



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**Método Analítico alternativo por Cromatografía de  
Líquidos de Alta Resolución para la cuantificación de  
glimepirida en tabletas**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**Químico Farmacéutico Biológico**

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

**Rodrigo Manuel Alejandro Martínez Barrera**

**Director: Dr. Vicente Jesús Hernández Abad**

**Asesora: Dra. Elizabeth Guadalupe Sánchez  
González**



**Ciudad de México, 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **Agradecimientos**

El desarrollo de esta tesis fue financiado en su totalidad con recursos del proyecto PAPIIT IT200815 "Diseño de matrices híbridas de liberación modificada preparadas mediante el proceso sol-gel, con actividad hipoglucemiante, aplicables en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2", por el que se agradece el apoyo de la Universidad Nacional Autónoma de México, a través de la dirección General de Asuntos del Personal Académico.

---

Se agradece a la Universidad Nacional Autónoma de México, a través de la Secretaría de Atención a la Comunidad Universitaria por el apoyo económico otorgado durante el desarrollo de este proyecto a través del programa de Becas para Titulación Egresados de Alto Rendimiento.



## **Dedicatoria**

A mi familia, porque a pesar de todas las adversidades y carencias siempre encontraron la forma de llevarme por el camino del bien, y dieron todo cuanto estuvo en sus manos para que yo lograra llegar hasta este punto de mi vida, en especial a mi mamá, por ser ejemplo de bondad y coraje ante la vida, y a mi papá, porque siempre me enseñó el amor al conocimiento.

A Denisse, porque siempre estás a mi lado, me ayudas a ser una mejor persona y siempre superamos las adversidades, siempre.

A todos los miembros del Laboratorio de Investigación Farmacéutica por su apoyo, consejos y tiempo dedicados a la consolidación de este proyecto, en especial al Dr. Vicente J. Hernández A., a la Dra. Elizabeth G. Sánchez G. y a la Mtra. Cynthia Espinosa C., por su constante supervisión y ánimos a lo largo de mi estancia en este gran Laboratorio, no hay palabras para expresar mi gratitud hacia ustedes por ser un pilar fundamental en mi formación profesional y por haber compartido conmigo su conocimiento y experiencias.

A la Q.F.B. Leticia C. Juárez, por todo el apoyo y consejos que me ha brindado a lo largo de la carrera.

---

## Índice

1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	3
2.1 Cromatografía .....	3
2.1.1 Tipos de cromatografía .....	4
2.1.1.1 Cromatografía de adsorción .....	4
2.1.1.2 Cromatografía de reparto.....	4
2.1.1.3 Cromatografía de intercambio iónico .....	5
2.1.1.4 Cromatografía de exclusión molecular.....	5
2.1.1.5 Cromatografía de afinidad .....	5
2.1.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR o HPLC).....	6
2.1.2.1 Equipo utilizado en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	6
2.1.3 Descriptores cromatográficos básicos .....	7
2.1.3.1 Factor de retención ( $k'$ ) .....	7
2.1.3.2 Eficiencia .....	8
2.1.3.3 Selectividad ( $\alpha$ ).....	9
2.1.3.4 Resolución (R) .....	9
2.2 Desarrollo de métodos analíticos cromatográficos.....	10
2.2.1 Definición .....	11
2.2.2 Características de desempeño en la validación y su relación con la clasificación de los métodos analíticos .....	11
2.2.3 Características de desempeño analítico .....	12
2.3 Glimepirida .....	14
2.3.1 Descripción .....	14
2.3.2 Propiedades físicas y químicas.....	15
2.3.3 Presentaciones comerciales .....	16

---

2.3.4 Control de calidad de tabletas de glimepirida .....	16
2.4 Detección UV .....	19
2.4.1 Luz .....	19
2.4.2 Características de la luz.....	19
2.4.3 Absorción de la luz.....	20
2.4.4 Espectro de absorción .....	21
3. Planteamiento del problema.....	22
4. Hipótesis.....	23
5. Objetivo general .....	23
5.1 Objetivos particulares.....	23
6. Material y métodos .....	24
6.1 Diseño experimental .....	26
6.2 Población de estudio.....	26
6.3 Criterios de inclusión.....	27
6.4 Criterios de exclusión.....	27
6.5 Criterios de eliminación.....	27
6.6 Variables .....	28
6.7 Metodología .....	29
6.8 Técnicas.....	30
6.8.1 Desarrollo de método.....	30
6.8.1.1 Determinación de longitud de onda de máxima absorción .....	30
6.8.1.2 Análisis de muestras durante desarrollo de método .....	30
6.8.2 Optimización de método .....	32
6.8.3 Método analítico.....	33
6.8.3.1 Preparación de fase móvil. ....	33

---

6.8.3.2 Preparación de estándar interno .....	34
6.8.3.3 Preparación del estándar.....	34
6.8.3.4 Preparación de la muestra.....	35
6.8.3.5 Análisis de la muestra.....	35
6.8.4 Validación de método analítico .....	36
6.8.4.1 Validación de sistema.....	36
6.8.4.1.1 Verificación de sistema .....	36
6.8.4.1.2 Precisión de sistema .....	36
6.8.4.1.3 Linealidad del sistema .....	37
6.8.4.2 Validación de método .....	38
6.8.4.2.1 Valoración de tabletas de glimepirida.....	38
6.8.4.2.2 Especificidad del método .....	39
6.8.4.2.3 Exactitud del método .....	40
6.8.4.2.4 Linealidad del método .....	41
6.8.4.2.5 Precisión del método .....	42
6.8.4.2.5.1 Repetibilidad .....	42
6.8.4.2.5.1 Precisión intermedia.....	43
6.8.4.3 Estabilidad analítica de la muestra .....	43
6.8.4.4 Robustez .....	44
6.9 Análisis estadístico.....	45
7. Resultados .....	58
7.1 Desarrollo de método.....	58
7.1.1 Determinación de longitud de onda de máxima absorción .....	58
7.1.2 Determinación de las condiciones de operación del método .....	59
7.2 Optimización de método .....	65

---

7.3 Validación de sistema .....	67
7.3.1 Adecuabilidad de sistema .....	67
7.3.2 Precisión del sistema .....	70
7.3.3 Linealidad del sistema .....	71
7.4 Validación de método.....	74
7.4.1 Valoración de pool de tabletas.....	74
7.4.2 Especificidad del método .....	76
7.4.3 Exactitud del método .....	80
7.4.4 Linealidad del método.....	82
7.4.5 Precisión .....	85
7.4.5.1 Repetibilidad.....	85
7.4.5.2 Precisión intermedia .....	86
7.4.6 Estabilidad analítica de la muestra .....	88
7.4.7 Robustez.....	89
8. Análisis de resultados.....	92
9. Conclusiones.....	99
8. Referencias .....	100

---

## 1. Introducción

Un método analítico cuantitativo es la descripción detallada de la forma en que se lleva a cabo la medición de un analito en la muestra, y debe explicar a detalle los pasos necesarios para ejecutar dicha tarea, pudiendo incluir lo referente al muestreo, el estándar, la preparación de los reactivos, uso de aparatos, generación de la curva de calibración y fórmulas de cálculo. Para demostrar que un método analítico cumple con su finalidad de uso este se debe validar; las características de desempeño del método que se evalúan durante la validación dependen de la aplicación para la que se vaya a utilizar.

La glimepirida es un producto utilizado en el tratamiento de *Diabetes Mellitus* tipo II o no insulino dependiente. Este fármaco se comercializa en productos que contienen una dosis de 1 mg, 2 mg o 4 mg de glimepirida por tableta. Existe un método analítico oficial para la valoración de productos que contienen este principio activo en tabletas por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), sin embargo, las condiciones de operación de dicho método pueden dañar las columnas utilizadas durante el análisis, debido al bajo pH utilizado en la fase móvil; por esta razón, es importante desarrollar un método analítico que permita llevar a cabo la cuantificación de glimepirida en tabletas y que, a su vez, evite daños en el sistema. El propósito de este trabajo es desarrollar y validar un método analítico para cuantificación de glimepirida en tabletas por CLAR utilizando un detector UV, para obtener evidencia documentada de que la cuantificación de glimepirida en tabletas cumple con lo estipulado con respecto a la exactitud, precisión, especificidad,

linealidad y robustez, pudiendo aplicar el método analítico a tabletas comercializadas por distintas empresas.

## 2. Marco teórico

### 2.1 Cromatografía

Se define a la cromatografía como un proceso de separación que se lleva a cabo por una distribución de sustancias entre una fase móvil y una estacionaria. Estas sustancias pasan por el sistema cromatográfico al ser distribuidas entre la fase móvil y la fase estacionaria; como consecuencia, las sustancias son eluidas en la columna en orden inverso a sus coeficientes de distribución con respecto a la fase estacionaria. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido adsorbido o enlazado covalentemente sobre un soporte poroso de gran área superficial, mientras que la fase móvil es un fluido que se usa como portador de la mezcla.<sup>1</sup> Entre 1903<sup>2</sup> y 1906<sup>1</sup> Mikhail Tswett, un científico ruso, observó la separación de pigmentos extraídos de hojas al hacerlos eluir en una columna empacada con un material poroso utilizando disolventes como eluyentes, denominó *cromatografía* a este proceso.<sup>1</sup> El fundamento de la separación es que diferentes tipos de moléculas permanecen una cantidad de tiempo diferente en la fase estacionaria, lo cual permite la separación. Debido al gran número de pasos de reparto, la cromatografía tiene un poder de resolución muy grande, y puede separar mezclas de componentes con propiedades físicas muy similares.<sup>3</sup>

## **2.1.1 Tipos de cromatografía**

Existen diversas clasificaciones de la cromatografía, pero la que parece ser más aceptada en el ámbito mundial es aquella basada en los fenómenos físicos que tienen lugar en el proceso cromatográfico<sup>1</sup> dentro de los cuales se consideran los siguientes mecanismos.

### **2.1.1.1 Cromatografía de adsorción**

En este tipo de cromatografía la fase estacionaria es un sólido sobre el que se adsorben los componentes de la muestra. La fase móvil puede ser un líquido (cromatografía líquido-sólido) o un gas (cromatografía gas-sólido); los componentes se distribuyen entre las dos fases por una combinación de procesos de adsorción-desorción.<sup>3</sup>

### **2.1.1.2 Cromatografía de reparto**

En este tipo de cromatografía la fase estacionaria es un líquido adsorbido o enlazado covalentemente en un sólido inerte. La separación se fundamenta en el reparto de soluto entre dos fases líquidas (solubilidad relativa). La fase móvil puede ser un líquido (cromatografía de reparto líquido-líquido) o un gas (cromatografía gas-líquido).<sup>1</sup>

### **2.1.1.3 Cromatografía de intercambio iónico**

Este tipo de cromatografía se basa en el intercambio de especies iónicas sobre una capa fina o en una columna de adsorbentes especiales con grupos intercambiadores de iones. Este tipo de método es utilizado para el análisis de iones inorgánicos principalmente, pero también puede ser utilizada para la separación de macromoléculas cargadas.<sup>1</sup>

### **2.1.1.4 Cromatografía de exclusión molecular**

En este tipo de cromatografía, las moléculas solvatadas son separadas de acuerdo con su tamaño molecular y por su habilidad para penetrar una estructura tipo tamiz (fase estacionaria).<sup>1</sup>

### **2.1.1.5 Cromatografía de afinidad**

En este tipo de cromatografía la fase estacionaria contiene biomoléculas atrapadas físicamente o enlazadas covalentemente a un soporte macroporoso. La separación se lleva a cabo por interacciones antígeno-anticuerpo o anticuerpo-sustrato, y permite la resolución de mezclas complejas de proteínas; una vez retenido el

material de interés, es separado de la fase estacionaria por cambios de pH, de fuerza iónica o por el uso de modificadores orgánicos.<sup>1</sup>

Las técnicas cromatográficas pueden clasificarse además con base en la naturaleza de la fase móvil, clasificándolas en cromatografía de gases y cromatografía de líquidos, las cuales se pueden subclasificar con base en la naturaleza de la fase estacionaria.<sup>1</sup>

### **2.1.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR o HPLC)**

El acrónimo HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) fue acuñado por primera vez por Csaba Horváth en 1970, indicando el hecho de que se utilizó alta presión para generar el caudal necesario para la cromatografía de líquidos en columna; debido a los grandes avances durante esa década, el nombre fue cambiado a Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (High Performance Liquid Chromatography) manteniendo el acrónimo.<sup>4</sup> En nuestro idioma, el acrónimo utilizado para referirse a la técnica es CLAR.

#### **2.1.2.1 Equipo utilizado en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución**

La instrumentación general para CLAR incorpora los siguientes elementos:

1. Recipiente para la fase móvil.
2. Sistema de bombeo, el cual suministra la fase móvil a la columna.

3. Válvulas de muestreo, inyectan la muestra en el flujo de la fase móvil
4. Precolumna o filtro en línea, evita contaminación a la columna por partículas pequeñas.
5. Manómetro, mide la presión de entrada de líquidos en la columna.
6. Columna, es donde se lleva a cabo la separación de los componentes de las muestras; el material de empaque dependerá del tipo de separación que se desee llevar a cabo.
7. Detector con dispositivo para manejo de datos<sup>1</sup>, permite el manejo de los datos generados por la muestra.

### **2.1.3 Descriptores cromatográficos básicos**

Existen cuatro descriptores cromatográficos principales, los cuales son utilizados para reportar las características de la columna cromatográfica, el sistema y de una separación en particular:

#### **2.1.3.1 Factor de retención ( $k'$ )**

Es una medida adimensional de la retención de un compuesto en particular en un sistema en condiciones dadas, está definido por la ecuación 1:

$$k' = \frac{V_R - V_0}{V_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde  $V_R$  es el volumen de retención del analito,  $V_0$  es el volumen de la fase líquida en el sistema cromatográfico,  $t_R$  es el tiempo de retención del analito y  $t_0$  es definido, en ocasiones, como el tiempo de retención de un componente no retenido.<sup>1</sup>

### 2.1.3.2 Eficiencia

Es una medida del grado de dispersión de un pico en una columna particular, es expresada como el número de platos teóricos por la ecuación 2:

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W_b} \right)^2 \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde  $t_R$  es el tiempo de retención y  $W_b$  es el ancho del pico en la línea base.<sup>5</sup>

En ocasiones es difícil medir el ancho del pico en la línea base, ya que puede coeluir con otros componentes o puede haber poca sensibilidad del detector. Para evitar dichos problemas se puede medir el ancho a la media altura del pico, de acuerdo a la ecuación 3:

$$N = 5.54 \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde  $W_{1/2}$  corresponde al ancho del pico a la altura media.<sup>1</sup>

### 2.1.3.3 Selectividad ( $\alpha$ )

La selectividad es la capacidad de un sistema cromatográfico de discriminar dos analitos diferentes. Es definido como la relación de dos factores de retención, como se muestra en la ecuación 4:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde  $k'_1$  y  $k'_2$  son los factores de retención de un pico anterior y un pico posterior, respectivamente.<sup>5</sup>

Otra forma de definirlo es como retención relativa ( $\alpha$ ), el cual permite establecer el grado de separación que existe entre dos picos adyacentes, como se muestra en la ecuación 5:

$$\alpha = \frac{tr_2}{tr_1} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde  $tr_2$  y  $tr_1$  son los tiempos de retención del pico dos y del pico uno, respectivamente.<sup>1</sup>

### 2.1.3.4 Resolución (R)

Es una medida del grado de separación que existe entre dos picos adyacentes, y está definido por la siguiente ecuación:

$$R_s = \frac{tr_2 - tr_1}{0.5(W_2 + W_1)} \quad \text{(Ecuación 6)}$$

Donde  $tr_1$  y  $tr_2$  son los tiempos de retención del primer y segundo pico, respectivamente y  $W_1$  y  $W_2$  son los anchos de las bases del primer y segundo pico, respectivamente.<sup>1</sup>

## 2.2 Desarrollo de métodos analíticos cromatográficos

Para el desarrollo de métodos analíticos cromatográficos, se tienen los siguientes objetivos:

- Obtener la máxima resolución posible entre los analitos de interés, para asegurar una identificación correcta y la cuantificación exacta y precisa de las sustancias presentes en la muestra.
- Desarrollar la separación en el menor tiempo posible, ya que esto permite un considerable ahorro en reactivos, tiempo de uso del equipo y horas-hombre frente al equipo.<sup>1</sup>

Para el desarrollo del método, la información sobre el producto es de gran utilidad y en ocasiones crucial, por lo cual se recomienda reunir toda la información disponible, de la cual la siguiente información podría ser útil:

- Espectros UV, solubilidad, pKa, estabilidad del principio activo (PA).
- Métodos anteriores para caracterizar al fármaco y al medicamento.

- Historia del desarrollo del método.
- Composición de la formulación.
- Datos de estabilidad del fármaco y medicamento.
- Datos de compatibilidad de excipientes.
- Datos en archivos regulatorios.
- Revisión de la literatura existente y guías actuales.<sup>6</sup>

## **2.3 Validación de métodos analíticos**

### **2.2.1 Definición**

La validación de un método es el proceso en el que se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método satisfacen los requisitos para su aplicación analítica.<sup>7</sup>

### **2.2.2 Características de desempeño en la validación y su relación con la clasificación de los métodos analíticos**

Las características a ser evaluadas durante el proceso de validación dependen de la finalidad del método analítico. Los métodos analíticos se pueden clasificar en las siguientes cuatro categorías de acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos:

Categoría I. Métodos analíticos para cuantificar a un componente específico en muestras de producto terminado o en pruebas de estabilidad.

Categoría II. Métodos analíticos para la determinación de impurezas. Estos métodos pueden incluir determinaciones cualitativas o pruebas límite.

Categoría III. Métodos analíticos utilizados en la determinación de un analito en una muestra con el objeto de evaluar una característica de desempeño del preparado farmacéutico.

Categoría IV. Pruebas de identificación de un analito.<sup>7</sup>

### **2.2.3 Características de desempeño analítico**

Las características de desempeño analítico que se recomienda evaluar en el proceso de validación pueden comprender, pero no están limitadas a las siguientes:

- Verificación, precisión y linealidad del sistema
- Especificidad/selectividad, exactitud, linealidad e intervalo, precisión, límite de detección y cuantificación, robustez y tolerancia del método.<sup>7</sup>

Para los métodos analíticos que pertenecen a la categoría I, las características de desempeño analítico recomendadas para la validación son las siguientes:

- Verificación, precisión y linealidad del sistema

- Especificidad/Selectividad, exactitud, linealidad, intervalo y precisión del método.<sup>7</sup>

Las características de desempeño analítico recomendadas para la validación de métodos de la categoría I se definen de la siguiente manera:

Verificación del sistema: Son pruebas utilizadas para verificar que el sistema funciona correctamente con base en criterios establecidos previamente.<sup>7</sup>

Precisión del sistema: Es el grado de concordancia relativa de la respuesta analítica de soluciones de referencia de concentración o magnitud conocida.<sup>7</sup>

Linealidad del sistema: Es la verificación de que la respuesta analítica y la concentración del analito se ajustan al modelo matemático, en un intervalo de concentraciones pertinentes a la aplicación analítica.<sup>7</sup>

Especificidad/selectividad: Es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra, que pueden estar presentes (especificidad) o que se pudieran presentar por efectos ambientales y/o de interacción con los mismos componentes (selectividad) tales como impurezas, productos de degradación o componentes de la misma muestra.<sup>7</sup>

Exactitud del método: es la concordancia absoluta entre el resultado obtenido con el método y la cantidad verdadera de analito en la muestra, a una cantidad fija.

Linealidad del método: Es la capacidad de un método analítico para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración de un analito (sin sesgo) dentro de un intervalo dado.<sup>7</sup>

Intervalo del método: Es el intervalo comprendido entre las concentraciones superior e inferior del analito (incluyendo dichas concentraciones) y para el que se ha demostrado que el analito es cuantificado con un nivel satisfactorio de precisión, exactitud y linealidad, cuando se aplica el método analítico.<sup>7</sup>

Precisión del método: Es el grado de concordancia relativa entre los resultados obtenidos al aplicar el método analítico, bajo las mismas condiciones (reproducibilidad), utilizando una muestra homogénea, expresado generalmente como la desviación estándar relativa o el coeficiente de variación.<sup>7</sup>

## **2.3 Glimepirida**

La glimepirida es un fármaco hipoglucemiante que pertenece al grupo de las sulfonilureas,<sup>15</sup> actúa por estimulación de la liberación de insulina a partir de las células  $\beta$ -pancreáticas y es suministrado por vía oral. La glimepirida se utiliza en el tratamiento de *diabetes mellitus* tipo II, cuando la dieta, el ejercicio físico y reducción de peso por sí solos no son adecuados.<sup>15</sup>

### **2.3.1 Descripción**

La glimepirida es un polvo blanco o blanco amarillento, cristalino, inodoro o prácticamente inodoro.<sup>8</sup>

### 2.3.2 Propiedades físicas y químicas

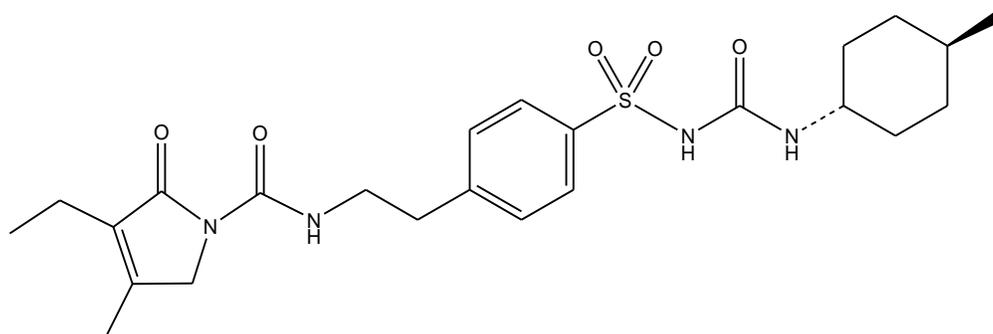


Figura 1. Estructura química de la glimepirida.<sup>8,9</sup>

Fórmula condensada:  $C_{24}H_{34}N_4O_5S$ <sup>8,9</sup>

PM: 490.62 g mol<sup>-1</sup><sup>8,9</sup>

T<sub>f</sub>: 207.0 °C<sup>8,9</sup>

pKa: 6.2 a 37°C<sup>8</sup>

$\lambda_{max}$ : 228 nm en amortiguador de fosfatos pH 7.4 0.2 M y acetonitrilo 40:60 v/v,<sup>10</sup>

230 nm en NaOH 5x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>,<sup>11</sup> 249 nm en cloroformo,<sup>12</sup> 225 nm en metanol.<sup>13</sup>

Sinónimos: HOE-490, Amaryl,<sup>9</sup> Amarel, Glimepiridum.<sup>14</sup>

Solubilidad: Soluble en dimetilformamida, poco soluble en cloruro de metileno, muy poco soluble en metanol y etanol; casi insoluble en agua.<sup>7</sup>

### 2.3.3 Presentaciones comerciales

Actualmente en México se otorgaron o prorrogaron registros sanitarios de los siguientes medicamentos en el periodo comprendido entre 2010 y 2015, los cuales contienen como principio activo únicamente glimepirida (Cuadro 1):<sup>16-21</sup>

Cuadro 1. Productos que cuentan con registro sanitario obtenido entre 2010 y 2015 que contienen glimepirida como único principio activo.	
Nombre del producto	Fabricante
MAGICA	Emifarma, S.A. de C.V.
GLEURIX	Mavi Farmacéutica S.A. de C.V.
ZUKEDIB	Loeffler, S.A. de C.V.
AMARYL	Sanofi-Aventis México, S.A. de C.V.
GLIMAL	Laboratorios Silanes, S.A. de C.V.
DIAGLIM	Sandoz, S.A. de C.V.

### 2.3.4 Control de calidad de tabletas de glimepirida

De acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, en su 11ª edición, los controles de calidad que deben realizarse a las tabletas de glimepirida comprenden sustancias de referencia, ensayos de identidad, disolución,

uniformidad de dosis, sustancias relacionadas y valoración; para realizar las pruebas de disolución, sustancias relacionadas y valoración se utiliza CLAR, en las tres pruebas se utilizan las siguientes condiciones de operación:<sup>7</sup>

Fase móvil: Solución de fosfato monobásico de potasio al 0.1%, pH 2.1 a 2.7 ajustado con ácido fosfórico al 10%.

Condiciones del equipo: Detector de luz UV, a una longitud de onda de 228 nm, con una columna de 125 mm x 3 mm, con una velocidad de flujo de 1.0 mL/min.

El intervalo de pH en el que operan estos métodos analíticos puede causar hidrólisis de los grupos alquílicos del empaque utilizado en la columna, modificando las características de desempeño del sistema y disminuyendo el tiempo de vida útil de la columna, generando un incremento en los gastos del laboratorio. Sin embargo, se han reportado otros métodos <sup>11, 22, 23, 24</sup> mediante los cuales es posible realizar la cuantificación de glimepirida en tabletas. En estos métodos se utilizaron las siguientes condiciones de operación:

Método 1:

Fase móvil: Solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.0275M y metanol 34:66 v/v.

Condiciones del equipo: Detector de luz UV, a una longitud de onda de 228 nm, con una columna Waters Symmetry® C-18 d 250 mm x 4.6 mm, con tamaño de partícula de 5.0 µm, volumen de inyección de 20 µL y velocidad de flujo de 1 mL/min.<sup>11</sup>

#### Método 2:

Fase móvil: Solución amortiguadora de fosfato dibásico de potasio – ácido fosfórico pH 5.0 al 0.71% w/v, acetonitrilo y tetrahidrofurano en proporción 40:50:10.

Condiciones del equipo: Detector UV, a longitud de onda de 228 nm, con una columna Inertsil ODS-3V de 250 mm x 4.6 mm, con tamaño de partícula de 5.0 µm, volumen de inyección de 20 µL y velocidad de flujo de 1.7 mL/min.<sup>22</sup>

#### Método 3:

Fase móvil: Solución de fosfato monobásico de potasio 0.05 M pH 6.0, ajustado con trietilamina, y acetonitrilo en proporción 60:40 v/v.

Condiciones del equipo: Detector UV, a una longitud de onda de 210 nm, con una columna Hypersil C-18 de 150 mm x 3.9 mm, volumen de inyección de 20 µL y velocidad de flujo de 1.5 mL/min.<sup>23</sup>

#### Método 4:

Fase móvil: Solución de acetonitrilo, agua y ácido acético glacial en una proporción 550:450:0.6.

Condiciones del equipo: Detector UV, a una longitud de onda de 230 nm, con una columna LiChrosorb C-18 de 125 mm x 4.4 mm, con tamaño de partícula de 5 µm, volumen de inyección de 20 µL y velocidad de flujo de 1 mL/min.<sup>24</sup>

## 2.4 Detección UV

### 2.4.1 Luz

Los métodos de análisis citados emplean detección UV para la cuantificación de glimepirida, para que exista dicha detección las moléculas de analito deben ser capaces de absorber la luz en la longitud de onda señalada. La luz es una onda que consta de planos eléctricos y magnéticos que oscilan en dos planos perpendiculares entre sí<sup>25</sup>, lo anterior se representa de acuerdo a la siguiente figura:

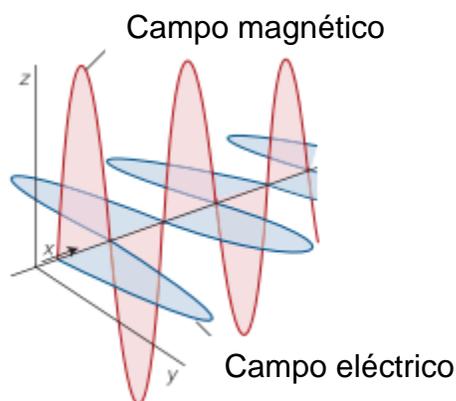


Figura 2. Radiación electromagnética, consiste ondas de campos eléctricos y magnéticos perpendiculares a la dirección de propagación, en este caso la dirección x, los cuales, además, son perpendiculares entre sí.<sup>26</sup>

### 2.4.2 Características de la luz

La luz presenta dos características, la frecuencia y la longitud de onda. La longitud de onda es la distancia entre las crestas de dos ondas, sucesivas, y la frecuencia

es el número de oscilaciones completas, o ciclos, de una onda por segundo;<sup>25, 27</sup> dichas características permiten clasificar las ondas electromagnéticas dentro de distintos grupos de acuerdo al espectro electromagnético, y son del interés de las técnicas que utilizan la absorción de luz UV y visible como forma de detección las radiaciones electromagnéticas que se encuentran en el intervalo de longitud de onda de 190 nm a 380 nm, y el intervalo que abarca de 380 nm a 780 nm, correspondientes a la región UV y visible del espectro electromagnético, respectivamente.<sup>7</sup>

### **2.4.3 Absorción de la luz**

La absorción de luz se debe a que una molécula absorbe un fotón, lo cual genera una transición en electrones excitables, aumentando la energía de la molécula, pasando de un estado basal a un estado excitado. En el caso de la luz UV y visible, el estado excitado es debido a una transición de los electrones de enlace a orbitales de mayor energía. Cuando una muestra absorbe luz, disminuye la intensidad de la irradiancia,  $P$ , la cual es la energía por unidad de tiempo y de área correspondiente al haz de luz, incrementando, de esta manera, la absorbancia.<sup>25</sup>

#### 2.4.4 Espectro de absorción

El espectro de absorción es una representación gráfica de la absorbancia como función de la longitud de onda de un haz luminoso que se hace incidir sobre un analito,<sup>7, 25</sup> esto es de utilidad para determinar la longitud de onda en la cual es posible cuantificar dicho analito, de esta manera se determina a que longitud de onda en la que se presenta máxima absorción por parte del analito. En la siguiente figura se puede observar el espectro de absorción de clorofila A y clorofila B, en el cual se traza la absorbancia de cada uno en función de la longitud de onda.<sup>27</sup>

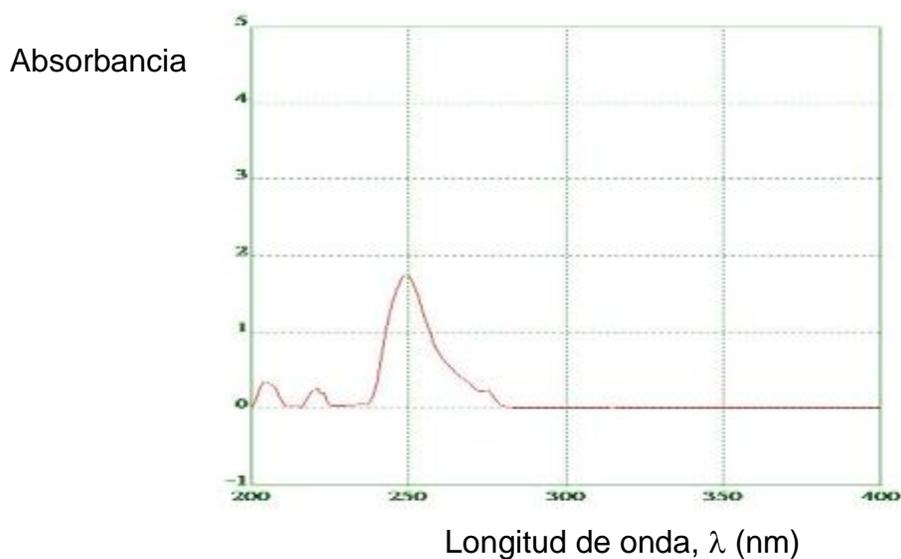


Figura 3. Espectro de absorción de glimepirida en cloroformo.<sup>28</sup>

### **3. Planteamiento del problema**

Existen diversos productos que contienen glimepirida (tabletas) en el mercado nacional las cuales, debido a la naturaleza variada de su formulación, pueden presentar dificultades para la cuantificación del principio activo en el producto terminado. A pesar de que existe un método oficial que puede ser utilizado para determinar el contenido de glimepirida en tabletas, las condiciones de operación de este pueden generar daños en la columna utilizada por los equipos durante el análisis, por ello, es importante contar con un método analítico que permita llevar a cabo dicha cuantificación evitando variaciones significativas en los resultados generados debidas a interferencias en la cuantificación por efecto de los excipientes, productos de degradación o problemas en el sistema ocasionados por las condiciones de operación. El propósito de este trabajo es desarrollar un método analítico que permita el análisis del contenido de tabletas de glimepirida de 4 mg elaboradas por distintas empresas y, a través de la validación, demostrar que dicho método permite que la cuantificación se lleve a cabo sin interferencia debida a los excipientes utilizados en las formulaciones, y que este método es de utilidad para llevar a cabo análisis de rutina en producto terminado de tabletas de glimepirida de 4 mg.

#### **4. Hipótesis**

Toda vez que el método analítico para la cuantificación de glimepirida en tabletas puede generar problemas instrumentales durante el análisis del fármaco, el método analítico por CLAR que se desarrolle en este trabajo evitará que dichos problemas se presenten, utilizando condiciones de operación adecuadas para cuantificar al fármaco de manera confiable.

#### **5. Objetivo general**

Generar un método por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección UV que sea útil para cuantificar glimepirida contenida en tabletas de diferentes fabricantes.

##### **5.1 Objetivos particulares**

Determinar el pH en el cual se encuentran bien definidos los picos cromatográficos, sin que este pueda causar daño a la columna.

Optimizar el método para reducir los tiempos de análisis y obtener la resolución necesaria para cuantificar al analito en presencia del estándar interno.

Validar el método analítico para tener evidencia documental de que este cumple con su finalidad de uso.

## 6. Material y métodos

Cuadro 2. Reactivos utilizados durante el desarrollo experimental.		
Reactivo	Fabricante	Número de lote
Metanol HPLC	Tecsiquim	TEC-488-PP-H
Acetonitrilo	Tecsiquim	TEC-344-PK-H
Fosfato dibásico de potasio	JT Baker	C05C00
Fosfato monobásico de potasio	JT Baker	L18C06
1-octil sulfato de sodio	Sigma-Aldrich	8380
Glimepirida	European Pharmacopoeia Reference Standard	2.0
Glibenclamida	Química Alkano S.A. de C.V.	EGAA-B-13-0008
Agua purificada	Theissier 2-4 $\mu\Omega/cm$	-
Ácido clorhídrico	Merck	209353 R
Hidróxido de sodio	Macron Fine Chemicals	78789-0000022894
Peróxido de hidrógeno	Farmacias del Ahorro	38A0498
Celulosa microcristalina HD90 alta densidad	MENDEL	HD9B5K3X

Lactosa Lactopress spray dried 250	BORCULO DOMO	501944
Crospovidona Kollidon CL	O-BASF	01967029U0
Poliplasdone XC	-	IFRS-34
Almidón	Niagara	IFRS-95

Cuadro 3. Materiales utilizados durante el desarrollo experimental.		
Material	Capacidad	Fabricante
Vaso de precipitados	1000 mL	Pyrex
Probeta	1000 mL	Pyrex
Micropipeta	Eppendorf	Research plus
Pipeta volumétrica	2 mL, 3 mL, 4 mL y 5 mL	
Matraz volumétrico	10 mL, 25 mL, 50 mL y 100 mL	
Columna Acclaim <sup>®</sup> 120 C-8, 5 mm de tamaño de partícula, dimensiones de 4.6x250 mm.		
Columna Phenomenex luna C-18 de 5 mm de tamaño de partícula, con dimensiones de 4.6x150 mm		

Cuadro 4. Equipos utilizados durante el desarrollo experimental.		
Equipo	Marca	Modelo
Espectrofotómetro	Varian	Cary 50 Bio
Balanza analítica	OHAUS	Explorer® Pro
Microbalanza	Mettler	MTS
Cromatógrafo Varian PsoStar	Varian	ProStar
Cromatografo HITACHI	HITACHI	Primaide
Equipo para filtración	Milli-Q®	Millipore
Vortex	Thermolyne	Maxi Mix PLUS
Estufa	NATIONAL APPLIANCE CO.	-

## 6.1 Diseño experimental

Por sus características, el estudio realizado fue experimental, prospectivo, transversal y descriptivo, por lo cual se clasifica como un estudio experimental controlado.

## 6.2 Población de estudio

Tabletas de glimepirida de 4 mg, de acuerdo con el siguiente cuadro:

Cuadro 5. Población de estudio.		
Nombre del producto	Laboratorio fabricante	N° de lote
Amaryl	Sanofi aventis	5MXA002
Glupropan	Pisa	N15T051
Zukedib	Loeffler	R1503779
Glimepirida	Silanes	N1377901
Gleurix	Mavi Farmacéutica	5H1935

### 6.3 Criterios de inclusión

Tabletas de las marcas y lotes señalados en el cuadro 5, con fecha de caducidad vigente, con material de empaque íntegro.

### 6.4 Criterios de exclusión

Tabletas dañadas durante su almacenamiento, con cambios apreciables en sus características, tabletas que no cumplan con lo señalado en el cuadro 5.

### 6.5 Criterios de eliminación

Muestras que se pierdan durante el desarrollo experimental.

## 6.6 Variables

Cuadro 6. Variables experimentales.				
Variable		Tipo de variable	Forma de medirla	
Fase móvil	Composición de la solución amortiguadora	Continua	Uso de balanza analítica, microbalanza y probeta,	
	pH de solución amortiguadora	Continua	Uso de potenciómetro	
	Proporción de los componentes de la fase móvil	Continua	Ajuste por medio del software de uso del cromatógrafo	
Columna	Material de empaque	Discreta	Determinada por el fabricante	
	Dimensiones	Continua	Determinada por el fabricante	
	Tamaño de partícula	Continua	Determinada por el fabricante	
Tabletas	Formulación	Discreta	Determinada por el fabricante	
Características cromatográficas	Tiempo de retención	Discreta	Generadas por el equipo de cromatografía.	
	Área Bajo la Curva	Discreta		
	Ancho del pico	Discreta		
Condiciones de operación	Velocidad de flujo	Continua	mL/min	Controladas por equipo de cromatografía
	Volumen de inyección	Continua	μL	
	Longitud de onda	Continua	nm	

## 6.7 Metodología

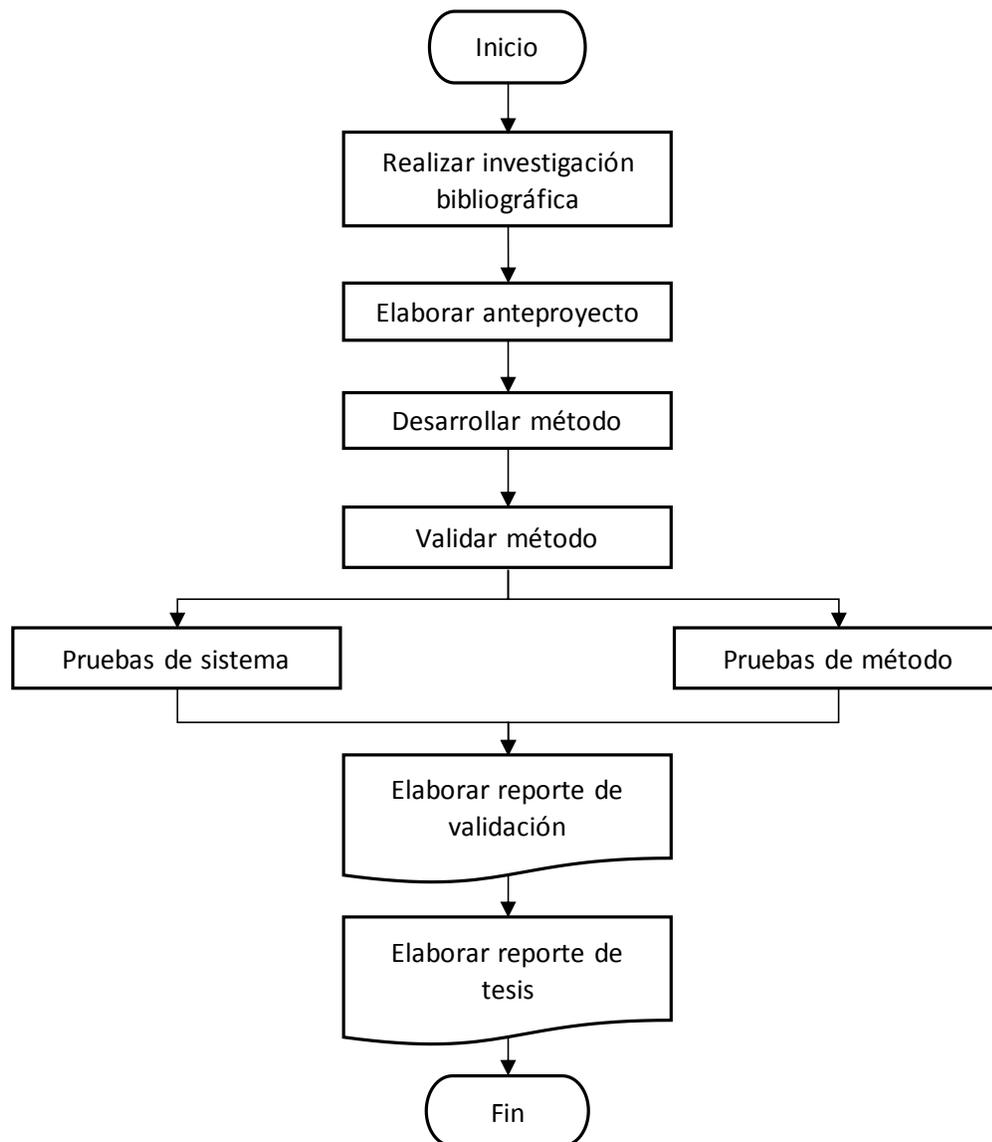


Figura 4. Diagrama de flujo del desarrollo del trabajo.

## **6.8 Técnicas**

### **6.8.1 Desarrollo de método**

#### **6.8.1.1 Determinación de longitud de onda de máxima absorción**

A una muestra de estándar de glimepirida disuelto utilizando fase móvil se le realizó un barrido utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer, la longitud de onda en la que se detectó la máxima señal fue la que se utilizó posteriormente para el análisis de todas las muestras.

#### **6.8.1.2 Análisis de muestras durante desarrollo de método**

En la etapa de desarrollo de método, se evaluaron distintas proporciones de fase móvil y velocidad de flujo. Además, se evaluó el comportamiento de excipientes de uso común en la fabricación de tabletas dentro del sistema cromatográfico, y el comportamiento del analito cuando se expone a distintos procesos de degradación forzada.

Para determinar la proporción de fase móvil y velocidad de flujo adecuadas para el método, se utilizaron dos proporciones de fase móvil y dos velocidades de flujo:

Proporción de fase móvil: Acetonitrilo y amortiguador de fosfatos 0.05 M con 1-octil sulfato de sodio  $10^{-5}$  M pH 5.25 55:45 y 50:50.

Velocidad de flujo: 2.0 y 2.2 mL/min.

Columna: Acclaim<sup>®</sup> 120 C-8, 5 µm de tamaño de partícula, dimensiones de 4.6x250 mm.

Longitud de onda: 227 nm.

Volumen de inyección: 50 µL.

Tiempo muerto: 0.81 min.

Los excipientes considerados para verificar la no interferencia dentro del método fueron celulosa microcristalina, lactosa, crospovidona, poliplasdone y almidón.

Para evaluar la posible interferencia de productos de degradación, se pesaron 10 mg de estándar de glimepirida, se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL y se disolvió y aforó utilizando metanol HPLC. Se tomaron cuatro alícuotas de 1 mL utilizando una micropipeta, se transfirieron a matraces volumétricos de 10 mL, cada uno de estos matraces se aforó utilizando soluciones de HCl 0.1 M, NaOH 0.1 M, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y metanol HPLC respectivamente, se homogeneizó la muestra y se transfirió a tubos de ensaye. Las muestras disueltas en HCl, NaOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se sometieron por dos días a calentamiento a 40°C en una estufa y la muestra disuelta en metanol se expuso por dos días a luz UV.

Una vez seleccionadas las condiciones de operación utilizando un cromatógrafo Varian ProStar, se evaluó el desempeño del método en un cromatógrafo Hitachi, considerando la resolución como parámetro para definir las condiciones de operación definitivas.

### 6.8.2 Optimización de método

En la etapa de optimización, se buscó disminuir los tiempos de corrida con la finalidad de mejorar la utilidad del método analítico. Para disminuir los tiempos de corrida, se evaluaron las condiciones de operación seleccionadas en la etapa de desarrollo de método en una columna Phenomenex luna C-18 de 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, con dimensiones de 4.6 x 150 mm y evaluando la resolución del sistema.

Las condiciones de operación seleccionadas para el método fueron las siguientes:

Proporción de fase móvil: Acetonitrilo y amortiguador de fosfatos 0.05 M con 1-octil sulfato de sodio  $10^{-5}$  M pH 5.25 50:50.

Velocidad de flujo: 2.0 mL/min.

Columna: Phenomenex luna C-18 de 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, con dimensiones de 4.6x150 mm

Longitud de onda: 227 nm.

Volumen de inyección: 50  $\mu\text{L}$ .

Tiempo muerto: 0.81 min.

### 6.8.3 Método analítico

En el siguiente apartado se describen el modo de preparación de la fase móvil y las muestras necesarias para utilizar el método analítico desarrollado.

#### 6.8.3.1 Preparación de fase móvil.

Reactivos:

Fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

Fosfato dibásico de potasio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )

1-octil sulfato de sodio ( $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{SO}_4\text{Na}$ )

Se pesaron 6.626 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 0.2282 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , se transfirieron a un vaso de precipitados de 2 L, se agregó 1 L de agua desionizada filtrada utilizando equipo Millipore Milli-Q<sup>®</sup>, se verificó que el pH fuera 5.25 en agitación. En caso de que el pH no fuera de 5.25, se ajustó utilizando soluciones de HCl o NaOH 0.1 M según corresponda. Una vez que la solución tuvo un pH de 5.25, se agregaron 2.136 mg de  $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{SO}_4\text{Na}$ . Esta solución tuvo una concentración de 0.05 M de sales del sistema amortiguador, y una concentración de  $10^{-5}$  M de agente formador de par iónico.

Se midieron con una probeta proporciones iguales de fase móvil y de acetonitrilo HPLC y se mezclaron, se verificó que la solución fuera translúcida e incolora. Se filtró la solución preparada utilizando filtros de nylon de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro,

utilizando equipo de filtración Milli-Q Millipore. Se desgasificó la solución filtrada durante 30 minutos.

La solución obtenida estaba libre de residuos sólidos mayores a  $0.22\ \mu\text{m}$  de diámetro y libre de gas disuelto, tenía una concentración de 0.05 M, pH 5.25 y una proporción 50:50 de acetonitrilo y amortiguador de fosfatos.

### **6.8.3.2 Preparación de estándar interno**

Se pesaron 3.0 mg de materia prima de glibenclamida utilizando microbalanza, se depositaron en un matraz volumétrico de 50 mL. Se agregó metanol y se agitó utilizando vortex hasta disolver completamente, se permitió que el líquido de las paredes descendiera y se aforó. La solución resultante tiene una concentración de  $60\ \mu\text{g/mL}$ .

### **6.8.3.3 Preparación del estándar**

Se pesaron 0.6 mg de estándar de glimepirida utilizando microbalanza, se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvió y aforó utilizando metanol HPLC. Se tomó una alícuota de 1 mL utilizando micropipeta y se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL y se aforó utilizando fase móvil. La solución resultante tuvo una concentración de  $6\ \mu\text{g/mL}$ .

#### **6.8.3.4 Preparación de la muestra**

Se pesaron 20 tabletas de glimepirida de 4 mg, se registró su peso, se transfirieron a un mortero y se trituraron utilizando un pistilo hasta obtener un polvo fino. Se determinó el peso promedio y se pesó, por triplicado, el equivalente a 0.5 mg de glimepirida y se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL. Se agregaron aproximadamente 10 mL de metanol HPLC a cada matraz, y se agitaron en vortex alrededor de un minuto. Se aforaron utilizando metanol y se permitió que sedimentara. Se tomó una alícuota de 3 mL utilizando pipeta volumétrica y transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL. Se agregó 1 mL de solución de estándar interno de glibenclamida de 60  $\mu\text{g/mL}$  utilizando micropipeta, se agregó fase móvil, se homogeneizó la muestra, se permitió que el líquido se deslizara desde las paredes hacia el fondo del matraz y se aforó con fase móvil. La solución resultante contenía 6  $\mu\text{g/mL}$  de glibenclamida y 6  $\mu\text{g/mL}$  de glimepirida aproximadamente.

#### **6.8.3.5 Análisis de la muestra**

Se depositaron alícuotas de cada muestra en viales para cromatógrafo de líquidos. Se configuró el equipo para analizar las muestras a una longitud de onda de 227 nm, a una velocidad de flujo de 2.0 mL/min, con un volumen de inyección de 50  $\mu\text{L}$  y un tiempo muerto de 0.81 minutos, utilizando una columna Phenomenex luna C-18 de 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, con dimensiones de 150 x 4.6 mm.

## **6.8.4 Validación de método analítico**

### **6.8.4.1 Validación de sistema**

#### **6.8.4.1.1 Verificación de sistema**

Se pesaron 5 mg de estándar de glimepirida, se transfirieron a un matraz volumétrico de 25 mL, se agregó metanol HPLC, se disolvió agitando en vortex por un minuto, hasta formar una disolución homogénea translúcida y se llevó al aforo con metanol. Se transfirieron 10 mL a un matraz volumétrico de 100 mL y se aforaron utilizando metanol HPLC. De esta solución se transfirieron 3 mL a un matraz de 10 mL, se agregó 1 mL de solución de estándar interno de 60  $\mu\text{g/mL}$  y se aforó utilizando fase móvil. Esta disolución se transfirió a un vial y se inyectó por quintuplicado utilizando las condiciones de operación establecidas en la etapa de optimización de método y se registró el tiempo de retención, el área bajo la curva, la asimetría del pico, el número de platos teóricos y el ancho del pico. Con los datos recolectados se determinó la media para resolución (R), factor de coe (T), selectividad ( $\alpha$ ), desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV)

#### **6.8.4.1.2 Precisión de sistema**

Se pesaron 5 mg de estándar de glimepirida, se transfirieron a un matraz volumétrico de 25 mL, se agregó metanol HPLC, se disolvió agitando en vortex por

un minuto, hasta formar una disolución homogénea translúcida y se llevó al aforo con metanol. Se transfirieron 10 mL a un matraz volumétrico de 100 mL y se aforaron utilizando metanol HPLC. De esta solución se transfirieron, por quintuplicado, 3 mL a matraces de 10 mL, se agregó 1 mL de solución de estándar interno de 60  $\mu\text{g/mL}$  a cada uno y se aforaron utilizando fase móvil. Estas disoluciones se transfirieron a viales y se inyectaron de acuerdo a las condiciones de operación establecidas en la etapa de optimización del método. Se registraron los datos obtenidos de área bajo la curva generados por el analito. Con los datos obtenidos se determinaron el promedio ( $\bar{y}$ ), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV).

#### **6.8.4.1.3 Linealidad del sistema**

Se pesaron 5 mg de estándar de glimepirida, se transfirieron a un matraz volumétrico de 25 mL, se agregó metanol HPLC, se disolvió agitando en vortex por un minuto, hasta formar una disolución homogénea translúcida y se llevó al aforo con metanol. Se transfirieron 10 mL a un matraz volumétrico de 100 mL y se aforaron utilizando metanol HPLC. De esta solución se transfirieron, por quintuplicado, 3 mL a matraces de 10 mL, se agregó 1 mL de solución de estándar interno de 60  $\mu\text{g/mL}$  a cada uno y se aforaron utilizando fase móvil. Estas disoluciones se transfirieron a viales y se inyectaron de acuerdo a las condiciones de operación establecidas en la etapa de optimización del método. Se registraron los datos obtenidos de área bajo la curva generados por el analito. Con los datos

obtenidos se graficó la concentración por nivel (x) contra la respuesta generada (y) y se determinaron la pendiente (m), la ordenada al origen (b), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), el error estándar de la regresión ( $S_{y/x}$ ), el error estándar de la pendiente ( $S_m$ ), el error estándar de la ordenada al origen ( $S_b$ ), el intervalo de confianza para la pendiente (IC m), el intervalo de confianza para la ordenada al origen (IC b), la suma de cuadrados de la regresión (SCR), la suma de cuadrados del error (SCER), la suma de cuadrados totales (SCT) y el valor de F Crítica ( $F_{\text{crit}}$ ).

#### **6.8.4.2 Validación de método**

##### **6.8.4.2.1 Valoración de tabletas de glimepirida**

Se pesaron 5 tabletas de glimepirida de cada marca perteneciente a la población de estudio utilizando microbalanza, se registraron sus pesos y se determinó el peso promedio por tableta. Se depositaron las tabletas pesadas en un mortero y se trituraron utilizando un pistilo hasta formar un polvo fino. Se pesó por triplicado el equivalente a 0.5 mg de glimepirida en polvo de tabletas, se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL, se agregó metanol HPLC y se agitó utilizando vortex por aproximadamente un minuto, se permitió que el líquido descendiera por las paredes del cuello de los matraces y se aforaron utilizando el mismo disolvente. Se tomaron alícuotas de 3 mL y se transfirieron a matraces volumétricos de 10 mL, se agregó a cada una 1 mL de solución de estándar interno de 60  $\mu\text{g/mL}$ , se agregó fase móvil y se homogeneizó la muestra, se permitió que el líquido descendiera por las paredes

del cuello de los matraces y se aforaron utilizando fase móvil. Se determinó el contenido promedio, la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV) de las determinaciones realizadas utilizando la siguiente ecuación:

$$C_x = \frac{C_c * A_x}{A_c}$$

Donde:

$C_x$  es la concentración de glimepirida en la muestra en mg/mL.

$C_e$  es la concentración de las muestras de control de calidad.

$A_c$  es la respuesta promedio del método a las muestras de control de calidad de glimepirida.

$A_x$  es la respuesta del método a la glimepirida en las muestras.

#### **6.8.4.2.2 Especificidad del método**

Se evaluaron las respuestas obtenidas a partir de los cromatogramas generados en desarrollo de método para excipientes de uso común en fabricación de tabletas y posibles productos de degradación. Para ello, se pesaron 10 mg de estándar de glimepirida, se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL y se disolvió y aforó utilizando metanol HPLC. Se tomaron cuatro alícuotas de 1 mL utilizando una micropipeta, se transfirieron a matraces volumétricos de 10 mL, cada uno de estos matraces se aforó utilizando soluciones de HCl 0.1 M, NaOH 0.1 M, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y metanol HPLC respectivamente, se homogeneizaron las muestras y se transfirieron a tubos

de ensaye. Las muestras disueltas en HCl, NaOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se sometieron por dos días a calentamiento a 40°C en una estufa y la muestra disuelta en metanol se expuso por dos días a luz UV.

Para la evaluación de interferencia de excipientes, se pesaron 1.2 mg de celulosa microcristalina, lactosa, crospovidona, poliplasdone y almidón, se transfirieron a matraces volumétricos de 10 mL, se les agregó metanol HPLC y se agitó por un minuto utilizando vortex, se permitió que el líquido descendiera por las paredes del cuello de los matraces y se aforaron. Se tomó 1 mL de cada una de estas soluciones y se transfirieron a matraces volumétricos de 10 mL y se aforaron con fase móvil. Además, se transfirió 1 mL de cada solución de 120 µg/mL a un matraz volumétrico de 10 mL, se adicionó 1 mL de una solución de estándar interno de 60 µg/mL y se aforó. Se verificó la ausencia de señales que pudiesen interferir con la cuantificación del analito.

#### **6.8.4.2.3 Exactitud del método**

Se pesó una muestra de 15.2637 mg de polvo de pool de tabletas de glimepirida, equivalente a 0.4128 mg de glimepirida, se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL, se agregó metanol grado HPLC y se agitó por un minuto utilizando vortex para disolver, se permitió que el disolvente se deslizara por las paredes del cuello del matraz y se aforó utilizando el mismo disolvente, se transfirieron por sextuplicado alícuotas de 3 mL a matraces volumétricos de 10 mL, se agregó 1 mL de solución

de estándar interno de 60 µg/mL y se llevó al aforo utilizando fase móvil, esta solución tuvo una concentración de 4.95 µg/mL de glimepirida.

Se determinó la cantidad de glimepirida en la muestra utilizando la ecuación empleada en la valoración, la cantidad recuperada, la desviación estándar y el estadígrafo t de Student para diferencia de medias. La cantidad recuperada se determinó por medio de la siguiente expresión:

$$\text{Cantidad recuperada (\%)} = \frac{\text{Cantidad cuantificada}}{\text{Cantidad adicionada}} * 100$$

#### **6.8.4.2.4 Linealidad del método**

Se pesaron por quintuplicado muestras de 15.2637 mg de polvo de pool de tabletas de glimepirida, equivalente a 0.4128 mg de glimepirida, y se transfirieron individualmente a matraces volumétricos de 25 mL. Se agregó metanol HPLC y se agitaron en vortex por aproximadamente un minuto para disolver, se permitió que el disolvente descendiera por las paredes del cuello de los matraces y se aforó utilizando el mismo disolvente. Se transfirieron, por triplicado y utilizando material volumétrico, alícuotas de 1, 2, 3, 4 y 5 mL de estas soluciones a matraces de 10 mL, se agregó 1 mL de solución de estándar interno de 60 µg/mL a cada solución y se llevaron al aforo con fase móvil. Con los datos obtenidos se graficó la concentración por nivel (x) contra la respuesta generada (y) y se determinaron la pendiente (m), la ordenada al origen (b), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), el error estándar de la regresión ( $S_{y/x}$ ), el error estándar de la pendiente ( $S_m$ ), el error

estándar de la ordenada al origen ( $S_b$ ), el intervalo de confianza para la pendiente ( $IC_m$ ), el intervalo de confianza para la ordenada al origen ( $IC_b$ ), la suma de cuadrados de la regresión (SCR), la suma de cuadrados del error (SCER), la suma de cuadrados totales (SCT) y el valor de F Crítica ( $F_{Crít}$ ).

#### **6.8.4.2.5 Precisión del método**

##### **6.8.4.2.5.1 Repetibilidad**

En un día, un analista pesó, por triplicado, 15.2637 mg de polvo de pool de tabletas de glimepirida, equivalente a 0.4128 mg de glimepirida, se transfirieron a matraces volumétricos de 25 mL, se les agregó metanol grado HPLC y se agitaron por un minuto en vortex para disolver, se permitió que el disolvente se deslizara por las paredes del cuello del matraz y se aforaron utilizando el mismo disolvente, se transfirieron alícuotas de 3 mL de cada matraz a matraces volumétricos de 10 mL, se les agregó 1 mL de solución de estándar interno de 60  $\mu\text{g/mL}$  y se aforaron utilizando fase móvil, esta solución tuvo una concentración de 4.95  $\mu\text{g/mL}$  de glimepirida.

Se determinó la cantidad recuperada, la media de la cantidad recuperada y el estadígrafo t de Student para diferencia entre dos medias.

#### **6.8.4.2.5.1 Precisión intermedia**

En dos días diferentes, dos analistas pesaron, por triplicado, 15.2637 mg de polvo de pool de tabletas de glimepirida, equivalente a 0.4128 mg de glimepirida, se transfirieron a matraces volumétricos de 25 mL, se les agregó metanol grado HPLC y se agitaron por un minuto en vortex para disolver, se permitió que el disolvente se deslizara por las paredes del cuello del matraz y se aforaron utilizando el mismo disolvente, se transfirió una alícuota de 3 mL de cada matraz a matraces volumétricos de 10 mL, se agregó 1 mL de solución de estándar interno de 60  $\mu\text{g/mL}$  y se llevó al aforo utilizando fase móvil, esta solución tuvo una concentración de 4.95  $\mu\text{g/mL}$  de glimepirida.

Se determinó si existía una diferencia estadística significativa en los resultados obtenidos por los analistas por medio de análisis de varianza.

#### **6.8.4.3 Estabilidad analítica de la muestra**

Se pesaron 15.2637 mg de polvo de pool de tabletas de glimepirida, equivalente a 0.4128 mg de glimepirida, se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL, se agregó metanol grado HPLC y se agitó por un minuto en vortex para disolver, se permitió que el disolvente se deslizara por las paredes del cuello del matraz y se aforó utilizando el mismo disolvente, se transfirió una alícuota de 3 mL a un matraz volumétrico de 10 mL, se agregó 1 mL de solución de estándar interno de 60  $\mu\text{g/mL}$

y se llevó al aforo utilizando fase móvil, esta solución tuvo una concentración de 4.95  $\mu\text{g/mL}$  de glimepirida, esta muestra se inyectó por triplicado y se registró la señal obtenida, y al transcurrir 4 horas se volvió a inyectar por triplicado, y se determinó si existió una diferencia significativa en el las señales obtenidas al transcurrir el tiempo, por medio del estadígrafo t de Student para diferencia de medias.

#### **6.8.4.4 Robustez**

Se pesaron 15.2637 mg de polvo de pool de tabletas de glimepirida, equivalente a 0.4128 mg de glimepirida, se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL, se agregó metanol grado HPLC y se agitó por un minuto en vortex para disolver, se permitió que el disolvente se deslizara por las paredes del cuello del matraz y se aforó utilizando el mismo disolvente, se transfirió una alícuota de 3 mL a un matraz volumétrico de 10 mL, se agregó 1 mL de solución de estándar interno de 60  $\mu\text{g/mL}$  y se llevó al aforo utilizando fase móvil, esta solución tuvo una concentración de 4.95  $\mu\text{g/mL}$  de glimepirida, esta muestra se inyectó por triplicado y se registró la señal obtenida de variando las condiciones de operación a un nivel alto y uno bajo, de acuerdo a la siguiente tabla:

Cuadro 7. Condiciones de operación utilizadas en el estudio de robustez.			
Parámetro de operación	Nivel de operación		
	Bajo	Normal	Alto
Velocidad de flujo	1.9	2.0	2.1
pH	5.20	5.25	5.30
Porcentaje de solución amortiguadora en fase móvil	48	50	52

Se registró la señal obtenida por el análisis de la muestra y se determinó si existió una diferencia significativa en las señales generadas por la variación de las condiciones de operación por medio del estadígrafo t de Student para diferencia de medias y por la diferencia porcentual absoluta entre los resultados de las condiciones de operación de prueba respecto a las condiciones normales de operación.

## 6.9 Análisis estadístico

### Promedio ( $\bar{y}$ , $\bar{x}$ )

Para un conjunto de datos  $x_1, x_2, \dots, x_n$  o  $y_1, y_2, \dots, y_n$ , se define el promedio como la suma de todos los valores, dividida entre el total de datos sumados, de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \text{ó} \quad \bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n}$$

Donde:

$x_i$  es la variable independiente

$y_i$  es la variable dependiente

### **Desviación estándar (S)**

Para un conjunto de datos  $y_1, y_2, \dots, y_n$ , se define la desviación estándar, S, por la siguiente expresión:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{y} - y)^2}{n - 1}}$$

Donde:

S es la desviación estándar

$\bar{y}$  es el promedio de la variable de respuesta, y

y es la variable de respuesta

n es el número de determinaciones realizadas o datos obtenidos

### **Coefficiente de variación (CV)**

Para un conjunto de determinaciones realizadas, se define el coeficiente de variación por la siguiente expresión:

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} * 100$$

Donde:

CV es el coeficiente de variación

S es la desviación estándar

$\bar{y}$  es el promedio de la variable de respuesta, y

### **Pendiente (m)**

Para una serie de parejas ordenadas  $(x_n, y_n)$ , se define la pendiente, m, por la siguiente expresión:

$$m = \frac{n \sum_{i=1}^n x_i y_i - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2}$$

Donde:

m es la pendiente

n es el número de parejas ordenadas  $(x_i, y_i)$

$x_i$  es la variable independiente

$y_i$  es la variable de respuesta

### **Ordenada al origen (b)**

Para una serie de parejas ordenadas  $(x_n, y_n)$ , se define la ordenada al origen, b, por la siguiente expresión:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n} - m \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

b es la ordenada al origen

n es el número de parejas ordenadas  $(x_i, y_i)$

m es la pendiente

$x_i$  es la variable independiente

$y_i$  es la variable de respuesta

### **Coefficiente de determinación ( $r^2$ )**

Para una serie de parejas ordenadas  $(x_n, y_n)$ , se define el coeficiente de determinación,  $r^2$ , por la siguiente expresión:

$$r^2 = \frac{m^2 \left[ \sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n} \right]}{\sum_{i=1}^n y_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n y_i)^2}{n}}$$

Donde:

$r^2$  es el coeficiente de determinación

$m$  es la pendiente

$n$  es el número de parejas ordenadas  $(x_i, y_i)$  consideradas para realizar el cálculo

$x_i$  es la variable independiente

$y_i$  es la variable de respuesta

### **Suma de Cuadrados de la Regresión (SCR)**

Para una serie de datos  $x_1, x_2, \dots, x_n$ , se define la Suma de Cuadrados de la Regresión, SCR, por la siguiente expresión:

$$SCR = m^2 \left[ \sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n} \right]$$

Donde:

SCR es la Suma de Cuadrados de la Regresión

m es la pendiente

n es el número de datos considerados para realizar el cálculo

$x_i$  es la variable independiente

### **Suma de Cuadrados del Error de la Regresión**

Para una serie de parejas ordenadas  $(x_n, y_n)$ , se define la Suma de Cuadrados del Error de la Regresión, SCER, por la siguiente expresión:

$$SCER = \sum_{i=1}^n y_i^2 - m \sum_{i=1}^n x_i y_i - b \sum_{i=1}^n y_i$$

Donde:

SCER es la Suma de Cuadrados del Error de la Regresión

m es la pendiente

b es la ordenada al origen

$x_i$  es la variable independiente

$y_i$  es la variable de respuesta

### **Suma de Cuadrados Total**

Para una serie de parejas ordenadas  $(x_n, y_n)$ , se define la Suma de Cuadrados Total, SCT, por la siguiente expresión:

$$SCT = \sum_{i=1}^n y_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n}$$

Donde:

SCT es la Suma de Cuadrados Total

n es el número de parejas ordenadas  $(x_i, y_i)$

$x_i$  es la variable independiente

$y_i$  es la variable de respuesta

### **Desviación estándar de los residuales-y ( $S_{y/x}$ )**

Para una serie de puntos  $y_n$ , se define la desviación estándar de los residuales-y,

$S_{y/x}$ , por la siguiente expresión:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

Donde:

$S_{y/x}$  es la desviación estándar de los residuales-y

$y_i$  es la variable de respuesta

$\hat{y}_i$  es el valor estimado de la variable de respuesta, obtenido de la ecuación de la recta.

n es el número de datos considerados para realizar el cálculo

### **Desviación estándar de la pendiente de la recta de regresión, $S_m$**

Para una serie de parejas ordenadas  $(x_n, y_n)$ , se define la desviación estándar de la pendiente de la recta de regresión,  $S_m$ , por la siguiente expresión:

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

Donde:

$S_m$  es la desviación estándar de la pendiente de la recta de regresión

$S_{y/x}$  es la desviación estándar de los residuales-y

$x_i$  es la variable independiente

$\bar{x}$  es el promedio de los datos de la variable independiente

### **Desviación estándar de la ordenada al origen de la recta de regresión, $S_b$**

Para una serie de parejas ordenadas  $(x_n, y_n)$ , se define la desviación estándar de la pendiente de la recta de regresión,  $S_m$ , por la siguiente expresión:

$$S_b = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$$

Donde:

$S_b$  es la desviación estándar de la ordenada al origen de la recta de regresión

$S_{y/x}$  es la desviación estándar de los residuales-y

$x_i$  es la variable independiente

$\bar{x}$  es el promedio de los datos de la variable independiente

### **Estadígrafo t para comparación entre una media encontrada y un valor teórico**

El estadígrafo t para comparar la desviación del valor de una media encontrada respecto a una media teórica es determinado mediante la siguiente expresión:

$$t = \left| \frac{\bar{y} - \mu}{\frac{S}{\sqrt{n}}} \right|$$

Donde:

t es el estadígrafo t de Student

$\bar{y}$  es el promedio de la variable de respuesta, y

$\mu$  es el valor teórico de la media contra la que se comparan los resultados obtenidos

S es la desviación estándar de la serie de datos

n es el número de datos utilizados para realizar los cálculos

### **Estadígrafo t para comparación entre dos medias encontradas**

El estadígrafo t para comparar la desviación del valor de la diferencia entre dos medias encontradas es determinado mediante la siguiente expresión:

$$t = \left| \frac{\bar{y}_1 - \bar{y}_2}{S \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \right|$$

Donde

t es el estadígrafo de contraste

$\bar{y}_1$  es el promedio de la variable de respuesta de la muestra 1

$\bar{y}_2$  es el promedio de la variable de respuesta de la muestra 2

$n_1$  es el número de datos de la muestra 1

$n_2$  es el número de datos de la muestra 2

S es la desviación estándar debida a las dos muestras, calculada por medio de la siguiente expresión:

$$S = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Donde

$S_1^2$  es la varianza de la muestra 1

$S_2^2$  es la varianza de la muestra 2

$n_1$  es el número de datos de la muestra 1

$n_2$  es el número de datos de la muestra 2

### **Cálculo de Intervalo de Confianza (IC)**

El intervalo de confianza para ambas pruebas t se determina mediante la siguiente expresión:

$$IC = \bar{y} \pm t_{1-\alpha/2, n-2} S$$

Donde:

IC es el intervalo de confianza

$t_{1-\alpha/2, n-2}$  es el valor de la distribución t cuando tiene una significancia de  $1-\alpha/2$  y  $n-2$  grados de libertad.

### **Análisis de varianza para linealidad del sistema**

El análisis de varianza para la linealidad del sistema se evalúa de acuerdo a la siguiente tabla:

Cuadro 8. Tabla de análisis de varianza para linealidad del sistema.				
Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	$F_{Calc}$
Regresión	1	SCR	$MCR = SCR$	$\frac{MCR}{MCER}$
Error de Regresión	$n-2$	SCER	$MCER = \frac{SCER}{n-2}$	

Donde:

SCR es la suma de cuadrados de la regresión

SCER es la suma de cuadrados del error de la regresión

MCR es la media de cuadrados de la regresión

MCER es la media de cuadrados del error de la regresión

## Precisión intermedia del método

Para evaluar la precisión intermedia del método, se utilizó el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_{j(i)} + e_{k(ij)}$$

Donde:

$\mu$  es la media general

$A_i$  es el factor analista con  $i=1, 2, a$  niveles.

$D_{j(i)}$  es el factor día con  $j=1,2, d$  niveles.

$e_{k(ij)}$  es el error experimental con  $k=1, 2, 3, r$  repeticiones

Se calculan las sumas de cuadrados de acuerdo a las siguientes expresiones:

### Suma de cuadrados del analista (SCA<sub>i</sub>)

$$SCA_i = \frac{\sum Y_{i..}^2}{dr} - \frac{Y_{...}^2}{adr}$$

### Suma de cuadrados del día (SCD<sub>j(i)</sub>)

$$SCD_{j(i)} = \frac{\sum \sum Y_{ij.}^2}{r} - \frac{Y_{i..}^2}{dr}$$

### Suma de cuadrados del error (SCE<sub>k(ij)</sub>)

$$SCE_{k(ij)} = \sum \sum \sum Y_{ijk}^2 - \frac{\sum \sum Y_{ij.}^2}{r}$$

## Análisis de varianza para precisión intermedia

El análisis de varianza para la precisión intermedia se realiza de acuerdo a la siguiente tabla:

Cuadro 9. Tabla de Análisis de varianza para precisión intermedia.				
Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	$F_{Calc}$
Analista	$a-1$	$SCA_i$	$MCA = \frac{SCA_i}{a-1}$	$\frac{MCA_i}{MCD_{j(i)}}$
Día	$(d-1)a$	$SCD_{j(i)}$	$MCD = \frac{SCD_{j(i)}}{(d-1)a}$	$\frac{MCD_{j(i)}}{MCE_{k(ij)}}$
Error experimental	$(k-1)ad$	$SCE_{k(ij)}$	$MCE = \frac{SCE_{k(ij)}}{(k-1)ad}$	

Donde:

$SCA_i$  es la suma de cuadrados del analista

$SCD_{j(i)}$  es la suma de cuadrados del día

$SCE_{k(ij)}$  es la suma de cuadrados del error experimental

MCA es la media de cuadrados del analista

MCD es la media de cuadrados del día

MCE es la media de cuadrados del error experimental

### **Variación interanalistas**

La variación interanalistas se determina por medio de la siguiente expresión

$$\text{Variación interanalistas} = \pm \sqrt{\frac{MCA - MCD}{rd}}$$

### **Variación interdías**

$$\text{Variación interdías} = \pm \sqrt{\frac{MCD - MCE}{r}}$$

### **Precisión intermedia**

$$\text{Precisión intermedia} = \pm \sqrt{MCE}$$

### **Media general**

$$\mu = \frac{Y_{...}}{n}$$

### **Desviación estándar total**

$$S = \sqrt{\frac{n \sum \sum \sum Y_{ijk}^2 - (Y_{...})^2}{n(n-1)}}$$

## 7. Resultados

### 7.1 Desarrollo de método

#### 7.1.1 Determinación de longitud de onda de máxima absorción

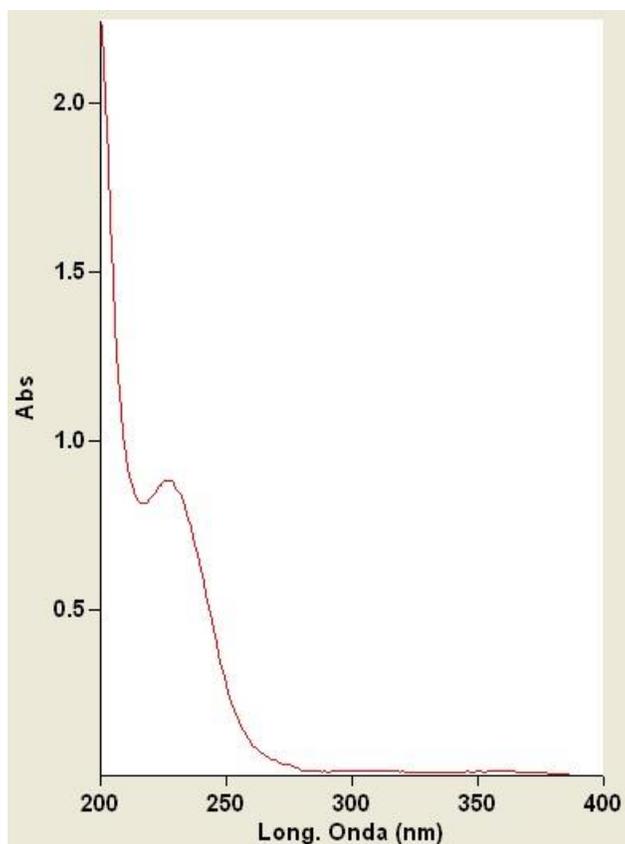


Figura 5. Barrido de solución estándar de glimepirida de 10 mg/mL en fase móvil de Acetonitrilo:amortiguador de fosfatos pH 5.25 0.05 M con ácido 1-octil sulfónico  $10^{-5}$  M.

A partir de este barrido, se determinó que la longitud de onda de máxima absorción en fase móvil es de 227 nm.

### 7.1.2 Determinación de las condiciones de operación del método

Condiciones de operación:

Cuadro 10. Condiciones de operación al inicio de desarrollo del método.	
Fase móvil	Amortiguador de fosfatos:Acetonitrilo 45:55 0.05M pH 5.25, 1-octilsulfonato de sodio 2.136 mg/1000 mL de solución amortiguadora.
Longitud de onda	227 nm
Velocidad de flujo	2.2 mL/min
Volumen de inyección	50 µL
Columna	Acclaim <sup>®</sup> 120 C-8 5 µm 120 A° 4.6x250 mm
Cromatógrafo	Varian ProStar

Cuadro 11. Resultados en inicio de desarrollo de método.				
Muestra		Tiempo de retención (min)	Área (mAu*s)	Ancho de la base (min)
Glibenclamida 8 µg/mL		5.94	177.8	0.23
Glimepirida 8 µg/mL		6.71	166.3	0.27
Mezcla	Glibenclamida	5.91	115.8	0.23
	Glimepirida	6.71	55.4	0.25
			Resolución	3.33

Tras la determinación de las condiciones de operación, se probaron las mismas en un cromatógrafo HITACHI PRIMAIDE, se obtuvieron los siguientes resultados:

Cuadro 12. Resultados de transferencia de método a cromatógrafo HITACHI PRIMAIDE.

Muestra	Concen- tración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Tiempo de retención (min)	Área (Au*min)	Tiempo de retención de estándar interno (min)	Área de estándar interno (AU*min)
Glimepirida	2	4.5965	74400.50	4.1365	187389.00
Glimepirida	4	4.5435	117357.50	4.1335	194844.00
Glimepirida	6	4.5935	171326.00	4.13	204707.50
Glimepirida	8	4.5865	237629.00	4.113	197550.50
Glimepirida	10	4.5735	287543.00	4.1065	194749.00

$r^2$  0.98239928

m 27327.825

b 4.6046

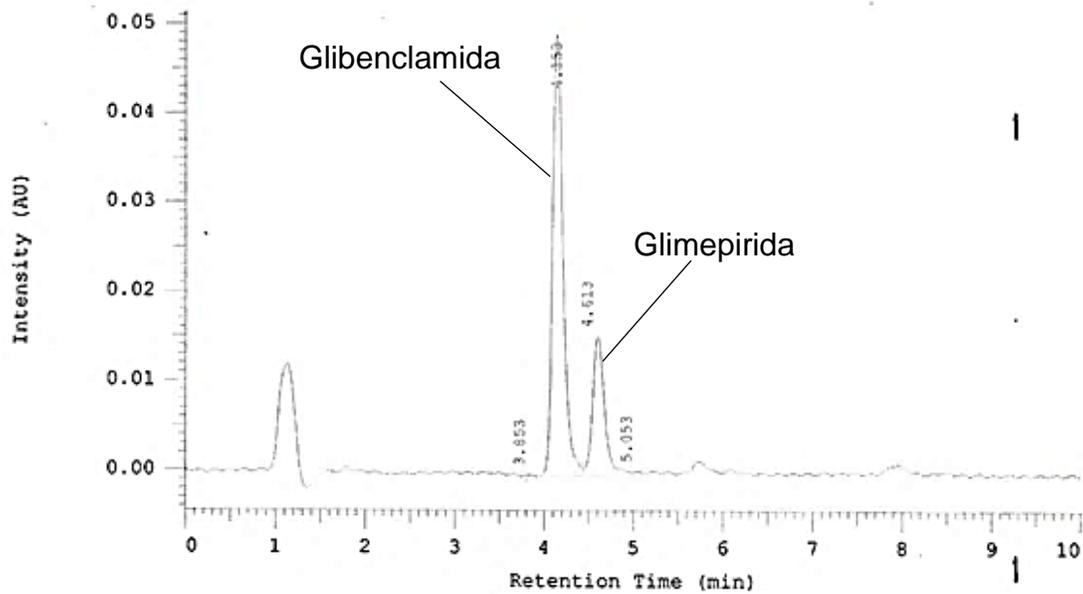


Figura 6. Cromatograma de mezcla de glibenclamida (pico 1) y glimepirida (pico 2) en concentraciones de 6  $\mu\text{g/mL}$  y 2  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.

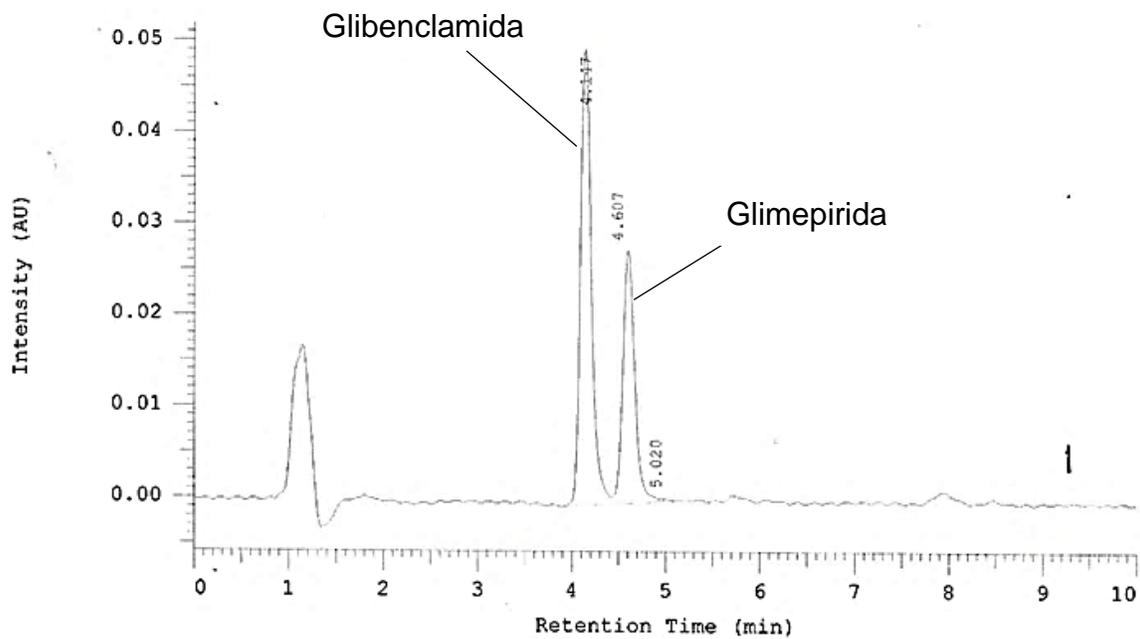


Figura 7. Cromatograma de mezcla de glibenclamida (pico 1) y glimepirida (pico 2) en concentraciones de 6  $\mu\text{g/mL}$  y 4  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.

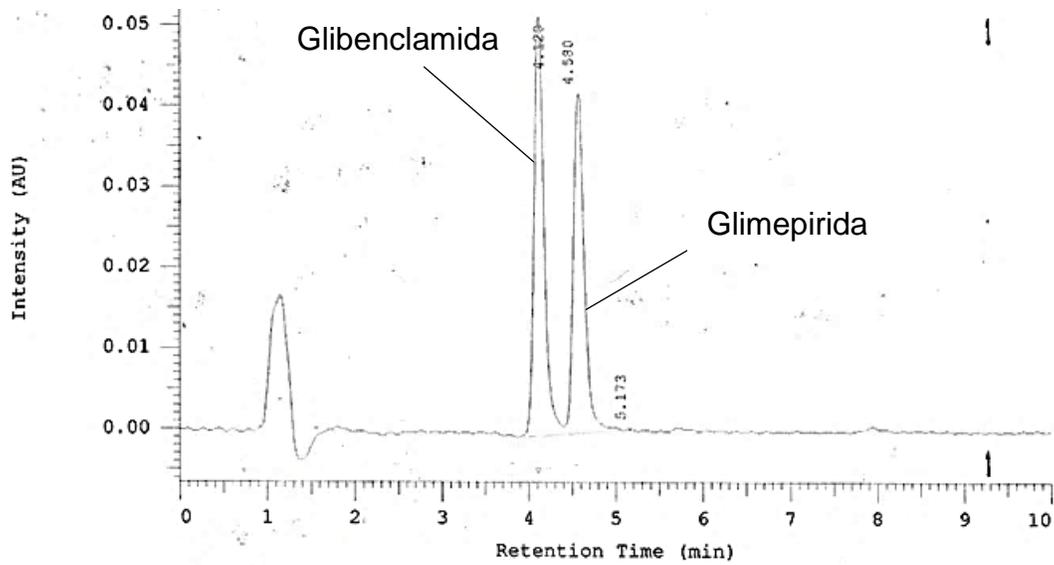


Figura 8. Cromatograma de mezcla de glibenclamida (pico 1) y glimepirida (pico 2) en concentraciones de 6 µg/mL y 6 µg/mL respectivamente.

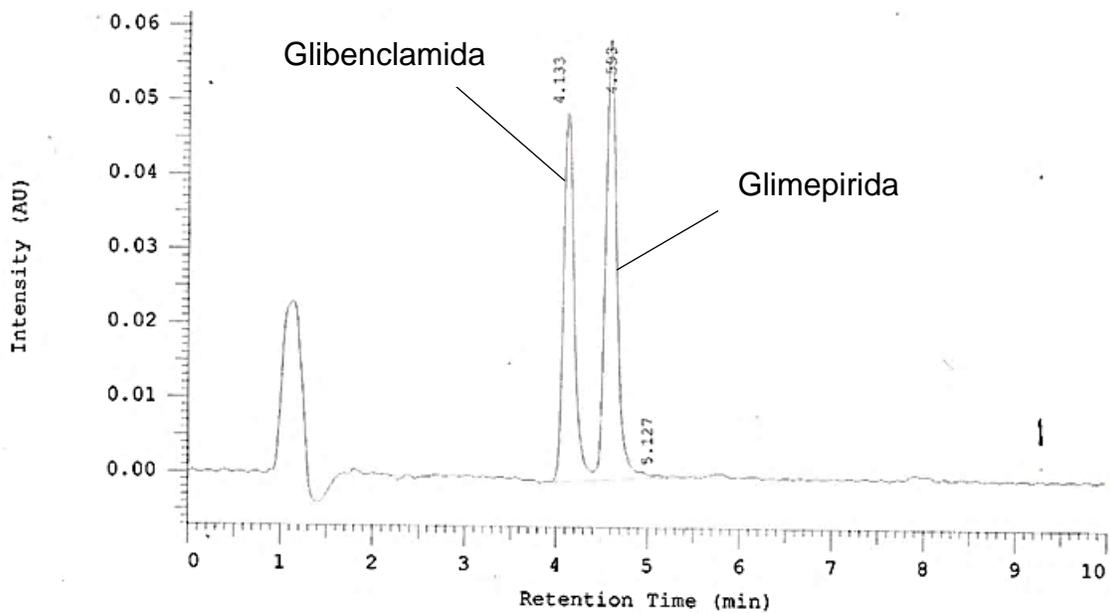


Figura 9. Cromatograma de mezcla de glibenclamida (pico 1) y glimepirida (pico 2) en concentraciones de 6 µg/mL y 8 µg/mL respectivamente.

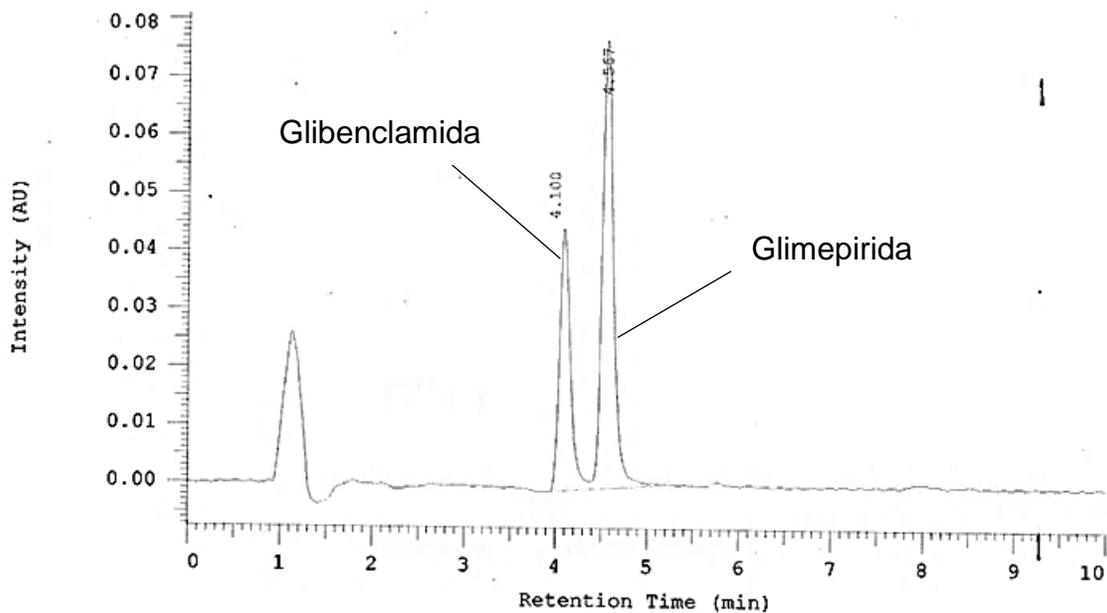


Figura 10. Cromatograma de mezcla de glibenclamida (pico 1) y glimepirida (pico 2) en concentraciones de 6  $\mu\text{g/mL}$  y 10  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.

A pesar de que se observa correlación entre la concentración de glimepirida y la respuesta del equipo a dicha concentración, las condiciones de operación no permitieron la separación mínima necesaria entre el analito de interés y el estándar interno, debido a esto se modificó la proporción de la fase móvil y la velocidad de flujo, obteniendo los siguientes resultados:

Cuadro 13. Condiciones de operación modificadas en desarrollo del método.	
Fase móvil	Amortiguador de fosfatos:Acetonitrilo 50:50 0.05M pH 5.25, 1-octilsulfonato de sodio 2.136 mg/1000 mL de solución amortiguadora.
Longitud de onda	227 nm
Velocidad de flujo	2.0 mL/min
Volumen de inyección	50 µL
Columna	Acclaim <sup>®</sup> 120 C-8 5 µm 120 A° 4.6x250 mm
Cromatógrafo	HITACHI PRIMAIDE

Bajo estas condiciones de operación se evaluó la resolución para los dos puntos de menor concentración en la curva patrón a utilizar, y se obtuvieron los siguientes resultados:

Cuadro 14. Resultados de modificación de condiciones de operación para ser utilizado en cromatógrafo HITACHI PRIMAIDE.				
Componente	Concentración (mg/mL)	Tiempo de retención (min)	Ancho del pico en la base (min)	Resolución
Glibenclamida	6	6.600	0.30	2.240
Glimepirida	2	7.440	0.45	
Glibenclamida	6	6.580	0.18	4.420
Glimepirida	4	7.420	0.20	

## 7.2 Optimización de método

Una vez que se obtuvo la resolución adecuada en ambos cromatógrafos, se sustituyó la columna utilizada en las primeras etapas de desarrollo de método, para lo cual se consideraron dos parámetros, siendo estos la longitud de la columna y la longitud de las cadenas alquílicas unidas a los grupos silanol del empaque de la columna. Las condiciones de operación del método utilizadas durante la optimización del método fueron las siguientes:

Cuadro 15. Condiciones de operación durante la etapa de optimización del método.	
Fase móvil	Amortiguador de fosfatos:Acetonitrilo 45:55 0.05M pH 5.25, 1-octilsulfonato de sodio 2.136 mg/1000 mL de solución amortiguadora.
Longitud de onda	227 nm
Velocidad de flujo	2.2 mL/min
Volumen de inyección	50 µL
Columna	Phenomenex Luna C-18 5 µm 90-110 A° 4.6x150 mm
Cromatógrafo	Varian ProStar

Al evaluar muestras de mezclas de analito y de estándar interno se obtuvieron los siguientes resultados:

Cuadro 16. Resultados de optimización de condiciones de operación de método.				
Componente	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Tiempo de retención (min)	Ancho del pico en la base (min)	Resolución
Glibenclamida	6	4.58	0.21	3.55
Glimepirida	6	5.38	0.24	
Glibenclamida	6	4.56	0.21	3.60
Glimepirida	6	5.37	0.24	
Glibenclamida	6	4.56	0.21	3.60
Glimepirida	6	5.37	0.24	

Una vez establecidas las pruebas de que el método permite la separación necesaria entre analito y estándar interno se procedió a validar el método.

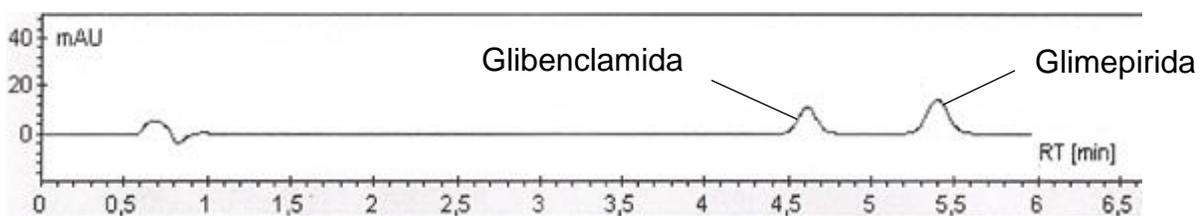


Figura 11. Resultados de optimización de método. Cromatogramas correspondientes a una muestra de glibenclamida y glimepirida en concentración de  $6 \mu\text{g/mL}$ .

### 7.3 Validación de sistema

#### 7.3.1 Adecuabilidad de sistema

Cuadro 17. Resultados de adecuabilidad de sistema: asimetría de picos, número de platos teóricos.						
	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Tiempo de retención (min)	Área (mAU*seg)	Asimetría	NPT	Ancho de pico (min)
Glibenclamida	6	4.58	107.3	1.04	7591.65	0.21
	6	4.57	107.5	1.02	7598.67	0.21
	6	4.55	107.5	1.04	7595.57	0.21
	6	4.54	107.4	1.00	7555.50	0.21
	6	4.53	107.4	1.04	7624.03	0.21
Glimepirida	6	5.38	96.2	1.03	8212.23	0.24
	6	5.37	96.1	1.04	8196.14	0.24
	6	5.35	95.7	1.02	8171.30	0.24
	6	5.34	96.1	1.03	8235.87	0.24
	6	5.33	96.0	1.02	8224.37	0.24

Cuadro 18. Resultados de adecuabilidad de sistema: verificación de la consistencia en la respuesta.

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área (mAU*seg)	Área-promedio	(Área-promedio) <sup>2</sup>
6	96.2	0.18	0.0324
6	96.1	0.08	0.0064
6	95.7	-0.32	0.1024
6	96.1	0.08	0.0064
6	96	-0.02	0.0004
$\Sigma y$	480.1	$\Sigma (y-\bar{y})^2$	0.148

N	5
Promedio ( $\bar{y}$ )	96.02
S	0.19235384
CV	0.20032685

Cuadro 19. Resultados de adecuabilidad de sistema: resolución, factor de coleo y selectividad.

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Resolución (R)	Factor de coleo (T)	Selectividad ( $\alpha$ )
6	3.56	1.03	1.17
6	3.56	1.04	1.18
6	3.56	1.02	1.18
6	3.56	1.03	1.18
6	3.56	1.02	1.18
Promedio	3.56	1.03	1.18

Resumen de resultados de adecuabilidad del sistema

Resumen de resultados

CV 0.200326849

Resolución (R) 3.56

Factor de coleo (T) 1.03

Selectividad ( $\alpha$ ) 1.18

### 7.3.2 Precisión del sistema

Cuadro 20. Resultados de precisión de sistema.			
Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área (mAU*seg)	Área-promedio	(Área-promedio) <sup>2</sup>
6	97.1	-0.88	0.7744
6	98.9	0.92	0.8464
6	98.0	0.02	0.0004
6	98.6	0.62	0.3844
6	97.3	-0.68	0.4624
Promedio	97.98	$\Sigma (y-\bar{y})^2$	2.468

n            5

Promedio ( $\bar{y}$ ) 97.98

S            0.78549348

CV           0.80168756

### 7.3.3 Linealidad del sistema

Cuadro 21. Resultados de linealidad de sistema.	
Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Promedio área (mAU*seg)
2.00	28.5666
4.00	54.4000
6.00	81.9000
8.00	113.1666
10.00	143.9333

m 14.475

b -2.457

$r^2$  0.99740665

n 15

$S_{y/x}$  2.242

$S_m$  0.019

$S_b$  1.358

$t_{0.975, 13}$  2.160

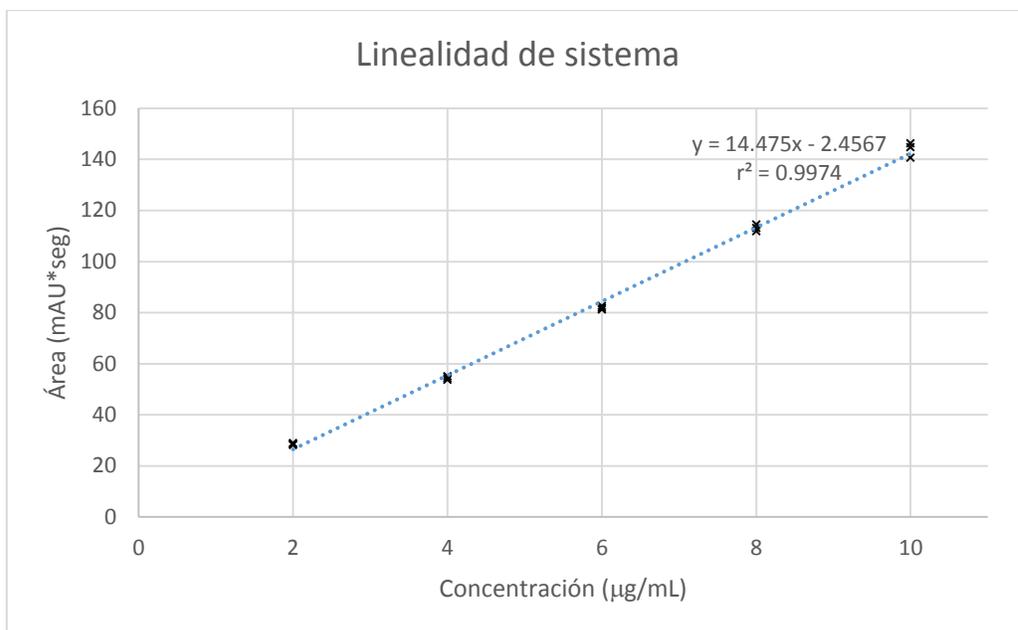


Figura 12. Gráfico de linealidad de sistema.

**Intervalo de confianza para la pendiente (m) y la ordenada al origen (b)**

Cuadro 22. Intervalo de confianza para la pendiente (m) y la ordenada al origen (b).		
	Límite inferior	Límite superior
IC m	14.435	14.515
IC b	-5.390	0.477

**Análisis de varianza**

SCR	25143.075
SCER	65.374
SCT	25208.449

Cuadro 23. Análisis de varianza para linealidad del sistema.					
Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F <sub>Calc</sub>	F <sub>Crít</sub>
Regresión	1	25143.075	25143.075	4999.821	4.667
Error de Regresión	13	65.374	5.028		

H<sub>0</sub>: Existe una relación lineal significativa entre el área bajo la curva y la cantidad de analito adicionada ( $F_{\text{Calc}} \geq F_{\text{Crít}}$ ).

H<sub>1</sub>: No existe una relación lineal significativa entre el área bajo la curva y la cantidad de analito adicionada ( $F_{\text{Calc}} < F_{\text{Crít}}$ ).

Conclusiones:

- El intervalo de confianza para la pendiente no incluye al cero, por lo no existe evidencia estadística de que la pendiente sea igual a cero, con una significancia del 95%, aceptando la hipótesis alterna.
- El intervalo de confianza para la ordenada al origen incluye al cero, por lo cual existe evidencia estadística de que la ordenada al origen es igual a cero, con una significancia del 95%, aceptando la hipótesis nula.
- Debido a que el valor de  $F_{\text{Calc}}$  es mayor al valor de  $F_{\text{Crít}}$ , existe una relación lineal significativa entre el área bajo la curva y la cantidad de analito adicionada y, por tanto, existe linealidad del sistema de medición.

## 7.4 Validación de método

### 7.4.1 Valoración de pool de tabletas

Cuadro 24. Peso de tabletas de glimepirida de diferentes marcas.					
	Glupropan	Zukedib	Farmacias del ahorro	Amaryl	Gleurix
Peso de las tabletas (mg)	140.742	121.972	118.631	172.507	160.632
	146.939	122.078	121.970	170.782	163.200
	151.090	120.254	118.622	167.503	158.814
	147.320	122.107	118.293	170.291	161.446
	149.584	122.593	119.035	171.269	160.526
	n	25	Promedio 143.928 mg/tableta		

Cuadro 25. Peso de muestras de pool para valoración.		
Muestra	Peso (mg)	Respuesta
1	17.993	100.8
2	17.996	99.3
3	17.988	99.8
FD	83.3333333	

Cuadro 26. Resultados de control de calidad para la valoración de pool de tabletas de glimepirida.

Control de calidad	Concentración	Respuesta
Glibenclamida	6	113.3
Glimepirida 1	6	102.2
Glimepirida 2	6	101.9
Glimepirida 3	6	104
Promedio		102.7
DS		1.13578167
CV		1.10592178

Cuadro 27. Resultados de la valoración de pool de tabletas de glimepirida.

Muestra	Concentración (µg/mL)	Concentración*FD(µg)	Concentración (mg)	Concentración por tableta (mg)	Concentración porcentual (%)
1	5.889	490.750	0.491	3.926	98.139
2	5.801	483.447	0.483	3.867	96.663
3	5.831	485.881	0.486	3.888	97.192
Promedio				3.8932535	97.3313374
DS				0.02991975	0.74799385
CV				0.76850259	0.76850259

## 7.4.2 Especificidad del método

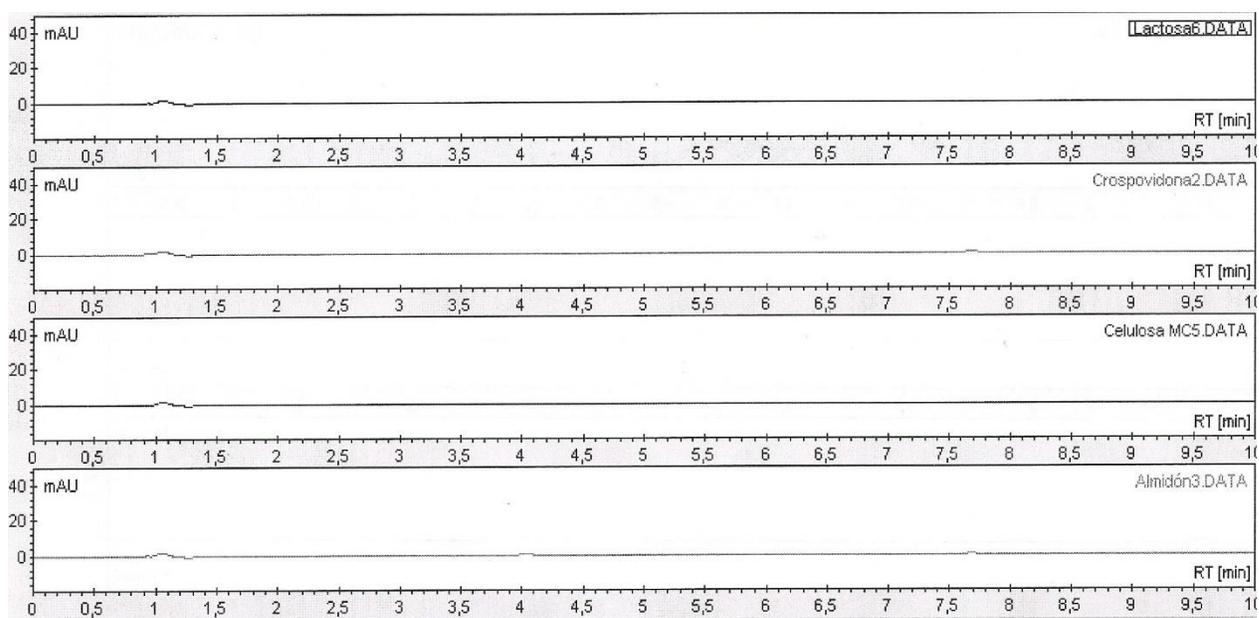


Figura 13. Resultados de exactitud: cromatogramas correspondientes a muestras de lactosa, crospovidona, celulosa microcristalina y almidón de maíz, respectivamente.

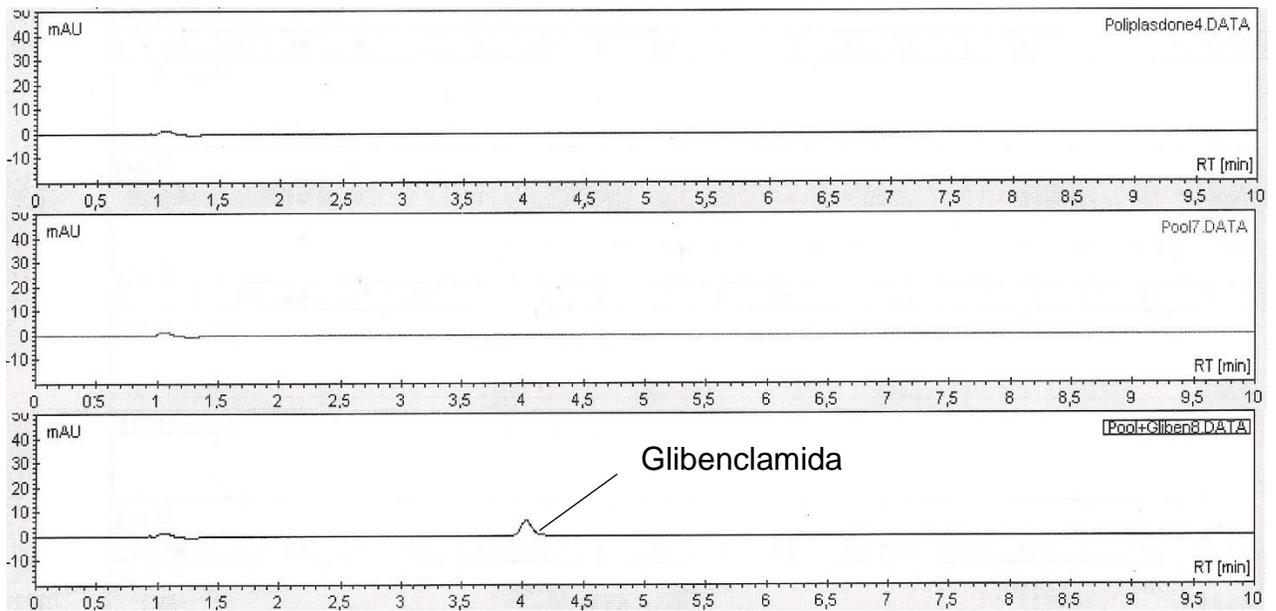


Figura 14. Resultados de exactitud: cromatogramas correspondientes a muestras de poliplasdone, pool de excipientes y pool de excipientes cargado con estándar interno, respectivamente.

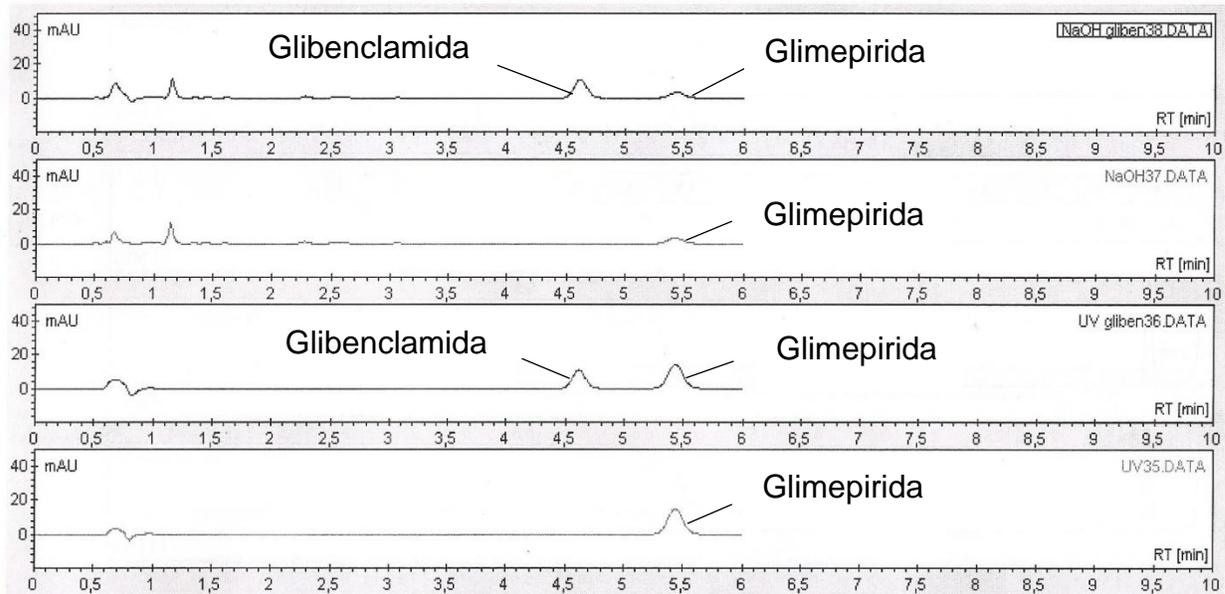


Figura 15. Resultados de exactitud: cromatogramas correspondientes a muestras de glimepirida sometida a condiciones de degradación alcalina y fotolítica en luz UV, las muestras se inyectaron sin estándar interno y con estándar interno.

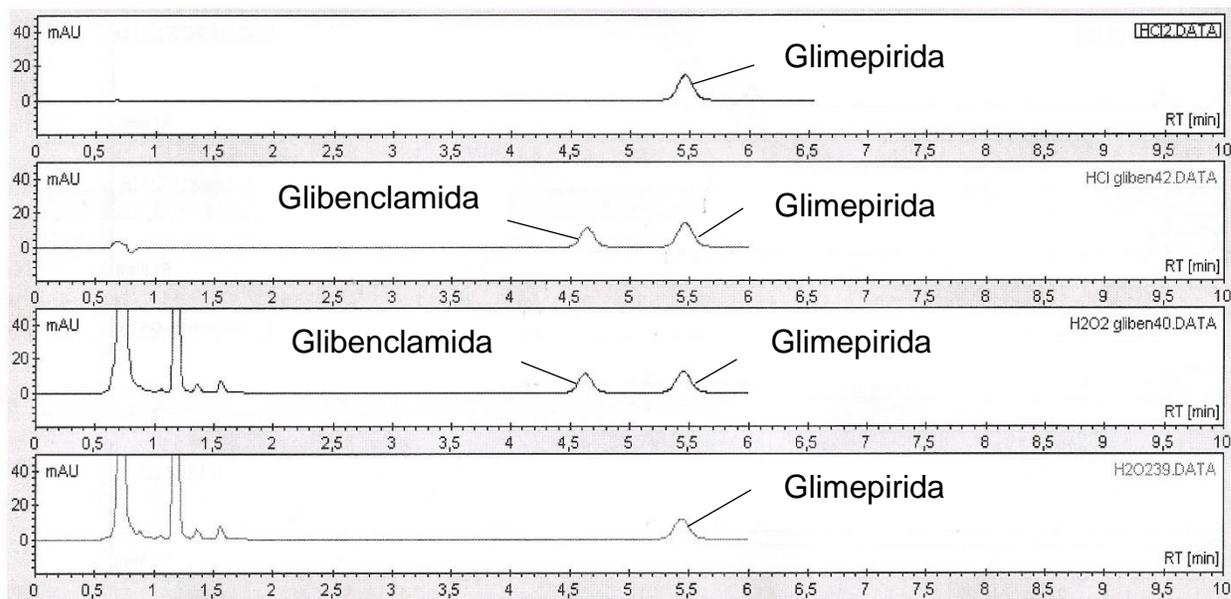


Figura 16. Resultados de exactitud: cromatogramas correspondientes a muestras de glimepirida sometida a condiciones de degradación ácida y oxidativa, las muestras se inyectaron sin estándar interno y con estándar interno.

### 7.4.3 Exactitud del método

Cuadro 28. Resultados de control de calidad para la valoración de pool de tabletas de glimepirida.

Control de calidad	Concentración	Respuesta
Glibenclamida	6	113.3
Glimepirida 1	6	102.2
Glimepirida 2	6	101.9
Glimepirida 3	6	104
Promedio		102.7
DS		1.13578167
CV		1.10592178

Cuadro 29. Resultados de exactitud de método.

Cantidad adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	ABC analito	Cantidad recuperada (%)
4.95	84.3	99.495
4.95	84.8	100.086
4.95	83.3	98.315
4.95	84.3	99.495
4.95	84.3	99.495
4.95	84.5	99.731

n	6
Promedio	99.436
s	0.59599923
$t_{calc}$	2.316
$t_{0.975,5}$	2.571

$H_0$ : La cantidad recuperada es igual a la cantidad adicionada

$H_1$ : La cantidad recuperada es diferente a la cantidad adicionada

Ya que  $t_{Calc}$  es menor que  $t_{Crit}$  se acepta la hipótesis nula, no existe diferencia significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada, por lo cual el método analítico es exacto.

#### 7.4.4 Linealidad del método

Cuadro 30. Resultados de linealidad de método.	
Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Promedio área (mAU*seg)
1.65	27.4000
3.30	55.3333
4.95	84.4667
6.60	116.8000
8.25	140.8333

m	17.475
b	-1.533
$r^2$	0.9983061
n	15
$S_{y/x}$	1.804
$S_m$	0.022
$S_b$	1.093
$t_{0.975, 13}$	2.160

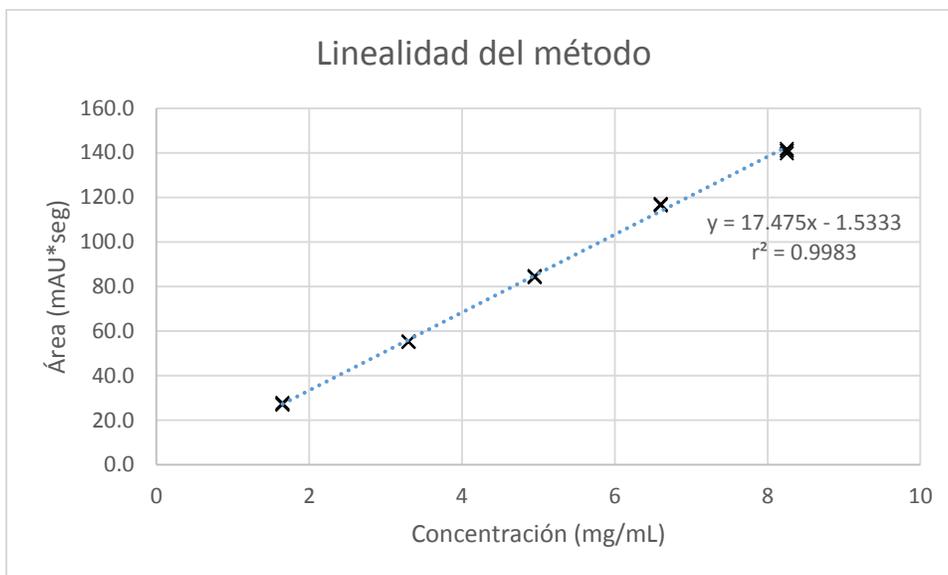


Figura 17. Gráfico de linealidad del método.

Cuadro 31. Intervalo de confianza para la pendiente (m) y la ordenada al origen (b).		
	Límite inferior	Límite superior
IC m	15.114	19.835
IC b	-3.894	0.827

Análisis de varianza

SCR 24940.833

SCER 42.320

SCT 24983.153

Cuadro 32. Análisis de varianza para linealidad del método.					
Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media de Cuadrados	F <sub>Calc</sub>	F <sub>Crít</sub>
Regresión	1	24940.833	24940.833	7661.409	4.667
Error de Regresión	13	42.320	3.255		

H<sub>0</sub>: Existe una relación lineal significativa entre el área bajo la curva y la cantidad de analito adicionada ( $F_{\text{Calc}} \geq F_{\text{Crít}}$ ).

H<sub>1</sub>: No existe una relación lineal significativa entre el área bajo la curva y la cantidad de analito adicionada ( $F_{\text{Calc}} < F_{\text{Crít}}$ ).

Conclusiones:

- El intervalo de confianza para la pendiente no incluye al cero, por lo no existe evidencia estadística que esta sea igual a cero, por lo cual se acepta la hipótesis alterna.
- El intervalo de confianza para la ordenada al origen incluye al cero, por lo cual existe evidencia estadística de que esta es igual a cero, aceptando la hipótesis nula.
- Debido a que el valor de  $F_{\text{Calc}}$  es mayor al valor de  $F_{\text{Crít}}$ , existe una relación lineal significativa entre el área bajo la curva y la cantidad de analito adicionada y, por tanto, existe linealidad del método de medición.

## 7.4.5 Precisión

### 7.4.5.1 Repetibilidad

Cuadro 33. Resultados de repetibilidad.

Peso (mg)	Respuesta (mAU*seg)	Cantidad adicionada ( $\mu\text{g}$ )	Cantidad recuperada ( $\mu\text{g}$ )	Porcentaje de recobro (%)
15.273	84.2	413.135	417.647	101.092
15.272	84.3	413.108	411.275	99.556
15.269	83.3	413.027	416.667	100.881

Promedio	100.510
n	3
DS	0.83261808
CV	0.8283939
t <sub>Crit</sub>	1.0608
t <sub>0.975, 4</sub>	4.3027

### 7.4.5.2 Precisión intermedia

Cuadro 34. Resultados de precisión intermedia (mAU*seg).		
Analista (i)		
Día (j)	1	2
1	85.6	84.2
	86.4	84.3
	88.7	83.3
2	85.2	83.1
	83.9	82.5
	85	81.1

SCA            22.14

SCD            11.60

SCe            8.87

Cuadro 35. Análisis de varianza para precisión intermedia.					
Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F <sub>Calc</sub>	F <sub>Crit</sub>
Analista	1	22.14	22.14	3.82	5.32
Día	2	11.60	5.80	5.23	4.46
Error experimental	8	8.87	1.11		

Variación interanalistas	1.65042082
Variación interdías	1.25011111
Precisión intermedia	1.05316982
Media general	84.44
Desviación estándar total	1.96813633
CV	2.33076443

$H_0$ : No existe evidencia de que se presente una diferencia significativa debida al factor analista o día ( $F_{\text{Calc}} \leq F_{\text{Crit}}$ ).

$H_1$ : Existe evidencia de que se presente una diferencia significativa debida al factor analista o día ( $F_{\text{Calc}} > F_{\text{Crit}}$ ).

Conclusiones:

- No existe evidencia suficiente de que existan diferencias significativas en los resultados debidas al factor analista, por lo cual el método es reproducible por los analistas, aceptando la hipótesis nula.

#### 7.4.6 Estabilidad analítica de la muestra

Cuadro 36. Resultados de estabilidad analítica de la muestra.		
Tiempo (h)	0	4
Número de inyección	Respuesta (mAU*seg)	Respuesta (mAU*seg)
1	85.2	85.9
2	85.5	85.2
3	84.7	85.7
Promedio	85.13	85.6
N	3	3
DS	0.40414519	0.36055513
CV	0.47472027	0.42120926
S <sub>total</sub>	0.38297084	
t <sub>Crít</sub>	1.492	
t <sub>0.975,4</sub>	2.776	

Conclusión:

No existe evidencia de que la señal obtenida del análisis de la muestra sea significativamente diferente al transcurrir un periodo de 4 h desde la preparación y primera inyección de la misma.

### 7.4.7 Robustez

Cuadro 37. Resultados de robustez: variación de velocidad de flujo.				
Velocidad de flujo (mL/min)		2	1.9	2.1
pH de la solución amortiguadora		5.25	5.25	5.25
Porcentaje de solución amortiguadora en fase móvil		50	50	50
Respuesta		mAU*seg	mAU*seg	mAU*seg
Número de inyección	1	79.1	85.3	77.1
	2	81.3	85.3	76.7
	3	80.3	85.2	76.9
Promedio		80.23	85.27	76.90
N		3	3	3
DS		1.10151411	0.05773503	0.20000000
CV		1.37288838	0.06771113	0.26007802
DS global		-	0.77995726	0.79162281
t <sub>Crít</sub>		-	7.904	5.157
t <sub>0.975,4</sub>		-	2.776	2.776
Diferencia absoluta porcentual (%)		-	6.2733	4.1545

Cuadro 38. Resultados de robustez: variación de pH.				
Velocidad de flujo (mL/min)		2	2	2
pH de la solución amortiguadora		5.25	5.2	5.3
Porcentaje de solución amortiguadora en fase móvil		50	50	50
Respuesta		mAU*seg	mAU*seg	mAU*seg
Número de inyección	1	79.9	80.7	80.2
	2	80.4	79.9	79.9
	3	80.33	80.4	79.8
Promedio		80.23	80.33	79.97
N		3	3	3
DS		1.10151411	0.40414519	0.281666
CV		1.37288838	0.5030853	0.26031672
DS global		-	0.82965856	0.7926748
t <sub>Crit</sub>		-	0.148	0.412
t <sub>0.975,4</sub>		-	2.776	2.776
Diferencia absoluta porcentual (%)		-	0.1246	0.3323

Cuadro 39. Resultados de robustez: variación de proporción de componentes de fase móvil.				
Velocidad de flujo (mL/min)		2	2	2
pH de la solución amortiguadora		5.25	5.25	5.25
Porcentaje de solución amortiguadora en fase móvil		50	48	52
Respuesta		mAU*seg	80.6	79.3
Número de inyección	1	80	79.3	77.1
	2	79.9	79.6	76.7
	3	80.17	79.40	76.9
Promedio		80.23	80.17	79.40
N		3	3	3
DS		1.10151411	0.37859389	0.17320508
CV		1.37288838	0.47225849	0.21814242
DS global		-	0.82360994	0.78845841
t <sub>Crit</sub>		-	0.099	1.294
t <sub>0.975,4</sub>		-	2.776	2.776
Diferencia absoluta porcentual (%)		-	0.0831	1.0386

H<sub>0</sub>: La media de los resultados obtenidos en condiciones normales de operación es igual a la media de los resultados obtenidos tras cambios pequeños pero deliberados.

H<sub>1</sub>: La media de los resultados obtenidos en condiciones normales de operación es diferente a la media de los resultados obtenidos tras cambios pequeños pero deliberados.

Conclusiones:

- Modificar la velocidad de flujo en  $\pm 0.1$  mL/min causa que las medias de las respuestas del método sean significativamente diferentes respecto a las condiciones normales de operación.
- Modificar el pH en  $\pm 0.05$  no modifica significativamente las medias de las respuestas del método respecto a las condiciones normales de operación.
- Modificar la proporción de solución amortiguadora en fase móvil en  $\pm 2\%$  no modifica significativamente la media de las respuestas del método respecto a las condiciones normales de operación.

## **8. Análisis de resultados.**

En la etapa de desarrollo de método la selección de la longitud de onda se realizó con base en los resultados del barrido realizado a una muestra de analito cuya última dilución se realizó utilizando fase móvil, esto se hace con la finalidad de verificar que el analito no precipita cuando el medio circundante es la fase móvil

evitando así que se dañe el equipo por sustancias no disueltas,<sup>29</sup> la longitud de onda seleccionada fue de 227 nm, como se puede observar en la Figura 5 no existen picos adyacentes a este máximo de absorción, los cambios de pendiente no son grandes en las rectas adyacentes al máximo, por lo cual se disminuye la posibilidad de que existan grandes variaciones en las medidas generadas con pequeños cambios en la longitud de onda de detección y se puede obtener una señal debida a la presencia del analito en las muestras.<sup>30,31</sup>

En los Cuadros 11 y 12 y Figuras 6-10 se observa que existen diferencias entre los resultados generados en dos cromatógrafos distintos bajo las mismas condiciones de operación; estas diferencias pueden deberse a variaciones en la velocidad de flujo, en la cantidad de luz emitida por ambos cromatógrafos o a variaciones en la proporción de la fase móvil, ya que el cromatógrafo HITACHI PRIMAIIDE posee una bomba cuaternaria que permite configurar el equipo para la selección de la proporción de los componentes de la fase móvil, mientras que la preparación de fase móvil para el cromatógrafo Varian ProStar se realiza de forma manual para la medición de las proporciones de los componentes acuoso y orgánico y es, en consecuencia, susceptible a una mayor variación en las proporciones de los componentes debido a la apreciación del analista; debido a lo anterior fue necesario modificar las condiciones de operación para que el método resultase de utilidad en ambos cromatógrafos. Se decidió modificar la proporción de la fase móvil y la velocidad de flujo, como se puede observar en el Cuadro 13, con la finalidad de mejorar la resolución del sistema sin afectar en gran medida la forma de los picos, situación que pudo haberse presentado si se modificaba el pH de la solución

amortiguadora, ya que esto modifica el grado de ionización del analito, modificando su afinidad por las soluciones acuosas y disminuyendo su afinidad por las cadenas alquílicas del empaque de la columna, ensanchando los picos.<sup>30</sup>

Una vez que el método logró la separación necesaria, se procedió a optimizar el método. Se decidió seleccionar una columna de menor longitud pero con cadenas alquílicas de mayor longitud, ya que de esta manera es mayor la afinidad del analito y del estándar interno por el empaque de la columna, pero es menor la distancia que tienen que recorrer dentro de la misma, disminuyendo así los tiempos de retención y manteniendo la resolución necesaria, esto puede observarse en el Cuadro 14.<sup>32</sup>

Una vez establecidas las condiciones de operación del método se procedió a validar el mismo. En la evaluación de adecuabilidad del sistema se encontró que no existe interferencia en el método debida al sistema cromatográfico, evaluada a través de la resolución, factor de coe, selectividad y el coeficiente de variación de las determinaciones realizadas, siendo estos parámetros cromatográficos críticos ya que evidencian la capacidad del sistema para separar dos analitos, a la par que evalúan la simetría de los picos de los componentes en la mezcla, y la reproducibilidad con la que se logran estos resultados para una misma muestra, descartando la posibilidad de gran variabilidad debida al equipo utilizado para procesar las muestras o debido al analito en el sistema cromatográfico, como se puede observar en los Cuadros 17-19.<sup>33</sup>

En la evaluación de la precisión del sistema se evaluó la concordancia entre los resultados generados por muestras preparadas a partir de la misma solución patrón,

esto indica la variabilidad en los resultados obtenidos debidos al sistema de medición cuando las muestras se generan a partir de la misma solución patrón, se encontró que no se presenta variabilidad significativa en los resultados obtenidos.<sup>33</sup>

En la evaluación de la linealidad del sistema se encontró que existe una relación lineal significativa entre la cantidad adicionada del analito y la respuesta generada por el sistema, descartando la posibilidad de que exista un comportamiento no lineal en los resultados debidos a interferencias por interacción del analito y el sistema cromatográfico, demostrado a través del análisis de varianza y por medio de intervalos de confianza, evidenciando que la ordenada al origen es igual a cero y la pendiente es igual a uno, con un nivel de significancia del 95%, lo anterior se puede observar en los Cuadros 21-23 y la Figura 12.<sup>33</sup>

En la evaluación de la especificidad del método se determinó la posibilidad de encontrar interferencias causadas por excipientes y productos de degradación de la glimepirida; se encontró que no existen interferencias en la cuantificación debidas a la presencia de lactosa, crospovidona, celulosa microcristalina, almidón o poliplasdone, como se puede observar en las Figuras 12 y 13, además, se puede observar que no existen interferencias debidas a la presencia de los excipientes en la misma muestra, como se puede observar en la Figura 14. En la evaluación de las muestras sometidas a condiciones de degradación no se presentan señales que pudiesen interferir en la cuantificación del principio activo, sin embargo, se observa un gran decremento en la intensidad de la señal generada por la glimepirida en la muestra sometida a hidrólisis alcalina, así como la presencia de señales de señales en tiempos de retención inferiores a los del estándar interno, lo mismo sucede en la

muestra sometida a condiciones de degradación oxidativa, como se puede observar en los cromatogramas de las Figuras 15 y 16. Lo anterior puede deberse a que la glimepirida presenta grupos hidrolizables en distintas porciones de la molécula, ya sea en los carbonilos pertenecientes a los grupos urea o al grupo sulfonilo. Además, es posible que la molécula sufra oxidación debida a la presencia de dobles enlaces en su estructura, lo anterior se puede observar en la Figura 1.<sup>34</sup>

En la evaluación de la exactitud del método se determinó la variación en los resultados generados por muestras obtenidas a partir de la misma solución. Por medio de una prueba t se determinó que no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos de la cantidad recuperada respecto a la cantidad adicionada, evidenciando, de esta manera, que no existe una variación significativa entre los resultados obtenidos debidos al analista ni a los excipientes presentes en las distintas formulaciones.<sup>33</sup>

En la evaluación de la linealidad del método se determinó la existencia de una relación lineal significativa entre la cantidad de analito obtenida a partir de muestras preparadas independientemente a distintos niveles y la respuesta del método de medición, además se determinó que la pendiente es igual a 1 y la ordenada al origen es igual a 0 con un nivel de significancia del 95%; lo anterior demuestra que no existen desviaciones significativas en la relación entre la cantidad de analito extraído de la muestra y la respuesta analítica, desviaciones que pueden deberse a interferencias por efectos matriz, además, al existir evidencia de que la ordenada al origen igual a 0 y la pendiente igual a 1, no existen constantes de corrección que afecten significativamente la linealidad debidas a efectos de matriz, lo anterior se

puede observar en los resultados reportados en los Cuadros 31, 32 y en la Figura 17.<sup>33</sup>

En la evaluación de la repetibilidad del método se determinó la variación entre los resultados obtenidos a partir de muestras preparadas por triplicado por un analista en el mismo día, encontrando que no existe evidencia de que los resultados varíen significativamente debido al analista en un mismo día, descartando la posibilidad de interferencias en los resultados obtenidos debidos a la forma de trabajo de un analista en un corto intervalo de tiempo.<sup>33</sup>

En la evaluación de la precisión intermedia se sometieron a Análisis de Varianza los resultados obtenidos por dos analistas, en dos días distintos, encontrando que no existen diferencias significativas en los resultados debidas al factor analista, pero si existen diferencias significativas debidas al factor día. Una causa probable de estas variaciones puede ser variaciones en el desempeño del equipo en distintos días, las cuales provocaron variaciones significativas en los resultados obtenidos, sin embargo, a pesar de que el Análisis de Varianza demuestra que no existe diferencia significativa debida a los analistas, se puede observar que, de hecho, la variación en los resultados obtenidos es mayor debida a los analistas que entre dos días distintos, así mismo, el coeficiente de variación refleja que existe una variabilidad significativa debida al efecto del factor analista y al factor día. Una forma de disminuir dicha variabilidad puede ser instruir a los analistas en la forma de llevar a cabo el desarrollo experimental, homologando así la forma de trabajo en el laboratorio y disminuyendo el impacto del factor analista en los resultados obtenidos; los resultados anteriores se pueden observar en los Cuadros 34 y 35.<sup>33</sup>

En la evaluación de la estabilidad analítica de la muestra se determinó si existió una diferencia significativa entre las señales generadas por una muestra en un tiempo inicial y la misma muestra al haber transcurrido de 4 horas, al no haberse encontrado diferencias significativas en este periodo de tiempo se asume que la muestra no sufre ningún tipo de degradación que pudiese afectar su cuantificación al permanecer en condiciones ambientales en un intervalo de 4 horas.<sup>33, 35</sup>

En la evaluación de la robustez del método se evaluaron las diferencias entre las señales generadas por muestras preparadas y analizadas bajo variaciones pequeñas pero deliberadas, siendo el pH, la velocidad de flujo y la proporción de solución amortiguadora en la fase móvil los parámetros seleccionados para evaluar este parámetro. Se encontró que no existe diferencia significativa al modificar en  $\pm 0.05$  el valor de pH, ni al modificar en  $\pm 2\%$  la proporción de solución amortiguadora en la fase móvil, sin embargo, el cambiar en  $\pm 0.1$  mL la velocidad de flujo si modifica significativamente las señales generadas por el método, demostrado por medio de la prueba t de Student y por la diferencia absoluta porcentual, esto puede deberse a que al aumentar o disminuir la velocidad de flujo se modifica el tiempo de contacto entre el analito y las cadenas alquílicas del empaque de la columna, generando modificaciones en la dispersión del analito en la banda cromatográfica, modificando la cantidad de analito detectada por unidad de tiempo, siendo esta la posible razón del incremento y decremento significativo en el área bajo la curva, observándose una relación de proporcionalidad inversa entre la velocidad de flujo y el área bajo la curva.<sup>33, 35</sup>

## 9. Conclusiones

Se logró desarrollar un método analítico específico, exacto, lineal, repetible y robusto a variaciones de  $\pm 0.05$  en el pH de operación y  $\pm 2\%$  en la proporción de solución amortiguadora en la fase móvil, además se encontró que las muestras son estables al menos durante un periodo de 4 horas posteriores a su preparación y análisis. Este método satisface las características de desempeño requeridas por la normatividad vigente, así mismo, la preparación de la fase móvil y de las muestras resulta sencilla, y la corrida de las muestras se lleva a cabo en un tiempo inferior a 6 minutos, permitiendo, además, separar al analito, glimepirida, del estándar interno, glibenclamida, lo cual es de utilidad si se desea realizar cálculos de concentración utilizando el método del estándar interno.

## 8. Referencias

1. Hernández Abad VJ, Sánchez González EG, Vázquez Lira JC, Mora Guevara JLA, Mendoza Mata MT. Introducción a las técnicas cromatográficas instrumentales más utilizadas en el Análisis Farmacéutico. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2008.
2. Connors K. Curso de análisis farmacéutico (ensayo del medicamento). España: Reverté; 1980.
3. Christian GD. Química analítica. 6ª ed. México: McGraw-Hill Educación; 2009.
4. Waters. HPLC - High Performance Liquid Chromatography. Waters THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE®. [http://www.waters.com/waters/es\\_MX/HPLC--High-Performance-Liquid-Chromatography-Beginner%27s-Guide/nav.htm?cid=10048919&locale=es\\_MX](http://www.waters.com/waters/es_MX/HPLC--High-Performance-Liquid-Chromatography-Beginner%27s-Guide/nav.htm?cid=10048919&locale=es_MX) (último acceso 24 junio 2016)
5. Kazavevich YV. HPLC Theory. En: Ahuja S, Rasmussen H (eds.). Separation Science and Technology Volume 8 HPLC Method Development for Pharmaceuticals. Italia: Academic Press; 2007. 13-44.
6. Jimidar MI, Smet MD. HPLC Method development in late phase pharmaceutical development. En: Ahuja S, Rasmussen H, (eds.). Separation Science and Technology Volume 8 HPLC Method Development for Pharmaceuticals. Italia: Academic Press; 2007. 373-405.
7. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 11ª edición. Ciudad de México: Secretaria de Salud; 2014.

8. Sanofi-Aventis Canada Inc. Product Monograph AMARYL. Quebec: Sanofi-aventis Canada Inc; <http://products.sanofi.ca/en/amaryl.pdf> (último acceso 24 junio 2016)
9. O'Neil MJ. The Merck Index: An encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. 14<sup>a</sup> ed. Nueva Jersey: Merck; 2006.
10. Mohd AB, Sanka K, Gullapelly R, Diwan PV, Shastri N. Development and validation of RP-HPLC method for glimepiride and its application for a novel self nanoemulsifying powder (SNEP) formulation analysis and dissolution study. J Anal Sci Technology 2014; 5(27). <http://jast-journal.springeropen.com/articles/10.1186/s40543-014-0027-0> (último acceso 24 junio 2016)
11. Bonfilio R, de Araújo MB, Salgado HRN. Development and Validation of an UV-Derivative Spectrophotometric Method for Determination of Glimepiride in Tablets. J Braz Chem Soc 2010; 22(2): 292-299. <http://www.scielo.br/pdf/jbchs/v22n2/v22n2a15.pdf> (último acceso 24 junio 2016)
12. Bhargavi S, Suryasagar G, Sowmya DK, Ashok K, Nama S. UV Spectrophotometric Method for Determination of Glimepiride in Pharmaceutical Dosage Forms. Int J Pharm Sci Rev Res. 2013; 21(2): 131-133. <http://globalresearchonline.net/journalcontents/v21-2/23.pdf> (último acceso 24 junio 2016)
13. Induri M, Raju B, Prasad R, Reddy P. Development and Validation of A Spectrophotometric Method for Quantification and Dissolution Studies of Glimepiride

in Tablets. E-J Chem. 2011; 9(2): 993-998.

[https://www.researchgate.net/publication/258388035\\_Development\\_and\\_Validation\\_of\\_a\\_Spectrophotometric\\_Method\\_for\\_Quantification\\_and\\_Dissolution\\_Studies\\_of\\_Glimepiride\\_in\\_Tablets](https://www.researchgate.net/publication/258388035_Development_and_Validation_of_a_Spectrophotometric_Method_for_Quantification_and_Dissolution_Studies_of_Glimepiride_in_Tablets) (último acceso 24 junio 2016)

14. PubChem.

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/glimepiride#section=Top> (último acceso 24 junio 2016)

15. Langtry HD. Balfour JA. Glimepiride A Review of its Use in the Management of Type 2 Diabetes Mellitus. Drugs. 1998; 55(4): 563-584. <http://link.springer.com/article/10.2165/00003495-199855040-00007> (último acceso 24 junio 2016)

16. Comisión de Autorización Sanitaria Dirección Ejecutiva de Autorización de Productos y Establecimientos. Registros sanitarios de medicamentos alopáticos expedidos de enero a diciembre de 2012. Comisión de Autorización Sanitaria <http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/RegistroSanitarioMedicamentos/Alop%C3%A1ticos%202012-2.pdf> (último acceso 23 julio 2016)

17. Comisión de Autorización Sanitaria Dirección Ejecutiva de Autorización de Productos y Establecimientos. Registros sanitarios de medicamentos alopáticos expedidos 2015. Comisión de Autorización Sanitaria. <http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/RegistroSanitarioMedicamentos/Alop%C3%A1ticos%202015.pdf> (último acceso 23 julio 2016)

18. Comisión de Autorización Sanitaria Dirección Ejecutiva de Autorización de Productos y Establecimientos. Relación de registros sanitarios de medicamentos que han sido prorrogados. Comisión de Autorización Sanitaria <http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/RegistroSanitarioMedicamentos/Prorroga2011.pdf> (último acceso 23 julio 2016)

19. Comisión de Autorización Sanitaria Dirección Ejecutiva de Autorización de Productos y Establecimientos. Relación de registros sanitarios de medicamentos que han sido prorrogados. Comisión de Autorización Sanitaria. <http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/RegistroSanitarioMedicamentos/Prorroga2012.pdf> (último acceso 23 julio 2016)

20. Comisión de Autorización Sanitaria Dirección Ejecutiva de Autorización de Productos y Establecimientos. Registros de medicamentos prorrogados en 2014. Comisión de Autorización Sanitaria. <http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/RegistroSanitarioMedicamentos/Pr%C3%B3rrogas%20Aprobadas%202014.pdf> (último acceso 23 julio 2016)

21. Comisión de Autorización Sanitaria Dirección Ejecutiva de Autorización de Productos y Establecimientos. Registros de medicamentos prorrogados en 2015. Comisión de Autorización Sanitaria. <http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/RegistroSanitarioMedicamentos/Pr%C3%B3rrogas%20Aprobadas%202015.pdf> (último acceso 23 julio 2016)

22. Nirupa G, Tripathi T. RP-HPLC Analytical Method Development and Validation for simultaneous Estimation of Three Drugs: Glimepiride, Pioglitazone, and

Metformin and Its Pharmaceutical Dosage Forms. J Chem. 2013. <https://www.hindawi.com/journals/jchem/2013/726235/> (último acceso 18 agosto 2016)

23. Wanjari DB, Gaikwad NJ. Reversed Phase HPLC Method for Determination of Glimepiride in Tablet Dosage Form. Indian J Pharm Sci. 2005. <http://www.ijpsonline.com/articles/reversed-phase-hplc-method-for-determination-of-glimepiride-in-tablet-dosage-form.pdf> (último acceso 18 agosto 2016)

24. Maslarska V. Development, estimation and validation of glimepiride in pharmaceutical formulation by HPLC method. Int J Pharm Sci Res. 2014; 5(8): 3195-3198. <http://ijpsr.com/bft-article/development-estimation-and-validation-of-glimepiride-in-pharmaceutical-formulation-by-hplc-method/> (último acceso 18 agosto 2016)

25. Harris DC. Análisis químico cuantitativo. 6ª ed. España: Reverté; 2007.

26. Atkins PW, Paula J. Physycal Chemistry for the Life Sciences. 2ª ed. Italia: Freeman and Company; 2011

27. Brown TL, LeMay HE, Bursten BE, Burdge JR. Química La ciencia central. 9ª ed. México: Pearson Prentice Hall; 2004

28. Bhargavi S, Gopisetty S, Sowmya DK, Ashok K, Nama S. UV Spectrophotometric Method for Determination of Glimepiride in Pharmaceutical Dosage Forms. Int J Pharm Sci Rev Res. 2013; 21(2): 131-133. [https://www.researchgate.net/publication/255786829\\_UV\\_Spectrophotometric\\_Met](https://www.researchgate.net/publication/255786829_UV_Spectrophotometric_Met)

hod\_for\_Determination\_of\_Glimepiride\_in\_Pharmaceutical\_Dosage\_Forms (último acceso 24 noviembre 2016)

29. Pryde A, Gilbert MT. Applications of High Performance Liquid Chromatography. 1ª ed. Inglaterra: Chapman & Hall Ltd.; 1979.

30. Gabhe SY, Mahadik KR, Potawale SE, Thati AB. Development And Validation of Chromatographic Methods For Simultaneous Quantification of Drugs In Bulk And In Their Formulations: HPLC And HPTLC Techniques. 1ª ed. Alemania: Anchor Academic Publishing; 2015.

31. Rasmussen HT, Li W, Redlich D, Jimidar MI. HPLC Method Development. En: Ahuja S, Dong MW (eds.). Separation Science and Technology Volume 6 Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC. Reino Unido: Academic Press; 2005. 144-188.

32. Hamilton S, Bertrand A. The Analytical Interface and the Impact on Pharmaceutical Process Development. En: Blacker AJ, Williams MT (eds.). RSC Drug Discovery Series No. 9 Pharmaceutical Process Development Current Chemical and Engineering Challenges. Reino Unido: RSC Publishing; 2011. 260-284.

33. Hernández Abad VJ, Mora Guevara JLA, Sánchez Ruiz JF. Validación de Métodos Analíticos. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2006.

34. Bansal G. Singh M, Jindal KC, Singh S. LC-UV-PDA and LC-MS studies to characterize degradation products of glimepiride. J Pharm Biomed Anal. 2008;

48(2008):788-795.<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073170850800>

4081 (último acceso 5 febrero 2017)

35. McPolin O. Validation of Analytical Methods for Pharmaceutical Analysis. Reino Unido: Mourn Training Services; 2009.