más adecuada para posteriormente producirse [2].

Las pruebas de disolución se establecieron hace más de 50 años y desde entonces se han utilizado con propósitos de control de calidad[3].

Las pruebas de disolución son un método oficial de evaluación para formas de dosificación sólidas orales. Varios medios de disolución estandarizados (se utilizan soluciones amortiguadoras acuosas debido a su bajo costo y su reproducibilidad), así como los aparatos a utilizar, están ya bien descritos en las farmacopeas alrededor del mundo.

2.1.3 Tecnología de disolución

Las farmacopeas establecen procedimientos estandarizados para evaluar la disolución de fármacos para la mayoría de formas sólidas de dosificación oral [7].

Los aparatos más comúnmente ocupados para las pruebas de disolución son los aparatos 1 y 2 que describe la USP.

El aparato 1 consiste de un vaso, con o sin tapa, de vidrio u otro material inerte y transparente; un motor, un eje propulsor metálico y una canastilla cilíndrica. El vaso está parcialmente sumergido en un baño de agua que recibe calor. Durante el transcurso de la prueba, el baño de agua debe mantener la temperatura al interior del vaso de $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y garantizar que el agua esté en constante movimiento (Figura 1).

Para el aparato 2 se emplea el aparato 1 usando como elemento de agitación una paleta compuesta por un aspa y un eje (Figura 2).

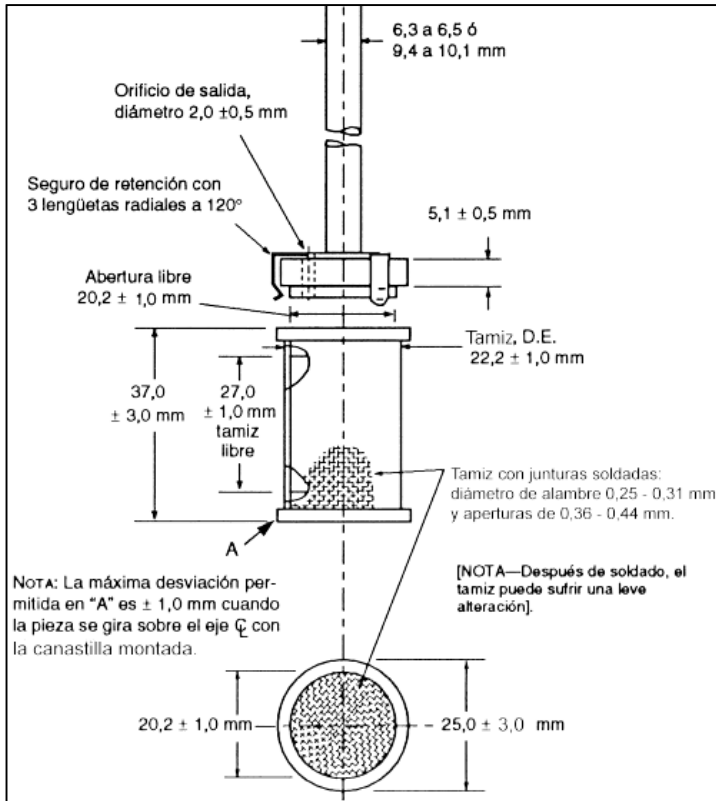


Figura 1. Especificaciones del aparato 1.

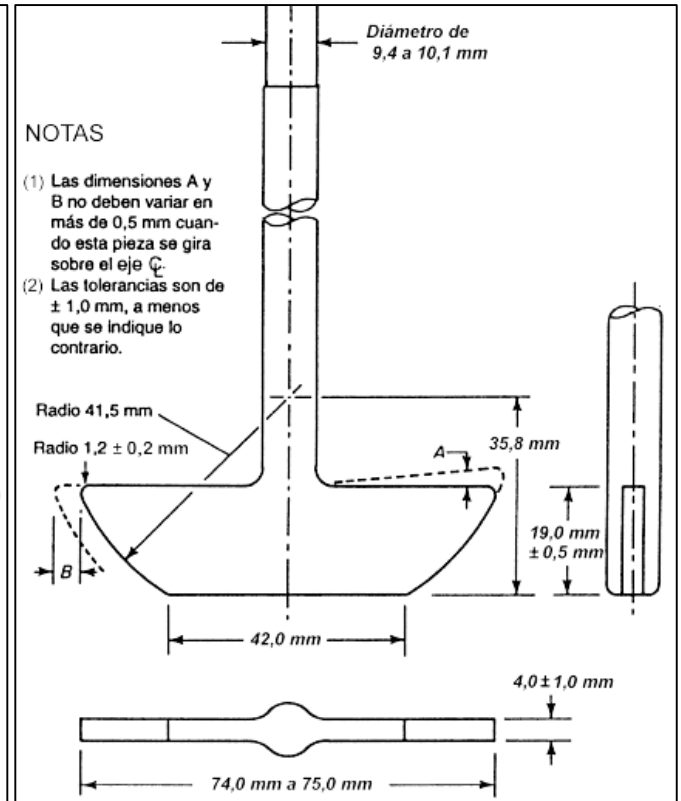


Figura 2. Especificaciones del aparato 2.

El aparato 3, llamado cilindro oscilante, se compone de un grupo de vasos de fondo plano, un grupo de cilindros oscilantes de vidrio, accesorios de un material inerte (de acero inoxidable o de otro material adecuado) y mallas de un material adecuado no absorbente ni reactivo, que se fijan a la parte superior e inferior de los cilindros oscilantes; un motor y una transmisión que hacen oscilar los cilindros en sentido vertical dentro de los vasos y, de ser necesario, traslada los cilindros oscilantes en sentido horizontal hacia otra hilera de vasos. Los vasos están parcialmente sumergidos en un baño de agua adecuado conveniente que permita mantener la temperatura a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ durante la prueba (Figura 3).

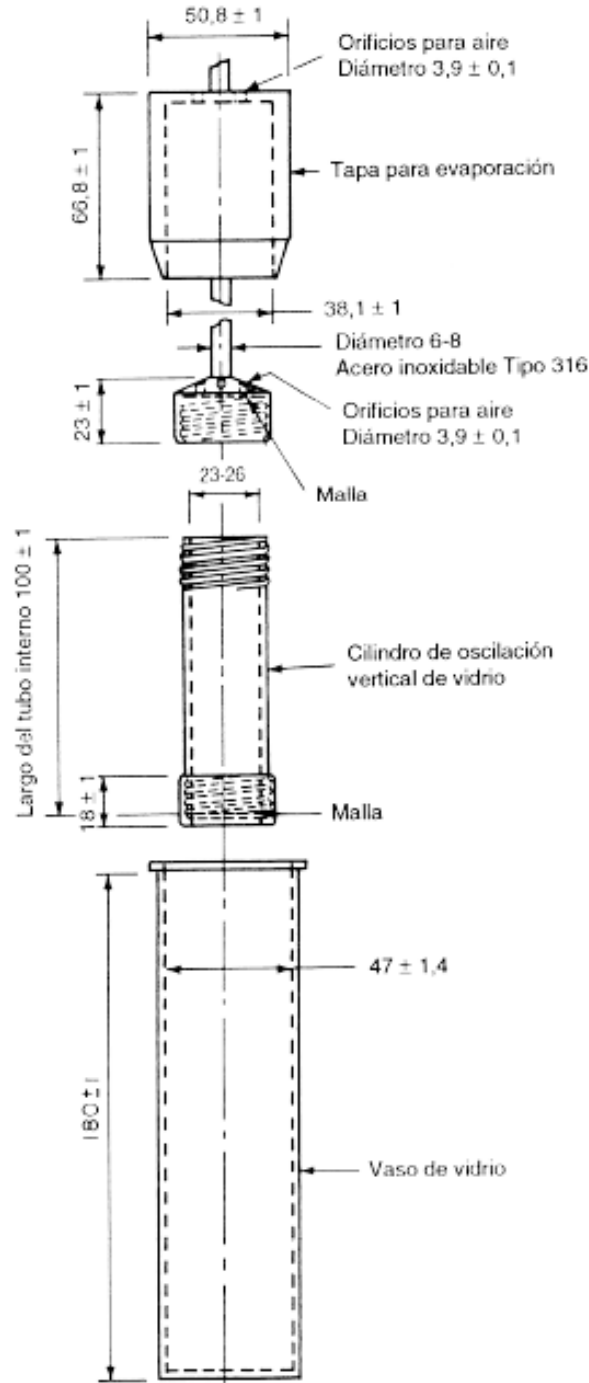


Figura 3. Especificaciones del aparato 3.

El aparato 4 (celda de flujo) se compone de un depósito y una bomba para el medio de disolución, una celda de flujo y un baño de agua que mantiene el medio de disolución a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Se debe utilizar la celda de tamaño especificado. La bomba desplaza el medio de disolución a través de la celda de

flujo en dirección ascendente. La bomba tiene un intervalo de operación de 240 a 960 mL por hora y las velocidades de flujo estándares son de 4, 8 y 16 mL por minuto. La bomba debe suministrar un flujo constante (Figura 4) [8].

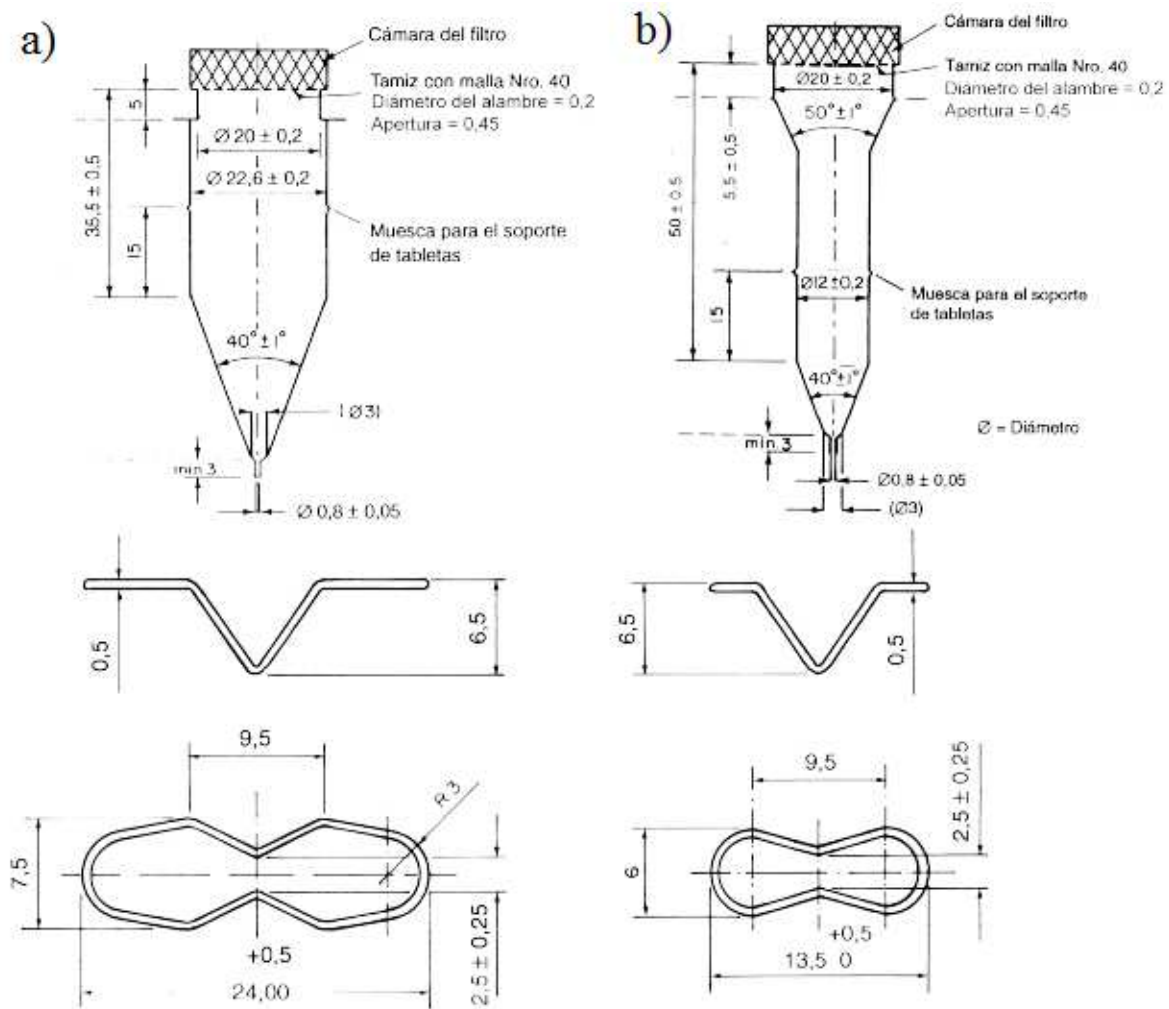


Figura 4. Especificaciones del aparato 4. a) Celda grande para tabletas y cápsulas y el porta-tabletas; b) celda pequeña para tabletas y cápsulas y el porta-tabletas.

2.1.4 Perfiles de disolución

La "velocidad de disolución" de un fármaco en un líquido se define generalmente como el cambio en la concentración de fármaco disuelto en un intervalo de tiempo. Para conocer esta velocidad, se realizan pruebas llamadas "Perfiles de disolución". Estas pruebas se realizan con medios de disolución, temperatura, aparato y velocidad de agitación establecidos. Se toma una muestra cada cierto tiempo, a la cual se mide la concentración de fármaco disuelto [6].

El PROY-NOM-177-SSA1-2013 establece que los perfiles de disolución deben realizarse con 12 unidades cada uno. Para realizar el perfil de disolución deben seleccionarse por lo menos 5 tiempos de muestreo que permitan caracterizar apropiadamente la curva ascendente y la fase de meseta. Únicamente dos puntos estarán en la meseta de la curva y los otros tres distribuidos entre la fase ascendente y de inflexión.

2.1.4.1 Modelos matemáticos para los perfiles de disolución

La evaluación cuantitativa de las características de disolución del fármaco es de gran interés para los científicos farmacéuticos.

Una amplia variedad de modelos matemáticos han sido desarrollados para ajustar los datos de liberación de fármacos, la mayoría de los cuales son ecuaciones no lineales[9]. Muchos de ellos representan el perfil de disolución con F (en algunos casos Q) que está en función del tiempo y relacionado con la cantidad de fármaco disuelto de la forma de dosificación farmacéutica.

Existen varias teorías y modelos que describen la disolución de fármacos a partir de formas de dosificación de liberación inmediata o prolongada.

Se deben utilizar ecuaciones empíricas, en la mayoría de los casos; para tabletas, tabletas recubiertas o de liberación prolongada.

El tipo de fármaco, la presencia de polimorfos, cristalinidad, tamaño de partícula y la solubilidad, pueden influir en la cinética de liberación del fármaco.

Un fármaco soluble en agua que está contenido en una matriz farmacéutica, principalmente es liberado por difusión, mientras que para uno de baja solubilidad la erosión de la matriz será su principal mecanismo de liberación[10].

Los modelos que más se aplican y describen mejor el fenómeno de disolución son el de Higuchi, modelo de orden cero, Weibull y Korsmeyer-Peppas.

En la tabla 1 se muestran los más utilizados con su respectiva ecuación.

Tabla 1. Modelos matemáticos de disolución[10].

Orden cero	$Q_t = Q_0 + K_0 t$
Primer orden	$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1 t$
Segundo Orden	$Q_t/Q_\infty(Q_\infty - Q_t)K_2 t$
Hixson–Crowell	$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_s t$
Weibull	$\log[-\ln(1 - (Q_t/Q_\infty))] = b \times \log t - \log a$
Higuchi	$Q_t = K_H \sqrt{t}$
Baker–Lonsdale	$(3/2)[1 - (-1(Q_t/Q_\infty))^{2/3}] - (Q_t/Q_\infty) = Kt$
Korsmeyer–Peppas	$Q_t/Q_\infty = K_k t^n$
Cuadrático	$Q_t = 100(K_1 t^2 + K_2 t)$
Logístico	$Q_t = A/[1 + e^{-K(t-y)}]$
Gompertz	$Q_t = A e^{-e^{-K(t-y)}}$
Hopfenberg	$Q_t/Q_\infty = 1 - [1 - k_0 t/C_0 a_0]^n$

El modelo de Weibull es una ecuación empírica que se adaptó para describir los perfiles de disolución. Esta ecuación puede aplicarse a casi todas las curvas de disolución satisfactoriamente y es muy usada en este tipo de estudios.

Cuando se aplica a la disolución de fármacos de una forma de dosificación sólida oral, la ecuación de Weibull (Ecuación 1) expresa la fracción acumulada del fármaco (F) en el tiempo de disolución (t):

$$F = 100 \cdot \left(1 - e^{-\frac{t^\beta}{\alpha}}\right) \text{(Ec. 1)}$$

En esta ecuación "a" define la escala de tiempo del proceso. El parámetro de forma "b", puede caracterizar la curva de distintas maneras; b=1 como una exponencial; b>1 como una sigmoidea con forma de S; o b<1 parabólica con una pendiente inicial muy alta y después consistente con una exponencial.

Debido a que este modelo es empírico y no tiene una base cinética, sólo puede describir la curva del perfil y por lo tanto no caracteriza ninguna propiedad cinética de disolución.

En 1983 Korsmeyer y Peppas desarrollaron un modelo simple y semiempírico, que relaciona exponencialmente la liberación del fármaco con el tiempo (Ecuación 2).

$$F = k_{KP} \cdot t^n \text{(Ec. 2)}$$

Donde F está en función del tiempo y es la fracción liberada, k_{KP} la constante de velocidad de liberación del fármaco y n es el exponente de liberación.

El valor 'n' puede utilizarse para conocer el mecanismo de liberación. Si es <0.5 el mecanismo de liberación es por difusión de Fick; si $0.5 < n < 1.0$ entonces es una transferencia de masa que no sigue una difusión de Fick. En el caso de un cilindro los valores son 0.45 en vez de 0.5 y 0.89 en vez de 1.0 respectivamente.

En 1988 se hizo una modificación a la ecuación para usarse con un tiempo de retardo (en inglés: lag) al principio de la liberación [10]. La ecuación queda de la siguiente manera:

$$F = k_{KP} \cdot (t - T_{lag})^n \quad (\text{Ec. 3})$$

Para escoger el mejor modelo para describir el perfil se deben tomar en cuenta varios parámetros. Uno muy común es el coeficiente de correlación r^2 , con el cual sabemos que tanto se ajustan los datos al modelo. Sin embargo, éste tiende a aumentar cuando se le agregan parámetros al modelo.

Cuando se comparan perfiles con un número distinto de parámetros, es mejor utilizar el coeficiente de correlación ajustado (r^2 ajustado), ya que toma en cuenta el número de parámetros en el modelo. Si se aumentan parámetros al modelo, r^2 aumenta o al menos permanece igual, en cambio, r^2 ajustada puede disminuir, indicando el parámetro añadido no mejora el modelo.

Además de r^2 y r^2 ajustada, se pueden tomar en cuenta los valores de la suma de cuadrados de los residuos (SSR por sus siglas en inglés), el cuadrado medio del error (MSE por sus siglas en inglés) y el criterio de información de Akaike (AIC por sus siglas en inglés).

El criterio de información de Akaike es una medida de bondad de ajuste basada en la máxima probabilidad. Se ha utilizado para seleccionar los modelos óptimos durante más de 35 años. Su aplicabilidad general y simplicidad hacen que sea un criterio excelente y popular para diversos fines, entre ellos el análisis de la disolución de fármacos. Cuando se comparan varios

modelos para el mismo conjunto de datos, el modelo asociado con el menor valor de criterio de Akaike, es el que mejor ajusta de los modelos probados [9, 10].

2.1.4.2 Comparación de perfiles de disolución

Otra área importante en el análisis de datos de disolución, es la evaluación de la similitud entre los perfiles de disolución. Varios enfoques se han desarrollado para su comparación, incluyendo los enfoques modelo independiente, como el factor de diferencia f_1 , el factor de similitud f_2 o la Región de Confianza Multivariada; el índice de Rescigno, distintas formas de ANOVA, el enfoque estadístico multivariado y el enfoque modelo dependiente [9, 11].

- Comparación por alcance modelo – independiente

El factor de diferencia f_1 (Ecuación 4) mide el porcentaje de error entre dos curvas en todos los puntos (tiempos de muestreo). Donde R_t y T_t son los porcentajes de disolución de la referencia y la prueba, respectivamente, a un tiempo t .

$$f_1 = \left[\frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \right] \times 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

El porcentaje de error es cero cuando los dos perfiles son idénticos y aumenta proporcionalmente con la disparidad entre los perfiles de disolución.

El factor de similitud f_2 (Ecuación 5) es la transformación logarítmica del error de la suma de cuadrados de la diferencia entre los perfiles a comparar. Es sensible al número de puntos de tiempo, especialmente después de que se haya alcanzado la meseta de disolución (> 85 %). Es decir, si se selecciona un gran número de puntos de muestreo después de que se alcanza la asíntota, entonces la diferencia promedio global será pequeña y tenderá a ser más

grande que 50, lo que resultará en una determinación de similitud aunque los perfiles podrían ser diferentes.

Debido a f_2 no tiene en cuenta la variabilidad dentro de los lotes de prueba y de referencia, cuando se utilizan los valores medios de las dos curvas en cada punto de tiempo, se sugiere que el límite del coeficiente de variación (CV) en el primer punto no debe ser superior al 20%, y en los demás, no mayores al 10%.

El resultado puede estar entre 0 y 100. Un valor de 100 significa que los perfiles son idénticos y tiende a cero cuando aumenta su disparidad. Donde R_t y T_t son los porcentajes de disolución de la referencia y la prueba, respectivamente, a un tiempo t .

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\} \quad (\text{Ec. 5})$$

En general, valores de f_1 menores a 15 (0-15) y valores de f_2 mayores a 50 (50-100) muestran una similitud entre los perfiles de disolución [9-11].

El factor de similitud ha sido adoptado por la FDA y la EMEA como criterio para establecer la similitud entre dos perfiles de disolución *in vitro* [12].

Las agencias internacionales, aún no han logrado armonizar los criterios para el cálculo del factor de similitud; mientras que la FDA establece que sólo se deberá considerar una medición después de la disolución del 85% de ambos productos, la EMEA establece que para el cálculo no debe tomarse más de un tiempo después de haber alcanzado un valor promedio del 85% disuelto de cualquiera de las formulaciones, la OMS y la NOM177 señalan que para el cálculo se debe tomar como máximo un tiempo después de que el producto de referencia haya alcanzado el 85% [12-15].

- Comparación por Región de Confianza Multivariada

Los procedimientos de región de confianza multivariados son algunos de los métodos modelo independientes que están recomendados por la FDA para la comparación de perfiles de disolución en los casos en que la variación dentro

del lote es superior al 15%. Este procedimiento se puede clasificar en dos: el 90% del Intervalo de Confianza (IC) o método de la diferencia (para valores de disolución de un solo punto) y los métodos de distancia estadística multivariada (para perfiles de disolución en tiempo múltiples).

En situaciones en las que la variación dentro del lote es mayor que 15 %, las guías de la FDA recomiendan el uso de un método de intervalo de confianza multivariado para evaluar la similitud entre dos productos. Esto se puede hacer usando el siguiente procedimiento:

- 1) Establecer un límite de similitud en términos de la distancia estadística multivariada (MSD) con base en las diferencias intra-lote de la disolución del producto de referencia.
- 2) Calcular la MSD entre las medias de las disoluciones de la prueba y la referencia.
- 3) Estimar el 90% del IC del MSD que se determinó en el paso 2.
- 4) Comparar el límite superior 90% del IC con el límite de similitud determinado en el paso 1. El producto de prueba se declara que es similar al de referencia si el límite superior del 90% del IC es inferior o igual al límite de similitud.

Ningún procedimiento exacto para calcular el MSD es indicado explícitamente por la FDA. Sin embargo, en la práctica, un método aceptado y recomendado por la FDA es el que emplea una distancia estadística multivariante, llamada distancia de Mahalanobis, y se utiliza para medir la diferencia entre dos medias multivariantes [9, 12, 16].

Mientras que la FDA propone que el límite de similitud se calcule con base en la variación intra-lote, la EMEA pide que el límite de similitud sea pre-definido en no más de 10% de diferencia [12, 14].

- Comparación por Alcance Modelo Dependiente

El enfoque modelo dependiente se puede utilizar, no sólo para describir el perfil de disolución, sino también para evaluar la similitud entre los perfiles de disolución de acuerdo a la similitud de sus parámetros. De acuerdo con el

método que ha sido aprobado por la FDA, se ha propuesto el siguiente procedimiento para evaluar la similitud entre dos formulaciones:

- 1) Determinar el modelo más apropiado para los perfiles de disolución del producto de referencia
- 2) Ajustar los datos individuales de disolución del producto de referencia al modelo más apropiado.
- 3) Definir un límite de similitud en términos de la MSD con base en la variación de los parámetros del modelo ajustado para las unidades de dosificación del lote de referencia.
- 4) Ajustar los datos individuales de disolución del producto de prueba al modelo más apropiado determinado en el paso 1.
- 5) Calcular el MSD entre los productos de prueba y de referencia utilizando los parámetros del modelo.
- 6) Estimar el 90 % del IC de la MSD que se determina en el paso 5.
- 7) Comparar el límite superior del 90 % del IC con el límite de similitud determinada en el paso 3. La hipótesis de similitud entre las dos formulaciones puede ser aceptada si el límite superior del 90 % del IC es inferior o igual al límite de similitud.

A partir de los pasos anteriores, se puede observar que el concepto de este enfoque modelo-dependiente es en parte similar al del método multivariante ya descrito, debido a que ambos métodos miden la diferencia entre dos conjuntos de datos en términos de la MSD. La diferencia está en que el enfoque multivariado calcula el MSD sobre la base de los datos originales de disolución del fármaco y el enfoque de modelo dependiente calcula el MSD sobre la base de los parámetros derivados del modelo [9, 12].

2.2 "Bioexención" de estudios de bioequivalencia

En general, los estudios de bioequivalencia son requeridos para la aprobación inicial de medicamentos de un medicamento genérico o para algunos cambios post-aprobación en orden de asegurar la equivalencia con una forma de dosificación que, previamente, ha probado ser segura y efectiva.

De alguna manera, los estudios de bioequivalencia pueden ser sustituidos con otro tipo de evidencia, tales como información *in vitro*, para ahorrar tiempo y reducir costos.

El término "biowaiver" (que se traduce al español como "bioexención") se refiere a la exención del requerimiento de ejecutar estudios de bioequivalencia. Los tipos más comunes de bioexenciones, adoptados por las agencias regulatorias (FDA, EMEA) son el empleo del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS por sus siglas en inglés) o las correlaciones *in vitro* (IVIVC).

El sistema de clasificación biofarmacéutica fue propuesto por Amidon y colaboradores en 1995 como un marco para clasificar a los fármacos de acuerdo a su solubilidad y sus propiedades de permeabilidad [17].

Cuando se combina con la disolución de la forma de dosificación, el BCS toma en cuenta los tres mayores factores que influyen la velocidad y la absorción del fármaco en la forma de dosificación de liberación inmediata: disolución, solubilidad y permeabilidad intestinal.

De acuerdo al BCS los fármacos se clasifican de la siguiente manera:

Clase I. Alta solubilidad y alta permeabilidad

Clase II. Baja solubilidad y alta permeabilidad

Clase III. Alta solubilidad y baja permeabilidad

Clase IV. Baja solubilidad y baja permeabilidad [18].

Muchas agencias regulatorias han adoptado el BCS como una herramienta para permitir exenciones de los estudios de bioequivalencia de productos de liberación inmediata, que no tienen un estrecho índice terapéutico y que no están diseñados para absorberse en la cavidad oral.

Un fármaco que pertenece al BCS I, puede solicitar una bioexención si se disuelve muy rápido (>85% en 15 minutos) en medios con pH 1.2, 4.5 y 6.8.

De la misma forma, si la disolución es rápida (>85% en 30 minutos), se pueden exentar los estudios de bioequivalencia si el factor de similitud f_2 es mayor que 50, con respecto a la referencia. Y para un fármaco que sea un ácido débil de clase III, se puede solicitar si su disolución es rápida y su

formulación no incluye excipientes que puedan afectar la motilidad del tracto gastrointestinal [17, 18].

Para los de clase II, se puede solicitar una bioexención si el producto de prueba, presenta un perfil de disolución similar al de referencia [19].

2.2.1 Correlación *in vitro in vivo*

Uno de los objetivos que se han trazado para las pruebas de disolución es el de la predicción del comportamiento de las formas farmacéuticas de dosificación oral a partir de la información *in vitro* dada por una correlación apropiada, llamadas correlación *in vitro/in vivo* (IVIVC)[2]. La relación entre la disolución *in vitro* y la biodisponibilidad o la absorción no se ha estudiado muy extensamente [20].

La correlación se define como el grado de relación entre 2 variables. Matemáticamente el término correlación se refiere a la interdependencia entre variables medibles. Cuando se habla de correlación, una relación lineal es la que se viene a la mente inmediatamente.

Desde un punto de vista biofarmacéutico, correlación puede referirse a la relación entre las apropiadas características de disolución y los parámetros de biodisponibilidad [1].

– La USP define IVIVC como:

El establecimiento de una relación racional entre una propiedad biológica o un parámetro derivado de una propiedad biológica producida por la forma de dosificación y una propiedad o característica fisicoquímica de la misma forma de dosificación.

– La FDA define IVIVC como:

Un modelo matemático predictivo que describe la relación entre una propiedad *in vitro* de una forma de dosificación y una respuesta *in vivo* relevante. Generalmente, la propiedad *in vitro* es la velocidad o el punto final de la disolución o liberación de un fármaco, mientras que la respuesta *in vivo* es la concentración o la cantidad de fármaco absorbido en el plasma.

2.2.2 Niveles de correlación

Además la FDA hace una clasificación del nivel de correlación:

– Correlación nivel A

Este es el nivel de más alta categoría porque representa una relación punto a punto entre la velocidad de disolución *in vitro* y la velocidad de absorción *in vivo* de la forma farmacéutica. El porcentaje de fármaco absorbido puede ser calculado por métodos modelo-dependientes, como el de la técnica de Wagner–Nelson o el método Loo–Riegelman o por una deconvolución numérica modelo-independiente.

El propósito de la correlación nivel A es definir una relación directa entre los datos de mediciones *in vivo*, tal que la sola prueba de disolución sea suficiente para predecir datos de los parámetros farmacocinéticos de la forma de dosificación [1].

Una correlación de nivel A debería ser una relación 1 a 1 entre absorción y disolución con una pendiente igual a 1 y una ordenada al origen igual a cero. Un estadístico del análisis de nivel A es el coeficiente de correlación r^2 . r^2 puede ir desde cero hasta 1 y es una medida entre la relación que existe entre la fracción absorbida y la fracción disuelta [21].

– Correlación nivel B

Una correlación de nivel B utiliza los principios del análisis del momento estadístico.

El tiempo medio de disolución *in vitro* (MDT *in vitro*) se compara con el tiempo medio de residencia (MRT) o con el tiempo medio de disolución *in vivo* (MDT *in vivo*). No es considerada una correlación punto a punto, porque existen distintas curvas *in vivo* que producen similares (MRT).

Uno puede confiar en esta correlación por sí misma únicamente para modificar la formulación, cambios en la fabricación o en las materias primas.

– Correlación nivel C

En ésta, sólo un punto de la disolución se compara con parámetros farmacocinéticos como ABC, $t_{m\acute{a}x}$ o $C_{m\acute{a}x}$. Es una correlación de un solo punto y es el nivel de correlación más débil.

- Correlación C de nivel múltiple

Relaciona uno o varios parámetros farmacocinéticos de interés ($C_{\text{máx}}$, AUC o algún otro) a la cantidad del fármaco disuelto a distintos tiempos.

Si es posible hacer una correlación C de nivel múltiple, entonces se tienen elementos para, en su caso, mejor hacer una de nivel A [1].

2.2.3 Software para establecer correlaciones *in vitro in vivo*

Existen en el mercado distintos programas de computadora para establecer correlaciones *in vitro in vivo*. Dentro de estas opciones se encuentran el IVIVC Toolkit de WinNonlin® [22], PDx-IVIVC® de GloboMax [23], IVIVCPlus™ de GastroPlus™ [24] y el paquete IVIVC para la plataforma de software libre R [25]. Este último paquete calcula el modelo para la IVIVC en dos etapas. En la primera se estima la fracción observada de fármaco absorbido basándose en el método de Wagner-Nelson. Para esto se pueden tomar como referencia datos reportados en la literatura o se calculan a partir de datos de concentraciones plasmáticas para administración intravenosa. El modelo de la IVIVC se genera utilizando la fracción observada del fármaco absorbido y la fracción liberada de fármaco disuelto. En la segunda etapa se valida el modelo de correlación, calculando con él el área bajo la curva tiempo infinito ($ABC_{0-\infty}$) y prediciendo con él el valor de concentración plasmática máxima ($C_{\text{máx}}$). Con estos datos se calcula el porcentaje de error de la predicción respecto al valor observado; para $C_{\text{máx}}$, el valor utilizado para el cálculo del error es el máximo valor de Concentración observada.

2.3 Condiciones del tracto gastrointestinal

Es crucial realizar las pruebas de disolución en condiciones que simulen estrechamente los parámetros de la fisiología gastrointestinal humana. Ya que la disolución del fármaco en condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal es el paso principal en la absorción de las formas farmacéuticas [3].

Para que un fármaco sea absorbido, tiene primero que estar disuelto en el fluido del sitio de absorción. Por ejemplo, un fármaco administrado por vía oral en forma de tableta no puede ser absorbido hasta que las moléculas de

fármaco se disuelvan en los fluidos del tracto gastrointestinal. Una vez que el fármaco se absorbe sistémicamente, se producen procesos fisiológicos normales para la distribución y eliminación, que por lo general no están influidos por la formulación específica del fármaco. La velocidad de liberación a partir del producto, la velocidad y grado de absorción son importantes en la determinación de la distribución, el comienzo, la intensidad y la duración de la acción del fármaco.

La biodisponibilidad se refiere a la medición de la velocidad y el grado de fármaco activo que se convierte en disponible en el sitio de acción. La circulación de la sangre sistémica administra el fármaco a los tejidos [26].

La ruta oral es muy compleja debido a las condiciones fisiológicas que el medicamento encuentra a su paso desde la boca hasta su sitio de absorción en el intestino.

Factores fisiológicos como la velocidad de vaciamiento gástrico, el movimiento peristáltico, el flujo de sangre; así como el volumen, la composición y el pH de los alimentos, son conocidos por el impacto que tienen en la velocidad o en la incapacidad de absorción de fármacos.

Con el descubrimiento de nueva información sobre el medio intraluminal, las pruebas de disolución podrían tener la capacidad de simular las condiciones del tracto gastrointestinal para así tener mejores predicciones del desempeño *in vivo* [20].

La composición del contenido gastrointestinal puede influir significativamente en la solubilidad del fármaco.

Para los fármacos lipófilos, los niveles de grasa y las concentraciones de sales biliares son los factores más relevantes. En el caso de fármacos ionizables, la capacidad amortiguadora y el pH son lo relevante en cuanto a la velocidad de disolución [3].

Los anfifilos (tensoactivos o surfactantes) se caracterizan por tener una estructura molecular con un dominio hidrófilo y uno hidrófobo. Cuando alcanzan el límite de reducción de la tensión superficial (concentración micelar crítica CMC) espontáneamente forman agregados llamados micelas (Figura 5).

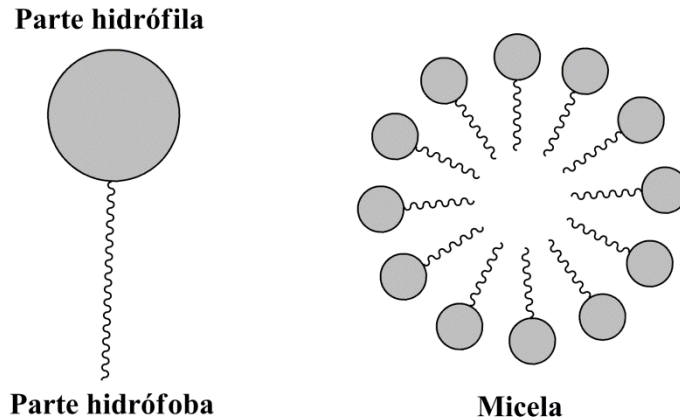


Figura 5. Anfifilo y micela.

En el intestino delgado, los anfifilos más relevantes secretados en la bilis son los ácidos/sales biliares, liso-fosfolípidos y el colesterol; y por parte de la digestión de alimentos los ácidos grasos y los monoglicéridos.

Las sales biliares y los liso-fosfolípidos son caracterizados como anfifilos solubles, estos pueden formar micelas por sí mismos.

Los lípidos pueden ser solubilizados y transportados por anfifilos que forman micelas. Los triglicéridos, diglicéridos, el colesterol y los ácidos grasos de cadena larga, en su forma protonada son insolubles.

Las sales biliares son moléculas planas tienden a orientarse en estructuras del tipo micelar con el lado hidrófobo proyectándose al interior de las micelas y el hidrófilo hacia fuera, lo que maximiza la hidratación de la parte hidrófila (Figura 6).

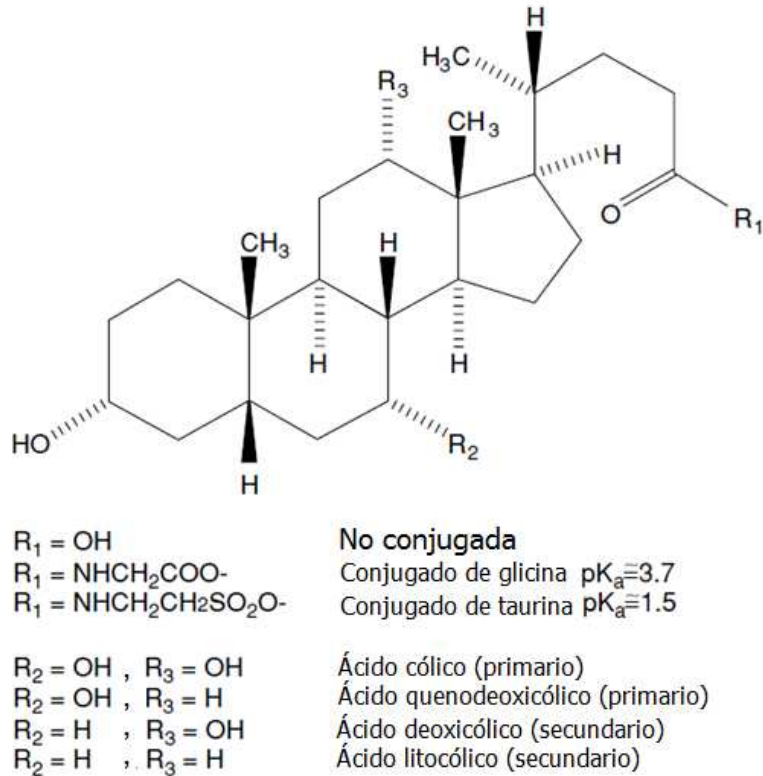


Figura 6. Estructura de las sales biliares [20].

La cinética de solubilización de fosfolípidos y sales biliares depende fuertemente del tipo de sal, siendo el más rápido el glicoquenodeoxicolato.

Los ácidos biliares son sintetizados en el hígado y almacenados en la vesícula biliar. La bilis se compone aproximadamente de 84% de agua, 11.5% de sales biliares, 3% de fosfolípidos, 0.5% de colesterol y 1% de pigmentos, iones y proteínas.

Después de la ingesta de comida, la respuesta hormonal facilita la secreción de bilis de la vesícula biliar al duodeno.

Los ácidos biliares se secretan de la vesícula biliar como sales de sodio o potasio y que están conjugados por enlace peptídico a taurina o glicina. El ácido cólico y el quenodeoxicólico son los de mayor presencia en la bilis.

Los ácidos biliares primarios se sintetizan en el hígado a partir del colesterol. Los secundarios los forman las bacterias a partir de la dehidroxilación de los primarios.

Los ácidos biliares conjugados están más ionizados y así son más solubles que los no conjugados.

En el rango de pH del intestino delgado (pH 5 – 6.8), los conjugados de taurina (pKa ~1.5) están ionizados, mientras que sólo una fracción de los de glicina (pKa ~3.7) lo están.

Las sales biliares ionizadas están cargadas negativamente a ese pH y necesitan un transportador para ser absorbidas (dicho transportador se encuentra en la parte distal del intestino).

Después de su absorción en la sangre por la vena porta, las sales biliares regresan al hígado; a este proceso se le conoce como circulación enterohepática.

2.3.1 Composición de los fluidos gastrointestinales humanos

-Estómago en ayuno.

El volumen del jugo gástrico en el estado de ayuno está en el rango de 15 – 50 mL y su pH está entre 1.5 y 2.9. El jugo gástrico es hipo-osmótico (≤ 200 mOsm/kg). Su tensión superficial se ha reportado entre 30 a 50 Nm/m, que es menos que la del agua (~ 70 mN/m).

La presencia de bajas cantidades de sales biliares, pueden provenir de reflujos del duodeno o de la lisis de células de la mucosa gástrica, lo que explicaría la baja en la tensión superficial.

- Duodeno en ayuno.

Su pH está entre 6 y 7.1. El bicarbonato es la especie responsable de la capacidad amortiguadora. La osmolaridad está incrementada, comparada con el fluido gástrico (270 mOsm/kg). También hay pequeñas cantidades de sales biliares, lo cual explica su baja tensión superficial (30 ~ 34 mN/m).

Las sales biliares son secretadas con fosfolípidos, principalmente, fosfatidilcolina.

- Estómago en estado postprandial.

La composición del fluido gástrico en el estado postprandial, depende de la naturaleza de los alimentos ingeridos.

La capacidad del estómago humano va de 1 a 1.6L.

- Intestino delgado en estado postprandial.

Cuando el quimo llega al duodeno, está mezclado con bilis y secreciones pancreáticas, lo que resulta en un pH de 5.5 a 6.5. Además, en el intestino delgado existe un gradiente de pH desde el duodeno hasta el íleon. Con la comida, la capacidad amortiguadora y la osmolaridad aumentan, pero la tensión superficial no cambia significativamente.

- Digestión de lípidos.

Comienza en el estómago con la emulsificación y la hidrólisis. La lipasa gástrica remueve un ácido graso de un triglicérido, así forman surfactantes diglicéridos y ácidos grasos libres.

La emulsificación se da en el estómago y la hidrólisis en el intestino.

El jugo pancreático es rico en enzimas que se encargan de la hidrólisis. La fosfolipasa pancreática A_2 es la principal.

La colipasa pancreática se encarga de limpiar la superficie de anfífilos y así la enzima puede hidrolizar lípidos. Las micelas formadas se desintegran en el epitelio intestinal y los lípidos anfífilos se absorben.

2.4 Medios biorrelevantes

Las pruebas de disolución tradicionales, que son apropiadas para evaluar la calidad, no sirven para predecir el comportamiento *in vivo* de fármacos pobremente solubles [20]. Las soluciones amortiguadoras acuosas pueden ser utilizadas para simular las condiciones de pH en el estómago y en el intestino delgado, pero no pueden utilizarse para simular la influencia de la ingestión de alimentos en la liberación del fármaco. Esto cobra importancia, ya que en el caso de fármacos poco solubles, la fracción absorbida aumenta cuando el fármaco es ingerida conjuntamente con alimentos [3].

En 1998 Dressman propuso dos medios "biorrelevantes" para simular condiciones en el duodeno: FaSSIF y FeSSIF. Algunos de los parámetros de estos, fueron elegidos con base en datos caninos y no de humanos. Estas versiones de los medios biorrelevantes no reflejan la acción de los productos de lipólisis de la comida, los cuales, se sabe que mejoran la solubilidad y disolución de fármacos lipofílicos poco solubles [4].

2.4.1 Composición de los medios biorrelevantes actuales

En el estómago, es donde las formas farmacéuticas de liberación inmediata se desintegran y el ingrediente activo se disuelve antes de llegar al intestino.

Vertzoni en 2005, propuso un medio (FaSSGF) que fue diseñado para simular las condiciones del estado de ayuno, más el volumen que representa un vaso de agua. Tabla 2.

Tabla 2. Composición del medio que simula las condiciones de ayuno en el estómago (Fasted-State Simulated Gastric Fluid (FaSSGF)) [4].

Composición	
Taurocolato de sodio (μM)	80
Lecitina (μM)	20
Pepsina (mg/mL)	0.1
NaCl (mM)	34.2
HCl (cbp)	pH 1.6
Propiedades	
pH	1.6
Osmolaridad (mOsm/kg)	120.7 \pm 2.5
Capacidad de amortiguación (mmol/L/pH)	-
Tensión superficial (mN/m)	42.6

El intestino delgado es la región donde mejor se absorben los fármacos.

Para los ácidos débiles poco solubles, las condiciones de disolución son las más favorables en este órgano. Recientemente se han propuesto nuevas versiones de FaSSIF y FeSSIF. Se nombraron FaSSIF-V2 (Tabla 3) y FeSSIF-V2 (Tabla 4). Estas versiones se basan en la composición del fluido intestinal de adultos sanos.

En FaSSIF-V2 se ha cambiado de fosfato a maleato, ya que el maleato da la combinación adecuada de osmolaridad, pH y capacidad de amortiguamiento.

Para FeSSIF-V2 hay cambios en el pH, la capacidad de amortiguadora, la osmolaridad, las concentraciones de los componentes biliares y se le agregaron productos de lipólisis.

Tiene cantidades menores de componentes de la bilis, pero estos son compensados añadiendo monoglicéridos y ácidos grasos libres (productos de lipólisis).

Tabla 3. Composición del medio que simula el estado de ayuno de la parte proximal del intestino delgado Versión 2 (Fasted-State Simulated Intestinal Fluid Versión 2: FaSSIF V2) [4].

Composición (mM)	
Taurocolato de sodio	3
Lecitina	0.2
Ácido maleico	19.12
NaOH	34.8
NaCl	68.62
Propiedades	
pH	6.5
Osmolaridad (mOsm/kg)	180±10
Capacidad de amortiguación (mmol/L/pH)	10
Tensión superficial (mN/m)	54.3

Tabla 4. Composición del medio que simula el estado después de alimentos de la parte proximal del intestino delgado Versión 2 (Fed-State Simulated Intestinal Fluid Versión 2: FeSSIF V2) [4].

Composición (mM)	
Taurocolato de sodio	10
Lecitina	2
Gliceril-monooleato	5
Oleato de sodio	0.8
Ácido maleico	55.02
NaOH	81.65
NaCl	125.5
Propiedades	
pH	5.8
Osmolaridad (mOsm/kg)	390±10
Capacidad de amortiguación (mmol/L/pH)	25
Tensión superficial (mN/m)	40.5±0.2

FaSSIF-V2 y FeSSIF-V2 demostraron una mejor predicción del comportamiento *in vivo* que sus predecesores. Como ejemplo, los medios actualizados predicen que no hay efecto de los alimentos para ciertas tabletas de glibenclamida, como ocurre *in vivo*, y no como sus versiones previas en el que sí lo hay (Figura 7).

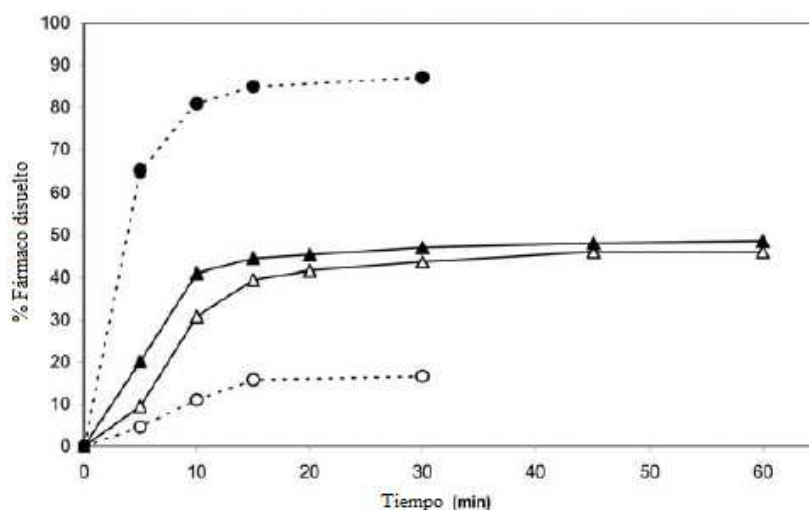


Figura 7. Comparación de perfiles de disolución de tabletas de glibenclamida en FaSSIF (●) y en FeSSIF (○) (líneas punteadas), y en FaSSIF-V2 (▲) y en FeSSIF-V2 (Δ) (líneas continuas) [4].

Para el éxito de la predicción *in vivo* de un fármaco no sólo se debe considerar el medio, además debe considerarse la hidrodinamia.

El estómago tendría 300 mL en el estado de ayuno y 1 L en el estado postprandial. En el intestino 200mL de ayuno y 1L con alimentos.

Los aparatos compéndiales (aparatos 1 y 2) no simulan la movilidad del intestino. Como sea, se han usado exitosamente en combinación con los medios biorrelevantes para obtener buenas IVIVC[4].

2.4.2 Predicción *in vivo* del desempeño de una formulación

El primer paso es la correcta caracterización de la solubilidad del ingrediente activo farmacéutico, para esto, un perfil de disolución es lo más adecuado.

Particularmente, con los compuestos lipófilos puede haber problemas de mojamiento, y las concentraciones de sales biliares pueden mejorar la solubilización.

Las formulaciones deben evaluarse y compararse contra su desempeño en humanos. Los fármacos BCS I y III no requieren de sofisticadas pruebas de disolución y las tradicionales pueden realizarse.

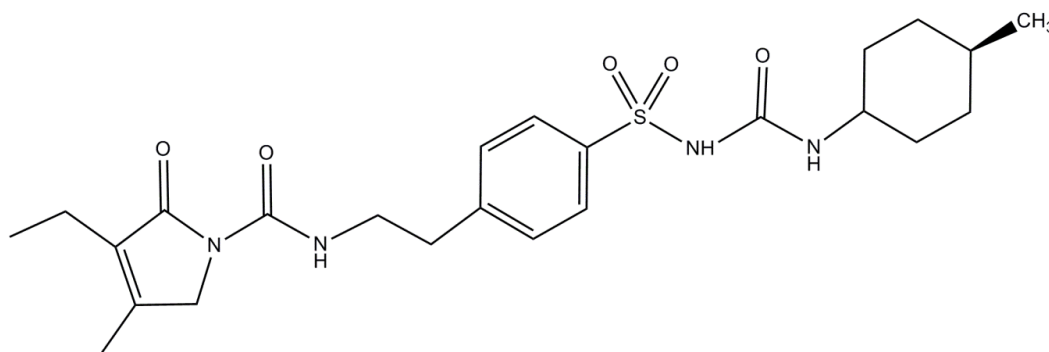
En cambio, para predecir el comportamiento de los II y IV, las pruebas simples no deben ser la primera opción.

Los fármacos de clase II, tienen un paso limitante en la disolución, así que para predecir su comportamiento *in vivo* debe realizarse con los medios de disolución adecuados.

Se ha reportado que el uso de medios biorrelevantes para predecir el comportamiento *in vivo* de fármacos de clase II (como el danazol, la fenitoína y el itraconazol) ha tenido resultados satisfactorios. Se espera que en un futuro cercano, el desarrollo de modernas formulaciones se base fuertemente en pruebas en medios biorrelevantes [3, 20].

2.5 Glimepirida

La glimepirida es una sulfonilurea que se administra por vía oral, que actúa estimulando la secreción de insulina y usualmente se utiliza con los pacientes de diabetes tipo II (Figura 8) [27, 28].



C₂₄H₃₄N₄O₅SMM 490.62

1- [[p-[2-(3-Etil-4metil-2-oxo-3-pirrolina-1-carboxamido)etil]fenil]sulfonil]-3-(*trans*-4-metilciclohexil)urea

Figura 8. Molécula de la glimepirida[29]

Es un ácido débil, con punto de fusión de 207°C, un pKa de 5.3 y de baja solubilidad-dependiente del pH.

En medio acuoso ácido y neutro su solubilidad a 37°C es muy baja (<0.004mg/mL). En medio alcalino, a 37°C la solubilidad aumenta ligeramente (pH 7.8; 0.02mg/mL). Es altamente permeable (BCS 2).

El mecanismo de acción principal de la glimepirida en la reducción de la glucosa en sangre, parece ser la estimulación de la liberación de insulina a partir del funcionamiento de las células beta-pancreáticas. Apoyado por estudios preclínicos y clínicos, se demuestra que la administración de glimepirida puede conducir a un aumento de la sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina.

La glimepirida es eficaz como terapia inicial. En los pacientes con monoterapia de metformina o glimepirida no se ha producido un control glucémico adecuado, la combinación de metformina y glimepirida puede tener un efecto sinérgico, ya que ambos agentes actúan para mejorar la tolerancia a la glucosa por diferentes mecanismos primarios de acción. Este efecto complementario se ha observado con metformina y otras sulfonilureas, en múltiples estudios [30, 31].

Un leve efecto reductor de la glucosa aparece por primera vez después de dosis únicas orales tan bajas como 0.5 ó 0.6 mg en sujetos sanos. El tiempo requerido para alcanzar el efecto máximo es de aproximadamente de 2 a 3 horas. En ensayos con dosis más grandes, la glucemia y la HbA1c se encontraron que eran dosis-dependiente de 1 a 4 mg/día de glimepirida. Los resultados de eficacia no se vieron afectados por la edad, sexo, peso o raza.

La absorción es uniforme, rápida y completa casi con el 100% de biodisponibilidad y no se ve afectada por la ingesta de alimentos [27, 32-34].

El modelaje farmacocinético sigue un modelo abierto de un compartimento para administración oral, una rápida absorción seguido de una cinética de eliminación de primer orden y un tiempo de vida media corto [35].

Después de administración intravenosa (IV) en sujetos sanos, el volumen de distribución (Vd) fue de 8.8 L (113 mL/kg) y el aclaramiento corporal total (Cl) fue de 47.8 mL/min. La unión a proteínas es superior al 99.5%.

La glimepirida se metaboliza completamente por biotransformación oxidativa ya sea después de una inyección intravenosa o dosis oral. Los metabolitos

principales son el derivado de ciclohexilo metil hidroxilado (M1) y el derivado de carboxilo (M2). Se ha demostrado que el Citocromo P450 2C9 (CYP2C9) está involucrado en la biotransformación de glimepirida a M1. M1 se metaboliza a M2 por una o varias enzimas citosólicas.

Cuando la glimepirida se administra por vía oral, aproximadamente el 60% se recupera en la orina en 7 días como M1 (predominantemente) y M2 para el 80-90 % de la que se recupera en la orina. Aproximadamente el 40% se recupera en las heces en forma de M1 y M2 (principalmente) lo cual representa aproximadamente el 70% de la que se recupera en las heces. Ninguna fracción del fármaco inalterado se encontró en orina o en heces [36].

La metformina es un fármaco que ataca la resistencia a la insulina. Estudios clínicos han demostrado que la combinación provee un mejor control hipoglucemiante que cuando se administran solas, pero que la presencia de una no afecta los parámetros farmacocinéticos de la otra [31, 37].

2.5.1 IVIVC para la glimepirida

Se han realizado estudios para encontrar una IVIVC para la glimepirida. Pero dado que el método descrito para la disolución, maneja un medio de disolución de pH = 7.8, éste puede sobreestimar la disolución del fármaco y por lo tanto no se ha podido establecer una correlación [33, 38, 39].

2.5.2 Análisis cuantitativo de la glimepirida

Existen en la literatura métodos que cuantifican la glimepirida en presencia de metformina, pero que no toman en cuenta las cantidades que contienen las tabletas (de 1 a 4 mg de glimepirida y de 500 a 1000 mg de metformina). Cantidades de metformina que pueden afectar los equipos e instrumentos de los análisis analíticos. En el caso de la cromatografía de líquidos, estas concentraciones pueden sobrecargar la columna cromatográfica [28].

En la FEUM no hay una monografía para tabletas de glimepirida, sólo se encuentra la monografía de la glimepirida como sustancia [29]. En la farmacopea de Estados Unidos se encuentra una monografía para tabletas de

glimpirida [38] donde el requisito para cumplir disolución, es que se disuelva >85% en 15 minutos. En ninguna farmacopea (ni nacional ni internacional) existe una monografía para tabletas de glimepirida con metformina.

En México, los parámetros a evaluar para la validación de métodos analíticos para disolución se establecen en la NOM-177-SSA1-2013.Ésta describe los parámetros y criterios de aceptación para distintas pruebas para la validación del método analítico. Se hace una distinción entre sistema (estándar del fármaco) y método (forma sólida de dosificación oral).

Las pruebas para la validación son las siguientes:

Sistema

Linealidad. Preparar una curva, por duplicado, al menos con 5 puntos de concentración, sin incluir el punto cero. Coeficiente de correlación mayor o igual que 0.99.

Error relativo debido a la regresión no mayor que el 2%.

Precisión. Con los datos de linealidad del sistema calcular el coeficiente de variación del factor de respuesta. Coeficiente de variación del factor de respuesta menor o igual al 2%.

Estabilidad de la muestra. Determinar las condiciones de temperatura y tiempo entre otros, en las que el compuesto permanezca estable. La diferencia absoluta del promedio del porcentaje cuantificado en el análisis inicial y final debe ser menor o igual a 3%.

Influencia del filtro. Determinar que no exista adherencia del fármaco al filtro. La diferencia absoluta entre el promedio de los datos de por lo menos 6 muestras de solución filtrada y sin filtrar debe ser igual o menor al 2%.

Método

Linealidad. El método debe demostrar una linealidad con al menos 5 puntos de concentración por duplicado, sin incluir el punto cero, a partir de 10 unidades que representen el peso promedio. Coeficiente de correlación mayor o igual que 0.99.

Error relativo debido a la regresión no mayor que el 3%.

Exactitud. Con los datos de concentración cuantificada, obtenidos en la linealidad del método, calcular el porcentaje cuantificado. No debe haber variación mayor al 3% en cada punto con respecto al valor nominal.

Repetibilidad. Con los datos de exactitud del método, calcular el coeficiente de variación del porcentaje cuantificado. El coeficiente de variación del porcentaje cuantificado debe ser menor o igual al 3%.

Reproducibilidad. En caso de que participen dos o más analistas evaluar su efecto en la precisión del método. Para cada condición de interés analizar, como indica el método propuesto, una muestra homogénea de la disolución del producto, por triplicado y calcular el porcentaje cuantificado. El coeficiente de variación global, del porcentaje cuantificado, debe ser menor o igual al 3%.

Selectividad. Se debe demostrar la selectividad del método para el fármaco ante otros componentes de la muestra, cualquier interferencia no debe producir un error mayor al aceptado en precisión y exactitud.

Internacionalmente, ya sea la Farmacopea de Estados Unidos (USP) o la Farmacopea Europea (EP) son las que se establecen como validar los métodos analíticos. Éstas describen las pruebas a realizar pero los métodos no, sólo establecen los criterios de aceptación para cada parámetro.

Especificidad o interferencia por placebo: No mayor al 2%

Linealidad: $r^2 \geq 0.98$ y la ordenada al origen no debe ser significativamente diferente de cero.

Exactitud o recobro: Entre 95 y 105%

Precisión (Repetibilidad): No se especifica un valor de CV.

Precisión intermedia: Menos de 10% de diferencia en cada punto de la disolución

Estabilidad: El rango aceptable es de 98 a 102%

Adecuabilidad: $CV < 2\%$.

Robustez: Investigar qué factores afectan el método y controlarlos [40, 41].

2.5.3 Extracción en fase sólida

En la práctica, los componentes de los medios biorrelevantes dañan las columnas cromatográficas [42] Se necesita de un método para purificar la glimepirida. La extracción en fase sólida (SPE por sus siglas en inglés) es una buena opción que aprovecha las características fisicoquímicas del fármaco para poder separarlo de los demás componentes del medio de disolución.

2.5.4 Diseño de experimentos

Para desarrollar métodos analíticos, una herramienta poderosa es el diseño de experimentos, ya que su objetivo es realizar menos experimentos pero más razonados, de los cuales, con un correcto análisis se puede obtener información valiosa sobre el experimento.

Los modelos de diseño de experimentos son modelos estadísticos clásicos cuyo objetivo es averiguar si unos determinados factores influyen en una variable de interés y, si existe influencia de algún factor, cuantificar dicha influencia.

Para un diseño factorial se ha de seleccionar un número fijo de "niveles" para cada uno de los factores (variables) y los experimentos se realizarán con todas las posibles combinaciones de niveles. Los factores pueden ser cualitativos o cuantitativos.

En el caso de dos niveles, estos diseños factoriales son llamados de "cribado" (screening en inglés) por lo que nos dan un idea de cómo se comporta el sistema a estudiar. Se considera el nivel alto y el nivel bajo para poder estudiar una superficie amplia; estos se establecen basados en la experiencia o en lo que se conoce sobre el sistema.

Esos diseños son de especial importancia porque:

- Requieren pocos experimentos por factor estudiado
- Cuando se necesita una exploración local más completa, se pueden ampliar convenientemente.
- Constituyen la base de los diseños factoriales fraccionados [43].

3. OBJETIVO E HIPÓTESIS

3.1 Objetivo

3.1.1 Objetivo General

Evaluar el perfil de disolución de la glimepirida en tabletas conteniendo glimepirida y metformina en un medio de disolución farmacopeico y uno biorrelevante.

3.1.2 Objetivos específicos

Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de la glimepirida en un medio de disolución farmacopeico y uno biorrelevante.

Investigar si existe una posible correlación *in vitro in vivo* para la glimepirida a partir de los datos de disolución en un medio de disolución farmacopeico y uno biorrelevante con datos simulados a partir de los parámetros farmacocinéticos disponibles en la literatura.

3.2 Hipótesis

La glimepirida es un fármaco de clase II prácticamente insoluble en agua y las condiciones de disolución farmacopeicas sobreestiman su disolución; por lo que el perfil de disolución en el medio biorrelevante podría reflejar mejor las diferencias de disolución *in vitro* e *in vivo*.

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En todos los experimentos se emplearon estas sales adicionalmente a las mencionadas en cada punto:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4 , K_2HPO_4 y el ácido maleico; así como el Metanol grado HPLC y el acetonitrilo grado HPLC se obtuvieron de JT Baker (Xalostoc, México).

Se emplearon H_3PO_4 al 85% (Mallinckrodt Inc Kentucky, EU), NaCl (Reprofiquim Xalostoc, México) y NaOH (Merck Darntadt, Alemania). El agua se obtuvo de un equipo Milli Q (Millipore, EU).

Se empleó un potenciómetro Hanna Instruments (EU) y una balanza Denver Instruments (EU).

4.1 Desarrollo del método analítico

4.1.1 Análisis Cromatográfico de acuerdo a USP

Se reprodujeron las condiciones establecidas para las tabletas de glimepirida en el *Revision Bulletin* del 2010 de la USP [38]. Las cuáles son las siguientes:

Tabla 5. Condiciones establecidas por USP para tabletas de glimepirida

Longitud de onda	228 nm
Fase móvil	Solución amortiguadora de fosfatos pH = 2.4 : ACN (50:50 v/v)
Columna	C18 150 x 4.6 mm 5 μ m
Flujo	1.0 mL/min
Tiempo de corrida	15 minutos
Volumen de inyección	10 μ L

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia HP Series 1050 con detector de arreglo de diodos (DAD), bomba cuaternaria acoplado a un degasificador Alltech.

Solución amortiguadora de fosfatos pH = 2.4

Se pesan 0.23 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, se disuelven en 100 mL de agua y se ajusta el pH a 2.4 con ácido fosfórico al 10%. Se afora a 200.0 mL

Preparación de la muestra

Se pesan 10 mg de estándar de glimepirida y se colocan en un matraz volumétrico de 100.0 mL para una concentración de 0.1 mg/mL. Se afora con Acetonitrilo: Agua (90:10) y se filtra con una membrana de 0.45 μm PVDF (Millex). Cork, Irlanda).

4.1.2 Diseño experimental para las condiciones cromatográficas

Se empleó el diseño de experimentos para obtener las mejores condiciones para el análisis cromatográfico. Los diseños y los análisis de los experimentos se realizaron con el software estadístico Statgraphics Centurion XVI.

Se utilizó un diseño 2^2 . Los factores estudiados fueron el porcentaje de Acetonitrilo y el pH de la fase móvil; se realizó por duplicado y en orden aleatorio. Los niveles y factores se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Niveles para el diseño factorial para las condiciones cromatográficas

Nivel	pH	% Acetonitrilo
-1	4	50
+1	6	70

Los factores se consideran significativos con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$).

Solución de fosfatos pH = 4

Se pesan 0.23 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 0.1 g de Na_2HPO_4 ; se disuelven en 100 mL de agua y se ajusta el pH a 4 con ácido fosfórico al 10%. Se afora a 200.0 mL.

Solución amortiguadora de fosfatos pH = 6

Se pesan 2.85 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 0.52 g de Na_2HPO_4 ; se disuelven en 100 mL y se ajusta el pH a 6 con NaOH 1 M. Se afora a 250.0 mL.

Las condiciones empleadas en los análisis cromatográficos fueron las siguientes:

Tabla 7. Condiciones cromatográficas del análisis.

Longitud de onda	228 nm
Columna	C18 150 x 4.6 mm 5 µm Waters Simmetry
Flujo	1.0 mL/min
Tiempo de corrida	7 minutos
Volumen de inyección	30 µL

4.1.3 Diseño experimental para la extracción en fase sólida

Se empleó el diseño de experimentos para obtener las mejores condiciones para tener el mayor recobro y purificación de glimepirida en la extracción por fase sólida. Los diseños y los análisis de los experimentos se realizaron con el software estadístico Statgraphics Centurion XVI.

En este caso se utilizó un diseño factorial 2^{6-2} para probar 6 factores que pudieran tener efecto sobre la extracción.

Se emplearon columnas para extracción en fase sólida Strata C18E (Phenomenex, EU).

Los niveles y factores se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Niveles y factores para las condiciones de la SPE.

Nivel	Tratamiento*	Volumen lavado (µL)	% ACN en el lavado	Vacío (kPa)	Volumen Elución (µL)	% ACN en la elución
-	No	600	0	30	600	60
+	Sí	900	30	50	1000	90

* El tratamiento es agregar 1.0mL de solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.8 a 1.0mL de muestra.

Los factores se consideran significativos con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$). Para el efecto real de los factores se corrigieron las áreas con respecto al Tratamiento y al volumen de elución (540 µL para 600 µL y 940 para 1000 µL). Se consideraron que las condiciones eran las adecuadas cuando el recobro de glimepirida fuera del 97–103%.

El procedimiento de la extracción en fase sólida fue el siguiente:

- Se activa la columna con 1 mL de metanol y se equilibra con 1mL de solución amortiguadora de fosfatos pH= 2.4.
- Se hace pasar 1.0 mL de la muestra, se lava, se eluye y se colecta en un tubo limpio.

4.2 Validación del método analítico

Los métodos analíticos se validaron de acuerdo a los criterios que se establecen a continuación.

Se emplearon tabletas del mercado local que se adquirieron en una farmacia del Distrito Federal, que contienen glimepirida/metformina 4mg/1000mg de liberación inmediata. Producto A Lote: 13A123 (Cad: Dic 14) y Producto B Lote: 13E151V1 (Cad: May 16).

4.2.1 Validación del sistema

Parámetros a evaluar y sus criterios de aceptación

Linealidad. Se prepara una curva, por duplicado, de concentraciones de 1 µg/mL a 10 µg/mL. El coeficiente de correlación debe ser mayor o igual que 0.99.

Error relativo debido a la regresión no mayor que el 2%.

Y se calcula con las ecuaciones 6 y 7:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - (\text{pendiente} * \sum xy) - (\text{ordenada} * \sum y)}{n-2}} \text{ (Ec. 6)}$$

$$\text{ERDR} = \frac{S_{y/x}}{\bar{y}} * 100 \text{ (Ec. 7)}$$

Precisión. Con los datos de linealidad del sistema calcular el coeficiente de variación del factor de respuesta. Coeficiente de variación del factor de respuesta menor o igual al 2%.

Estabilidad de la muestra. Las muestras se dejaron en el automuestreador por 3 días a temperatura ambiente. Se analizaron al día 2 y al día 3. La diferencia absoluta del promedio del porcentaje cuantificado en el análisis inicial y final debe ser menor o igual a 3%.

Selectividad. No debe haber interferencias en la señal del analito. La prueba de selectividad se realizó con el Detector de Arreglo de Diodos, buscando interferencias en el espectro de la glimepirida. También se elaboró el espectro en 3D para mostrar que no hay interferencias en el tiempo de retención. Para considerar que no hay interferencias, el resultado del factor de pureza debe estar dentro del límite calculado.

Influencia del filtro Se hizo la disolución de una muestra y se filtró con un filtro de Nylon de 0.44 μm .

Preparación de la curva de calibración

La solución stock se prepara de la misma manera que se describe en el punto 4.1.1. De ésta, se toman 2.0 mL y se aforan a 20.0 mL con ACN: Agua (90:10 v/v).

La curva se prepara de la siguiente manera (Tabla 9):

Tabla 9. Curva de calibración para el fármaco

Volumen de la solución 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (mL)	Aforar con ACN:Agua (90:10 v/v) a (mL)	Concentración final ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1.0	10.0	1.0
3.0	10.0	3.0
5.0	10.0	5.0
7.0	10.0	7.0

4.2.2 Validación del método

Parámetros a evaluar y sus criterios de aceptación

Linealidad. Se prepara una curva, por duplicado, de concentraciones de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a partir de 10 unidades que representen el peso promedio. Coeficiente de correlación mayor o igual que 0.99.

Error relativo debido a la regresión no mayor que el 3%. Se calcula de igual manera que para el sistema.

Exactitud. Con los datos de concentración cuantificada, obtenidos en la linealidad del método, calcular el porcentaje cuantificado. El promedio del porcentaje cuantificado debe encontrarse entre 97% y 103%.

Repetibilidad. Con los datos de exactitud del método, calcular el coeficiente de variación del porcentaje cuantificado. El coeficiente de variación del porcentaje cuantificado debe ser menor o igual al 3%.

Reproducibilidad. Se evaluó en diferentes días una muestra homogénea de la disolución del producto, por triplicado y se calcula el porcentaje cuantificado. El coeficiente de variación global, del porcentaje cuantificado, debe ser menor o igual al 3%.

Selectividad. Se debe demostrar la selectividad del método para el fármaco ante otros componentes de la muestra, cualquier interferencia no debe producir un error mayor al aceptado en precisión y exactitud. Se realizó de la misma manera que para el sistema. Para considerar que no hay interferencias, el resultado del factor de pureza debe estar dentro del límite calculado.

La curva de calibración para el medio farmacopeico con el producto se prepara de la siguiente manera:

Se pulverizan 10 tabletas y a partir del peso promedio, se pesó la cantidad adecuada de polvo de las tabletas para tener una concentración de 10 µg/mL en un volumen de 100.0 mL. Se disuelve en 70 mL de solución amortiguadora pH = 7.8 y se sonica por 5 minutos con agitación manual cada minuto.

Se deja enfriar a temperatura ambiente y se afora a 100.0mL con la misma solución amortiguadora.

Se calienta a $38 \pm 1^\circ\text{C}$ y la curva se prepara de acuerdo a la tabla 10.

Medio de disolución farmacopeico: Solución amortiguadora de fosfatos

pH = 7.8

Se pesan 4.52 g de Na_2HPO_4 y 0.31 g de KH_2PO_4 . Se disuelven en 300 mL de agua y se ajusta el pH a 7.8 con ácido fosfórico al 10%. Se afora a 500.0 mL.

Tabla 10. Curva de calibración para el medicamento en solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.8

Volumen de la solución 10 µg/mL (mL)	Aforar con solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.8 (mL)	Concentración final (µg/mL)
1.0	10.0	1.0
3.0	10.0	3.0
5.0	10.0	5.0
7.0	10.0	7.0

A 1.0 mL de cada punto de la curva se le realizó una extracción por fase sólida con el procedimiento ya descrito.

La curva de calibración para el medio biorrelevante con el producto se prepara de la siguiente manera:

Se pesa la cantidad adecuada de polvo de las tabletas para tener una concentración de 10 µg/mL en un volumen de 100.0 mL. Se disuelve en 70 mL de medio de disolución FaSSIF V2 y se sonica por 5 minutos con agitación manual cada minuto. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se afora a 100.0 mL con el mismo FaSSIF V2. Se calienta a $38 \pm 1^\circ\text{C}$ y la curva se prepara de acuerdo a la siguiente tabla, con el medio FaSSIF V2 para llevar al volumen también a $38 \pm 1^\circ\text{C}$. La curva se preparó de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 11. Curva de calibración para el medicamento en medio FaSSIF V2

Volumen de la solución 10 µg/mL (mL)	Aforar con medio FaSSIF (mL)	Concentración final (µg/mL)
1.0	10.0	1.0
3.0	10.0	3.0
5.0	10.0	5.0
7.0	10.0	7.0

A 1.0 mL de cada punto de la curva se agregó 1.0 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.8 antes de hacer la extracción por fase sólida.

Solución amortiguadora de maleatos pH = 6.5

Se disuelven 1.39 g de NaOH, 2.23 g de ácido maleico y 4.01 g de NaCl en 900mL de agua y se ajusta el pH a 6.5 con NaOH 1M. Se afora a 1000.0 mL con agua.

El medio biorrelevante FaSSIF V-2 se obtuvo de Biorrelevant.com (Surrey, Inglaterra).

Medio de disolución biorrelevante FaSSIF V2 pH= 6.5

Se disuelven 1.79 g de polvo FaSSIF en 500 mL de solución amortiguadora de maleatos pH = 6.5. Se afora a 1000.0 mL con solución amortiguadora de maleatos.

4.3 Estudios de disolución

Los estudios de disolución se realizaron en el Aparato 2 (LabIndia DS 8000, India) de acuerdo al procedimiento (modificado) descrito en el Revision Bulletin del 2010 para tabletas de glimepirida.

Se realizaron los perfiles con 12 tabletas de cada producto para cada uno de los dos medios de disolución.

Para la elaboración de los perfiles de disolución se muestreó cada 10 minutos hasta llegar a la meseta de disolución.

Cada muestra fue procesada inmediatamente de su toma con la extracción en fase sólida.

Los perfiles de disolución se realizaron en 500 mL de medio de disolución y a 50 rpm, ya que son las condiciones recomendadas para los estudios de disolución en medio biorrelevante [44]. Se realizaron en el medio farmacopeico en el mismo volumen y a la misma velocidad de agitación para fines comparativos.

4.3.1 Estudios de disolución en medio farmacopeico

Los estudios de disolución en medio farmacopeico se realizan en 500mL de solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.8 a 50 rpm a 37°C para ambos medicamentos.

Cada muestra fue procesada inmediatamente de su toma con la extracción en fase sólida.

4.3.2 Estudios de disolución en medio biorrelevante

Los estudios de disolución en medio biorrelevante se realizaron en 500 mL del medio de disolución FaSSIF V2 a 50 rpm a 37°C para ambos medicamentos.

Cada muestra fue procesada inmediatamente de su toma con la extracción en fase sólida.

4.4 Análisis de los perfiles de disolución

4.4.1 Modelaje matemático de los perfiles

Para encontrar el modelo que mejor ajusta los datos de disolución para cada perfil, se utilizó el macro de Excel DDSolver [9].

Los modelos matemáticos a elegir son los siguientes: Weibull, Korsmeyer-Peppas, Korsmeyer-Peppas con tiempo de retraso, orden cero, primer orden, Higuchi. Sólo se consideraron los modelos de los que su r^2 ajustada fuera mayor de 0.98.

El modelo matemático seleccionado para describir el perfil se eligió con base en el que tuviera el mayor valor de r^2 ajustada, y los menores valores de criterio de Akaike (AIC) y suma de cuadrados de residuos (SSR).

4.4.2 Comparación de perfiles

De igual manera que para el modelaje, la comparación de perfiles se realizó con el macro de Excel DDSolver [9].

Los perfiles se comparan con el método de la Región de Confianza Multivariada con los criterios recomendados por FDA [12].

Se considera el perfil del producto en medio farmacopeico como la Referencia y el del medio biorrelevante como la Prueba.

Para la comparación de perfiles de los dos productos en el mismo medio de disolución, se consideró como la referencia al producto A.

El perfil del producto de prueba se declara que es similar al de referencia si el límite superior del 90% del IC es inferior o igual al límite de similitud. Se utilizó un valor de 15% en la diferencia máxima intra-lote para los cálculos.

4.5 Correlación *in vitro in vivo*

4.5.1 Obtención de niveles de concentración plasmática

Los niveles de fármaco en sangre se calcularon con los parámetros farmacocinéticos reportados en la literatura para la ingesta de una tableta de glimepirida de 4 mg [45]:

Vd: 8.8 L

ke: 0.124 h

Cmax: 364 µg/L

tmax: 2.1 h

F: 1

A partir de estos datos y con la ecuación de niveles en sangre del modelo abierto de un compartimento para administración oral (Ecuación 8), se realizan simulaciones para obtener el valor de la constante de la velocidad de absorción (k_a) que proporcione el valor de $C_{m\acute{a}x}$ ya descrito. La superficie explorada estuvo entre 0.05 y 2.0 h^{-1} .

$$Cp = \frac{k_a FD}{Vd(k_a - k_e)} (e^{-k_e \cdot t_{max}} - e^{-k_a \cdot t_{max}}) \text{ (Ec. 8)}$$

Con este dato y con esa misma ecuación se calculó la concentración del fármaco en sangre para los tiempos 0, 0.17, 0.33, 0.50, 0.67 y 0.83 horas.

4.5.2 IVIVC para los perfiles de los productos A y B en medio de disolución farmacopeico

Para establecer una posible correlación *in vitro* de nivel A con los datos de disolución *in vitro* y los datos de niveles plasmáticos simulados, se utilizó el programa IVIVC de la plataforma de software libre R [25].

Los datos que se introducen en el programa son los datos de concentración observada en plasma del fármaco contra el porcentaje disuelto del fármaco que corresponden al mismo tiempo.

Sólo se toman los datos hasta el 100% de la disolución in vitro.

Se considera una correlación exitosa cuando el valor de r^2 sea lo más cercano a 1, la ordena al origen a cero y la pendiente a 1. Se considera significativa si el valor de r^2 es mayor al valor crítico reportado en las tablas de Correlación de Pearson de acuerdo al número de grados de libertad. También se toma en cuenta el porcentaje de error calculado para el ABC (0- ∞) y de $C_{\text{máx}}$ [25].

4.5.3 IVIVC para los perfiles de los productos A y B en medio de disolución biorrelevante FaSSIF V2

Se siguen las mismas especificaciones que para los perfiles en el medio de disolución farmacopeico.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Desarrollo del método analítico

5.1.1 Análisis Cromatográfico de acuerdo a USP

El análisis cromatográfico se realizó con las condiciones establecidas por USP para tabletas de glimepirida con las cuales se obtenían cromatogramas como los de la figura 9.

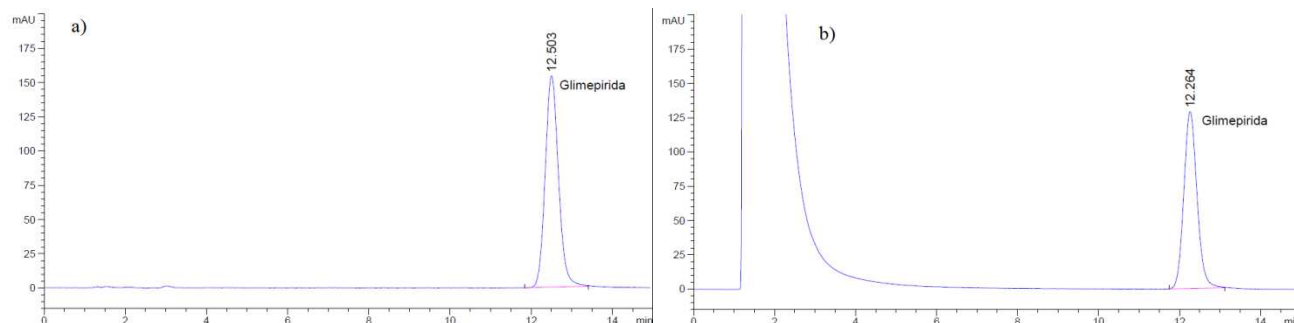


Figura 9. Cromatogramas obtenidos bajo las condiciones establecidas por USP para tabletas de glimepirida. a) Estándar de glimepirida, b) Tableta que contiene glimepirida y metformina.

Con las condiciones cromatográficas farmacopeicas, el tiempo de retención de la glimepirida fue de 12 minutos.

Con este método, el tiempo de análisis se extendía hasta los 15 minutos, lo que implica un alto gasto de acetonitrilo y por lo tanto una gran generación de desechos. Además este método fue diseñado para tabletas de glimepirida sin otro fármaco. Como se puede ver en la figura 9 b) cuando la tableta contiene metformina, la cantidad de ésta sobrecarga la columna pudiendo ser ineficiente la separación y disminuyendo la vida útil de la columna a medida que se incrementa el número de muestras, como es el caso de los perfiles de disolución. Además que el método de análisis de USP maneja en la fase móvil un pH = 2.4, el cual está muy cerca del límite inferior en el cual puede trabajar la columna recomendada. Lo anterior dio la pauta para proponer el diseño experimental planteado en la siguiente sección, orientado a la búsqueda de condiciones cromatográficas para reducir el tiempo de análisis y para la protección de la columna cromatográfica.

5.1.2 Diseño experimental para las condiciones cromatográficas

Con la herramienta del diseño de experimentos se buscaron condiciones adecuadas para seguir teniendo una buena resolución, disminuir el tiempo de análisis y probar un pH más alto al recomendado por USP. Se probaron pH 4 y 6, por ser una unidad menor y una mayor al pKa reportado en la literatura para la glimepirida. El acetonitrilo se probó al 50%, que es el recomendado por USP, y 70% para tener un nivel alto en el diseño. Se muestran los cromatogramas típicos de cada condición a la cual se llevó a cabo la corrida cromatográfica (Figura 10).

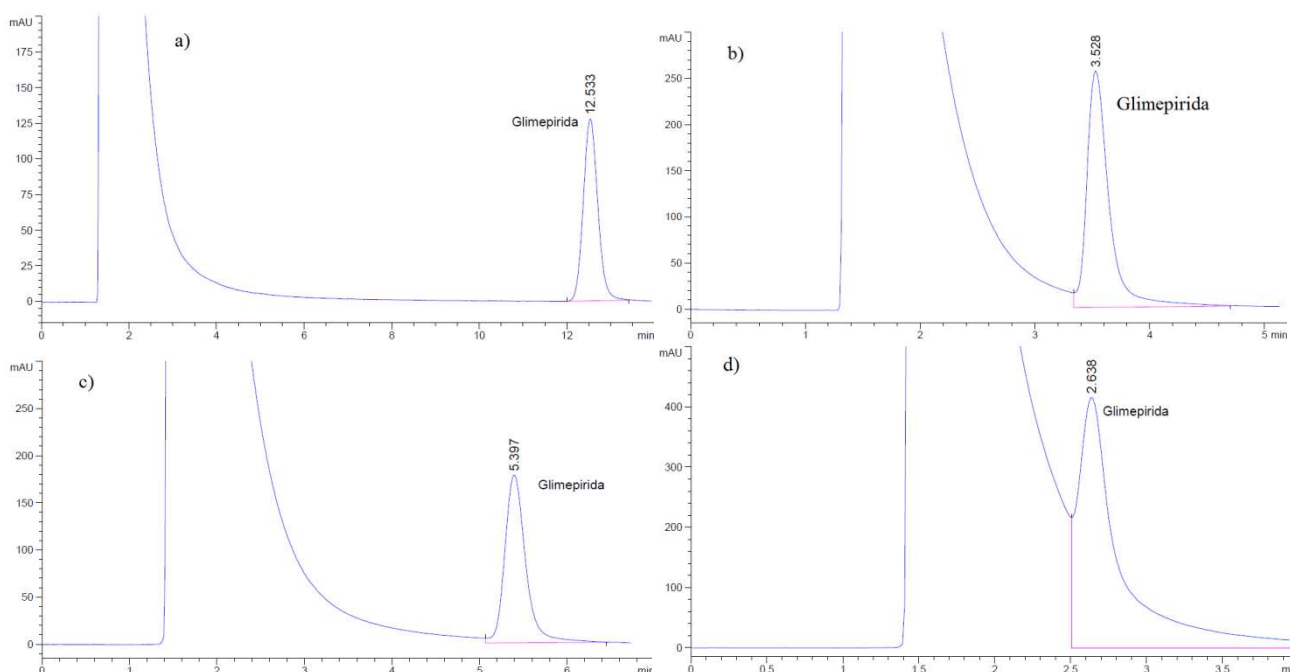


Figura 10. Cromatogramas obtenidos con las condiciones que se propusieron para el diseño experimental. a) pH = 4 y 50% de ACN en la fase móvil, b) pH = 4 y 70% de ACN en la fase móvil, c) pH = 6 y 50% de ACN en la fase móvil, d) pH = 6 y 70% de ACN en la fase móvil.

El análisis del experimento muestra que al momento de aumentar el pH disminuye el tiempo de retención de la glimepirida. Y al aumentar el porcentaje de acetonitrilo de la fase móvil, el tiempo de retención de la glimepirida disminuye (Figura 11); el de la metformina no se altera por ningún cambio en esas condiciones. De acuerdo al diagrama de Pareto, los efectos fueron significativos a un nivel de confianza del 95% como se muestra en la Figura 12.

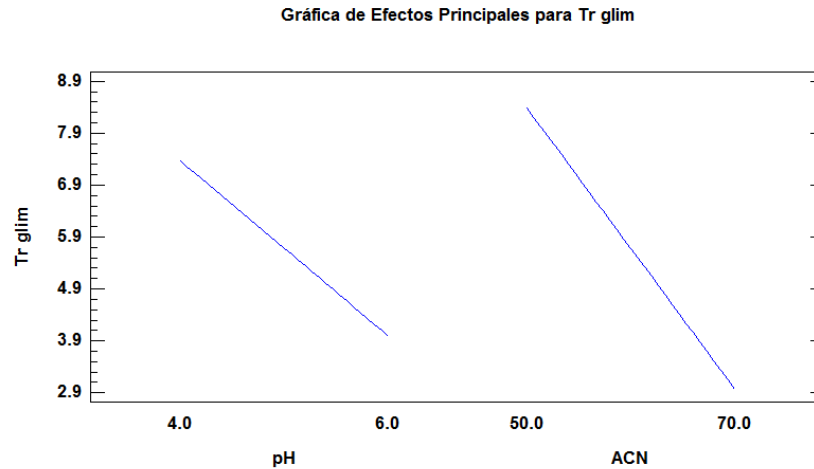


Figura 11. Efecto del pH y el porcentaje de acetonitrilo de la fase móvil sobre el tiempo de retención de la glimepirida.

Diagrama de Pareto Estandarizada para Tr glim

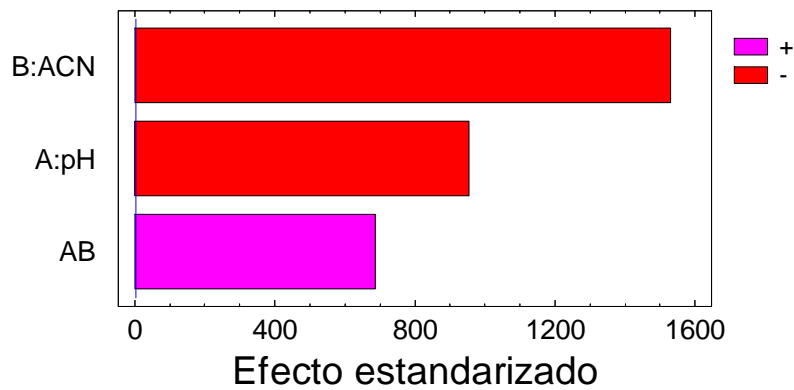


Figura 12. Diagrama de Pareto para el tiempo de retención de la glimepirida.

La resolución varía de acuerdo al tiempo de retención de la glimepirida, ya que en estas condiciones no hay cambios en el tiempo de retención de la metformina.

Así que al momento de analizar los resultados en un gráfico de respuesta (figura 13) se observa que a pH = 6 y un 50% de acetonitrilo en la fase móvil, se obtiene una resolución de 1.9.

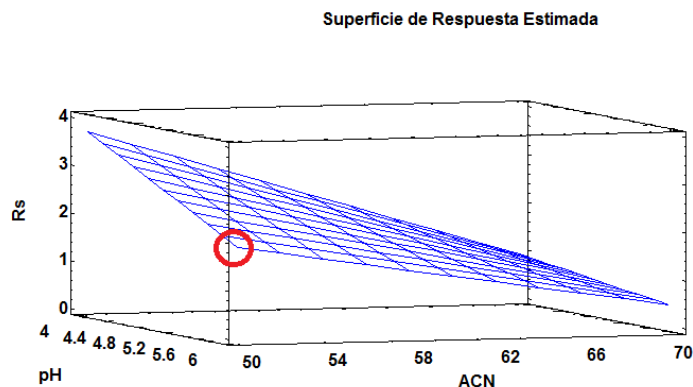


Figura 13. Gráfico de respuesta para resolución.

Con esto se establecieron las condiciones de la fase móvil para el análisis cromatográfico. Las cuáles se enlistan en la Tabla 12.

Tabla 12. Condiciones cromatográficas.

Longitud de onda	228 nm
Fase móvil	Solución amortiguadora de fosfatos pH = 6 : ACN (50:50 v/v)
Columna	C18 150 x 4.6 mm 5 μ m Waters Simmetry
Flujo	1.0 mL/min
Tiempo de corrida	7 minutos
Volumen de inyección	30 μ L

Con esta nueva fase móvil el tiempo de análisis se reduce de 15 a 7 minutos y además se trabaja en un pH alejado de los límites de trabajo de una columna C18. Con el uso de una solución amortiguadora de fosfatos, que tiene un cut-off de 190nm se asegura que no interfiera con la cuantificación de la glimepirida que su $\lambda_{m\acute{a}x}$ es de 228.

A pesar de la buena resolución obtenida con la condiciones cromatográficas, las altas cantidades de metformina podrían acarrear problemas en los componentes e instrumentos del análisis. Por lo tanto se buscó una estrategia para eliminar o reducir la mayor cantidad posible de metformina previo al análisis de la muestra en el cromatógrafo. Y ya que este estudio está dirigido a un medio biorrelevante, también se necesitaba que el método eliminara la mayoría de esos componentes, ya que es sabido que reducen demasiado la vida útil de las columnas.

Así que aprovechando las características fisicoquímicas de la glimepirida y los resultados obtenidos sobre la metformina (que no es retenida por una fase estacionaria C18), se planteó el empleo de extracción en fase sólida para eliminar la mayor cantidad de metformina y componentes del medio biorrelevante de las muestras a analizar.

Para esto se empleó una fase sólida en la columna de extracción igual a la columna cromatográfica. Por lo tanto, se equilibró la columna con una solución amortiguadora de pH= 2.4, ya que en ese pH la glimepirida está en su forma no ionizada y así es retenida por la columna.

5.1.3 Diseño experimental para la extracción en fase sólida

Las respuestas evaluadas fueron el recobro de glimepirida y la reducción de la metformina. Como se puede observar en el diagrama de Pareto para los factores estudiados en el recobro de glimepirida, sólo el acetonitrilo en la solución de lavado fue significativo. La presencia de Acetonitrilo en el lavado disminuye el área de la glimepirida ya que este porcentaje de acetonitrilo eluye glimepirida de la columna en el proceso de lavado (Figura 14).

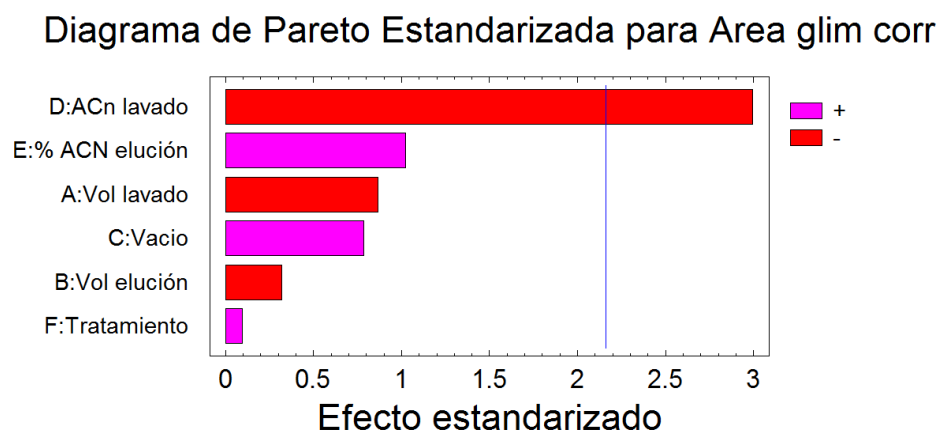


Figura 14. Diagrama de Pareto estandarizado para el área corregida de la glimepirida.

Tomando en cuenta esto, se mantuvieron los niveles bajos para todos los factores, excepto el porcentaje de Acetonitrilo en la solución de elución.

Aunque no sea un factor significativo para el recobro de glimepirida de acuerdo al análisis, para asegurar la completa elución de la glimepirida en la columna, se trabajo en su nivel alto. Se muestra el gráfico de respuesta con

las condiciones en las que se obtuvo el mayor recobro de glimepirida. En esas mismas condiciones, se hizo el análisis para la reducción de la metformina, Figura 15.

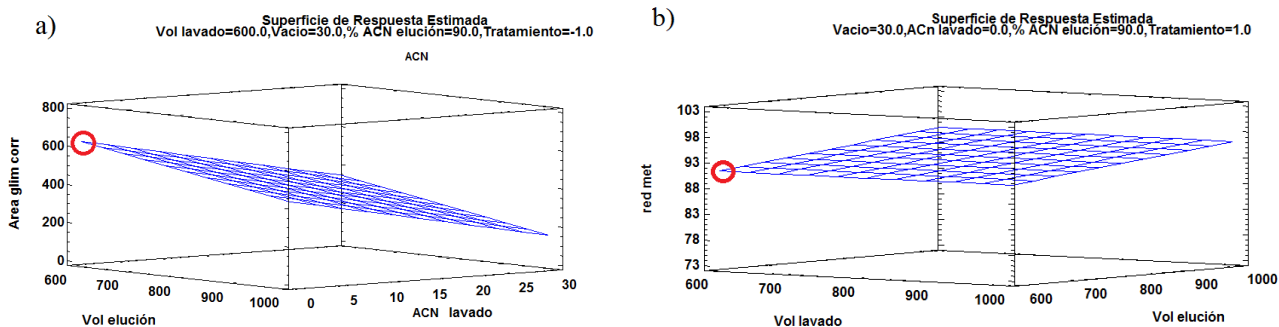


Figura 15. Gráficos de respuesta para los efectos en las mejores condiciones para obtener: a) el mayor recobro de glimepirida, y b) la mayor reducción de metformina.

Las mejores condiciones en las cuales el recobro de la glimepirida es el mayor, se muestran en la tabla 13. Con éstas se obtiene un recobro entre 98–102% de glimepirida, por lo tanto ya no se hicieron más predicciones. Se trabajaron estas condiciones aunque la reducción de la metformina no sea la mayor, pero al momento de tratar de eliminar una mayor cantidad de metformina se puede afectar el recobro de glimepirida.

Tabla 13. Condiciones seleccionadas para el SPE.

Tratamiento	Volumen lavado (µL)	% ACN en el lavado	Vacío (kPa)	Volumen Elución (µL)	% ACN en la elución
No	600	0	30	600	60

El tratamiento, que es agregar un mililitro de solución amortiguadora pH = 7.8 a la muestra sólo se hace con las muestras de medio biorrelevante.

El tratamiento se propuso debido a que no se recuperaba el 100% de glimepirida. A pH = 6.5 que es el del medio biorrelevante, la glimepirida es poco soluble. Los surfactantes del medio biorrelevante podrían formar micelas, donde las moléculas insolubles entran para estar en la parte hidrófoba o simplemente la solubilidad es favorecida por los tensoactivos ayudando al mojamamiento de la molécula. Por lo tanto, al momento de hacer la extracción en fase sólida, y eliminar la mayoría de los componentes del medio biorrelevante,

la glimepirida puede encontrarse dentro de las micelas y atravesar con ellas la columna o por acción de los surfactantes, impedir que interaccione con la fase estacionaria. Haciendo un cambio en el pH, en el cual la glimepirida es soluble, se considera que sale de la micela o se separa de los surfactantes, y se encuentra ionizada, lo que le permite retenerse en la columna de extracción (Figura 16) [20].

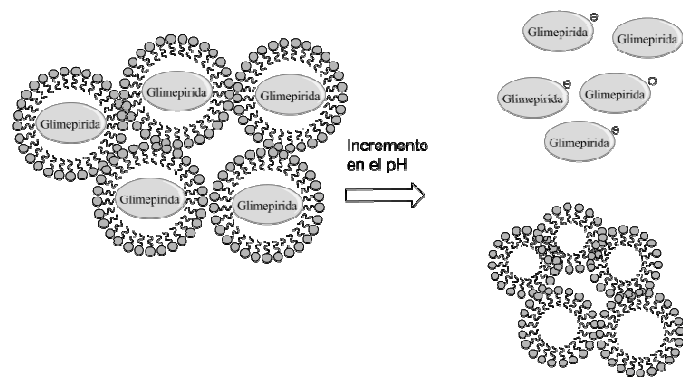


Figura 16. Efecto del cambio en el pH sobre la carga en la glimepirida.

Se muestran cromatogramas típicos que se obtienen con las condiciones seleccionadas de ambos diseños. Figura 17.

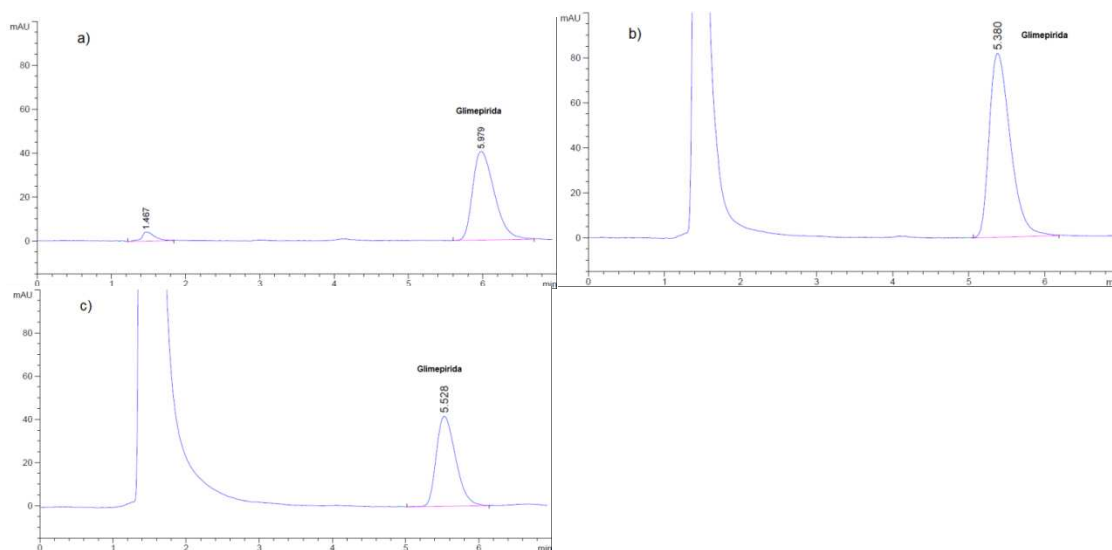


Figura 17. Cromatogramas típicos para a) el estándar de glimepirida; b) tableta glimepirida/metformina en medio de disolución farmacopeico y c) tableta glimepirida/metformina en medio de disolución biorrelevante.

5.2 Validación del método analítico

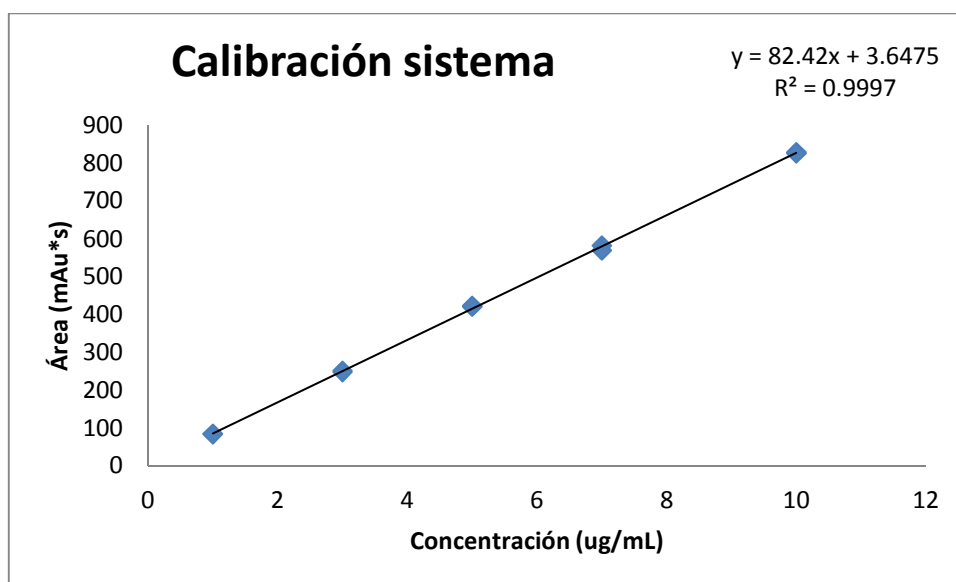
5.2.1 Validación del sistema

Los cromatogramas más relevantes se muestran en el Anexo 1.

Los resultados para los parámetros de linealidad y precisión se encuentran en la tabla 14 y en la figura 18.

Tabla 14. Linealidad y precisión

Concentración (µg/mL)	Área (mAu*s)	FR
1	85.092	85.092
3	251.779	83.926
5	423.055	84.611
7	582.639	83.234
10	829.441	82.944
1	84.183	84.183
3	248.31	82.770
5	421.026	84.205
7	570.165	81.452
10	826.623	82.662
	Media	83.508
	DE	1.091
	CV	1.307



	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	3.64755	3.14714	1.159	0.2799
Pendiente	82.42	0.518791	158.869	0.0000

Figura 18. Curva de calibración del sistema y sus coeficientes.

Error relativo debido a la regresión:

$$ERDR = \quad \%$$

Los resultados de la prueba de estabilidad que se realizaron con las muestras en el automuestreador por 3 días a temperatura ambiente se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Estabilidad

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Día 1	Día 2	Día 3
	Área ($\text{mAu}\cdot\text{s}$)		
1	81.686	80.978	84.818
3	251.552	247.279	251.258
5	415.76	417.789	424.99
7	586.898	587.021	583.726
10	836.71	833.32	834.884
	% Desviación absoluta	0.559	0.666

Los resultados de la prueba de selectividad para el sistema se muestran en la figura 19. El factor de pureza se encuentra dentro del límite calculado.

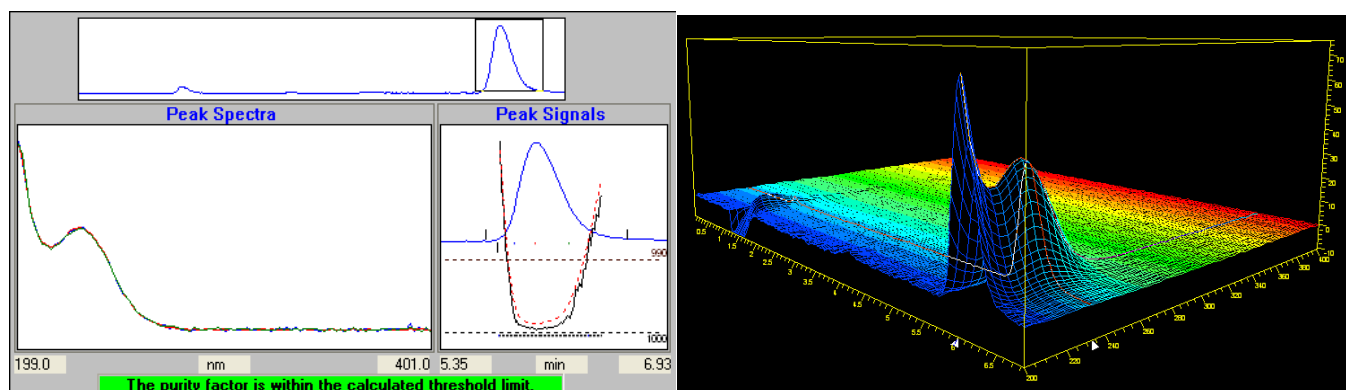


Figura 19. Selectividad para la glimepirida. Resultado del factor de pureza y el espectro en 3D para los cromatogramas del fármaco.

Tabla 16. Resumen de validación del sistema

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado	Cumple con la prueba
Linealidad	$r^2 > 0.99$	$r^2 = 0.999$	Sí
Error relativo debido a la regresión	$\frac{S_{y/x}}{\bar{y}} \% < 2\%$	$\frac{S_{y/x}}{\bar{y}} \% = 1.19\%$	Sí
Precisión	CV de FR $\leq 2\%$	CV de FR = 1.25%	Sí
Estabilidad	Desviación absoluta $\leq 3\%$	A temperatura ambiente Día 2 = 0.56% Día 3 = 0.67%	Sí La curva es estable por tres días
Influencia del filtro	Desviación absoluta de 1 filtrado contra la solución sin filtrar $\leq 3\%$	DE $> 3\%$	No, por lo tanto no se utiliza filtro
Selectividad	No debe haber interferencias	Se muestra la pureza con el análisis del DAD	Sí

En la prueba de influencia del filtro, la glimepirida presenta adsorción en el filtro, por lo tanto no se realiza este paso antes de tratar la muestra. Con la extracción en fase sólida, la muestra pierde turbidez y puede analizarse sin problemas en el cromatógrafo. Se hizo la prueba para el medio biorrelevante y presentó más adsorción en ese caso. Por lo tanto el uso de filtro se descartó.

5.2.2 Validación para método

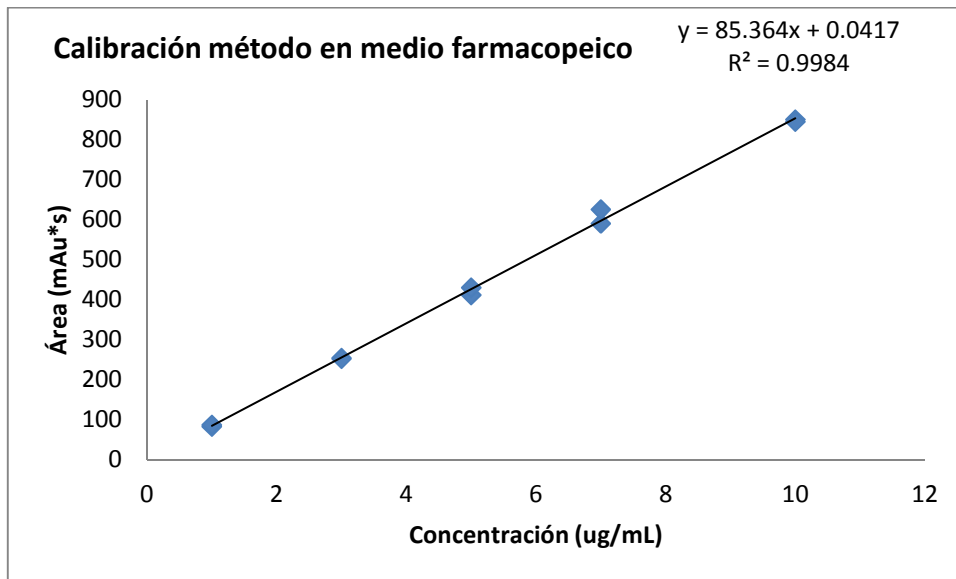
Los cromatogramas más representativos de la validación del método en medio de disolución farmacopeico y biorrelevante se muestran en el Anexo 2. Se muestran los cromatogramas crudos, en las tablas siguientes se reporta el valor del área corregida con respecto a las diluciones.

- Validación para las tabletas en medio de disolución farmacopeico

Los resultados para los parámetros de linealidad y precisión se encuentran en la tabla 17 y en la figura 20.

Tabla 17. Linealidad y exactitud

Concentración (µg/mL)	Área (mAu*s)	Concentración calculada (µg/mL)	% Cuantificado
1	83.899	0.981	98.118
3	255.269	3.056	101.871
5	412.721	4.963	99.251
7	591.545	7.128	101.825
10	851.480	10.275	102.751
1	87.887	1.029	102.947
3	253.035	3.029	100.969
5	431.110	5.185	103.704
7	626.464	7.551	107.865
10	845.952	10.208	102.081
Media			102.138
DE			2.631
CV			2.58



	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	0.0419508	7.43108	0.00564532	0.9956
Pendiente	85.3643	1.22498	69.6865	0.0000

Figura 20. Curva de calibración para la glimepirida a partir de tabletas en medio farmacopeico y sus coeficientes.

Error relativo debido a la regresión:

$$ERDR = \quad \%$$

En la tabla 18 se muestran los resultados para repetibilidad y reproducibilidad para el método en medio de disolución farmacopeico del porcentaje cuantificado en dos días distintos.

Tabla 18. Repetibilidad y reproducibilidad

Día	Concentración (µg/mL)	Área (mAu*s)	Concentración calculada (µg/mL)	% Cuantificado
1	10	852.317	10.285	102.852
1	10	855.207	10.320	103.202
1	10	854.757	10.315	103.147
2	10	863.344	10.419	104.187
2	10	868.004	10.475	104.751
2	10	868.323	10.479	104.790
Media				103.822
DE				0.862
CV				0.830

Los resultados de la prueba de selectividad para el método en el medio de disolución farmacopeico se muestran en la figura 21. El factor de pureza se encuentra dentro del límite calculado.

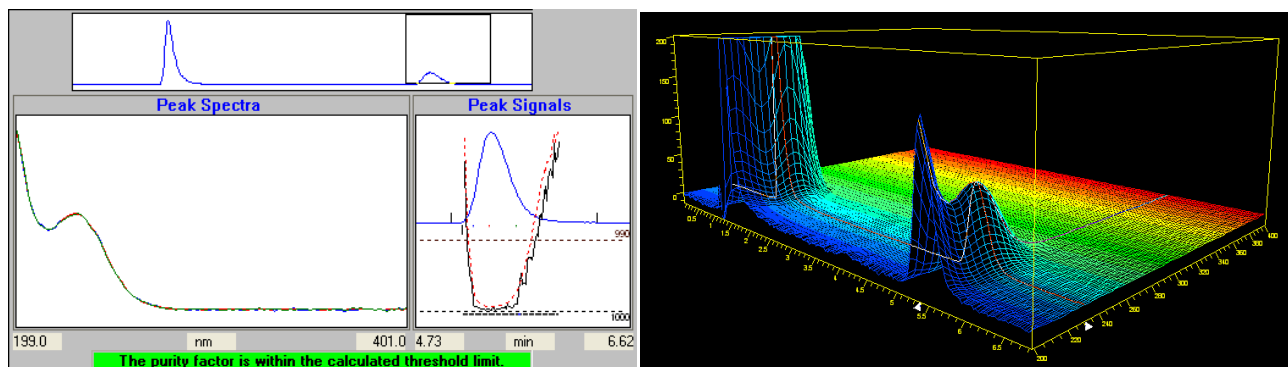


Figura 21. Selectividad para la glimepirida. Resultado del factor de pureza y el espectro en 3D para los cromatogramas del fármaco.

Tabla 19. Resumen de validación del método en medio farmacopeico

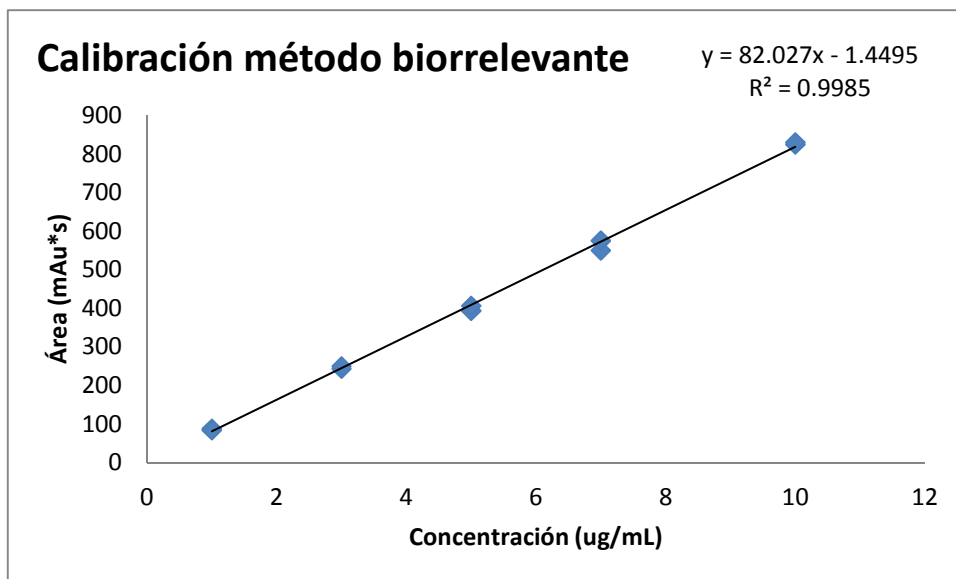
Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado	Cumple con la prueba
Linealidad	$r^2 > 0.99$	$r^2 = 0.998$	Sí
Error relativo debido a la regresión	$\frac{S_{y/x}}{\bar{y}}\% < 3\%$	$\frac{S_{y/x}}{\bar{y}}\% = 2.75\%$	Sí
Exactitud	El promedio de lo cuantificado debe estar entre 97 y 103%	Media = 102.14%	Sí
Precisión (Repetibilidad)	CV del porcentaje cuantificado $\leq 3\%$	CV = 2.58%	Sí
Precisión (Reproducibilidad)	CV del porcentaje cuantificado entre 2 días distintos $\leq 3\%$	CV = 0.83%	Sí
Selectividad	No debe haber interferencias	El espectro en 3D por Detector de Arreglo de Diodos no muestra interferencias	Sí

- Validación para el método en medio de disolución biorrelevante FaSSIF V2

Los resultados para los parámetros de linealidad y precisión se encuentran en la tabla 20 y en la figura 22.

Tabla 20. Linealidad y exactitud

Concentración (µg/mL)	Área (mAu*s)	Concentración calculada (µg/mL)	% Cuantificado
1	88.408	1.036	103.631
3	243.657	2.916	97.184
5	394.071	4.737	94.735
7	550.652	6.633	94.752
10	825.673	9.963	99.626
1	84.526	0.989	98.878
3	250.084	3.002	100.069
5	407.102	4.895	97.890
7	576.016	6.940	99.139
10	830.697	10.023	100.234
		Media	98.614
		DE	2.663
		CV	2.70



	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	-1.44943	6.90041	-0.210051	0.8389
Pendiente	82.0265	1.1375	72.1114	0.0000

Figura 22. Curva de calibración para la gimepirida a partir de tabletas en medio FaSSIF V2 y sus coeficientes.

Error relativo debido a la regresión:

$$ERDR = 2.65\%$$

En la tabla 21 se muestran los resultados para repetibilidad y reproducibilidad para el método en medio de disolución biorrelevante del porcentaje cuantificado en dos días distintos.

Tabla 21. Repetibilidad y reproducibilidad

Día	Concentración (µg/mL)	Área (mAu*s)	Concentración calculada (µg/mL)	% Cuantificado
1	10	830.697	10.023	100.230
1	10	845.889	10.207	102.780
1	10	825.673	9.963	99.630
2	10	799.965	9.651	96.510
2	10	812.415	9.802	98.020
2	10	792.078	9.556	95.560
Media				98.788
DE				2.643
CV				2.675

Los resultados para la prueba de selectividad para el método en medio de disolución biorrelevante se muestran en la figura 23. El factor de pureza se encuentra dentro del límite calculado.

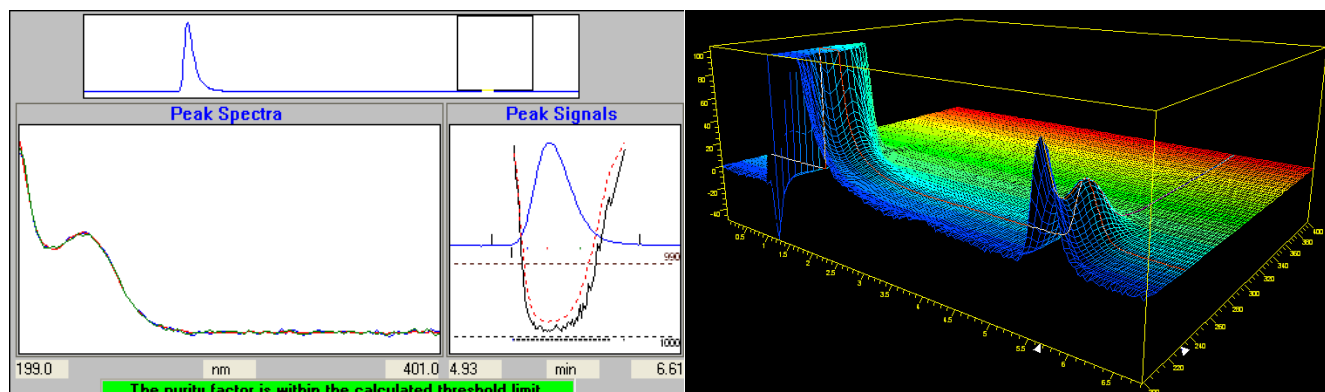


Figura 23. Selectividad para la glimepirida. Resultado del factor de pureza y el espectro en 3D para los cromatogramas del fármaco.

Tabla 22. Resumen de validación del método en medio FaSSIF V2

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado	Cumple con la prueba
Linealidad	$r^2 > 0.99$	$r^2 = 0.9985$	Sí
Error relativo debido a la regresión	—% < 3%	—%=2.65%	Sí
Exactitud	El promedio de lo cuantificado debe estar entre 97 y 103%	Media = 98.61%	Sí
Precisión (Repetibilidad)	CV del porcentaje cuantificado $\leq 3\%$	CV = 2.66%	Sí
Precisión (Reproducibilidad)	CV del porcentaje cuantificado entre 2 días distintos $\leq 3\%$	CV = 2.675%	Sí
Selectividad	No debe haber interferencias	El espectro en 3D por Detector de Arreglo de Diodos no muestra interferencias	Sí

Como se observa en las tablas de los resúmenes, el método se validó tanto para sistema como para método en ambos medios de disolución. El método demostró ser lineal, preciso, exacto y selectivo.

5.3 Estudios de disolución

Una vez validado el método analítico, se realizaron los perfiles de disolución de los productos A y B, tanto en medio de disolución farmacopeico como en medio de disolución biorrelevante.

En el Anexo 3 se encuentran los cromatogramas para el perfil de disolución de una tableta de cada producto para cada medio de disolución.

5.3.1 Estudios de disolución en medio farmacopeico

Los perfiles se muestran en la Figura 24.

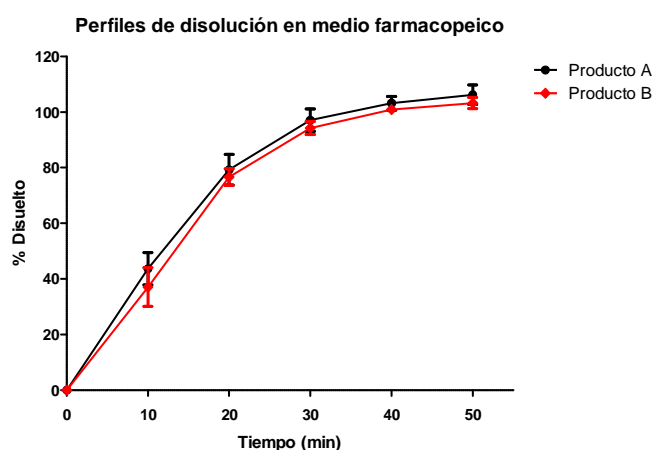


Figura 24. Perfiles de disolución del producto A y B en el medio de disolución farmacopeico (n = 12 para cada producto).

5.3.2 Estudios de disolución en medio biorrelevante FaSSIF V2

Los perfiles se muestran en la Figura 25.

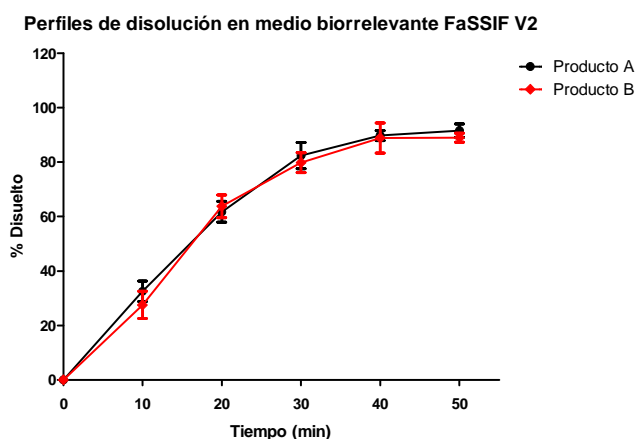


Figura 25. Perfiles de disolución del producto A y B en el medio de disolución biorrelevante (n = 12 para cada producto).

5.4 Análisis de los perfiles de disolución

Con el macro de Excel DDSolver se determinó para cada perfil, el modelo matemático que mejor describe a la curva del perfil de disolución. El modelo con la mayor r^2 ajustada, menor SSR y con el menor valor de criterio de Akaike fue el seleccionado.

5.4.1 Modelaje matemático de los perfiles

Producto A en medio farmacopeico

De acuerdo a la tabla 23 el modelo que mejor ajusta para este perfil de disolución es el Korsmeyer-Peppas con tiempo de retardo (Ec. 3) (Figura 26).

Tabla 23. Parámetros comparativos para elegir modelo para el perfil del producto A en medio farmacopeico.

	Weibull		Korsmeyer-Peppas Lag	
	Media	DE	Media	DE
r^2 ajustada	0.98	0.02	0.99	0.01
SSR	117.27	118.29	37.88	26.99
AIC	30.06	5.93	24.94	7.54

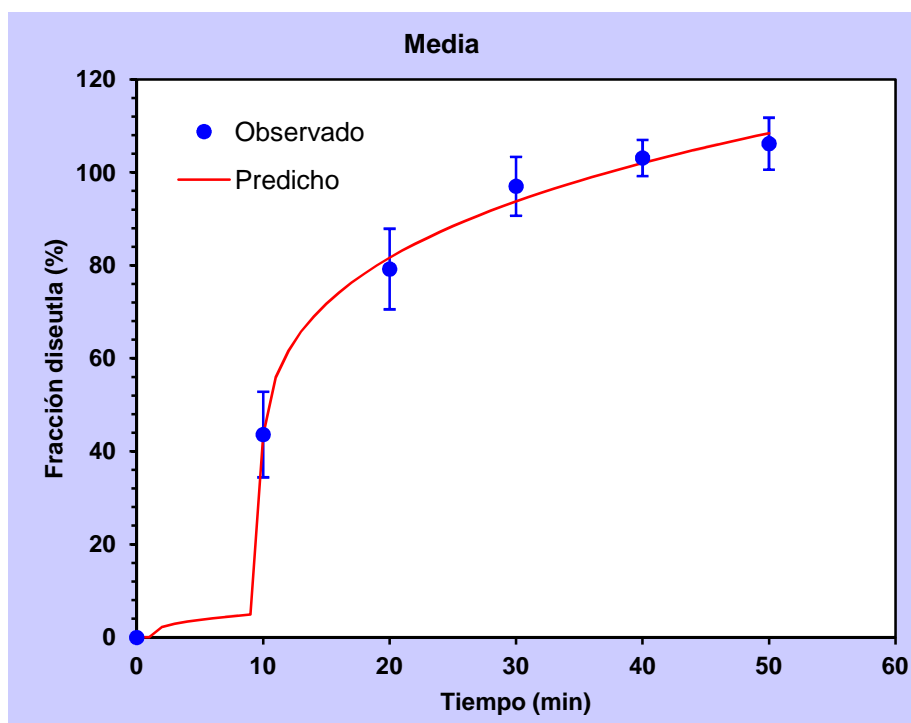


Figura 26. Gráfica de tiempo vs fracción disuelta para el modelo matemático del producto A en el medio farmacopeico. Se muestran los valores observados y los predichos

Los valores de los parámetros k_{KP} , T_{lag} y n se muestran en la tabla 24.

Tabla 24. Parámetros del modelo matemático del producto A en el medio farmacopeico

Parámetro	Media	DE	% CV
kKP	49.221	14.419	29.294
n	0.223	0.080	35.894
Tlag	8.827	2.477	28.056

Producto B en medio farmacopeico

Como se observa en la tabla 25, dos modelos describen bien la curva del perfil de disolución. Se eligió el modelo Korsmeyer–Peppas con tiempo de retardo (Figura 27; Ec 3), debido a que no hay una diferencia significativa entre los valores de este modelo y los obtenidos para Weibull. Además que Weibull describe bien la curva pero no nos indica nada sobre cómo se da el proceso de disolución del fármaco. Además que la variación en los parámetros calculados para el modelo de Weibull (α y β) es mayor.

Tabla 25. Parámetros comparativos para elegir modelo para el perfil del producto B en medio farmacopeico.

	Weibull		Korsmeyer-Peppas Lag	
	Media	DE	Media	DE
r^2 ajustada	1.00	0.00	0.99	0.00
SSR	33.86	25.21	29.20	13.49
AIC	23.84	4.01	25.41	3.73

Los valores de los parámetros k_{KP} , T_{lag} y n se muestran en la tabla 26.

Tabla 26. Parámetros del modelo para el modelo matemático del producto B en el medio farmacopeico

Parámetro	Media	DE	% CV
kKP	48.010	7.779	16.202
n	0.216	0.044	20.279
Tlag	9.545	0.531	5.560

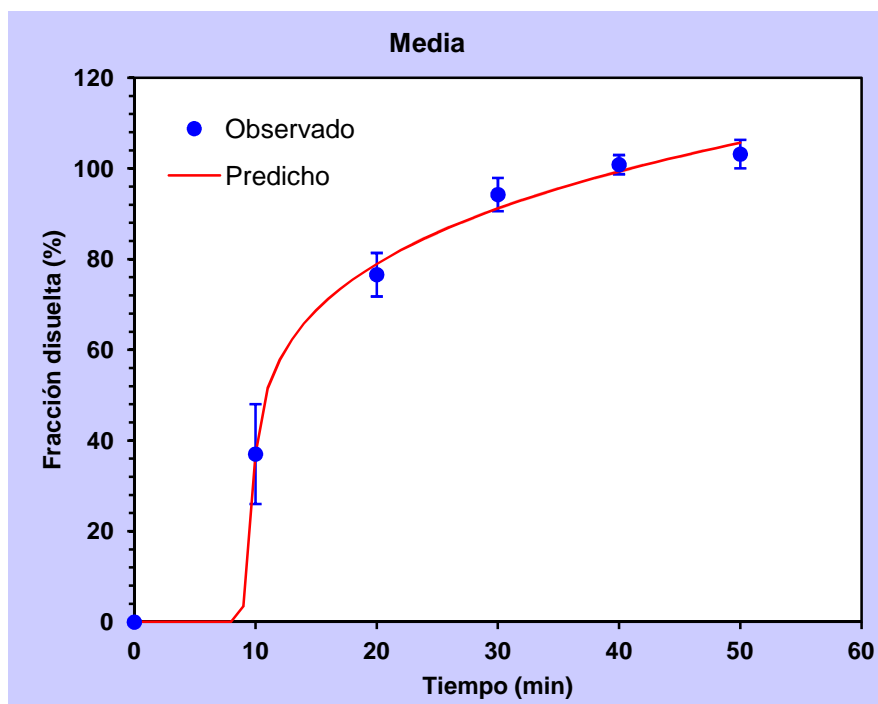


Figura 27. Gráfica de tiempo vs fracción disuelta para el modelo matemático del producto B en el medio farmacopeico. Se muestran los valores observados y los predichos

Producto A en medio biorrelevante FaSSIF V2

De igual manera que para el producto B en medio farmacopeico, se eligió el modelo Korsmeyer–Peppas con tiempo de retardo (Ec. 3) (Figura 28) sobre Weibull (Tabla 27).

Tabla 27. Parámetros comparativos para elegir modelo para el perfil del producto A en medio biorrelevante.

	Weibull		Korsmeyer-Peppas Lag	
	Media	DE	Media	DE
R ² ajustada	0.99	0.01	0.98	0.02
SSR	75.09	54.98	81.02	78.81
AIC	28.37	4.83	29.26	7.44

Los valores los parámetros k_{KP} , T_{lag} y n se muestran en la tabla 28.

Tabla 28. Parámetros del modelo para el modelo matemático del producto A en el medio farmacopeico

Parámetro	Media	DE	% CV
k_{KP}	32.399	9.920	30.617
n	0.300	0.085	28.505
T_{lag}	8.134	2.338	28.746

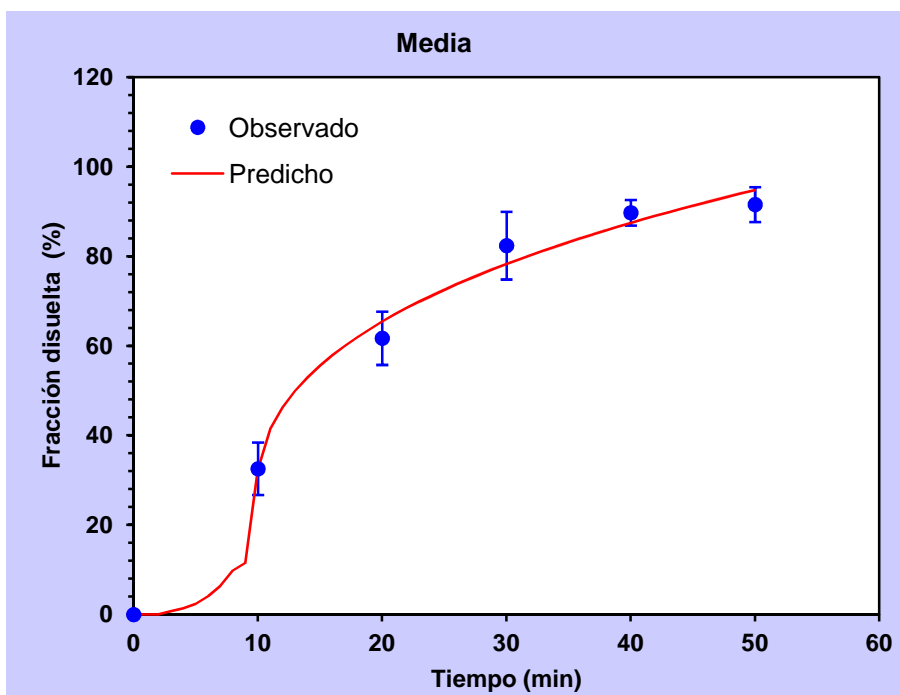


Figura 28. Gráfica de tiempo vs fracción disuelta para el modelo matemático del producto A en el medio biorrelevante. Se muestran los valores observados y los predichos

Producto B en medio biorrelevante FaSSIF V2

El modelo que mejor ajusta para este perfil de disolución es el Korsmeyer-Peppas con tiempo de retardo (Ec. 3; Tabla 29; Figura 29).

Tabla 29. Parámetros comparativos para elegir modelo para el perfil del producto A en medio biorrelevante.

	Weibull		Korsmeyer-Peppas Lag	
	Media	DE	Media	DE
r^2 ajustada	0.98	0.02	0.99	0.00
SSR	88.63	80.73	23.63	17.29
AIC	26.90	9.10	22.68	6.28

Los valores de los parámetros k_{KP} , T_{lag} y n se muestran en la tabla 30.

Tabla 30. Parámetros del modelo para el modelo matemático del producto B en el medio biorrelevante

Parámetro	Media	DE	% CV
k_{KP}	35.942	9.436	26.253
n	0.264	0.078	29.553
T_{lag}	9.435	0.570	6.045

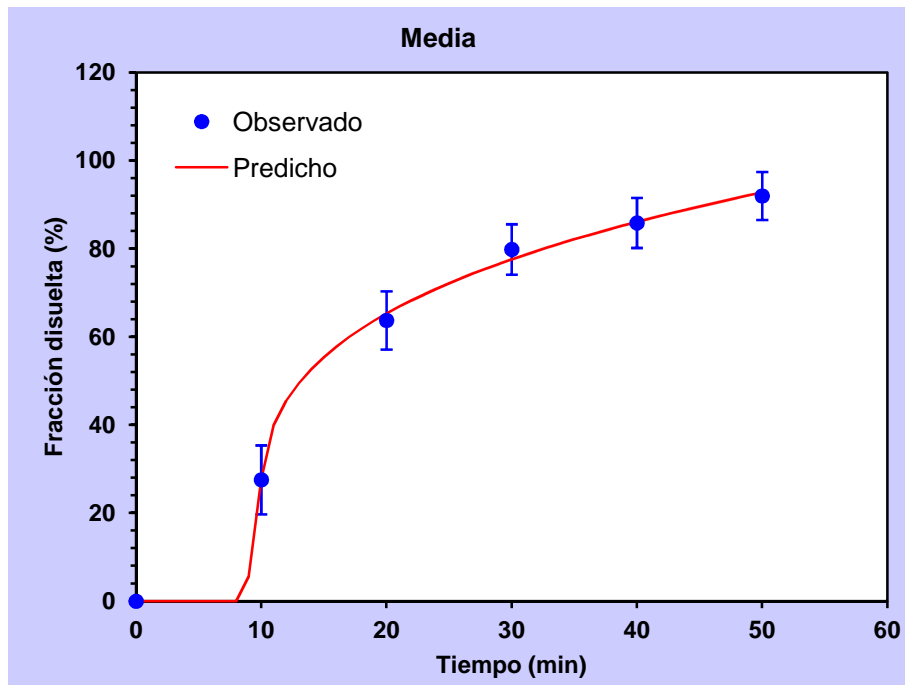


Figura 29. Gráfica de tiempo vs fracción disuelta para el modelo matemático del producto B en el medio biorrelevante. Se muestran los valores observados y los predichos

De acuerdo a los resultados, se puede observar que los cuatro perfiles ajustan al modelo Korsmeyer–Peppas con tiempo de retardo tienen un coeficiente $n < 0.5$, lo que indica que tienen un proceso de difusión de Fick.

De acuerdo a lo mostrado por los resultados y con base en lo reportado en la literatura, las tabletas pudieron haber sido formuladas con una matriz polimérica, ya que el modelo al que ajustaron los perfiles sirve para conocer como es la liberación del fármaco en este tipo de formulaciones [10].

5.4.2 Comparación de perfiles

Como se observa en la tabla 31, los perfiles exceden el 20% de coeficiente de variación en el primer punto de muestreo, por lo cual no se puede realizar una prueba de factor de similitud. Se ha reportado la alta variación en la disolución, debido a la dosis baja en la que se encuentra la glimepirida en la tableta. También es el caso de la glibenclamida [39].

Tabla 31. Perfiles de disolución del producto A y B, en los dos diferentes medios de disolución.

Tiempo	Producto A (M Farmacopeico)		Producto A (M Biorrelevante)		Producto B (M Farmacopeico)		Producto B (M Biorrelevante)	
	% Dis	%CV	% Dis	%CV	% Dis	%CV	% Dis	%CV
0	0.00	0.00	0	0	0	0	0	0
10	43.66	21.05	32.56	18.01	37.06	29.72	27.57	28.39
20	79.26	10.94	61.74	9.66	76.64	6.26	63.76	10.37
30	97.07	6.52	82.43	9.18	94.30	3.88	79.86	7.17
40	103.16	3.78	89.78	3.20	100.90	2.09	88.88	9.80
50	106.24	5.26	91.60	4.27	103.22	3.04	89.01	2.91

Se hizo la comparación entre el perfil del producto A y B en medio farmacopeico por medio del alcance Región de Confianza Multivariada. Se utilizó el producto A como referencia para esta comparación. De acuerdo a la comparación, los perfiles son similares (Figura 30) ya que el valor de MSD es mayor que el límite del intervalo de confianza superior (MSD = 5.2948, IC Superior al 90% MSD = 2.4767).

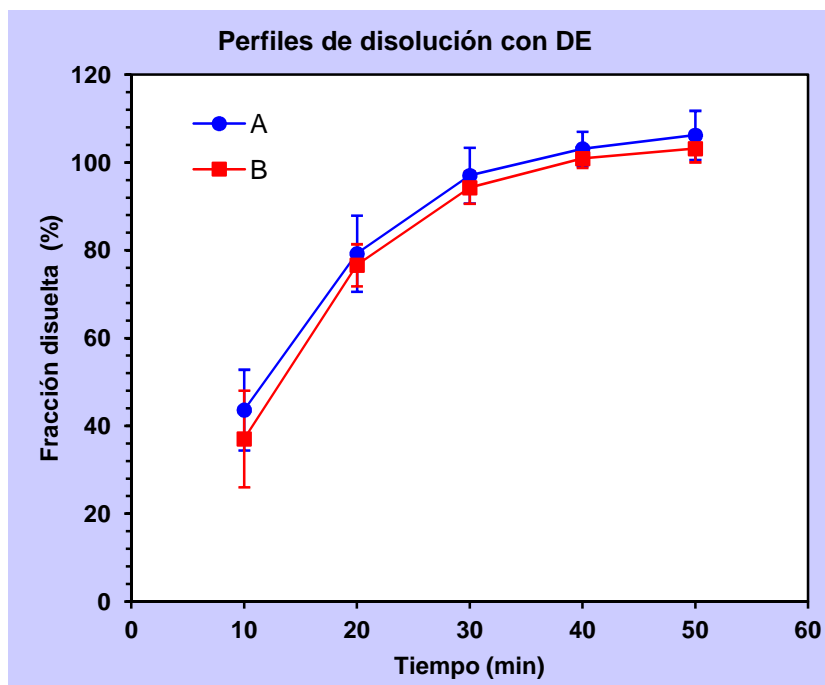


Figura 30. Comparación de los perfiles del Producto A vs el Producto B en medio farmacopeico.

Posteriormente se analizó si los perfiles de disolución de cada producto, en los dos diferentes medios de disolución eran similares. Se comparó el perfil del producto A en medio farmacopeico contra el perfil del producto A en medio biorrelevante para ver si eran similares o no (Figura 31). De acuerdo a la comparación, los perfiles no son similares ya que el valor de MSD es menor que el límite del intervalo de confianza superior (MSD = 5.3549, IC Superior al 90% MSD = 6.1658).

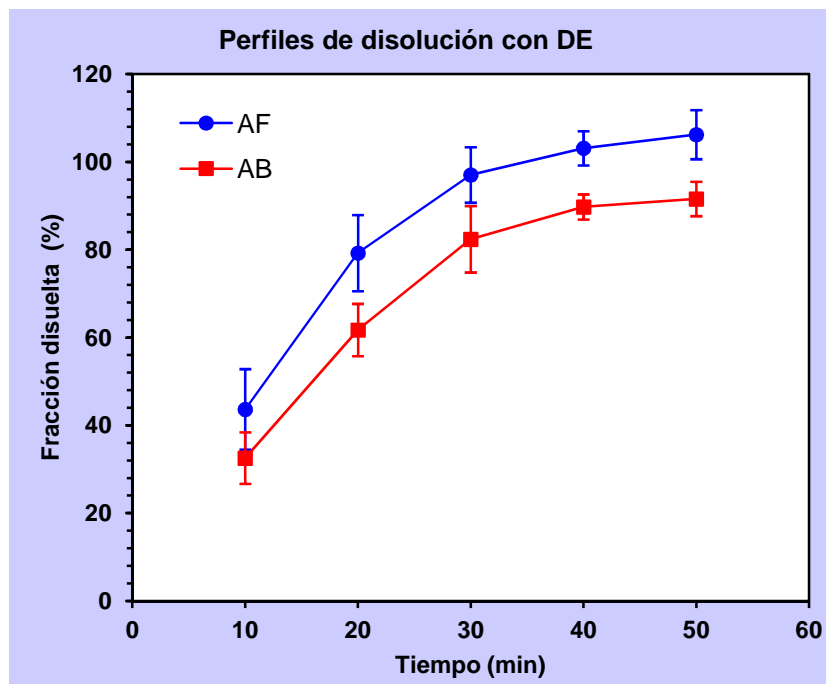


Figura 31. Comparación de los perfiles del Producto A en medio farmacopeico (AF) vs el Producto A en medio biorrelevante (AB).

Se comparó el perfil del producto B en medio farmacopeico contra el perfil del producto B en medio biorrelevante para comprobar similitud (Figura 32). De acuerdo a la comparación, los perfiles no son similares ya que el valor de MSD es menor que el límite del intervalo de confianza superior (MSD = 4.6666, IC Superior al 90% MSD = 5.5571).

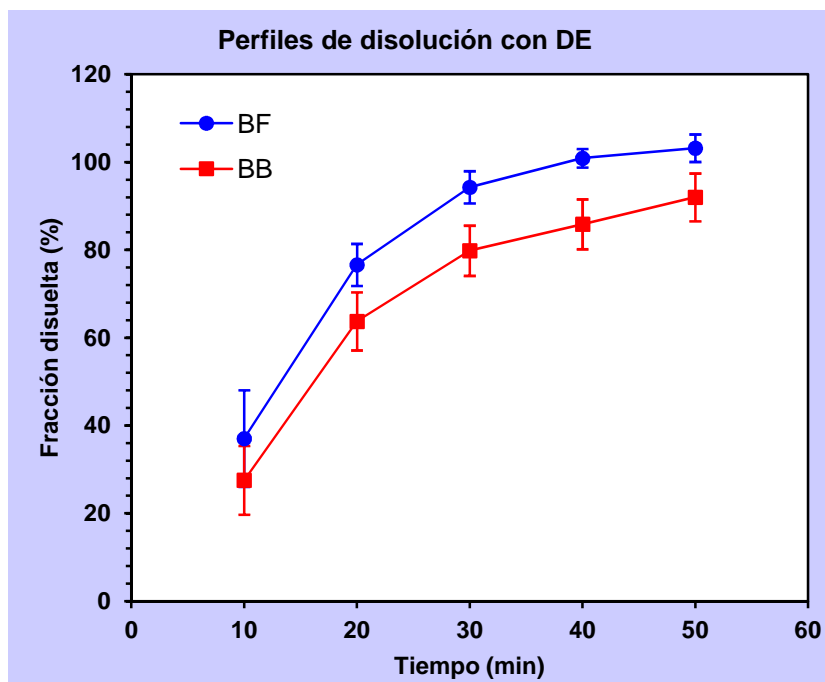


Figura 32. Comparación de los perfiles del Producto B en medio farmacopeico (BF) vs el Producto B en medio biorrelevante (BB).

Se hizo la comparación de los perfiles en medio de disolución biorrelevante. Se muestran los resultados en la Figura 33.

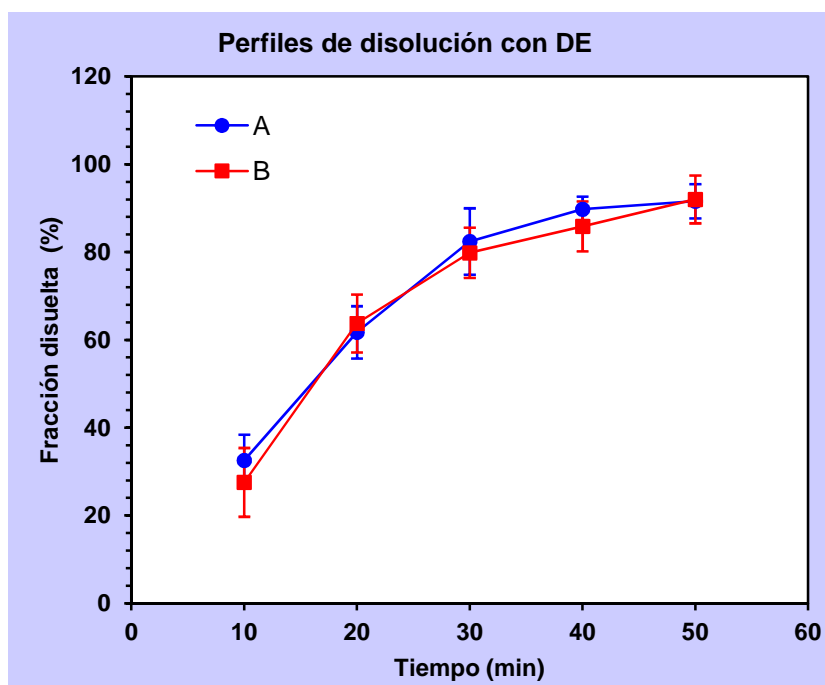


Figura 33. Comparación de los perfiles del Producto A en medio biorrelevante vs el Producto B en medio biorrelevante.

De acuerdo a la comparación de Región de Confianza Multivariada, los perfiles en medio biorrelevante son similares ya que el valor de MSD es mayor que el límite del intervalo de confianza superior (MSD = 4.2218, IC Superior al 90% MSD = 2.9434).

Con estas pruebas se comprueba que los perfiles de disolución de cada producto en medio farmacopeico no son similares a los del medio de disolución biorrelevante.

En el medio farmacopeico, en 30 minutos ya se llegó a más del 85% de la disolución del fármaco. En cambio para los perfiles en medio biorrelevante, la disolución del 85% tarda aproximadamente 50 minutos. Como ya se había descrito, la glimepirida es ligeramente más soluble en un pH = 7.8 que en un pH neutro o ácido [33]. El pH = 7.8 es el elegido para las pruebas de disolución debido a que la glimepirida se disolverá casi totalmente, lo cual es adecuado para una prueba de control de calidad [38] pero puede carecer de una relación con lo que pasa fisiológicamente. Por eso los perfiles de disolución en medio biorrelevante, podrían reflejar mejor lo que pasa en la disolución *in vivo*.

Esta comparación de perfiles de cada producto en los dos medios es importante, ya que la prueba de disolución en medio farmacopeico no refleja lo que pasa *in vivo* (ya que en el organismo el pH del intestino no es 7.8) y los perfiles podrían ser similares en estas condiciones, pero al momento de hacer los estudios de bioequivalencia en humanos, los productos podrían no ser bioequivalentes. Este no es el caso para los productos estudiados, ya que resultaron similares para los dos medios de disolución.

5.5 Correlación *in vitro in vivo*

5.5.1 Obtención de niveles de concentración plasmática

Con los datos farmacocinéticos en 4.5.1 se obtuvo una k_a de 1.57 h^{-1} .

Con esta constante, en la ecuación 8, se calcularon los niveles plasmáticos, que se muestran en la tabla 32.

Tabla 32. Niveles plasmáticos calculados para la ingesta de una tableta de 4mg de glimepirida

T (min)	Cp (ug/L)
0	0.00
0.17	103.53
0.33	181.11
0.50	238.75
0.67	281.09
0.83	311.69

5.5.2 IVIVC para los perfiles de los productos A y B en medio de disolución farmacopeico

Con los datos de la tabla 32, se hicieron los cálculos para la correlación *in vitro in vivo* para el producto A en medio de disolución farmacopeico. El programa arroja los siguientes resultados para los cálculos realizados. Se muestran en la tabla 33 los valores observados y en la tabla 34 los valores predichos.

Tabla 33. Resultados para los valores observados del producto A en medio de disolución farmacopeico.

Tiempo (h)	Conc Obs (µg/L)	ABC obs (0-t) (µg/L · h)	F obs	FA Obs (%)	FRD (%)	ABC obs (0-∞) (µg/L · h)
0	0	0	0	0	0	2378.30
0.17	103.53	8.8	104.62	35.48	43.66	
0.33	181.11	31.57	185.02	62.74	79.26	
0.50	238.75	67.26	247.09	83.79	97.07	
0.67	281.09	111.44	294.91	100.00	103.16	

Tabla 34. Resultados para los valores predichos del producto A en medio de disolución farmacopeico.

Tiempo (h)	Conc Pred (µg/L)	ABC Pred (0-t) (µg/L · h)	FA Pred (%)	ABC Pred (0-∞) (µg/L · h)
0	0	0	0	3360.45
0.17	167.34	14.22	37.20	
0.33	310.74	52.47	69.79	
0.50	377.59	110.98	86.09	
0.67	394.79	176.63	91.67	

Como puede observarse en las tablas 33 y 34, los valores predichos para la concentración plasmática y el área bajo la curva son mayores a los observados. La glimepirida, al ser un fármaco BCS II, su absorción está en

función de la disolución, si la disolución ocurre de manera rápida, la absorción será rápida. Esto no correlaciona con los niveles plasmáticos observados y puede observarse en los valores del porcentaje de error para $C_{m\acute{a}x}$ y ABC (0- ∞) que son 40.45 y 41.3 respectivamente. Esto puede considerarse un valor de error alto, aunque no hay un parámetro para las IVIVC de las formulaciones de liberación inmediata, el recomendado para las de liberación prolongada es del 15% [46]. La disolución rápida de la glimepirida en medio farmacopeico, tiene que ver con el pH del medio de disolución, al ser casi de 3 unidades mayor que el pKa de la glimepirida, se asegura que casi el 100% de la dosis esté en su forma ionizada y pueda disolverse fácilmente, además de que a ese pH a 37°C la solubilidad aumenta [33]. En la literatura ya se había reportado que con las condiciones del método de disolución establecido por USP para tabletas de glimepirida (900 mL, pH = 7.8, 75 rpm) [38] no hay una correlación *in vitro in vivo*. Dado que en el sitio de absorción, que es el duodeno, no tiene ese pH.

Con los datos de la tabla 32, se hicieron los cálculos para la correlación *in vitro in vivo* para el producto B en medio de disolución farmacopeico. Se muestran en la tabla 35 los valores observados y en la tabla 36 los valores predichos.

Tabla 35. Resultados para los valores observados del producto B en medio de disolución farmacopeico.

Tiempo (h)	Conc Obs ($\mu\text{g/L}$)	ABC obs (0-t) ($\mu\text{g/L} \cdot \text{h}$)	F obs	FA Obs (%)	FRD (%)	ABC obs (0- ∞) ($\mu\text{g/L} \cdot \text{h}$)
0	0	0	0	0	0	2378.30
0.17	103.53	8.80	104.62	35.48	37.06	
0.33	181.11	31.57	185.02	62.74	76.64	
0.50	238.75	67.26	247.09	83.79	94.30	
0.67	281.09	111.44	294.91	100.00	100.90	

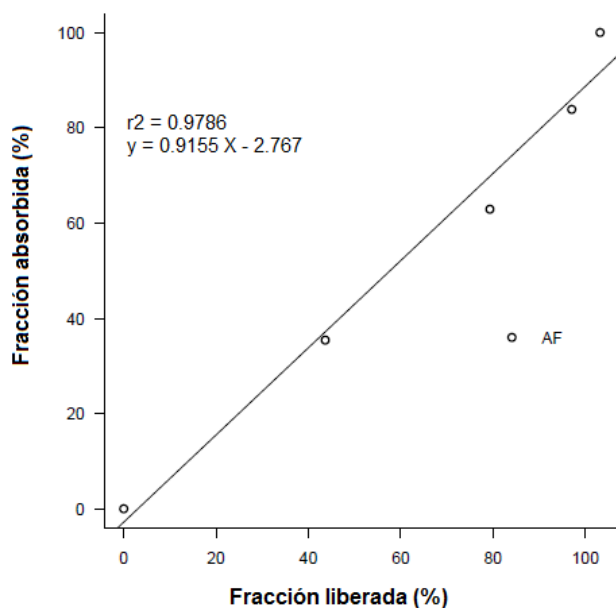
Tabla 36. Resultados para los valores predichos del producto B en medio de disolución farmacopeico.

Tiempo (h)	Conc Pred (µg/L)	ABC Pred (0-t) (µg/L · h)	FA Pred (%)	ABC Pred (0-∞) (µg/L · h)
0	0	0	0	3393.56
0.17	150.87	12.82	33.54	
0.33	312.64	49.90	70.14	
0.50	379.58	108.74	86.47	
0.67	399.11	174.93	92.57	

Al ser similares los perfiles de disolución del Producto A y del producto B en medio de disolución farmacopeico, el análisis para los resultados es equivalente también. Los valores del porcentaje de error para $C_{máx}$ y ABC (0-∞) son 41.99 y 42.69 respectivamente.

En la figura 34, se muestran los modelos de las correlaciones *in vitro in vivo* para ambos productos.

a) Modelo de correlación *in vitro in vivo*



b) Modelo de correlación *in vitro in vivo*

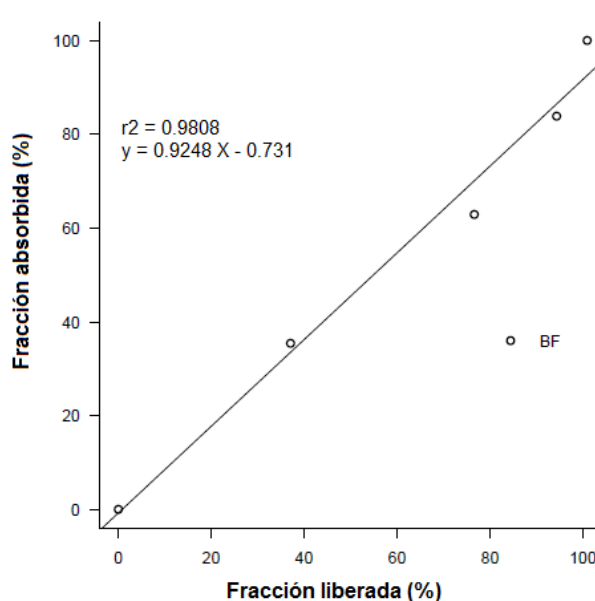


Figura 34. Resultados de la IVIVC: a) Producto A en medio farmacopeico; b) Producto B en medio farmacopeico

5.5.3 IVIVC para los perfiles de los productos A y B en medio de disolución biorrelevante

Con los datos de la tabla 32, se hicieron los cálculos para la correlación *in vitro* *in vivo* para el producto A en medio de disolución biorrelevante. Se muestran en la tabla 37 los valores observados y en la tabla 38 los valores predichos.

Tabla 37. Resultados para los valores observados del producto A en medio de disolución biorrelevante.

Tiempo (h)	Conc Obs (µg/L)	ABC obs (0-t) (µg/L · h)	F obs	FA Obs (%)	FRD (%)	ABC obs (0-∞) (µg/L · h)
0	0	0	0	0	0	2672.48
0.17	103.53	8.80	104.62	31.57	32.56	
0.33	181.11	31.57	185.02	55.83	61.74	
0.50	238.75	67.26	247.09	74.56	82.43	
0.67	281.09	111.44	294.91	88.99	89.78	
0.83	311.69	158.87	331.39	100.00	91.60	

Tabla 38. Resultados para los valores predichos del producto A en medio de disolución biorrelevante.

Tiempo (h)	Conc Pred (µg/L)	ABC Pred (0-t) (µg/L · h)	FA Pred (%)	ABC Pred (0-∞) (µg/L · h)
0	0	0	0	3327.96
0.17	139.64	11.87	31.05	
0.33	269.79	44.62	60.57	
0.50	358.34	98.02	81.51	
0.67	384.31	161.14	88.95	
0.83	385.05	222.69	90.79	

Debido que a pH= 6.5, que es el pH que se encuentra en el intestino, la glimepirida es prácticamente insoluble, la disolución dependerá de la interacción de las sales biliares presentes en el medio con la tableta y posteriormente con el fármaco [20]. Como se observa en las tablas 37 y 38, los valores predichos para ABC (0-∞) y para la concentración plasmática, son mayores a los observados. En este caso, el error en la predicción de C_{max} y ABC (0-∞) es menor, con valores de 23.54 y 24.52 respectivamente. Esto sugiere que con los datos de la disolución en medio biorrelevante, la predicción es más adecuada. Esto puede ser debido a que este medio simula mejor las condiciones *in vivo* [4, 20].

Esta correlación (con base en la simulación de los niveles plasmáticos en sangre del fármaco) puede ayudar a predecir el comportamiento *in vivo* de cambios en la formulación.

Con los datos de la tabla 32, se hicieron los cálculos para la correlación *in vitro in vivo* para el producto B en medio de disolución biorrelevante. Se muestran en la tabla 39 los valores observados y en la tabla 40 los valores predichos.

Tabla 39. Resultados para los valores observados del producto B en medio de disolución biorrelevante.

Tiempo (h)	Conc Obs (µg/L)	ABC obs (0-t) (µg/L · h)	F obs	FA Obs (%)	FRD (%)	ABC obs (0-∞) (µg/L · h)
0	0	0	0	0	0	2672.49
0.17	103.53	8.80	104.62	31.57	27.57	
0.33	181.11	31.57	185.02	55.83	63.76	
0.50	238.75	67.26	247.09	74.56	79.86	
0.67	281.09	111.44	294.91	88.99	88.88	
0.83	311.69	158.87	331.39	100.00	89.01	

Tabla 40. Resultados para los valores predichos del producto B en medio de disolución biorrelevante.

Tiempo (h)	Conc Pred (µg/L)	ABC Pred (0-t) (µg/L · h)	FA Pred (%)	ABC Pred (0-∞) (µg/L · h)
0	0	0	0	3284.51
0.17	124.17	10.55	27.61	
0.33	286.09	43.37	64.12	
0.50	353.2	97.71	80.37	
0.67	386.77	160.61	89.47	
0.83	379.76	221.93	89.6	

Al ser similares los perfiles de disolución del Producto A y el del producto B en medio de disolución biorrelevante, el análisis para los resultados es equivalente también. Los valores del porcentaje de error para $C_{máx}$ y ABC (0-∞) son 24.09 y 22.9 respectivamente.

En la figura 35, se muestran los modelos de las correlaciones *in vitro in vivo* para ambos productos.

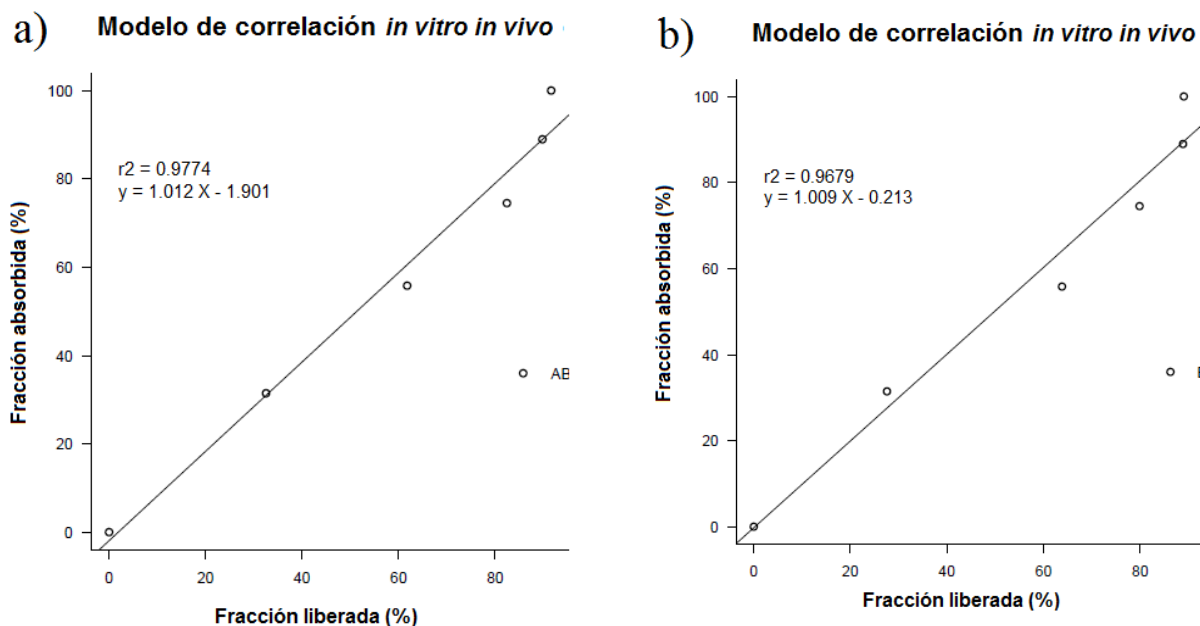


Figura 35. Resultados de la IVIVC: a) Producto A en medio biorrelevante y b) Producto B en medio biorrelevante.

5.5.4 Comparación de las correlaciones obtenidas de los perfiles de disolución farmacopeico y biorrelevante

En la tabla 41 está la comparación de todos los parámetros obtenidos para la evaluación de las modelos de las correlaciones *in vitro in vivo*.

Tabla 41. Comparación de los parámetros obtenidos para cada correlación.

	Producto A en medio farmacopeico	Producto B en medio farmacopeico	Producto A en medio biorrelevante	Producto B en medio biorrelevante
Pendiente	0.9155	0.9248	1.012	1.009
Intercepto	-2.767	-0.731	-1.901	-0.203
r^2	0.9786	0.9808	0.9774	0.9679
r	0.9892	0.9903	0.9886	0.9838
n	4	4	5	5
PE Cmáx	40.45	41.99	23.54	24.09
PE ABC (0-∞)	41.3	42.69	24.52	22.9

Como se observa en la tabla 41, los perfiles hechos en el medio de disolución biorrelevante presentan un mejor ajuste a una línea recta, su pendiente es de 1 y su ordenada al origen, estadísticamente, no es distinta de cero. Todas las

correlaciones son significativas para el número de observaciones en cada uno de los experimentos a un nivel de confianza del 95%. Sin embargo, los porcentajes de error para $C_{\text{máx}}$ y ABC (0- ∞) se encuentran al doble en el medio de disolución farmacopeico con respecto al biorrelevante, lo cual implica que la correlación con el medio de disolución biorrelevante tendrá más impacto en la predicción.

Como se puede observar, existe una tendencia de una correlación *in vitro in vivo*, por lo que es probable que este tipo de modelo, permitiera estimar los perfiles plasmáticos de los dos productos empleados en este estudio.

Se esperaría que si existe un cambio en el perfil de disolución en el medio biorrelevante, este se refleje en el perfil plasmático del fármaco.

Ello permitiría seleccionar la mejor formulación con base en el perfil de disolución en medio biorrelevante, antes de llevar a cabo el estudio *in vivo*.

6. CONCLUSIONES

Se evaluó el perfil de disolución de la glimepirida en tabletas conteniendo glimepirida y metformina empleando el medio farmacopeico y un medio biorrelevante (FaSSIF V2). Se encontró que en el medio biorrelevante la disolución es más lenta.

Se desarrolló y validó un método analítico para la cuantificación de la glimepirida en un medio farmacopeico y un medio biorrelevante. El método demostró ser lineal, exacto, preciso y selectivo.

Tomando como base los parámetros farmacocinéticos disponibles en la literatura, se investigó la posible correlación *in vitro in vivo* para la glimepirida, en ambos medios de disolución. Se encontró una mejor correlación al emplear el medio biorrelevante.

7. REFERENCIAS

1. Emami, J., *In vitro - in vivo correlation: from theory to applications*. J Pharm Pharm Sci, 2006. **9**(2): p. 169-89.
2. Shargel, L., Wu-Pong, S., Yu, B., *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics. E-Book*. McGraw Hill Acces, 2004. **5ta ed**: p. Capítulo 14.
3. Klein, S., *The use of biorelevant dissolution media to forecast the in vivo performance of a drug*. AAPS J, 2010. **12**(3): p. 397-406.
4. Ekarat, J. and J. Dressman, *Biorelevant Dissolution Media Simulating the Proximal Human Gastrointestinal Tract: An Update*. Dissolution Technologies, 2009: p. 21-25.
5. FDA, *The Biopharmaceutics Classification System (BCS) Guidance*. 2009.
<http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDER/ucm128219.htm> (Fecha de Revisión: 16/01/2014).
6. Siepman, J. and F. Siepman, *Mathematical modeling of drug dissolution*. Int J Pharm, 2013. **453**(1): p. 12-24.
7. McGilveray, I., *Biopharmaceutics*. Encyclopedia of Biopharmaceutical Statics, 2003: p. 107 - 109.
8. EUA, *711 Disolución*. USP 33, 2009.
http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/ES/c711usp33spa.pdf (Fecha de revisión: 16/01/2014): p. 1 -8
9. Zhang, Y., M. Huo, J. Zhou, A. Zou, W. Li, et al., *DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles*. AAPS J, 2010. **12**(3): p. 263-71.
10. Costa, P. and J.M. Sousa Lobo, *Modeling and comparison of dissolution profiles*. Eur J Pharm Sci, 2001. **13**(2): p. 123-33.
11. Tsong, Y., *In vitro dissolution profile comparison*. Encyclopedia of Biopharmaceutical Statics, 2003: p. 456 - 462.
12. FDA, *Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms*. 1997.
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070237.pdf> (Fecha de Revisión: 23/01/2014).
13. Jung, H., *Comparación de perfiles de disolución. Impacto de los criterios de diferentes agencias regulatorias en el cálculo de f2*. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 2012. **43**(3): p. 67-71.
14. EMEA, *Guideline on the investigation of bioequivalence* 2010.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf (Fecha de revisión: 30/01/2014).
15. WHO, *Guideline on submission of documentation for a multisource (generic) finished pharmaceutical product (fpp): quality part* 2010.
http://www.who.int/medicines/services/expertcommittees/pharmprep/GenericGuideline-Quality_QAS10-373_17082010.pdf (Fecha de revisión: 30/01/2014).

16. Tsong, Y., *Statistical assesment of mean differences between two dissolution data sets*. Drug Information Journal, 1996. **30**: p. 1105-1112.
17. Karalis, V., E. Magklara, V.P. Shah, and P. Macheras, *From drug delivery systems to drug release, dissolution, IVIVC, BCS, BDDCS, bioequivalence and biowaivers*. Pharm Res, 2010. **27**(9): p. 2018-29.
18. FDA, *Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System*. 2000.
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070246.pdf> (Fecha de revisión: 14/01/2014).
19. WHO, *Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability*. 2005.
http://www.who.int/medicines/services/expertcommittees/pharmprep/QAS04_093Rev4_final.pdf (Fecha de Revisión: 20/01/2014).
20. Müllertz, A., *Solvent Systems and Their Selection in Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Springer New York, 2007: p. 151-171.
21. Polli, J.E., *IVIVR versus IVIVC*. Dissolution Technologies, 2000. **7**(3): p. 6-16.
22. WinNonlin, *IVIVC Toolkit™ for Phoenix® WinNonlin®*
<http://www.certara.com/products/pkpd/ivivc/> (Fecha de Revisión: 30/01/2014).
23. GloboMax, *PRODUCTS: PDx-IVIVC® TOOLS FOR IN VITRO - IN VIVO CORRELATION*
<http://www.globomaxnm.com/pdxivivc.htm> (Fecha de Revisión: 30/01/2014).
24. GastroPlus, *What is IVIVCPlus™?* **<http://www.simulations-plus.com/Products.aspx?pID=11&mID=12>** (Fecha de Revisión: 30/01/2014).
25. Hsin-ya Lee, Y.-j.L., *Package IVIVC*. CRAN for R, 2013. **<http://cran.r-project.org/web/packages/ivivc/ivivc.pdf>** (Fecha de revisión: 16/01/2014).
26. Allen, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems Ebook*. Lippincott Williams & Wilkins 9na ed, 2010.
<https://www.inkling.com/read/ansel-pharmaceutical-dosage-form-drug-delivery-9th/chapter-5/dissolution-and-drug-absorption> (Fecha de revisión: 16/01/2014).
27. Abdul Ahad, H., *Fabrication of glimepiride Hibiscus esculentus fruit mucilage and povidone sustained release matrix tablets: in vitro evaluation*. Der pharmacia sinica, 2011. **2**(2): p. 91-100.
28. Kolte, B.L., B.B. Raut, A.A. Deo, M.A. Bagoor, and D.B. Shinde, *Simultaneous determnation of metformin and glimepiride in pharmaceutical dosage form by reverse-phase liquid chromatography*. J Sep Sci, 2005. **28**(16): p. 2076-9.
29. FEUM, *Glimepirida*. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 2011.
30. Gu, N., B.H. Kim, H. Rhim, J.Y. Chung, J.R. Kim, et al., *Comparison of the bioavailability and tolerability of fixed-dose combination*

- glimepiride/metformin 2/500-mg tablets versus separate tablets: A single-dose, randomized-sequence, open-label, two-period crossover study in healthy Korean volunteers.* Clin Ther, 2010. **32**(7): p. 1408-18.
31. Kim, B.H., K.H. Shin, J. Kim, K.S. Lim, K.P. Kim, et al., *Pharmacokinetic comparison of a new glimepiride 1-mg + metformin 500-mg combination tablet formulation and a glimepiride 2-mg + metformin 500-mg combination tablet formulation: a single-dose, randomized, open-label, two-period, two-way crossover study in healthy, fasting Korean male volunteers.* Clin Ther, 2009. **31**(11): p. 2755-64.
 32. Abdul Ahad, H., *Preparation of glimepiride Aloe barbadensis miller leaves mucilage and povidone controlled release matrix tablets: in vitro and in vivo evaluation.* International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy, 2011. **2**(2): p. 563-571.
 33. Frick, A., H. Moller, and E. Wirbitzki, *Biopharmaceutical characterization of oral immediate release drug products. In vitro/in vivo comparison of phenoxymethylpenicillin potassium, glimepiride and levofloxacin.* Eur J Pharm Biopharm, 1998. **46**(3): p. 305-11.
 34. Badian, M., A. Korn, K.H. Lehr, V. Malerczyk, and W. Waldhausl, *Absolute bioavailability of glimepiride (Amaryl) after oral administration.* Drug Metabol Drug Interact, 1994. **11**(4): p. 331-9.
 35. Antonesi, I.M., R. Potur, D.M. Potur, C.M. Ghiciuc, and C.E. Lupusoru, *Pharmacokinetic modeling of glimepiride plasma concentration in healthy subjects.* Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2011. **115**(3): p. 949-53.
 36. SANOFI-AVENTIS, *AMARYL (Description).* 2009. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/020496s021lbl.pdf (Fecha de revisión: 30/01/2014).
 37. PLM, *Tabletas de glimepirida-metformina.* http://www.medicamentosplm.com/productos/glimetal_tabletas.htm(Fecha de revisión: 14/01/2014).
 38. USP, *Revision Bulletin, Glimepiride.* 2010. http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/glimepirideTabletsM35024.pdf (Fecha de revisión: 16/01/2014).
 39. Qureshi, S.A., *Potentially Incorrect Interpretation of In Vitro Dissolution Characteristics of Products – Glimepiride.* Drug Dissolution Testing, 2012. <http://www.drug-dissolution-testing.com/blog/files/glimepiride.pdf> (Fecha de Revisión: 16/01/2014).
 40. EUA, 1092 *The dissolution procedure: Development and validation.* USP32-NF27, 2009. http://www.drugfuture.com/Pharmacopoeia/USP32/pub/data/v32270/usp32nf27s0_c1092.html(Fecha de Revisión: 16/01/2014): p. 599.
 41. EMEA, *ICH Topic Q4B Annex 7 Dissolution Test General Chapter* 2008. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002776.pdf (Fecha de Revisión: 16/01/2014).

42. Craven, *FaSSIF Dissolution*. 2011.
<http://www.dissolution.com/ddg/archive/index.php/t-2988.html> (Fecha de revisión: 16/01/2014).
43. Box, G. and S. Hunter, *Estadística para investigadores*. Editorial Reverté, 2008. **2da ed**: p. 173-239.
44. biorelevant.com, *Tips for basic biorelevant dissolution tests*. 2012.
<http://biorelevant.com/blog/tips-basic-biorelevant-dissolution-tests/>(Fecha de revisión (14/01/2014)).
45. Langtry, H.D. and J.A. Balfour, *Glimepiride. A review of its use in the management of type 2 diabetes mellitus*. *Drugs*, 1998. **55**(4): p. 563-84.
46. FDA, *Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, And Application of In Vitro/In Vivo Correlations*. Guidance for Industry, 1997.

Anexo 1

En este anexo se muestran los cromatogramas de la linealidad y la estabilidad (sólo para la concentración 10 µg/mL) para la validación del sistema.

En orden se muestran:

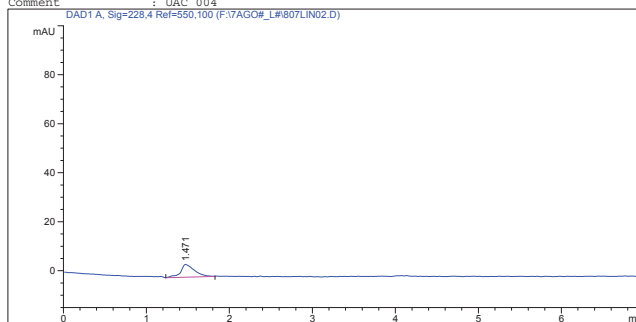
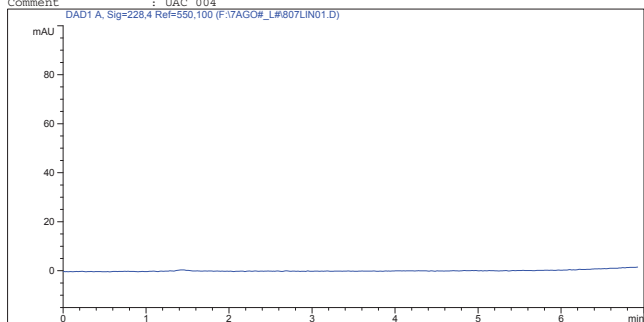
1. Prueba del inyector
2. Blanco
3. 1 µg/mL
4. 3 µg/mL
5. 5 µg/mL
6. 7 µg/mL
7. 10 µg/mL (día 1)
8. 10 µg/mL (día 2)
9. 10 µg/mL (día 3)

Injection Date : 8/7/2013 12:42:45 PM Seq. Line : 1
Sample Name : Cero Vial : 1
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarollo Analitico Inj Volume : 5 µl
Different Inj Volume from Sequence Actual Inj Volume : 0 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 8/7/2013 12:41:56 PM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 6/21/2013 8:09:22 PM

Injection Date : 8/7/2013 12:50:31 PM Seq. Line : 2
Sample Name : Blanco Vial : 1
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarollo Analitico Inj Volume : 5 µl
Different Inj Volume from Sequence Actual Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 8/7/2013 12:41:56 PM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 6/21/2013 8:09:22 PM

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004



Area Percent Report with Performance

Area Percent Report with Performance

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

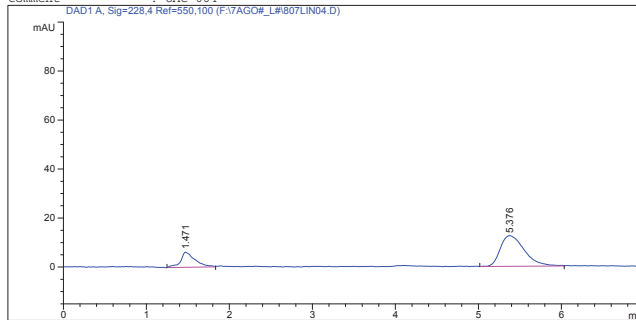
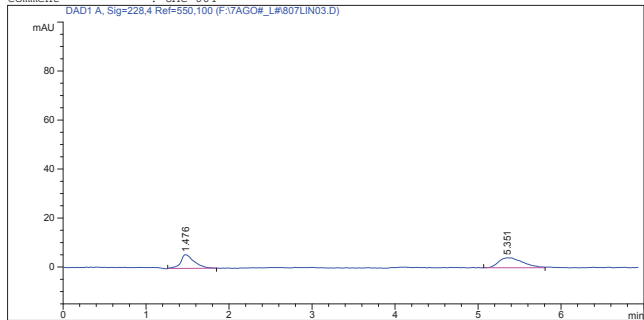
*** End of Report ***

Injection Date : 8/7/2013 12:58:26 PM Seq. Line : 3
Sample Name : ACN 1 Vial : 2
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarollo Analitico Inj Volume : 5 µl
Different Inj Volume from Sequence Actual Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 8/7/2013 12:41:56 PM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 6/21/2013 8:09:22 PM

Injection Date : 8/7/2013 1:06:20 PM Seq. Line : 4
Sample Name : ACN 3 Vial : 3
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarollo Analitico Inj Volume : 5 µl
Different Inj Volume from Sequence Actual Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 8/7/2013 12:41:56 PM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 6/21/2013 8:09:22 PM

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004



Area Percent Report with Performance

Area Percent Report with Performance

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Table with 10 columns: RetTime, k', Area, Height, Symm., Width, Plates, Resol, Select, Retention. Row 1: 1.476, -, 62.93882, 5.61281, 0.56, 0.1581, 483, -, -

Table with 10 columns: RetTime, k', Area, Height, Symm., Width, Plates, Resol, Select, Retention. Row 1: 1.471, -, 74.77412, 6.13638, 0.51, 0.1689, 421, -, -

*** End of Report ***

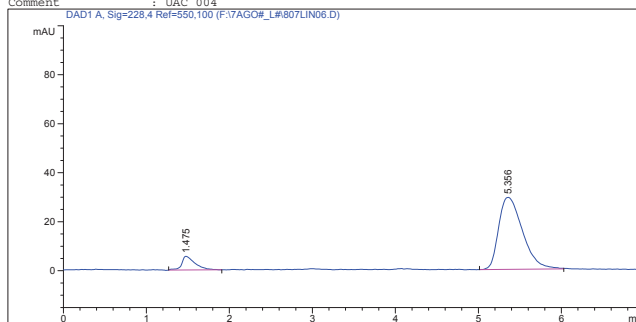
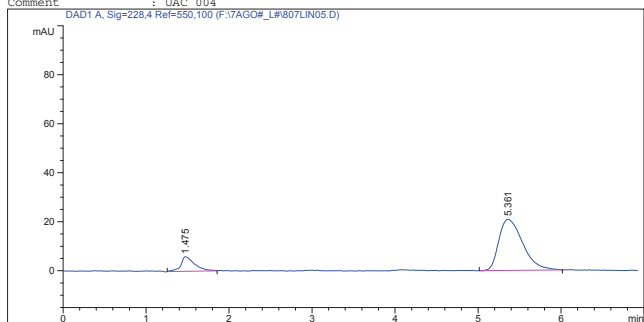
*** End of Report ***

Injection Date : 8/7/2013 1:14:15 PM Seq. Line : 5
Sample Name : ACN 5 Vial : 4
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 5 µl
Different Inj Volume from Sequence : Actual Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 8/7/2013 12:41:56 PM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 6/21/2013 8:09:22 PM

Injection Date : 8/7/2013 1:22:10 PM Seq. Line : 6
Sample Name : ACN 7 Vial : 5
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 5 µl
Different Inj Volume from Sequence : Actual Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 8/7/2013 12:41:56 PM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 6/21/2013 8:09:22 PM

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004



Area Percent Report with Performance

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Selectivity, Iivity. Rows for peaks at 1.475 and 5.361.

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Selectivity, Iivity. Rows for peaks at 1.475 and 5.356.

*** End of Report ***

Page 1 of 1

*** End of Report ***

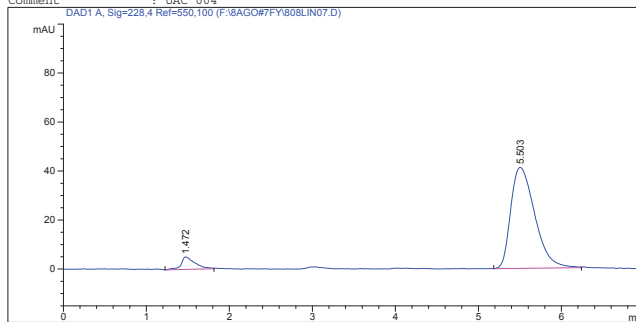
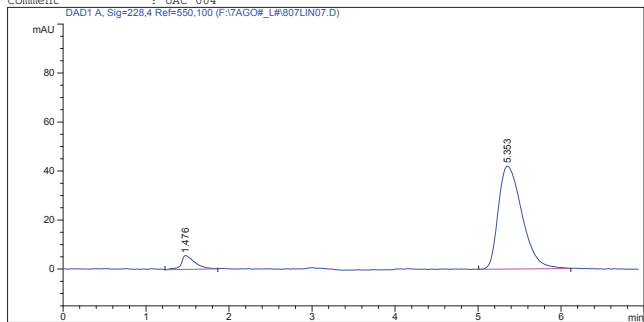
Page 1 of 1

Injection Date : 8/7/2013 1:30:06 PM Seq. Line : 7
Sample Name : ACN 10 Vial : 6
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 5 µl
Different Inj Volume from Sequence : Actual Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 8/7/2013 12:41:56 PM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 6/21/2013 8:09:22 PM

Injection Date : 8/8/2013 1:07:19 PM Seq. Line : 7
Sample Name : ACN 10 Vial : 6
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 5 µl
Different Inj Volume from Sequence : Actual Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 8/8/2013 12:18:53 PM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 6/21/2013 8:09:22 PM

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004



Area Percent Report with Performance

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Selectivity, Iivity. Rows for peaks at 1.476 and 5.353.

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Selectivity, Iivity. Rows for peaks at 1.472 and 5.503.

*** End of Report ***

Page 1 of 1

*** End of Report ***

Page 1 of 1

```

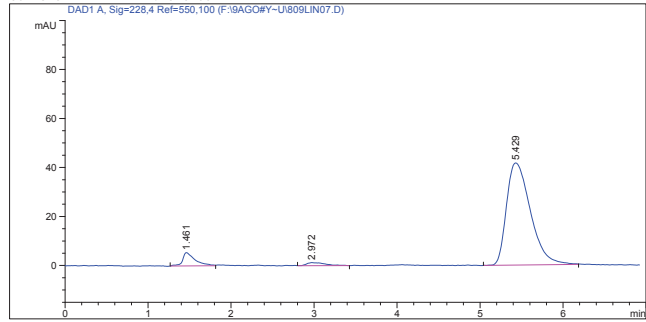
=====
Injection Date : 8/9/2013 12:22:44 PM      Seq. Line : 7
Sample Name    : ACN 10                    Vial : 6
Acq. Operator  : Ricardo                   Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico     Inj Volume : 30 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed   : 8/9/2013 11:41:35 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed   : 6/21/2013 8:09:22 PM
=====

```

```

Column Description : Waters Symmetry C18
Product#           : WAT045905           Batch#: 0261312061
Serial#            : 02613120613806
Diameter           : 4.6 mm              Length : 150.0 mm
Particle size      : 5.0 µm              Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure   : 400 bar              Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment            : UAC 004

```



Area Percent Report with Performance

```

=====
Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier           : 1.0000
Dilution              : 1.0000

```

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

```

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Selectivity
1.461	-	56.00488	5.41096	0.41	0.1371	629	-	-
2.972	0.75	19.91985	1.28804	0.37	0.2400	849	4.71	-
5.429	2.20	835.43701	41.69956	0.59	0.3067	1737	5.28	2.93

*** End of Report ***

Anexo 2

En este anexo se muestran los cromatogramas de la linealidad, repetibilidad y reproducibilidad para la validación del método en medio de disolución farmacopeico.

En orden se muestran:

1. Prueba del inyector
2. Blanco
3. 1 µg/mL
4. 3 µg/mL
5. 5 µg/mL
6. 7 µg/mL
7. 10 µg/mL
8. 10 µg/mL (día 1)
9. 10 µg/mL (día 1)
10. 10 µg/mL (día 1)
11. 10 µg/mL (día 2)
12. 10 µg/mL (día 2)
13. 10 µg/mL (día 2)

Se muestran esos mismos cromatogramas para el medio biorrelevante.

14. Prueba del inyector
15. Blanco
16. 1 µg/mL
17. 3 µg/mL
18. 5 µg/mL
19. 7 µg/mL
20. 10 µg/mL
21. 10 µg/mL (día 1)
22. 10 µg/mL (día 1)
23. 10 µg/mL (día 1)
24. 10 µg/mL (día 2)
25. 10 µg/mL (día 2)
26. 10 µg/mL (día 2)

```

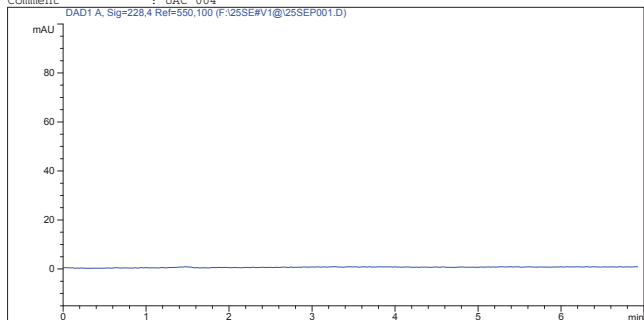
=====
Injection Date : 9/25/2013 11:39:38 AM      Seq. Line : 1
Sample Name    : Cero                        Vial : 1
Acq. Operator  : Ricardo                     Inj : 1
Acq. Instrument: Desarrollito Analitico      Inj Volume : 30 µl
Different Inj Volume from Sequence | Actual Inj Volume : 0 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed   : 9/25/2013 11:38:36 AM by Ricardo
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed   : 9/25/2013 3:15:44 PM
                (modified after loading)
=====

```

```

=====
Column Description : Waters Simmetry C18
Product#          : WAT045905      Batch#: 0261312061
Serial#          : 02613120613806
Diameter         : 4.6 mm          Length : 150.0 mm
Particle size    : 5.0 µm          Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar         Maximum pH : 8
Maximum Temperature: 40 °C
Comment          : UAC 004
=====

```



```

=====
Area Percent Report with Performance
=====
Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier           : 1.0000
Dilution             : 1.0000

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

```

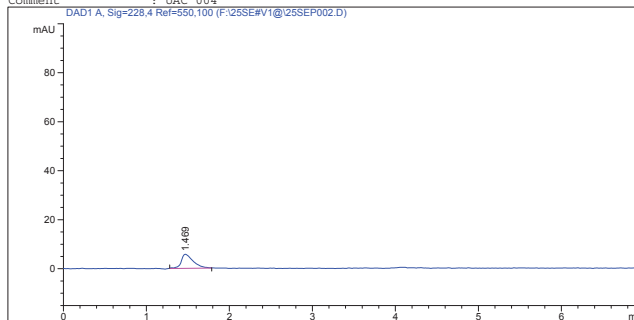
=====
Injection Date : 9/25/2013 11:47:24 AM      Seq. Line : 2
Sample Name    : Blanco                     Vial : 1
Acq. Operator  : Ricardo                     Inj : 1
Acq. Instrument: Desarrollito Analitico      Inj Volume : 30 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed   : 9/25/2013 11:38:36 AM by Ricardo
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed   : 9/25/2013 3:15:44 PM
                (modified after loading)
=====

```

```

=====
Column Description : Waters Simmetry C18
Product#          : WAT045905      Batch#: 0261312061
Serial#          : 02613120613806
Diameter         : 4.6 mm          Length : 150.0 mm
Particle size    : 5.0 µm          Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar         Maximum pH : 8
Maximum Temperature: 40 °C
Comment          : UAC 004
=====

```



```

=====
Area Percent Report with Performance
=====
Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier           : 1.0000
Dilution             : 1.0000

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
1.469	-	58.48790	5.77382	0.49	0.1448	570	-	-

*** End of Report ***

```

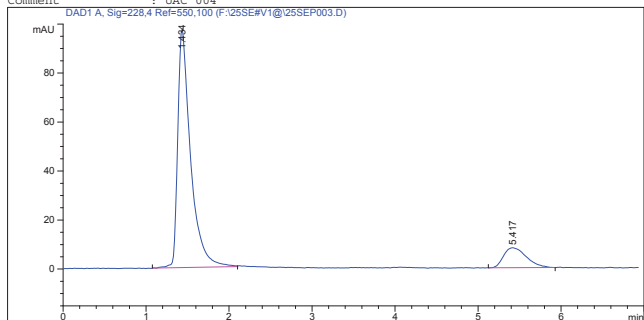
=====
Injection Date : 9/25/2013 11:55:20 AM      Seq. Line : 3
Sample Name    : 1 1                        Vial : 2
Acq. Operator  : Ricardo                     Inj : 1
Acq. Instrument: Desarrollito Analitico      Inj Volume : 30 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed   : 9/25/2013 11:38:36 AM by Ricardo
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed   : 9/25/2013 3:15:44 PM
                (modified after loading)
=====

```

```

=====
Column Description : Waters Simmetry C18
Product#          : WAT045905      Batch#: 0261312061
Serial#          : 02613120613806
Diameter         : 4.6 mm          Length : 150.0 mm
Particle size    : 5.0 µm          Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar         Maximum pH : 8
Maximum Temperature: 40 °C
Comment          : UAC 004
=====

```



```

=====
Area Percent Report with Performance
=====
Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier           : 1.0000
Dilution             : 1.0000

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
1.434	-	1042.90027	97.46349	0.47	0.1467	530	-	-
5.417	2.20	155.36888	8.16854	0.63	0.2967	1847	10.56	-

*** End of Report ***

```

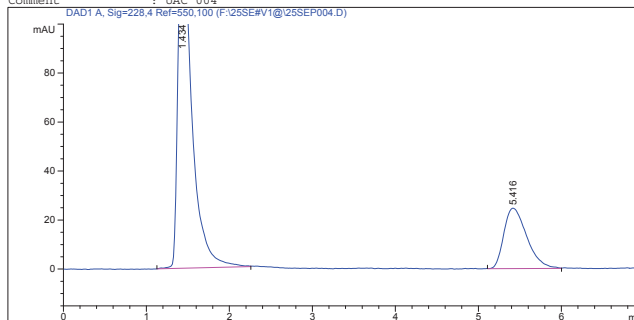
=====
Injection Date : 9/25/2013 12:03:14 PM      Seq. Line : 4
Sample Name    : 1 3                        Vial : 3
Acq. Operator  : Ricardo                     Inj : 1
Acq. Instrument: Desarrollito Analitico      Inj Volume : 30 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed   : 9/25/2013 11:38:36 AM by Ricardo
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed   : 9/25/2013 3:15:44 PM
                (modified after loading)
=====

```

```

=====
Column Description : Waters Simmetry C18
Product#          : WAT045905      Batch#: 0261312061
Serial#          : 02613120613806
Diameter         : 4.6 mm          Length : 150.0 mm
Particle size    : 5.0 µm          Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar         Maximum pH : 8
Maximum Temperature: 40 °C
Comment          : UAC 004
=====

```



```

=====
Area Percent Report with Performance
=====
Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier           : 1.0000
Dilution             : 1.0000

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
1.434	-	1679.30334	157.96954	0.44	0.1467	529	-	-
5.416	2.19	472.72046	24.65196	0.62	0.2933	1889	10.63	-

*** End of Report ***

```

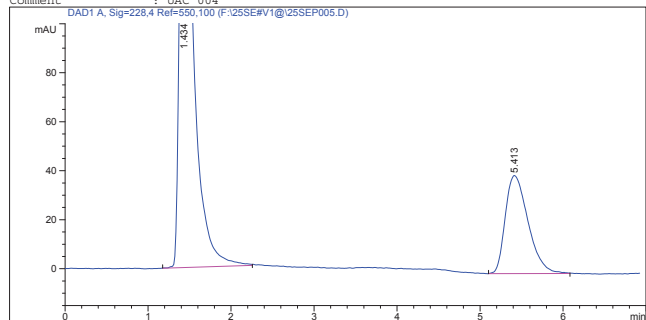
=====
Injection Date : 9/25/2013 12:11:09 PM      Seq. Line : 5
Sample Name    : 1 5                        Vial : 4
Acq. Operator  : Ricardo                    Inj : 1
Acq. Instrument: Desarrollo Analitico       Inj Volume : 30 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed   : 9/25/2013 11:38:36 AM by Ricardo
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed   : 9/25/2013 3:15:44 PM
                (modified after loading)
=====

```

```

Column Description : Waters Symmetry C18
Product#           : WAT045905      Batch#: 0261312061
Serial#           : 02613120613806
Diameter          : 4.6 mm          Length : 150.0 mm
Particle size     : 5.0 µm          Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure  : 400 bar          Maximum pH : 8
Maximum Temperature: 40 °C
Comment           : UAC 004

```



Area Percent Report with Performance

```

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier           : 1.0000
Dilution             : 1.0000

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
1.434	-	2430.97656	231.27151	0.44	0.1440	549	-	-
5.413	2.19	764.29840	40.03917	0.62	0.2933	1887	10.69	-

*** End of Report ***

Page 1 of 1

Instrument 1 9/25/2013 3:36:09 PM

```

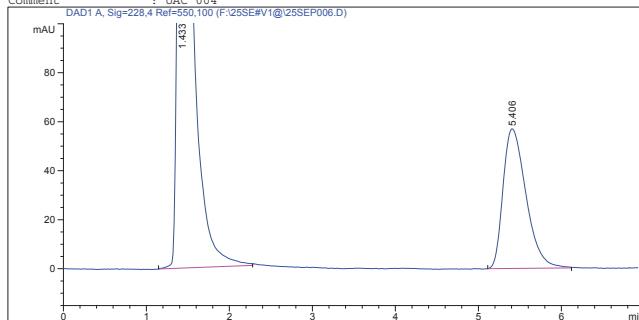
=====
Injection Date : 9/25/2013 12:19:03 PM      Seq. Line : 6
Sample Name    : 1 7                        Vial : 5
Acq. Operator  : Ricardo                    Inj : 1
Acq. Instrument: Desarrollo Analitico       Inj Volume : 30 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed   : 9/25/2013 11:38:36 AM by Ricardo
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed   : 9/25/2013 3:15:44 PM
                (modified after loading)
=====

```

```

Column Description : Waters Symmetry C18
Product#           : WAT045905      Batch#: 0261312061
Serial#           : 02613120613806
Diameter          : 4.6 mm          Length : 150.0 mm
Particle size     : 5.0 µm          Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure  : 400 bar          Maximum pH : 8
Maximum Temperature: 40 °C
Comment           : UAC 004

```



Area Percent Report with Performance

```

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier           : 1.0000
Dilution             : 1.0000

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
1.433	-	3508.97949	335.52533	0.44	0.1440	549	-	-
5.406	2.19	1095.45349	57.04937	0.61	0.2933	1882	10.67	-

*** End of Report ***

Page 1 of 1

Instrument 1 9/25/2013 3:36:33 PM

```

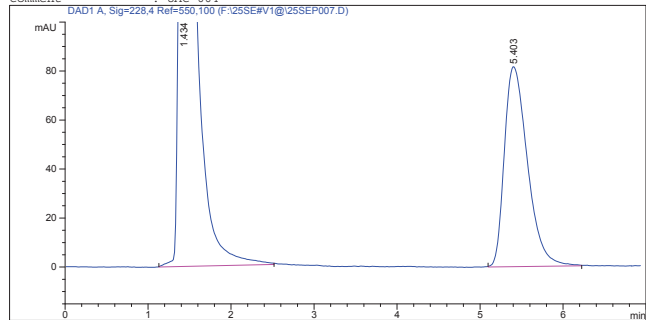
=====
Injection Date : 9/25/2013 12:26:59 PM      Seq. Line : 7
Sample Name    : 1 10                       Vial : 6
Acq. Operator  : Ricardo                    Inj : 1
Acq. Instrument: Desarrollo Analitico       Inj Volume : 30 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed   : 9/25/2013 11:38:36 AM by Ricardo
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed   : 9/25/2013 3:15:44 PM
                (modified after loading)
=====

```

```

Column Description : Waters Symmetry C18
Product#           : WAT045905      Batch#: 0261312061
Serial#           : 02613120613806
Diameter          : 4.6 mm          Length : 150.0 mm
Particle size     : 5.0 µm          Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure  : 400 bar          Maximum pH : 8
Maximum Temperature: 40 °C
Comment           : UAC 004

```



Area Percent Report with Performance

```

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier           : 1.0000
Dilution             : 1.0000

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
1.434	-	4586.11377	434.53275	0.44	0.1433	555	-	-
5.403	2.19	1578.43762	81.64135	0.61	0.2933	1879	10.68	-

*** End of Report ***

Page 1 of 1

Instrument 1 9/25/2013 3:36:50 PM

```

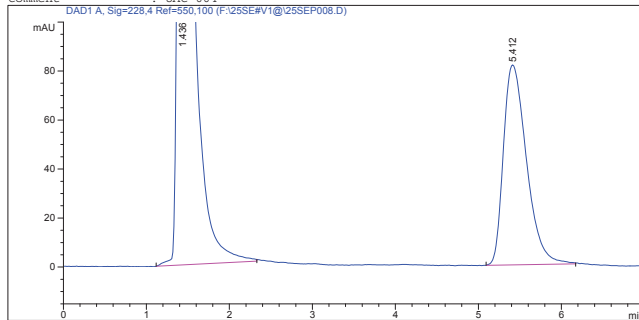
=====
Injection Date : 9/25/2013 12:34:54 PM      Seq. Line : 7
Sample Name    : 1 10                       Vial : 6
Acq. Operator  : Ricardo                    Inj : 2
Acq. Instrument: Desarrollo Analitico       Inj Volume : 30 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed   : 9/25/2013 11:38:36 AM by Ricardo
Analysis Method: C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed   : 9/25/2013 3:15:44 PM
                (modified after loading)
=====

```

```

Column Description : Waters Symmetry C18
Product#           : WAT045905      Batch#: 0261312061
Serial#           : 02613120613806
Diameter          : 4.6 mm          Length : 150.0 mm
Particle size     : 5.0 µm          Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure  : 400 bar          Maximum pH : 8
Maximum Temperature: 40 °C
Comment           : UAC 004

```



Area Percent Report with Performance

```

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier           : 1.0000
Dilution             : 1.0000

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
1.436	-	4549.47852	435.68439	0.45	0.1413	572	-	-
5.412	2.19	1578.36536	81.62405	0.61	0.2933	1886	10.75	-

*** End of Report ***

Page 1 of 1

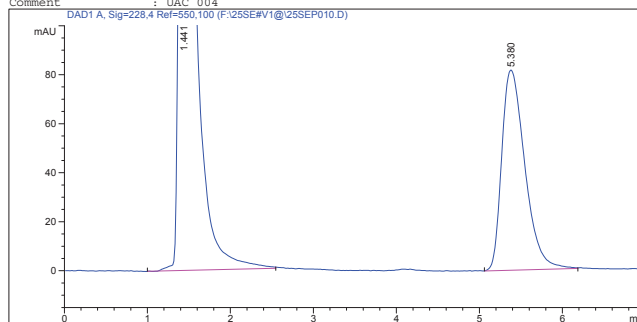
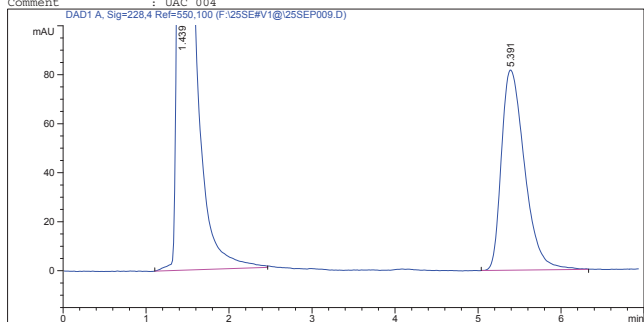
Instrument 1 9/25/2013 3:37:16 PM

Injection Date : 9/25/2013 12:42:49 PM Seq. Line : 7
Sample Name : 1 10 Vial : 6
Acq. Operator : Ricardo Inj : 3
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 9/25/2013 11:38:36 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 9/25/2013 3:15:44 PM
(modified after loading)

Injection Date : 9/25/2013 12:50:44 PM Seq. Line : 7
Sample Name : 1 10 Vial : 6
Acq. Operator : Ricardo Inj : 4
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 9/25/2013 11:38:36 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 9/25/2013 3:15:44 PM
(modified after loading)

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004



Area Percent Report with Performance

Area Percent Report with Performance

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Selectivity, Iivity. Contains two rows of peak data.

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Selectivity, Iivity. Contains two rows of peak data.

*** End of Report ***

Page 1 of 1

*** End of Report ***

Page 1 of 1

Instrument 1 9/25/2013 3:37:32 PM

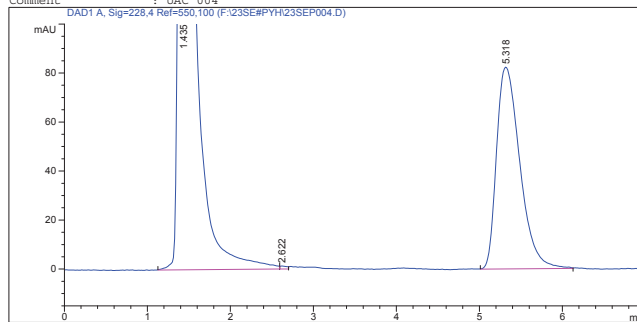
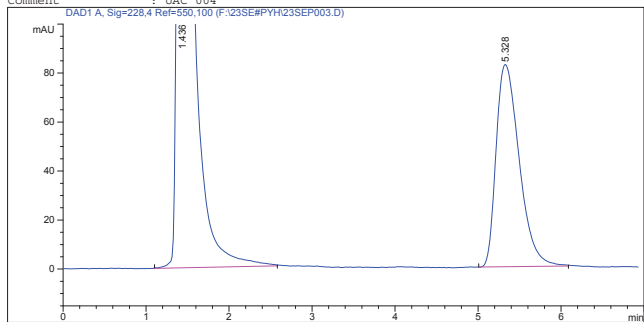
Instrument 1 9/25/2013 3:38:05 PM

Injection Date : 9/24/2013 2:00:27 PM Seq. Line : 3
Sample Name : E1 Vial : 2
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 9/24/2013 1:43:50 PM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 9/25/2013 3:15:44 PM
(modified after loading)

Injection Date : 9/24/2013 2:08:21 PM Seq. Line : 3
Sample Name : E1 Vial : 2
Acq. Operator : Ricardo Inj : 2
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 9/24/2013 1:43:50 PM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 9/25/2013 3:15:44 PM
(modified after loading)

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004



Area Percent Report with Performance

Area Percent Report with Performance

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Selectivity, Iivity. Contains three rows of peak data.

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Selectivity, Iivity. Contains three rows of peak data.

*** End of Report ***

Page 1 of 1

*** End of Report ***

Page 1 of 1

Instrument 1 9/25/2013 3:20:38 PM

Instrument 1 9/25/2013 3:20:59 PM


```

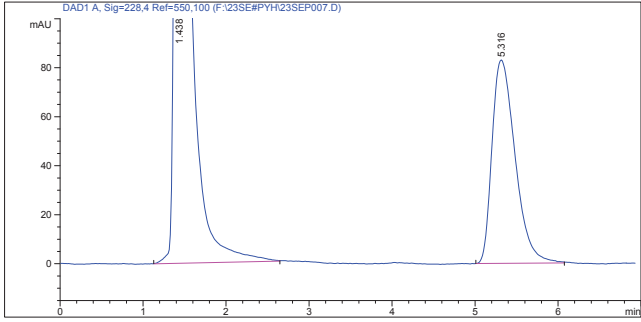
=====
Injection Date : 9/24/2013 2:32:04 PM      Seq. Line : 3
Sample Name    : E1                        Vial : 2
Acq. Operator  : Ricardo                   Inj : 5
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico     Inj Volume : 30 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed   : 9/24/2013 1:43:50 PM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed   : 9/25/2013 3:15:44 PM
                (modified after loading)
=====

```

```

Column Description : Waters Symmetry C18
Product#           : WAT045905           Batch#: 0261312061
Serial#           : 02613120613806
Diameter          : 4.6 mm               Length : 150.0 mm
Particle size     : 5.0 µm              Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure  : 400 bar              Maximum pH : 8
Maximum Temperature: 40 °C
Comment           : UAC 004

```



Area Percent Report with Performance

```

=====
Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier           : 1.0000
Dilution              : 1.0000

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
1.438	-	4744.32617	459.62833	0.45	0.1367	613	-	-
5.316	2.14	1608.00647	83.06841	0.61	0.2933	1819	10.60	-

*** End of Report ***

```

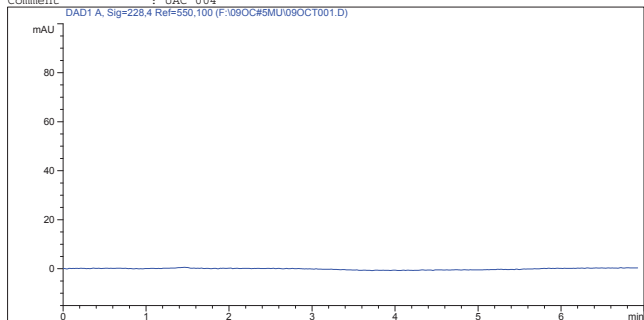
=====
Injection Date : 10/9/2013 11:26:03 AM      Seq. Line : 1
Sample Name   : Cero                        Vial : 1
Acq. Operator : Ricardo                     Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico      Inj Volume : 30 µl
Different Inj Volume from Sequence | Actual Inj Volume : 0 µl
Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed  : 10/9/2013 11:24:36 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed   : 10/3/2013 2:21:28 PM
=====

```

```

Column Description : Waters Simmetry C18
Product#           : WAT045905      Batch#: 0261312061
Serial#           : 02613120613806
Diameter          : 4.6 mm          Length : 150.0 mm
Particle size     : 5.0 µm          Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure  : 400 bar         Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment           : UAC 004

```



Area Percent Report with Performance

```

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier           : 1.0000
Dilution              : 1.0000

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

```

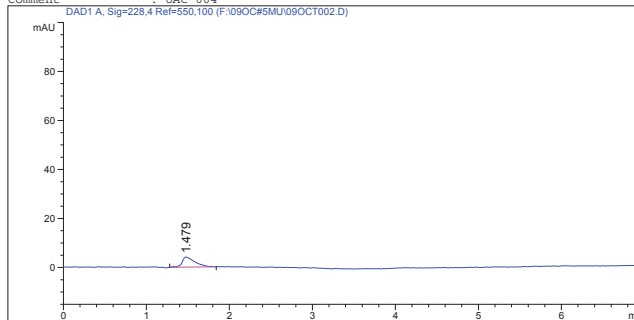
=====
Injection Date : 10/9/2013 11:33:50 AM      Seq. Line : 2
Sample Name   : Blanco                     Vial : 1
Acq. Operator : Ricardo                     Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico      Inj Volume : 30 µl
Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed  : 10/9/2013 11:24:36 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed   : 10/3/2013 2:21:28 PM
=====

```

```

Column Description : Waters Simmetry C18
Product#           : WAT045905      Batch#: 0261312061
Serial#           : 02613120613806
Diameter          : 4.6 mm          Length : 150.0 mm
Particle size     : 5.0 µm          Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure  : 400 bar         Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment           : UAC 004

```



Area Percent Report with Performance

```

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier           : 1.0000
Dilution              : 1.0000

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
1.479	-	44.94553	4.10844	0.44	0.1581	485	-	-

*** End of Report ***

```

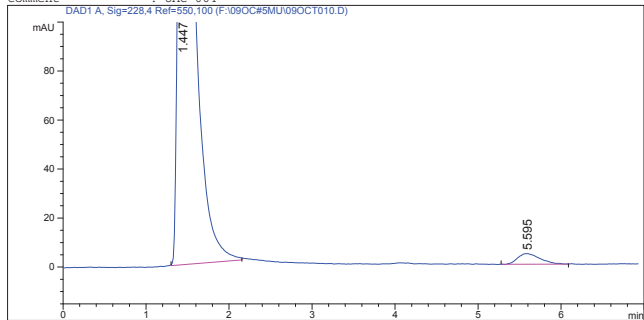
=====
Injection Date : 10/9/2013 12:37:06 PM      Seq. Line : 5
Sample Name   : 1 1                       Vial : 3
Acq. Operator : Ricardo                     Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico      Inj Volume : 30 µl
Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed  : 10/9/2013 11:24:36 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed   : 10/11/2013 11:45:29 AM
                  (modified after loading)
=====

```

```

Column Description : Waters Simmetry C18
Product#           : WAT045905      Batch#: 0261312061
Serial#           : 02613120613806
Diameter          : 4.6 mm          Length : 150.0 mm
Particle size     : 5.0 µm          Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure  : 400 bar         Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment           : UAC 004

```



Area Percent Report with Performance

```

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier           : 1.0000
Dilution              : 1.0000

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
1.447	-	4069.77393	372.91025	0.43	0.1520	502	-	-
5.595	2.30	81.85995	4.34024	0.69	0.2933	2016	10.94	-

*** End of Report ***

```

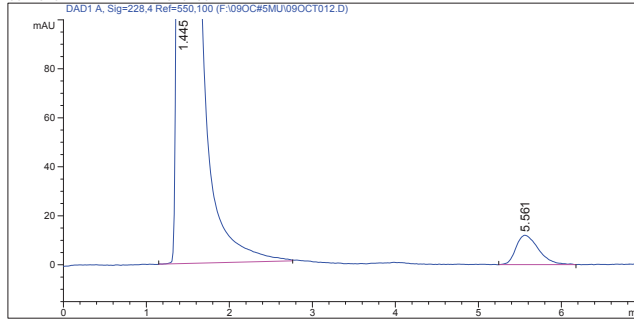
=====
Injection Date : 10/9/2013 12:52:55 PM      Seq. Line : 7
Sample Name   : 1 3                       Vial : 5
Acq. Operator : Ricardo                     Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico      Inj Volume : 30 µl
Acq. Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed  : 10/9/2013 11:24:36 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed   : 10/3/2013 2:21:28 PM
=====

```

```

Column Description : Waters Simmetry C18
Product#           : WAT045905      Batch#: 0261312061
Serial#           : 02613120613806
Diameter          : 4.6 mm          Length : 150.0 mm
Particle size     : 5.0 µm          Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure  : 400 bar         Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment           : UAC 004

```



Area Percent Report with Performance

```

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier           : 1.0000
Dilution              : 1.0000

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
1.445	-	9197.23535	849.71893	0.43	0.1433	563	-	-
5.561	2.28	225.60898	11.97189	0.63	0.2867	2085	11.25	-

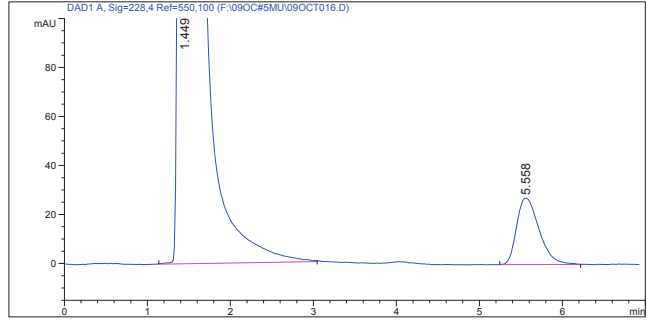
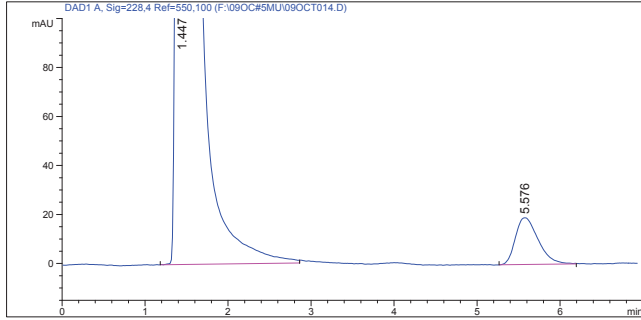
*** End of Report ***

Injection Date : 10/9/2013 1:08:46 PM Seq. Line : 9
Sample Name : 1 5 Vial : 7
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 10/9/2013 11:24:36 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 10/3/2013 2:21:28 PM

Injection Date : 10/9/2013 1:24:36 PM Seq. Line : 11
Sample Name : 1 7 Vial : 9
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 10/9/2013 11:24:36 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 10/3/2013 2:21:28 PM

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004



Area Percent Report with Performance

Area Percent Report with Performance

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Width [min], Plates, Resol, Select, ution, ivity. Rows for peaks at 1.447 and 5.576.

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Width [min], Plates, Resol, Select, ution, ivity. Rows for peaks at 1.449 and 5.558.

*** End of Report ***

*** End of Report ***

Instrument 1 10/10/2013 11:16:56 AM

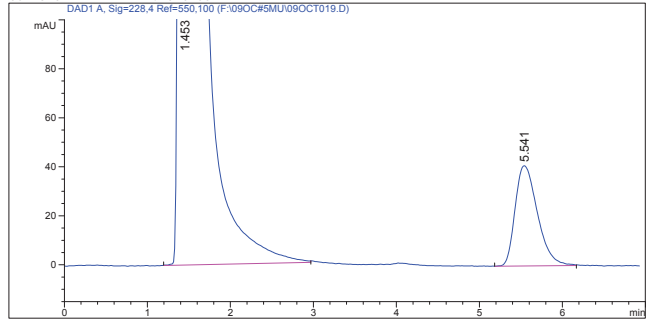
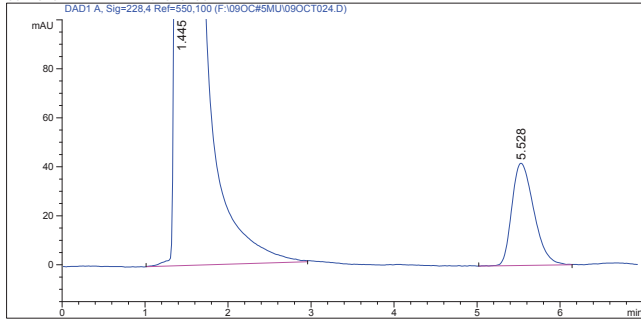
Instrument 1 10/10/2013 11:17:40 AM

Injection Date : 10/9/2013 2:20:47 PM Seq. Line : 19
Sample Name : 1 10 Vial : 18
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 10/9/2013 11:24:36 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 10/3/2013 2:21:28 PM

Injection Date : 10/9/2013 1:48:24 PM Seq. Line : 14
Sample Name : 10 R Vial : 12
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 10/9/2013 11:24:36 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 10/3/2013 2:21:28 PM

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004



Area Percent Report with Performance

Area Percent Report with Performance

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Width [min], Plates, Resol, Select, ution, ivity. Rows for peaks at 1.445 and 5.528.

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Width [min], Plates, Resol, Select, ution, ivity. Rows for peaks at 1.453 and 5.541.

*** End of Report ***

*** End of Report ***

Instrument 1 10/10/2013 11:36:12 AM

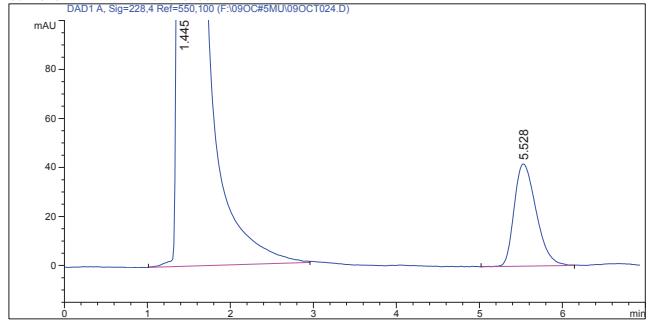
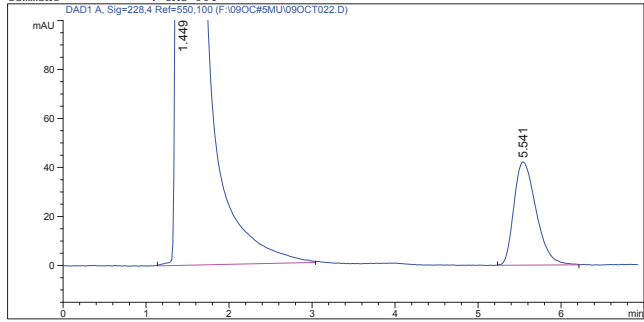
Instrument 1 10/10/2013 11:18:33 AM

Injection Date : 10/9/2013 2:12:10 PM Seq. Line : 17
Sample Name : 10 R Vial : 14
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 10/9/2013 11:24:36 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 10/3/2013 2:21:28 PM

Injection Date : 10/9/2013 2:20:47 PM Seq. Line : 19
Sample Name : 10 R Vial : 18
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 10/9/2013 11:24:36 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 10/3/2013 2:21:28 PM

Column Description : Waters Simmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004

Column Description : Waters Simmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004



Area Percent Report with Performance

Area Percent Report with Performance

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Select, Iivity. Rows for peaks at 1.449 and 5.541.

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Select, Iivity. Rows for peaks at 1.445 and 5.528.

*** End of Report ***

*** End of Report ***

Instrument 1 10/10/2013 11:35:37 AM

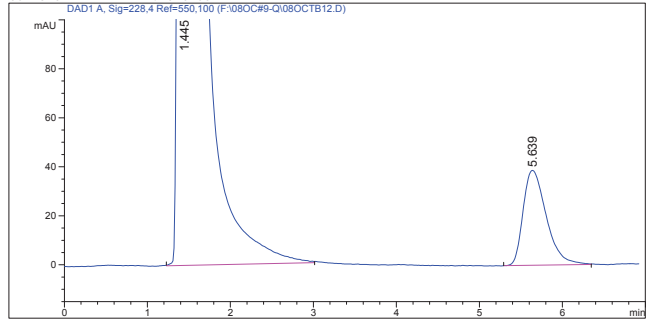
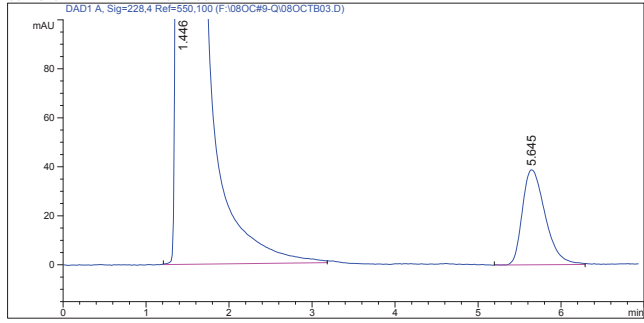
Instrument 1 10/10/2013 11:36:12 AM

Injection Date : 10/8/2013 4:36:41 PM Seq. Line : 3
Sample Name : 10 R Vial : 2
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 10/9/2013 1:00:14 PM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 10/3/2013 2:21:28 PM

Injection Date : 10/8/2013 5:02:15 PM Seq. Line : 7
Sample Name : 10 R Vial : 5
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 10/9/2013 1:00:14 PM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 10/3/2013 2:21:28 PM

Column Description : Waters Simmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004

Column Description : Waters Simmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004



Area Percent Report with Performance

Area Percent Report with Performance

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Select, Iivity. Rows for peaks at 1.446 and 5.645.

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Select, Iivity. Rows for peaks at 1.445 and 5.639.

*** End of Report ***

*** End of Report ***

Instrument 1 10/8/2013 6:12:50 PM

Instrument 1 10/8/2013 6:13:44 PM

```

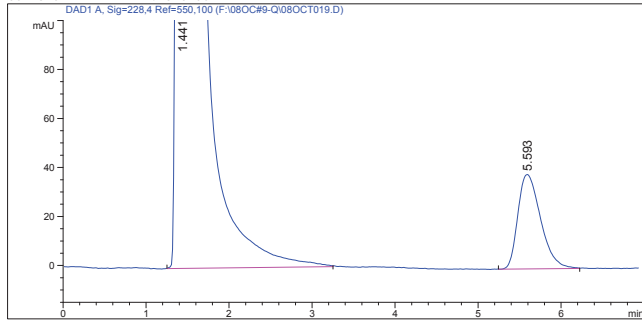
=====
Injection Date : 10/8/2013 3:37:13 PM      Seq. Line : 14
Sample Name    : 10 R                      Vial : 11
Acq. Operator  : Ricardo                   Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico     Inj Volume : 30 µl
Acq. Method    : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed   : 10/8/2013 1:00:14 PM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed   : 10/3/2013 2:21:28 PM
=====

```

```

Column Description : Waters Symmetry C18
Product#          : WAT045905             Batch#: 0261312061
Serial#           : 02613120613806
Diameter          : 4.6 mm                 Length : 150.0 mm
Particle size     : 5.0 µm                Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure  : 400 bar                Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment           : UAC 004

```



=====
Area Percent Report with Performance
=====

```

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier           : 1.0000
Dilution              : 1.0000

```

```

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

```

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
1.441	-	1.98510e4	1844.65649	0.43	0.1422	569	-	-
5.593	2.30	733.40668	38.56608	0.67	0.2900	2061	11.29	-

=====
*** End of Report ***

Anexo 3

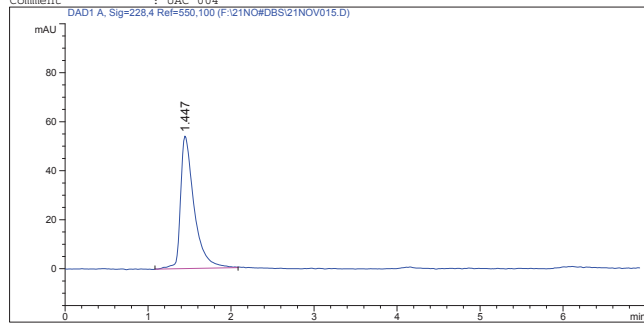
En este anexo se muestran los cromatogramas del perfil de disolución de una tableta de cada producto. Se muestran los cromatogramas para los tiempos: cero, 10, 20, 30, 40 y 50 minutos.

Los cromatogramas del 1 al 6 corresponden al perfil de una tableta del producto A en medio de disolución farmacopeico y los cromatogramas del 6 al 12, a una tableta del producto B en este mismo medio.

Los cromatogramas del 13 al 18, corresponden al perfil de una tableta del producto A en medio de disolución biorrelevante, y del 19 al 24 para una tableta del producto B en este mismo medio.

Injection Date : 11/21/2013 11:24:58 AM Seq. Line : 10
 Sample Name : B0 Vial : 9
 Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
 Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 5 µl
 Different Inj Volume from Sequence 1 Actual Inj Volume : 30 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
 Last changed : 11/21/2013 9:13:49 AM by Ricardo
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
 Last changed : 10/11/2013 11:39:57 AM

Column Description : Waters Symmetry C18
 Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
 Serial# : 02613120613806
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
 Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
 Maximum Temperature : 40 °C
 Comment : UAC 004



Area Percent Report with Performance

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=228.4 Ref=550.100

Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
1.447	-	616.56146	54.20466	0.47	0.1578	466	-	-

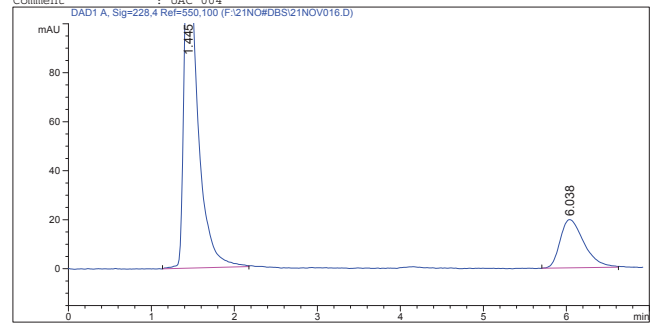
*** End of Report ***

Page 1 of 1

Instrument 1 11/21/2013 6:17:52 PM

Injection Date : 11/21/2013 11:32:53 AM Seq. Line : 11
 Sample Name : B1 Vial : 10
 Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
 Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 5 µl
 Different Inj Volume from Sequence 1 Actual Inj Volume : 30 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
 Last changed : 11/21/2013 9:13:49 AM by Ricardo
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
 Last changed : 10/11/2013 11:39:57 AM

Column Description : Waters Symmetry C18
 Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
 Serial# : 02613120613806
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
 Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
 Maximum Temperature : 40 °C
 Comment : UAC 004



Area Percent Report with Performance

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=228.4 Ref=550.100

Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
1.445	-	1591.08960	145.92300	0.43	0.1493	519	-	-
6.038	2.56	392.67929	19.67528	0.63	0.3033	2195	11.92	-

*** End of Report ***

Page 1 of 1

Instrument 1 11/21/2013 6:18:11 PM

Data File F:\21NO#DBS\21NOV017.D

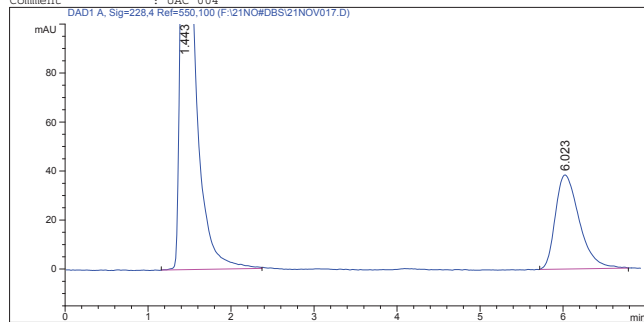
Sample Name: B2

Data File F:\21NO#DBS\21NOV018.D

Sample Name: B3

Injection Date : 11/21/2013 11:40:49 AM Seq. Line : 12
 Sample Name : B2 Vial : 11
 Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
 Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 5 µl
 Different Inj Volume from Sequence 1 Actual Inj Volume : 30 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
 Last changed : 11/21/2013 9:13:49 AM by Ricardo
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
 Last changed : 10/11/2013 11:39:57 AM

Column Description : Waters Symmetry C18
 Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
 Serial# : 02613120613806
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
 Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
 Maximum Temperature : 40 °C
 Comment : UAC 004



Area Percent Report with Performance

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=228.4 Ref=550.100

Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
1.443	-	2486.83765	227.35136	0.42	0.1493	517	-	-
6.023	2.55	772.31714	38.45972	0.64	0.3033	2184	11.89	-

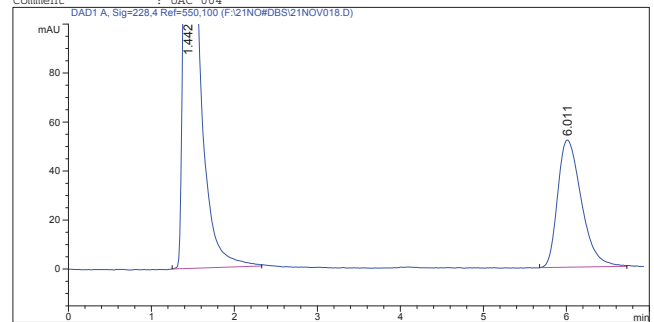
*** End of Report ***

Page 1 of 1

Instrument 1 11/21/2013 6:18:29 PM

Injection Date : 11/21/2013 11:48:45 AM Seq. Line : 13
 Sample Name : B3 Vial : 12
 Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
 Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 5 µl
 Different Inj Volume from Sequence 1 Actual Inj Volume : 30 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
 Last changed : 11/21/2013 9:13:49 AM by Ricardo
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
 Last changed : 10/11/2013 11:39:57 AM

Column Description : Waters Symmetry C18
 Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
 Serial# : 02613120613806
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
 Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
 Maximum Temperature : 40 °C
 Comment : UAC 004



Area Percent Report with Performance

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=228.4 Ref=550.100

Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
1.442	-	3056.44116	282.39151	0.42	0.1493	517	-	-
6.011	2.55	1030.47192	51.99170	0.64	0.3000	2224	11.95	-

*** End of Report ***

Page 1 of 1

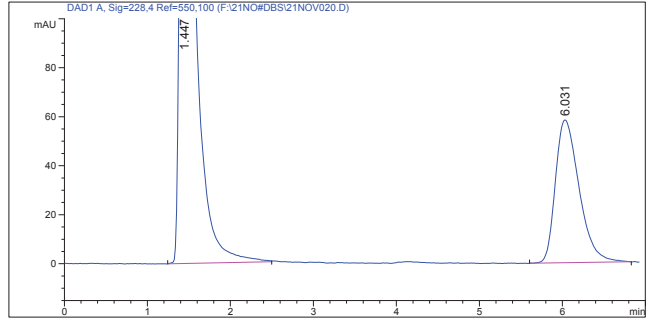
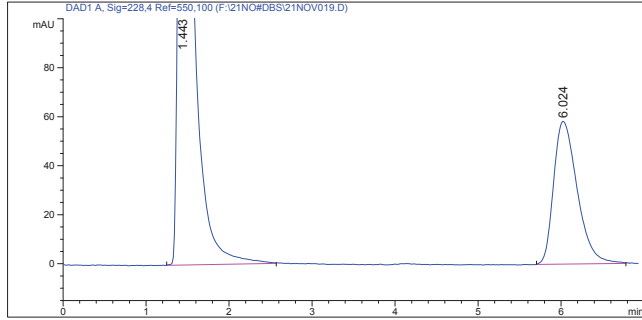
Instrument 1 11/21/2013 6:18:46 PM

Injection Date : 11/21/2013 11:56:42 AM Seq. Line : 14
Sample Name : B4 Vial : 13
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollio Analitico Inj Volume : 5 µl
Different Inj Volume from Sequence 1 Actual Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 11/21/2013 9:13:49 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 10/11/2013 11:39:57 AM

Injection Date : 11/21/2013 12:04:37 PM Seq. Line : 15
Sample Name : B5 Vial : 14
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollio Analitico Inj Volume : 5 µl
Different Inj Volume from Sequence 1 Actual Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 11/21/2013 9:13:49 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 10/11/2013 11:39:57 AM

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004



Area Percent Report with Performance

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Select, Iivity. Rows for peaks at 1.443 and 6.024.

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Select, Iivity. Rows for peaks at 1.447 and 6.031.

*** End of Report ***

Page 1 of 1

*** End of Report ***

Page 1 of 1

Instrument 1 11/21/2013 6:19:03 PM

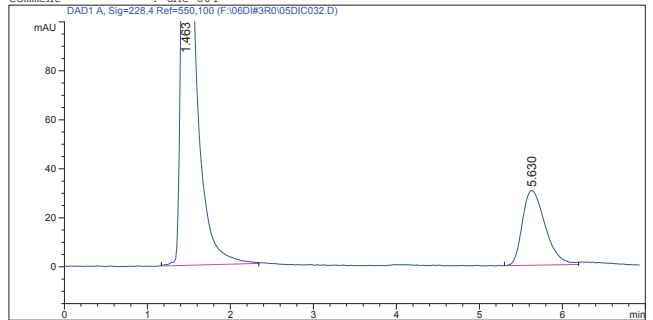
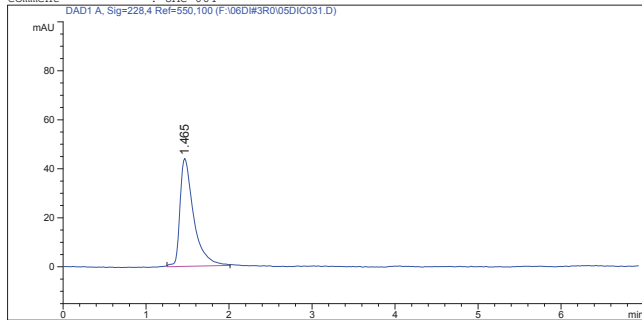
Instrument 1 11/21/2013 6:19:24 PM

Injection Date : 12/5/2013 2:01:22 PM Seq. Line : 26
Sample Name : D0 Vial : 6
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollio Analitico Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 12/5/2013 10:02:51 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 10/11/2013 11:39:57 AM

Injection Date : 12/5/2013 2:09:18 PM Seq. Line : 27
Sample Name : D1 Vial : 7
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollio Analitico Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 12/5/2013 10:02:51 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 10/11/2013 11:39:57 AM

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004



Area Percent Report with Performance

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Select, Iivity. Rows for peaks at 1.465 and 5.630.

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Select, Iivity. Rows for peaks at 1.463 and 5.630.

*** End of Report ***

Page 1 of 1

*** End of Report ***

Page 1 of 1

Instrument 1 12/5/2013 7:53:28 PM

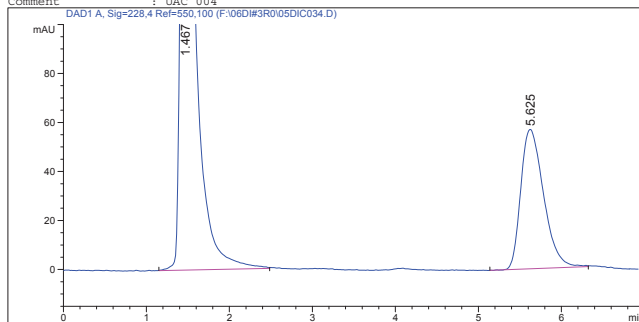
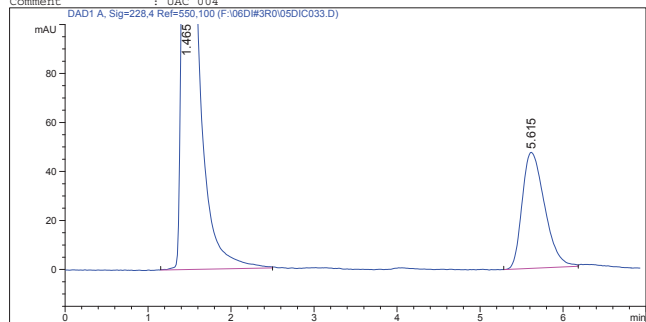
Instrument 1 12/5/2013 7:54:21 PM

Injection Date : 12/5/2013 2:17:13 PM Seq. Line : 28
Sample Name : D2 Vial : 8
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollito Analitico Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 12/5/2013 10:02:51 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 10/11/2013 11:39:57 AM

Injection Date : 12/5/2013 2:25:10 PM Seq. Line : 29
Sample Name : D3 Vial : 9
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollito Analitico Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 12/5/2013 10:02:51 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 10/11/2013 11:39:57 AM

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004



Area Percent Report with Performance

Area Percent Report with Performance

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Select, Iivity. Rows for peaks at 1.465 and 5.615.

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Select, Iivity. Rows for peaks at 1.467 and 5.625.

*** End of Report ***

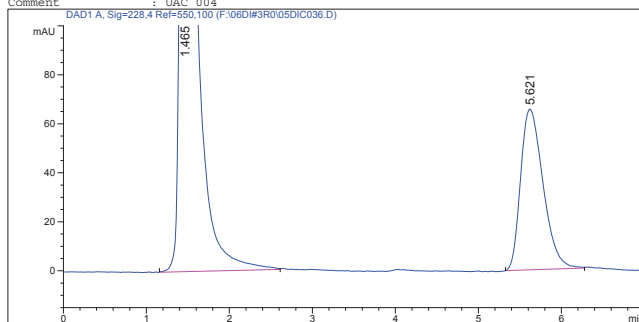
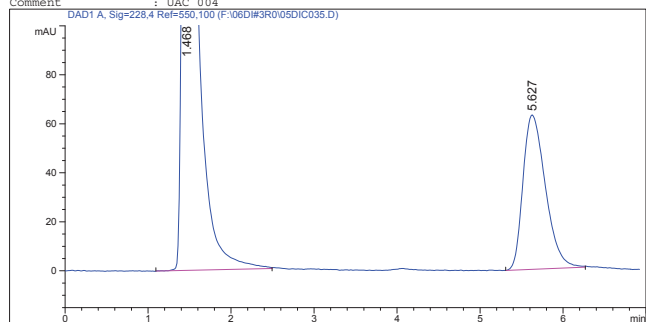
*** End of Report ***

Injection Date : 12/5/2013 2:33:05 PM Seq. Line : 30
Sample Name : D4 Vial : 10
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollito Analitico Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 12/5/2013 10:02:51 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 10/11/2013 11:39:57 AM

Injection Date : 12/5/2013 2:41:02 PM Seq. Line : 31
Sample Name : D5 Vial : 11
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollito Analitico Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 12/5/2013 10:02:51 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 10/11/2013 11:39:57 AM

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004



Area Percent Report with Performance

Area Percent Report with Performance

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Select, Iivity. Rows for peaks at 1.468 and 5.627.

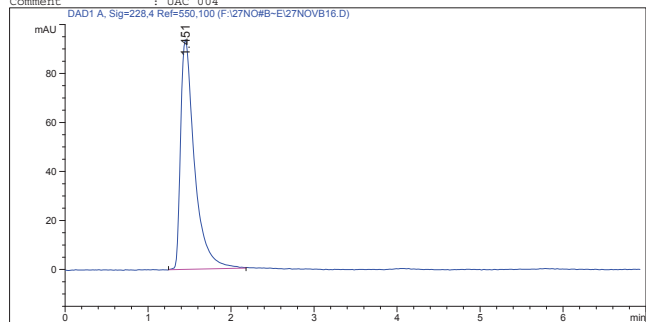
Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Select, Iivity. Rows for peaks at 1.465 and 5.621.

*** End of Report ***

*** End of Report ***

Injection Date : 11/27/2013 9:19:16 PM Seq. Line : 16
 Sample Name : K0 Vial : 18
 Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
 Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 30 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
 Last changed : 11/27/2013 10:37:06 AM by Ricardo
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
 Last changed : 10/11/2013 11:39:57 AM

Column Description : Waters Symmetry C18
 Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
 Serial# : 02613120613806
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
 Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
 Maximum Temperature : 40 °C
 Comment : UAC 004



Area Percent Report with Performance

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
1.451	-	1089.85889	93.85455	0.47	0.1600	456	-	-

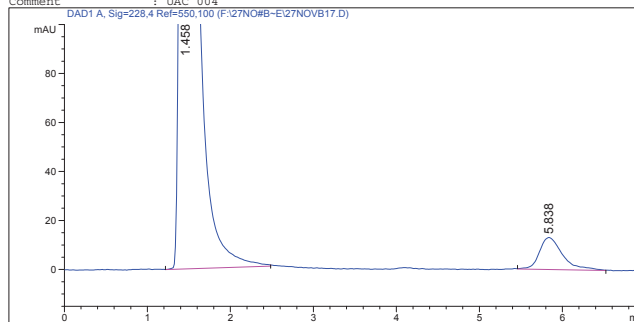
*** End of Report ***

Page 1 of 1

Instrument 1 11/28/2013 11:49:39 AM

Injection Date : 11/27/2013 9:27:13 PM Seq. Line : 17
 Sample Name : K1 Vial : 19
 Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
 Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 30 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
 Last changed : 11/27/2013 10:37:06 AM by Ricardo
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
 Last changed : 10/11/2013 11:39:57 AM

Column Description : Waters Symmetry C18
 Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
 Serial# : 02613120613806
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
 Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
 Maximum Temperature : 40 °C
 Comment : UAC 004



Area Percent Report with Performance

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
1.458	-	5621.61377	485.99844	0.47	0.1633	441	-	-
5.838	2.44	252.59392	13.05620	0.66	0.2733	2527	11.79	-

*** End of Report ***

Page 1 of 1

Instrument 1 11/28/2013 11:49:58 AM

Data File F:\27NO#B-E\27NOVB18.D

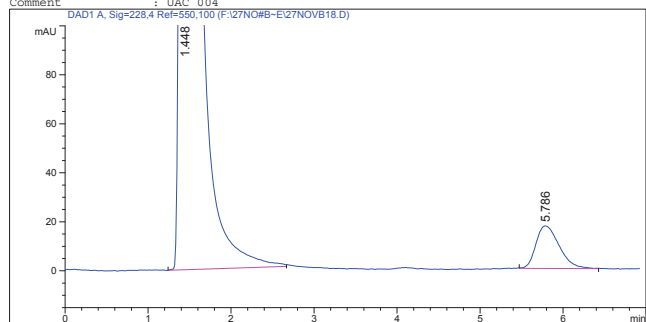
Sample Name: K2

Data File F:\27NO#B-E\27NOVB19.D

Sample Name: K3

Injection Date : 11/27/2013 9:35:09 PM Seq. Line : 18
 Sample Name : K2 Vial : 20
 Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
 Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 30 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
 Last changed : 11/27/2013 10:37:06 AM by Ricardo
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
 Last changed : 10/11/2013 11:39:57 AM

Column Description : Waters Symmetry C18
 Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
 Serial# : 02613120613806
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
 Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
 Maximum Temperature : 40 °C
 Comment : UAC 004



Area Percent Report with Performance

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
1.448	-	9175.60449	806.89178	0.42	0.1567	474	-	-
5.786	2.41	337.71710	17.33618	0.64	0.2967	2107	11.24	-

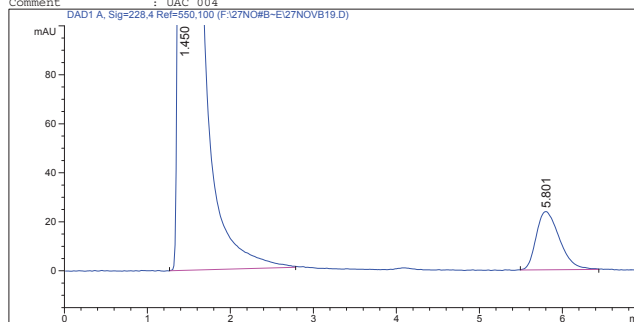
*** End of Report ***

Page 1 of 1

Instrument 1 11/28/2013 11:50:18 AM

Injection Date : 11/27/2013 9:43:08 PM Seq. Line : 19
 Sample Name : K3 Vial : 21
 Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
 Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 30 µl
 Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
 Last changed : 11/27/2013 10:37:06 AM by Ricardo
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
 Last changed : 10/11/2013 11:39:57 AM

Column Description : Waters Symmetry C18
 Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
 Serial# : 02613120613806
 Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
 Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
 Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
 Maximum Temperature : 40 °C
 Comment : UAC 004



Area Percent Report with Performance

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
 Multiplier : 1.0000
 Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
 Results obtained with enhanced integrator!

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
1.450	-	1.0563664	926.78796	0.43	0.1567	474	-	-
5.801	2.42	463.17776	23.78706	0.67	0.3000	2072	11.20	-

*** End of Report ***

Page 1 of 1

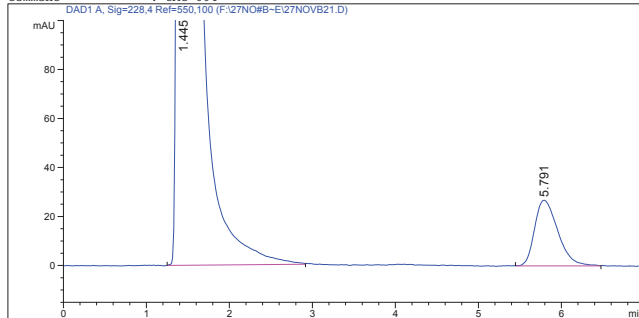
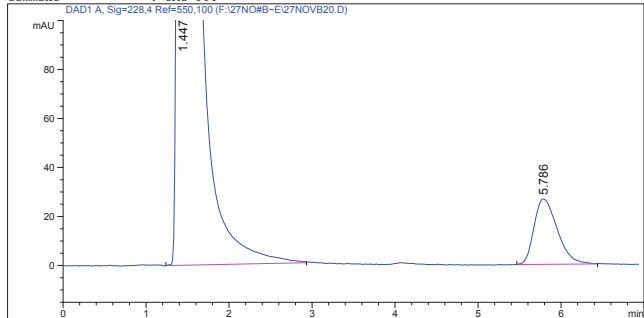
Instrument 1 11/28/2013 11:50:35 AM

Injection Date : 11/27/2013 9:51:03 PM Seq. Line : 20
Sample Name : K4 Vial : 1
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 11/27/2013 10:37:06 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 10/11/2013 11:39:57 AM

Injection Date : 11/27/2013 9:58:57 PM Seq. Line : 21
Sample Name : K5 Vial : 2
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 11/27/2013 10:37:06 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 10/11/2013 11:39:57 AM

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004



Area Percent Report with Performance

Area Percent Report with Performance

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Select, Iution ivity. Rows for peaks at 1.447 and 5.786.

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Select, Iution ivity. Rows for peaks at 1.445 and 5.791.

*** End of Report ***

*** End of Report ***

Instrument 1 11/28/2013 11:50:52 AM

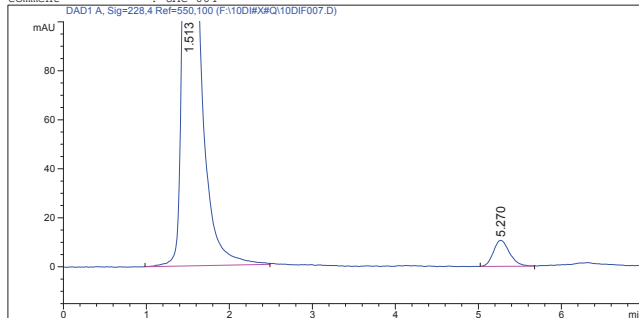
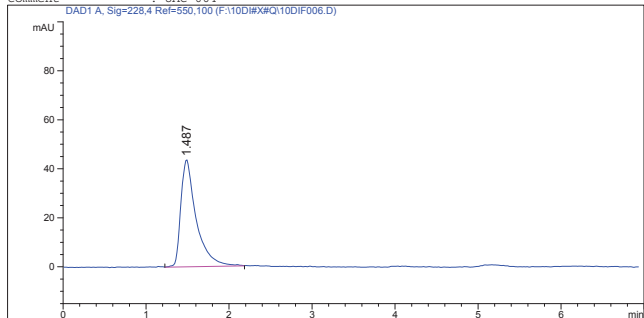
Instrument 1 11/28/2013 11:51:13 AM

Injection Date : 12/10/2013 8:16:18 PM Seq. Line : 6
Sample Name : J0 Vial : 6
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 12/10/2013 10:16:25 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 10/11/2013 11:39:57 AM

Injection Date : 12/10/2013 8:24:12 PM Seq. Line : 7
Sample Name : J1 Vial : 7
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 12/10/2013 10:16:25 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 10/11/2013 11:39:57 AM

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004



Area Percent Report with Performance

Area Percent Report with Performance

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Select, Iution ivity. Rows for peaks at 1.487 and 5.270.

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Select, Iution ivity. Rows for peaks at 1.513 and 5.270.

*** End of Report ***

*** End of Report ***

Instrument 1 12/11/2013 3:34:26 PM

Instrument 1 12/11/2013 3:34:55 PM

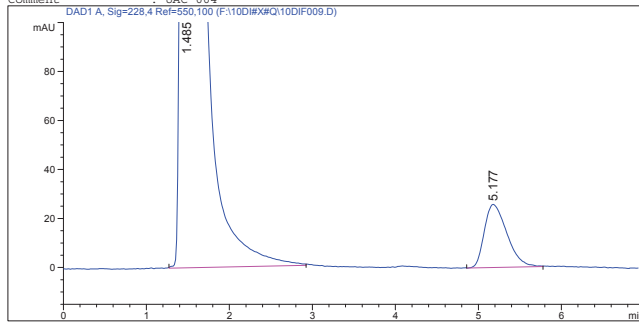
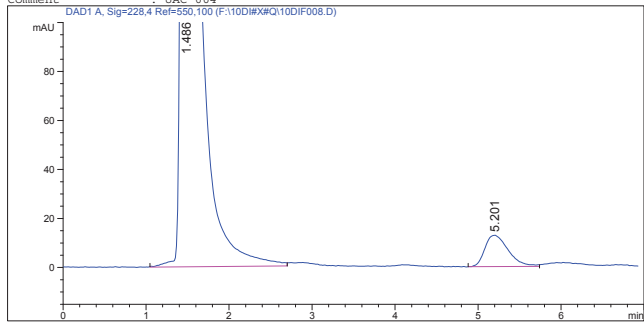
\$\$\$

Injection Date : 12/10/2013 8:32:09 PM Seq. Line : 8
Sample Name : J2 Vial : 8
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 12/10/2013 10:16:25 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 10/11/2013 11:39:57 AM

Injection Date : 12/10/2013 8:40:04 PM Seq. Line : 9
Sample Name : J3 Vial : 9
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 12/10/2013 10:16:25 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 10/11/2013 11:39:57 AM

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004



Area Percent Report with Performance

Area Percent Report with Performance

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Select, Iivity. Rows for peaks at 1.486 and 5.201.

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Select, Iivity. Rows for peaks at 1.485 and 5.177.

*** End of Report ***

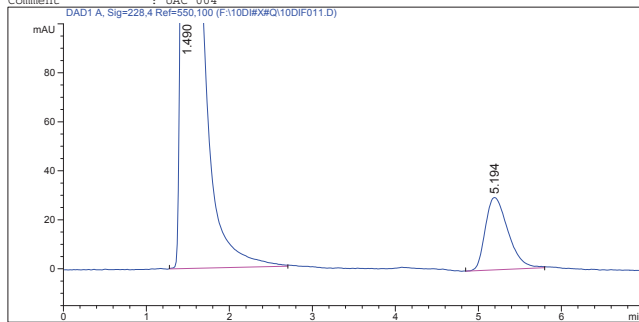
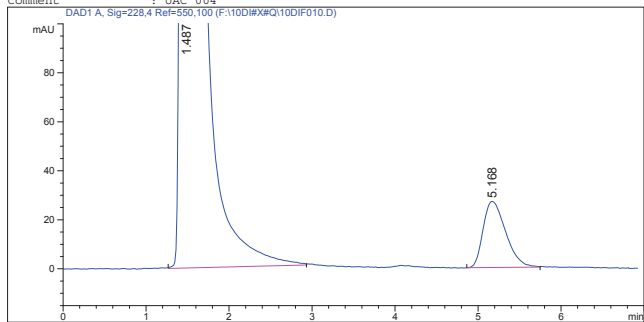
*** End of Report ***

Injection Date : 12/10/2013 8:48:00 PM Seq. Line : 10
Sample Name : J4 Vial : 10
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 12/10/2013 10:16:25 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 10/11/2013 11:39:57 AM

Injection Date : 12/10/2013 8:55:56 PM Seq. Line : 11
Sample Name : J5 Vial : 11
Acq. Operator : Ricardo Inj : 1
Acq. Instrument : Desarrollo Analitico Inj Volume : 30 µl
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIM6.M
Last changed : 12/10/2013 10:16:25 AM by Ricardo
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\RICARDO.M
Last changed : 10/11/2013 11:39:57 AM

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004

Column Description : Waters Symmetry C18
Product# : WAT045905 Batch#: 0261312061
Serial# : 02613120613806
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 68.0 %
Maximum Pressure : 400 bar Maximum pH : 8
Maximum Temperature : 40 °C
Comment : UAC 004



Area Percent Report with Performance

Area Percent Report with Performance

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Calib. Data Modified : 01/01/2000 06:23:44 a.m.
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Signal 1: DAD1 A, Sig=228,4 Ref=550,100
Results obtained with enhanced integrator!

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Select, Iivity. Rows for peaks at 1.487 and 5.168.

Table with 10 columns: RetTime [min], k', Area [mAU*s], Height [mAU], Symm., Width [min], Plates, Resol, Select, Iivity. Rows for peaks at 1.490 and 5.194.

*** End of Report ***

*** End of Report ***