



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO  
ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE  
GLIMEPIRIDA EN PLASMA DE RATA POR HPLC.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

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

**MIGUEL BENCOMO CRUZ LÓPEZ**



**México, D.F. 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dra. Inés Fuentes Noriega  
VOCAL: M. en C. Lauro Misael Del Rivero Ramírez  
SECRETARIO: M. en C. María de Lourdes Beatriz Mayet Cruz.  
1er SUPLENTE: M. en C. Luis Jesús García Aguirre.  
2do SUPLENTE: M. en C. Kenneth Rubio Carrasco.

Asesor del tema:

---

Dra. Inés Fuentes Noriega

Supervisor Técnico:

---

M. en C. Kenneth Rubio Carrasco

Sustentante:

---

Miguel Bencomo Cruz López

AGRADECIMIENTOS:

A LOS DE CASA, QUE QUIERO CON TODO MI CORAZÓN; MI MADRE, PADRE, HERMANO Y ABUELA GRACIAS POR EL APOYO INCONDICIONAL, Y EL CARIÑO DE TODOS LOS DÍAS...

A LOS QUE ESTUVIERON EN ESTOS AÑOS INCREÍBLES. GRACIAS A TODOS POR PARTICIPAR EN DIFERENTES MOMENTOS, LOS QUIERO.

## AGRADECIMIENTOS:

AGRADECEMOS EL APOYO ECONÓMICO Y LA BECA BRINDADA PARA LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO A :

PROYECTO INNOVA-SILANES-CONACYT	No. 178174
PROYECTO INNOVATEC-SILANES-CONACYT/2013,	No. 19833
PROYECTO INNOVATEC-SILANES-CONACYT/2013,	No. 198757

FACULTAD DE QUÍMICA EN PROYECTO PAIP-178174

**ÍNDICE GENERAL**

<b>ANEXOS</b>	<b>5</b>
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS</b>	<b>5</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>6</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>8</b>
<b>1. RESUMEN</b>	<b>10</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>11</b>
<b>2.1 DIABETES</b>	<b>11</b>
<b>2.2 DESARROLLO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS</b>	<b>13</b>
<b>2.3 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS</b>	<b>23</b>
<b>2.4 SULFONILUREAS</b>	<b>27</b>
<b>3. OBJETIVO</b>	<b>34</b>
<b>4. METODOLOGÍA</b>	<b>35</b>
<b>4.1 MATERIALES</b>	<b>35</b>
<b>4.2 REACTIVOS</b>	<b>35</b>
<b>4.3 EQUIPOS E INSTRUMENTOS</b>	<b>36</b>
<b>4.4 PREPARACIÓN DE REACTIVOS</b>	<b>37</b>
<b>4.5 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO</b>	<b>40</b>
<b>4.6 VALIDACIÓN DEL SISTEMA</b>	<b>43</b>
<b>4.7 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO</b>	<b>44</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>52</b>
<b>5.1 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO</b>	<b>52</b>
<b>5.2 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS</b>	<b>56</b>
<b>5.3 VALIDACIÓN DEL SISTEMA</b>	<b>56</b>
<b>5.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO</b>	<b>57</b>
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>74</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>81</b>
<b>8. REFERENCIAS</b>	<b>82</b>

**ANEXOS****ÍNDICE DE ABREVIATURAS**

ACN	Acetonitrilo.
D.E.	Desviación estándar.
FDA	Food and Drug Administration
GLM	Glimepirida.
GLB	Glibenclamida.
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta resolución).
ng	Nanogramos.
nm	Nanómetros
mg	Miligramos.
mL	Mililitros.
mm	Milímetros
mM	Milimolar
min	minutos
mAU	miliunidades de área
µg	Microgramos.
µL	Microlitros.
µm	Micrometros
T.Retención	Tiempo de retención
PGZ	Pioglitazona.
%C.V.	Porcentaje de Coeficiente de Variación.

## ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Resumen de técnicas utilizadas para cuantificación de Glimepirida.
- Tabla 2. Preparación de soluciones de trabajo y muestras control en metanol.
- Tabla 3. Preparación de curvas de calibración y puntos control de calidad en plasma de rata.
- Tabla 4. Cuadro indicativo del desarrollo del método analítico.
- Tabla 5. Criterios de aceptación para la verificación del sistema.
- Tabla 6. Criterios de aceptación para la linealidad del método.
- Tabla 7. Criterios de aceptación para la estabilidad de muestra en refrigeración por 24 h.
- Tabla 8. Criterios de aceptación para estabilidad de muestra a temperatura ambiente.
- Tabla 9. Criterios de aceptación para la estabilidad de muestra a temperatura a largo plazo.
- Tabla 10. Criterios de aceptación para la tolerancia del método.
- Tabla 11. Condiciones cromatográficas finales del método analítico.
- Tabla 12. Resultados de adecuabilidad del sistema.
- Tabla 13. Resultados de curva de calibración promedio del método.
- Tabla 14. Resultados de repetibilidad del método.
- Tabla 15. Resultados de reproducibilidad muestra baja del método.
- Tabla 16. Resultados de reproducibilidad muestra media del método.
- Tabla 17. Resultados de reproducibilidad muestra alta del método.
- Tabla 18. Resultados promedio de recobro del método
- Tabla 19. Resultados de exactitud del método.
- Tabla 20. Resultados límite de detección del método.
- Tabla 21. Resultados límite de cuantificación del método.
- Tabla 22. Resultados muestra control baja estabilidad del método a tiempo cero.
- Tabla 23. Resultados muestra control media estabilidad del método a tiempo cero.
- Tabla 24. Resultados muestra control alta estabilidad del método a tiempo cero.
- Tabla 25. Resultados muestra control baja estabilidad del método a temperatura ambiente por 24h.
- Tabla 26. Resultados muestra control media estabilidad del método a temperatura ambiente por 24h.
- Tabla 27. Resultados muestra control alta estabilidad del método a temperatura ambiente por 24h.
- Tabla 28. Resultados muestra control baja estabilidad del método a temperatura de refrigeración por 24h.

Tabla 29. Resultados muestra control media estabilidad del método a temperatura de refrigeración por 24h.

Tabla 30. Resultados punto control alto estabilidad del método a temperatura de refrigeración por 24h.

Tabla 31. Resultados muestra control baja estabilidad del método a dos ciclos de congelación.

Tabla 32. Resultados muestra control media estabilidad del método a dos ciclos de congelación.

Tabla 33. Resultados punto control alto estabilidad del método a dos ciclos de congelación.

Tabla 34. Resultados muestra control media tolerancia del método (58:42).

Tabla 35. Resultados muestra control media tolerancia del método (52:48).

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Estructura química de la glimepirida.
- Figura 2. Estructura química de la pioglitazona
- Figura 3. Esquema de preparación de muestras de plasma de rata para la extracción de Glimepirida, empleando Pioglitazona como estándar interno.
- Figura 4. Cromatograma de glimepirida (10  $\mu\text{g/mL}$ ) en metanol.
- Figura 5. Cromatograma muestra de Glimepirida y Glibenclamida en metanol.
- Figura 6. Cromatograma de Pioglitazona (3 $\mu\text{g/mL}$ ) como estándar interno en metanol.
- Figura 7. Cromatograma de Glimepirida con Pioglitazona (Concentraciones: 12 $\mu\text{g/mL}$  PGZ, 1  $\mu\text{g/mL}$  GLM) como estándar interno en plasma de rata.
- Figura 8. Cromatograma muestra Glimepirida con Pioglitazona (Concentraciones: 12  $\mu\text{g/mL}$  PGZ, 1  $\mu\text{g/mL}$  GLM), extracción éter:diclorometano (70:30).
- Figura 9. Cromatograma de muestra de plasma de Glimepirida con Pioglitazona (Concentraciones: 3 $\mu\text{g/mL}$  PGZ, 1  $\mu\text{g/mL}$  GLM), extracción con éter (100%).
- Figura 10. Cromatograma de muestra de plasma con Glimepirida y Pioglitazona (Concentraciones: 3 $\mu\text{g/mL}$  PGZ, 1  $\mu\text{g/mL}$  GLM), extracción precipitación de proteínas con ACN. Tiempo de retención PGZ: 3.6 minutos. Tiempo de retención GLM: 5.7 minutos.
- Figura 11. Cromatograma de muestra de plasma con Glimepirida y Pioglitazona (Concentraciones: 3 $\mu\text{g/mL}$  PGZ, 1  $\mu\text{g/mL}$  GLM), extracción precipitación de proteínas con ACN y  $\text{ZnSO}_4$ . Tiempo de retención PGZ: 3.6 minutos. Tiempo de retención GLM: 5.7 min.
- Figura 12. Resultados de linealidad del sistema.
- Figura 13. Cromatograma de fase móvil de prueba de selectividad. Escala: -4 a 10 mAU.
- Figura 14. Cromatograma de metanol de prueba de selectividad. Escala -60 a 140 mAU.
- Figura 15. Cromatograma de solución de Sulfato de zinc de prueba de selectividad. Escala 40-60 mAU.
- Figura 16. Cromatograma de solución de heparina de prueba de selectividad. Escala -25 a 200 mAU.
- Figura 17. Cromatograma de blanco de plasma de rata. Escala -50 a 200 mAU.
- Figura 18. Cromatograma de Plasma hemolizado de prueba de Selectividad. Escala -25 a 200 mAU.

Figura 19. Cromatograma de Blanco de plasma con estándar interno de prueba de selectividad. Escala -25 a 175 mAU.

Figura 20. Cromatograma de muestra cargada con 800 ng/mL de glimepirida con pioglitazona como estándar interno. Escala -75 a 175 mAU.

Figura 21. Resultados de la curva de calibración promedio del método.

Figura 22. Análisis de muestra de plasma de rata tomada a tiempo 6.5h en estudio piloto.

## 1. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue desarrollar y validar un método analítico que permita la cuantificación de glimepirida en plasma de rata por medio de cromatografía líquida de alta resolución bajo los lineamientos de la NOM-SSA1-177-2013 y la FDA<sup>34,35,40</sup>. Las condiciones cromatográficas establecidas fueron las siguientes: columna de fase reversa Agilent Eclipse XDB C18 (4.6x150 mm 5  $\mu$ m) y pre columna Phenomenex C18 (4.0 x 3.0 mm). Una velocidad de flujo de 1.0 mL/min, un volumen de inyección de 50  $\mu$ L y llevándose la detección a una longitud de onda de 230 nm. La fase móvil utilizada fue acetonitrilo con solución amortiguadora de acetato de amonio 20 mM ajustado a una pH de 4.5 (55:45). El método fue validado cumpliendo con los criterios establecidos. Los resultados de la validación cumplieron con los criterios de aceptación. Con esto se puede concluir que el método analítico desarrollado para cuantificar glimepirida en plasma de rata arroja resultados confiables, exactos, precisos y reproducibles en el rango de concentraciones de (800 ng/mL a 20 000 ng/mL ) con un límite de detección de 400 ng/mL. Sin embargo de acuerdo al Cmax (400-600 ng/mL) de glimepirida, reportado por algunos autores<sup>29,36</sup> el método no es lo suficiente sensible, por lo que el siguiente paso será la optimización del método, para poder ser empleado en estudios farmacocinéticos preclínicos de glimepirida en ratas.

## **2. ANTECEDENTES**

### **DIABETES**

La diabetes se está convirtiendo rápidamente en la epidemia del siglo XXI y en un reto de salud global. Estimaciones de la Organización Mundial de la Salud indican que a nivel mundial, de 1995 a la fecha casi se ha triplicado el número de personas que viven con diabetes, con cifra actual estimada en más de 347 millones de personas con diabetes. De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, China, India, Estados Unidos, Brasil, Rusia y México, son –en ese orden– los países con mayor número de diabéticos <sup>1,2</sup>.

La diabetes es una enfermedad crónica de causas múltiples. En su etapa inicial no produce síntomas y cuando se detecta tardíamente y no se trata adecuadamente ocasiona complicaciones de salud graves como infarto del corazón, ceguera, falla renal, amputación de las extremidades inferiores y muerte prematura<sup>3</sup>.

En México, la edad promedio de las personas que murieron por diabetes en 2010 fue de 66.7 años, lo que sugiere una reducción de 10 años. Algunas estimaciones indican que, por ejemplo, Estados Unidos desde 1997 destina más de 15% del gasto en salud de este país para la atención de los diabéticos.<sup>4</sup>

Las estrategias de prevención implementadas a escala poblacional en países con elevado riesgo que logren modificar estilos de vida -en particular en la dieta, actividad física y tabaquismo- pueden ser altamente costo efectivas al reducir la aparición de la diabetes y retrasar la progresión de la misma. México tiene condiciones de alto riesgo, por lo que recientemente se han impulsado políticas intersectoriales relacionadas con la salud alimentaria y con ello combatir uno de los más importantes factores de riesgo, la obesidad.<sup>9</sup>

En México, las estimaciones existentes son muy variables con cálculos de costos de atención por paciente que van desde 700 hasta 3 200 dólares

anuales, lo que se traduce en 5 a 14% del gasto en salud destinado a la atención de esta enfermedad y sus complicaciones.<sup>5</sup>

Del total de la población de adultos en México, 9.17% (IC95% 8.79%-9.54%) reportó tener un diagnóstico previo de diabetes por un médico, lo que equivale a 6.4 millones de personas. Por sexo, este porcentaje fue de 8.60% (IC95% 8.00% – 9.20%) entre los hombres y 9.67% (IC95% 9.13% - 10.22%) entre las mujeres, lo que equivale a 2.84 millones de hombres y 3.56 millones de mujeres.<sup>4</sup>

Por sexo, en el caso de los hombres las entidades con mayor proporción de individuos con diagnóstico de diabetes son el Distrito Federal (12.7%), Estado de México (11.5%), y Veracruz (10.7%), en tanto que para las mujeres, las entidades con mayor proporción de personas con diagnóstico de diabetes son Nuevo León (15.5%), Tamaulipas (12.8%), y Distrito Federal (11.9%).<sup>4</sup>

Dado que la diabetes tiene un periodo de latencia largo con una fase preclínica que puede pasar desapercibida, la posibilidad de que los pacientes sean detectados en forma tardía es alta. El tratamiento de la diabetes incluye el control de la glucemia, alcanzar objetivos terapéuticos sobre la presión arterial y los lípidos en sangre, así como acciones preventivas como el uso de antiagregantes plaquetarios, cuidado de pies, vacunación y detección oportuna de complicaciones crónicas. La implementación de estas acciones ha demostrado ser eficaz en la prevención de muerte o incapacidad prematura por diabetes.<sup>6-8</sup>

## DESARROLLO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS

### Análisis biofarmacéuticos

El bioanálisis es una disciplina de la química analítica enfocada a la medición cuantitativa de agentes Xenobióticos y Bióticos; tales como proteínas, macromoléculas, DNA, fármacos de gran peso molecular metabolitos en matrices provenientes de seres humanos, animales y vegetales.

Los agentes Xenobióticos de interés para su cuantificación se encuentran los fármacos; sus metabolitos y moléculas endógenas; mientras que los agentes Bióticos de interés se encuentran las proteínas, macromoléculas, DNA, fármacos de alto peso molecular y metabolitos.<sup>18</sup>

El bioanálisis en la industria farmacéutica se aplica principalmente en las áreas de farmacocinética, toxicocinética, bioequivalencia, correlación farmacocinética-farmacodinámica. Así como en las investigaciones forenses, antidopaje en el deporte y toxicidad ambiental, entre otras.<sup>18</sup>

El área de bioanálisis puede abarcar una gama muy amplia de ensayos que apoyan los estudios clínicos y pre clínicos. Muchos factores influyen en el desarrollo de métodos bioanalíticos para el análisis de muestras por ejemplo, las matrices biológicas de interés, el intervalo de concentraciones de los analitos deben ser medidos, número y las estructuras de los analitos, propiedades físico-químicas de los analitos, y estabilidad en las matrices biológicas desde el momento de la toma de muestra hasta su análisis.<sup>18</sup>

Los ensayos bioanalíticos permiten cuantificar con exactitud y de forma fiable estos fármacos a concentraciones más bajas. Esto ha llevado a mejoras en la tecnología y los métodos analíticos.

Algunas técnicas de separación y/o medición, comúnmente utilizadas en los estudios bioanalíticos incluyen<sup>18</sup>:

- HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución)

- GC (Cromatografía de gases)
- UPLC (Cromatografía líquida de ultra)
- LC-MS (Cromatografía líquida de espectrometría de masas)
- GC-MS (Cromatografía de gases-espectrometría de masas)
- LC-DAD (Cromatografía de líquidos con detección de arreglo de diodos)
- CE-MS (Electroforesis capilar con detección de masas)

En gran medida la estructura química de un fármaco indica cual es el mejor procedimiento para realizar un ensayo que permita conocer su cuantificación, la magnitud y frecuencia de las dosis administradas. Por otro lado, la sensibilidad y la especificidad de un ensayo permiten una buena cuantificación del compuesto en fluidos biológicos y con esto conocer la farmacocinética del fármaco.<sup>12,13</sup>

Dado que la eficacia clínica de una nuevo principio activo depende en gran medida de la biodisponibilidad, de sus formas de dosificación y la farmacocinética del fármaco en el ser humano (objetivo final de cualquier estudio de este tipo) el compromiso entre la sensibilidad del ensayo y la especificidad se puede justificar en función de la etapa del desarrollo del nuevo medicamento.<sup>13</sup>

En esta etapa la generación de información biofarmaceutica y farmacocinética relevante se basa en gran medida en el desarrollo rápido de un ensayo químico adecuado para el fármaco a probar.<sup>11</sup>

El compuesto normalmente se extrae de la de matriz biológica (sangre, plasma, suero), seguido de una limpieza de la muestra para mejorar la sensibilidad de detección y la selectividad para el análisis. La monitorización terapéutica del fármaco puede implicar la cuantificación en microgramos, nanogramos o picogramos. El grado de "limpieza" requerido depende del método analítico a utilizar, ya que puede ser por cromatografía gas-líquido (GLC), la cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y de la tolerancia específica del sistema para la detección a la contaminación.<sup>12,13</sup>

Los factores responsables de la pérdida de compuestos durante la preparación de la muestra (adsorción, estabilidad) son críticos a bajas concentraciones y pueden afectar negativamente a la fiabilidad de un ensayo. En consecuencia, la maximización de la recuperación global del analito es esencial no sólo para la sensibilidad sino también para una buena precisión y exactitud en la cuantificación del fármaco.<sup>11</sup>

### **Desarrollo de un método analítico.**

En base a las propiedades físico químicas intrínsecas del analito, como por ejemplo su valor de pKa, la solubilidad en disolventes orgánicos, las características de partición y las vías más probables de biotransformación (basada en la experiencia anterior con compuestos análogos) y a la decisión en cuanto a qué método analítico se va a utilizar (TLC, GLC, HPLC) se podrá tener un ensayo adecuadamente sensible y específico para la cuantificación del fármaco y sus probables principales metabolitos.<sup>15</sup>

El enfoque principal de la monitorización terapéutica está en el fármaco original y su perfil farmacocinético en el ser humano. La concentración del fármaco en la sangre puede ser limitante, independientemente de la dosis administrada ya que los factores biofarmacéuticos tales como la velocidad de disolución, pKa, la permeabilidad a través de la mucosa lipoidal, el estado cristalino (polimorfismo), así como en tamaño de partícula.<sup>14</sup>

Los parámetros farmacocinéticos tales como el metabolismo de primer paso, la absorción en la pared del intestino o del estómago, un alto volumen de distribución y/o rápida eliminación en la orina (conjugados) y en las heces a través de la excreción biliar pueden dar lugar a una baja concentración del fármaco en la circulación sistémica.<sup>15</sup>

No sólo los requisitos de especificidad del ensayo y la sensibilidad influyen para desarrollar un método analítico, sino también la estructura química y la

farmacocinética de un compuesto influyen en la cuantificación de un fármaco en estudios pre clínicos y clínicos.<sup>15</sup>

Los criterios que se utilizarán en la preparación de muestras y el método analítico seleccionado para la cuantificación deben tratar de optimizar todos los factores mencionados en el eventual desarrollo de un método fiable y validado para el compuesto adecuado para su uso en la monitorización terapéutica.<sup>11</sup>

### **Preparación de muestras**

El grado de preparación de la muestra requerida depende del método analítico utilizado (cromatografía de gases, cromatografía de capa fina, cromatografía líquida de alto rendimiento) y de la tolerancia del tipo específico de sistema de detección de contaminación. Los factores que conducen a pérdidas de compuestos durante la preparación de la muestra (de adsorción, la estabilidad) son críticos a bajas concentraciones y pueden afectar negativamente a la fiabilidad de un ensayo, por lo tanto, la maximización de la recuperación total del ensayo es esencial no sólo para alta sensibilidad, pero también para una buena precisión y exactitud.<sup>11</sup> Por lo tanto, los criterios que se utilizarán en la preparación de muestras deben tratar de optimizar todos los factores mencionados en el desarrollo general de un método fiable y validado para el compuesto adecuado para su uso en la monitorización terapéutica clínica.<sup>17</sup>

Debido a que las muestras biológicas son matrices muy complejas formadas por muchos componentes que pueden interferir con buenas separaciones y/o buenas señales de cuantificación, la preparación de la muestra es un aspecto importante de la estimación de bioanálisis. Esto es importante si las muestras se originan de extractos de tejido, plasma, suero u orina. Generalmente desde la perspectiva bioanalítica existen algunas ventajas de elegir suero sobre plasma excepto donde haya interferencias notorias en el ensayo en estas situaciones se requiere un tratamiento al plasma para obtener una buena cuantificación.<sup>18</sup>

La sangre es el medio de transporte de muchas sustancias vitales y nutrientes para todo el cuerpo, por lo tanto contiene muchos compuestos endógenos y exógenos en diferentes concentraciones. La determinación de fármaco en el plasma humano es a menudo complicada por bajas concentraciones (0,1 - 10 ng/mL). Un problema extra es que la sangre es una matriz biológica muy compleja donde se encuentra la muestra a analizar debido a las proteínas, por lo que puede conducir a la unión del analito con proteína y por lo tanto los volúmenes de muestra son limitados, normalmente 0,5-1 mL estarán disponible para ser utilizados en la determinación.<sup>19</sup>

La magnitud del reto de la purificación de proteínas se hace más clara cuando se considera la mezcla de macromoléculas presentes en las matrices biológicas. Por lo tanto, la preparación de muestras es crucial en el análisis de drogas que incluye tanto pre-concentración de analito y la limpieza de la muestra.<sup>19</sup>

### **Métodos analíticos para la extracción de fármacos de una matriz biológica**

El objetivo del proceso de preparación de la muestra es proporcionar una muestra adecuada, por lo general para el análisis cromatográfico, que no se contamine la instrumentación y donde la concentración en la muestra preparada es un reflejo de la que se encuentra en el original.<sup>20</sup>

El método de preparación de la muestra seleccionada está dictado generalmente por la técnica analítica disponible y las características físicas de los analitos investigados. Los dos métodos principales de preparación de muestras son la limpieza de la matriz o de inyección directa. En un procedimiento de limpieza de la matriz, el objetivo es eliminar la mayor cantidad de material endógeno como sea posible de la muestra de drogas.<sup>20</sup>

Preparación de la muestra se lleva a cabo tradicionalmente (a) por extracción líquido-líquido, (b) extracción en fase sólida o (c) por precipitación de las proteínas del plasma, mientras que el análisis final en la mayoría de los casos se lleva a cabo por cromatografía líquida de interfaz con espectrometría de

masas o espectrometría de masas o cromatografía de gases con columna capilar.<sup>18</sup>

Este método muy utilizado en los análisis bioanalíticos. Esta es una técnica muy sencilla para la extracción del analito de la matriz. Si se sospecha de una unión de proteína con el fármaco, entonces la precipitación de proteínas como método de extracción de la muestra puede ser considerado. Reactivos para realizar la precipitación pueden ser perclórico, tricloroacético y ácidos túngstico, y disolventes orgánicos tales como acetonitrilo o metanol. Con todo esto, es necesario tener en cuenta la capacidad de los analitos y los requisitos para llevar a cabo el procedimiento de extracción de la matriz biológica.

### **Precipitación de proteínas**

El requisito principal de esta técnica es que el analito debe ser libremente soluble en la reconstitución de disolvente. La preparación de la muestra a través de la precipitación de proteínas logra la separación por conversión de proteínas solubles a un estado insoluble por desplazamiento salino o mediante la adición de algún disolvente de precipitación miscible o disolventes orgánicos tales como acetona , etanol , acetonitrilo o metanol.<sup>27</sup> Los resultados de la precipitación se utilizan a menudo en la secuencia de purificación de muestras, ya que reducen el volumen y el aumentan la pureza de la proteína antes de cualquier análisis por cromatografía. Las proteínas pueden pegarse entre sí a través de una de las tres fuerzas : electrostática , hidrofóbica , y Van Waals . El último es difícil de distinguir del hidrófobo y opera en un rango muy corto. Las fuerzas electrostáticas operan a larga distancia, pero entre las moléculas son fuerzas de repulsión en vez de atracción.<sup>24, 25</sup>

Las proteínas pueden volverse insolubles mediante la alteración de sus propiedades superficiales, características de carga o cambiar las características de disolvente, el cambio de las características de disolventes siendo los preferidos. Las proteínas son menos solubles cuando su punto isoeléctrico (pI) oscila entre el 4 - 10. Se recomienda la selección de un buffer en o cerca del punto isoeléctrico de la proteína. Sin embargo, algunas proteínas pueden desnaturalizarse a su pI y por encima de su pI.<sup>27</sup>

La solubilidad de una proteína aumenta con la adición de la sal y alcanza un máximo después de lo cual hay una disminución lineal en la solubilidad rápida. Hay varios métodos para reducir la solubilidad de proteínas, que son iónica precipitación, con compuestos como sulfato de amonio, cloruro de sodio; iones metálicos, como  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+2}$ .<sup>24</sup>

En la práctica, la precipitación se realiza generalmente a baja temperatura. La condición para la proteína es que se manejen en un medio frío, por ejemplo en un baño de hielo, porque las proteínas tienden a desnaturalizarse a temperaturas más altas, aunque si el control se puede conseguir suficiente y su proteína es más estable que otras, esto puede ser selectivo y lograr una mayor purificación.<sup>24, 27</sup>

Comúnmente la muestra se centrifuga a alta velocidad durante un tiempo suficiente, todos los componentes precipitados de plasma se liquidarán en el fondo del sobrenadante. El líquido sobrenadante obtenido se puede inyectar directamente en la HPLC o puede ser evaporado y se reconstituye con la fase móvil para tener más limpia la muestra. Puede llevarse a cabo mediante el uso de micro centrifuga a muy alta velocidad para mejorar la limpieza de muestra.<sup>24</sup>

### **Extracción Líquido-líquido (LLE)**

Una de las técnicas más útiles para el aislamiento de los componentes deseados de una mezcla es la extracción líquido-líquido (LLE). LLE es un método utilizado para la separación de una mezcla utilizando dos disolventes inmiscibles. En la mayoría de LLEs, una de las fases es acuosa y el otro es un disolvente orgánico inmiscible. La capacidad para separar los compuestos en una mezcla utilizando la técnica de LLE depende cómo interactúan los componentes de la muestra a analizar entre los dos disolventes inmiscibles. La partición selectiva del compuesto de interés en una de las dos fases no miscibles o parcialmente miscibles se produce por la adecuada elección del disolvente de extracción.<sup>21, 22</sup>

En esta técnica la muestra se distribuye en dos fases, en donde una fase es inmisible a otra. LLE separa los analitos de interferencias partiendo la muestra entre dos líquidos o fases inmiscibles. En primer lugar, la mezcla de componentes se disuelve en un disolvente adecuado y se añade un segundo disolvente que es inmisible con el primer disolvente. A continuación, los contenidos se mezclan a fondo (agitación) y los dos disolventes inmiscibles permiten separar en capas las diferentes fases.<sup>23</sup>

Generalmente después de la extracción los compuestos hidrófilos se encuentran en la fase acuosa polar y compuestos hidrofóbicos se encuentran principalmente en los disolventes orgánicos. El analito que se extrae en la fase orgánica es fácilmente recuperado por evaporación del disolvente, el residuo se reconstituye con un pequeño volumen de un disolvente apropiado fase de preferencia móvil mientras analito extraído en la fase acuosa puede ser inyectado directamente en una columna RP.<sup>21,23</sup>

LLE técnica es simple, rápida es costo relativo efectiva por muestra, en comparación con otras técnicas y se puede tener un porcentaje de recuperación alto que permite ser cuantitativo (90%).<sup>22</sup>

### **Extracción en Fase Sólido (SPE)**

Los objetivos de la SPE son reducir el nivel de interferencias, minimizar el volumen de la muestra final para maximizar la sensibilidad del analito y proporcionar la fracción de analito en un disolvente que es compatible con las técnicas de medición analíticas. Como un beneficio adicional, la SPE sirve como un filtro para eliminar partículas de la muestra.<sup>25</sup>

El grado de enriquecimiento alcanzable para una muestra particular depende de:

- La selectividad de la fase unida para el analito
- La fuerza relativa de la interacción

Con la SPE se puede preparar múltiples muestras en paralelo (normalmente 12-24 muestras) y utiliza relativamente bajas cantidades de disolventes y los procedimientos se pueden automatizar con facilidad. Como su nombre indica el principio de SPE es una técnica de extracción similar a la de LLE, que implica una partición de los solutos entre dos fases. Sin embargo, en lugar de dos fases líquidas inmiscibles, como en LLE, SPE implica la partición entre un líquido (matriz de la muestra o disolvente con los analitos) y una fase sólida (absorbente).<sup>25, 26</sup>

SPE es un proceso de separación más eficiente que LLE, se obtiene fácilmente una mayor recuperación de analito mediante el empleo de una pequeña columna de plástico desechable o cartucho que comúnmente es fabricado con un material de sílice-C18. En el cual se retiene el compuesto de interés, para después con algún disolvente separarlo del cartucho y poder obtenerlo en un medio líquido para su análisis.<sup>25, 26</sup> En la Tabla 1, se resumen algunas técnicas analíticas para determinación de glimepirida previamente publicadas.

El diseño de nuevas formulaciones de medicamentos cada vez es más utilizado por la industria farmacéutica como respuesta a los problemas y a la baja eficiencia de los medicamentos y formulaciones tradicionales. Por lo tanto, estas nuevas formulaciones deben ser analizadas de igual manera que las otras, por medio de métodos analíticos que permiten la cuantificación del analito en la nueva forma farmacéutica.

Para conocer la toxicidad, farmacocinética, entre otros parámetros de las nuevas formulaciones se deben realizar los estudios en animales pertinentes y con esto conocer los nuevos valores en comparación a formulaciones tradicionales. El analito utilizado en este trabajo, glimepirida, ya ha tenido propuestas de nuevas formulaciones, por lo que optimizar un método analítico para la cuantificación de éste tiene un gran interés farmacéutico.

En ratas se han hecho estudios para conocer los parámetros farmacocinéticos en formulaciones tradicionales, como suspensiones. A continuación se

muestran algunos valores farmacocinéticos de glimepirida ya reportados: Tiempo de vida media ( $T_{1/2}$ )  $11.72 \pm 1.52$  h, Concentración máxima plasmática ( $C_{max}$ )  $251 \pm 0.76$  ng/mL, Área bajo la curva de la concentración plasmática (AUC o ABC)  $3172 \pm 1.05$  ng/mL (0-24h) y tiempo para la concentración plasmática máxima ( $T_{max}$ ) de  $3.0 \pm 0.5$  h.

Con las nuevas formulaciones se espera mejorar los parámetros farmacocinéticos del fármaco de interés a partir de sus propiedades fisicoquímicas y obtener un producto farmacéutico con altas propiedades terapéuticas.

**Tabla 1. Resumen de técnicas utilizadas para cuantificación de Glimepirida.**

Autor	Fase móvil (Proporción)	Columna cromatográfica	Rango de concentración	Matriz biológica	Detector
Milena G. et al	ACN:Agua acidificada con ácido acético glacial (pH 3.3) (45:55)	Chromolith Performance RP-18e. 100x4.6mm 2 $\mu$ m	0.001-1.0 $\mu$ g/mL	Plasma humano	UV (231nm)
Yadav KS., et al	ACN:Agua acidificada con ácido acético glacial (0.1mM, pH 2.5) (70:30)	Phenomenex, C-18 250x4.6 mm, 5 $\mu$ m	---	Plasma de rata.	UV (227nm)
Karthik et al	ACN:Buffer acetato de amonio (20mM pH 4.5) (60:40)	Inertsil ODS, C18 250x4.6 mm, 5 $\mu$ m	0.5-50 $\mu$ g/mL (GLM) 2-200 $\mu$ g/mL (PGZ)	No matriz*	UV (230nm)
T. Rajesh. et al.	Metanol:Buffer acetato de amonio (pH-3.5) (55: 45)	Phenomenex C18 150x4.6mm, 5 $\mu$ m.	25-2000 ng/mL (PGZ y GLM)	Plasma humano.	UV (245nm)
Mamdouh R. R et al	ACN:Buffer acetato de amonio (pH 5.1) (60:40)	Cosmosil ODS C18 250x4.6 mm, 5 $\mu$	100-500 $\mu$ g/ml. (GLM)	No matriz*	UV (230nm)

## VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

La validación se define como el proceso que se establece para la obtención de pruebas documentadas mediante la aplicación de estudios sistemáticos de laboratorio; estos deben ser capaces de demostrar que un método de análisis es lo suficientemente confiable y reproducible para generar el resultado previsto dentro de un intervalo definido.<sup>27,28,34,35</sup>

Un método analítico es la forma de llevar a cabo un análisis, ya que describe los pasos necesarios para realizar la prueba y tratamiento de muestras; también incluye la preparación de soluciones de muestras, referencias y reactivos. Equipos o aparatos que se utilizan y fórmulas para los cálculos de los resultados obtenidos.<sup>27,28</sup>

La validación de un método analítico es la evidencia documentada de un procedimiento analítico que permite la obtención de resultados exactos y precisos dentro de las especificaciones y atributos de calidad establecidos previamente. De esta manera se establecen las características de desempeño (exactitud, precisión, linealidad, etc) del procedimiento para que se cumplan los requisitos analíticos pretendidos.

Existen ciertos requerimientos para la validación de un método analítico, por ejemplo, se debe de tomar en cuenta la etapa de desarrollo del producto a analizar, el tipo de análisis que se va a realizar (identificación, ensayo, potencia, etc.) y por último su uso (investigación, producto terminado, liberación de producto, etc.).

Para realizar la validación también se requiere contar con un protocolo de validación aprobado, en el cual se describe el método a ser validado, especifica los parámetros que deben ser evaluados, los criterios de aceptación y los pasos a seguir en caso de que no se cumpla con los criterios de aceptación establecido en el mismo protocolo.<sup>34,35.</sup>

Por último, en el laboratorio que se va a realizar la validación del método analítico debe contar con instrumentos y equipos calificados o calibrados, dependiendo el caso, y con estándares de referencia certificados.

En el caso de métodos cromatográficos presentes en farmacopeas, con es el caso del método en este trabajo, las regulaciones señalan que es obligatorio validar el método. Los parámetros que se realizan para validar un método de esta índole son los siguientes:<sup>34,35,40</sup>

- Verificación del sistema
- Selectividad
- Linealidad del sistema
- Curva de calibración del método
- Límite de cuantificación
- Límite de detección
- Exactitud
- Precisión:
  - Repetibilidad
  - Reproducibilidad
  - Estabilidad
  - Recobro
  - Tolerancia

### **Selectividad**

Capacidad del método de medir y diferenciar al analito de interés en presencia de otros compuestos en la muestra.

### **Curva de Calibración**

Habilidad de un método de obtener resultados que sean directamente proporcionales al cambio de concentración del analito en la muestra, dentro de un intervalo determinado.

### **Exactitud**

Es la concordancia entre los resultados obtenidos del análisis y valores aceptados como verdaderos o de referencia.

### **Precisión**

Es la medida del grado de concordancia entre una serie de valores de múltiples muestreos de la misma muestra homogénea preparada bajo condiciones establecidas.

### **Repetibilidad**

Concordancia entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y métodos.

### **Reproducibilidad**

Precisión entre laboratorios, estudios colaborativos para estandarizar métodos. A la precisión expresada en diferentes laboratorios, días, equipo, analistas la llama precisión intermedia.

### **Límite de detección**

La mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser cuantificada con una apropiada precisión y exactitud.

### **Límite de cuantificación**

La más baja cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada, cuantificada con precisión, pero sin exactitud.

### **Estabilidad**

Es la característica de una muestra y/o solución de referencia, preparadas para su cuantificación, de mantener su integridad fisicoquímica y concentración del analito después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones previamente establecidas.

### **Recobro**

Es una comparación de la respuesta del extracto con la respuesta de la muestra de referencia en un disolvente puro.

### **Tolerancia**

Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método.

### **Verificación del sistema**

Verificación de que el sistema (instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia, entre otros) opera con base a criterios preestablecidos, que permitan asegurara la confiabilidad de los resultados de un método analítico.<sup>34,35,40.</sup>

## **SULFONILUREAS**

Las sulfonilureas (SU) se descubrieron accidentalmente a mediados del siglo pasado. Janbon y col. (1942) encontraron que algunas sulfonamidas producían hipoglucemia en animales de experimentación. A principios de 1950 se realizaron extensos estudios clínicos acerca de tolbutamida, primera sulfonilurea de extensa utilidad clínica, hoy en desuso debido a promover elevada mortalidad cardiovascular.<sup>33</sup>

Las sulfonilureas se dividen en dos grupos o generaciones:

1° Generación: se caracterizan por tener alta unión a proteínas plasmáticas (albúmina) lo cual aumenta el riesgo de interacciones medicamentosas, especialmente con alcohol, acetazolamida, rifampicina, propranolol, salicilatos, fenotiazidas, algunos antiinflamatorios no esteroideos, anticoagulantes orales, anticonceptivos orales, etc.

2° Generación: estos son más potentes que los del primer grupo y su interacción con otros fármacos es menor.

### **Glimepirida**

La glimepirida es un medicamento que pertenece al grupo de las sulfonilureas. Se administra por vía oral en el tratamiento de la diabetes tipo 2. Se utiliza como tratamiento complementario a la modificación dietética, cuando la dieta no ha sido eficaz por sí sola; en pacientes que son obesos se prefiere utilizar metformina. Con la finalidad de controlar la diabetes se prefiere como primera línea hacer cambios en la dieta o en los niveles de la actividad física antes de empezar con el tratamiento farmacológico.<sup>33,37,38.</sup>

Los pacientes que no responden adecuadamente a la dieta sola o pacientes que requieren de insulina (40 unidades USP o menos/día) además de la dieta, pueden ser candidatos para la terapia con sulfonilureas o en combinación con la insulina.

La glimepirida está indicada en diabetes mellitus y otros síndromes con condiciones asociadas, tal como: enfermedades endocrinas, síndromes genéticos, así como diabetes mellitus inducida por hormonas, medicamentos o productos químicos.

La combinación de insulina y las sulfonilureas en pacientes con diabetes tipo 1 es controversial, debido a que muchos estudios han demostrado que las sulfonilureas no son efectivas en el tratamiento de estos pacientes.

La administración a corto plazo de las sulfonilureas para la pérdida transitoria del control de la glucosa sanguínea puede ser suficiente para pacientes con diabetes tipo 2, cuyos niveles de glucosa en sangre son normalmente bien controlados con la dieta. La efectividad para controlar la glucosa sanguínea de las sulfonilureas puede disminuir a través del tiempo. Si la dosis máxima de la sulfonilurea falla, debe cambiarse a otra sulfonilurea o agregar al tratamiento metformina, esta puede beneficiar el control glucémico y el metabolismo de las lipoproteínas.<sup>37, 38.</sup>

La Glimepirida y la metformina pueden utilizarse concomitantemente con la dieta, el ejercicio y la glimepirida o la metformina sola no son adecuadas para controlar los niveles de glucosa en sangre. El uso combinado de la glimepirida con metformina puede incrementar el potencial de una hipoglicemia

### Propiedades Físicoquímicas de la glimepirida

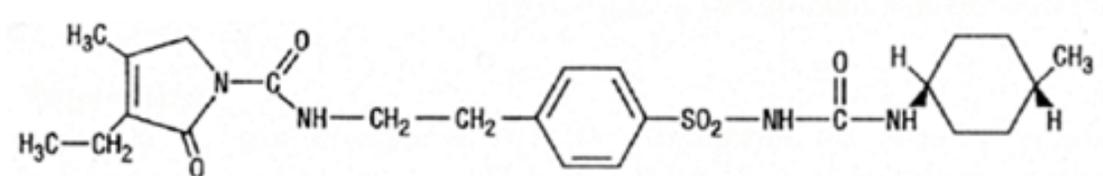


Figura 1. Estructura química de la glimepirida.

Peso Molecular: 490.62 g/mol

Nombre: Trans- 3- Etil- 2,5- dihidro- 4- metil- N- [2-[4 [[[( 4- metilciclohexil)amino] carbonilamino] sulfonil] fenil] etil]- 2- oxo- 1H- pirrol- 1- carboxamida.

Fórmula Molecular : C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S

Punto de Fusión: 207° C

pKa: 4.3

log P: 3.12

Características: Polvo cristalino blanco a blanco amarillento soluble en Metanol, acetonitrilo y cloroformo. Insoluble en agua, 0.0012 mg/mL en agua a pH de 7. Además de tener una solubilidad de 0.00087 mg/mL en una solución buffer con pH de 6.8<sup>37</sup>

Clasificación Biofarmacéutica: Clase II<sup>37</sup>

### **Farmacocinética de glimepirida**

Después de la administración oral, la glimepirida se absorbe por completo a través del tubo digestivo. La concentración plasmática máxima (Cmax) se alcanza a las 2-3 horas después de su administración.

Estudios en humanos reportan que con una dosis única de 3mg la Cmax alcanzada fue 547±218 ng/mL.<sup>37</sup> En ratas, la Cmax reportada por varios autores está en un rango de 400 ng/mL a 500 ng/mL con una dosis equivalente de 2.5mg/Kg/día.<sup>29</sup>

Los alimentos disminuyen la concentración máxima (Cmax) y el área bajo la curva de las concentraciones plasmáticas (AUC) por 8% y 9% respectivamente, e incrementa el tiempo para alcanzar la Cmax (Tmax) en un 12% en humanos sanos.<sup>33,37,38.</sup>

Se recomienda que la glimepirida se tome con el desayuno o la primera comida principal. La glimepirida se une fuertemente a las proteínas plasmáticas y es completamente metabolizado a 2 metabolitos principales, un derivado hidroxílico y otro carboxílico. La vida media ( $t_{1/2}$ ) después de dosis múltiples es de 9 horas. Aproximadamente el 60% de la dosis se elimina en la orina y un 40% en las heces.<sup>37</sup>

## Farmacodinamia de glibeprida

Las sulfonilureas disminuyen la glucosa sanguínea en pacientes con diabetes tipo 2, ya que genera una estimulación directa para liberar insulina desde las células  $\beta$  funcionales de los islotes pancreáticos por medio de un proceso desconocido que involucra a los receptores de las sulfonilureas de las células beta.<sup>37,38</sup>

Las sulfonilureas generan un efecto similar al que produce la glucosa, inhiben los canales de potasio sensibles a ATP en las membranas de las células beta por lo tanto el flujo de potasio, lo que produce una despolarización y un flujo de calcio hacia dentro de la célula, inducen la unión de calcio-calmodulina, la activación de las cinasas, y la liberación de los gránulos con insulina por medio de exocitosis.<sup>37,38</sup>

La insulina es una hormona que disminuye la glucosa sanguínea y controla el almacenamiento y metabolismo de los carbohidratos, proteínas y las grasas. Las sulfonilureas son efectivas únicamente en pacientes cuyo páncreas es capaz de producir insulina.

Con el tratamiento crónico de las sulfonilureas, la producción de insulina no se aumenta y puede regresar a los valores pre-tratamiento, pero la eficacia de la insulina continúa, esto conducido por un mecanismo extrapancreático que incrementa la sensibilidad de los tejidos blanco a la insulina, como el hígado, los músculos, así como las grasas en las otras células, como los monocitos y eritrocitos. Esto puede provocar una disminución de la glucogenólisis y gluconeogénesis hepática.

No está claro si la acción extrapancreática de las sulfonilureas que incrementan la eficacia de la insulina, es un efecto directo o indirecto, pero está claro que el mecanismo de acción no se debe a una acción directa de las sulfonilureas en los receptores de insulina.<sup>37,38</sup>

Debido a que el efecto periférico no está claro en los pacientes con diabetes tipo 1, la evidencia sugiere que este mecanismo de las sulfonilureas tampoco es una acción clínicamente significativa en pacientes con diabetes tipo 2. Sin embargo,

está claro que los tejidos de paciente con diabetes tipo 2 tratados con sulfonilureas responden mejor a menores concentraciones de insulina endógena.<sup>37,38</sup>

### **Efectos adversos de glimepirida**

El efecto adverso más común en la terapia con sulfonilureas es la hipoglucemia. Su incidencia depende del agente usado y es mayor para los de vida media más prolongada (P.e.: clorpropamida); en su forma más grave puede llegar al coma e inclusive muerte.<sup>37,38</sup>

Otras reacciones adversas son:

- Náuseas y vómitos
- Ictericia colestática
- Agranulocitosis
- Anemia aplásica y hemolítica
- Reacciones de hipersensibilidad generalizada y dermatológicas

## Tiazolidinedionas (agonistas PPRg)

Comprende a un grupo de medicamentos que actúan sobre los receptores PPRg: Troglitazona (que fue el primer agente usado y se retiró del mercado en marzo de 2000 por presentar toxicidad hepática grave); Rosiglitazona y Pioglitazona.<sup>33</sup>

En pacientes con Diabetes Tipo 2, la rosiglitazona y pioglitazona disminuyen los niveles de Hb A1C en un porcentaje que oscila entre 1- 1,5%. Se puede administrar como monoterapia o combinado con insulina u otros hipoglucemiantes orales.<sup>33,39</sup>

Este grupo de medicamentos tiende a disminuir los triglicéridos (10-20%) y a aumentar las fracciones HDL (19%) y LDL (12%) del colesterol.

### Pioglitazona

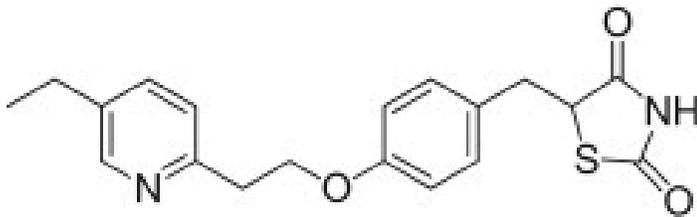


Figura 2. Estructura química de la pioglitazona

Peso molecular: 392.90 g/mol.

Nombre: [(±)-5-[[4-[2-(5-etil-2-piridinil)etoxi]fenil]metil]-2,4-] tiazolidinediona

Fórmula molecular: C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S

Punto de fusión: 193-194 °C

pKa: 6.6

Características: Polvo cristalino blanco. Soluble en metanol y etanol. Ligeramente soluble en cloroformo. Poco soluble en acetona. Prácticamente insoluble en agua y en éter.<sup>36,39</sup>

### **Farmacocinética de pioglitazona**

La rosiglitazona y pioglitazona presentan una rápida absorción por vía oral ( 2 horas), se unen a las proteínas plasmáticas en un alto porcentaje (99%), el metabolismo es hepático y sus metabolitos se excretan por orina y heces.<sup>33</sup>

Son metabolizadas por enzimas hepáticas del citocromo P 450, así la rosiglitazona es metabolizada por el CYP2C8 y la pioglitazona por el CYP3A4 y CYP2C8. El efecto terapéutico máximo se observa entre 6-12 semanas.<sup>39</sup>

### **Farmacodinamia de pioglitazona**

Los agonistas PPRg, al unirse a receptores nucleares, activan la respuesta de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa y lípidos: aumentan la expresión (síntesis y translocación) de transportadores de glucosa (Glut 4) incrementando su actividad. De esta manera, se reestablece la entrada de glucosa a la célula, se facilita el aprovechamiento intracelular de la glucosa y disminuyen los niveles de glucosa en plasma.<sup>33,39</sup>

Ejercen su principal efecto disminuyendo la resistencia a la insulina en los tejidos periféricos; pero también se ha reportado un efecto en la disminución en la producción de la glucosa por el hígado y la activación de genes que regulan el metabolismo de los ácidos grasos libres en los tejidos periféricos.<sup>39</sup>

### **Efectos adversos de pioglitazona**

Se han reportado los siguientes efectos adversos: anemia, aumento de peso, edema leve a moderado. En algunos estudios controlados, donde se evaluó la eficacia de rosiglitazona, se observó que la incidencia y tipo de eventos adversos fueron generalmente similares al placebo.<sup>39</sup>

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo General**

Desarrollar y validar un método analítico por HPLC para cuantificar Glimepirida en plasma de rata.

#### **3.1 Objetivo Particulares**

Optimizar las condiciones de determinación por HPLC para cuantificar Glimepirida en plasma de rata.

Desarrollar un método de extracción de Glimepirida en plasma de rata

Validar el método analítico en HPLC para cuantificar Glimepirida en plasma de rata.

## **4. METODOLOGÍA.**

### **4.1 Materiales**

- 4.1.1 Matraces volumétricos de 250 mL, 100 mL, 50 mL, 25 mL
- 4.1.2 Viales 1.5 mL
- 4.1.3 Probetas de 25 mL, 1000 mL
- 4.1.4 Frascos para fase móvil y/o soluciones de 500 mL y 1000mL
- 5.1.5 Nave de pesado
- 4.1.6 Vasos de precipitado 50 mL, 250 mL
- 4.1.7 Matraces Erlenmeyer 250 mL
- 4.1.8 Espátulas de acero
- 4.1.9 Pipetas Pasteur
- 4.1.10 Micropipeta BRAND 100-1000 µL
- 4.1.11 Micropipeta Science MED 1000-5000 µL
- 4.1.12 Guantes

### **4.2 Reactivos**

- 4.2.1 Agua grado HPLC. Milli-Q
- 4.2.2 Ácido acético glacial grado analítico. J.T. Baker
- 4.2.3 Metanol grado HPLC. Tecsiquim
- 4.2.4 Acetonitrilo grado HPLC. TECNOLAB
- 4.2.5 Acetato de amonio. Cristales J.T. Baker
- 4.2.6 Estándar de Glimpirida
  - Sustancia de Referencia Secundaria (Clave: 400101-0913-0914)
  - Lote: 1305007883
  - Pureza: 99.9% BH
  - Caducidad: Septiembre 2014.
  - Laboratorio Silanes S.A. de C.V.
- 4.2.7 Estándar de Pioglitazona
  - Sustancia de Referencia Secundaria (Clave: 800362-06-10-0614)
  - Lote: 16020011
  - Pureza: 98.3% BH
  - Caducidad: Junio 2014.
  - Laboratorio Silanes S.A. de C.V.

4.2.8 Anticoagulante: Heparina sódica

4.2.9 Plasma de rata Windstar

Peso promedio: 260 g

### **4.3 Equipos e instrumentos**

4.3.1 Balanza analítica Sartorius A9

Modelo: A210P

4.3.2 Sistema HPLC Agilent 1100

4.3.2.1 Detector

Modelo: G1315B

4.3.2.2 Termostato

Modelo: G1316A

4.3.2.3 Desgasificador

Modelo: G1322A

4.3.2.4 Bomba

Modelo: G1311A

4.3.2.5 Sistema inyección

Modelo: G1313A

4.3.3 Baño de ultrasonido BRANSON

Modelo: 3510R-MTH

4.3.4 Agitador horizontal Heidolph

Modelo: Multi reax

4.3.5 Centrifuga EPPENDORF con control de temperatura (T=24°C)

Modelo: Centrifuge 5416

4.3.4 Agitador tipo Vortex Genie II

Modelo: G560

## 4.4 Preparación de Reactivos

### 4.4.1 Fase móvil Acetonitrilo:Solución amortiguadora de acetato de amonio 20mM pH=4.5 (55:45)

#### 4.4.1.1 Acetonitrilo (ACN)

- Colocar 1000 mL de ACN grado HPLC en un frasco contenedor para fase móvil.
- Filtrar el ACN grado HPLC al vacío por una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm.
- Colocar el ACN grado HPLC filtrado en baño de ultrasonido por 25 minutos.

#### 4.4.1.2 Solución amortiguadora de acetato de amonio 20mM pH=4.5

- Pesar 1.54 g de acetato de amonio
- Disolver la cantidad pesada en 800 mL de agua desionizada.
- Ajustar el pH a 4.5 con ácido acético (1:9).
- Llevar la solución a aforo de 1000 mL con agua desionizada
- Filtrar la solución al vacío por una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm.
- Colocar la solución filtrada en baño de ultrasonido por 25 minutos.

### 4.4.2 Solución stock Glimepirida (GLM) 1000 µg/mL

- Pesar con exactitud el equivalente a 0.0100 g de estándar de GLM.
- Transferir cuantitativamente a un matraz de 10 mL.
- Agregar aproximadamente 5 mL de metanol.
- Agitar la solución en el agitador tipo Vortex por 5 minutos.
- Colocar en el baño de ultrasonido la solución por 5 minutos.
- Llevar al aforo la solución con metanol y mezclar completamente.

#### 4.4.3 Solución stock Glimpirida (GLM) 100 µg/mL

- Tomar una alícuota de 10 µL de la solución estándar de GLM 1000 µg/mL.
- Transferir cuantitativamente a un matraz de 10 mL.
- Llevar al aforo la solución con metanol y mezclar.

#### 4.4.4 Solución stock Pioglitazona (PTZ) 1000 µg /mL

- Pesar con exactitud el equivalente a 0.0100 g de estándar de PTZ
- Transferir cuantitativamente a un matraz de 10 mL.
- Agregar aproximadamente 5 mL de metanol
- Agitar la solución en el agitador tipo Vortex por 5 minutos
- Llevar al aforo la solución con metanol y mezclar completamente

#### 4.4.5 Solución stock Pioglitazona (PTZ) 60 µg/mL

- Tomar una alícuota de 600 µL de la solución estándar de PTZ 1000 µg/mL.
- Transferir cuantitativamente a un matraz de 10 mL.
- Llevar al aforo la solución con metanol y mezclar completamente.

4.4.6 Preparación de soluciones iniciales de trabajo y muestras control en metanol (Ver Tabla 2).

#### 4.4.7 Solución para Verificación del Sistema 4000 ng/mL

- Tomar una alícuota de 2000 µL de la solución stock de GLM 100 µg/mL.
- Transferir cuantitativamente a un matraz de 5 mL.
- Llevar al aforo la solución con metanol y mezclar completamente.

4.4.8 Preparación de curva de calibración y muestras control en plasma. A partir de las soluciones preparadas en metanol como se indica en la Tabla 2. Se prepararon curvas de calibración y muestras control de calidad en plasma bajo el esquema descrito en la Tabla 3.

Tabla 2. Preparación de soluciones de trabajo y muestras control en metanol.

Stock GLM 1000 µg/mL (µL)	Stock GLM 100 µg/mL (µL)	Aforo con metanol (mL)	Conc. stock (µg/mL)
-	400	5.0	8
-	800	5.0	16
-	1200	5.0	24
-	1600	5.0	32
-	2000	5.0	40
360	-	5.0	72
400	-	5.0	80
800	-	5.0	160
1200	-	5.0	240
1600	-	5.0	320
2000	-	5.0	400

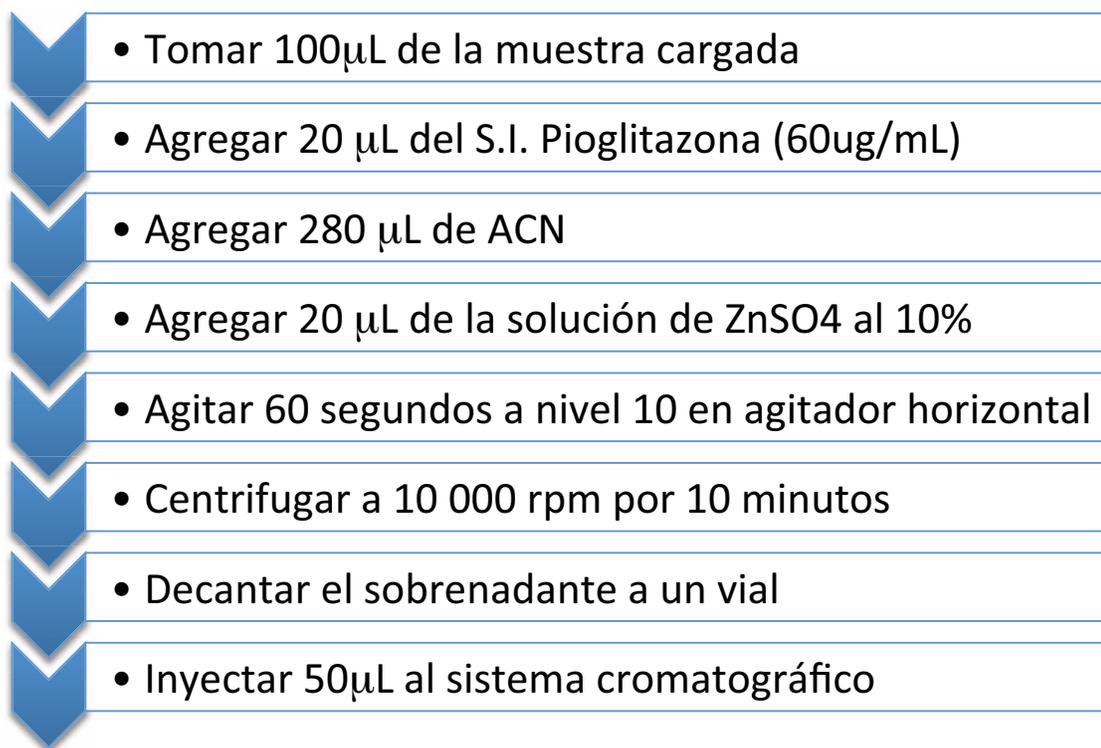
Tabla 3. Preparación de curvas de calibración y puntos control de calidad en plasma de rata.

Conc. stock (µg/mL)	Alícuota (µL)	Aforo con plasma a (mL)	Conc final (ng/mL)
8	50	1.0	400 <sup>a</sup>
16	50	1.0	800 <sup>b</sup>
24	50	1.0	1 200*
32	50	1.0	1 600
40	50	1.0	2 000
72	50	1.0	3 600*
80	50	1.0	4 000
160	50	1.0	8 000
240	50	1.0	12 000*
320	50	1.0	16 000
400	50	1.0	20 000

\*Muestras control Bajo, Medio y Alto. <sup>a</sup>Límite de detección: 400 ng/mL, <sup>b</sup>Límite de cuantificación: 800ng/mL

#### 4.4.9 Método de extracción por precipitación de proteínas

En la Figura 3. Se esquematice el Procedimiento de extracción de glimepirida en plasma de rata por la técnica de precipitación de proteínas.



**Figura 3. Esquema de preparación de muestras de plasma de rata para la extracción de glimepirida, empleando pioglitazona como estándar interno.**

#### 4.5 Desarrollo del Método Analítico

Para desarrollar el método analítico se buscaron condiciones cromatográficas y condiciones de extracción del analito de interés. La primera etapa del desarrollo del método fue encontrar las condiciones cromatográficas necesarias para cuantificar a la glimepirida en plasma de rata (método) y en metanol (sistema). Para esto se partió de un par de métodos previamente publicados por otros autores.<sup>28,29</sup> Ambos métodos utilizan HPLC y una detección por UV. La fase móvil que utilizan son similares tanto en reactivos como en proporción, al igual que las columnas cromatográficas utilizadas.

De estos dos trabajos se obtienen condiciones iniciales, las cuales fueron probadas, sin embargo no dieron muy buenos resultados, tales como en resolución entre picos, problemas de selectividad, por lo que se procedió a realizar cambios en las condiciones cromatográficas con el fin de optimizarlas y poder tener una adecuada cuantificación de la glimepirida.

Debido a que en el trabajo publicado de Milena G, et al.,<sup>28</sup> trabajaron con glibenclamida como estándar interno se decidió probarlo no obstante no obtuvimos buenos resultados y era problemática para la cuantificación del analito de interés, por lo que se buscaron otras opciones encontrándose que la pioglitazona también había sido empleada como estándar interno en otros estudios anteriormente publicados<sup>30</sup> y se procedió a probarla, obteniendo resultados óptimos, por lo que se estableció como estándar interno. Una vez que se concretó la primera etapa del desarrollo del método se continuó con la segunda parte, la cual fue la extracción de glimepirida de la matriz biológica.

Para esta etapa se partió de condiciones reportadas por Milena y colaboradores, los cuales utilizan la extracción líquido-líquido como método de extracción con diferentes disolventes. Para este trabajo se probaron las opciones que mencionan los artículos consultados, sin embargo por las características de los equipos que se tienen en el laboratorio la cuantificación de la glimepirida y del estándar interno se veía comprometido, por lo que se trabajó con un segundo método de extracción que fue la precipitación de proteínas.

Este método resultó ser más sencillo y con menor tiempo para la preparación de muestra, sin embargo se tuvieron que probar diferentes agentes precipitantes para lograr la una buena precipitación y cuantificación. Después de la búsqueda se logró obtener una buena cuantificación y un buen recobro de glimepirida y del estándar interno empleando el sulfato de zinc como agente precipitante, y estableciéndose la condiciones de extracción (ver Figura 3) se procedió a la validación del método.

Autores revisados en este trabajo<sup>28, 29</sup>, reportan en sus estudios con Glimepirida y Pioglitazona rangos de concentraciones que van de los 20 ng/mL hasta una máxima concentración de 5000 ng/mL. En la mayoría teniendo un límite de

cuantificación entre 100-200 ng/mL. Al establecer el intervalo de concentraciones lo menos que pudimos observar fueron 400 ng/mL, por lo que el intervalo se definió de 400 a 20 000 ng/mL, no obstante al seguir con el desarrollo el rango final quedó de 800 a 20000 ng/mL.

La siguiente Tabla 4., muestra las condiciones cromatográficas iniciales que se utilizaron para la cuantificación de Glimepirida y su estándar interno. Se obtuvieron condiciones cromatográficas modificadas, las cuales se muestran en la tercera columna, sin embargo, estas condiciones fueron cambiadas nuevamente después de conocer las condiciones de extracción para tener una excelente resolución, cuantificación y tiempos de retención en las respuestas de ambos analitos.

**Tabla 4. Cuadro indicativo del desarrollo del método analítico.**

<b>Parámetros</b>	<b>Condiciones iniciales</b>	<b>Condiciones modificadas</b>
Fase móvil	ACN:Agua acidificada pH=3.3 con ácido acético glacial	ACN:Buffer acetato de amonio 20mM pH=4.5
Proporción fase móvil	70:30 45:55	50:50 55:45
Columna	Agilent Eclipse Plus C18 3.0x100 mm 3.5 µm	Agilent Zorbax C18 4.6x150 mm 3.5 µm Agilent Eclipse XDB C18 4.6x150 mm, 5 µm
Precolumna	Eclipse XDB C18 4.6x12.5mm, 5µm	Phenomenex C18 4.0x3.0mm, 5 µm
Velocidad de flujo	1.5mL/min	1.0mL/min 0.5mL/min
Volumen de inyección	20 µL	30 µL 50 µL 100 µL

## 4.6 Validación del Sistema

### 4.6.1 Verificación del sistema

4.6.1.1 Se debe preparar una solución con una concentración de 4000 ng/mL (ésta es la concentración media en las curvas de calibración). Dicha muestra se inyecta por lo menos seis veces, consecutivamente, antes de cada corrida de una curva de calibración.

4.6.1.2 Criterio de aceptación:

**Tabla 5. Criterios de aceptación para la verificación del sistema.**

Parámetro	Criterio
Repetibilidad de relación de áreas	C.V. $\leq$ 2.0 %
Repetibilidad (Tiempo de retención)	C.V. $\leq$ 2.0 %

### 4.6.2 Linealidad del sistema

4.6.2.1 Se deben preparar dos curvas de calibración siguiendo las alícuotas y aforos establecidos en la tabla 2 y tabla 3 utilizando metanol. Correr las dos curvas el mismo día en el HPLC y obtener cromatogramas.

Tabular y graficar los datos de respuesta obtenidos contra la concentración utilizada. Determinar por regresión, para cada curva, la relación entre la concentración y la respuesta, verificando su reproducibilidad y que sea continua a lo largo del trabajo.

4.6.2.2 Criterio de aceptación: El coeficiente de determinación de las dos curvas y de la curva de calibración promedio debe ser mayor o igual a 0.98

## 4.7 Validación del Método Analítico

### 4.7.1 Selectividad del método

4.7.1.1 Se debe preparar una muestra control de 400 ng/mL, un blanco de plasma y un blanco de plasma con estándar interno.

Colocar en un vial 500 µL de Fase Móvil, en el siguiente 500 µL de metanol grado HPLC 100%, en otro vial 500 µL de ACN grado HPLC 100%, en otro 500 µL plasma de rata, en el siguiente 500 µL plasma de rata hemolizado, en otro 500 µL ZnSO<sub>4</sub> y por último en otro 500 µL de heparina sodio.

Las muestras se inyectan y se observa en las respuestas obtenidas, si hay o no hay interferencia en el tiempo de retención de la glimepirida y de la pioglitazona.

4.7.1.2 Criterio de aceptación: no debe presentarse interferencia en el mismo tiempo de retención de los analitos de interés. Si hay alguna señal, debe ser menor a 20% de la respuesta de la concentración más baja de la curva, y del 5% en la respuesta del SI.

### 4.7.2 Curva de calibración

4.7.2.1 Se deben preparar tres curvas de calibración siguiendo las alícuotas y aforos establecidos en la tabla 1 y tabla 2 utilizando plasma. Correr las dos curvas el mismo día en el HPLC y obtener cromatogramas.

Cada curva de calibración debe incluir una muestra de blanco de matriz (muestra procesada sin la adición del analito y del EI) y muestra cero (muestra procesada con la adición del EI).

Deben ser evaluadas un mínimo de 3 curvas de calibración e incluir los resultados de la concentración recuperada y el por ciento de desviación.

Los datos de concentración recuperada de la curva de calibración deben estar dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, excepto para el límite inferior de cuantificación, ya que puede ser menor o igual que el 20%. Al menos el 75% de las concentraciones de la curva de calibración con un mínimo de 6 puntos deben cumplir con este criterio. Cuando un punto de la curva de calibración no cumpla con el criterio de aceptación, debe ser rechazado y la curva de calibración debe ser recalculada sin modificar el modelo matemático.

Del total de las curvas evaluadas, al menos el 50% de cada nivel de concentración debe cumplir con el criterio del 15% de la concentración nominal y 20% para el límite inferior de cuantificación.

#### 4.7.2.2 Criterio de aceptación. Ver Tabla 6

**Tabla 6. Criterios de aceptación para la linealidad del método.**

<b>Parámetro</b>	<b>Criterio</b>
Coeficiente de determinación. Cada curva	$r^2 \geq 0.98$
Desviación estándar (DE) Cada nivel de concentración Nivel más bajo de concentración	DE $\leq$ 20 % DE $\leq$ 15 %

#### 4.7.3 Límite de detección

4.7.3.1 Para determinar este parámetro preparar la concentración de (400 ng/mL) en plasma por quintuplicado. Analizar, extrapolando en una curva de calibración preparada el mismo día de análisis.

Preparar una curva de calibración siguiendo las alícuotas y aforos.

4.7.3.2 Criterio de aceptación: Los resultados de las cinco muestras analizadas deben cumplir con un coeficiente de variación menor a 15%. Su desviación estándar de todos los puntos es mayor a 20%, no cumple con el parámetro de exactitud.

#### 4.7.4 Límite de cuantificación

4.7.4.1 Preparar la concentración de (800 ng/mL) en plasma por quintuplicado. Analizar, extrapolando en una curva de calibración preparada el mismo día de análisis.

4.7.4.2 Criterio de aceptación: Los resultados de las cinco muestras analizadas deben cumplir con un coeficiente de variación menor a 15%. Su desviación estándar de todos los puntos es menor a 20%. Con esto cumple con el parámetro de exactitud y precisión.

#### 4.7.5 Recuperación absoluta (Recobro)

4.7.5.1 Preparar tres puntos de control (bajo, medio y alto) por triplicado en plasma y metanol. Analizar, extrapolando en una curva de calibración preparada el mismo día de análisis.

Calcular el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de la respuesta obtenida para cada concentración.

4.7.5.2 Determinar el parámetro con la siguiente fórmula:

$$\% \text{Recobro absoluto} = \frac{\text{Respuesta del analito en plasma}}{\text{Respuesta del analito en solución}} \times 100$$

4.7.5.3 Criterio de aceptación: la diferencia de recobro entre los tres niveles de concentración, no debe ser mayor a 15%. Recobro no necesariamente tiene que ser de un 100%, pero sí preciso en cada nivel de concentración.

#### 4.7.6 Precisión

Este parámetro está relacionado con la dispersión de las medidas alrededor de un valor. Corresponde al valor de concordancia entre diferentes ensayos.

La precisión se evalúa con la repetibilidad y la reproducibilidad.

##### 4.7.6.1 Repetibilidad

4.7.6.1.1 Preparar en un mismo día, una curva de calibración y tres muestras control (bajo, medio, alto) por quintuplicado. Analizar todas las muestras en una misma corrida analítica.

Calcular la concentración recuperada en cada nivel de concentración, interpolando los datos obtenidos de las muestras control de la curva.

Calcular el promedio, desviación estándar y el coeficiente de variación en cada una de las concentraciones analizadas.

4.7.6.1.2 Criterio de aceptación: método es repetible si el coeficiente de variación para cada una de las tres concentraciones no es mayor a 15%, excepto el límite inferior que puede ser de 20%.

#### 4.7.6.2 Reproducibilidad

4.7.6.2.1 Preparar en un dos días diferentes, curva de calibración y tres muestras control (bajo, medio, alto) por triplicado. Analizar las muestras cada día de preparación.

Calcular la concentración recuperada y tabular la información obtenida para cada uno de las muestras de control.

Determinar el promedio, desviación estándar absoluta y el coeficiente de variación para cada concentración analizada.

4.7.6.2.2 Criterio de aceptación: método es reproducible si el coeficiente de variación para cada concentración no es mayor que 15%.

#### 4.7.7 Exactitud

4.7.7.1 De los datos de repetibilidad y reproducibilidad calcular la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal (% de desviación) empleando la siguiente ecuación.

$$\% \text{Desviación} = \frac{\text{valor nominal} - \text{valor calculado}}{\text{valor nominal}} \times 100$$

4.7.7.3 Criterio de aceptación: método es exacto si la desviación para cada concentración no es mayor que 15%, excepto el límite inferior que puede ser de 20%.<sup>40</sup>

#### 4.7.8 Estabilidad

4.7.8.1 Estabilidad de muestras procesadas en refrigeración por 24 horas

4.7.8.1.1 Preparar muestras control por triplicado, se toma un volumen determinado para hacer un primer análisis, el cual será el tiempo cero ( $t_0$ ) otra serie se preparan hasta antes de la reconstitución y se almacenan en refrigeración y se analizan al término de 24 h.

Preparar puntos control por triplicado y curva patrón cada día de análisis.

Calcular la concentración de recuperada, interpolando los valores en la curva de calibración y compararlos con los datos obtenidos a  $t=0$

4.7.8.1.2 Criterio de aceptación, Ver Tabla 7.

**Tabla 7. Criterios de aceptación para la estabilidad de muestra en refrigeración por 24 h.**

Parámetro	Criterio
Precisión	C.V. < 15 %
Exactitud	DA < 15 %

4.7.8.2 Estabilidad de la muestra procesada sin reconstituir, a temperatura ambiente por 24 h.

4.7.8.2.1 Preparar muestras control por triplicado, se toma un volumen determinado para hacer un primer análisis, el cual será el tiempo cero ( $t_0$ ) otra serie se preparan hasta antes de la reconstitución y se almacenan a temperatura ambiente y se analizan al término de 24 h.

Preparar muestras control por triplicado y curva patrón cada día de análisis.

Calcular la concentración de recuperada, interpolando los valores en la curva de calibración y compararlos con los datos obtenidos a  $t=0$

Calcular la concentración de recuperada, interpolando los valores en la curva de calibración y calcular la %DE y comparar con los datos obtenidos a  $t=0$ .

4.7.8.2.2 Criterio de aceptación, Ver Tabla 8.

**Tabla 8. Criterios de aceptación para estabilidad de muestra a temperatura ambiente.**

<b>Parámetro</b>	<b>Criterio</b>
Precisión	C.V. < 15 %
Exactitud	DA < 15 %

4.7.8.3 Estabilidad de la muestra a largo plazo

4.7.8.3.1 Preparar muestras control por quintuplicado, se toma un volumen determinado para hacer un primer análisis, el cual será el tiempo cero ( $t_0$ ) otra serie se preparan hasta antes de la reconstitución y se almacenan y se almacenan a temperatura de congelación ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) por 7 días.

A los 7 días se descongelan y vuelven a congelarse a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

A los 14 días se descongelan y vuelven a congelarse a  $-20^{\circ}\text{C}$  y a los 21 días se descongelan, se preparan muestras control por triplicado y curva patrón fresca y se analizan.

Calcular la concentración de recuperada, interpolando los valores en la curva de calibración y compararlos con los datos obtenidos a  $t=0$

Calcular la concentración de recuperada, interpolando los valores en la curva de calibración y calcular la %DE y compararla con los datos obtenidos a  $t=0$ .

## 4.7.8.3.2 Criterio de aceptación: Ver Tabla 9.

**Tabla 9. Criterios de aceptación para la estabilidad de muestra a temperatura a largo plazo.**

<b>Parámetro</b>	<b>Criterio</b>
Precisión	C.V. < 15 %
Exactitud	DEA < 15 %

## 4.7.9 Tolerancia

## 4.7.9.1 Preparar la muestra control medio por triplicado.

Se debe modificar la composición de la fase móvil en un 5%, es decir,  
 a) 60% ACN y 40% Solución amortiguadora de acetatos. Y después  
 b) 50% ACN y 50% de Solución amortiguadora de acetatos.

Analizar las muestras y una curva de calibración recién preparada bajo la condición a) y de nuevo volver a inyectarlas bajo la condición b). Las dos curvas se analizan el mismo día en el HPLC.

## 4.7.9.2 Criterio de aceptación: Ver Tabla 10

**Tabla 10. Criterios de aceptación para la tolerancia del método.**

<b>Parámetro</b>	<b>Criterio</b>
Precisión	C.V. < 15 %
Exactitud	DA < 15 %

## 5. RESULTADOS

### 5.1 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO.

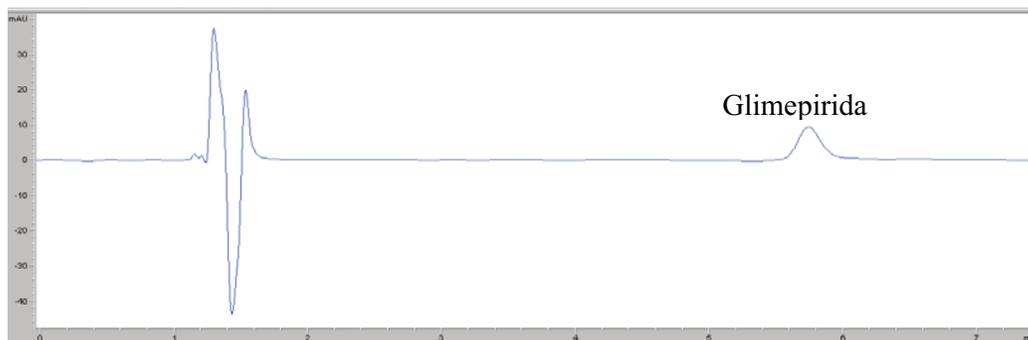


Figura 4. Cromatograma de glimepirida (10  $\mu\text{g/mL}$ ) en metanol.

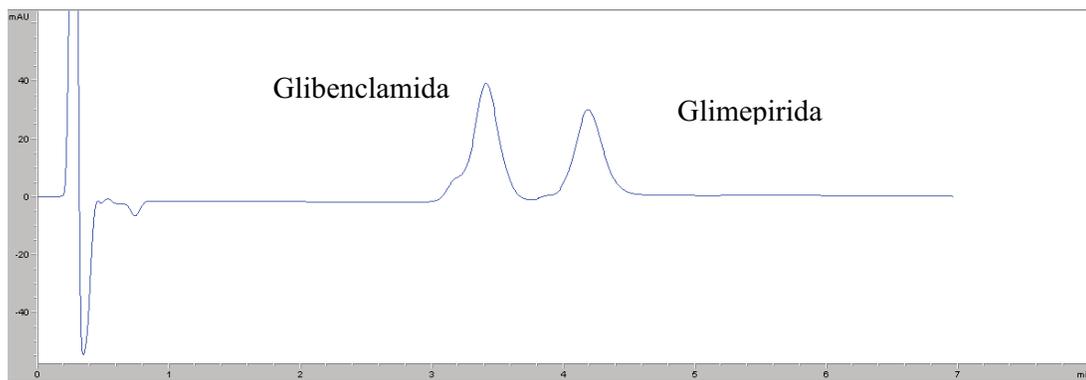
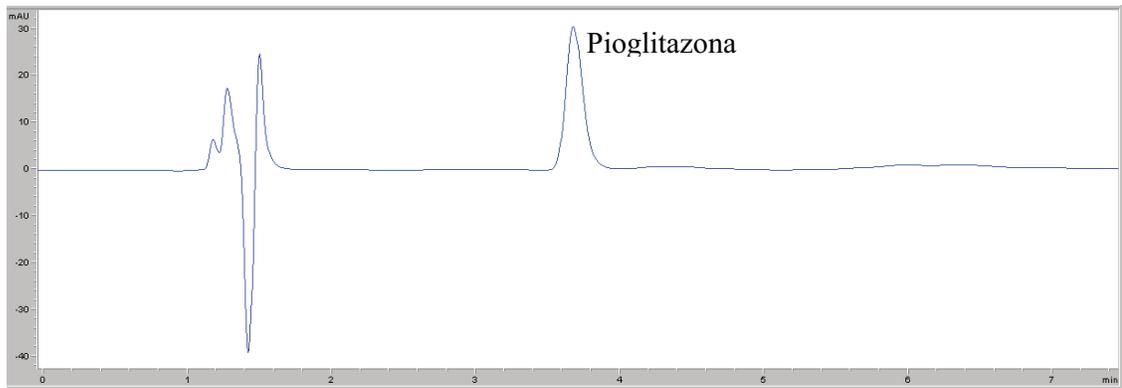
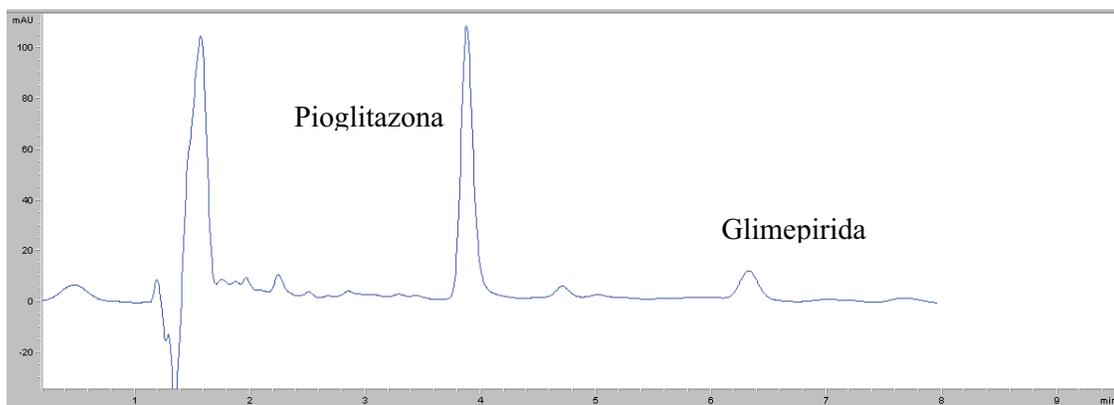


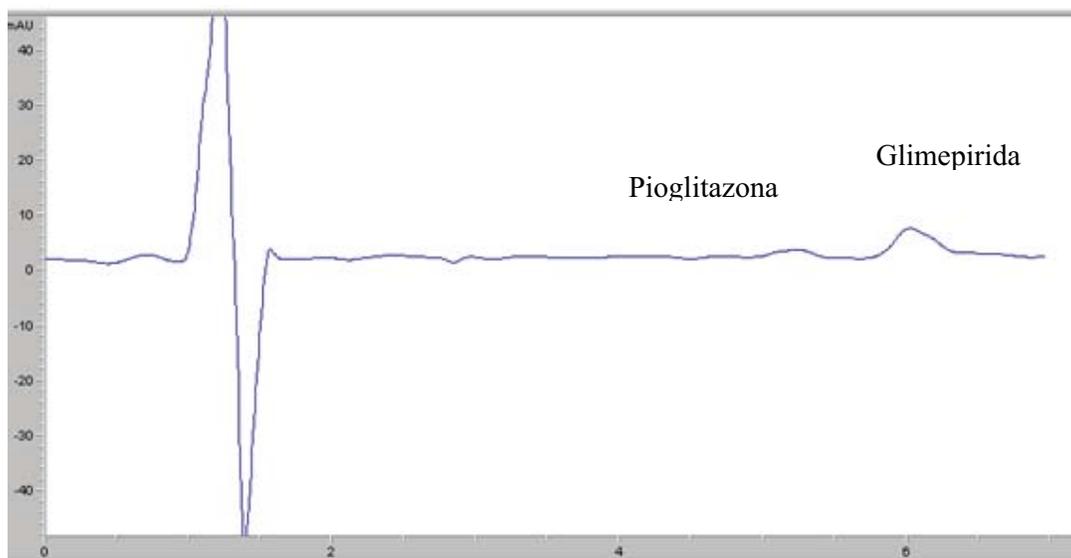
Figura 5. Cromatograma muestra de Glimepirida y Glibenclamida en metanol.



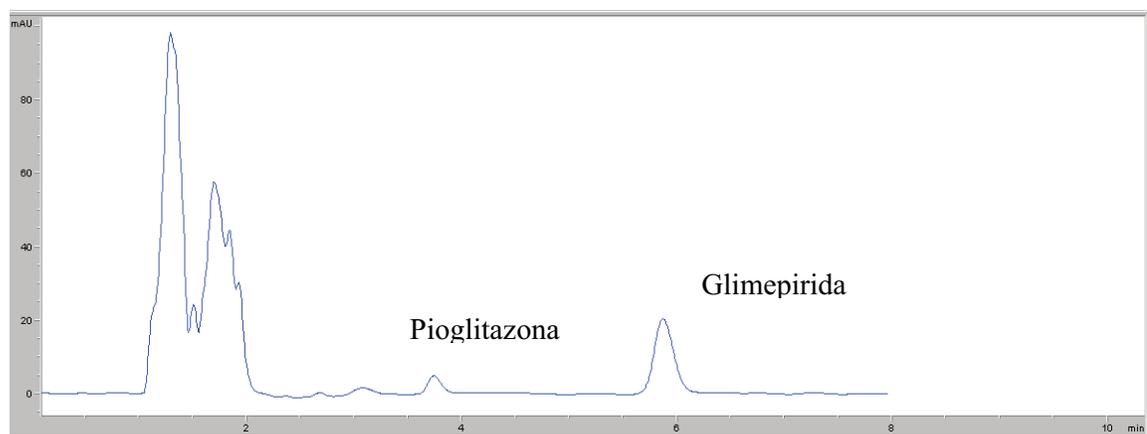
**Figura 6. Cromatograma de pioglitazona (3µg/mL) como estándar interno en metanol.**



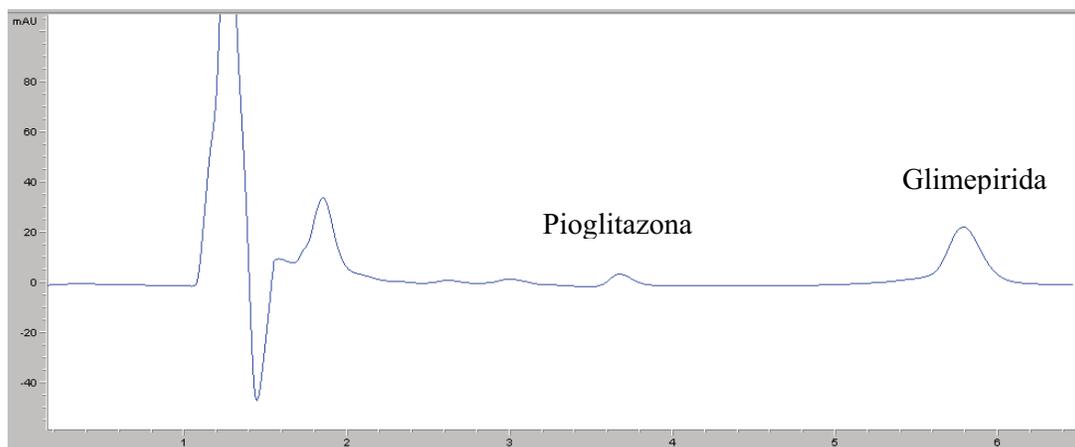
**Figura 7. Cromatograma de Glimepirida con Pioglitazona (Concentraciones: 12µg/mL PGZ, 1 µg/mL GLM) como estándar interno en plasma de rata.**



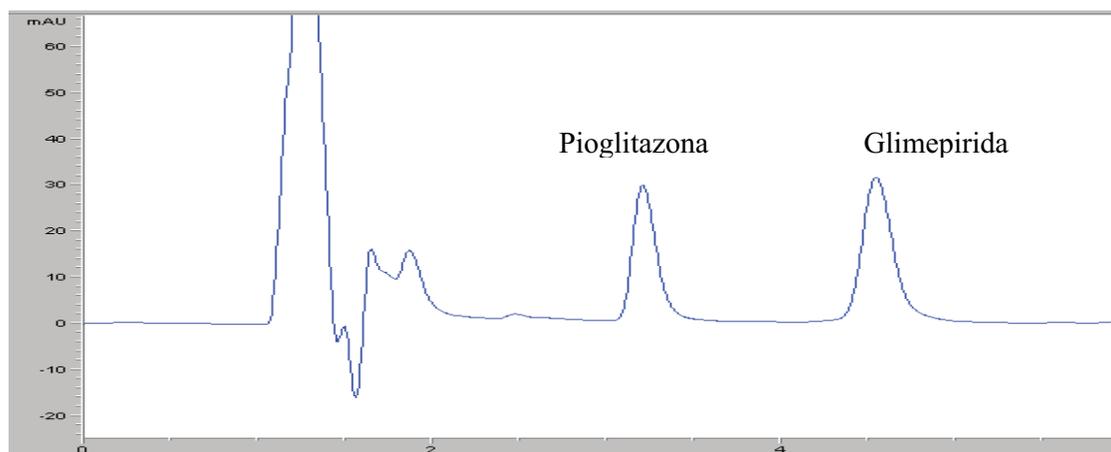
**Figura 8. Cromatograma muestra Glimepirida con Pioglitazona (Concentraciones: 12  $\mu\text{g/mL}$  PGZ, 1  $\mu\text{g/mL}$  GLM), extracción éter:diclorometano (70:30).**



**Figura 9. Cromatograma de muestra de plasma de Glimepirida con Pioglitazona (Concentraciones: 3 $\mu\text{g/mL}$  PGZ, 1  $\mu\text{g/mL}$  GLM), extracción con éter (100%).**



**Figura 10. Cromatograma de muestra de plasma con Glimepirida y Pioglitazona (Concentraciones:  $3\mu\text{g/mL}$  PGZ,  $1\mu\text{g/mL}$  GLM), extracción precipitación de proteínas con ACN. Tiempo de retención PGZ: 3.6 minutos. Tiempo de retención GLM: 5.7 minutos.**



**Figura 11. Cromatograma de muestra de plasma con Glimepirida y Pioglitazona (Concentraciones:  $3\mu\text{g/mL}$  PGZ,  $1\mu\text{g/mL}$  GLM), extracción precipitación de proteínas con ACN y  $\text{ZnSO}_4$ . Tiempo de retención PGZ: 3.6 minutos. Tiempo de retención GLM: 5.7 minutos.**

## 5.2 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Las condiciones cromatográficas finales que se utilizaron para la validación del método analítico y se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11. Condiciones cromatográficas finales del método analítico.**

Parámetro	Condición
Fase móvil	ACN:Buffer acetato de amonio 20mM pH=4.5 (55:45)
Columna cromatográfica	Agilent Eclipse XDB C18 4.6x150 mm 5 µm
Precolumna	Phenomenex C18 4.0x3.0mm
Temperatura	40 °C
Velocidad de flujo	1.0 mL/min
Volumen de inyección	50 µL
Longitud de onda	230 nm
Tiempo de retención Pioglitazona	3.7 minutos
Tiempo de retención Glimepirida	5.7 minutos

## 5.3 VALIDACIÓN DEL SISTEMA

### 5.3.1 Validación del sistema

**Tabla 12. Resultados de verificación del sistema.**

4000ng/mL	Pioglitazona		Glimepirida		Relación áreas
	Área	Tiempo de retención	Área	Tiempo de retención	
1	304.50	3.696	109.50	5.737	0.35961
2	305.90	3.697	108.90	5.734	0.35600
3	306.50	3.635	109.20	5.731	0.35628
4	307.10	3.695	109.52	5.728	0.35663
5	306.40	3.688	106.20	5.721	0.34661
<b>Promedio</b>	<b>306.0800</b>	<b>3.6822</b>	<b>108.6640</b>	<b>5.7302</b>	<b>0.3550</b>
<b>D.E.</b>	<b>0.9808</b>	<b>0.0266</b>	<b>1.4005</b>	<b>0.0061</b>	<b>0.0049</b>
<b>%C.V.</b>	<b>0.3204</b>	<b>0.7230</b>	<b>1.2889</b>	<b>0.1072</b>	<b>1.3868</b>

### 5.3.2 Linealidad del sistema

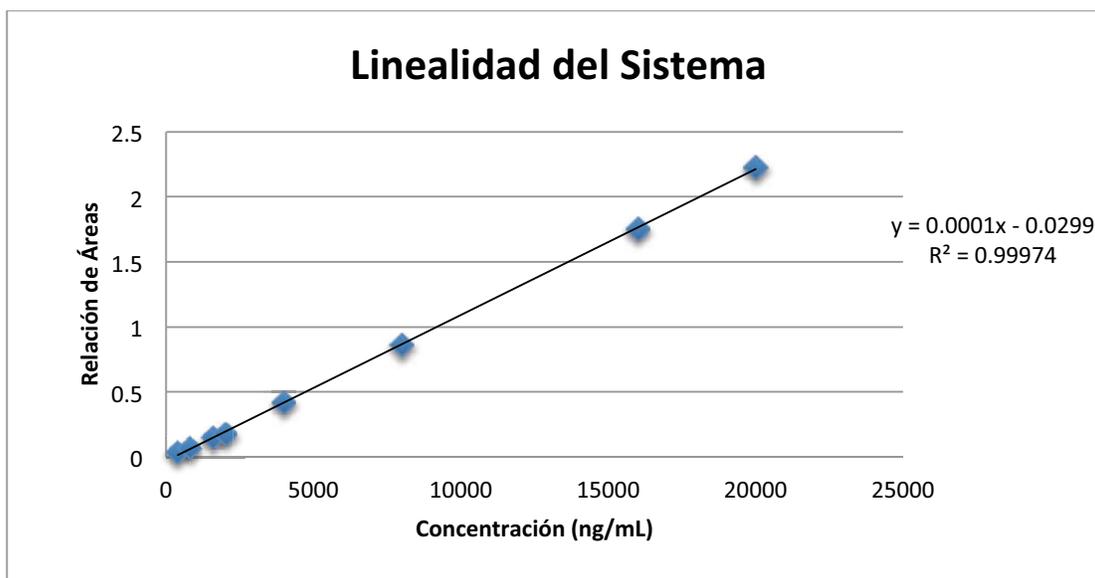
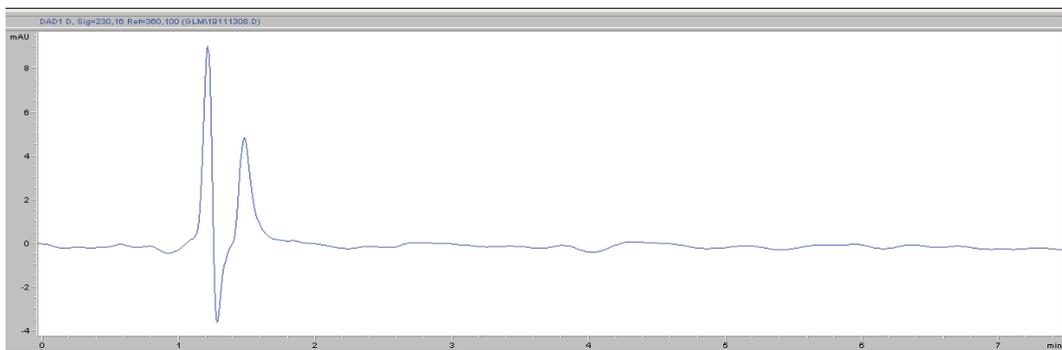


Figura 12. Resultados de linealidad del sistema.

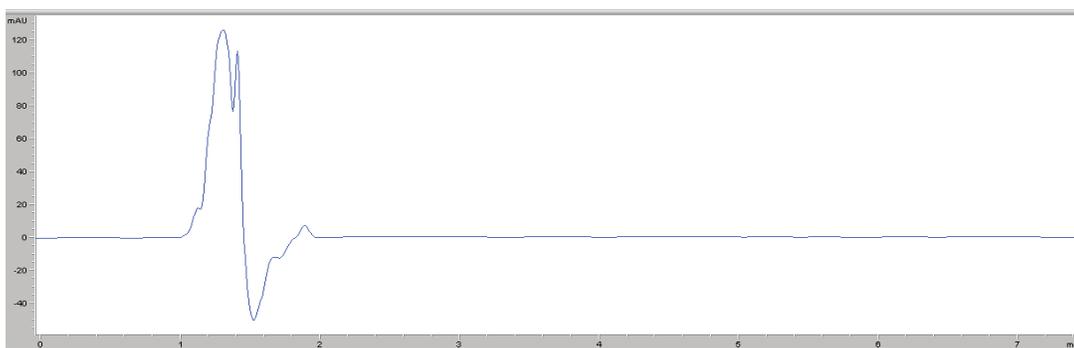
## 5.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

### 5.4.1 Selectividad del método

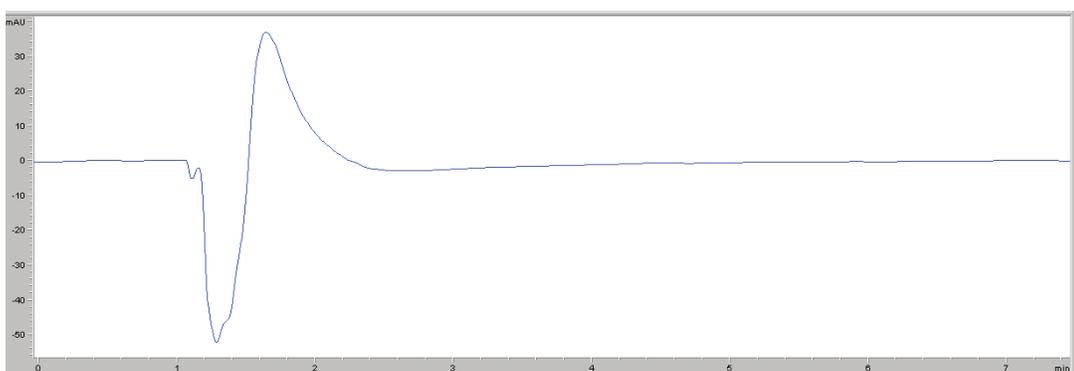
Para determinar la selectividad del método analítico validado se probaron los siguientes compuestos, sustancias, etc. que estaban involucrados en el método de extracción, en la fase móvil y en la conservación de la muestra: Fase móvil, Metanol, Sulfato de Zinc, Heparina, Pioglitazona en metanol, Glimepirida en metanol, blanco de plasma, blanco de plasma hemolizado blanco de plasma con Pioglitazona y una muestra de 800 ng/mL en plasma.



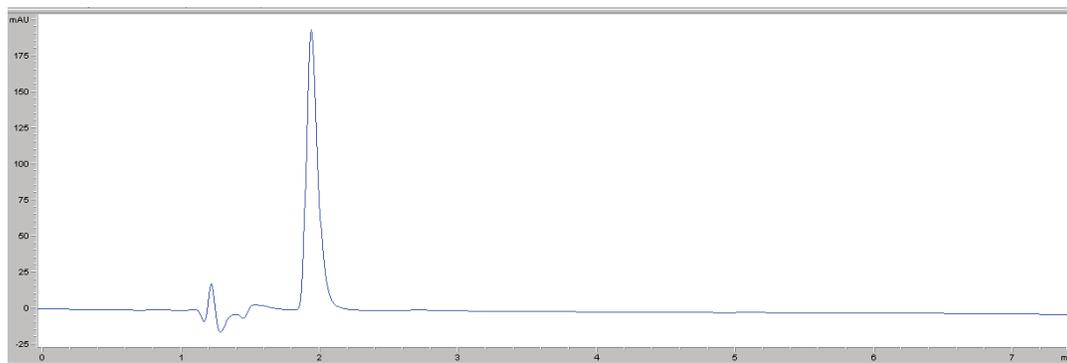
**Figura 13. Cromatograma de fase móvil de prueba de selectividad.**



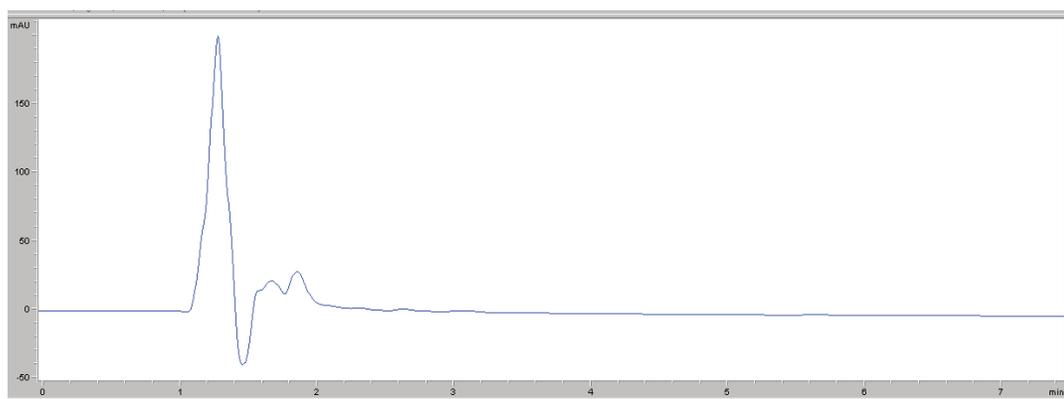
**Figura 14. Cromatograma de metanol de prueba de selectividad.**



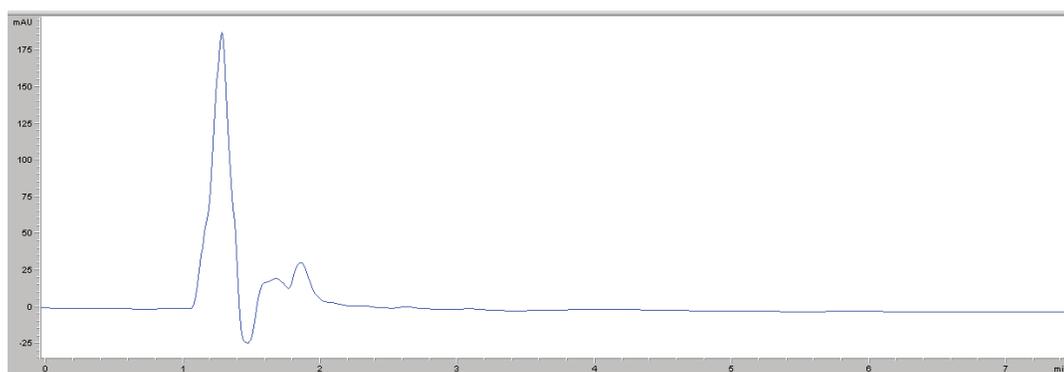
**Figura 15. Cromatograma de solución de Sulfato de zinc de prueba de selectividad.**



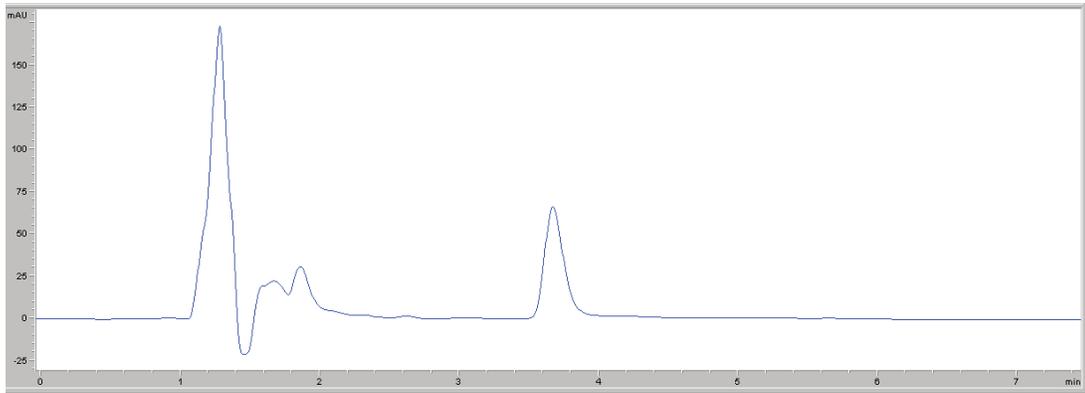
**Figura 16. Cromatograma de solución de heparina de prueba de selectividad.**



**Figura 17. Cromatograma de blanco de plasma de rata.**

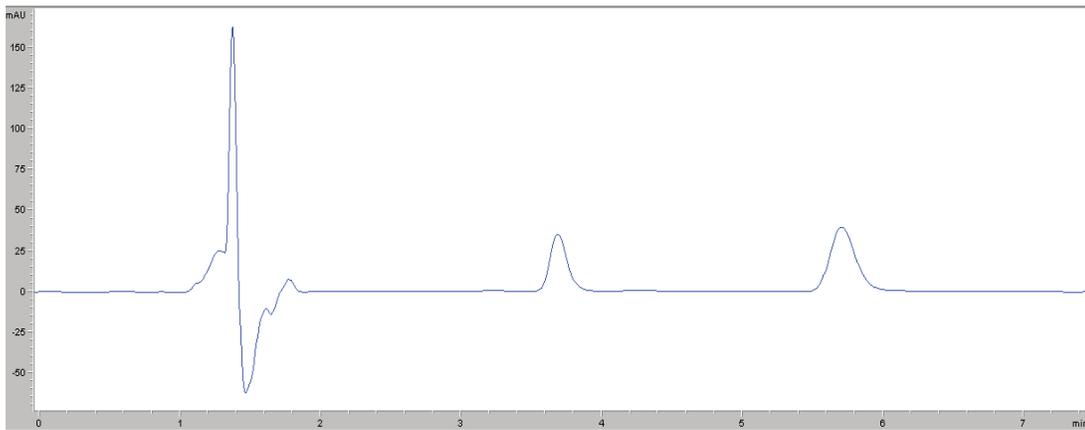


**Figura 18. Cromatograma de Plasma hemolizado de prueba de Selectividad.**



**Figura 19. Cromatograma de Blanco de plasma con estándar interno de prueba de selectividad.**

### **Muestra 800ng/mL**



**Figura 20. Cromatograma de muestra cargada con 800 ng/mL de glimepirida con pioglitazona como estándar interno. Escala -75 a 175 mAU.**

## 5.4.2 Curva de calibración del método

Tabla 13. Resultados de curva de calibración promedio del método.

Concentración(ng/mL)	Relación de áreas
400	0.03434
800	0.06914
1600	0.14732
2000	0.17374
4000	0.41743
8000	0.86140
16000	1.75240
20000	2.22785
<b>m</b>	0.0001
<b>b</b>	0.0299
<b>r<sup>2</sup></b>	0.999976

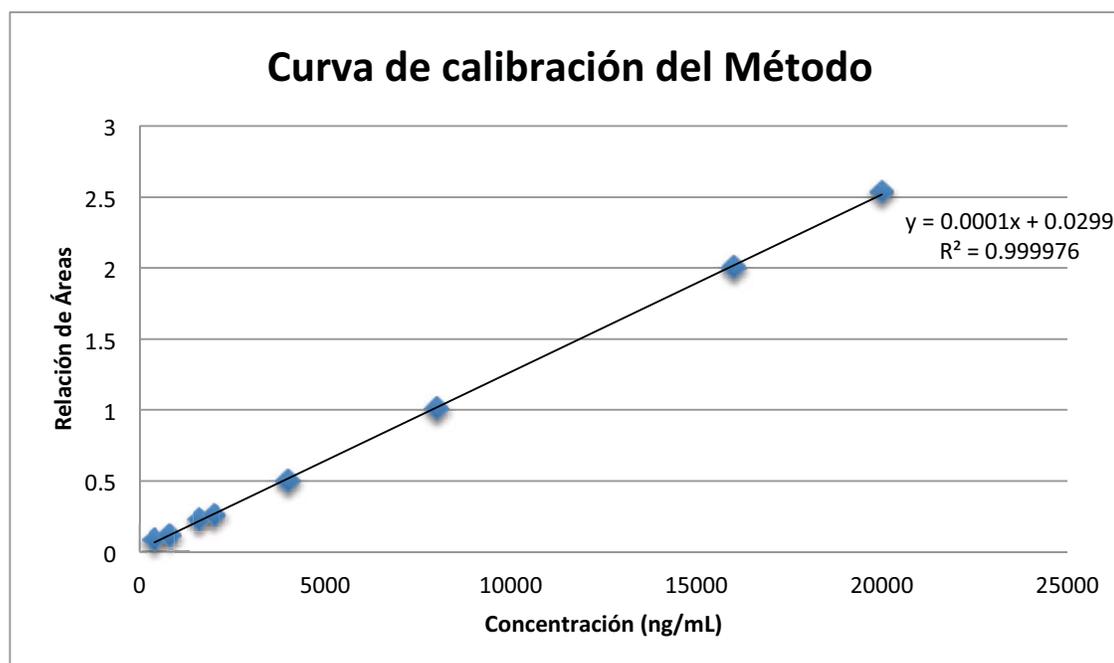


Figura 21. Resultados de la curva de calibración promedio del método.

## 5.4.3 Precisión

## 5.4.3.1 Repetibilidad

Tabla 14. Resultados de repetibilidad del método.

	Muestra Control	CONC. (ng/mL)	CONC. CAL (ng/mL)
REPETIBILIDAD	BAJA	1 200	1235.8
			1305.7
			1351.1
			1282.4
			1249.2
		PROMEDIO	1284.7
		D.E.	46.0
		%C.V.	3.6
		MEDIA	3 600
	3596.8		
	3290.1		
	3476.4		
	3276.8		
	PROMEDIO		3497.7
	D.E.		237.2
	%C.V.	6.8	
	ALTA	12 000	12792.9
			13143.3
			15122.3
			12842.9
			13027.4
PROMEDIO		13385.8	
D.E.		980.9	
%C.V.	7.3		

## 5.4.3.2 Reproducibilidad

Tabla 15. Resultados de reproducibilidad muestra baja del método.

	Muestra BAJA (ng/mL)	CONC. CAL (ng/mL)
DÍA 1	1 200	1235.8
		1305.2
		1377.8
	PROMEDIO	1306.3
	D.E.	71.0
%C.V.	5.4	
DÍA 2	1 200	1282.4
		1249.2
		1193.1
	PROMEDIO	1241.6
	D.E.	45.1
%C.V.	3.6	
DÍA 3	1 200	1200.4
		1190.7
		1198.9
	PROMEDIO	1196.7
	D.E.	5.2
%C.V.	0.4	

Tabla 16. Resultados de reproducibilidad muestra media del método.

	Muestra MEDIA (ng/mL)	CONC. CAL (ng/mL)
DÍA 1	3 600	3848.2
		3596.8
		3290.1
	PROMEDIO	3578.4
	D.E.	279.5
%C.V.	7.8	
DÍA 2	3 600	3476.5
		3276.8
		3839.3
	PROMEDIO	3530.8
	D.E.	285.2
%C.V.	8.1	
DÍA 3	3 600	3838.4
		3897.2
		3851.8
	PROMEDIO	3862.4
	D.E.	30.8
%C.V.	0.8	

Tabla 17. Resultados de reproducibilidad muestra alta del método.

	Muestra ALTA (ng/mL)	CONC. CAL (ng/mL)
DÍA 1	12 000	12792.9
		13143.3
		13339.4
	PROMEDIO	13091.9
	D.E.	276.8
	%C.V.	2.1
DÍA 2	12 000	12842.9
		13027.4
		13107.6
	PROMEDIO	12992.6
	D.E.	135.8
	%C.V.	1.1
DÍA 3	12 000	12037.9
		13007.8
		12598.6
	PROMEDIO	12548.1
	D.E.	486.9
	%C.V.	3.9

## 5.4.4 Recobro

Tabla 18. Resultados promedio de recobro del método

Concentración (ng/mL)	Relación de áreas	Concentración recuperada (ng/mL)	%C.V.	Relación de áreas	Concentración recuperada (ng/mL)	%C.V.	Recobro (%)
	Sistema			Método			
1200	0.1737	1281.7	9.865	0.1685	304.4	8.227	96.677
3600	0.3460	2817.7	5.438	0.3986	833.9	6.671	103.777
12000	1.5043	13143.3	3.763	1.4913	2948.6	2.366	99.122
						<b>Promedio</b>	99.859
						<b>DE</b>	3.606
						<b>%C.V.</b>	3.611

## 5.4.5 Exactitud

Tabla 19. Resultados de exactitud del método.

MUESTRA	CONC. (ng/mL)	CONC. CAL (ng/mL)	% DESVIACIÓN
BAJA	1 200	1235.8	2.9
		1305.2	8.8
		1287.9	7.3
		1282.4	6.9
		1249.2	4.1
		1200.4	0.1
	PROMEDIO	1260.2	
	D.E.	38.9	
%C.V.	3.1		
MEDIA	3 600	3848.2	6.9
		3596.8	0.1
		3290.1	8.6
		3476.5	3.4
		3276.8	8.9
		4016.7	11.6
	PROMEDIO	3584.2	
	D.E.	299.8	
%C.V.	8.4		
ALTA	12 000	12792.9	6.6
		13143.3	9.5
		13339.4	11.1
		12842.9	7.0
		13027.4	8.6
		12598.6	4.9
	PROMEDIO	12957.4	
	D.E.	266.2	
%C.V.	2.6		

## 5.4.6 Límite de detección

Tabla 20. Resultados límite de detección del método.

Concentración (ng/mL)	Relación de áreas	Concentración calculada (ng/mL)	% DESVIACIÓN
400	0.0876	514.2	28.5
400	0.0820	464.3	16.0
400	0.08319	474.9	18.7
400	0.09240	556.9	39.2
400	0.09638	592.5	48.1
	<b>Promedio</b>	520.6	
	<b>D.E.</b>	54.3	
	<b>%C.V.</b>	10.4	

#### 5.4.7 Límite de cuantificación

Tabla 21. Resultados límite de cuantificación del método.

Concentración (ng/mL)	Relación de áreas	Concentración calculada (ng/mL)	% DESVIACIÓN
800	0.1190	794.1	0.7
800	0.1174	779.8	2.5
800	0.11015	715.2	10.6
800	0.1253	850.3	6.2
800	0.1302	893.9	11.7
	<b>Promedio</b>	806.7	
	<b>D.E.</b>	68.5	
	<b>%C.V.</b>	8.5	

#### 5.4.8 Estabilidad

##### 5.4.8.1. Estabilidad a tiempo cero.

Muestra control Baja (1 200 ng/mL)

**Tabla 22. Resultados muestra control baja estabilidad del método a tiempo cero.**

<b>Concentración (ng/mL)</b>	<b>Relación de áreas</b>	<b>Concentración recuperada (ng/mL)</b>	<b>% DESVIACIÓN</b>
1 200	0.1685	1235.4	2.9
1 200	0.1763	1304.9	8.7
1 200	0.1844	1287.9	7.3
	<b>Promedio</b>	1276.1	
	<b>D.E.</b>	36.3	
	<b>%C.V.</b>	2.8	

Muestra control Medio (3 600 ng/mL)

**Tabla 23. Resultados muestra control media estabilidad del método a tiempo cero.**

<b>Concentración (ng/mL)</b>	<b>Relación de áreas</b>	<b>Concentración recuperada (ng/mL)</b>	<b>% DESVIACIÓN</b>
3 600	0.4616	3848.2	6.9
3 600	0.4334	3596.8	0.1
3 600	0.3990	3290.1	8.6
	<b>Promedio</b>	3578.4	
	<b>D.E.</b>	279.5	
	<b>%C.V.</b>	7.8	

Muestra control Alta (12 000 ng/mL)

**Tabla 24. Resultados muestra control alta estabilidad del método a tiempo cero.**

<b>Concentración (ng/mL)</b>	<b>Relación de áreas</b>	<b>Concentración recuperada (ng/mL)</b>	<b>% DESVIACIÓN</b>
12 000	1.4650	12792.9	6.6
12 000	1.5043	13143.3	9.5
12 000	1.7263	13339.4	11.1
	<b>Promedio</b>	13091.9	
	<b>D.E.</b>	276.8	
	<b>%C.V.</b>	2.1	

#### 5.4.8.2 Estabilidad a temperatura ambiente por 24 horas

Muestra control Baja (1 200 ng/mL)

Tabla 25. Resultados muestra control baja estabilidad del método a temperatura ambiente por 24h.

<b>Concentración (ng/mL)</b>	<b>Relación de áreas</b>	<b>Concentración recuperada (ng/mL)</b>	<b>%DESVIACIÓN</b>
1 200	0.18583	1300.7	8.4
1 200	0.16864	1236.6	3.0
1 200	0.17396	1284.0	7.0
	<b>Promedio</b>	1273.8	
	<b>D.E.</b>	33.2	
	<b>%C.V.</b>	2.6	

Muestra control Media (3 600 ng/mL)

**Tabla 26. Resultados muestra control media estabilidad del método a temperatura ambiente por 24h.**

<b>Concentración (ng/mL)</b>	<b>Relación de áreas</b>	<b>Concentración recuperada (ng/mL)</b>	<b>%DESVIACIÓN</b>
3 600	0.561	4026.5	11.8
3 600	0.5003	3953.4	9.8
3 600	0.5003	3316.0	7.9
	<b>Promedio</b>	3765.3	
	<b>D.E.</b>	390.8	
	<b>%C.V.</b>	10.4	

Muestra control Alta (12 000 ng/mL)

**Tabla 27. Resultados muestra control alta estabilidad del método a temperatura ambiente por 24h.**

<b>Concentración (ng/mL)</b>	<b>Relación de áreas</b>	<b>Concentración recuperada (ng/mL)</b>	<b>%DESVIACIÓN</b>
12 000	1.4975	13082.7	9.0
12 000	1.4571	12722.5	6.0
12 000	1.4081	12285.7	2.4
	<b>Promedio</b>	12696.9	
	<b>D.E.</b>	399.1	
	<b>%C.V.</b>	3.1	

### 5.4.8.3 Estabilidad a temperatura refrigeración 24 horas

Muestra control Baja (1 200 ng/mL)

**Tabla 28. Resultados muestra control baja estabilidad del método a temperatura de refrigeración por 24h.**

Concentración (ng/mL)	Relación de áreas	Concentración recuperada (ng/mL)	%DESVIACIÓN
1 200	0.17247	1270.8	5.9
1 200	0.17621	1304.1	8.7
1 200	0.19638	1305.6	8.8
	<b>Promedio</b>	1293.5	
	<b>D.E.</b>	19.7	
	<b>%C.V.</b>	1.5	

Muestra control Media (3 600 ng/mL)

**Tabla 29. Resultados muestra control media estabilidad del método a temperatura de refrigeración por 24h.**

Concentración (ng/mL)	Relación de áreas	Concentración recuperada (ng/mL)	%DESVIACIÓN
3 600	0.4809	3931.1	9.2
3 600	0.4582	3817.9	6.1
3 600	0.4582	3817.9	6.1
	<b>Promedio</b>	3855.6	
	<b>D.E.</b>	65.4	
	<b>%C.V.</b>	1.7	

Muestra control Alta (12 000 ng/mL)

**Tabla 30. Resultados punto control alto estabilidad del método a temperatura de refrigeración por 24h.**

Concentración (ng/mL)	Relación de áreas	Concentración recuperada (ng/mL)	%DESVIACIÓN
12 000	1.4866	12985.5	8.2
12 000	1.7294	13367.0	11.4
12 000	1.6925	13038.1	8.7
	<b>Promedio</b>	13130.2	
	<b>D.E.</b>	206.8	
	<b>%C.V.</b>	1.6	

#### 5.4.8.4. Estabilidad a tres ciclos de congelación

Muestra control Baja (1 200 ng/mL)

**Tabla 31. Resultados muestra control baja estabilidad del método a dos ciclos de congelación.**

Concentración (ng/mL)	Relación de áreas	Concentración recuperada (ng/mL)	%DESVIACIÓN
1 200	0.20503	1293.6	7.8
1 200	0.17803	1320.3	10.0
1 200	0.18273	1362.2	13.5
	<b>Promedio</b>	1325.4	
	<b>D.E.</b>	34.6	
	<b>%C.V.</b>	2.6	

Muestra control Media (3 600 ng/mL)

**Tabla 32. Resultados muestra control media estabilidad del método a dos ciclos de congelación.**

<b>Concentración (ng/mL)</b>	<b>Relación de áreas</b>	<b>Concentración recuperada (ng/mL)</b>	<b>%DESVIACIÓN</b>
3 600	0.47034	3926.1	9.1
3 600	0.46346	3864.8	7.4
3 600	0.43289	3592.3	0.2
	<b>Promedio</b>	3794.4	
	<b>D.E.</b>	177.7	
	<b>%C.V.</b>	4.7	

Muestra control Alta (12 000 ng/mL)

**Tabla 33. Resultados punto control alto estabilidad del método a dos ciclos de congelación.**

<b>Concentración (ng/mL)</b>	<b>Relación de áreas</b>	<b>Concentración recuperada (ng/mL)</b>	<b>%DESVIACIÓN</b>
12 000	1.41936	12386.1	3.2
12 000	1.62625	13338.9	11.1
12 000	1.38719	12099.3	0.8
	<b>Promedio</b>	12608.1	
	<b>D.E.</b>	648.9	
	<b>%C.V.</b>	5.1	

### 5.4.9 Tolerancia

#### 5.4.9.1 Proporción (58:42)

Muestra control Media (3 600 ng/mL)

**Tabla 34. Resultados muestra control media tolerancia del método (58:42).**

Concentración (ng/mL)	T. Retención SI	T. Retención GLM	Relación de áreas	Concentración recuperada (ng/mL)	%DESVIACIÓN
<b>3 600</b>	3.205	4.537	0.46548	3882.8	7.9
<b>3 600</b>	3.218	4.557	0.45839	3819.6	6.1
<b>3 600</b>	3.207	4.545	0.44473	3697.8	2.7
<b>Promedio</b>				<b>3800.1</b>	
<b>D.E.</b>				<b>94.2</b>	
<b>%C.V.</b>				<b>2.5</b>	

#### 5.4.9.2 Proporción (52:48)

Muestra control Media (3 600 ng/mL)

**Tabla 35. Resultados muestra control media tolerancia del método (52:48).**

Concentración (ng/mL)	T. Retención SI	T. Retención GLM	Relación de áreas	Concentración recuperada (ng/mL)	%DESVIACIÓN
3 600	4.269	6.986	0.4543	3783.1	5.0
3 600	4.269	6.986	0.4334	3596.8	0.1
3 600	4.268	6.985	0.4784	3997.9	11.0
<b>Promedio</b>				<b>3792.6</b>	
<b>D.E.</b>				<b>200.7</b>	
<b>%C.V.</b>				<b>5.2</b>	

## **6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

El desarrollo del método se puede dividir en dos fases, la primera fue establecer las condiciones cromatográficas del método; y la segunda obtener las condiciones de extracción para los analitos del plasma de rata.

Se probaron diferentes tipos de columnas y de fases móviles, velocidad de flujo y volumen de inyección, para determinar únicamente a glimepirida (ver figura 4) y una vez que se seleccionaron algunas condiciones iniciales se procedió a seleccionar el estándar interno

La glibenclamida fue el estándar interno que se deseaba utilizar, ya que hay algunos artículos que lo utilizan en la cuantificación de glimepirida, además de que tiene propiedades fisicoquímicas similares y su estructura es parecida a la de glimepirida. Éstas son características necesarias para considerar un compuesto como estándar interno. En la Figura 5 se puede observar un cromatograma muestra de un análisis en sistema de glimepirida y glibenclamida, los picos tienen buena resolución, sin embargo no tienen buena altura y aparece un pequeño pico negativo después de la respuesta.

Aunque el tiempo de retención de ambos compuestos es corto, también es cercano, lo cual puede generar problemas cuando se quiera cuantificar en el plasma de rata. Después de cambiar algunas condiciones cromatográficas y de extracción y al mostrar una mejora en la separación se decidió probar con un nuevo estándar interno, la pioglitazona.

Se seleccionó a la pioglitazona ya que es un hipoglucemiante al igual que la glimepirida y glibenclamida, su estructura química y sus características fisicoquímicas con similares a la glimepirida lo que lo hacía un buen candidato como estándar interno. Las pruebas con pioglitazona como estándar interno fueron exitosas como se muestra en las Figuras 6 y 7, el tiempo de retención de la pioglitazona es bueno, y con buena resolución con respecto a la señal de la glimepirida lo que permite una buena cuantificación de ambos compuestos.

El ruido generado por el plasma de rata no afecta el tiempo de retención de la pioglitazona ni de la glimepirida, los picos de ambos hipoglucemiantes tienen buena resolución y el tiempo de corrida es corto.

Una vez seleccionado el estándar interno se decidió probar diferentes técnicas de extracción, tales como; precipitación de proteínas y extracción líquido-líquido. Para la extracción líquido-líquido se probaron dos disolventes, éter etílico (100%) y una mezcla de éter etílico con diclorometano (70:30).

En la Figura 8 se observa la extracción con la mezcla de éter y diclorometano. Como se puede observar, la resolución de los picos de cada analito no es muy buena, además de las señales de gran área y altura debido al plasma de rata no permite la buena cuantificación de glimepirida ni del estándar interno.

Para mejorar la cuantificación de los analitos se aumentó el tiempo de agitación, se utilizó nitrógeno para evaporar mejor el disolvente y evitar alguna señal de este. También se congelaron las muestras a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  antes de evaporar con nitrógeno. Sin embargo, con ningún cambio se observó una mejora en los cromatogramas, por lo tanto se decidió hacer un cambio en el método de extracción.

En la Figura 9, se encuentra un cromatograma muestra de la extracción con éter (100%). Se puede notar como la resolución del pico de glimepirida mejora, aunque sigue teniendo poca altura y área. Sin embargo, el ruido generado por el plasma de rata es mucho y la cuantificación del estándar interno no es posible.

Continuando con las condiciones de extracción se probó la extracción por precipitación de proteínas. En principio se utilizó metanol para la extracción ya que la preparación de las muestras es con dicho disolvente, sin embargo no existió una buena precipitación por lo que los picos de los analitos de interés no tuvieron una buena resolución. Debido a esto se cambió el disolvente por acetonitrilo, debido a que también es muy utilizado en esta forma de extracción y la fase móvil contiene este compuesto.

La extracción resultante fue buena. Como se puede observar en la Figura 10, los picos de glimepirida y de pioglitazona tienen una mejor resolución. Por otro lado, los picos no deseados debidos al plasma de rata redujeron su altura y área, aunque la cuantificación de los analitos de interés sigue sin ser confiable, ya que en diferentes inyecciones con una misma concentración la variación de área es muy alta y se tiene un recobro menor a 50%.

Para corregir estos problemas se utilizó un nuevo compuesto, el Sulfato de Zinc ( $ZnSO_4$ ). Con este compuesto la precipitación de proteínas es mucho mayor, cuando se agrega dos gotas de dicho compuesto se cambia el color de la solución a blanco y con mucha opacidad debido a la precipitación. Se tiene una muy buena resolución de los picos de interés como se puede notar en la Figura 11, además de que el recobro aumenta hasta llegar a valores mayores del 80%.

Con el agente precipitante y el estándar interno elegidos, así como las condiciones cromatográficas establecidas, se procedió a afinar los detalles tales como tiempos de agitación para la preparación de la muestra, revoluciones por minutos, etc., por lo que se establecieron las condiciones de extracción finales. En la Tabla 11 se describen las condiciones cromatográficas óptimas de separación del compuesto. En la Figura 19 se observa un cromatograma representativo de muestra de plasma de rata cargada con glimepirida y pioglitazona.

Para determinar el parámetro de selectividad, como se puede observar se hicieron analizar muestras de plasma hemolizado, anticoagulante y reactivos y como se puede observar en las Figuras 12 a 19, no se observan interferencia de sustancias endógenas del plasma ni de otros analitos en el tiempo de retención de la glimepirida (5.8 min) ni de la pioglitazona (3.7 min) y tampoco observamos interferencias que superen el 20% de la señales esperadas. A partir de esto, se establece que el método desarrollado es selectivo para los analitos de interés.

La verificación del sistema es un parámetro que se debe analizar cada vez que se va a realizar una inyección para asegurarse que el equipo, en este caso HPLC, continua funcionando bien y bajo las mismas condiciones de trabajo arrojará resultados similares en todo el estudio. El coeficiente de variación en cada corrida

analítica no superó en ningún momento del estudio el 2%, por lo tanto el equipo funcionó correctamente, sin alterar los resultados finales durante la validación del método.

La Figura 11 muestra un gráfico de la linealidad promedio del sistema, obteniendo la ecuación y el coeficiente de correlación. En la misma gráfica se puede observar que se cumplen con el criterio de aceptación, ya que la curva promedio tiene un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) mayor a 0.98.

A partir de estos dos criterios, se puede establecer que el sistema analizado es lineal y preciso en el intervalo de concentración de 800 ng/mL a 20 000 ng/mL.

En la Figura 20 se observa un gráfico con una curva promedio, de las tres analizadas, para la curva de calibración del método, todas las curvas tienen un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) mayor a 0.98, por lo que cumplen con el criterio de aceptación.

A partir de estos criterios, se puede establecer que el método que se está utilizando para analizar a la glimepirida con un estándar interno es lineal y preciso en el intervalo de concentración de 800 ng/mL a 20 000 ng/mL.

En la Tabla resumen 14 se observa que el método cumple con la reproducibilidad ya que el coeficiente de variación no supera el 15%, por lo que cumple con el criterio de aceptación establecido.

En las tablas 15, 16 y 17 se muestra que el método es reproducible ya que bajo el análisis de días diferentes las muestras cumplieron con un coeficiente de variación menor a 15%, por lo tanto cumplen con el criterio de aceptación para el primer día de análisis.

El parámetro de exactitud se analizó con seis datos obtenidos de las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad calculando el porcentaje de desviación de cada muestra. Estos resultados están en la Tabla 19, se observa que cada muestra analizada cumple con el criterio de aceptación, es decir, tener un porcentaje de

desviación menor a 15%. A partir de estos resultados el método es exacto en las condiciones que se han establecido.

Con los valores mostrados en la Tabla 20, se puede establecer el valor de 400 ng/mL como el límite de detección para este método, ya que cumple con el criterio de aceptación de precisión, porque su coeficiente de variación no supera el 15 %. Sin embargo no cumple con el de exactitud, debido a que todos sus puntos tienen un valor de desviación estándar absoluta mayor a 20%.

El límite de cuantificación se determinó con los valores que se muestran en la Tabla 21. En dicha tabla se muestra que el punto utilizado (800 ng/mL) cumple con el criterio de aceptación establecido. Tiene un coeficiente de variación menor a 15% y todos sus puntos tienen una desviación estándar absoluta menor a 20%, siendo este punto preciso y exacto en el método que se está utilizando.

El recobro del método se indica en la Tabla 18. en ella se muestra el promedio de cada punto control analizado por triplicado en sistema y en método para obtener el valor del parámetro en análisis. Como se observa en la Tabla 18. el recobro en cada nivel de concentración es muy alto, superando el 90%.

Por otra parte cada nivel de concentración tiene un coeficiente de variación menor a 15%, por lo que cumple con el criterio de precisión. La misma tabla muestra que no hay una diferencia mayor al 15% entre cada nivel de concentración. Estos resultados, cumplen el criterio de aceptación que indicado para este parámetro.

La estabilidad del método al tiempo cero, se muestra en las Tablas 22, 23 y 24. en las cuales se observa que la desviación estándar de cada punto no es mayor a 15%, con estos resultados se establece que al analizar las muestras el mismo día que son preparadas, el método que se está validando es estable, además de preciso y exacto al ser analizadas el mismo día que son preparadas.

En la Tabla 25, 26 y 27 se muestran los resultados obtenidos del análisis de estabilidad de las muestras por 24 horas a temperatura ambiente. De igual manera que en la estabilidad a tiempo cero, cada punto de los tres niveles de concentración

tienen un coeficiente de variación menor a 15% y una desviación estándar absoluta menor a 15%, por lo tanto el método desarrollado es estable, preciso y exacto por 24 horas a temperatura ambiente.

Los valores del análisis a temperatura de refrigeración por 24 horas se encuentran en la Tabla 28, 29 y 30 el criterio de aceptación de este análisis es el mismo para toda la estabilidad del método, el valor del coeficiente de variación y el valor de desviación estándar absoluta no mayor a 15%.

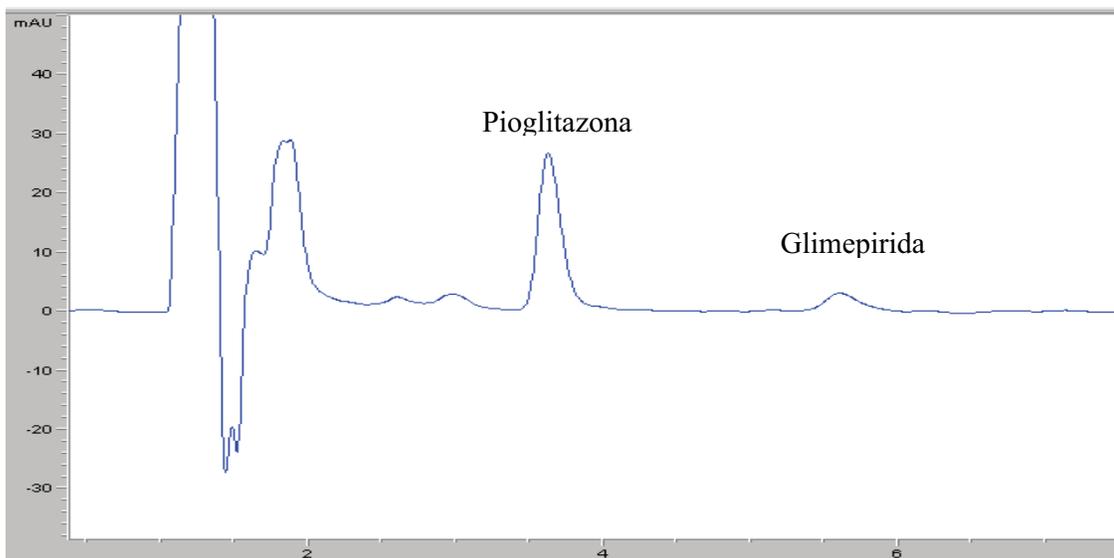
Como se observa en cada nivel de concentración todos los resultados cumplen con el criterio de aceptación, por lo tanto a una temperatura de refrigeración por 24 horas, el método desarrollado es estable, preciso y exacto a dicha condición.

Por último, los resultados de la estabilidad a dos ciclos de congelación del método se muestran en las Tablas 31, 32 y 33. En estas tablas se muestra como cada nivel de concentración cumple con el criterio de aceptación ya mencionado para cualquier tipo de análisis de estabilidad, por lo tanto, el método desarrollado es estable, preciso y exacto en esta condición.

Los resultados de la tolerancia del método están en las Tablas 34 y 35. En la Tabla 34. están los resultados de la primera proporción (48:52), se cumple con el criterio de aceptación de exactitud y precisión con esta variación de fase móvil, además de mostrarse como varía el tiempo de retención de ambos analitos.

En la tabla 35. está la segunda variación de proporción de fase móvil (52:48), de la misma manera que el primer análisis de tolerancia, este cumple con su criterio de aceptación, por lo que el método desarrollado es preciso y exacto aun con variaciones de 5% en la proporción de la fase móvil.

En la Figura 22, se muestra un cromatograma de plasma de rata tomada a las 6.5 h, después de una dosis por vía intraperitoneal de 0.16 mg/Kg de glimepirida en solución salina. La muestra fue procesada y analizada bajo las condiciones del método previamente desarrollado y validado, tal como fue el objetivo del presente trabajo, sin embargo al realizar un estudio piloto de farmacocinética preclínica es necesario contar con un método más sensible para poder caracterizar todo un perfil farmacocinético.



**Figura 22. Cromatograma de muestra de plasma de rata tomada a las 6.5h después de la administración por vía intraperitoneal de una dosis de glimepirida de 0.16 mg/Kg en solución salina.**

## **7. CONCLUSIONES**

- Se desarrolló un método analítico por precipitación de proteínas para separar y cuantificar Glimepirida con Pioglitazona como estándar interno en un intervalo de trabajo de 400 ng/mL a 20 000 ng/mL en plasma de rata, el cual es eficiente y sencillo.
- Se optimizó un método analítico para determinar Glimepirida con Pioglitazona como estándar interno por HPLC y detección UV .
- Se validó y se desarrollo el método analítico en base a los criterios de aceptación de la NOM-177-SSA1-2013 y la FDA<sup>34,35</sup>.
- El método desarrollado para la cuantificación de glimepirida en plasma de rata en un intervalo de concentración de 800ng/mL a 20 000ng/mL demostró ser lineal, exacto, preciso y confiable, no obstante requerimos de acuerdo a los niveles esperados optimizar el método para mejorar su sensibilidad y poder ser empleado en estudios de farmacocinética preclínica.

## 8. REFERENCIAS

- 1) Organización Mundial de la Salud. Diabetes. Nota Descriptiva No.312. OMS; 2012. [Consultado 2014 Mayo]. Disponible en:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>.
- 2) International Diabetes Federation. Atlas de Diabetes. Update 2012. 5th edición. [Consultado 2014 Mayo]. Disponible en:  
<http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/Update2012>.
- 3) DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Med Clin North Am 2004;88(4):787-835.
- 4) Hernández-Ávila M, Gutiérrez JP, Reynoso-Noverón N. Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. Salud Publica Mex 2013;55 supl 2:S129-S136.
- 5) Rodríguez-Bolaños RA, Reynales-Shigematsu LM, Jiménez-Ruiz JA, Juárez-Márquez SA, Hernández-Ávila M. Costos directos de atención médica en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en México: análisis de microcosteo. Rev Panam de Salud Pública 2010;28:412-420.
- 6) Guzmán JR, Lyra R, Aguilar-Salinas CA, Cavalcanti S, Escaño F, Tambasia M, et al. Treatment of type 2 diabetes in Latin America: a consensus statement by the medical associations of 17 Latin American countries. Latin American Diabetes Association. Rev Panam Salud Pública 2010;28:463-471.
- 7) American Diabetes Association. Standard of Medical Care in Diabetes-2012. Diabetes Care 2012; 35:s1-s63.
- 8) Harris SB, Ekoé JM, Zdanowicz Y, Webster-Bogaert S. Glycemic control and morbidity in the Canadian primary care setting (results of the diabetes in Canada evaluation study). Diabetes Res Clin Pract 2005;70:90-97.

- 9) Secretaría de Salud. Acuerdo para la Salud Alimentaria. Estrategia contra el sobrepeso y la Obesidad. México: SSA, 2010.
  
- 10) Romero-Martínez M, Shamah-Levy T, Franco-Núñez A, Villalpando S, Cuevas-Nasu L, Gutiérrez JP, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012: diseño y cobertura. Salud Publica Mex 2013;55 supl 2:S332-S340.
  
- 11) J.A.F. de Silva, Analytical strategies for therapeutic monitoring of drugs in biological fluids, Journal of Chromatography, 340 (1985) 3-30, Biomedical Applications.
  
- 12) J.A.F. de Silva, in J. Swarbrick (Editor), Current Concepts in the Pharmaceutical Sciences, Vol. 1, Biopharmaceutics, Lea and Febiger, Philadelphia, PA, 1970, pp. 203-264.
  
- 13) G. Schill, H. Ehrsson, J. Vessman and D. Westerlund, Separation Methods for Drugs and Related Organic Compounds, Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, 2nd ed., 1983.
  
- 14) M.A. Schwartz and J.A.F. de Silva, in J. Blanchard, R.J. Sawchuk and B.B. Brodie (Editors), Principles and Perspectives in Drug Bioavailability, S. Karger, Basel, 1979, pp. 90-119.
  
- 15) S.A. Kaplan and M.L. Jack, in J.W. Bridges and L.F. Chasseaud (Editors), Progress in Drug Metabolism, Vol. 4, Wiley, New York, 1980, pp. I-55.
  
- 16) J.A.F. de Silva, in E. Reid (Editor), Blood Drugs and Other Analytical Challenges, Ellis Horwood, Chichester, 1978, pp. 7-28.
  
- 17) W. Sadee and G.C.M. Beelen, Drug Level Monitoring: Analytical Techniques, metabolism and Pharmacokinetics, Wiley, New York, 1980.

- 18) S. Lakshmana Prabu and T. N. K. Suriyaprakash (2012). Extraction of Drug from the Biological Matrix: A Review, Applied Biological Engineering - Principles and Practice, Dr. Ganesh R. Naik (Ed.), ISBN: 978-953-51-0412-4, InTech,
- 19) Ho TS, Bjergaard SP, Rasmussen KE. (2002). Liquid-phase microextraction of protein bound drugs under non-equilibrium conditions. *Analyst*, 127, 608-13.
- 20) Watt AP, Morrison D, Evans DC. (2000). Approaches to higher throughput pharmacokinetics in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 5(1), 17-24.
- 21) Wells DA. (2003). Liquid Liquid Extraction: Strategies for method development and optimization, In: High Throughput Bioanalytical Sample Preparation - Methods and Automation Strategies, Wells DA, 307-326, Elsevier, Amsterdam.
- 22) Christian GD., O'Reilly JE. (1986). Instrumental Analysis, 2nd Ed. Newton, MA: Allyn & Bacon.
- 23) Harris DC. (1994). Quantitative chemical Analysis, 4th Ed. NY, WH. Freeman.
- 24) Wells DA. (2003). Protein precipitation: High throughput techniques and strategies for method development, In: High Throughput Bioanalytical Sample Preparation - Methods and Automation Strategies, Wells DA, 199-254, Elsevier, Amsterdam.
- 25) Zief M, Kiser R. (1990). An overview of solid phase extraction for sample preparation. *American Laboratory*, 22(1), 70-83.
- 26) Zwir Ferenc A, Biziuk M. (2006). Solid Phase extraction technique Trends, opportunities and Applications. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(5), 677-690.
- 27) Backes D. (2000) Strategy for the development of quantitative analytical procedures, In: Principles and Practice of Bioanalysis, Venn RF, 342-358, Taylor & Francis, NY.

- 28) Milena G., Ramirez G., Velázquez O., Pérez M., Restrepo P.; Validation of analytical method for the determination of glimepiride in human plasma by HPLC/UV with addition standard using glibenclamide as an internal standard. *Ars Pharm* 2005; 46 (4): 411-427.
- 29) Yadav KS., Mishra S., Mishra B; Eudragit-Based Nanosuspension of Poorly Water-Soluble Drug: Formulation and In Vitro–In Vivo Evaluation; *AAPS PharmSciTech*, Vol. 13, No. 4, December 2012
- 30) Karthik A., Subramanian G., Mallikarjuna Rao C, Krishnamurthy Bhat, Ranjithkumar A., Musmade P., Surulivelrajan M., Karthikeyan K and Udupa N.; Simultaneous determination of Pioglitazone and Glimepiride in bulk drug and pharmaceutical dosage form by RP-HPLC method; *Pak. J. Pharm. Sci.*, Vol.21, No.4, October 2008, pp.421-425
- 31) K.S. Lakshmi, T. Rajesh, Shrinivas Sharma; Determination of Pioglitazone and Glimepiride in pharmaceutical formulations and rat plasma by RP-LC; *International Journal of PharmTech Research*; Vol.1, No.3, pp 496-499; July-Sept 2009.
- 32) K.S.Nataraj, P.Sivalingachari, K.Alekhyia,V.Jahnavi and B.Ramu; Development and validation of a reverse phase High Performance Liquid Chromatographic method for the estimation of glimepiride in bulk and dosage forms; *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*; JPBS |Volume 3| Issue 3 |JUL-SEP|2013|01-06.
- 33) Davis Stephen N and Granner Daryl K. Insulin, oral hypoglycemic agents, and the pharmacology of the endocrine pancreas. In *The pharmacological basis of therapeutics*. Goodman & Gilman's. 2001. Tenth edition.
- 34) Food and Drug Administration. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, September 2013.
- 35) Food and Drug Administration. Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. February 2014.

36) N. Satheeshkumar, S. Shantikumar, R. Srinivas; Pioglitazone: A review of analytical methods; Journal of Pharmaceutical Analysis; Volume 4, Issue 4, Pages 223-294 (August 2014)

37) <http://www.drugs.com/pro/glimepiride.html>

38) <http://www.grupounipharm.com/sites/default/files/INSERTO%20EFINEX.pdf>

39) <http://www.drugs.com/cdi/pioglitazone.html>

40) NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad.