



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO
ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR GLIMEPIRIDA EN
PLASMA DE RATA POR CLAR**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO

PRESENTA:

MARICRUZ HERNANDEZ HERNANDEZ

Director: Dr. Vicente J Hernández Abad
Asesora: Dra. Elizabeth G Sánchez González



2019

CIUDAD DE MEXICO



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.

AGRADECIMIENTO

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.

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado principalmente a mi mamá, por ella esto fue posible. Gracias por ayudarme, por animarme y empujarme a alguno de mis sueños; gracias por demostrarme el coraje para cumplir cada objetivo que me propusiera y te echo de menos.

A mi familia que fue uno de mis pilares para cumplir esta meta, todos me apoyaron a no darme por vencida, siempre estando conmigo en las buenas y en las malas, porque siempre conté con ustedes.

A mis amigas y amigos de la universidad, gracias a ellos disfrute mucho más de esta etapa, compitiendo y celebrando con todos.

A mis amigas de CCH Sur por cada palabra de aliento que me ofrecieron en cada momento difícil; gracias a sus ánimos me mostraron lo que ellas ven en mí.

A todos del Laboratorio de Investigación Farmacéutica por su tiempo y apoyo en especial al Dr. Vicente J. Hernández A., a la Dra. Elizabeth G. Sánchez G., a la Mtra. Cynthia Espinosa C. y al QFB José Ignacio Vázquez Olvera por su constante supervisión y ánimos a lo largo de mi proyecto, les agradezco ser parte de mi formación profesional, por haber compartido conmigo su conocimiento y siempre incitar que me desafiara a mí misma.

ÍNDICE

| | | |
|-------|---|----|
| 1. | INTRODUCCIÓN..... | 7 |
| 2. | MARCO TEÓRICO..... | 8 |
| 2.1 | Diabetes mellitus..... | 8 |
| 2.1.1 | Fármacos utilizados en los tratamientos para la diabetes. | 8 |
| 2.2 | Glimepirida..... | 9 |
| 2.2.1 | Propiedades farmacocinéticas..... | 9 |
| 2.2.2 | Farmacocinética de la glimepirida. | 10 |
| 2.2.3 | Farmacodinamia. | 11 |
| 2.2.4 | Ventajas de la glimepirida en el tratamiento de diabetes mellitus. | 11 |
| 2.3 | Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. | 12 |
| 2.3.1 | Tipos de separación de la CLAR. | 13 |
| 2.3.2 | Fase estacionaria..... | 15 |
| 2.3.3 | Fase móvil..... | 16 |
| 2.3.4 | Equipo. | 17 |
| 2.3.5 | Aplicaciones..... | 18 |
| 2.3.6 | Ventajas y desventajas..... | 19 |
| 2.4 | Validación de métodos bioanalíticos..... | 20 |
| 2.4.1 | Especificidad. | 21 |
| 2.4.2 | Exactitud..... | 21 |
| 2.4.3 | Precisión. | 21 |
| 2.4.4 | Linealidad. | 22 |
| 2.4.5 | Estabilidad. | 22 |
| 2.4.6 | Límite de detección..... | 24 |
| 2.4.7 | Límite de cuantificación. | 24 |
| 2.5 | Bioanálisis..... | 24 |
| 2.5.1 | Desarrollo de un método bioanalítico. | 25 |
| 2.5.2 | Muestra biológica. | 26 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.5.3 | Recolección de la muestra..... | 27 |
| 2.5.4 | Tratamiento de la muestra..... | 27 |
| 2.5.5 | Métodos de calibración..... | 29 |
| 2.5.6 | Problemas encontrados. | 30 |
| 3. | PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 31 |
| 4. | OBJETIVOS | 32 |
| 5. | HIPÓTESIS | 33 |
| 6. | MATERIAL Y MÉTODO. | 34 |
| 6.1 | Diseño de estudio. | 34 |
| 6.2 | Material, instrumento, equipo y reactivo..... | 34 |
| 6.3 | Diagrama de flujo. | 36 |
| 6.4 | Desarrollo experimental. | 37 |
| 6.4.1 | Obtención del plasma | 37 |
| 6.4.2 | Desarrollo del método analítico. | 37 |
| 6.4.3 | Optimización del método analítico..... | 40 |
| 6.4.4 | Condiciones elegidas para la cuantificación de glimepirida en plasma. | 40 |
| 6.4.5 | Validación del sistema..... | 41 |
| 6.4.6 | Validación del método. | 43 |
| 6.5 | Diseño estadístico..... | 53 |
| 7. | RESULTADOS Y ANÁLISIS..... | 62 |
| 7.1 | Desarrollo del método. | 62 |
| 7.2 | Optimización del método..... | 67 |
| 7.3 | Validación del sistema. | 70 |
| 7.3.1 | Precisión. | 70 |
| 7.3.2 | Linealidad. | 71 |

| | | |
|-------|---|----|
| 7.4 | Validación del método..... | 73 |
| 7.4.1 | Especificidad..... | 73 |
| 7.4.2 | Linealidad..... | 74 |
| 7.4.3 | Exactitud..... | 77 |
| 7.4.4 | Repetibilidad..... | 78 |
| 7.4.5 | Precisión intermedia..... | 79 |
| 7.4.6 | Estabilidad de la muestra..... | 80 |
| 7.4.7 | Límite de detección y límite de cuantificación..... | 83 |
| 7.5 | Resumen de los resultados obtenidos..... | 84 |
| 8. | CONCLUSIONES..... | 85 |
| | ANEXO I. Preparación de disoluciones..... | 86 |
| | ANEXO II. Cromatogramas obtenidos durante el desarrollo y optimización del método..... | 88 |
| | ANEXO III. Cuadros de concentración vs respuesta en el parámetro de estabilidad de la muestra. | 91 |
| 9. | REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS..... | 93 |

1. INTRODUCCIÓN

En la presente investigación se desarrolló y validó un método analítico, que se caracterizó por elaborar un procedimiento para la cuantificación de la glimepirida, posteriormente su validación demostró que es útil para su propósito.

Para iniciar el proceso fue necesario investigar sobre la glimepirida, un fármaco hipoglucemiante, utilizado en el tratamiento de la *diabetes mellitus* tipo II, tiene alta permeabilidad pero baja solubilidad, característica que obstaculiza el desarrollo de una forma farmacéutica adecuada y sobre todo conocer si en verdad se está absorbiendo el fármaco. Como parte de la solución se desarrolló un método analítico para cuantificar la glimepirida en plasma utilizando como técnica la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, el cual está validado, donde se demostró tener resultados confiables y específicos que pueden servir más adelante para estudios farmacocinéticos.

Para llegar al método analítico, se tomó de referencia el método para cuantificar glimepirida en matriz farmacéutica (tabletas), desarrollado en el Laboratorio de Investigación Farmacéutica; donde se cambió el tipo de matriz (plasma); sin embargo, se tuvo que optimizar las condiciones y las técnicas utilizadas.

El presente trabajo será utilizado principalmente en las pruebas farmacocinéticas de nuevas formas de liberación de la glimepirida como mejora a los tratamientos contra la *diabetes mellitus* tipo II; esperando una disminución en reacciones adversas y efectos secundarios.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Diabetes mellitus.

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica, provocada por el páncreas que no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza activamente la insulina que produce. Como consecuencia el organismo sufre de hiperglucemia (aumento de glucosa en la sangre).¹

La diabetes se divide en dos tipos: ^{1, 2}

- Tipo 1: se caracteriza por la ausencia de síntesis de insulina por parte del páncreas, también es conocida como diabetes insulino dependiente.
- Tipo 2: Se debe a una utilización ineficaz de la insulina o no se produce lo suficiente para transformar a la glucosa en energía.

2.1.1 Fármacos utilizados en los tratamientos para la diabetes.

El tipo de tratamiento dependerá de que tan avanzada se encuentre la enfermedad, entre los principales hipoglucemiantes se encuentra la insulina, los secretagogos de insulina (sulfonilureas y glinidas), los sensibilizadores a la insulina (biguanidas), algunos inhibidores y agonistas, entre otros.³

En la Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010 para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus los medicamentos que pueden utilizarse para su control son las sulfonilureas, biguanidas e insulina y sus respectivas combinaciones.³

2.2 Glimepirida.

Las sulfonilureas (SUs) son extensamente usadas en el tratamiento de *diabetes mellitus* tipo 2 como secretagogos de insulina, su nombre se deriva de su configuración estructural (Figura 1). Las SUs de primera generación son aquellas de larga actividad, por ejemplo: tolbutamida, talazamida, clopropamida, entre otras. Y las de segunda generación donde se encuentra la gliburida, glipizida y la glimepirida, que varían en la duración de su acción.⁴

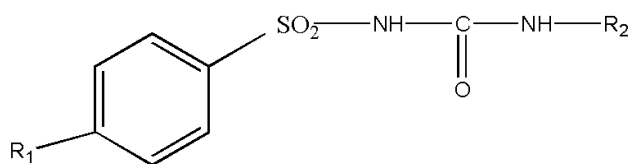


Fig. 1. Estructura de sulfonilurea

La glimepirida (Figura 2) es una sulfonilurea de segunda generación que puede ser utilizada en monoterapia o en combinación con otro agente anti hipoglucemiante, incluyendo la insulina.⁴

2.2.1 Propiedades farmacocinéticas.

Glimepirida.⁵ 1-[[p-[2-(3-Etil-4metil-2-oxo-3-pirrolina-1-carboxamido)etil]fenil]sulfonil]-3-(*trans*-4-metilciclohexil)urea.

Formula condensada: C₂₄H₃₄N₄O₅S

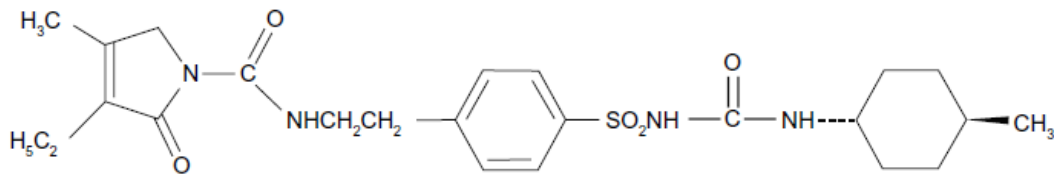


Fig. 2. Fórmula desarrollada de glimepirida

Masa Molecular: 490.62 g/mol

La glimepirida es un polvo blanco. Prácticamente es insoluble en agua, escasamente soluble en diclorometano; soluble en dimetilformamida y ligeramente soluble en metanol. Se disuelve en hidróxidos y ácidos diluidos. Se almacena a una temperatura no excediendo los 25 °C.⁶

Es un ácido débil con un valor de pKa en agua de 6.2⁷

Su baja disolución puede ser atribuida por la hidrofobicidad del polvo, pues tiene una pobre humectación de superficie y baja solubilidad en agua, pero una alta permeabilidad, haciéndolo un fármaco de clase II, de acuerdo con el sistema de clasificación biofarmacéutica.^{4, 8}

2.2.2 Farmacocinética de la glimepirida.

La glimepirida es completamente absorbida del tracto gastrointestinal, ya que su concentración máxima en plasma ocurre en 2 a 3 h y se une extensamente a las proteínas. El fármaco es metabolizado en el hígado a dos metabolitos. En múltiple dosis tiene una vida media cerca de 9 h. Un 60% de la dosis es eliminada en la orina y el 40% en heces.^{4, 9}

2.2.3 Farmacodinamia.

2.2.3.1 Efecto de páncreas.

La glimepirida actúa en los canales de potasio dependientes de ATPasa en las células β del páncreas para estimular la liberación de insulina.⁴

2.2.4 Ventajas de la glimepirida en el tratamiento de diabetes mellitus.

La glimepirida se puede utilizar en tratamiento inicial, como monoterapia o combinada con otro fármaco para el control de la diabetes. Esta ejerce efectos leves sobre la secreción de insulina, su administración previene enfermedades macrovasculares. Otra ventaja que tiene la glimepirida es su única administración de dosis al día. Tiene una alta seguridad y eficacia confirmada en diversos estudios controlados y se asocia con riesgos menores de hipoglucemia.⁴

Para medir las concentraciones plasmáticas de la glimepirida se requiere de técnicas específicas como la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas por ionización química a presión atmosférica (API) que utiliza una ionización suave en la muestra, aunque comparada con la cromatografía de líquidos de ionización por electrospray con espectrometría de masas en tándem es mucho más eficiente en cuanto a las matrices biológicas.¹⁰ También se han utilizado técnicas como la cromatografía electrocinética micelar, la cual, es un híbrido entre la cromatografía de líquidos y la electroforesis capilar; otra técnica es la cromatografía en capa fina de alto rendimiento, ambas técnicas utilizadas para muestras biológicas, son un poco complicadas de utilizar por altos costos y tiempos de equilibrios largos. Las técnicas espectrofotométricas son otra alternativa de análisis, las cuales al ser acopladas a la cromatografía de líquidos, facilitan su detección y sensibilidad.¹¹

2.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

La cromatografía se define como una técnica que se utiliza para la separación de constituyentes en una mezcla, donde implica dos fases: una fase estacionaria y una fase móvil. Los métodos cromatográficos como cromatografía de gases (CG), cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) y cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) se utilizan comúnmente en laboratorios para el análisis cualitativo y cuantitativo de sustancias farmacológicas y muestras biológicas en todas las fases del desarrollo del método de un medicamento en investigación y control de calidad.^{12, 13}

La CLAR es una forma moderna de cromatografía líquida (CL), esta utiliza columnas de partículas pequeñas, donde la fase móvil se bombea bajo presión, que regularmente se utiliza de cientos de libras por pulgada cuadrada (psi). El disolvente o fase móvil generalmente fluye a través de columna con la ayuda de la gravedad, pero en la técnica de CLAR, la fase móvil se forzaría bajo altas presiones de hasta 400 atmósferas, por lo que la muestra se puede separar en diferentes constituyentes con la ayuda de la diferencia en afinidades relativas dependiendo del equilibrio químico involucrado.^{12, 14}

En CLAR, las bombas se utilizan para transferir disolvente líquido presurizado que incluye la muestra, ambas entran en una columna llena de material adsorbente sólido. La interacción de cada componente de muestra variará y esto causa una diferencia en los índices de flujo y distribución de cada componente, finalmente conduce a la separación de estos en la columna.¹²

Uno de los objetivos de la CLAR es separar y cuantificar el principal fármaco activo, así como cualquier reacción de impurezas, todos los intermediarios sintéticos disponibles y cualquier degradante.¹⁵

2.3.1 Tipos de separación de la CLAR.

2.3.1.1 Cromatografía de fase normal (CFN).

Está basada en el modo de separación tradicional o adsorción/desorción del analito sobre la fase estacionaria polar (típicamente sílice o alúmina), regularmente la fase móvil (no polar) es hexano, cloroformo u éter dietílico y las muestras polares se conservan en la columna. Con dicho empaquetamiento, el analito compite con la fase móvil por los sitios sobre la superficie de este y la

retención se debe a las fuerzas de adsorción. Es particularmente utilizada para la separación de compuestos no polares e isómeros como el fraccionamiento de muestras complejas por grupos funcionales o limpieza de la muestra.^{12, 14, 16}

2.3.1.2 Cromatografía de fase reversa (CFR).

La separación está basada en el coeficiente de reparto de los analitos entre la fase móvil polar y la fase estacionaria hidrofóbica (no polar). Los primeros analitos en eluir son los polares mientras los analitos no polares interactúan más fuertemente con los grupos hidrofóbicos que forma una capa líquida alrededor del soporte sólido de sílice. El orden de elución provoca que los compuestos más polares emerjan primero y finalmente los no polares, es lo contrario de lo observado en la cromatografía de fase normal. Típicamente se utiliza como fase móvil metanol, acetonitrilo o mezcla con agua.¹⁴

2.3.1.3 Cromatografía de intercambio iónico (CII).

El modo de separación está basado en el intercambio de analitos iónicos con la conversión de los grupos ionizables adjuntos al soporte sólido. Típicamente la fase estacionaria son grupos de intercambio catiónico (sulfonato) o intercambio aniónico (amonio cuaternario) que se unen a material polimérico o sílice, es decir, la fase estacionaria tiene una superficie con carga iónica opuesta a la carga de la muestra. La fase móvil consiste de buffers, ya que a menudo incrementa fuertemente los iones y la fuerza de migración de los analitos, pues es utilizada para controlar el pH y la fuerza iónica. Comúnmente las aplicaciones son los análisis de iones y componentes biológicos como aminoácidos, proteínas/péptidos y polinucleótidos.^{12, 14}

2.3.1.4 Cromatografía de exclusión molecular (CEM).

Su modo de separación se basa solamente en el tamaño molecular, las moléculas grandes son excluidas de los poros y migran rápidamente, las moléculas pequeñas pueden penetrar los poros y migrar más lento bajo la columna. Es llamada a menudo cromatografía de gel permeación (CGP) cuando es usada para la determinación de las masas molares o polímeros orgánicos y cromatografía de gel filtración (CGF) cuando es usada en la separación de los materiales solubles al agua.¹⁴

2.3.2 Fase estacionaria.

La fase estacionaria es regularmente un material granular hecho de partículas sólidas de un tamaño de 2 µm a 50 µm. Los segmentos están aislados el uno del otro debido a sus grados distintivos de conexión con el retentivo particular, dando una gran capacidad de retención o resolución al aislar mezclas. Debido a la pequeña cantidad de muestra aislada en CLAR las medidas de la sección de columna son de 2,1 mm a 4,6 mm de distancia, y de 30 mm a 250 mm de longitud. El tipo de fase estacionaria seleccionada por un análisis depende del tipo de CLAR, típicamente la fase esta enlazada con la superficie de sílice mediante enlaces covalentes usando un proceso de derivatización.^{12, 17}

Cambiar una columna tendrá el mayor efecto en la resolución de analitos durante el desarrollo del método. Las columnas de CLAR para fase reversa se preparan empacando la columna con perlas esféricas de gel de sílice que son recubiertas con la fase estacionaria hidrofóbica. En general, a más cadenas de alquilo, mayor

carga de fase y mayor las cargas de carbono, proporcionan una mayor retención de analitos no polares que depende de la longitud de cadena crítica.¹⁵

2.3.3 Fase móvil.

El fluido presurizado es comúnmente una mezcla de disolventes (por ejemplo, agua, acetonitrilo y / o metanol) y se conoce como 'fase móvil'. Su organización y temperatura juegan un papel importante en el procedimiento al afectar las conexiones que ocurren entre los segmentos de muestra y el adsorbente, ya que la composición de la fase móvil es capaz de modificar el tiempo de retención, el factor de interacción del analito con la fase estacionaria y la selectividad de la separación; se puede adicionar a la fase móvil aditivos que mejore la separación. En cromatografía de fase reversa, la fase móvil consiste en un amortiguador acuoso y un disolvente orgánico miscible en agua no activo con UV. Los efectos de la fase orgánica, acuosa y las proporciones en que se mezclan afectarán el análisis de la molécula del fármaco.^{12, 15, 17}

2.3.3.1 pH.

En la CFR es importante considerar: el efecto del pH sobre la retención del analito, tipo de amortiguador a usar y su concentración, la solubilidad en el modificador orgánico y su efecto en la detección. La idea de acuerdo a la teoría y práctica es elegir un amortiguador de $pK_a \pm 1$ unidades del pH deseado, este a su vez debe ser ± 2 del pK_a del analito y una concentración de 10-50 mM. El pH para analitos ionizables a menudo conduce a picos simétricos y agudos en la CLAR, estos picos son necesarios en un análisis con el fin de lograr bajos límites de detección, bajas desviaciones estándar relativas entre las inyecciones y tiempos de retención

reproducibles, ya que una elección incorrecta de amortiguador puede resultar en una pobre retención o una deformación del pico cromatográfico en forma de coileo en fase inversa con relación a la separación de compuestos polares e ionizables.¹⁵

2.3.4 Equipo.

El sistema típico del CLAR consiste de los siguientes componentes:¹⁸

- Reservorio de disolventes: almacena la cantidad suficiente de solventes en el cromatógrafo para continuar la operación del sistema. Puede ser equipado con un sistema de desgasificación en línea y filtros especiales para aislar el solvente de las influencias del entorno.
- Bomba: este proporciona el constante y continuo flujo de la fase móvil a través del sistema; varias bombas permiten controlar el mezclado de los diferentes solventes y los diferentes reservorios.
- Inyector: este permite una introducción (inyección) de la mezcla de analitos dentro de la corriente de la fase móvil hacia la entrada de la columna; varios inyectores modernos son automuestreadores, donde permite programar inyecciones de diferentes volúmenes de muestras, estas son retiradas por viales en la bandeja del automuestreador.
- Columna: este es el corazón del sistema de la CLAR; actualmente produce una separación de los analitos en la mezcla. Una columna es el lugar donde la fase móvil está en contacto con la fase estacionaria formando una interfase con una superficie enorme.
- Detector: La elección del detector depende de la naturaleza química de los analitos, la interferencia potencial, el límite de detección requerido, la

disponibilidad o el costo del detector, puesto que es un dispositivo de registro continuo de propiedades físicas específicas, los más comunes utilizados en el análisis farmacéutico es el UV, ya que este ofrece la alta sensibilidad requerida para las aplicaciones rutinarias para la identificación de impurezas de bajo nivel y el análisis cuantitativo. El detector UV tiene como características una celda de flujo con un volumen de 10 μ L para un trayecto de 1 cm, el sistema más simple emplea una emisión a 254 nm de una lámpara de mercurio a una sola longitud de onda, otros sistemas más versátiles tienen una lámpara de deuterio y un monocromador para mediciones a longitud variables. ^{14, 15, 19.}

- Adquisición de datos y sistema de control: Es un sistema computarizado, controla todos los parámetros del cromatógrafo (composición del eluyente mezcla de diferentes solventes, temperatura, secuencia de inyección, entre otros.) y adquisición de datos de los detectores y monitores.

2.3.5 Aplicaciones.

La CLAR tiene varias aplicaciones en los campos de farmacia, medicina forense, medio ambiente y clínica. ^{12, 20, 21.}

- Las aplicaciones farmacéuticas incluyen el control de la estabilidad del fármaco, estudios de disolución y control de calidad.
- Aplicaciones ambientales: monitoreo de contaminantes y detección de componentes del agua potable, más ampliamente utilizado en agroquímicos, es decir, análisis de pesticidas en aguas de limpieza.

-
- Aplicaciones forenses: análisis de tintes textiles, cuantificación de drogas y esteroides en muestras biológicas como la separación de morfina y metabolitos extraídos del plasma sanguíneo.
 - Aplicaciones de alimentos y sabores: análisis de azúcar en jugos de frutas, detección de compuestos policíclicos en vegetales, análisis de conservantes.
 - Aplicaciones clínicas: Detección de neuropéptidos endógenos, análisis de muestras biológicas como sangre y orina directamente de la columna
 - CLAR-FR tiene el mayor impacto en la separación de oligopéptidos y proteínas.
 - Amplia gama de aplicaciones en química orgánica.
 - Aplica a diversos tipos de analitos de pequeñas moléculas orgánicas e iones a grandes biomoléculas y polímeros.

2.3.6 Ventajas y desventajas.

Algunas de ellas son:^{15, 22, 23.}

La cromatografía de líquidos de alta resolución es más versátil que la cromatografía de gases, ya que (a) no se limita a muestras volátiles y térmicamente estables y (b) la elección de fases estacionarias es más ancha.

- Proporcionan un análisis rápido, de mayor sensibilidad, alta resolución, recuperación fácil de la muestra, resultados precisos y reproducibles.
- La técnica utiliza instrumentación costosa.
- Separa compuestos de peso molecular de 54 a 450 000 Da.

-
- No hay requisitos para compuestos volátiles o derivados.
 - Requiere de una alta experiencia y conocimiento para su funcionamiento.
 - Muestras acuosas pueden ser directamente corridas después de una filtración simple.
 - Compuestos con amplio rango de polaridad pueden ser analizados en una única corrida.
 - Compuestos termolábiles pueden ser detectados.
 - Cantidad de material para ser detectada puede variar de picogramos y nanogramos a microgramos y miligramos a multigramos.
 - Las corridas típicas son de 10 a 30 min., pero largos gradientes podrían consumir de 1 a 2 h.

Para que un método que utiliza la técnica de CLAR, sea útil este debe estar validado.

2.4 Validación de métodos bioanalíticos.

La validación de métodos analíticos es la demostración mediante la recopilación, análisis y evaluación objetiva de la evidencia obtenida a partir de pruebas de desempeño específicas de un procedimiento o método analítico que puede ser utilizado o aplicado en el análisis de un analito de una determinada muestra.²⁴ La única diferencia que tiene con la validación de los métodos bioanalíticos es el tipo de matriz a utilizar, puesto que regularmente en un método analítico las matrices son farmacéuticas, es decir, son los excipientes que contiene el medicamento, sin embargo, en un método bioanalítico, la matriz es biológica como sangre, suero, plasma, orina, tejido y piel.

La validación depende de varios parámetros para evaluarlos, los cuales, se mencionan a continuación:

2.4.1 Especificidad.

Es la capacidad del método analítico para asegurar la presencia del analito en la muestra de manera inequívoca, aun cuando existan otros componentes que pudieran estar presentes en la muestra. Las posibles sustancias interferentes en una matriz biológica incluyen componentes de la matriz endógena, metabolitos y productos de descomposición. Regularmente se compara la respuesta del analito en la muestra que contiene éste y todos los componentes potenciales de la muestra (formulación de placebo, impurezas de proceso, etc.) con la respuesta de la solución que contiene solo el analito.^{21, 24, 25}

2.4.2 Exactitud.

Es el grado de concordancia entre el valor que es aceptado, ya sea como un valor real convencional o un valor de referencia aceptado y el valor encontrado en la medición.²⁴

2.4.3 Precisión.

Es el grado de dispersión que existe entre una serie de mediciones del analito obtenidas a partir de la aplicación del método analítico a múltiples alícuotas de la misma muestra homogénea. Existen tres niveles los cuales son: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.²⁴

2.4.3.1 Repetibilidad.

Es el grado de dispersión de los resultados analíticos obtenidos a partir del análisis múltiple de la misma muestra homogénea bajo las mismas condiciones de operación.²⁴

2.4.3.2 Precisión intermedia.

Es el grado de dispersión de los resultados analíticos obtenidos a partir del análisis múltiple de la misma muestra homogénea variando condiciones de operación del método (analista, día, equipo de medición, entre otras) dentro de un mismo laboratorio.²⁴

2.4.4 Linealidad.

Es la capacidad del método de análisis para brindar resultados que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) del analito en la muestra. Para los métodos de CLAR, se determina la relación lineal entre la respuesta del detector (área del pico o altura) y la concentración de la muestra. La linealidad debe evaluarse mediante la inspección visual de un gráfico de señales en función del analito concentración o contenido.^{23, 24}

2.4.5 Estabilidad.

La estabilidad del fármaco en un fluido biológico es una función de las condiciones de almacenamiento, las propiedades fisicoquímicas del fármaco, la matriz y el sistema del recipiente. Las pruebas de estabilidad deben evaluar la estabilidad de los analitos durante la recolección y manejo de la muestra, después de largo plazo (congelado a la temperatura de almacenamiento prevista) y de almacenamiento a corto plazo (sobremesa, temperatura ambiente) y después de

ciclos de congelación y descongelación. Las condiciones utilizadas en los experimentos de estabilidad deben reflejar las situaciones que probablemente se encontrarán durante el manejo y análisis de la muestra.²⁵

2.4.5.1 Estabilidad de congelamiento y descongelamiento.

Durante las evaluaciones de estabilidad de congelación / descongelación, en ella las muestras de estabilidad debe imitar las condiciones de manejo de esta, que se desea utilizar durante el análisis de la muestra. La estabilidad debe evaluarse durante un mínimo de tres ciclos de congelación-descongelación.²⁵

2.4.5.2 Estabilidad de mesa.

Los experimentos de estabilidad de mesa deben diseñarse y realizarse para cubrir las condiciones de manejo del laboratorio que se esperan para las muestras de estudio.²⁵

2.4.5.3 Estabilidad a corto plazo.

Se determina la estabilidad de las muestras bajo las condiciones de manejo de laboratorio, imitando un día de trabajo, desde que se saca del congelador la muestra hasta su análisis y su tiempo de espera para el estudio.²⁵

2.4.5.4 Estabilidad a largo plazo.

El tiempo de almacenamiento en una evaluación de estabilidad a largo plazo debe ser igual o superior al tiempo transcurrido entre la fecha de la primera recolección de muestras y la fecha del último análisis de muestras.²⁵

2.4.5.5 Estabilidad de automuestreador.

Se evalúa la estabilidad de la muestra procesada para cubrir las condiciones que se manejaran durante su tiempo de espera en el automuestreador hasta que se inyecte para ser analizada en el equipo.²⁵

2.4.6 Límite de detección.

Es la menor cantidad del analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto.²⁴

2.4.7 Límite de cuantificación.

Es la menor cantidad del analito en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con una adecuada precisión y exactitud. El enfoque más simple se basa en la relación señal / ruido, está es determinada comparando las señales medidas de las muestras con baja concentración conocida de analito con aquellas de muestras en blanco, la concentración que muestra la relación señal / ruido entre 3:1 o 2:1 es generalmente considerado como límite de detección aceptable.^{23, 24}

2.5 Bioanálisis.

El bioanálisis cubre la identificación y cuantificación de analitos en muestras biológicas (sangre, plasma, suero, saliva, orina, heces, piel, cabello y tejido), está relacionado con el análisis de analitos (fármacos, metabolitos, biomarcadores) y comprende varios pasos, desde la toma de muestras hasta el análisis de las mismas y el informe de datos, el objetivo fundamental del bioanálisis es informar una concentración de analito que es un reflejo preciso de la concentración en la muestra en el momento de la recolección.^{26, 27}

2.5.1 Desarrollo de un método bioanalítico.

El primer paso es la recolección de muestras de estudios clínicos o preclínicos, el segundo paso es la limpieza de la muestra (preparación de la muestra) y es un paso muy importante en el bioanálisis. El último paso es el análisis y la detección de muestras.^{26, 27}

El cuadro 1 muestra los requisitos que se necesitan en el desarrollo de un método bioanalítico y su validación.

Cuadro 1. Desarrollo de método bioanalítico y estrategias de validación²⁶

| Tema | Requisito |
|----------------------------------|---|
| Analito | Estructura química. |
| | Propiedades químicas. |
| | Pureza del analito. |
| Preparación de la muestra | Naturaleza y propiedades de la matriz. |
| | Estabilidad de la matriz |
| | Elección del método adecuado de extracción. |
| | Recuperación en la extracción. |
| Método de validación | Recta de calibración |
| | Exactitud |
| | Precisión |
| | Selectividad |
| | Efecto de la matriz. |
| | Estabilidad (largo y corto plazo) |

2.5.2 Muestra biológica.

La NOM – 087- ECOL- SSA1- 2002 (Protección ambiental – salud ambiental – Residuos Peligrosos – Infecciosos – clasificación y especificaciones de manejo) define que una muestra biológica es una “parte anatómica o fracción de órganos o tejido, excreciones o secreciones obtenidas de un ser humano o animal vivo o muerto para su análisis.”²⁸

En un análisis químico son consideradas dos partes de la muestra: el analito y la matriz.²⁹

- Los analitos son moléculas o especies iónicas de interés en la muestra y la matriz es el resto de los componentes que la conforman; un problema es la complejidad.

La sangre es la principal muestra biológica utilizada para el bioanálisis.

2.5.2.1 Sangre: Plasma sanguíneo.

La sangre es un fluido que conecta a toda la anatomía entre sí, consta de una parte líquida (plasma) y de elementos formes (eritrocitos, leucocitos y plaquetas). El plasma sanguíneo es un líquido claro y ligeramente amarillo, este contiene un 10% de solutos de los cuales una gran parte son proteínas (7 g/dL), también contiene 0.9% de sales inorgánicas aproximadamente y el 2% restante lo constituyen diversos compuestos orgánicos no proteicos. Algunos aniones inorgánicos que contiene el plasma son los bicarbonatos, cloruros, fosfatos, sulfatos, etc. y los cationes presentes son el calcio, magnesio, hierro, potasio entre

otros. Entre los compuestos orgánicos no proteicos se encuentran la urea, la bilirrubina, creatinina, ácido úrico, cítrico y colesterol.³⁰

2.5.2.2 Proteínas plasmáticas.

Las proteínas plasmáticas son muy importantes pues la mayoría de los fármacos que se transportan por la sangre, viajan en el plasma fijados en ellas, ya que es muy frecuente que interaccionen con los fármacos, este proceso se considera reversible de absorción a su superficie. Se sabe que los ácidos débiles se unen casi exclusivamente a la albúmina y las bases débiles y sustancias independientes no ionizables liposolubles se unen principalmente a lipoproteínas, pero las bases débiles también pueden hacerlo con la albúmina y α -glucoproteínas.³¹

2.5.3 Recolección de la muestra.

Es la operación de la que se obtiene la muestra cruda siendo dada de una forma apropiada del proceso analítico, muestrear es un proceso muy importante, ya que las implicaciones de recolección es la selección del método de análisis y en particular en la selección de la técnica de CLAR.^{26, 29}

2.5.4 Tratamiento de la muestra.

El papel de la preparación de la muestra es eliminar las interferencias de la matriz de la muestra y mejorar el rendimiento del sistema analítico, la muestra cruda es frecuentemente sometida a una etapa de preparación, que tuvo el papel de modificar la muestra cruda para ser más manejable. Esta etapa puede ser de una a varios procesos complejos para la muestra, ya que regularmente se utilizan manipulaciones de rutina como homogenización, reducción del tamaño, lavado,

pesado, mezclando del volumen y disolución de la muestra, también incluyen procedimientos de limpieza cuando la matriz lo amerite, algunos son el simplificado, fraccionado, concentración de analitos y modificación química, por ello la preparación de la muestra a menudo requiere mucho trabajo y consume más tiempo.^{24, 29}

2.5.4.1 Filtración y centrifugación.

La filtración es un proceso físico empleado para separar precipitados. En este proceso el sólido es retenido por el medio filtrante y el filtrado fluye por él, debido a una diferencia de presión a través del medio filtrante, este pueden ser el papel filtro, algodón, láminas de vidrio, entre otros.³²

La centrifugación se utiliza para separar los precipitados de la muestra, regularmente se utiliza la fuerza centrífuga fijando un tiempo y una velocidad (rpm), dicha separación se da por gradiente de densidad. Cuando termina la centrifugación se separa el sobrenadante del sólido.³²

2.5.4.2 Extracción liquido-liquido.

Es una técnica clásica de preparación de muestras biológicas en matrices acuosas e implica la transferencia de una disolución del analito de una fase líquida a otra, para llegar a una pre-concentración o limpieza de la muestra, también es un paso del analito a un disolvente más compatible con el método de análisis. Básicamente la muestra acuosa (plasma, orina, etc.) y un disolvente orgánico inmiscible son mezclados para remover el analito dentro de la fase orgánica. Esta técnica regularmente se utiliza para la extracción de fármacos ácidos y básicos de

muestras biológicas obteniendo un alto recobro, aunque se utilice grandes volúmenes de disolvente y tiempos largos durante el proceso.^{26, 33}

2.5.4.3 Extracción liquido-sólido.

En esta separación se utilizan cartuchos pequeños y empaquetados con un adsorbente (fase estacionaria) para atrapar los analitos de interés de la matriz líquida, una vez atrapado en el adsorbente los analitos son eluidos usando un disolvente fuerte. Es una técnica utilizada para matrices complejas debido a su alta eficiencia, costo efectivo y alta reproducibilidad, sin embargo. en cada separación hay ocasiones donde también se encuentran analitos traza de la muestra biológica.^{26, 34}

2.5.4.4 Precipitación de proteínas.

Es utilizada para recuperar el producto de las proteínas, se utiliza para muestras de plasma o sangre especialmente analitos con altas concentraciones. Esta técnica es usualmente inducida por la adición de un disolvente orgánico miscible (acetonitrilo, acetona o metanol), sales, iones metálicos o por cambio de pH con soluciones ácidas, regularmente es rápida y simple.^{26, 35}

2.5.5 Métodos de calibración.

2.5.5.1 Calibración por estándar interno.

En este método se adiciona a la muestra una sustancia estándar que se recupera por completo de los demás componentes de la muestra, el uso del estándar interno es para compensar los efectos de la matriz y obtener resultados precisos, este debe de tener una estructura química y propiedades similares al analito, ya

que debe tener un tiempo de retención cercano a los analitos de interés. Gracias al estándar interno se puede verificar si las condiciones cromatográficas afectan a la muestra.^{26, 36}

2.5.5.2 Calibración por estándar externo.

Se establece una calibración con un estándar del analito en cuestión con condiciones idénticas a las de trabajo y concentraciones conocidas. La respuesta absoluta del analito se representa frente a la concentración de está obteniendo una recta de calibración así se puede comparar la muestra con el estándar, ya que ambas se dieron con las mismas condiciones de trabajo.³⁶

2.5.6 Problemas encontrados.

Las áreas problemáticas pueden incluir las inestabilidades físicas y químicas del analito durante la recolección y el almacenamiento, la incompatibilidad del analito con su tipo detección, las limitaciones de usar un método no validado, ya que agrega complejidad a los datos interpretación.²⁷

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) representa el 90-95% de todos los tipos de diabetes y se calcula que al menos el 50% está sin diagnosticar; de ahí la importancia del cribado de la población, por ello actualmente en México representa uno de los más grandes retos en salud pública, el tratamiento de esta enfermedad no es variado, sino depende de que tan avanzada se encuentra.³⁷

Uno de los medicamentos que se utiliza en el tratamiento es la glimepirida.

Éste es caracterizado por ser de larga duración, teniendo una absorción significativa, y una unión a proteínas plasmáticas del 99,4% con un volumen de distribución de 8,8 L. No produce acumulación después de múltiples dosis. Al ser un fármaco ampliamente empleado, por ello se diseñan nuevas formas de liberación que permitan mejorar la adherencia a los tratamientos, lo que conlleva a evaluarlos *in vivo*, y con ello a requerir de un método de cuantificación para poder verificar las diferentes concentraciones de glimepirida en plasma en evaluaciones farmacocinéticas. Así se propone en este trabajo, desarrollar y validar un método analítico empleando la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para cuantificar de forma precisa y exacta, ya que es una técnica muy sensible y específica, recomendado para futuras aplicaciones en evaluaciones biofarmacéuticas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Desarrollar y validar un método analítico utilizando CLAR para cuantificar glimepirida en plasma de rata.

4.2 Objetivos particulares.

- Desarrollar un método analítico para cuantificar glimepirida en plasma de rata tomando de partida las condiciones del método para cuantificar glimepirida en matriz farmacéuticas.³⁸

Columna: Phenomenex luna C-18 de 5 μm de tamaño de partícula, con dimensiones de 4.6x150 mm

Longitud de onda: 227 nm

Fase móvil: acetonitrilo: amortiguador de fosfatos 0.05M pH 5.25
(50: 50 v/v)

Velocidad de flujo: 2.2 mL/min

Volumen de inyección: 50 μL

- Optimizar el método de cuantificación dependiendo de los resultados obtenidos en los cromatogramas, cambiando la proporción de la fase móvil, la velocidad de flujo y hasta el tipo de columna.
- Validar el método analítico desarrollado para cuantificar glimepirida en plasma de rata.

5. HIPÓTESIS

El método analítico desarrollado para cuantificar glimepirida en plasma de rata por CLAR-UV proporcionará resultados específicos, lineales, exactos, precisos y sobre todo confiables.

6. MATERIAL Y MÉTODO.

6.1 Diseño de estudio.

Cuadro 2. Tipo de estudio del presente trabajo.

| Estudio Prospectivo, transversal, descriptivo, experimental. | | |
|---|---|------------------------------|
| Población de estudio: | | Glimepirida en plasma |
| Criterios de inclusión | Criterios de exclusión | Criterios de eliminación |
| Fármaco de glimepirida. Sustancia de referencia. Lote: Y0000515 Plasma de rata | Plasma diferente de rata. Plasma que tenga más de un año de congelación. | Fármaco degradado. |

6.2 Material, instrumento, equipo y reactivo

6.2.1 Material.

- Matraz Volumétrico de 10 y 5 mL
- Vaso de precipitados de 30, 50, 100, 500 y 1000 mL
- Probeta graduada de 15, 1000 mL
- Matraz Erlenmeyer de 1000 mL
- Tubo de ensayo de 10 mL
- Pipeta Pasteur
- Gradilla
- Tubos eppendorf
- Puntas para micropipeta de 1 mL
- Micropipeta de 100 – 1000 μ L
- Sistema para filtración a vacío

6.2.2 Instrumentos

Marca

Modelo

- Microbalanza analítica Mettler MTS

| | | |
|---------------------------------|-------------------|--|
| ➤ Balanza analítica | OHAUS | Explorer® Pro |
| ➤ Potenciómetro | Cole Parmer | Ep.500/154868 |
| 6.2.3 Equipo | Marca | Modelo |
| ➤ Cromatógrafo de líquidos | Hitachi | Primaide |
| ➤ Microcentrifuga | Eppendorf | Centrifuge 5417C |
| ➤ Bomba para vacío | | |
| ➤ Vortex | | |
| ➤ Parrilla para agitación | Thermo Scientific | |
| ➤ Sonicador | Branson | CPXH |
| 6.2.4 Reactivo | | |
| ➤ Glimepirida SRef | | European Pharmacopoeia Reference Standard |
| ➤ Glibenclamida | | Química Alkano |
| ➤ Felodipino | | Laboratorios Kener |
| ➤ Fosfato dibásico de potasio | | JT Baker |
| ➤ Fosfato monobásico de potasio | | JT Baker |
| ➤ Acetonitrilo HPLC | | Tecsiquim |
| ➤ Metanol HPLC | | Tecsiquim |
| ➤ Ácido 1-octilsulfónico | | Sigma-Aldrich |
| ➤ Ácido acético glacial | | Merck |
| ➤ Agua | | Theissier 2-4 $\mu\Omega/cm$ |
| ➤ Hidróxido de sodio | | Macron Fine Chemical |

6.3 Diagrama de flujo.

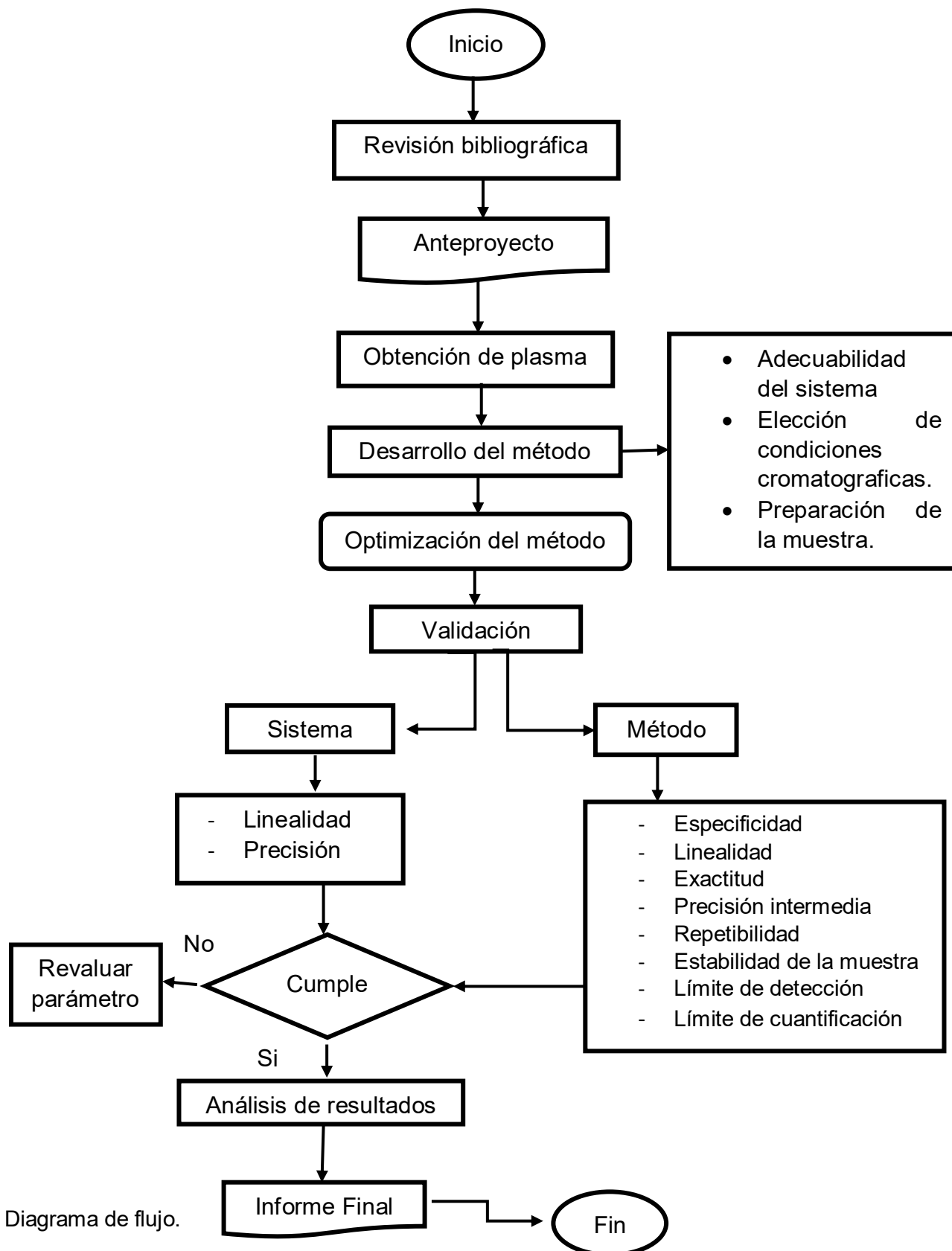


Fig. 3. Diagrama de flujo.

6.4 Desarrollo experimental.

6.4.1 Obtención del plasma

Se utilizó la norma NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” para el adecuado manejo de ratas de laboratorio.

Se usaron ratas del tipo Long-Evans de cualquier edad y sexo indistinto. Utilizando agujas vacutainer y tubos con EDTA se extrajo la sangre. Cada tubo se centrifugo a 10000 rpm por 10 minutos y se tomó con una pipeta pasteur el plasma de cada uno, recolectándolo en un tubo de ensayo, etiquetándolo con la fecha del día que se obtuvo, el nombre de lo que contiene el tubo y el nombre del analista. Se mantuvieron los tubos en congelación hasta el momento que se utilizó el plasma.

6.4.2 Desarrollo del método analítico.

Esta etapa se inició con las siguientes condiciones cromatográficas, las cuales fueron tomadas de la tesis llamada “Método Analítico alternativo por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para la cuantificación de glimepirida en tabletas”³⁸ donde se utilizó una cromatografía del tipo de fase reversa; cambiando la matriz farmacéutica a biológica utilizando plasma.

Condiciones cromatográficas:

- **Fase móvil:** acetonitrilo: amortiguador de fosfatos 0.05M pH 5.25 50: 50 (v/v)
- **Velocidad de flujo:** 2.2 mL/min
- **Columna:** Phenomenex luna C-18 de 5 μ m de tamaño de partícula, con dimensiones de 4.6x150 mm

-
- **Longitud de onda:** 227 nm
 - **Volumen de inyección:** 50 µL

Se utilizó glibenclamida MP como estándar interno (Solución de Estándar Interno A). Se prepararon las muestras de la siguiente manera:

1. Se tomó una alícuota de 0.5 mL de la solución stock de glimepirida (100 µg/mL), y se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL, adicionándole 0.5 mL de la solución de estándar interno A (100 µg/mL) y se aforo con plasma. La muestra se preparó por triplicado.
2. Se procedió con el **Tratamiento de la muestra** de la siguiente manera:
 - 2.1 Se tomaron 0.5 mL de muestra y se colocó en tubos de ensayo, adicionando 1.5 mL de la solución de MetOH/Ácido acético 1% (1:3)
 - 2.2 Se sostuvieron los tubos de manera vertical y se agito en vortex por 1 min.
 - 2.3 Se transfirió el contenido del tubo de ensayo a un tubo eppendorf y se centrifugo a 10000 rpm durante 10 minutos.
3. Se transfirió el sobrenadante a viales, para su análisis en el equipo de CLAR
4. Se leyeron bajo las condiciones antes mencionadas

En los cromatogramas se observaron los picos con baja resolución, por ello se decidió probar otras opciones como las sales de sulfato para la solución amortiguadora, columnas de otro tamaño pero con las mismas características; también se evaluaron diferentes proporciones de fase móvil y la velocidades de

flujo. Por parte del tratamiento de la muestra se evaluaron diferentes proporciones en el tratamiento de la muestra y los tiempos de agitación en vortex.

Condiciones que se evaluaron:

- Proporción de fase móvil de acetonitrilo: amortiguador de fosfatos 0.05M pH 5.25 de 50: 50 y 55:45.
- Velocidad de flujo: 2.0 mL/min y 2.2 mL/min.
- Proporciones en el tratamiento de la muestra: solución de Metanol/ Ácido acético 1%. 1:1, 1:2, 1:3.
- Tiempo de agitación en vortex: 1 y 1.5 min.

Todas las condiciones que se evaluaron se realizaron a 227 nm de longitud de onda y 50 µL de volumen de inyección.

Eligiendo las siguientes condiciones del tipo Fase Reversa:

- **Fase móvil:** acetonitrilo: amortiguador de fosfatos 0.05M pH 5.25 50: 50 (v/v)
- **Velocidad de flujo:** 2.0 mL/min
- **Columna:** Phenomenex luna C-18 de 5 µm de tamaño de partícula, con dimensiones de 4.6x150 mm
- **Longitud de onda:** 227 nm
- **Volumen de inyección:** 50 µL
- **Proporción en el tratamiento de la muestra:** solución de Metanol/ Ácido acético 1%. 1:2
- **Tiempo de agitación en vortex:** 1.5 min.

6.4.3 Optimización del método analítico.

Se buscó mejorar la forma del pico, ya que se presentaba con coleo, por ello se adiciono ácido 1-octilsufónico 1×10^{-5} M a la solución amortiguadora y se evaluaron diferentes pH de esta, también se probaron velocidades de flujo y por causa del coleo se cambió la glibenclamida a felodipino como estándar interno (Solución de Estándar Interno B)

Condiciones que se evaluaron:

- pH de la solución amortiguadora de fosfatos 0.05M: pH 5, 5.25 y 5.45.
- Velocidad de flujo: 1.5, 1.8 y 2.0 mL/min

6.4.4 Condiciones elegidas para la cuantificación de glimepirida en plasma.

- **Fase móvil:** 50: 50 v/v de acetonitrilo: amortiguador de fosfatos 0.05M pH 5 con ácido 1-octilsufónico 1×10^{-5} M.
- **Velocidad de flujo:** 2.0 mL/min
- **Columna:** Phenomenex luna C-18 de 5 μ m de tamaño de partícula, con dimensiones de 4.6x150 mm
- **Longitud de onda:** 227 nm
- **Volumen de inyección:** 50 μ L

Preparación de la muestra.

1. Se tomó una alícuota de 0.5 mL de la solución stock de glimepirida (50 μ g/mL), y se transfirió a un matraz volumétrico de 5 mL, adicionándole 0.5

mL de la solución stock de estándar interno B (50 µg/mL) y se aforo con plasma. La muestra se preparó por triplicado.

2. Se procedió con el **Tratamiento de la muestra:**

2.1 Se tomaron 0.5 mL de muestra y se colocó en tubos de ensayo, adicionando 1 mL de MetOH/Ácido acético 1% (1:2)

2.2 Se sostienen los tubos de manera vertical y se agito en vortex por 1.5 min.

2.3 Se transfirió el contenido del tubo de ensayo a un tubo eppendorf y se centrifugo a 10000 rpm durante 10 minutos.

3. Se transfirió el sobrenadante a viales, para su análisis en el equipo de CLAR

4. Se leyeron bajo las condiciones antes mencionadas

Después de obtener un método de cuantificación para la glimepirida en plasma adecuado, se procedió a validar, primero el sistema y después el método.

6.4.5 Validación del sistema.

6.4.5.1 Precisión del sistema.

1. De la solución stock de glimepirida se transfirió 0.5 mL a matraces volumétricos de 5 mL y se adicionó 0.5 mL de la solución stock de estándar interno B. Se aforó con fase móvil; esto se realizó por **sextuplicado**.

2. Se transfirió las disoluciones a viales y se inyectaron de acuerdo a las condiciones de operación establecidas.

Se registraron los datos obtenidos de área bajo la curva generados por el analito y el estándar interno. Con los datos obtenidos se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Criterios de aceptación.

CV \leq 3% Ho: $\sigma^2 \geq 3\%$ Hi: $\sigma^2 < 3\%$ Rechazar Ho $X^2_{\text{calc}} < X^2_{\text{tab}}$

6.4.5.2 Linealidad del sistema.

1. Por triplicado se realizaron cinco concentraciones, las cuáles fueron las siguientes: 1 $\mu\text{g/mL}$, 3 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 7 $\mu\text{g/mL}$, 9 $\mu\text{g/mL}$.

Se tomaron alícuotas de 0.1 mL, 0.3 mL, 0.5 mL, 0.7 mL, 0.9 mL de la solución stock de glimepirida, se transfirió a matraces volumétricos de 5 mL respectivamente, a cada matraz se le adicionó 0.5 mL de la solución de stock de estándar interno B y se aforó con fase móvil a cada matraz.

2. Se transfirió las disoluciones a viales y se inyectaron de acuerdo a las condiciones de operación establecidas.

Con los resultados, se calculó la concentración y las variables para el método de regresión por mínimos cuadrados (x^2 , $x-y$, $(x-y)^2$, entre otros) y así se obtuvo la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de determinación. Para comprobar las hipótesis de la ordenada al origen y la pendiente se utilizó el estadígrafo t.

Criterios de aceptación:

Pendiente: $\beta \neq 0$

Ordenada al origen: $\alpha = 0$

Coefficiente de determinación: $r^2 \geq 0.98$

Pendiente (respuesta vs concentración) diferente de cero

$H_0: \beta_0 = 0$ $t_{\text{Calc}} > t_{\text{Crít}}$ se rechaza la hipótesis nula

$H_1: \beta_0 \neq 0$

Ordenada al origen igual a cero.

$H_0: \alpha_0 = 0$ $t_{\text{Calc}} < t_{\text{Crít}}$ se acepta la hipótesis nula

$H_1: \alpha_0 \neq 0$

Tabla de análisis de varianza:

H_0 : No existe una relación lineal significativa entre la respuesta y la concentración.

H_1 : Existe una relación lineal significativa entre la respuesta y la concentración.

F calc > F tab Rechazar Hipótesis nula

6.4.6 Validación del método.

6.4.6.1 Especificidad.

1. Se enumeró cuatro tubos de ensayo, en los cuales cada tubo contenía:
 - Tubo 1: 0.5 mL de plasma + 0.1 mL de Metanol grado HPLC.
 - Tubo 2: 0.5 mL de plasma + 0.1 mL de solución stock de estándar interno B.
 - Tubo 3: 0.5 mL de plasma + 0.1 mL de solución stock de glimepirida.

-
- Tubo 4: 0.5 mL de plasma + 0.1 mL de solución stock de estándar interno B + 0.1 mL de solución stock de glimepirida.
2. Se llevó a cabo el **tratamiento de la muestra** con todos los tubos.
 3. Se leyeron bajo las condiciones antes mencionadas.

Se compararon los cromatogramas, verificando de donde pertenece cada respuesta.

6.4.6.2 Linealidad del método.

1. Por triplicado se realizaron cinco concentraciones, las cuáles fueron las siguientes: 1 µg/mL, 3 µg/mL, 5 µg/mL, 7 µg/mL, 9 µg/mL.
Se tomaron alícuotas de 0.1 mL, 0.3 mL, 0.5 mL, 0.7 mL, 0.9 mL de la solución stock de glimepirida, se transfirió a matraces volumétricos de 5 mL respectivamente, a cada matraz se le adicionó 0.5 mL de la solución stock de estándar interno B y se aforó con plasma cada matraz.
2. Se llevó a cabo el **tratamiento de la muestra** a cada matraz.
3. Se transfirió el sobrenadante a viales y se inyectaron de acuerdo a las condiciones de operación establecidas.

Con los resultados se calculó la concentración y las variables para el método de regresión por mínimos cuadrados (x^2 , $x-y$, $(x-y)^2$, entre otros) y así se obtuvo la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de determinación. Para comprobar las hipótesis de la ordenada al origen y la pendiente se utilizará el estadígrafo t.

Criterios de aceptación:

Pendiente: $\beta \neq 0$

Ordenada al origen: $\alpha = 0$

Coefficiente de determinación: $r^2 \geq 0.98$

Pendiente (respuesta vs concentración) diferente de cero

$H_0: \beta_0 = 0$ $t_{\text{Calc}} > t_{\text{Crít}}$ se rechaza la hipótesis nula

$H_1: \beta_0 \neq 0$

Ordenada al origen igual a cero.

$H_0: \alpha_0 = 0$ $t_{\text{Calc}} < t_{\text{Crít}}$ se acepta la hipótesis nula

$H_1: \alpha_0 \neq 0$

Tabla de análisis de varianza:

H_0 : No existe una relación lineal significativa entre la respuesta y la concentración.

H_1 : Existe una relación lineal significativa entre la respuesta y la concentración.

F calc > F tab Rechazar Hipótesis nula

6.4.6.3 Exactitud.

1. Por triplicado se realizaron tres concentraciones, las cuáles fueron las siguientes: 3 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 7 $\mu\text{g/mL}$.

Se tomaron alícuotas de 0.3 mL, 0.5 mL, 0.7 mL de la solución stock de glimepirida, se transfirió a matraces volumétricos de 5 mL respectivamente, a cada matraz se le adicionó 0.5 mL de la solución stock de estándar interno B y se aforó con plasma cada matraz.

-
2. Se llevó a cabo el **tratamiento de la muestra** a cada matraz.
 3. Se transfirió el sobrenadante a viales y se inyectaron de acuerdo a las condiciones de operación establecidas.

Con los resultados se calculó la concentración recuperada de la muestra, el porcentaje de recobro para cada muestra y con esto se procedió a obtener el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación para calcular el estadígrafo t.

Criterios de aceptación: $CV \leq 15\%$

$H_0: \mu = 100$

$H_1: \mu \neq 100$ μ : Porcentaje de recobro

t_{Calc} se encuentra dentro de la región de no rechazo. Con un 95% de confianza.

6.4.6.4 Precisión: Repetibilidad.

1. Por triplicado se realizaron tres concentraciones las cuáles fueron las siguientes: 1 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 9 $\mu\text{g/mL}$.

Se tomaron alícuotas de 0.1 mL, 0.5 mL, 0.9 mL de la solución stock de glimepirida, se transfirió a matraces volumétricos de 5 mL respectivamente, a cada matraz se le adicionó 0.5 mL de la solución stock de estándar interno B y se aforó con plasma cada matraz.

2. Se llevó a cabo el **tratamiento de la muestra** a cada matraz.
3. Se transfirió el sobrenadante a viales y se inyectaron de acuerdo a las condiciones de operación establecidas.

Con los resultados obtenidos, utilizando la respuesta de cada muestra se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación por cada concentración. Usando los parámetros necesarios para calcular el estadígrafo ji cuadrada χ^2 .

Criterios de aceptación: $CV \leq 15\%$

H_0 : $\sigma^2 \geq 15\%$ de la concentración nominal.

H_1 : $\sigma^2 < 15\%$ de la concentración nominal.

$\chi^2_{calculada} < \chi^2_{tablas}$ Rechazar H_0 .

6.4.6.5 Precisión: precisión intermedia.

En dos días diferentes se realizó lo siguiente:

1. Se tomó una alícuota de la solución stock de glimepirida de 0.5 mL y se transfirió a un matraz volumétrico de 5 mL, se adicionó 0.5 mL de solución stock de estándar interno y se aforo con plasma, **esto se realizó por triplicado.**
2. Se llevó a cabo el **tratamiento de la muestra** a cada matraz.
3. Se transfirió el sobrenadante a viales y se inyectaron de acuerdo a las condiciones de operación establecidas.

Con los resultados obtenidos se utilizaron para un análisis de varianza. Donde se comprobaron la hipótesis:

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

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

Criterios de aceptación: $CV \leq 15\%$; $F_{\text{Calc}} \leq F_{\text{Crít}}$

6.4.6.6 Estabilidad de la muestra.

6.4.6.6.1 Estabilidad de mesa o a temperatura ambiente.

1. Se tomó una alícuota de la solución stock de glimepirida de 0.5 mL y se transfirió a un matraz volumétrico de 5 mL, se adicionó 0.5 mL de solución stock de estándar interno B y se aforo con plasma, **esto se realizó por triplicado.**
2. Se dejó la muestra en la mesa de trabajo y se hicieron muestreos a 0, 2, 4 y 6 h.
3. Por cada muestreo, se llevó a cabo el **tratamiento de la muestra** a cada matraz.
4. Se transfirió el sobrenadante a viales y se inyectaron de acuerdo a las condiciones de operación establecidas.

Con los resultados obtenidos, se obtuvo la concentración recuperada de cada muestra, se calculó el promedio, la desviación estándar de cada tiempo y se llevó a cabo un análisis estadístico con ji cuadrada X^2 .

Criterio de aceptación: $CV \leq 15\%$

H_0 : $\sigma^2 \geq 15\%$ de la concentración nominal

H_1 : $\sigma^2 < 15\%$ de la concentración nominal

$X^2_{\text{Calc}} < X^2_{\text{tab}}$ se rechaza la hipótesis nula.

6.4.6.6.2 Estabilidad de congelamiento y descongelamiento.

1. Se tomó una alícuota de la solución stock de glimepirida de 0.5 mL y se transfirió a un matraz volumétrico de 5 mL, se adicionó 0.5 mL de solución stock de estándar interno B y se aforo con plasma, **esto se realizó por triplicado.**
2. Se colocó cada muestra en tubos de ensayo y se almacenó al congelador de 12 a 24 h. y se descongelaron a temperatura ambiente. Cuando se descongeló completamente, las muestras volvieron a congelar de 12 a 24 h. bajo las mismas condiciones, se realizaron al menos tres ciclos.
3. Se realizó un muestreo para cada ciclo.
4. Por cada muestreo, se llevó a cabo el **tratamiento de la muestra** a cada matraz.
3. Se transfirió el sobrenadante a viales y se inyectaron de acuerdo a las condiciones de operación establecidas.

Con los resultados obtenidos, se obtuvo la concentración recuperada de cada muestra, se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de cada tiempo y se llevó a cabo un análisis estadístico con ji cuadrada X^2 .

Criterio de aceptación: $CV \leq 15\%$

$H_0: \sigma^2 \geq 15\%$ de la concentración nominal

$H_1: \sigma^2 < 15\%$ de la concentración nominal

$X^2_{\text{Calc}} < X^2_{\text{tab}}$ se rechaza la hipótesis nula.

6.4.6.6.3 Estabilidad a corto plazo a temperatura ambiente.

1. Se utilizaron las muestras en el primer descongelamiento de **Estabilidad de congelamiento y descongelamiento**.
2. Cuando se descongeló, se hicieron muestreos de 0, 2, 4 y 6 horas, donde en cada muestreo se llevó a cabo el **tratamiento de la muestra**.
3. Se transfirió el sobrenadante a viales y se inyectaron de acuerdo a las condiciones de operación establecidas.

Con los resultados obtenidos, se obtuvo la concentración recuperada de cada muestra, se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de cada tiempo; se llevó a cabo un análisis estadístico con ji cuadrada.

Criterio de aceptación: $CV \leq 15\%$

$H_0: \sigma^2 \geq 15\%$ de la concentración nominal

$H_1: \sigma^2 < 15\%$ de la concentración nominal

$X^2_{\text{Calc}} < X^2_{\text{tab}}$ se rechaza la hipótesis nula.

6.4.6.6.4 Estabilidad a largo plazo.

1. Se utilizaron las muestras de **Estabilidad de congelamiento y descongelamiento**, terminando los tres ciclos se dejaron congelar durante una semana.
2. Pasando ese tiempo se descongeló y se llevó a cabo el **tratamiento de la muestra**.

-
3. Se transfirió el sobrenadante a viales y se inyectaron de acuerdo a las condiciones de operación establecidas.

Con los resultados obtenidos, se obtuvo la concentración recuperada de cada muestra, se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación a cada tiempo y se llevó a cabo un análisis estadístico con ji cuadrada.

Criterio de aceptación: $CV \leq 15\%$

H_0 : $\sigma^2 \geq 15\%$ de la concentración nominal

H_1 : $\sigma^2 < 15\%$ de la concentración nominal

$X^2_{Calc} < X^2_{tab}$ se rechaza la hipótesis nula.

6.4.6.6.5 Estabilidad de automuestreador.

1. Se tomó una alícuota de 0.5 mL de la solución stock de glimepirida, se transfirió a matraces volumétricos de 5 mL respectivamente, a cada matraz se le adicionó 0.5 mL de la solución stock de estándar interno B y se aforó con plasma cada matraz. **Se realizó por triplicado.**
2. Se llevó a cabo el **tratamiento de la muestra** a cada matraz.
3. Se transfirió el sobrenadante a viales y se inyectaron de acuerdo a las condiciones de operación establecidas.
4. Se mantuvo el vial en el automuestreador.
5. Se inyectó las muestras anteriores cada hora hasta completar las 4 horas.

Con los resultados obtenidos, se calculó la concentración recuperada de cada muestra, el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de cada tiempo y se llevó a cabo un análisis estadístico con ji cuadrada.

Criterio de aceptación: $CV \leq 15\%$

$H_0: \sigma^2 \geq 15\%$ de la concentración nominal

$H_1: \sigma^2 < 15\%$ de la concentración nominal

$X^2_{\text{Calc}} < X^2_{\text{tab}}$ se rechaza la hipótesis nula.

6.4.6.7 Límite de detección.

1. Se realizaron tres concentraciones: 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 0.25 $\mu\text{g/mL}$, 0.1 $\mu\text{g/mL}$.

A partir de un matraz con una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ de glimepirida y estándar interno en plasma. Se tomaron alícuotas de 1 mL, 0.5 mL, 0.25 mL y se transfirió a matraces volumétricos de 5 mL respectivamente se aforó con plasma cada matraz.

2. Se llevó a cabo el **tratamiento de la muestra** a cada matraz.

3. Se transfirió el sobrenadante a viales y se inyectaron de acuerdo a las condiciones de operación establecidas.

Criterio de aceptación: Se debe de mostrar en el cromatograma aun señal del analito.

6.4.6.8 Límite de cuantificación.

Observando los resultados del límite de detección, se pudo decidir a partir de que concentración más baja se puede cuantificar la glimepirida.

Con los resultados obtenidos se obtuvo la concentración recuperada, calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Criterio de aceptación: $CV \leq 15\%$

6.5 Diseño estadístico.

*** Promedio (\bar{y})**

Para un conjunto de datos 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:

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n}$$

Dónde:

- \bar{y} = Promedio
- y_i = valor (variable de respuesta)
- n = Total de datos

*** 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:

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

Dónde:

- S = la desviación estándar

-
- \bar{y} = el promedio de la variable
 - y = la variable de respuesta
 - n = número de determinaciones realizadas
 - * Coeficiente de variación (CV)

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

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

Dónde:

- CV = el coeficiente de variación
- S = la desviación estándar
- \bar{y} = el promedio de la variable de respuesta
- * Pendiente (b)

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

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

Dónde:

- β = la pendiente
 - n = el número de parejas ordenadas (x_i, y_i)
 - x_i = la variable independiente
 - y_i = la variable de respuesta
-

* Ordenada al origen (α)

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

$$\alpha = \frac{\sum_{i=1}^n y_i - \beta \sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Dónde:

- α = la ordenada al origen.
- n = el número de parejas ordenadas (x_i, y_i) .
- b = es la pendiente
- x_i = la variable independiente
- y_i = 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:

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

Dónde:

- r^2 = el coeficiente de determinación
- β = la pendiente
- n = el número de parejas ordenadas (x_i, y_i) consideradas para realizar el cálculo.

- x_i = la variable independiente
- y_i = la variable de respuesta
- * Estadígrafo de t para la pendiente de la regresión lineal (t).

$$t = \frac{b - \beta_0}{S_b}$$

Dónde:

- t = t de student, calculada para el estadígrafo.
- b = pendiente calculada para la regresión.
- β_0 = Valor de la hipótesis nula para la pendiente.
- S_b = desviación estándar para el cálculo de la pendiente.

- * Varianza para el cálculo de la pendiente (S_b^2)

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

Dónde:

- S_b^2 = Varianza para el cálculo de la pendiente.
- $S_{y/x}^2$ = Varianza de regresión.
- x_i = Variable independiente
- n = Número de parejas ordenadas (x_i, y_i) .

- * Varianza de regresión ($S_{y/x}^2$)

$$S_{y/x}^2 = \frac{n-1}{n-2} (S_y^2 - b^2 S_x^2)$$

- $S_{y/x}^2$ = Varianza de regresión.

- n = Número de parejas ordenadas (x_i, y_i) .
- S_y^2 = Varianza de los valores de y .
- S_x^2 = Varianza de los valores de x .
- b = Pendiente calculada de la regresión.

★ Estadígrafo de t para la ordenada al origen de la regresión lineal (t).

$$t = \frac{a_0 - \alpha}{S_{y/x} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(X_p - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n}}}}$$

Dónde:

- t = t de student, calculada para el estadígrafo.
- a_0 = Valor estimado de los datos de regresión para la ordenada al origen.
- α = Valor de la hipótesis nula para la ordenada al origen.
- $S_{y/x}$ = Desviación estándar inexplicada a partir de los datos de la muestra.
- n = Número de parejas ordenadas.
- X_p = Valor particular de x en el que se desea obtener un intervalo de predicción para y .
- \bar{x} = Promedio de los valores de x .

★ Estadígrafo t para la estimación de la media de los recobros. (t)

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

Dónde:

- t = estadígrafo t de Student
- \bar{y} = promedio de la variable de respuesta, y
- μ = valor teórico de la media contra la que se comparan los resultados obtenidos
- S = desviación estándar de la serie de datos
- n = número de datos utilizados para realizar los cálculos

* Análisis de varianza (ANDEVA) de la regresión lineal.

| Cuadro 3. Tabla de análisis de varianza para demostrar la regresión lineal. | | | | | |
|---|---------------------------|-------------------|--------------------------------|------------------------|---|
| Fuente de variación | Grados de libertad (g.l.) | Suma de cuadrados | Media de cuadrados | F calculada | F tablas |
| Regresión | 1 | SC _R | $MC_R = SC_R$ | $\frac{MC_R}{MC_{ER}}$ | (F _{α/2g.l.R, g.l.e} – F _{1α/2g.l.R, g.l.e}) |
| Error de regresión | n-1 | SC _{ER} | $MC_{ER} = \frac{SC_e}{g.l.e}$ | | |

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

- Suma de cuadrados de la regresión (SC_R)

$$SCD_R = \beta^2 \left[\sum_{i=1}^n X_i^2 - \frac{X_i^2}{n} \right]$$

- $\sum_{i=1}^n X_i^2$ = Sumatoria elevada al cuadrado de los datos obtenidos para X.

- Suma de cuadrados del error (SCE)

$$SCE = \sum_{i=1}^n Y_i^2 - \beta \left[\sum_{i=1}^n X_i - Y_i \right] - \alpha \left[\sum_{i=1}^n Y_i \right]$$

- $\sum_{i=1}^n X_i - Y_i$ = Sumatoria de la resta de X-Y de cada resultado analítico.

★ Análisis de varianza (ANDEVA) de la precisión intermedia

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

$$Y_{ik} = \mu + D_j + e_{k(j)}$$

Dónde:

- Y_{jk} = k-ésima observación obtenida por el j-ésimo día.
- μ = Media poblacional de las observaciones obtenidas aplicando el método.
- D_j = Efecto del j-ésimo día en el resultado analítico.
- $e_{k(j)}$ = Error experimental de la k-ésima observación realizada en el j-ésimo día.

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

- Suma de cuadrados del día (SCD_j)

$$SCD_j = \frac{\sum_{i=1}^n Y_j^2}{k} - \frac{Y_{..}^2}{jk}$$

- $\sum_{i=1}^n Y_j^2$ = Sumatoria elevada al cuadrado de los datos obtenidos para cada día sin importar replica.

- **Suma de cuadrados del error ($SCE_{k(j)}$)**

$$SC_e = \sum_{i=1}^n \sum_{k=1}^n Y_{jk}^2 - \frac{\sum_{i=1}^n Y_j^2}{k}$$

- $\sum_{i=1}^n \sum_{i=1}^n Y_{jk}^2$ = Sumatoria del cuadrado del valor de cada resultado analítico.

- Análisis de varianza para precisión intermedia

El análisis de varianza para la precisión intermedia se realiza de acuerdo al siguiente cuadro:

| Cuadro 4. Tabla de análisis de varianza para demostrar la precisión intermedia. | | | | | |
|---|---------------------------|-------------------|-----------------------------|---------------------|---|
| Fuente de variación | Grados de libertad (g.l.) | Suma de cuadrados | Media de cuadrados | F calculada | F tablas |
| Día | (j-1) | SC _D | $MC_D = \frac{SC_D}{g.l.D}$ | $\frac{MC_D}{MC_e}$ | (F _{α/2g.l.D, g.l.e} – F _{1α/2g.l.D, g.l.e}) |
| Error | (k-1)(j) | SC _e | $MC_A = \frac{SC_e}{g.l.e}$ | | |

Dónde:

- SC_D = Suma de cuadrados del día
- SC_e = Suma de cuadrados del error experimental.
- MC_D = Media de cuadrados del día
- MC_e = Media de cuadrados del error experimental

* Ji calculada (χ²)

$$X^2 = \frac{(n-1)S^2}{(\sigma)^2}$$

Dónde:

- S = Desviación estándar de la serie de datos
- n = Número de datos utilizados para realizar los cálculos
- σ = Desviación estándar poblacional.

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

7.1 Desarrollo del método.

En el desarrollo y optimización del método se cambiaron varias condiciones tanto cromatograficas como del tratamiento de la muestra, obteniendo el método adecuado se procedió a validarlo.

Las condiciones cromatograficas con las que se inició el desarrollo del método fueron tomadas del método de cuantificación de glimepirida en matriz farmacéutica,³⁸ sin embargo estas condiciones fueron probadas en una matriz biológica que fue el plasma.

Condiciones cromatograficas:

- **Columna:** C18 de 5 µm de tamaño de partícula con dimensiones de 4.6 X 150 mm.
- **Fase móvil:** Amortiguador de fosfatos pH 5.25 0.05M: Acetonitrilo (50:50 v/v)
- **Velocidad de flujo:** 2.2 mL/min.
- **Volumen de inyección:** 50 µL
- **Detector:** UV
- **Longitud de onda:** 227 nm
- **Tiempo de corrida:** 5.5 minutos

Este método fue desarrollado para la utilización en farmacocinética, por ello su matriz biológica es plasma, para que este no sea un problema en el análisis del equipo del CLAR, se realiza previamente un tratamiento de la muestra, el cual, se

requirió de una proporción 1:3 con la solución de metanol/ Ácido acético 1%, se agito en vortex por 1 minuto y se centrifugo a 10000 rpm durante 10 min.

Se utilizó glibenclamida como estándar interno porque una de las características de este es una estructura similar a la del fármaco, lo cual se comporta de forma similar. Pero se observó (Figura 4) en el cromatograma picos con poca resolución. Por ello se realizaron varios cambios en el método como se muestra en la cuadro 5.

| Cuadro 5. Condiciones que se probaron durante el desarrollo del método. | | | | |
|--|--|---|---|---------------------|
| N° de cambio. | Condición | Trabajo que se realizo | Resultado | Decisión |
| 1° | Sales de sulfato | Se cambiaron los reactivos de la solución amortiguadora. | Muy poca resolución en los picos. | No se utiliza. |
| 2° | Proporción de la muestra con solución metanol/ ácido acético 1%. | Cambio de 1:3 a 1:1. | Mejoro la forma de los picos. | Se utilizó. |
| 3° | Proporción de fase móvil. | 45:55 v/v de amortiguador de fosfatos pH 5.25 y acetonitrilo. | Mejoro el factor de capacidad de los picos, es decir, la separación de los picos se optimizo. | Se utilizó. |
| 4° | Velocidad de flujo. | 2.0 mL/min | Disminuyo los tiempos de retención. | Se utilizó. |
| 5° | Columnas C18 de 5 µm de tamaño de partícula con dimensiones de | Se acondicionaron con metanol HPLC: agua (50:50 v/v). Se usaron las condiciones | No soportaba presiones altas. Los picos en el cromatograma se encontraban muy | Ninguna se utilizó. |

| | | | | |
|-----|--|---|--|-------------------------|
| | 4.6 X 100 mm. | cromatograficas para el método cambiando una velocidad de 1.2 mL/min | juntos y se encimaban en el frente del plasma. | |
| 6° | Columnas C18 de 5 µm de tamaño de partícula con dimensiones de 4.6 X 200 mm. | Se acondicionaron con metanol HPLC: agua (50:50 v/v) | Línea base con mucho ruido y no soportaban presiones altas, | Ninguna se utilizó. |
| 7° | Columnas C18 de 5 µm de tamaño de partícula con dimensiones de 4.6 X 150 mm | Se calificaron con solución de cafeína 5mg/L. 10 inyecciones por columna. | Columna 1: CV= 1.157% Columna 2: CV= 0.985% Columna 3: CV= 1.45% Columna 4: CV= 1.57% | Eligiendo la columna 2. |
| 8° | Proporción de fase móvil. | 50:50 v/v de amortiguador de fosfatos pH 5.25 y acetonitrilo. | Mejoro el factor de capacidad de los picos, es decir, la separación de los picos se optimizo. | Se utilizó. |
| 9° | Proporción de la muestra con solución metanol/ ácido acético 1%. | Cambio de 1:1 a 1:2. | Desaparecieron las lecturas que eran por parte del plasma. | Se utilizó. |
| 10° | Tiempo de agitación en vortex. | 1.5 minutos | Desapareció la turbidez del vial | Se utilizó |

El primer cambio realizado como se muestra en el cuadro 5, es el uso de los sulfatos de sodio en la solución amortiguadora, estas sales causaron una baja resolución, ya que este ion es menos soluble que el potasio y precipita más cuando se mezcla con solventes orgánicos,³⁹ lo cual se volvió a elegir las sales de

fosfatos de potasio, sin embargo al volver a realizar los cálculos para la cantidad de ambas sales a utilizar, se descubrió un error en la proporción de las sales (fosfato monobásico y dibásico) donde provocaba un desequilibrio en la columna. Cuando se corrigió el cálculo, se mejoró la resolución de los picos (Figura 5), no obstante, los picos eran pequeños y anchos, por ello se cambió la proporción del tratamiento de la muestra como se muestra en el cuadro 5, eligiendo la proporción 1:1, pues los picos se mostraban más definidos (Figura 6). También se cambió la proporción de la fase móvil (45:55 v/v) de amortiguador de fosfatos pH 5.25 y acetonitrilo respectivamente y la velocidad de flujo a 2.0 mL/min, donde se mejoró el factor de capacidad entre los picos y se disminuyó los tiempos de retención.

Se probó el método ya obtenido con algunas muestras, sin embargo, se encontró con otro problema al volver a reproducirlo, pues los cromatogramas revelaron picos anchos y asimétricos (Figura 7), la causa fue una mala preparación de la muestra, obteniendo una homogenización pobre como consecuencia se tuvo que cambiar la columna.

Como se muestra en el cuadro 5, se probaron varias columnas, tenían las mismas características que la primera sólo que su tamaño era diferente (4.6 X 100 mm), sin embargo, este tipo de columnas no se podía utilizar a una velocidad de flujo mayor a 1.2 mL/min, pues la columna no resistía mayor presión y expulsaba la línea donde pasaba la fase móvil, no obstante, se decidió usar la columna con las condiciones antes mencionadas, el único que cambio fue la velocidad de flujo de 1.2 mL/min pero los picos salieron muy pegados entre si y encimados al frente del plasma. Otras de las columnas a probar fue una C18 pero con un tamaño más

grande (4.6 X 200 mm), como las columnas ya tenían tiempo en el laboratorio y eran reutilizables no soportaban presiones altas, pues se encontraban en un estado alto de sequedad. Por ello solo se tomaron en cuenta las columnas con las mismas características y dimensiones a la columna con la que se inició el proyecto. Para ello se encontraron cuatro, las cuales se tuvieron que calificar y se eligió la que tenía un coeficiente de variación menor a 1 como se muestra en el cuadro 5.

Con la columna elegida mejoraron la forma de los picos pero por el cambio, estos se encontraron muy juntos. Para mejorar el factor de capacidad se cambió la proporción de la fase móvil a 50:50, si bien separo los picos, el cromatograma (Figura 8) se mostraba con más lecturas a parte de los picos de interés; para evitar esto se cambió la proporción de la muestra y la solución de metanol/ ácido acético 1% a 1:2 respectivamente pero aún se observó en el vial la precipitación de proteínas, por ello se aumentó el tiempo de agitación del vortex a 1.5 minutos, presentando menos lecturas y disminuyendo la turbidez del vial.

Con los cambios anteriores se obtuvo un método (Figura 9), en donde se podía observar el pico de la glimepirida y el del estándar interno, sin embargo se debía optimizar para mejorar algunas características.

7.2 Optimización del método.

| Cuadro 6. Condiciones que se probaron durante la optimización de método | | |
|--|--|-----------------|
| Condición | Resultado | Decisión |
| Velocidad de flujo 1.5 mL/min | Aumento el tiempo de retención y deforme los picos. | Se descartó |
| Velocidad de flujo 1.8 mL/min | Aumento el tiempo de retención y disminuyo la resolución de los picos. | Se descarto |
| Solución amortiguadora de fosfatos pH 5.0 | Mejoro la forma de los picos y su resolución. | Se utilizó. |
| Solución amortiguadora de fosfatos pH 5.45 | Deformo los picos y bajo la resolución. | Se descartó |
| Adición de ácido 1-octilsulfónico 10^{-5} M en la solución amortiguadora | Disminuyo el coleo de los picos. | Se utilizó |
| Felodipino como estándar interno | Su pico se alejó del fármaco. | Se utilizó |

Al obtener el método de cuantificación de la glimepirida, se decidió optimizar la resolución de los picos, su tiempo de retención de ambos y su factor de selectividad, por ello se probó cambiar la velocidad de flujo como se muestra en el cuadro 6, tratando de que los picos se separaran un poco y disminuir el coleo pero lo único que se observó fue la mal formación de estos y que los tiempos de retención aumentaron, dejando la velocidad de flujo a 2 mL/min. Después se adicionó el ácido 1-octilsulfónico a una concentración de 10^{-5} M en la buffer, también se probaron diferentes pH de esta (5, 5.25 y 5.45) y se utilizó felodipino como estándar interno.

Obteniendo cromatogramas donde se eliminó el coleo gracias al ácido 1-octilsulfónico, los picos se definieron mejor con la solución amortiguadora de pH 5

y se eligió el felodipino como estándar interno (Figura 10), puesto que sus tiempos de retención estaban separados de al menos 2 minutos a comparación con la glibenclamida (Figura 11) que tenían una separación menor de 50 segundos, evitando que los picos se junten por el coleo provocados por el plasma.

Finalmente por los cambios anteriores se optaron por las siguientes condiciones:

- Condiciones cromatograficas elegidas:
 - **Columna:** C18 de 5 μm de tamaño de partícula con dimensiones de 4.6 X 150 mm.
 - **Fase móvil:** Buffer de fosfatos pH 5 0.05M más 10^{-5} M de ácido 1 - octilsulfonico: Acetonitrilo (50:50 v/v)
 - **Velocidad de flujo:** 2 mL/min.
 - **Volumen de inyección:** 50 μL
 - **Detector:** UV
 - **Longitud de onda:** 227 nm
 - **Tiempo de corrida:** 6.5 minutos

Donde las condiciones para el tratamiento de la muestra son:

- Proporción de la solución metanol- ácido acético 1% y la muestra: 2:1
- Tiempo de agitación en vortex: 1.5 min.
- Velocidad y tiempo en microcentrifuga: 10 000 rpm X 10 min.

Y la elección para estándar interno fue el Felodipino Std ref.

En el cromatograma (Figura 12) con el método elegido se puede observar ambos picos simétricos y con buena resolución, ya no tiene coleo los picos y no hay lecturas de contaminación; comparando el método de cuantificación de

glimpirida obtenido con otros encontrados en artículos, estos utilizan gran cantidad de disolvente en la fase móvil (80 a 90%)^{40,41}, en cambio en este método se disminuye, utilizando solo 50% v/v; uno de los métodos tiene un tratamiento difícil de reproducir además de utilizar reactivos no estables⁴¹ obteniendo muy poca confianza en este paso, comparado con el tratamiento del método desarrollado de este trabajo, que es muy sencillo y con reactivos estables donde se tiene la seguridad de resultados confiables.

Ya obtenido el método de cuantificación de glimepirida, se llevó a cabo la validación del sistema, para demostrar que el desempeño del sistema cumple con los criterios para utilizarse en el método analítico.

7.3 Validación del sistema.

7.3.1 Precisión.

Cuadro 7. Tratamiento de resultados de precisión del sistema.

| Variable | Resultado | Criterio de aceptación | Dictamen |
|--------------|-----------|--|-----------------------|
| \bar{y} | 0.952058 | --- | El sistema es preciso |
| DS | 0.018946 | --- | |
| CV | 1.9905% | $CV \leq 3\%$ | |
| X^2_{calc} | 0.079767 | $H_0: \sigma^2 \geq 3\%$ $H_1: \sigma^2 < 3\%$ | |
| X^2_{tab} | 1.145 | Rechazar H_0 $X^2_{calc} < X^2_{tab}$ | |

Para el análisis de los resultados de precisión del sistema se usó el coeficiente de variación donde se puede observar en el cuadro 7 que resulto menor que el criterio de aceptación, es decir, las respuestas se alejan menos del 3% del promedio. También se utilizó el contraste de hipótesis para comprobar la variabilidad, donde con el estadígrafo ji cuadrada se rechazó la hipótesis nula, puesto que ji de tablas con 5 grados de libertad es mayor que ji calculada, demostrando que hay una variabilidad menor del 3% en las respuestas de las seis muestras con un 95% de confianza; exponiendo que si hay precisión en el sistema.

7.3.2 Linealidad.

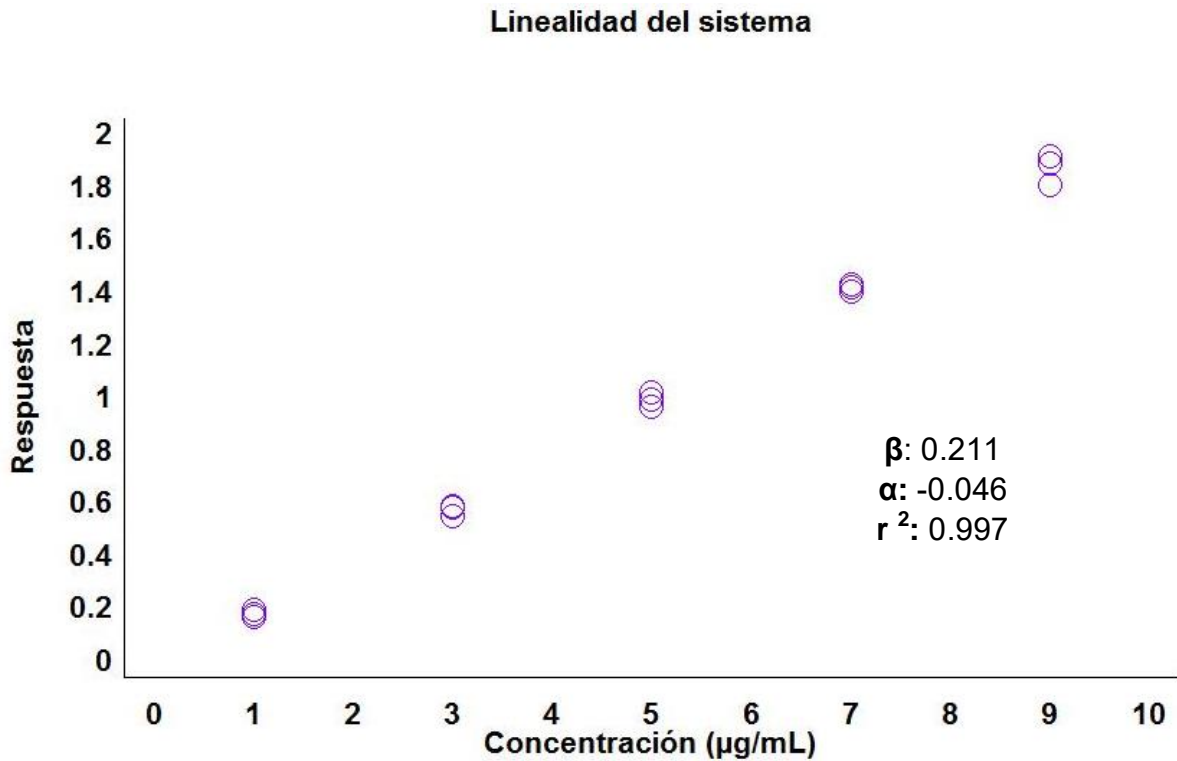


Fig. 13. Recta de linealidad del sistema.

Cuadro 8. Tratamiento de resultados de linealidad del sistema.

| Variable | Resultado | Criterio de aceptación | Dictamen |
|-------------------------------------|-----------|--|-----------------------|
| Pendiente β | 0.21117 | $\beta \neq 0$ | El sistema es lineal. |
| Ordenada al origen α | -0.04677 | $\alpha = 0$ | |
| Coefficiente de determinación r^2 | 0.99757 | $r^2 \leq 0.99$ | |
| t_β | 79.7996 | $H_0: \beta = 0$ y $\alpha = 0$ | |
| t_α | 1.159 | $H_1: \beta \neq 0$ y $\alpha \neq 0$ | |
| t_{tab} | 2.1604 | Para β : $t_{calc} > t_{tab}$ Rechazar H_0 Para α : $t_{calc} < t_{tab}$ Aceptar H_0 | |

H_0 : No existe una relación lineal significativa entre la respuesta y la concentración.
 H_1 : Existe una relación lineal significativa entre la respuesta y la concentración.

Cuadro 9. Análisis de Varianza de la regresión.

| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de Cuadrados | Media de Cuadrados | F_{calc} | F_{tab} | Criterio de aceptación | Dictamen |
|---------------------|--------------------|-------------------|------------------------|------------|-----------|---------------------------------|-------------------------------|
| Regresión | 1 | 5.3791 | 5.3791 | 5368.36 | 4.67 | $F_{calc} > F_{(0.975, 1, 13)}$ | Hay linealidad en el sistema. |
| Error | 13 | 0.013026 | 1.002×10^{-3} | | | | |

Para el análisis de la linealidad del sistema, primero se observó en la curva (Figura 13) que cada concentración tiene una variabilidad en respuesta menor, después se obtuvo la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de determinación con el método de mínimos cuadrados, donde los resultados se encontraron dentro de los criterios de aceptación. Sin embargo, para tener una afirmación completa se utilizó el contraste de hipótesis para la pendiente y la ordenada al origen, el cual se manejó el estadígrafo t de Student para cada uno y una vez determinado se obtuvo el valor de t de tablas para 13 grados de libertad, donde podemos observar que t de la pendiente rechaza la hipótesis nula y t de la ordenada al origen la acepta, concluyendo que la pendiente es diferente de cero y la ordena es igual a cero con un 95% de confianza para ambas.

Finalmente el estadígrafo F de Fisher es resultado del cuadro 9 Análisis de Varianza, en el cual la hipótesis nula (H_0) expresa que no existe una relación lineal significativa entre la respuesta y la concentración. Obteniendo una F calculada mayor a la F de tablas con 13 grados de libertad y rechazando dicha

hipótesis. Concluyendo que existe una relación lineal significativa entre la respuesta y la concentración, es decir, el sistema es lineal con un 95% de confianza.

7.4 Validación del método.

7.4.1 Especificidad.

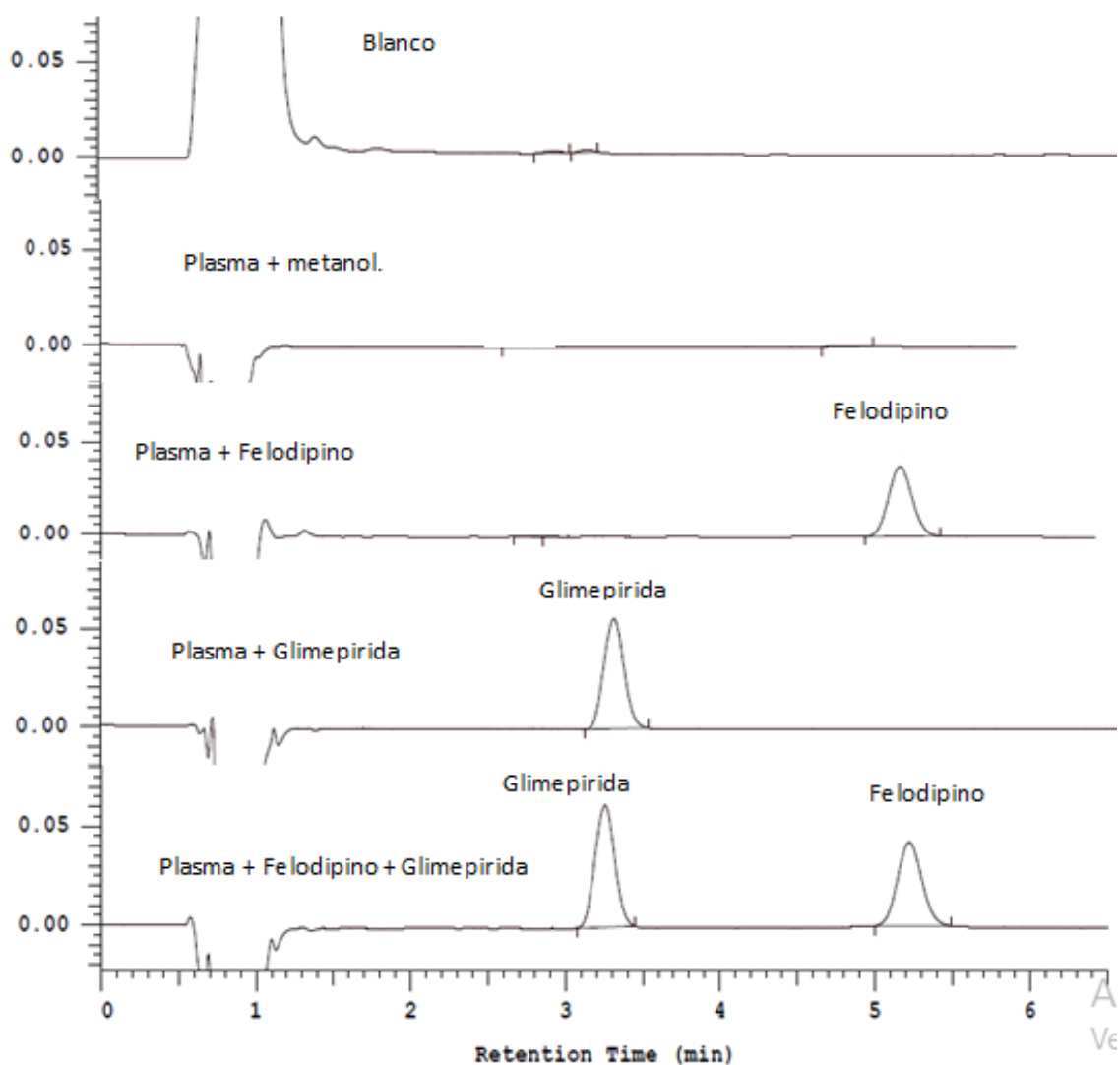


Fig. 14. Cromatogramas de la prueba de especificidad del método.

Observando la Figura 14, se demostró la especificidad, puesto que en cada cromatograma se observa que el método obtenido sólo es para el fármaco en cuestión que es la glimepirida, pues no hay ninguna otra sustancia que salga al mismo tiempo de retención que la glimepirida observándose en los tres primeros cromatogramas. También se confirmó que los picos obtenidos en un cromatograma son glimepirida y felodipino, demostrándolo cuando sólo se estudió cada uno por separado y señalando que tienen el mismo tiempo de retención y la misma proporción en cada pico.

7.4.2 Linealidad.

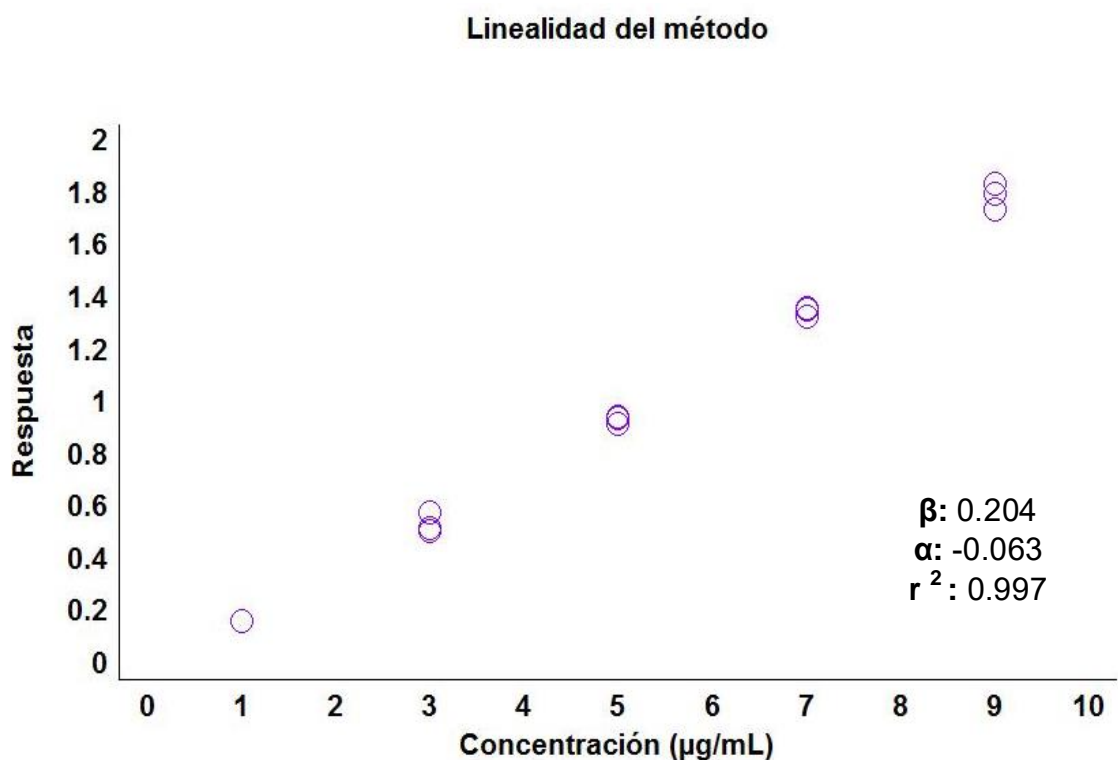


Fig. 15. Recta de linealidad del método.

Cuadro 10. Tratamiento de resultados de linealidad del método.

| Variable | Resultado | Criterio de aceptación | Dictamen |
|-------------------------------------|-----------|--|----------------------|
| Pendiente β | 0.20358 | $\beta \neq 0$ | El método es lineal. |
| Ordenada al origen α | -0.06283 | $\alpha = 0$ | |
| Coefficiente de determinación r^2 | 0.99715 | $r^2 \leq 0.99$ | |
| t_β | 67.6686 | $H_0: \beta = 0$ y $\alpha = 0$ | |
| t_α | 0.17326 | $H_1: \beta \neq 0$ y $\alpha \neq 0$ | |
| t_{tab} | 2.1604 | Para β : $t_{calc} > t_{tab}$ Rechazar H_0 Para α : $t_{calc} < t_{tab}$ Aceptar H_0 | |
| F_{calc} | 700.445 | $F_{calc} > F_{tab}$ | |
| F_{tab} | 4.67 | | |

H_0 : No existe una relación lineal significativa entre la respuesta y la concentración.

H_1 : Existe una relación lineal significativa entre la respuesta y la concentración.

Cuadro 11. Análisis de Varianza de la regresión.

| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de Cuadrados | Media de Cuadrados | F_{calc} | F_{tab} | Criterio de aceptación | Dictamen |
|---------------------|--------------------|-------------------|-----------------------|------------|-----------|---------------------------------|------------------------------|
| Regresión | 1 | 4.97358 | 4.9735 | 700.445 | 4.67 | $F_{calc} > F_{(0.975, 1, 13)}$ | Hay linealidad en el método. |
| Error | 13 | 0.092308 | 7.10×10^{-3} | | | | |

En los resultados de linealidad del método se puede observar en la curva (Figura 15) una dispersión mínima en algunas concentraciones y en otras es un poco variable la respuesta. Se obtuvo la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de determinación con el método de mínimos cuadrados, donde los resultados se encontraron dentro del criterio de aceptación. Sin embargo, para tener una afirmación completa se utilizó la comprobación de hipótesis para la pendiente y la ordenada al origen, donde se manejó el estadígrafo t de Student

para cada parámetro y una vez determinado se obtuvo el valor de t de tablas para 13 grados de libertad, el cual, t calculada de la pendiente rechaza la hipótesis nula (H_0) y t calculada de la ordenada al origen la acepta, concluyendo que la pendiente es diferente de cero y la ordena es igual a cero con un 95% de confianza para ambas.

Finalmente el estadígrafo F de Fisher es resultado del cuadro 11 Análisis de Varianza, donde la H_0 afirma que no existe una relación lineal significativa entre la respuesta y la concentración, este análisis es para afirmar el coeficiente de determinación, donde se obtuvo una F calculada mayor a la F de tablas con 13 grados de libertad. Concluyendo que existe una relación lineal significativa entre la respuesta y la concentración, es decir, el método es lineal con un 95% de confianza.

7.4.3 Exactitud.

Cuadro 10. Tratamiento de resultados de la prueba de exactitud del método.

| Variable | Resultado | Criterio de aceptación | Dictamen |
|------------------------|--------------------|--|---------------------|
| Concentración: 3 µg/mL | | $CV \leq 15\%$ $H_0: \mu = 100\% \quad H_1: \mu \neq 100\%$ $t_{0.025, 2} \leq t_{calc} \leq t_{0.975, 2}$ Aceptar la H_0 | El método es exacto |
| \bar{y} | 103.62% | | |
| DS | 3.18217 | | |
| CV | 3.071% | | |
| t_{calc} | 1.9703 | | |
| t_{tab} | {-4.3027 – 4.3027} | | |
| Concentración: 5 µg/mL | | | |
| \bar{y} | 99.41% | | |
| DS | 2.03175 | | |
| CV | 2.044 % | | |
| t_{calc} | -0.5030 | | |
| t_{tab} | {-4.3027 – 4.3027} | | |
| Concentración: 7 µg/mL | | | |
| \bar{y} | 96.55% | | |
| DS | 4.59151 | | |
| CV | 4.755% | | |
| t_{calc} | -1.3014 | | |
| t_{tab} | {-4.3027 – 4.3027} | | |

Para el análisis de la exactitud se utilizaron los porcentajes de recobro donde cada coeficiente de variación por concentración es menor que el 15%, es decir, cada porcentaje de recobro no se aleja de forma considerable al 100%.

Para la estimación de la media de recobros se utilizó el estadígrafo de t de Student, donde se aceptó la hipótesis nula, ya que indicaba que la media de todos los recobros es igual al 100%, puesto que comparando la t de tablas con 2 grados de libertad versus la t calculada de los tres niveles de concentración analizados, encontrándose dentro de la región de no rechazo con un 95% de confianza, por lo que se confirmó que el método es exacto.

7.4.4 Repetibilidad.

Cuadro 13. Tratamiento de resultados de la prueba de repetibilidad del método.

| Variable | Resultado | Criterio de aceptación | Dictamen |
|------------------------|-----------|--|------------------------|
| Concentración: 1 µg/mL | | $CV \leq 15\%$ $H_0: \sigma^2 \geq 15\% \quad H_1: \sigma^2 < 15\%$ Rechazar H_0 $X^2_{\text{calc}} < X^2_{\text{tab}}$ | El método es repetible |
| \bar{y} | 1.4052 | | |
| DS | 0.0087 | | |
| CV | 0.623% | | |
| X^2_{calc} | 0.0068 | | |
| X^2_{tab} | 0.103 | | |
| Concentración: 5 µg/mL | | | |
| \bar{y} | 5.5871 | | |
| DS | 0.08971 | | |
| CV | 1.604% | | |
| X^2_{calc} | 0.0285 | | |
| X^2_{tab} | 0.103 | | |
| Concentración: 9 µg/mL | | | |
| \bar{y} | 9.2694 | | |
| DS | 0.1521 | | |
| CV | 1.641% | | |
| X^2_{calc} | 0.0254 | | |
| X^2_{tab} | 0.103 | | |
| Todos los datos | | | |
| \bar{y} | 109.7435 | | |
| DS | 12.9205 | | |
| CV | 12.1043 | | |
| X^2_{calc} | 5.9356 | | |
| X^2_{tab} | 15.507 | | |

La repetibilidad se evaluó mediante la determinación del coeficiente de variación de los porcentajes de recobro por cada concentración analizada, resultando menor al 15%, del mismo modo con el coeficiente de variación de los porcentajes de recobro de todas las muestras fue menor a lo que indica el criterio de aceptación. También se utilizó la comparación de hipótesis donde la hipótesis nula (H_0) nos dice que la varianza poblacional es mayor al 15%, evaluándose con el estadígrafo

de ji cuadrada (X^2), donde resulto menor ji calculada que ji de tablas con 2 grados de libertad para cada concentración y 8 grados de libertad para todas las muestras. Rechazando la hipótesis nula y demostrando que el método es repetible con un 95% de confianza.

7.4.5 Precisión intermedia.

Tabla 14. Resultados de la prueba de precisión intermedia del método.

| | Día 1 | Día 2 |
|----------|---------|---------|
| Analista | 0.79404 | 0.80411 |
| | 0.79356 | 0.81642 |
| | 0.79277 | 0.79404 |
| CV | 2.398% | 1.392% |

$$H_0: D_1 = D_2$$

$$H_1: D_1 \neq D_2$$

Cuadro 15. Tratamiento de resultados de la precisión intermedia del método.

| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de Cuadrados | Media de Cuadrados | F_{calc} | F_{tab} | Criterio de aceptación | Dictamen |
|---------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|------------------|---|-------------------------------------|
| Día | 1 | 1.95×10^{-4} | 1.95×10^{-4} | 3.09 | (0.13 | $F_{(0.025, 1, 8)} < F_{\text{calc}} < F_{(0.975, 1, 8)}$ | Hay precisión intermedia entre días |
| Error | 4 | 2.52×10^{-3} | 6.29×10^{-5} | | 7.57) | | |

En el caso de la precisión intermedia, se evaluó un factor: días; donde primero se verifico que el coeficiente de variación de las muestras por día fue menor al 15%, después para comparar los resultados se utilizó una tabla de análisis de varianza (cuadro 15).

Teniendo como hipótesis nula (H_0) que los resultados del analista para ambos días son iguales, en contraste la hipótesis alterna (H_1) nos indica que los resultados son diferentes para ambos días.

Utilizando el estadígrafo F de Fisher se aceptó la H_0 , pues su F calculada entro en la región de no rechazo con un 97.5% de confianza. Demostrando que hay precisión intermedia entre días para cada analista que realice este método con un 97.5% de confianza.

7.4.6 Estabilidad de la muestra.

Cuadro 16. Tratamiento de resultados de la prueba de estabilidad en automuestreador de la muestra en el método

| Tiempo | 0h | 1h | 2h | 3h | 4h |
|-------------------|---|---------|---------|---------|---------|
| DS | 0.09956 | 0.10083 | 0.09348 | 0.05313 | 0.07072 |
| CV | 2.043% | 2.095% | 1.997% | 1.163% | 1.504% |
| $X^2_{calculada}$ | 0.03524 | 0.03524 | 0.03107 | 0.01004 | 0.01778 |
| X^2_{tablas} | $H_0: \sigma^2 \geq 15\%$ $H_1: \sigma^2 < 15\%$ $X^2_{calc} < X^2_{tab}$ Rechazar H_0 $X^2_{tab} = 0.103$ | | | | |
| Dictamen | La muestra es estable en automuestreador durante el método | | | | |

Cuadro 17. Tratamiento de resultados de la prueba de estabilidad a temperatura ambiente, refrigeración y a corto plazo de la muestra en el método

| Tiempo | 0h | 2h | 4h | 6h |
|----------------------|---------|---------|---------|---------|
| Temperatura ambiente | | | | |
| DS | 0.06851 | 0.04578 | 0.02886 | 0.01969 |
| CV | 1.363% | 0.937% | 0.595% | 0.392% |
| $X^2_{calculada}$ | 0.01669 | 0.00745 | 0.00296 | 0.00138 |
| Refrigeración | | | | |
| DS | 0.10971 | 0.03921 | 0.14555 | 0.13217 |
| CV | 2.194% | 0.812% | 2.93% | 2.639% |
| $X^2_{calculada}$ | 0.04280 | 0.00547 | 0.07532 | 0.06211 |
| Corto plazo | | | | |
| DS | 0.02761 | 0.07168 | 0.12280 | 0.08235 |

| | | | | |
|-------------------|---|------------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| CV | 0.504% | 1.336% | 2.315% | 1.179% |
| $X^2_{calculada}$ | 0.00271 | 0.01827 | 0.05362 | 0.02411 |
| X^2_{tablas} | Ho: $\sigma^2 \geq 15\%$ | H ₁ : $\sigma^2 < 15\%$ | Rechazar H ₀ | $X^2_{calc} < X^2_{tab}$ |
| | $X^2_{tab} = 0.103$ | | | |
| Dictamen | La muestra es estable a temperatura ambiente, refrigeración y a corto plazo durante el método | | | |

Cuadro 18. Tratamiento de resultados de la prueba de estabilidad en ciclos de congelación de la muestra en el método.

| Tiempo | 0h | 1° ciclo | 2° ciclo | 3° ciclo |
|-------------------|--|------------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| DS | 0.08741 | 0.02783 | 0.06558 | 0.06923 |
| CV | 1.618% | 0.508% | 1.19% | 1.236% |
| $X^2_{calculada}$ | 0.02717 | 0.00275 | 0.01529 | 0.01704 |
| X^2_{tablas} | Ho: $\sigma^2 \geq 15\%$ | H ₁ : $\sigma^2 < 15\%$ | Rechazar H ₀ | $X^2_{calc} < X^2_{tab}$ |
| | $X^2_{tab} = 0.103$ | | | |
| Dictamen | La muestra es estable en ciclos de congelamiento durante el método | | | |

Cuadro 19. Tratamiento de resultados de la prueba de estabilidad a largo plazo de la muestra en el método

| Tiempo | 0h | 2 semanas | |
|-------------------|--|------------------------------------|-------------------------|
| DS | 0.11665 | 0.10816 | |
| CV | 2.095% | 1.997% | |
| $X^2_{calculada}$ | 0.04838 | 0.04159 | |
| X^2_{tablas} | Ho: $\sigma^2 \geq 15\%$ | H ₁ : $\sigma^2 < 15\%$ | Rechazar H ₀ |
| | $X^2_{tab} = 0.103$ | | |
| Dictamen | La muestra es estable durante el método a largo plazo. | | |

Si se observa en los cuadros de los resultados de la estabilidad en automuestreador (cuadro 20), a temperatura ambiente, refrigeración y a corto plazo (cuadro 21) en el Anexo III, se puede notar que las concentraciones disminuyen entre 0.1 y 0.2 µg/mL hasta el penúltimo tiempo, en el último las

concentraciones aumentaron, puesto que aparece algún producto de degradación de la glimepirida que tiene el mismo tiempo de retención provocando el aumento de la concentración.

También se observó la inestabilidad de la glimepirida con el choque térmico en el caso de los ciclos de congelación (cuadro 22, Anexo III), ya que se tenía las muestras a temperatura de congelación (-2 °C) y se descongelaron a temperatura ambiente de 27 °C, notándose un aumento en las concentraciones, es decir, en el primer ciclo de congelación ya se contaba con el producto de degradación que apareció en el último análisis de las pruebas de estabilidad antes mencionadas.

En el análisis estadístico para este rubro se utilizó primero el coeficiente de variación para cada prueba de estabilidad, donde se puede observar que todos los resultados son menores que el 15%, es decir, la concentración de cada muestra no varía más del 15% a la concentración nominal. También se recurrió al contraste de hipótesis donde la hipótesis nula (H_0) afirma que la varianza poblacional de cada prueba por tiempo es mayor al 15%, dicho de otra manera, que alguna de las concentraciones disminuyó o aumento más del 0.75 µg/mL de la concentración nominal. Utilizando el estadígrafo de ji cuadrada se evaluaron las hipótesis, en el cual la ji calculada empleo principalmente la desviación estándar de las muestras por cada tiempo.

En todas los cuadros de análisis de las diferentes estabilidades, ji calculada es menor que ji de tablas con 2 grados de libertad, rechazando la H_0 y afirmando que la concentración disminuye y en otros aumenta, sin embargo, la glimepirida tiene estabilidad en automuestreador, a temperatura ambiente, a temperatura de

refrigeración (5 °C), a corto y largo plazo y en los ciclo de congelación con un 95% de confianza en todas las pruebas antes mencionadas.

7.4.7 Límite de detección y límite de cuantificación.

Cuadro 23. Tratamiento de resultados de la prueba de límite de detección y límite de cuantificación del método.

| Variable | Resultado | Criterio de aceptación | Dictamen |
|---------------------------|-----------|------------------------|---|
| Concentración: 0.5 µg/mL | | CV ≤ 15% | El método tiene un límite de detección de 0.1 µg/mL y su límite de cuantificación se encuentra entre 0.1 µg/mL y 0.25 µg/mL |
| \bar{y} | 0.66844 | | |
| DS | 0.0094 | | |
| CV | 1.407% | | |
| Concentración: 0.25 µg/mL | | | |
| \bar{y} | 0.34217 | | |
| DS | 0.0071 | | |
| CV | 2.083% | | |
| Concentración: 0.1 µg/mL | | | |
| \bar{y} | ---- | | |
| DS | ---- | | |
| CV | --- | | |

Para el análisis del límite de cuantificación se utilizó como parámetro el coeficiente de variación para cada concentración elegida, donde 0.5 µg/mL y 0.25 µg/mL obtuvieron un coeficiente menor del 15%, en otras palabras las concentraciones recuperadas de las muestras no varían del 15% con respecto a su promedio.

Se determinó que la concentración de 0.1 µg/mL ya no se podía cuantificar la glimepirida, sin embargo, a un se observaba en los cromatogramas, definiendo que 0.1 µg/mL es su límite de detección y afirmando que el límite de cuantificación se encuentra entre 0.1 µg/mL y 0.25 µg/mL

7.5 Resumen de los resultados obtenidos.

Validación del método de cuantificación de glibeprida en plasma de rata por CLAR.

| Cuadro 24. Resultados obtenidos de la validación del sistema y método. | | |
|---|---|--|
| Parámetro | Resultado | Criterio de aceptación |
| Validación del sistema | | |
| Precisión | Cumple | $CV \leq 3\%$ |
| Linealidad | Cumple | $\beta \neq 0$ $\alpha = 0$ $r^2 \leq 0.99$ |
| Validación del método | | |
| Especificidad | Cumple | Comparación de cromatogramas. |
| Linealidad | Cumple | $\beta \neq 0$ $\alpha = 0$ $r^2 \leq 0.99$ |
| Exactitud | Cumple | $CV \leq 15\%$ |
| Repetibilidad | Cumple | $CV \leq 15\%$ |
| Precisión intermedia | Cumple | $F_{(0.025, 1, 8)}$ $< F_{calc} <$ $F_{(0.975, 1, 8)}$ |
| Estabilidad de la muestra | Cumple | $CV \leq 15\%$ |
| Límite de detección | 0.1 $\mu\text{g/mL}$ | $CV \leq 15\%$ |
| Límite de cuantificación | Se encuentra entre 0.1 $\mu\text{g/mL}$ y 0.25 $\mu\text{g/mL}$ | $CV \leq 15\%$ |

8. CONCLUSIONES

Se logró desarrollar un método analítico lineal, específico, preciso y exacto para cuantificar glimepirida en plasma de rata, optimizando las condiciones cromatograficas del CLAR-UV y el procedimiento del tratamiento de la muestra; dando resultados confiables.

ANEXO I. Preparación de disoluciones.

- I. Preparación de la solución amortiguadora de fosfatos 0.05M pH 5 con ácido 1-octilsufónico 1×10^{-5} M.
 - Pesar en balanza analítica 6.7289 g de fosfato monobásico de potasio y 0.09667 g de fosfato dibásico de potasio y agregarlo en un vaso de precipitados de 2 L.
 - Adicionarle 1 L de agua desionizada medida de una probeta graduada de 1 L y colocar dentro del vaso un agitador magnético.
 - En una parrilla de agitación, poner el vaso de precipitados y dejar que se disuelvan las sales.
 - Medir el pH de la solución usando un potenciómetro recién calibrado.
 - El pH debe de ser de 5, si no está en ese nivel adicionarle gotas de solución de Hidróxido de sodio 0.1 M o Ácido clorhídrico 0.1 M, dependiendo del pH que tenga la solución.
 - Adicionar 2.163 mg de ácido 1-octilsufónico.
 - Filtrar la solución buffer a vacío usando un filtro de membrana de nylon de poro de 0.45 μm .
 - Colocar la solución buffer a un matraz de 2 L y poner a desgasificar durante 30 minutos.
- II. Preparación de la solución de metanol con ácido acético 1%
 - En un vaso de precipitados de 100 mL adicionarle 50 mL de Metanol grado HPLC recientemente medidos en una probeta graduada de 50 mL.

-
- Adicionar 0.5 mL de ácido acético glacial al vaso de precipitados que contiene metanol.
 - Agitar con agitador de vidrio y tapar con vidrio de reloj.

III. Preparación de una solución stock de glimepirida 50 µg/mL

Pesar 0.5 mg de glimepirida Sref y transferirlo en un matraz volumétrico de 10 mL, adicionarle aprox. 7 mL de metanol Grado HPLC. Colocar el matraz al sonicador durante 3 minutos para que se disuelva la glimepirida y aforar con metanol.

IV. Preparación de una solución stock del estándar interno A: Glibenclamida 50 µg/mL.

Pesar 0.5 mg de glibenclamida MP y transferirlo a un matraz volumétrico de 10 mL adicionarle aprox. 7 mL de metanol Grado HPLC. Colocar el matraz al sonicador durante 3 minutos para que se disuelva la glibenclamida y aforar con metanol.

V. Preparación de una solución stock del estándar interno B: Felodipino 50 µg/mL.

Pesar 0.5 mg de felodipino Sref y transferirlo a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar al aforo con metanol Grado HPLC. Agitar manualmente el matraz hasta que se disuelva.

ANEXO II. Cromatogramas obtenidos durante el desarrollo y optimización del método.

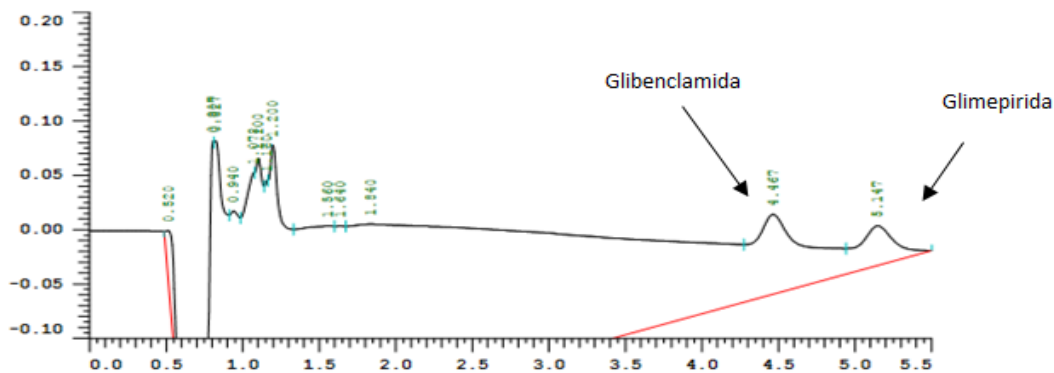


Fig. 4. Cromatograma de glimepirida 2 µg/mL y glibenclamida 5 µg/mL

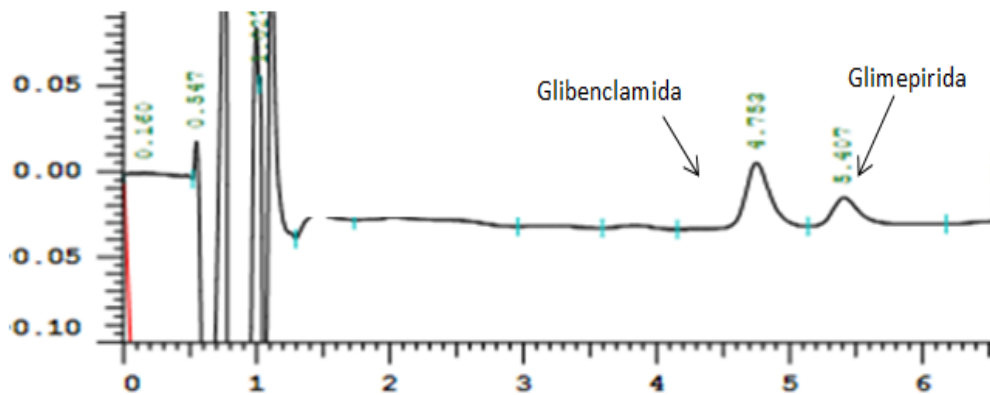


Fig. 5. Cromatograma glimepirida 2 µg/mL y glibenclamida 5 µg/mL

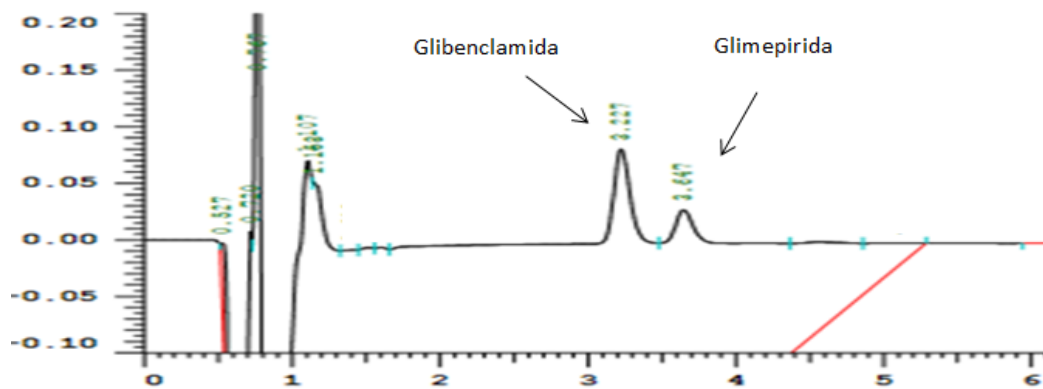


Fig. 6. Cromatograma glimepirida 2 µg/mL y glibenclamida 5 µg/mL

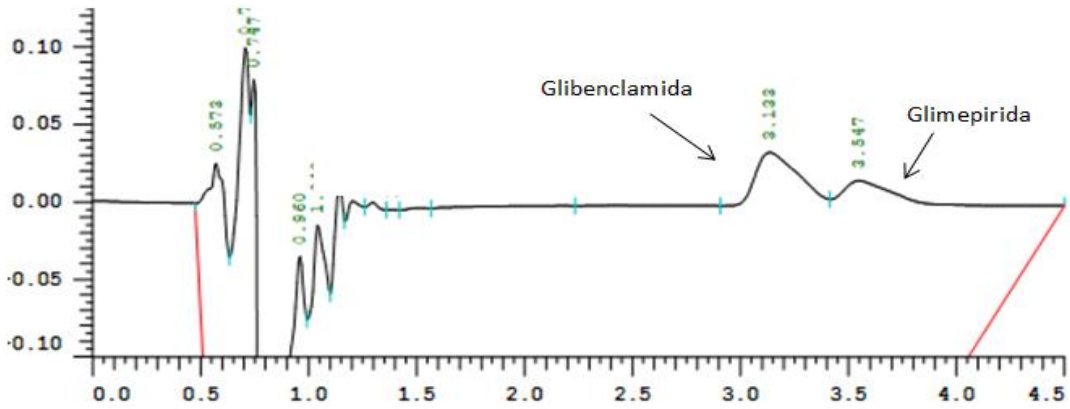


Fig. 7. Cromatograma glimepirida 2 µg/mL y glibenclamida 5 µg/mL

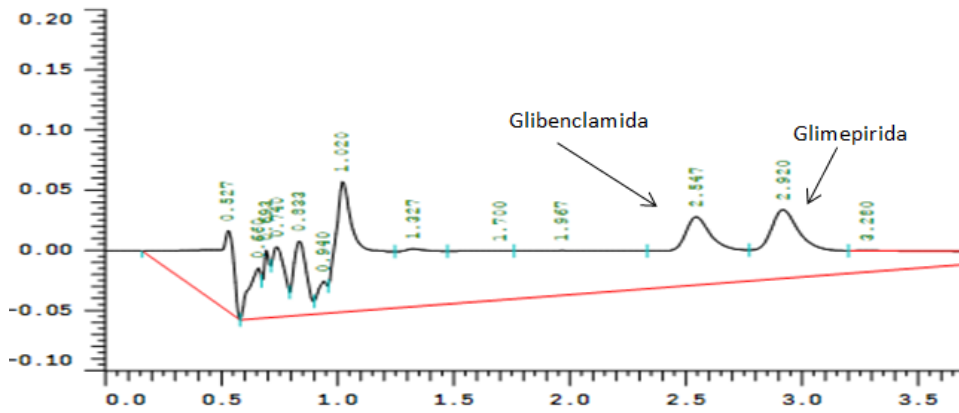


Fig. 8. Cromatograma glimepirida 5 µg/mL y glibenclamida 5 µg/mL.

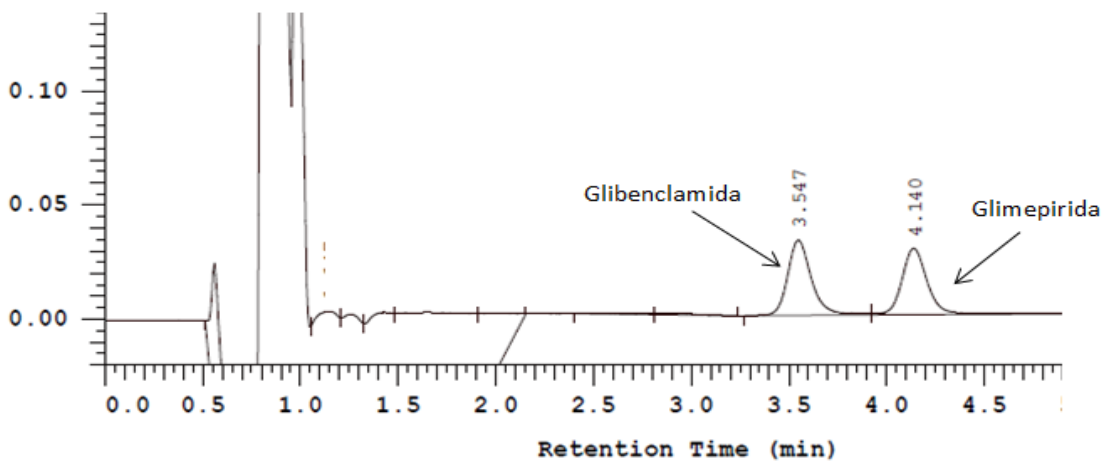


Fig. 9. Cromatograma glimepirida 5 µg/mL y glibenclamida 5 µg/mL.

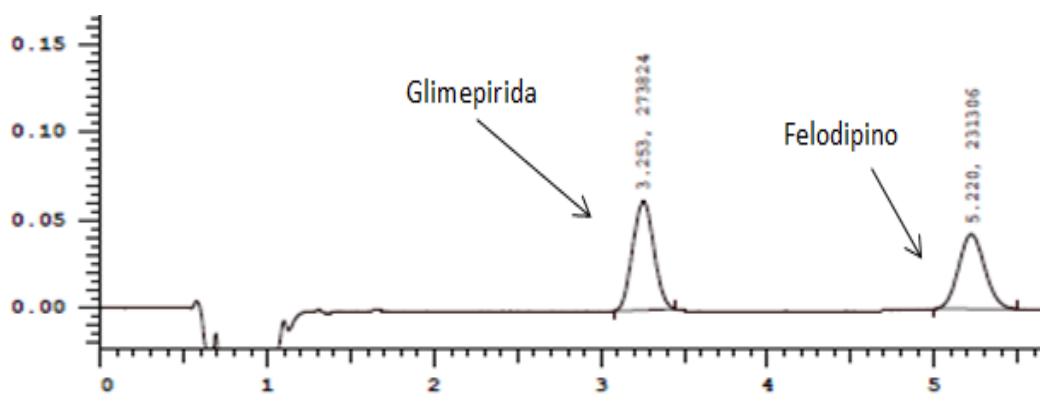


Fig. 10. Cromatograma de glimepirida 5 $\mu\text{g/mL}$ y felodipino 5 $\mu\text{g/mL}$. Utilizando el método obtenido

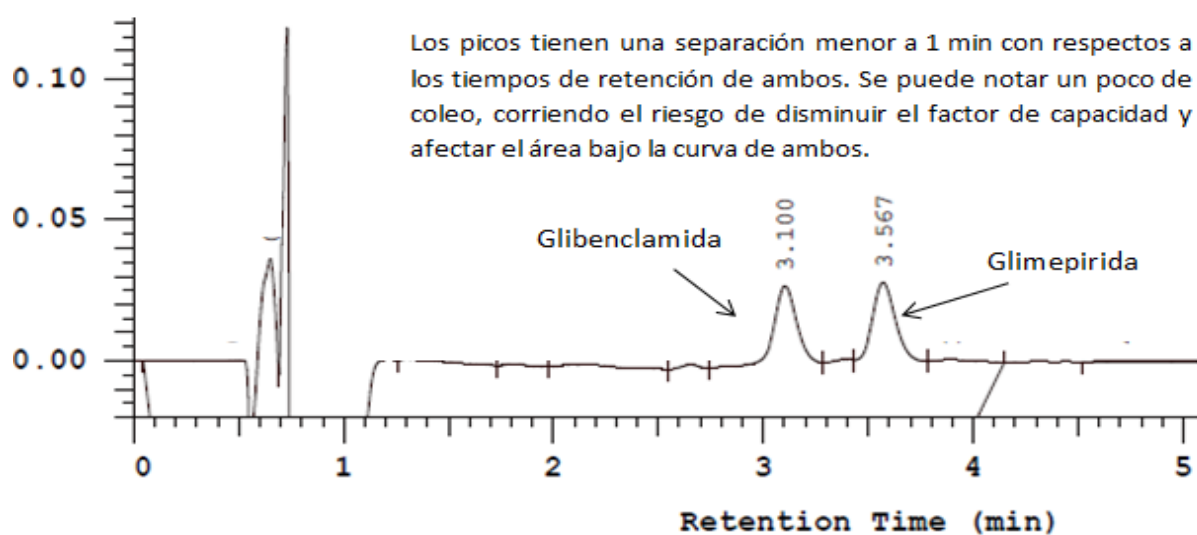


Fig. 11. Cromatograma glimepirida 5 $\mu\text{g/mL}$ y glibenclamida 5 $\mu\text{g/mL}$

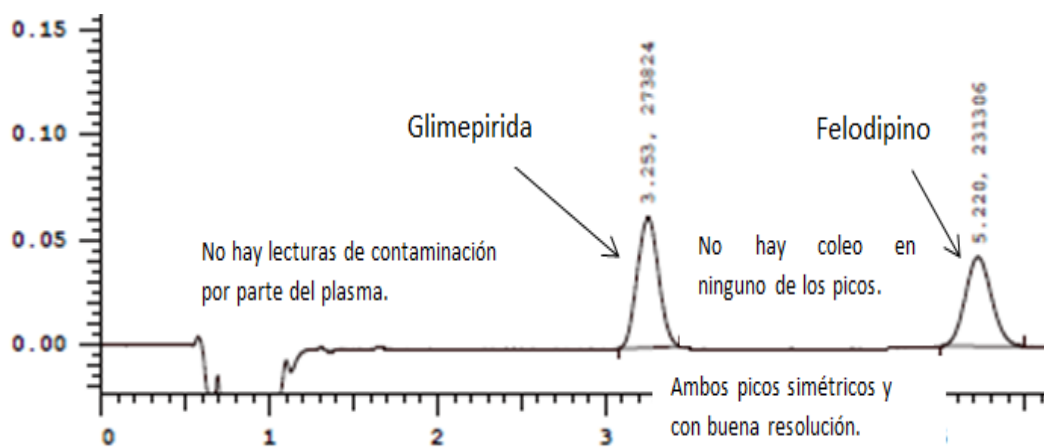


Fig. 12. Cromatograma de glimepirida 5 $\mu\text{g/mL}$ y felodipino 5 $\mu\text{g/mL}$, demostrando características adecuadas para el método desarrollado.

ANEXO III. Cuadros de concentración vs respuesta en el parámetro de estabilidad de la muestra.

Cuadro 20. Resultados de la prueba de estabilidad en automuestreador de la muestra en el método

| Tiempo | Automuestreador | |
|--------|-----------------|---------------------|
| | Respuesta | Concentración µg/mL |
| 0h | 1.0320 | 4.926 |
| | 1.0332 | 4.932 |
| | 0.9945 | 4.756 |
| 1h | 1.0132 | 4.841 |
| | 1.0250 | 4.895 |
| | 0.9817 | 4.699 |
| 2h | 0.9796 | 4.690 |
| | 0.9973 | 4.770 |
| | 0.9559 | 4.584 |
| 3h | 0.9555 | 4.582 |
| | 0.9623 | 4.612 |
| | 0.9393 | 4.509 |
| 4h | 0.9884 | 4.730 |
| | 0.9941 | 4.756 |
| | 0.9645 | 4.622 |

Cuadro 21. Resultados de la prueba de estabilidad en temperatura ambiente, refrigeración y a corto plazo de la muestra en el método

| Tiempo | Temperatura ambiente | | Refrigeración | | Corto plazo | |
|--------|----------------------|------------|---------------|------------|-------------|------------|
| | Respuesta | C [µg/mL] | Respuesta | C [µg/mL] | Respuesta | C [µg/mL] |
| 0h | 0.8041 | 5.023 | 1.0153 | 4.880 | 0.8204 | 5.501 |
| | 0.8164 | 5.094 | 1.0627 | 5.095 | 0.8116 | 5.446 |
| | 0.7928 | 4.957 | 1.0478 | 5.027 | 0.8164 | 5.476 |
| 2h | 0.7718 | 4.836 | 0.9960 | 4.793 | 0.7861 | 5.288 |
| | 0.7809 | 4.888 | 1.0018 | 4.819 | 0.8005 | 5.377 |
| | 0.7875 | 4.927 | 1.013 | 4.870 | 0.8089 | 5.429 |
| 4h | 0.7687 | 4.818 | 0.9990 | 4.806 | 0.7753 | 5.220 |
| | 0.7784 | 4.874 | 1.0613 | 5.088 | 0.7796 | 5.247 |
| | 0.7758 | 4.859 | 1.0440 | 5.010 | 0.8114 | 5.445 |
| 6h | 0.8009 | 5.004 | 1.0126 | 4.868 | 0.8196 | 5.496 |
| | 0.8020 | 5.011 | 1.0699 | 5.127 | 0.8185 | 5.489 |

0.8072

5.041

1.0509

5.041

0.8372

5.606

C: Concentración

Cuadro 22. Resultados de la prueba de estabilidad en ciclos de congelación de la muestra en el método

| Tiempo | Ciclos de congelación | |
|----------|-----------------------|------------------------|
| | Respuesta | Concentración [µg/mL] |
| 0 | 0.7940 | 5.337 |
| | 0.8268 | 5.541 |
| | 0.7928 | 5.329 |
| 1° ciclo | 0.8204 | 5.501 |
| | 0.8116 | 5.446 |
| | 0.8164 | 5.476 |
| 2° Ciclo | 0.8225 | 5.514 |
| | 0.8236 | 5.521 |
| | 0.8205 | 5.502 |
| 3° Ciclo | 0.8249 | 5.529 |
| | 0.8471 | 5.668 |
| | 0.8372 | 5.606 |

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Diabetes. OMS: Organización Mundial de la Salud. [Internet]. 2016. [Consulta 22/11/2018]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/diabetes>
2. La diabetes y sus complicaciones. Secretaria de salud. gob. mx [Internet]. 2015. [Consulta 22/11/18]. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/articulos/la-diabetes-y-sus-complicaciones>
3. Hipoglucemiantes orales. Balance Labs. [Internet]. 2016. [Consulta 22/11/18] Disponible en: <https://www.diabalance.com/glosario/366-hipoglucemiantes-oraes>
4. Basit A., Riaz M., Fawwad A. *Glimepiride: evidence-based facts, trends and observations*. Vasc Health Risk Manag. [Internet]. 2012. [consulta: 28/07/2017]. 2012:8. Pp.: 462-472. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3448454/>
5. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. Vol. 1. 11 ed. México: secretaria de salud; 2014. Pp.: 1075.
6. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. *Japanese Pharmacopoeia*. 16 ed. Japon: Ministry of Health Labour and Welfare; 2012. Pp.: 884-886.
7. Guru Prakash P., Abdul Ahad H., Sreeramulu J., Hima Bindu V. *Preparation of Glimepiride aloe barbadensis miller leaves mucilage and povidone controlled reléase matriz tablets: in vitro and in vivo evaluations*. IJRAP. [Internet] 2011. [Consulta: 15/09/2017]. 2(2). Pp.: 563-571. Disponible en: http://www.ijrap.net/admin/php/uploads/461_pdf.pdf
8. Biswal S., Baliar O.P., Sahoo J., Murthy P.N. *Physicochemical Porperties of Glimepiride in Solid Dispersions with Polyethylene Glycol 20000*. International

-
- Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology. [Internet]. 2009. [Consulta: 15/09/2017]. 2(2). Pp.: 537-543. Disponible en: <http://www.ijpsnonline.com/Issues/537.pdf>
9. Brayfield A. *Martindale: The Complete Drug Reference*. 37 ed. Great Britain: Pharmaceutical Press; 2011. Pp.: 463, 477.
10. Martin C., Ballesteros M. *Espectrometría de masa y de análisis de biomarcadores*. [Internet]. España Universidad Complutense. Disponible en: <https://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/1066/1063>
11. Bonfilio R., Araujo M., Salgado H. *A Review of analytical techniques for determination of glimepiride: present and perspectives*. Therapeutic Drug Monitoring. [Internet]. 2010. [Consulta: 24/06/2018]. 11(2). Pp.: 550-559. Disponible en: https://journals.lww.com/drug-monitoring/Abstract/2010/10000/A_Review_of_Analytical_Techniques_for.5.aspx
12. Thammana M. *A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*. RRJPA. [Internet]. 2016. [Consulta: 20/09/2017]. 5(2). Pp.: 22-28. Disponible en: <http://www.rroj.com/open-access/a-review-on-high-performance-liquid-chromatography-hplc-.pdf>
13. Datar P. A. *Quantitative bioanalytical and analytical method development of dibenzazepine derivative, carbamazepine: a review*. JPA. [Internet]. 2015. [Consulta: 26/09/2017] 5(4). Pp.: 213-222. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177915000337>
14. Dong M. W. *Modern HPLC for practicing scientists*. USA; Wiley- interscience; 2006. Pp.: 286.
15. Skoog D.A. *Química Analítica*. 7 ed. México; McGraw-Hill; 2001. Pp.: 660-670.
-

-
16. Gupta V., Ajay Deep Kumar Jain, Gill N. S., Gupta K. *Development and validation of HPLC method - a review*. Int. Res J Pharm. [Internet]. 2012. [Consulta: 26/09/2017]. 2(4). Pp.: 17-25. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/36fd/c8ce844bb3bbb8a09b44684921fb29a3a13f.pdf>
17. Harris D. C. *Análisis químico cuantitativo*. 3 ed. España: Reverte; 2007. Pp.:
18. Moldeveano S. C., Davida V. *Essentials in Modern HPLC Separations*. [Internet]. USA: El Sevier; 2013. [Consulta: 03/10/2017]. Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?id=hDJcg6hdcYoC&printsec=frontcover&dq=Essentials+in+Modern+HPLC+Separations&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjDxf7BhcYAhWB8YMKHVKEC6kQ6AEIKzAA#v=onepage&q=Essentials%20in%20Modern%20HPLC%20Separations&f=false>
19. Kazakevich Y., Lobrutto R. *HPLC for pharmaceutical Scientists*. [Internet]. USA: John Wiley & Sons; 2007. [Consulta: 03/10/2017]. Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?id=csAk-MpeTocC&printsec=frontcover&dq=HPLC+for+pharmaceutical+Scientists&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjZpcCgiMrYAhUH7IMKHTR8BasQ6AEIKDAA#v=onepage&q=HPLC%20for%20pharmaceutical%20Scientists&f=false>
20. Dong M. W. *The essence of modern HPLC: advances, limitations, fundamentals and oportunities*. LCGC [Internet]. 2013. [Consulta: 15/10/2017]. 31(6). Pp.: 472-479. Disponible en: <http://www.chromatographyonline.com/essence-modern-hplc-advantages-limitations-fundamentals-and-opportunities>.
21. Sangeetha M., Rubina Reichal C., Indulatha V. N., Thirumoorthy N. *Development and Validation of RP-HPLC Method: An Overview*. RRJPA. [Internet]. 2014.

-
- [Consulta: 18/09/2017]. 3(4). Pp: 8-14. Disponible en: <http://www.rroij.com/open-access/development-and-validation-of-rphplc-method-an-overview-.php?aid=34720>
22. McMaster M. C. *HPLC: A Practical User's Guide*. [Internet]. 2 ed. USA: John Wiley & Sons; 2007. [Consulta: 15/10/2017]. Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?id=MrHMeDmaLPwC&printsec=frontcover&dq=HPLC:+A+Practical+User%C2%B4s+Guide&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEWjWi6ijjcrYAhUq5IMKHZOtDqoQ6AEIKjAA#v=onepage&q=HPLC%3A%20A%20Practical%20User%C2%B4s%20Guide&f=false>
23. Paithankar H. V. *HPLC Method Validation For Pharmaceuticals: a review*. IJUPBS. [Internet]. 2013. [Consulta: 18/09/2017]. 2(4). Pp.: 229-240. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/252930849_HPLC_METHOD_VALIDATION_FOR_PHARMACEUTICALS_A_REVIEW
24. Hernández V., Sánchez E. *Introducción a la validación de métodos analíticos para el laboratorio farmacéutico de control de calidad*. México: UNAM; 2017. Pp.: 198.
25. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration [Internet]. 2013. [Consulta: 2/09/2017]. Disponible en: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm368107.pdf>
26. Mahdia Moein M., El Baqqali A., Abdel Rehi M. *Bioanalytical method development an validation: Critical concepts and strategies*. Journal of Chromatography B. [Internet]. 2017. [Consulta: 19/10/2017]. 1043. Pp.: 3-11. Disponible en: <https://www.deepdyve.com/lp/elsevier/bioanalytical-method-development-and-validation-critical-concepts-and-xe5wzsUh78?shortRental=true>
27. Bashaw E. D., DeSilva B., Rose M. J., Wang Y., Shukla C. *Bioanalytical Method Validation: Concepts, Expectations and Challenges in Small Molecule and*
-

-
- Macromolecul*—A Report of PITTCON 2013 Symposium. The APPS Journal. [Internet]. 2014. [Consulta: 19/10/2017]. 16(3). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4012041/>
28. NOM—087-ECOL-SSA1-2002. *Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo*. DOF. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. [Internet]. 2003. [Consulta: 05/11/2017]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html>
29. Moloveano S., Victor David. *Selection of the HPLC: Method in Chemical Analysis*. [Internet]. USA: El Sevier; 2017. [Consulta: 05/11/2017]. Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?id=mky0DAAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Selection+of+the+HPLC&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiyz9n4msrYAhUM84MKHX9ID6UQ6AEIKDAA#v=onepage&q=Selection%20of%20the%20HPLC&f=false>
30. Garrido A., Teijon J. M., Blanco D. *Fundamentos de química estructural*. [Internet] España: TEBAR; 2006. [Consulta: 10/11/2017]. Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?id=avt8LFmp8q4C&pg=PP6&dq=Fundamento+de+quimica+estructural&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjxvjLnMrYAhWY0YMKHU4tAKsQ6AEIKDAA#v=onepage&q=Fundamentos%20de%20quimica%20estructura&f=false>
31. Lorenzo P., Moreno A., Lizasoain L., et al. *Velázquez. Farmacología Básica y clínica*. [Internet]. 18 ed. China: Medica Panamericana; 2009. [Consulta: 10/11/2017]. Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?id=BeQ6D40wTPQC&printsec=frontcover&dq=Velazquez.+Farmacologia+Basica+y+clinica&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiosbW>
-

[VncrYAhWT3oMKHYTAAA8Q6AEIKDAA#v=onepage&q=Velazquez.%20Farmacologia%20Basica%20y%20clinica&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=VncrYAhWT3oMKHYTAAA8Q6AEIKDAA#v=onepage&q=Velazquez.%20Farmacologia%20Basica%20y%20clinica&f=false)

32. Rivas J. *Introducción al trabajo de laboratorio*. México: UNAM; 2003. Pp.: 145.
33. Venkatesh Iyengar G., Subramanias K. S, Woittiez J. R. W. *Element Analysis of biological Samples: Principles and practice*. [Internet]. Vol. 2. USA. [Consulta: 21/11/2017]. Disponible en: https://books.google.com.mx/books?id=l5bcrKai_7kC&printsec=frontcover&dq=Element+Analysis+of+Biological+Samples:+Principles+and+Practices,+Volume+II&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi_0aSgoMrYAhXMqYMKHRBtAqUQ6AEIKDAA#v=onepage&q=Element%20Analysis%20of%20Biological%20Samples%3A%20Principles%20and%20Practices%2C%20Volume%20II&f=false
34. Ahuja S., Rasmussen H. *HPLC Method Development for Pharmaceuticals*. Vol. 8. Italia: El Servier; 2007. Pp.:
35. Connors K.A. *Curso de Análisis Farmacéutico (ensayo de medicamento)*. [Internet]. 2 ed. España: Reverte; 1981. [Consulta: 02/12/2017]. Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?id=HRhFUkEUlyAC&printsec=frontcover&dq=Curso+de+An%C3%A1lisis+Farmac%C3%A9utico&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjRyt3XocrYAhWk7YMKHdyJDacQ6AEIKDAA#v=onepage&q=Curso%20de%20An%C3%A1lisis%20Farmac%C3%A9utico&f=false>
36. Usher K. M., Hansen S. W., Amoo J. S., Berstein A. P., McNally M. *Precision del estándar interno y métodos del estándar externo en CLAR*. LCGC. [Internet]. 2015. [Consulta: 02/12/2017]. 33(4). Pp.: 40-46. Disponible en: <http://www.chromatographyonline.com/precision-internal-standard-and-external-standard-methods-high-performance-liquid-chromatography?pageID=1>

-
37. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. Diabetes Care. 2005;28 Suppl 1:S4-36
38. Martínez R. M. A. *Método Analítico alternativo por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para la cuantificación de glimepirida en tabletas*. [Tesis]. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. 2017.
39. Vallat A. *Troubleshooting Guide – HPLC*. [Internet]. 2007. [Consulta: 27/11/2017]. Disponible en: <http://www.pbf.unizg.hr/content/download/19116/76175/version/1/file/TroubleshootingGuide-HPLC.pdf>
40. Samala S., Tatipamula S., Veeresham C. *Determination of Glimepiride in Rat Serum by RP-HPLC Method*. AJAC. [Internet]. 2011. [Consulta: 20/08/2017]. 2. Pp.: 152-157. Disponible en: https://file.scirp.org/pdf/AJAC20110200001_85527650.pdf
41. Tripathi A. S., Dewani A. P., Chandewar A. V., Mazumder P. M. *Approaches Development and Validation of RP-HPLC Method for Estimation of Glimepiride in Rat Plasma-Application to Pharmacokinetic Studies*. Eurasian J Anal Chem. [Internet]. 2016. [Consulta: 20/08/2017]. 11(2). Pp.: 55-61. Disponible en: <http://www.iserjournals.com/journals/ejac/download/10.12973/ejac.2016.121a>
42. Universidad Nacional Autónoma de México – UNAM. ValidApp. (2.0.1) [Aplicación móvil]. 2017. Descargado de: https://play.google.com/store/apps/details?id=mx.unam.zaragoza.android.ValidApp&hl=es_419
-