



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**



**Laboratorio de investigación Farmacéutica**

TESIS

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO  
ANALÍTICO ALTERNATIVO POR CLAR PARA  
CUANTIFICACIÓN DE GLIBEMCLAMIDA Y METFORMINA  
EN TABLETAS**

QUE PRESENTAN:

**Maldonado Reyes Juan Manuel**

**Hernández Trejo Samantha**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**Químico Farmacéutico Biólogo**

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

**Dra. Elizabeth Guadalupe  
Sánchez González**  
Directora

**Dr. Vicente Jesús Hernández  
Abad**  
Asesor

**Q.F.B. Humberto Daniel  
Rodríguez Gaspar**  
Asesor

Ciudad de México, 2023

## Contenido

<b>1 Introducción</b> .....	6
<b>2 Marco Teórico</b> .....	7
2.1 Cromatografía.....	7
2.2 Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) .....	7
2.2.1 Mecanismos de cromatografía .....	9
2.2.1.1 Cromatografía de adsorción .....	9
2.2.1.2 Cromatografía de reparto.....	10
2.2.1.3 Cromatografía de intercambio iónico .....	10
2.2.1.4 Cromatografía de afinidad .....	11
2.2.1.5 Cromatografía de exclusión por tamaño .....	12
2.2.2 Componentes de un equipo de CLAR <sup>11, 6</sup> .....	13
2.3 Desarrollo de métodos analíticos <sup>14, 15, 16, 17</sup> .....	14
2.4 Validación de métodos analíticos.....	16
2.5 Diabetes mellitus.....	20
2.6 Fármacos utilizados en los tratamientos para diabetes mellitus.....	21
2.6.1 Metformina.....	21
2.6.1.1 Productos de degradación <sup>30, 31</sup> .....	22
2.6.2 Glibenclamida.....	23
2.6.2.1 Productos de degradación .....	24
<b>3 Planteamiento del problema</b> .....	26
<b>4 Hipótesis</b> .....	27
<b>5 Objetivo general</b> .....	27
<b>6 Desarrollo experimental</b> .....	28
6.1 Desarrollo del método analítico .....	29
6.1.1 Elección de la fase móvil.....	29
6.1.2 Optimización del método.....	30
6.2 Validación del método analítico.....	30
6.2.1 Validación del sistema .....	30
6.2.1.1 Adecuabilidad .....	30
6.2.1.2 Linealidad del sistema.....	31
6.2.1.3 Precisión del sistema.....	32
6.2.2 Validación del método.....	33

6.2.2.1 Especificidad .....	33
6.2.2.2 Linealidad del método .....	38
6.2.2.3 Exactitud del método .....	39
6.2.2.4 Precisión intermedia .....	40
6.2.2.5 Estabilidad de la muestra.....	40
6.2.2.6 Robustez.....	41
6.2.2.7 Tolerancia.....	42
<b>7 Resultados</b> .....	<b>43</b>
7.1 Elección de la fase móvil.....	43
7.2 Optimización del método .....	45
7.3 Adecuabilidad del sistema.....	46
7.4 Linealidad del sistema.....	47
7.5 Precisión del sistema .....	50
7.6 Especificidad.....	50
7.6.1 Degradación ácida.....	50
7.6.2 Degradación alcalina.....	52
7.6.3 Degradación oxidativa .....	53
7.6.4 Degradación térmica .....	55
7.6.5 Interferencia con los excipientes.....	56
7.7 Linealidad del método .....	59
7.8 Exactitud del método .....	63
7.9 Precisión intermedia .....	63
7.10 Estabilidad de la muestra .....	65
7.11 Robustez.....	67
7.12 Tolerancia .....	69
<b>8 Análisis de resultados</b> .....	<b>71</b>
8.1 Elección de la fase móvil .....	71
8.2 Optimización del método .....	72
8.3 Adecuabilidad del sistema.....	73
8.4 Linealidad del sistema.....	73
8.5 Precisión del sistema .....	73
8.6 Especificidad.....	74
8.7 Linealidad del método .....	76
8.8 Exactitud del método.....	77

8.9 Precisión intermedia.....	77
8.10 Estabilidad de la muestra.....	78
8.11 Robustez.....	78
8.12 Tolerancia.....	79
<b>9 Conclusiones.....</b>	<b>81</b>
<b>10 Referencias.....</b>	<b>82</b>

Este trabajo de tesis fue financiado en su totalidad con recursos del proyecto del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la Universidad Nacional Autónoma de México, con clave IT200323 *Efectividad antihiper glucemiante de las matrices monolíticas de silicio que contienen glibenclamida preparadas por el método sol-gel*, por lo que se agradece su apoyo.

## **1 Introducción**

La enfermedades crónico-degenerativas como la Diabetes mellitus, son de gran importancia en el ámbito de la salud pública, debido a que presentan un elevado índice de casos. Para este tipo de enfermedades se emplean fármacos que estimulan las células beta pancreáticas para la producción de insulina en la diabetes tipo 2, o bien la insulina en casos de diabetes tipo 1. Para los casos de diabetes tipo 2, los fármacos más utilizados son la glibenclamida (perteneciente a la familia de las sulfonilureas) y la metformina (perteneciente al grupo de las biguanidas). Tan importante es esta enfermedad que existe una normatividad para el tratamiento de ella, en la cual se indica que se pueden hacer uso de estos dos fármacos para mejorar la calidad de vida de la población con dicha condición. Para proporcionar seguridad a la población que requiere estos medicamentos, se desarrollan y validan métodos para la identificación y cuantificación de dichos fármacos. En este trabajo se desarrolló un método alternativo a los ya propuestos en la literatura para la identificación y cuantificación de glibenclamida y metformina en tabletas, posteriormente, se realizó la validación del método desarrollado, para proporcionar evidencia documentada de que el método es confiable para ser utilizado.

## **2 Marco Teórico**

### **2.1 Cromatografía**

La cromatografía es una técnica, por la cual se pueden separar, identificar, cuantificar y purificar muestras, con distintos analitos de interés. Esta fue descrita por primera vez por el botánico Mikhail Tswett en 1910, separando pigmentos de algún vegetal, usando como fase estacionaria el carbonato de calcio y como fase móvil el disulfuro de carbono; observándose de esta manera como se separaba en distintas bandas una muestra de pigmentos que descendían a distintos tiempos en la fase estacionaria.<sup>1,2</sup>

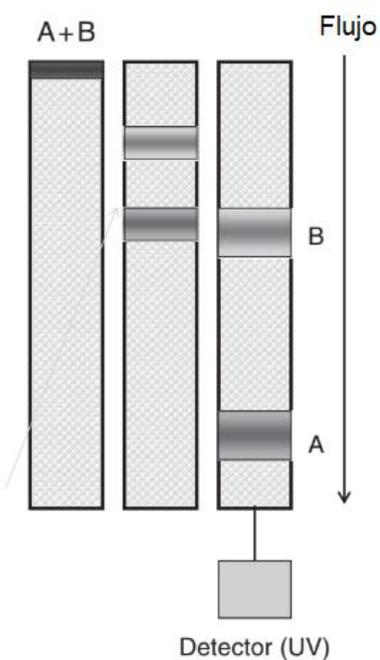
A partir de este descubrimiento, se ha empleado el fundamento para desarrollar diferentes alternativas. No solo la fase estacionaria puede ser un sólido, sino que también se pueden emplear líquidos, de esta manera la fase móvil no siempre es un líquido, ya que se emplean también gases o mezclas de estos.<sup>3</sup>

Dicha técnica se basa en una interacción entre las fases (móvil y estacionaria) y la muestra o analito de interés, fundamentadas en las diferencias de polaridad, solubilidad o afinidad entre el analito y ambas fases.<sup>3,4,5</sup>

### **2.2 Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)**

La migración diferencial en la CLAR es resultado del equilibrio de distribución de los componentes de una mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil. Dichos componentes se separan en la columna y al salir de esta son conducidos por la fase móvil en el orden que emergieron, hacia un detector donde se registra una respuesta proporcional a su cantidad de concentraciones y sus tiempos de retención en la columna (Figura 1). La distribución relativa de un soluto entre dos fases se

determina por las interacciones de las especies del soluto con cada fase. Estas interacciones se definen por la variedad y la resistencia de las fuerzas intermoleculares que están presentes, o en términos generales por la polaridad de la muestra y de las fases (móvil y estacionaria). Las fuerzas intermoleculares pueden ser generadas por una molécula de soluto que tiene un momento dipolo, por esto interactúa selectivamente con otros dipolos o si la molécula es un buen donador o aceptor de protones, es posible su interacción con otras moléculas por puentes de hidrógeno. La utilización de presión (comúnmente 5800-7000 psi o 400-500 bares) incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce así su difusión, mejorando la resolución de la cromatografía.<sup>6,7</sup>



**Figura 1. Esquema del proceso cromatográfico.**

Se muestran dos bandas de componentes (A y B) eluyendo por la columna.

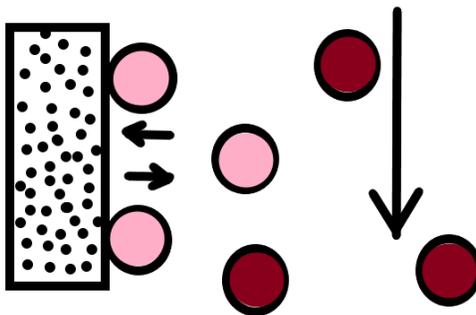
Adaptado de: Dong M. HPLC and UHPLC for Practicing Scientist. 2 ed. Nueva Jersey: Wiley; 2019.

## 2.2.1 Mecanismos de cromatografía

Si bien la finalidad de la cromatografía es la separación de componentes, existen en el mundo diferentes mecanismos para lograr esta finalidad, algunos de estos mecanismos enfocados a la cromatografía de líquidos de alta resolución son los siguientes.<sup>5</sup>

### 2.2.1.1 Cromatografía de adsorción

Es en la que los productos químicos se retienen en función de su adsorción y desorción en la superficie del soporte, fase estacionaria. La retención en esta cromatografía se basa en la competencia del analito con las moléculas de la fase móvil ya que ambas se unen a la superficie del soporte (Figura 2). El grado de retención de una sustancia química en la cromatografía de adsorción dependerá de la fuerza de unión de esta sustancia química al soporte, el área superficial del soporte, la cantidad de fase móvil desplazada del soporte por la sustancia química y la fuerza de unión de la fase móvil al soporte, debido a las interacciones electrostáticas, los enlaces de hidrógeno, las interacciones dipolo-dipolo y las interacciones dispersivas (es decir, las fuerzas de van der Waals) pueden afectar la retención en este tipo de cromatografía.<sup>8,9</sup>



### Figura 2. Mecanismo de adsorción.

Adaptado de: Hage, D. Chromatography. Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry [Internet], 2018; 1–32. Disponible en: doi:10.1016/b978-0-12-816063-3.00001-3

#### 2.2.1.2 Cromatografía de reparto

En este mecanismo, los solutos se separan con base en su diferencia de solubilidad entre una fase móvil líquida y una fase estacionaria recubierta sobre un soporte sólido. El soporte utilizado en este tipo de cromatografía suele ser sílice, pero también pueden ser otros materiales. El proceso se esquematiza en la Figura 3. Originalmente, la cromatografía de reparto implicaba cubrir el soporte con una fase estacionaria líquida que no era miscible con la fase móvil, pero, actualmente, la mayoría de las columnas modernas para esta técnica emplea fases estacionarias que están unidas químicamente al soporte.<sup>8, 9, 10</sup>

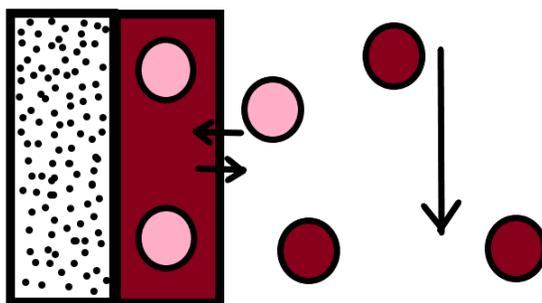


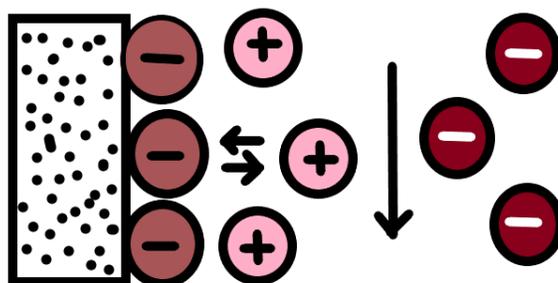
Figura 3. Mecanismo de reparto.

Adaptado de: Hage, D. Chromatography. Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry [Internet], 2018; 1–32. Disponible en: doi:10.1016/b978-0-12-816063-3.00001-3

#### 2.2.1.3 Cromatografía de intercambio iónico

Es un tipo de cromatografía en la que sus iones se separan mediante su adsorción sobre un soporte que tiene cargas fijas en su superficie. Se basa principalmente en la interacción (o intercambio) de iones en la muestra o fase móvil con grupos iónicos fijos de carga opuesta que están unidos a la fase estacionaria (Figura 4). Según la carga de los grupos que forman la fase estacionaria, los tipos de iones que se unen

a la columna pueden ser cationes o aniones. Este tipo de cromatografías se denominan cromatografía de intercambio catiónico y de intercambio aniónico, respectivamente.<sup>9,11</sup>

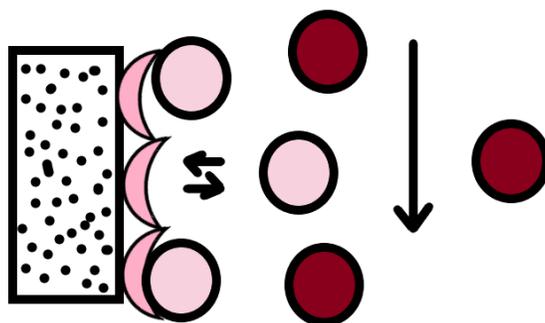


**Figura 4. Mecanismo de intercambio iónico.**

Adaptado de: Hage, D. Chromatography. Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry [Internet], 2018; 1–32. Disponible en: doi:10.1016/b978-0-12-816063-3.00001-3

#### 2.2.1.4 Cromatografía de afinidad

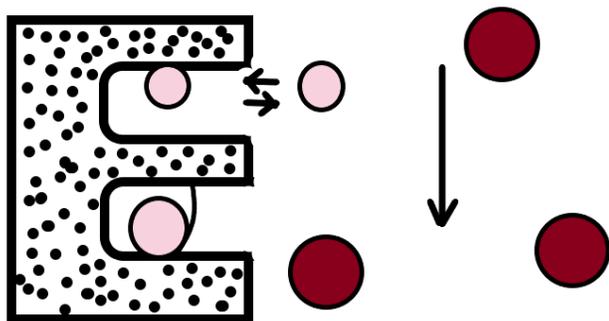
La cromatografía de afinidad es un método para la purificación selectiva de una molécula o grupo de moléculas a partir de mezclas complejas basado en la interacción biológica altamente específica entre las dos moléculas. La interacción suele ser reversible y la purificación se logra a través de una interacción bifásica con una de las moléculas (ligando) inmovilizada en la superficie mientras su pareja (el analito) se encuentra en una fase móvil como parte de una mezcla compleja (Figura 5). Las interacciones altamente selectivas permiten un proceso rápido, a menudo de un solo paso, con un potencial de purificación alto.<sup>9, 10,12</sup>



**Figura 5. Mecanismo de afinidad.**

### 2.2.1.5 Cromatografía de exclusión por tamaño

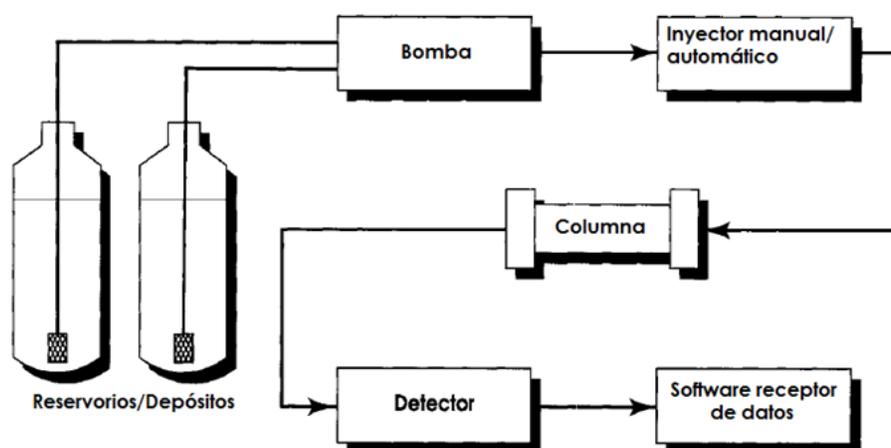
La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés) separa sobre la base del volumen o tamaño molecular (Figura 6), en lugar de por interacciones entálpicas con la fase estacionaria o las superficies de empaquetamiento, como es el caso con las antes mencionadas separaciones cromatográficas. *El polímero* se disuelve en un disolvente apropiado y se inyecta en una columna llena de partículas porosas de tamaño de poro bastante definido. La fase móvil es generalmente el mismo disolvente que se usa para disolver *el polímero*. A medida que *el polímero* eluye a través de la columna, las moléculas que son demasiado grandes para penetrar los poros del relleno eluyen en el espacio intersticial o vacío. El término “cromatografía de permeación en gel” (GPC, por sus siglas en inglés) también se usa, pero se refiere a la separación de polímeros organosolubles; mientras que el nombre de “cromatografía de filtración en gel” (GFC, por sus siglas en inglés) se refiere específicamente a la separación de biopolímeros en una fase móvil acuosa.<sup>10,13</sup>



**Figura 6. Mecanismo de exclusión por tamaño.**

## 2.2.2 Componentes de un equipo de CLAR<sup>11, 6</sup>

Un cromatógrafo de líquidos de alta resolución esencialmente está compuesto por los siguientes módulos (Figura 7):



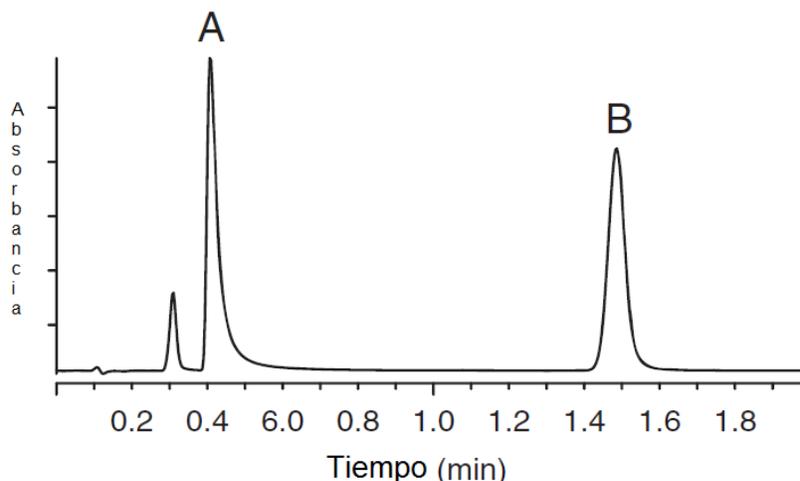
**Figura 7. Esquema de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.**

Adaptado de: Ahuja S, Dong M. Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC. Reino Unido: Elsevier; 2005.

1. Reservorios de disolventes para la fase móvil.
2. Columna: es parte fundamental del equipo de CLAR ya que es donde se lleva a cabo la separación.
3. Sistemas de bombeo: el objetivo principal es el de impulsar la fase móvil a través de la columna a altas presiones y deben cumplir ciertas especificaciones, como reproducibilidad y precisión, manteniendo un flujo laminar y de velocidad constante.
4. Sistema de inyección de muestras: este sistema de inyección debe de introducir volúmenes pequeños y reproducibles de muestra. También su funcionamiento no debe alterar las características hidrodinámicas del sistema.
5. Detector: es el que detecta y muestra las señales de los componentes de la mezcla por lo que requiere de gran sensibilidad. El detector UV/Visible es de los más utilizados, sin embargo, debe utilizarse aquel que se adecue a las

características del analito por lo que también se usan detectores de fluorescencia, amperométricos, refractómetro diferencial, entre otros.

6. Registro de señales (Software): los equipos actuales emplean computadoras con requerimientos especiales para el correcto funcionamiento del equipo CLAR, estas a su vez van acompañadas de softwares desarrollados que permiten transducir la señal eléctrica generada por el detector a una señal visible, tangible, y fácilmente interpretable, que es el cromatograma (Figura 8).



**Figura 8. Cromatograma típico de una señal trazada en un detector UV.**

El detector monitorea la concentración de cada banda de componentes, A y B separada y en el cromatograma se muestra su elución.

Adaptada de: Dong M. HPLC and UHPLC for Practicing Scientist. 2 ed. Nueva Jersey: Wiley; 2019.

### **2.3 Desarrollo de métodos analíticos<sup>14, 15, 16, 17</sup>**

El desarrollo de métodos analíticos se define como, la actividad de seleccionar un procedimiento de ensayo preciso para realizar análisis cuantitativos y cualitativos en analitos de interés. Un método analítico es la descripción de la secuencia de actividades, materiales y parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico de una muestra. De esta manera el desarrollo de métodos analíticos se divide en las fases indicadas en el Cuadro 1.

**Cuadro 1. Etapas del desarrollo de métodos analíticos.**

<b>Etapa</b>	<b>Descripción</b>
Caracterización estándar del analito	Se recopila toda la información conocida del analito y su estructura, es decir, propiedades físicas y químicas.
Requisitos del método	Aquí se consideran los objetivos del método analítico que se va a desarrollar. (selectividad, precisión, exactitud, etc...)
Selección del método	En esta etapa se decide que método es el apropiado para determinar el o los analitos de interés en la matriz dada. Para tomar esta decisión se debe discutir sobre las ventajas y desventajas de los métodos a disposición, cuál método se ajusta más a las propiedades físico químicas identificadas, qué restricciones impone la matriz sobre el método seleccionado.
Optimización del método	Durante la optimización, se cambia un parámetro a la vez y se aísla un conjunto de condiciones, en lugar de utilizar un enfoque de prueba y error. El trabajo se ha realizado a partir de un plan metódico organizado, y cada paso está documentado.
Validación del método	En esta etapa del desarrollo del método, se evalúan los objetivos del método.
Evaluación de los resultados	Los resultados obtenidos en la validación del método se documentan expresarse en función del promedio de un número determinado de mediciones y su desviación estándar como medida del error cometido. Igualmente, el resultado analítico se debe expresar en ocasiones como el promedio de las medidas más o menos un intervalo de confianza calculado de manera estadística.
Informe final	El informe final representa el reporte por escrito de los resultados del trabajo de laboratorio, el cual puede tener un esquema formal o puede presentarse bajo la forma de un reporte técnico.

Se define a un método analítico como una secuencia lógica de operaciones para llevar a cabo un análisis. Resulta de gran importancia tener en cuenta los siguientes objetivos al momento de desarrollar un método analítico por CLAR:

- Respuestas bien definidas.
- Obtener la mayor resolución posible entre los analitos de interés cuando se tiene una muestra con diferentes analitos, esto asegura la identificación correcta y precisa, a su vez también asegura su correcta cuantificación.
- Desarrollar la separación en el menor tiempo posible, de esta manera se permite un ahorro de reactivos, así como una mayor comodidad al momento de replicar el método.

La información sobre el analito de interés es crucial, así como la matriz en la que se encuentra. Algunos ejemplos de esta información serían:

- pKa
- Estabilidad del analito de interés
- Espectros UV
- Composición de la matriz que lo acompañan
- Datos de archivos regulatorios

#### **2.4 Validación de métodos analíticos**

Se denomina validación a la evidencia documentada generada a través de la recopilación y evaluación de los datos obtenidos en la calificación y de las pruebas específicas basadas en el conocimiento del proceso, sistema o método, para demostrar funcionalidad, consistencia y robustez<sup>18</sup>. Utilizando este concepto podríamos definir a la validación de métodos analíticos como “la demostración inequívoca con estudios de laboratorio que un determinado método de medición cumple con los requisitos para los cuales fue desarrollado, generando evidencia”.

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), clasifica en cuatro categorías a los métodos analíticos (Cuadro 2), dependiendo de la naturaleza de su funcionalidad. Mientras que en la Guía Q2 de la International Conference on Harmonization (ICH) clasifica en 3 categorías (Cuadro 3).<sup>19</sup>

**Cuadro 2. Clasificación de las categorías de los métodos analíticos de acuerdo con la FEUM.<sup>20</sup>**

<b>Clasificación</b>	<b>Descripción</b>
Categoría I	Métodos analíticos para cuantificar a un componente específico en muestras de un producto determinado o en pruebas de estabilidad, ya sea en fármacos, aditivos o preparados farmacéuticos, u otros analitos de interés (conservadores, solventes, etc).
Categoría II	Métodos analíticos para la determinación de impurezas (productos de degradación, sustancias relacionadas, isómeros ópticos, etc...). No se incluye en esta categoría a los métodos en los que se determina la pureza.
Categoría III	Métodos analíticos en los cuales se determina un analito en una muestra, donde se evalúa una característica de desempeño del preparado farmacéutico.
Categoría IV	Métodos analíticos cuyo propósito es únicamente establecer la presencia del analito de interés en la muestra.

**Cuadro 3. Clasificación de las categorías de los métodos analíticos de acuerdo con la USP.<sup>21</sup>**

<b>Categoría</b>	<b>Descripción</b>
Ensayos de identidad	Métodos analíticos que, como lo indica su nombre son para asegurar la identidad de un analito en la muestra.
Pruebas para impurezas	Métodos analíticos que pueden ser de carácter cuantitativo o cualitativo. Estos métodos tienen como finalidad reflejar con exactitud las características de pureza de la muestra.
Métodos para valoración	Métodos analíticos con los cuales se busca medir la cantidad de analito presente en una determinada muestra.

Las características por evaluar dependerán del objetivo del método. En el Cuadro 4 se pueden observar las características de desempeño que indica la FEUM correspondientes para cada categoría, mientras que en el Cuadro 5 se observan las características de desempeño que indica la guía Q2 a evaluar dependiendo de su clasificación.

**Cuadro 4. Características de desempeño indicadas por la FEUM.<sup>20</sup>**

Característica de desempeño	Categoría I	Categoría II Cuantitativas	Categoría II Cualitativas	Categoría III	Categoría IV
Verificación del Sistema	*	*	*	*	-
Precisión del Sistema	x	x	*	*	-
Linealidad del Sistema	x	x	*	*	-
Especificidad/ Selectividad	x	x	x	*	x
Exactitud del Método	x	x	*	*	-
Linealidad del Método	x	x	*	*	-
Precisión del Método	x	x	-	x	-
Límite de Detección	-	-	x	*	-
Límite de Cuantificación	-	x	-	*	-
Tolerancia	*	*	*	*	*
Robustez	*	*	*	*	*

\* Puede ser necesario dependiendo de la naturaleza del método

- La determinación de dicha característica de desempeño no es recomendada

**Cuadro 5. Características de desempeño indicadas por la Guía Q2<sup>19</sup>**

Característica de desempeño	Ensayos de identidad	Pruebas para impurezas cuantitativas	Pruebas para impurezas cualitativas	Valoración
Especificidad/ Selectividad	x	x	x	x
Exactitud del método	-	x	-	x
Linealidad del método	-	x	-	x
Intervalo	-	x	-	x
Precisión del método		X		X
Repetibilidad		X (1)	-	X
Precisión intermedia	-			
Límite de detección	-	- (2)	x	-
Límite de cuantificación	-	x	-	-

1 si se determina reproducibilidad, no es necesario verificar Precisión intermedia

2 puede requerirse en ocasiones

- La determinación de dicha característica de desempeño no es recomendada

## 2.5 Diabetes mellitus

La diabetes es una enfermedad metabólica que se caracteriza por niveles elevados de glucosa en sangre, secundaria a una alteración absoluta o relativa de la secreción de insulina y/o a una alteración de esta hormona en los tejidos insulino dependientes. La hiperglucemia crónica se acompaña de modificaciones del metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y proteínas.<sup>22,23</sup>

Existen dos categorías de diabetes mellitus, la diabetes mellitus tipo 1, es causada por una deficiencia absoluta en la secreción de insulina, a menudo con evidencia de destrucción autoinmune de las células pancreáticas. En la segunda categoría,

mucho más prevalente, diabetes mellitus tipo 2, la causa es una combinación de resistencia a la acción de la insulina (generalmente asociada a obesidad) y una inadecuada respuesta secretora compensatoria.<sup>24, 25</sup>

## **2.6 Fármacos utilizados en los tratamientos para diabetes mellitus**

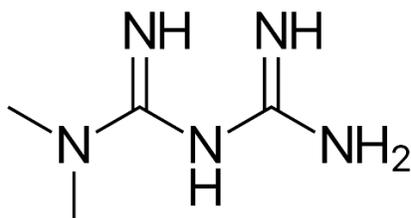
Existen diferentes hipoglucemiantes para el tratamiento de esta enfermedad, entre los principales se encuentran los secretagogos de insulina (sulfonilureas y glinidas), los sensibilizadores a la insulina (biguanidas), algunos inhibidores y agonistas, entre otros.<sup>26</sup>

La Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010 para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus indica que los medicamentos que pueden utilizarse para su control son las sulfonilureas, biguanidas e insulina, así como sus respectivas combinaciones.<sup>27</sup>

### **2.6.1 Metformina**

La metformina (Figura 9) es un agente antihiper glucémico altamente soluble en agua que se utiliza en el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2 no insulino dependiente. Su biodisponibilidad relativamente baja (50-60%), junto con su vida media biológica corta y variable (1.5-4.5 h), requieren administraciones repetidas de dosis altas para mantener concentraciones plasmáticas efectivas<sup>28</sup>. Su nombre químico es:

N,N-dimetilimidodicarbonimidica diamida<sup>29</sup>

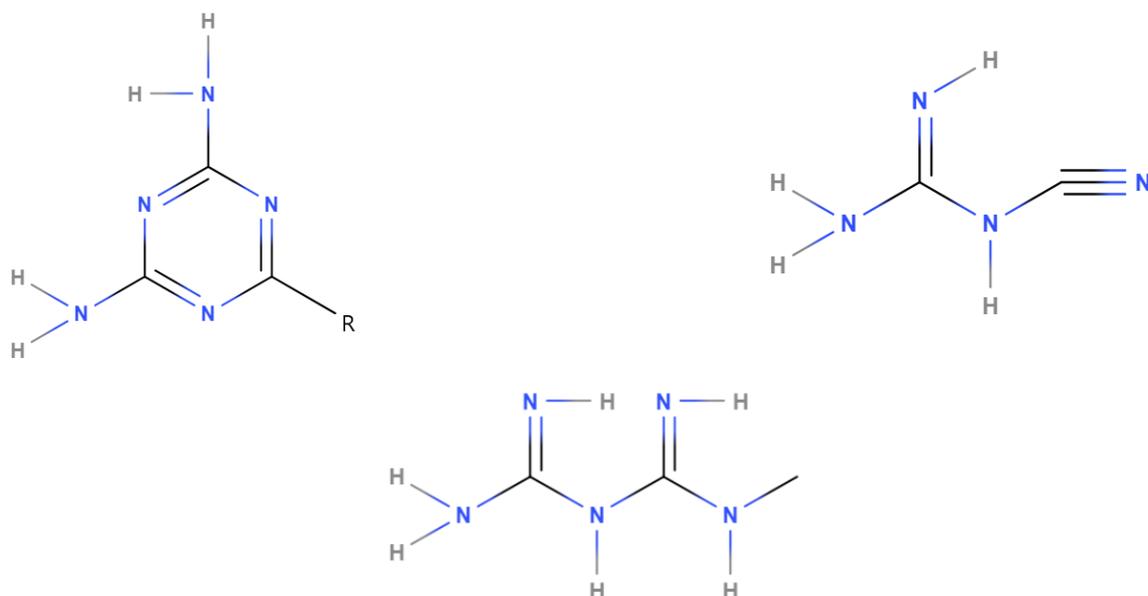


**Figura 9. Estructura molecular del fármaco Metformina.**

- Apariencia: Blanco, higroscópico, polvo cristalino<sup>28</sup>
- Fórmula condensada:  $C_4H_{11}N_5$  <sup>28, 29</sup>
- Nombre sistémico: N,N-dimetilimidodicarbonimidica diamida
- Otro nombre: Dimetilbiguanadina<sup>29</sup>
- Número CAS: 657-24-9<sup>28</sup>
- Peso molecular: 129.16 <sup>29</sup>
- Temperatura de fusión: 223-226 °C <sup>29</sup>
- Solubilidad: Soluble 1 en 2 partes de agua, 1 en 100 partes de etanol; prácticamente insoluble en éter y cloroformo <sup>29</sup>
- Coeficiente de reparto: Log P (octanol/agua): -2.6
- pKa: 2.8, 11.5 (32°) <sup>28</sup>

#### **2.6.1.1 Productos de degradación<sup>30, 31</sup>**

La farmacopea británica enumera 6 impurezas de las cuales solo toma como importancia a la impureza A, cianoguanidina, en la monografía general de la molécula. Aunque no se han reportado casos en donde sean detectables en los fármacos, se muestran en la Figura 10 algunas de las más importantes relacionadas con la síntesis del fármaco.



**Figura 10. Principales impurezas del fármaco Metformina.**

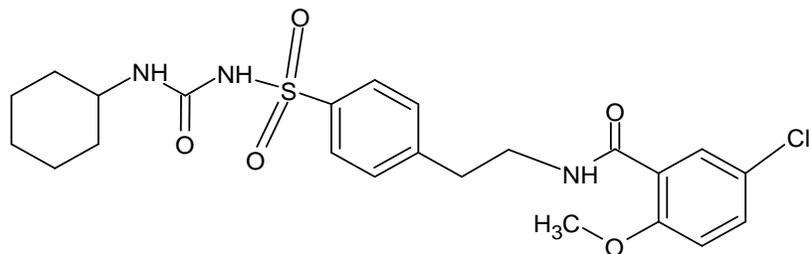
La molécula de lado izquierdo superior corresponde a la impureza B ((4,6-diamino-1,3,5-triazina-2-yl)guanidina), la que está de lado derecho superior corresponde a la impureza A (cianoguanidina) y por último la que se encuentra debajo de las dos anteriores corresponde a la impureza C (1-metilbiguadina).

### 2.6.2 Glibenclamida

La glibenclamida (también conocida como gliburida) es un agente hipoglucemiante oral de tipo sulfonilurea de segunda generación que reduce el nivel de glucosa en sangre al estimular la liberación de insulina de las células funcionales del páncreas.

Su nombre químico es:

1-[[ 4-[2-[(5-cloro-2-metoxi-benzoil)-amino]etil]fenil]sulfonil]-3-ciclo-hexilurea.<sup>32, 33</sup>

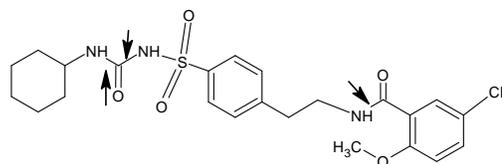


**Figura 11. Estructura molecular del fármaco Glibenclamida**

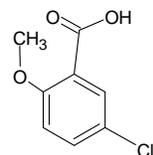
- Apariencia: polvo blanco
- Fórmula condensada: C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S
- Nombre sistémico: 1-4-[2-(5-cloro-2-metoxibenzamida)etil]bencenosulfonil-3-ciclohexilurea
- Otro nombre: Gliburida
- Número CAS: 10238-21-8
- Peso molecular: 494 g/mol
- Temperatura de fusión: 169°C, 174 °C
- Solubilidad: en agua a 27°C: 4 mg/ L (Es bastante insoluble en agua), insoluble en éter, soluble en 330 partes de alcohol, soluble en 36 partes de cloroformo y soluble en 250 partes de metanol.
- Coeficiente de reparto: Log P: 4.7
- pKa: 5.3<sup>34</sup>

### 2.6.2.1 Productos de degradación

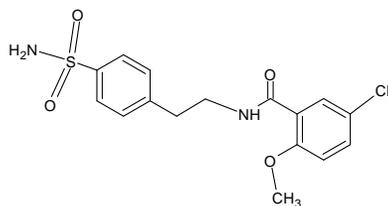
La presencia de enlaces amida y sulfonilurea hace que el fármaco sea muy susceptible a la degradación hidrolítica y fotolítica en un medio acuoso. La Farmacopea Europea 2005 enumera 2 impurezas, a saber, 5-cloro-2-metoxi-N-2-(4-sulfamoilfenil)etil]benzamida (Impureza A) y metilo[[4-[2-[(5-cloro-2-metoxibenzoil) amino]etil]fenil]-sulfonil]carbamato (Impureza B) en la monografía del principio activo. También se sabe que el fármaco se degrada a la impureza A junto con la ciclohexanamina y el CO<sub>2</sub> en un medio fuertemente ácido.<sup>32</sup>



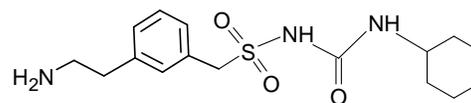
Glibenclamida



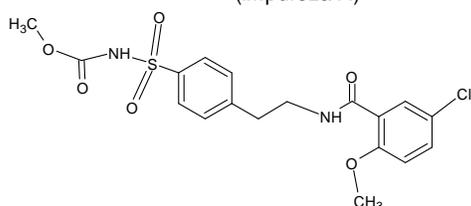
Ácido 5-cloro-2-metoxibenzoico



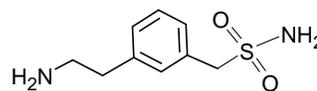
5-cloro-2-metoxi-N-2-(4-sulfamoilfenil)etil]benzamida  
(impureza A)



1-ciclohexil-3-[[4-(2-aminoetil)fenil]sulfonyl]urea



[[4-[2-[(5-cloro-2-metoxibenzoil)amino]etil  
[fenil]sulfonyl]carbamato de metilo  
(impureza B)



4-(2-Aminoetil)benzenosulfonamida

**Figura 12. Estructuras químicas de glibenclamida y productos de degradación conocidos y previstos. Las flechas indican los enlaces susceptibles de hidrólisis.<sup>32</sup>**

Adaptado de: Bansal G et al. Ultraviolet-Photodiode Array and High-Performance Liquid Chromatographic/Mass Spectrometric Studies on Forced Degradation Behavior of Glibenclamide and Development of a Validated Stability-Indicating Method. Journal of AOAC INTERNATIONAL. 2008; 91(4): 709–719.

### **3 Planteamiento del problema**

La eficacia del control glucémico es clave para el manejo de la diabetes, en México, existe un aumento en el número de personas con este padecimiento de 7.3 millones de personas en el 2006 a 12.8 millones en 2020.<sup>35</sup> En contraste, ha habido adelantos en los diferentes tipos de tratamiento. El fármaco oral más utilizado para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 es la metformina y por lo general se acepta como tratamiento de primera línea para este trastorno. La metformina es eficaz como monoterapia y también en combinación con casi cualquier otro tipo de tratamiento.<sup>36</sup>

El uso de la terapia combinada es útil para reducir los efectos secundarios de uno u otro medicamento, disminuir las dosis, así como incrementar su efectividad. Otro fármaco para tratar la diabetes mellitus de tipo 2 es la glibenclamida cuyo problema de baja solubilidad en agua puede impactar negativamente en su absorción; este se ve reducido al usarla en conjunto con metformina, que tiene un mecanismo de acción diferente pero que da como resultado un tratamiento eficaz que ha sido demostrado en estudios clínicos.<sup>37</sup>

Debido a la importancia de estos dos hipoglucemiantes en el tratamiento de un padecimiento tan común en los mexicanos como lo es la diabetes, y su uso concomitante, en el presente trabajo se busca diseñar y validar un método alternativo para cuantificar glibenclamida y metformina de manera conjunta por cromatografía de líquidos de alta resolución que sea eficaz y que pueda brindar certeza de la calidad de los datos obtenidos para asegurar la medición de ambas

sustancias en una forma farmacéutica (tabletas) en las que se incluyan de manera conjunta.

#### **4 Hipótesis**

El método analítico por CLAR desarrollado para cuantificar glibenclamida y metformina en tabletas es preciso, exacto, lineal, específico y sobre todo confiable.

#### **5 Objetivo general**

Desarrollar y validar un método analítico utilizando CLAR para cuantificar conjuntamente glibenclamida y metformina en tabletas.

## 6 Desarrollo experimental

**Cuadro 6. Materiales.**

<b>Materiales</b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>● Sistema de filtración Millipore</li><li>● Jeringas</li><li>● Probeta graduada de 100 y 500 mL</li><li>● Matraz 500 mL</li><li>● Matraz volumétrico 10, 50, 5 mL</li><li>● Viales para CLAR 2 mL</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>● Filtros de discos para jeringa PVDF 45 µm</li><li>● Filtro de membrana 45 µm</li><li>● Papel glassine</li><li>● Mortero con pistilo</li><li>● Vasos de precipitado 1000, 600, 250, 100, 50, 30 mL.</li></ul>

**Cuadro 7. Equipos e instrumentos.**

<b>Equipos</b>	<b>Instrumentos</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>● Columna Luna Omega PS C18 150 mm x 4.6 mm 5 µm.</li><li>● Sonificador BRANSON, modelo 3800</li><li>● Desionizador de agua Milli Q ®</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>● Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Varian Pro Star</li><li>● Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Hitachi</li><li>● Balanza</li><li>● Potenciómetro HANNA</li></ul>

**Cuadro 8. Reactivos.**

<b>Reactivos</b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>● Fosfato de amonio monobásico JT Baker</li><li>● Lauril sulfato de sodio ALYT Reactivos Analíticos</li><li>● Hidróxido de sodio MACRON</li><li>● Ácido clorhídrico MERCK</li><li>● Peróxido de hidrógeno 2.5% Alcomex</li><li>● Tabletas de 500 mg Metformina-5 mg Glibenclamida marca Wadil®, lote SF2142, caducidad Junio 23</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>● SRef Metformina APOTEX</li><li>● SRef Glibenclamida APOTEX</li><li>● Agua desionizada Teissier</li><li>● Metanol grado HPLC Tecsiquim</li><li>● Acetonitrilo grado HPLC Tecsiquim</li><li>● Materia prima de Glibenclamida</li><li>● Materia prima de Metformina DC 90%</li></ul>

## 6.1 Desarrollo del método analítico

### 6.1.1 Elección de la fase móvil

Se pesaron 5 mg de SRef de glibenclamida y se llevaron a un matraz volumétrico de 50 mL. Se agregaron 40 mL de fase móvil y se llevó a ultrasonido por 3 minutos. Se terminó de aforar y se homogenizó la solución.

Se pesaron 10 mg de SRef de metformina y se llevó a un matraz volumétrico de 5 mL. Se agregaron 4 mL de fase móvil y se llevó a ultrasonido por 3 minutos. Se terminó de aforar y se homogenizó la solución.

Se realizaron pruebas en el cromatógrafo con un volumen de inyección de 20 µL y un flujo de 2 mL/min, la longitud de onda se seleccionó mediante referencia bibliográfica.

Las proporciones y concentraciones de la fase móvil se cambiaron como lo indica el Cuadro 9 ya que los resultados fueron insatisfactorios.

**Cuadro 9. Elección de fase móvil.**

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Proporción</b>
Fosfato de amonio monobásico/1-octanosulfonato de sodio	40 mM/5mM	40 %
Metanol	-----	60%
<b>Cambios realizados</b>		
Fosfato de amonio monobásico/1-octanosulfonato de sodio	40 mM/10mM	42 %
Metanol	-----	58 %

### 6.1.2 Optimización del método

Para la etapa de optimización del método se buscó reducir tiempos de corrida sin perder una buena resolución entre los picos, y como prioridad tener un mejor tiempo de retención para la metformina. Las condiciones de operación para el método fueron las siguientes:

#### Cuadro 10. Condiciones cromatográficas.

- 
- Columna: Luna® Omega PS C18 150 mm x 4.6 mm 5 µm
  - Longitud de onda del detector: 254 nm
  - Volumen de inyección: 20 µL
  - Velocidad de flujo: 1.5 mL/min
  - Tiempo de corrida: 10 min
  - Proporción: 40% fase acuosa y 60% MeOH
- 

Debido a que el 1-octanosulfonato nos proporcionaba una mínima retención para la metformina (Figura 15) se sustituyó por lauril sulfato de sodio a una concentración de 5mM.

### 6.2 Validación del método analítico

#### 6.2.1 Validación del sistema

##### 6.2.1.1 Adecuabilidad

Se preparó una solución al 100% de la concentración (10 mg/mL para metformina y 100 µg/mL para glibenclamida), la cual, se inyectó por sextuplicado en el cromatógrafo. La adecuabilidad debió de cumplir con los siguientes parámetros:

CV ≤ 2% para metformina

CV ≤ 3% para glibenclamida

Resolución > 3

Se pesaron 10 mg de SRef de glibenclamida y se colocaron en un matraz volumétrico de 50 mL, se añadieron 5 mL de acetonitrilo y 15 mL de metanol, y se llevó a ultrasonido durante 3 min. Transcurrido el tiempo se agregaron 10 mL de fase acuosa y se llevó a ultrasonido por 1 min. Se pesaron 1000 mg de materia prima estandarizada de metformina y se colocaron en el mismo matraz de 50 mL, se añadió fase móvil sin llegar al aforo y se llevó a ultrasonido por 3 min. Pasado el tiempo se aforó el matraz y se homogeneizó la solución. Se dejó reposar durante 5 min.

Transcurrido el tiempo, se tomó una alícuota de 2.5 mL y se transfirió a un matraz de 5 mL, se aforó y se homogeneizó.

#### 6.2.1.2 Linealidad del sistema

Se prepararon 3 curvas con 5 niveles de concentración a partir de una solución stock de metformina y una de glibenclamida como lo indica el Cuadro 11.

**Cuadro 11. Niveles de concentración para la curva de linealidad del sistema.**

Conc. Stock	Alícuotas metformina (mL)	Alícuotas glibenclamida (mL)	Volumen final (mL)	Concentración final Glibenclamida ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración final Metformina (mg/mL)	% Concentración
1 mg/mL de glibenclamida y 20 mg/mL de metformina	7	1.4	10	140	14	140
	6	1.2	10	120	12	120
	5	1	10	100	10	100
	4	0.8	10	80	8	80
	3	0.6	10	60	6	60

Este parámetro debió cumplir con los siguientes criterios:

$$r^2 \geq 0.98$$

$$m \neq 0$$

IC( $\beta$ 1) tiene que incluir la unidad

Para preparar las 3 curvas con los 5 niveles (como se muestra en el Cuadro 11) se realizaron soluciones stock de cada analito de la siguiente manera:

Solución stock de metformina: Se pesaron 1000 mg de materia prima estandarizada de metformina. Se colocó la pesada en un matraz volumétrico de 50 mL, se aforó con fase móvil y se homogeneizó la solución.

Solución stock de glibenclamida: Se pesaron 50 mg de SRef de glibenclamida. Se colocó la pesada en un matraz de 50 mL, se adicionaron 5 mL de acetonitrilo y 15 mL de metanol, se sometió a ultrasonido por 3 min. Se agregaron 10 mL de la fase acuosa y se sometió a ultrasonido por 1 min. Se terminó de aforar con fase móvil y se homogeneizó la solución.

### **6.2.1.3 Precisión del sistema**

Se prepararon 6 muestras como lo indica el Cuadro 12 a partir de una solución stock de metformina y una de glibenclamida. El CV debió ser  $\leq 2\%$  para metformina y  $\leq 3\%$  para glibenclamida.

**Cuadro 12. Condiciones para precisión del sistema.**

Conc. Stock	Alícuota de glibenclamida (mL)	Alícuota de metformina (mL)	Volumen final (mL)	Concentración final
250 µg/mL de glibenclamida, 50 mg/mL de metformina	2	1	5	10 mg/mL de metformina, 100 µg/mL de glibenclamida

Se pesaron 10 mg de SRef de glibenclamida y se colocaron en un matraz volumétrico de 50 mL, se agregaron 5 mL de acetonitrilo y 15 mL de metanol, se sometió a ultrasonido por 3 minutos y se adicionaron 10 mL de fase acuosa.

Se pesaron 1000 mg de materia prima estandarizada de metformina y se adicionaron al matraz que contenía la glibenclamida. Se añadió fase móvil sin llegar al aforo y se sometió a ultrasonido por 3 minutos. Se tomó una alícuota de 2.5 mL y se colocó a un matraz volumétrico de 5 mL (Cuadro 12).

Esta solución tenía una concentración de 10 mg/mL de metformina/100 µg/mL de glibenclamida.

Se realizó la solución por sextuplicado con la misma stock.

## **6.2.2 Validación del método**

### **6.2.2.1 Especificidad**

Se sometieron soluciones de materia prima de metformina, glibenclamida y producto terminado a condiciones de degradación ácida, alcalina, oxidativa y térmica por 24 h y se inyectaron en el cromatógrafo. Las señales resultantes no debieron interferir con las señales emitidas por los analitos.

Para probar que los excipientes no interfieren con las señales de los analitos se inyectaron soluciones de excipientes por separado, mezclados y una solución con placebo cargado.

Para la degradación ácida se realizaron muestras de materia prima de metformina, glibenclamida y producto terminado, a una concentración del 100%, se colocaron las pesadas en matraces volumétricos de 50 mL, se adicionaron 5 mL de acetonitrilo, enseguida se adicionaron 15 mL de metanol y se sometieron a ultrasonido durante 3 minutos, posteriormente se adicionaron 10 mL de fase acuosa y se volvieron a someter a ultrasonido durante 1 minuto. Se adicionó un volumen de 10 mL de fase móvil. Posteriormente se agregó 1 mL de HCl 0.1 M. Se sometieron las soluciones a ultrasonido durante 1 minuto. Enseguida se colocaron las soluciones a temperatura y tiempo indicado en el Cuadro 13.

Transcurrido el tiempo y dejando enfriar las soluciones a temperatura ambiente, se neutralizaron las soluciones con 1 mL de NaOH 0.1 N y se terminaron de aforar con fase móvil. Se llevaron a ultrasonido por 1 minuto.

Se tomaron 2.5 mL de cada solución y se trasvasaron a matraces de 5 mL independientes para cada muestra, se aforaron con fase móvil y sometieron a ultrasonido durante 1 minuto. Estas soluciones se inyectaron en el cromatógrafo.

**Cuadro 13. Preparación de muestras para degradación ácida.**

Analito	Volumen inicial (mL)	mL de HCl 0.1M	Alicuota (mL)	mL de NaOH 0.1N	Volumen final (mL)	Tiempo (h)	Temperatura (°C)
Metformina	50	1	2.5	1	5	24	40
Glibenclamida	50	1	2.5	1	5	24	40
Producto terminado	50	1	2.5	1	5	24	40

Para la degradación alcalina se realizaron muestras de materia prima de metformina, glibenclamida y producto terminado, a una concentración del 100%, se colocaron las pesadas en matraces volumétricos de 50 mL, se adicionaron 5 mL de acetonitrilo, enseguida se adicionaron 15 mL de metanol y se sometieron a ultrasonido durante 3 minutos, posteriormente se adicionaron 10 mL de fase acuosa y se volvieron a someter a ultrasonido durante 1 minuto. Se adicionó un volumen de 10 mL de fase móvil. Posteriormente se agregó 1 mL de NaOH 0.1 N. Se sometieron las soluciones a ultrasonido durante 1 minuto. Enseguida se colocaron las soluciones a temperatura y tiempo indicado en el Cuadro 14.

Transcurrido el tiempo y dejando enfriar las soluciones a temperatura ambiente, se neutralizaron las soluciones con 1 mL de HCl 0.1 M y se terminaron de aforar con fase móvil. Se llevaron a ultrasonido por 1 minuto.

Se tomaron 2.5 mL de cada solución y se trasvasaron a matraces de 5 mL independientes para cada muestra, se aforaron con fase móvil y sometieron a ultrasonido durante 1 minuto. Estas soluciones se inyectaron en el cromatógrafo.

**Cuadro 14. Preparación de muestras para degradación alcalina.**

Analito	Volumen inicial (mL)	mL de NaOH 0.1N	Alicuota (mL)	mL de HCl 0.1M	Volumen final (mL)	Tiempo (h)	Temperatura (°C)
Metformina	50	1	2.5	1	5	24	40
Glibenclamida	50	1	2.5	1	5	24	40
Producto terminado	50	1	2.5	1	5	24	40

Para la degradación oxidativa se realizaron muestras de materia prima de metformina, glibenclamida y producto terminado, a una concentración del 100%, se colocaron las pesadas en matraces volumétricos de 50 mL, se adicionaron 5 mL de acetonitrilo, enseguida se adicionaron 15 mL de metanol y se sometieron a ultrasonido durante 3 minutos, posteriormente se adicionaron 10 mL de fase acuosa y se volvieron a someter a ultrasonido durante 1 minuto. Se adicionó un volumen de 10 mL de fase móvil. Posteriormente se agregó 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2.5%. Se sometieron las soluciones a ultrasonido durante 1 minuto. Enseguida se colocaron las soluciones a temperatura y tiempo indicado en el Cuadro 15.

Transcurrido el tiempo y dejando enfriar las soluciones a temperatura ambiente, se terminaron de aforar con fase móvil. Se llevaron a ultrasonido por 1 minuto.

Se tomaron 2.5 mL de cada solución y se trasvasaron a matraces de 5 mL independientes para cada muestra, se aforaron con fase móvil y sometieron a ultrasonido durante 1 minuto. Estas soluciones se inyectaron en el cromatógrafo.

**Cuadro 15. Preparación de muestras para degradación oxidativa.**

Analito	Volumen inicial (mL)	mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2.5%	Alícuota (mL)	Volumen final (mL)	Tiempo (h)	Temperatura (°C)
Metformina	50	1	2.5	5	24	40
Glibenclamida	50	1	2.5	5	24	40
Producto terminado	50	1	2.5	5	24	40

Para la degradación térmica se prepararon soluciones al 100% de la concentración de materia prima de metformina, glibenclamida y producto terminado, se colocaron las pesadas en matraces volumétricos de 50 mL, se adicionaron 5 mL de acetonitrilo, enseguida se adicionaron 15 mL de metanol y se sometieron a ultrasonido durante 3 minutos, posteriormente se adicionaron 10 mL de fase acuosa y se volvieron a someter a ultrasonido durante 1 minuto. Se adicionó un volumen de 10 mL de fase móvil. Se sometieron las soluciones a ultrasonido durante 1 minuto. Enseguida se colocaron las soluciones a temperatura y tiempo indicado en el Cuadro 16.

Transcurrido el tiempo y dejando enfriar las soluciones a temperatura ambiente, se terminaron de aforar con fase móvil. Se llevaron a ultrasonido por 1 minuto.

Se tomaron 2.5 mL de cada solución y se trasvasaron a matraces de 5 mL independientes para cada muestra, se aforaron con fase móvil y sometieron a ultrasonido durante 1 minuto. Estas soluciones se inyectaron en el cromatógrafo.

**Cuadro 16. Preparación de muestras para degradación térmica.**

Analito	Volumen inicial (mL)	Alícuota (mL)	Volumen final (mL)	Tiempo (h)	Temperatura (°C)
Metformina	50	2.5	5	24	40
Glibenclamida	50	2.5	5	24	40
Producto terminado	50	2.5	5	24	40

En la evaluación de la interferencia con los excipientes se realizó un pool de placebo, conformado por almidón, polyplasdone y celulosa microcristalina. Se realizaron muestras por separado de cada excipiente y una mezcla de todos; de la misma forma se realizó un placebo cargado con los analitos al 100%.

#### 6.2.2.2 Linealidad del método

Se prepararon 3 curvas por pesadas independientes de placebo cargado de metformina y glibenclamida como se indica en el Cuadro 17.

**Cuadro 17. Niveles de concentración para linealidad del método.**

Volumen inicial (mL)	Peso de MP Metformina (mg)	Peso de MP Glibenclamida (mg)	Peso de placebo (mg)	Volumen de la alícuota (mL)	Volumen final (mL)	Concentración final Glibenclamida (µg/mL)	Concentración final Metformina (mg/mL)	% Concentración
50	1200	12	189	2.5	5	140	14	140
50	1100	11	290	2.5	5	120	12	120
50	1000	10	391	2.5	5	100	10	100
50	900	9	492	2.5	5	80	8	40
50	800	8	593	2.5	5	60	6	60

Los criterios que debió cumplir este parámetro fueron los siguientes:

$$r^2 \geq 0.98$$

$$m \neq 0$$

$$b = 0$$

IC( $\beta$ 1) tiene que incluir la unidad

CV de % de Recobro  $\leq$  2% para metformina

CV de % de Recobro  $\leq$  3% para glibenclamida

En la linealidad del método se pesó lo indicado de materia prima en el Cuadro 17 para cada nivel, se vertieron las pesadas en matraces de 50 mL. Se adicionaron 5 mL de acetonitrilo, enseguida se adicionaron 15 mL de metanol, se sometió a ultrasonido por 3 minutos, enseguida se adicionaron 10 mL de fase acuosa, se sometió a ultrasonido por 1 minuto. Se terminó de aforar con fase móvil, posteriormente se homogenizo la solución. Enseguida se tomaron 2.5 mL de la solución y se llevó la alícuota a un matraz de 5 mL, se terminó de aforar con fase móvil y se sometió a ultrasonido por 1 minuto. La curva se realizó por triplicado.

### **6.2.2.3 Exactitud del método**

Se realizaron 6 muestras con placebo cargado al 100% como lo indica el Cuadro 17. El CV del % de recobro debió ser  $\leq$  2% para metformina y  $\leq$  3% para glibenclamida.

Las 6 muestras con placebo cargado se prepararon pesando lo indicado en el Cuadro 17, colocando la pesada en un matraz volumétrico de 50 mL, se agregaron 5 mL de acetonitrilo y 15 mL de metanol, se sometió a ultrasonido por 3 min, pasado el tiempo se añadieron 10 mL de fase acuosa y se sometió a ultrasonido durante 1 min. Se agregaron 10 mL de fase móvil y se sometió a ultrasonido por 1 min, se terminó de aforar, se homogeneizó y se dejó reposar durante 5 min. Se tomó una

alícuota de 2.5 mL y se colocó en un matraz volumétrico de 5 mL, se aforó con fase móvil y se homogeneizó. Las soluciones se inyectaron en el cromatógrafo.

#### **6.2.2.4 Precisión intermedia**

Un analista preparó por triplicado soluciones al 100% de la concentración por pesadas independientes. En otro día el mismo analista preparó de la misma manera las soluciones. Un segundo analista realizó el mismo procedimiento en los mismos días que el primer analista.

El CV debió ser  $\leq 2\%$  para metformina y  $\leq 3\%$  para glibenclamida.

Las soluciones fueron preparadas con producto terminado pesando lo equivalente a 1000 mg de metformina/10 mg de glibenclamida y colocando la pesada en un matraz volumétrico de 50 mL, se agregaron 5 mL de acetonitrilo y 15 mL de metanol, se sometió a ultrasonido por 3 min, pasado el tiempo se añadieron 10 mL de fase acuosa y se sometió a ultrasonido durante 1 min. Se agregaron 10 mL de fase móvil y se sometió a ultrasonido por 1 min, se terminó de aforrar, se homogeneizó y se dejó reposar durante 5 min. Se tomó una alícuota de 2.5 mL y se colocó en un matraz volumétrico de 5 mL, se aforó con fase móvil y se homogeneizó. Este procedimiento fue realizado por triplicado por cada analista en los mismos días.

#### **6.2.2.5 Estabilidad de la muestra**

Se preparó una solución al 100% de la concentración con el producto terminado y se inyectó por triplicado enseguida de haber sido realizada, a las 24 h y 48 h. Se calculó la diferencia absoluta para cada tiempo y esta debió ser  $\leq 2\%$  para metformina y  $\leq 3\%$  para glibenclamida.

Se preparó una solución pesando lo equivalente a 1000 mg de metformina/10 mg de glibenclamida y colocando la pesada en un matraz volumétrico de 50 mL, se

agregaron 5 mL de acetonitrilo y 15 mL de metanol, se sometió a ultrasonido por 3 min, pasado el tiempo se añadieron 10 mL de fase acuosa y se sometió a ultrasonido durante 1 min. Se agregaron 10 mL de fase móvil y se sometió a ultrasonido por 1 min, se terminó de aferrar, se homogeneizó y se dejó reposar durante 5 min. Se tomó una alícuota de 2.5 mL y se colocó en un matraz volumétrico de 5 mL, se aforó con fase móvil y se homogeneizó. Esta solución se inyectó por triplicado después de ser preparada y como lo indica el Cuadro 18.

**Cuadro 18. Condiciones para la estabilidad de la muestra.**

<b>Tiempo (h)</b>	<b>N° de lecturas</b>
0	3 lecturas
24	3 lecturas
48	3 lecturas

#### **6.2.2.6 Robustez**

Para evaluar este parámetro se prepararon las muestras de producto terminado y se corrieron por triplicado con fase móvil a distintos valores de pH como lo indica el Cuadro 19.

**Cuadro 19. Condiciones de pH para robustez.**

<b>Condición</b>	<b>Nivel</b>		
	<b>Alto</b>	<b>Normal</b>	<b>Bajo</b>
<b>pH</b>	5.3	5.2	5.1

La diferencia absoluta para cada condición de pH debió ser  $\leq 2\%$  para metformina y  $\leq 3\%$  para glibenclamida.

Las muestras se prepararon pesando lo equivalente a 1000 mg de metformina/10 mg de glibenclamida de polvo de tabletas y se colocó en un matraz volumétrico de 50 mL, se agregaron 5 mL de acetonitrilo, 15 mL de metanol y se sometió a

ultrasonido durante 3 min. Después, se agregaron 10 mL de fase acuosa y se sometió nuevamente a ultrasonido durante 1 min. Pasado el tiempo se agregaron 10 mL de su respectiva fase móvil y se llevó a ultrasonido por 1 min, después se aforó y se homogeneizó. Se dejó reposar por 5 min y se tomó una alícuota de 2.5 mL que se colocó en un matraz volumétrico de 5 mL, se aforó con fase móvil y se homogeneizó.

#### **6.2.2.7 Tolerancia**

Se inyectó por triplicado una solución al 100% de concentración con producto terminado en 2 diferentes cromatógrafos de líquidos de alta resolución. El CV debió ser  $\leq 2\%$  para metformina y  $\leq 3\%$  para glibenclamida.

Se pesó lo equivalente a 1000 mg de metformina/10 mg de glibenclamida de polvo de tabletas y se transfirió a un matraz volumétrico de 50 mL, se añadieron 5 mL de acetonitrilo, 15 mL de metanol y se llevó a ultrasonido por 5 min. Después, se agregaron 10 mL de fase acuosa y se llevó nuevamente a ultrasonido durante 1 min. Se adicionaron 10 mL de fase móvil, se sometió a ultrasonido por 1 min, se aforó y se homogeneizó la solución. Se dejó reposar durante 5 min y se tomó una alícuota de 2.5 mL que fue colocada en un matraz de 5 mL, se aforó con fase móvil y se homogeneizó.

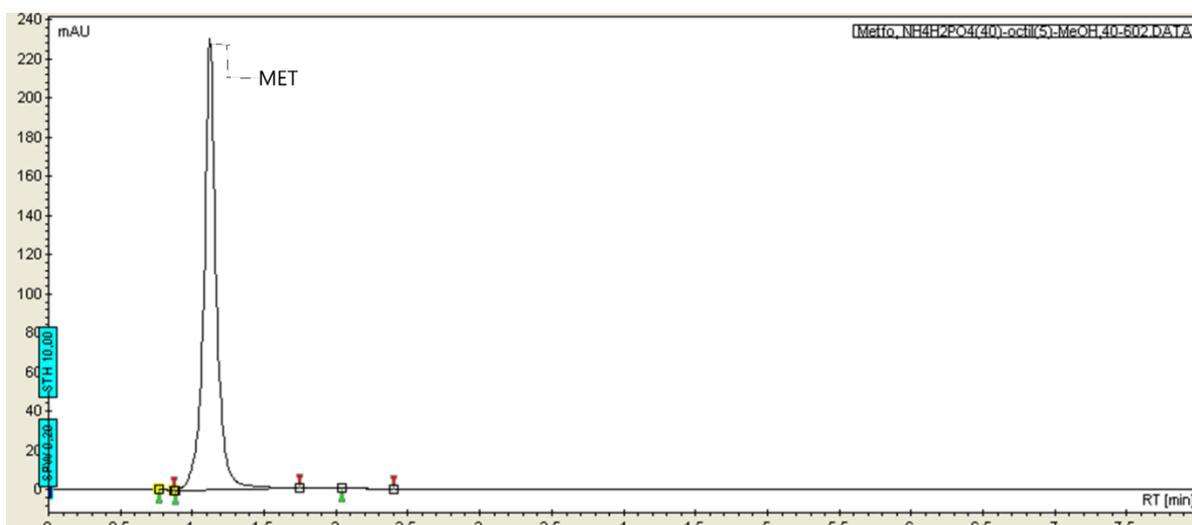
Esta solución se inyectó por triplicado en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución Varían y en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución Hitachi.

## 7 Resultados

### 7.1 Elección de la fase móvil.

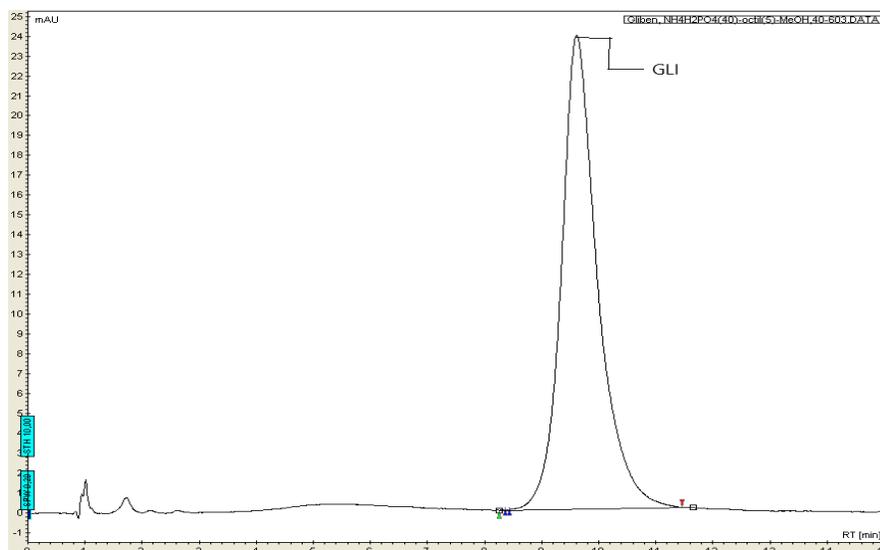
De acuerdo con las propiedades físicas y químicas de los analitos se buscó la fase móvil adecuada para poder usarla en el equipo CLAR y tener picos definidos para su identificación. Se utilizó fosfato de amonio monobásico y 1-octanosulfonato de sodio, como fase acuosa, mientras que fase orgánica se utilizó metanol.

La Figura 13 corresponde a un cromatograma de metformina con una fase móvil compuesta de 60% metanol y 40% fase acuosa; la cual está a un pH de 5.2 y compuesta de fosfato de amonio monobásico a una concentración de 40 mM con 1-octanosulfonato de sodio a una concentración de 5 mM.



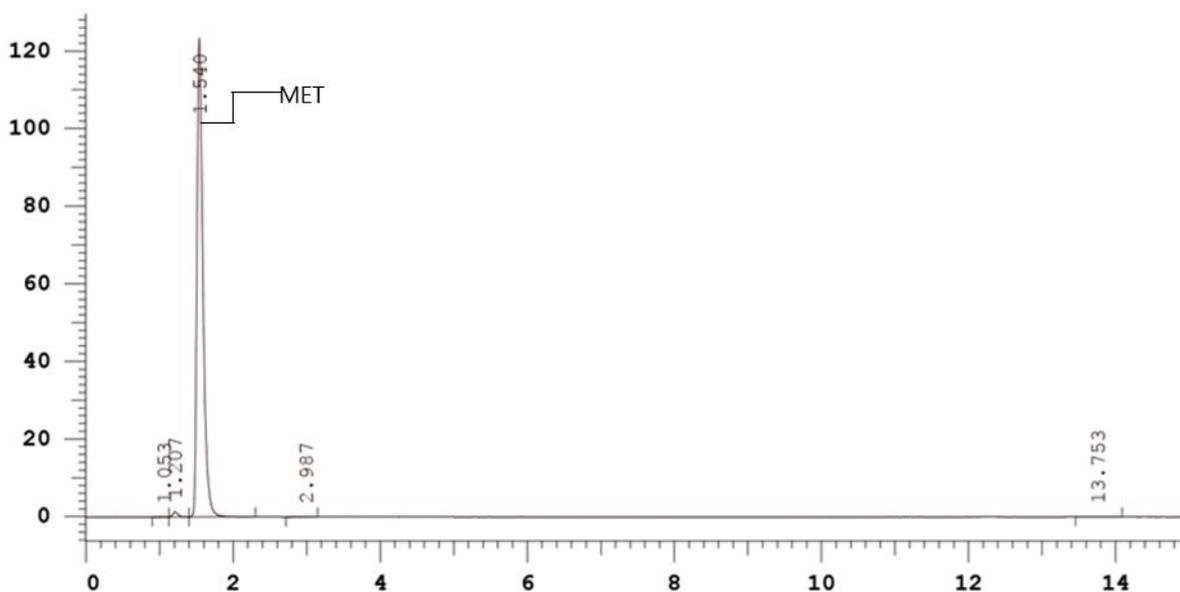
**Figura 13. Cromatograma de metformina a una concentración de 100 µg/mL.**

En el cromatograma correspondiente a la Figura 14 se observa al minuto 9 aproximadamente, un pico perteneciente a glibenclamida con una fase móvil compuesta de 60% metanol y 40% fase acuosa; la cual está a un pH de 5.2 y compuesta de fosfato de amonio monobásico a una concentración de 40 mM con 1-octanosulfonato de sodio a una concentración de 5 mM.



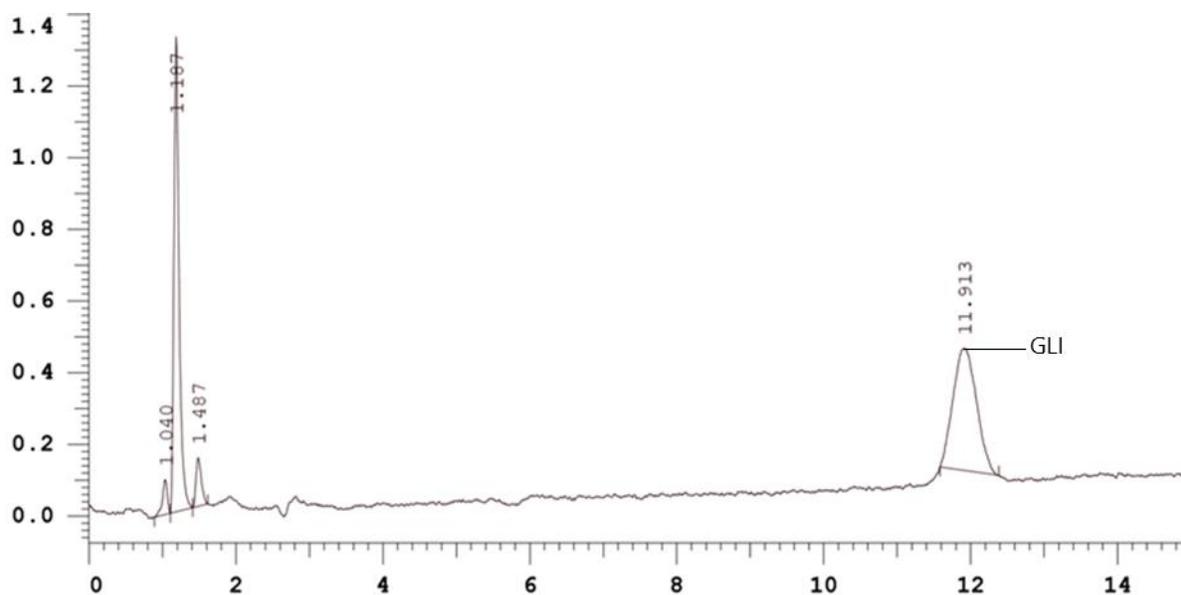
**Figura 14. Cromatograma de glibenclamida a una concentración de 100 µg/mL.**

En la Figura 15 se observa un pico en el minuto 1.54, perteneciente a metformina, este cromatograma se obtuvo de la corrida con fase móvil compuesta por 42% acuosa y 58% metanol; siendo la fase acuosa compuesta por fosfato de amonio monobásico a una concentración de 40 mM y 1-octanosulfonato de sodio a una concentración de 10 mM.



**Figura 15. Cromatograma de metformina con fase móvil compuesta por acuosa 42:58 metanol.**

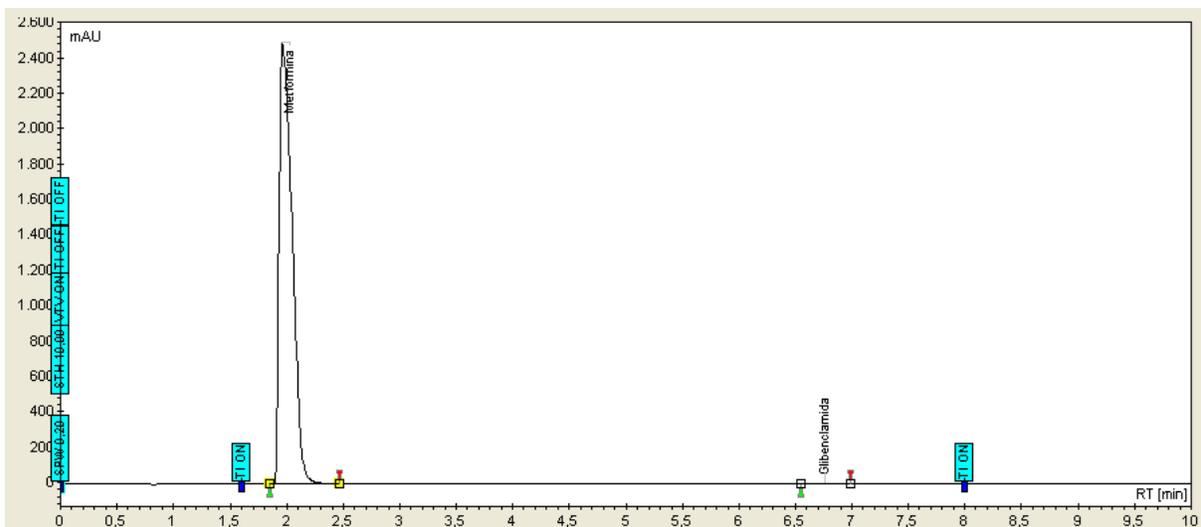
En la Figura 16 se observa un pico en el minuto 11.91, perteneciente a glibenclamida, este cromatograma se obtuvo de la corrida con fase móvil compuesta por 42% acuosa y 58% metanol; siendo la fase acuosa compuesta por fosfato de amonio monobásico a una concentración de 40 mM y 1-octanosulfonato de sodio a una concentración de 10 mM.



**Figura 16. Cromatograma de glibenclamida con fase móvil compuesta por acuosa 42:58 metanol.**

## 7.2 Optimización del método

En el cromatograma de la Figura 17 se observa un pico al minuto 1.96, que corresponde a la metformina, y otro pico al minuto 6.76 respectivo a glibenclamida. Este cromatograma fue obtenido con una fase móvil de 60% metanol y 40% fase acuosa; la cual está a un pH de 5.2 y compuesta de fosfato de amonio monobásico a una concentración de 40 mM con lauril sulfato de sodio a una concentración de 5 mM.



**Figura 17. Cromatograma de metformina y glibenclamida a una concentración de 10 mg/mL y 100 µg/mL respectivamente.**

### 7.3 Adecuabilidad del sistema

Los coeficientes de variación de las áreas bajo la curva (ABC) obtenidas de inyectar por sextuplicado una misma solución al 100% de la concentración (10 mg/mL para metformina y 100 µg/mL para glibenclamida) de metformina y glibenclamida se observan en el Cuadro 20, así como la resolución (R) entre ambos picos:

**Cuadro 20. Coeficiente de variación de las ABC para la adecuabilidad del sistema y resolución (R).**

		MET	GLI	
		ABC	ABC	R
Concentración 100 %	1	22822.00	391.30	12.62
	2	22880.30	392.20	12.61
	3	22861.70	394.80	12.55
	4	22884.50	394.60	12.89
	5	22979.40	394.80	12.84
	6	23084.00	397.70	12.75
	$\bar{X}$	22918.65	394.23	12.71
	DESVEST	96.18	2.26	
	% CV	0.42	0.57	

Los CV para metformina y glibenclamida son menores a los establecidos ( $\leq 2\%$  para metformina y  $\leq 3\%$  para glibenclamida) y la resolución es mayor a 5, que es el criterio de aceptación establecido.

#### 7.4 Linealidad del sistema

En el Cuadro 21 se observa el coeficiente de variación obtenido de las ABC de los distintos niveles de concentración para metformina y en el Cuadro 22 se observa para glibenclamida.

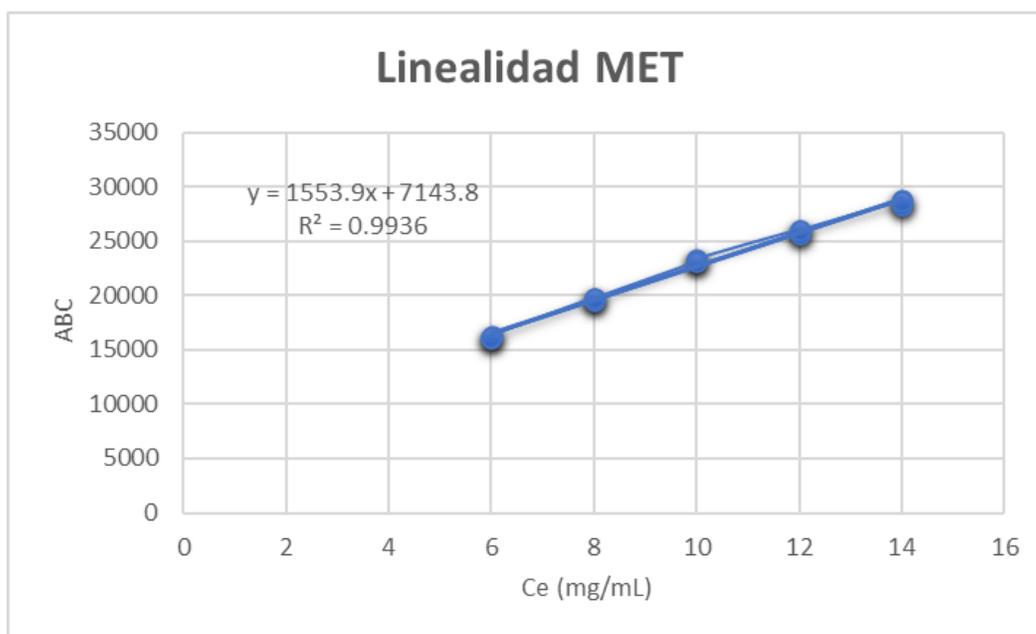
**Cuadro 21. Coeficiente de variación por nivel de linealidad del sistema para metformina.**

		ABC	MET		
		MET	$\bar{X}$	DESVEST	% CV
1er	140%	28785.70	28579.03	253.55	0.89
2da	140%	28296.10			
3ra	140%	28655.30			
1er	120%	25963.50	25861.00	235.24	0.91
2da	120%	25591.90			
3ra	120%	26027.60			
1er	100%	23361.70	23210.70	143.92	0.62
2da	100%	23195.30			
3ra	100%	23075.10			
1er	80%	19712.80	19648.267	168.72	0.86
2da	80%	19456.80			
3ra	80%	19775.20			
1er	60%	16282.10	16141.433	138.79	0.86
2da	60%	16004.60			
3ra	60%	16137.60			

**Cuadro 22. Coeficiente de variación por nivel de linealidad del sistema para glibenclamida.**

		ABC	GLI		
		GLI	$\bar{X}$	DESVEST	%CV
1er	140%	615.00	602.00	13.87	2.30
2da	140%	587.40			
3ra	140%	603.60			
1er	120%	465.20	460.83	7.31	1.59
2da	120%	452.40			
3ra	120%	464.90			
1er	100%	388.70	388.70	3.60	0.93
2da	100%	392.30			
3ra	100%	385.10			
1er	80%	303.00	302.80	3.50	1.16
2da	80%	299.20			
3ra	80%	306.20			
1er	60%	223.60	222.53	1.76	0.79
2da	60%	223.50			
3ra	60%	220.50			

La curva obtenida de graficar la concentración en cada nivel contra las ABC para metformina se puede observar en la Figura 18.



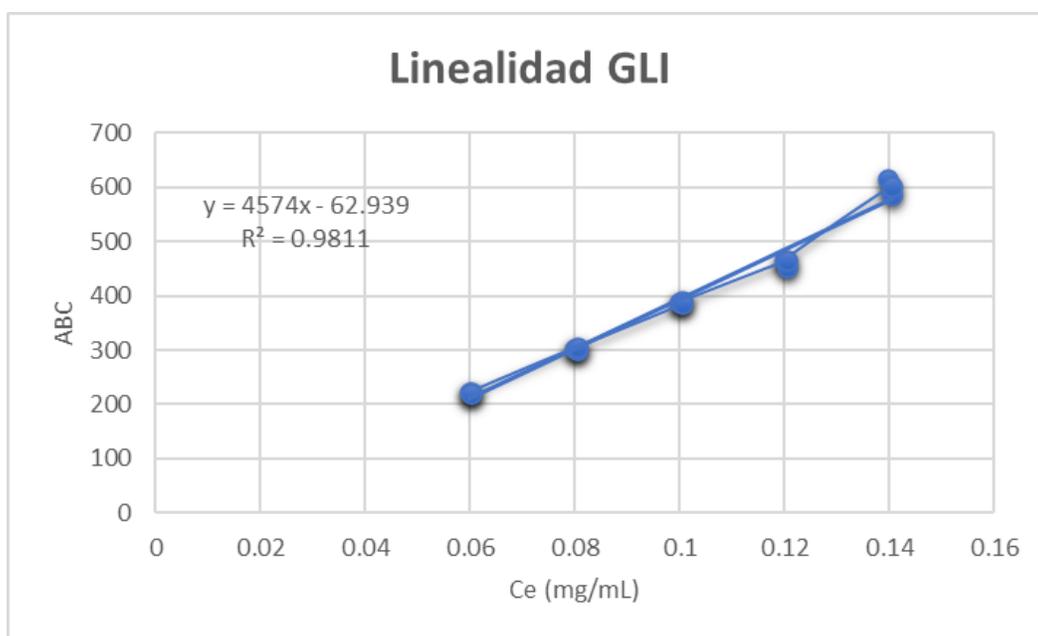
**Figura 18. Gráfico de linealidad del sistema para MET.**

En el Cuadro 23 se observa el intervalo de confianza dentro del cual se puede encontrar el valor de la pendiente para metformina.

**Cuadro 23. Intervalo de confianza para la pendiente.**

	MET	
	Superior	Inferior
IC( $\beta_1$ )	1628.4334	1479.4569

En la Figura 19 se observa la curva obtenida de graficar la concentración de las muestras contra las ABC de glibenclamida.



**Figura 19. Gráfico de linealidad del sistema para GLI.**

En el Cuadro 24 se observa el intervalo de confianza dentro del cual se puede encontrar el valor de la pendiente glibenclamida.

**Cuadro 24. Intervalo de confianza para la pendiente.**

	GLI	
	Superior	Inferior
IC( $\beta_1$ )	4954.6209	4193.4001

Los valores de  $r^2$ , pendiente e intervalo de confianza para la pendiente se encuentran dentro de los criterios de aceptación que son los siguientes:

$$r^2 \geq 0.98$$

$$m \neq 0$$

IC( $\beta_1$ ) tiene que incluir la unidad

## 7.5 Precisión del sistema

En el Cuadro 25 se observa el coeficiente de variación calculado a partir de las ABC de 6 muestras al 100%. El CV obtenido para metformina es de 1.15%, el cual es menor a 2%, que es el criterio de aceptación y para glibenclamida es de 0.78%, menor al establecido de 3%.

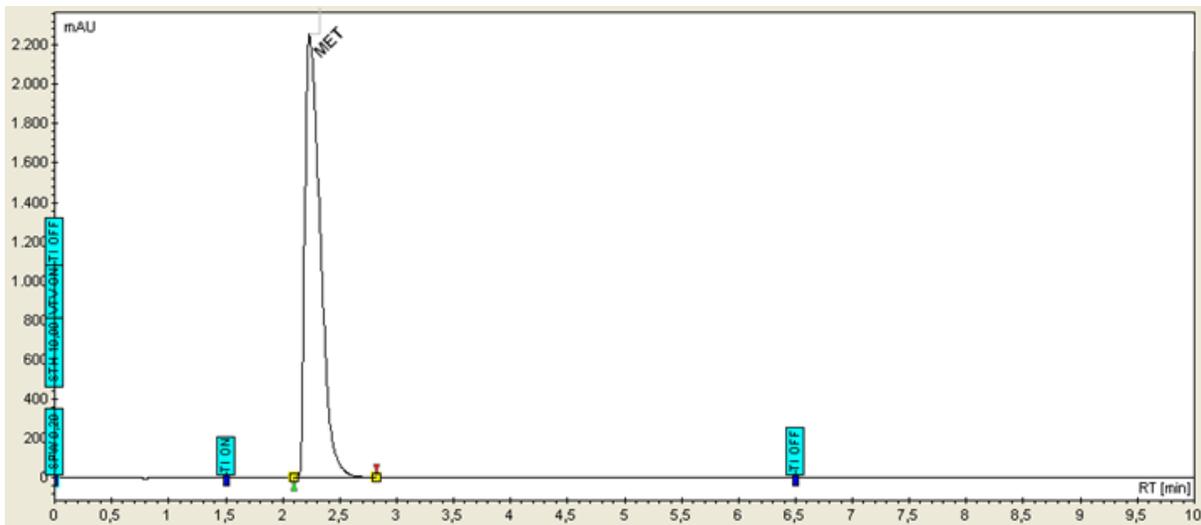
**Cuadro 25. Coeficiente de variación de 6 muestras para precisión del sistema.**

	MET	GLI
	ABC	ABC
1	23060.00	388.10
2	23182.20	393.70
3	22946.10	395.80
4	22771.10	395.30
5	22527.90	396.20
6	22578.10	395.70
$\bar{X}$	22844.23	394.13
DESVEST	263.59	3.08
% CV	1.15	0.78

## 7.6 Especificidad

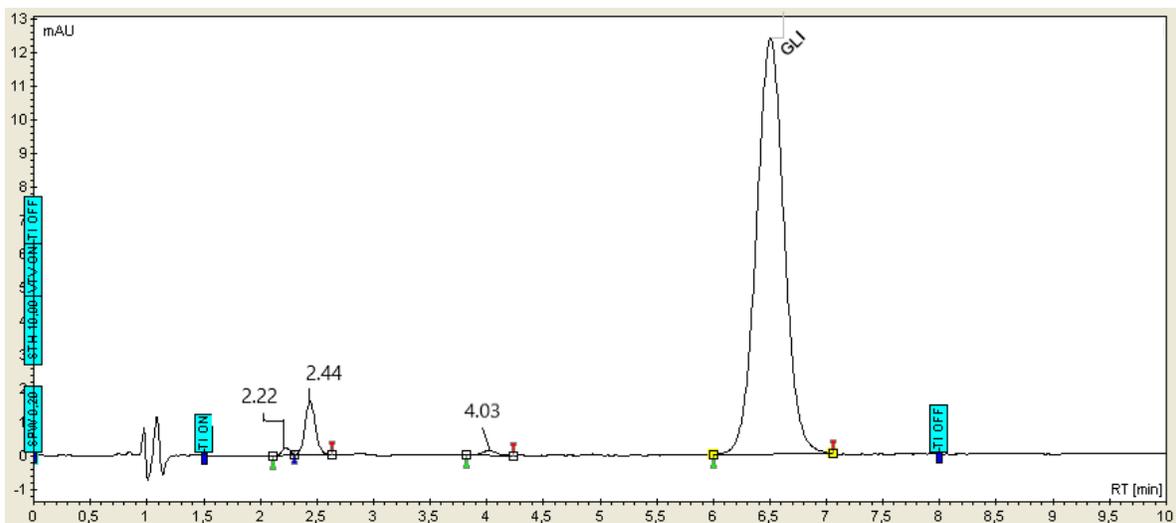
### 7.6.1 Degradación ácida

En la Figura 20 se aprecia el cromatograma correspondiente a metformina sometida a degradación ácida con HCl 0.1 M; a una concentración de 10 mg/mL.



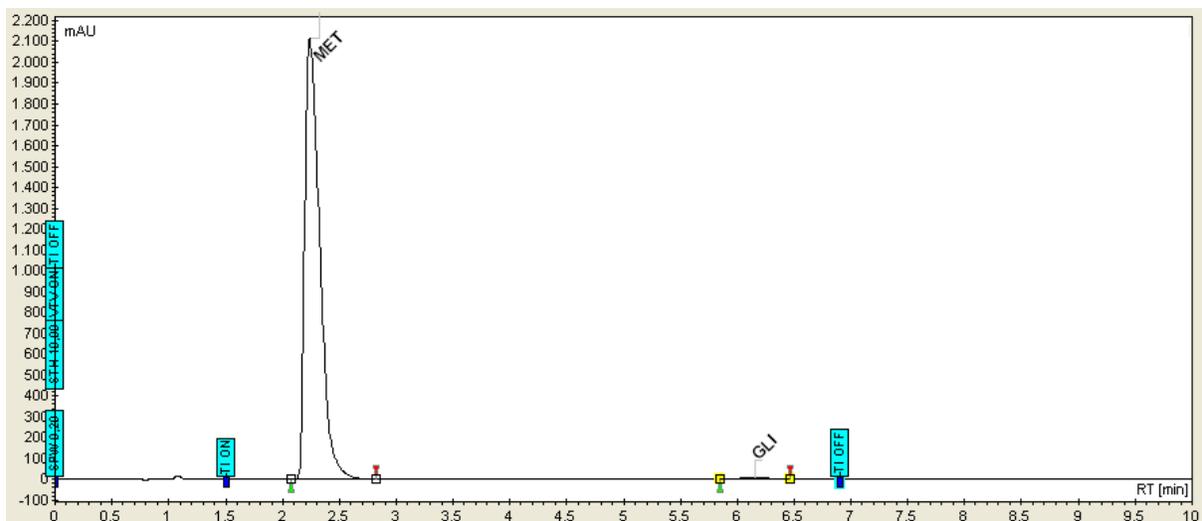
**Figura 20. Degradación ácida de MET con HCl 0.1 M.**

En la Figura 21 se aprecia el cromatograma correspondiente a glibenclamida sometida a degradación ácida con HCl 0.1 M; a una concentración de 100 µg/mL.



**Figura 21. Degradación ácida de GLI con HCl 0.1 M.**

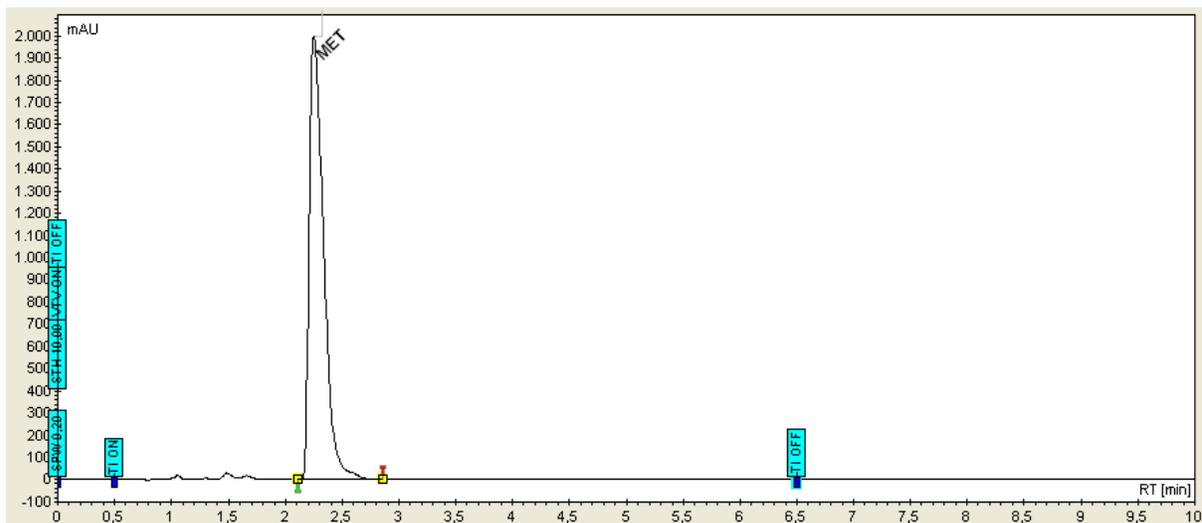
En la Figura 22 se aprecia el cromatograma correspondiente a producto terminado sometido a degradación ácida con HCl 0.1 M; con una concentración de 10 mg/mL para metformina y 100 µg/mL para glibenclamida.



**Figura 22. Degradación ácida de producto terminado con HCl 0.1 M.**

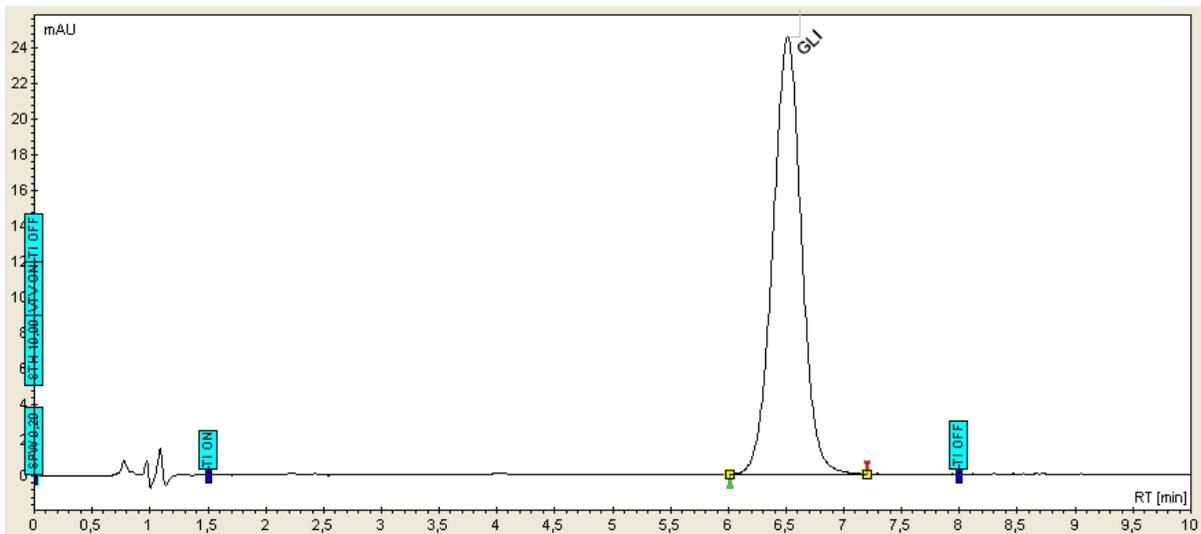
### 7.6.2 Degradación alcalina

En la Figura 23 se aprecia el cromatograma correspondiente a metformina sometida a degradación alcalina con NaOH 0.1 N; a una concentración de 10 mg/mL.



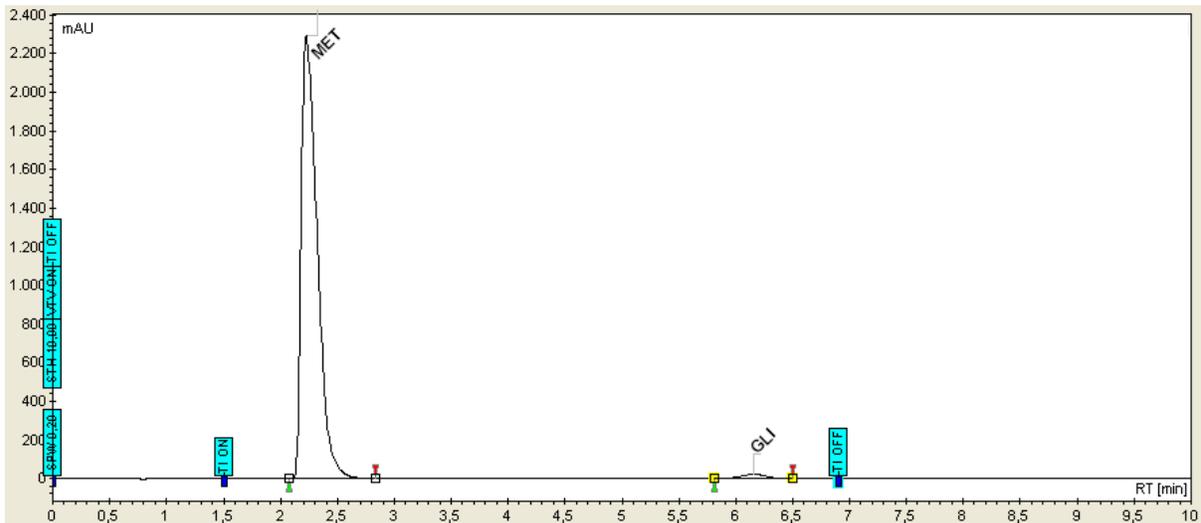
**Figura 23. Degradación alcalina de MET con NaOH 0.1 N.**

En la Figura 24 se aprecia el cromatograma correspondiente a glibenclamida sometida a degradación alcalina con NaOH 0.1 N: a una concentración de 100 µg/mL.



**Figura 24. Degradación alcalina de GLI con NaOH 0.1 N.**

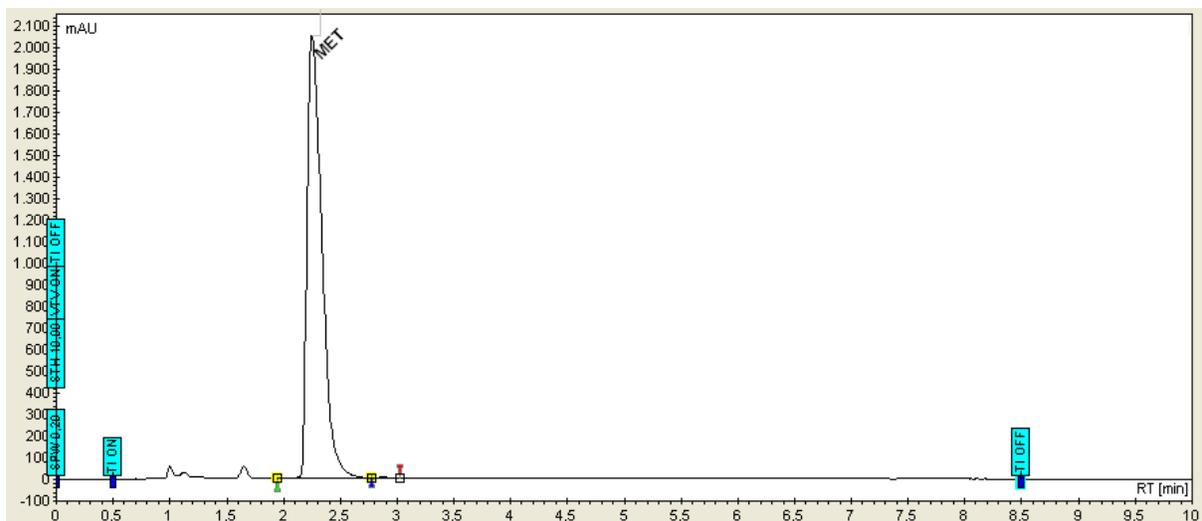
En la Figura 25 se aprecia el cromatograma correspondiente a producto terminado sometido a degradación alcalina con NaOH 0.1 N; con una concentración de 10 mg/mL para metformina y 100 µg/mL para glibenclamida.



**Figura 25. Degradación alcalina de producto terminado con NaOH 0.1 N.**

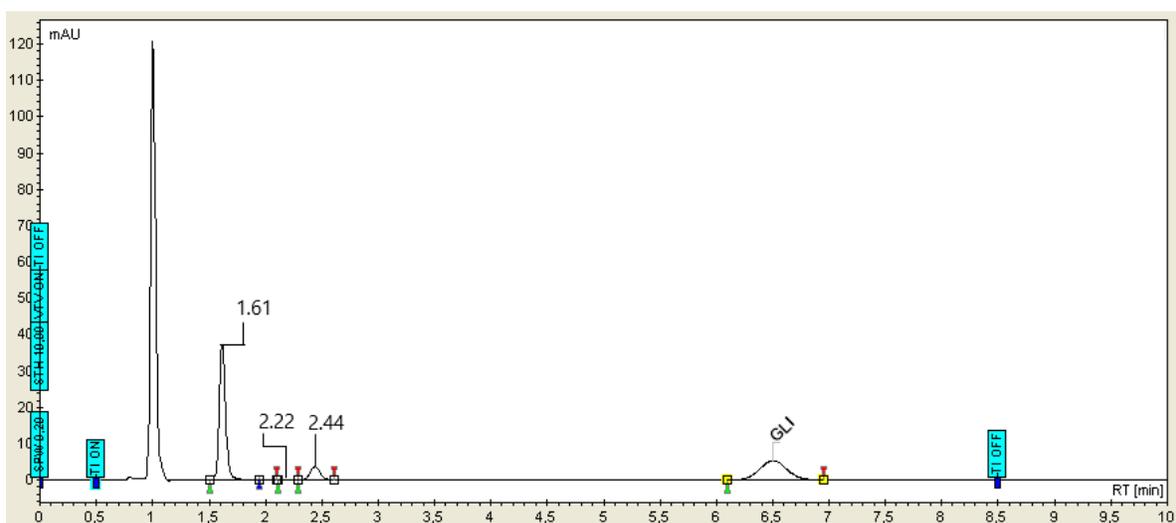
### 7.6.3 Degradación oxidativa

En la Figura 26 se aprecia el cromatograma correspondiente a metformina sometida a degradación oxidativa con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2.5%; a una concentración de 10 mg/mL.



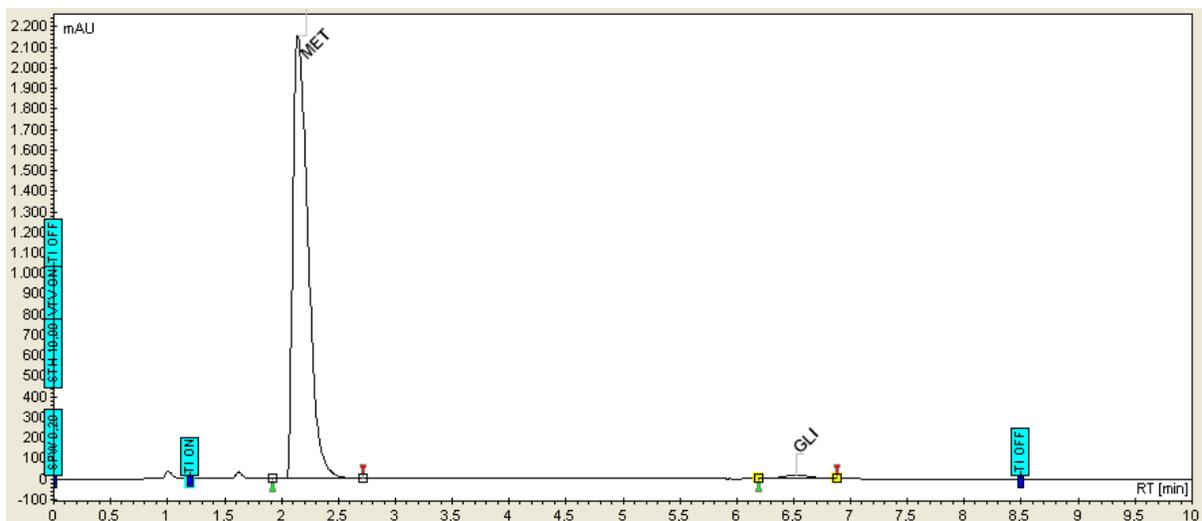
**Figura 26. Degradación oxidativa de MET con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2.5%.**

En la Figura 27 se aprecia el cromatograma correspondiente a glibenclamida sometida a degradación oxidativa con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2.5%; a una concentración de 100 µg/mL.



**Figura 27. Degradación oxidativa de GLI con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2.5%.**

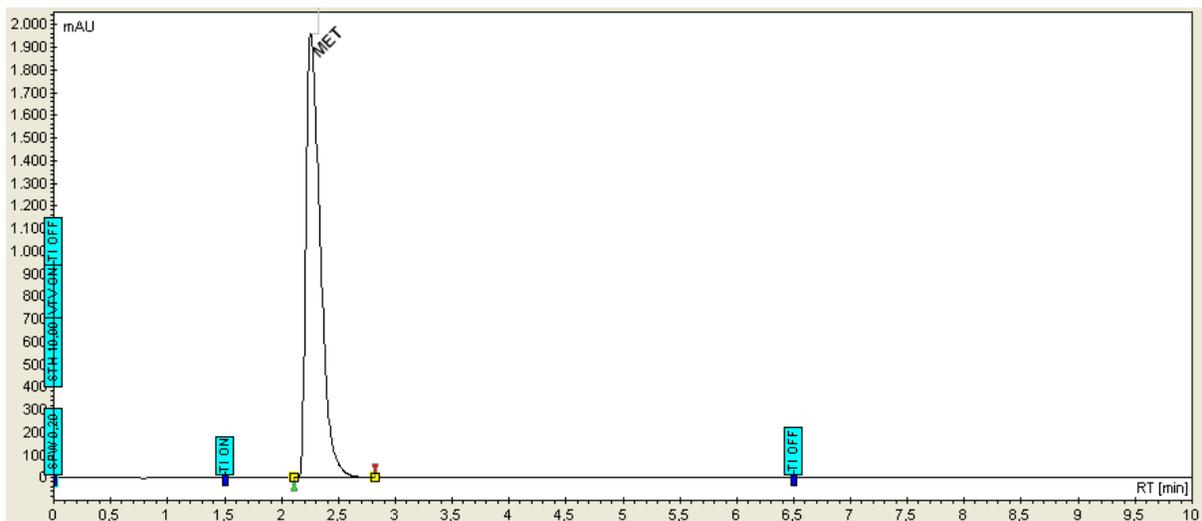
En la Figura 28 se aprecia el cromatograma correspondiente a producto terminado sometido a degradación oxidativa con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2.5%; con una concentración de 10 mg/mL para metformina y 100 µg/mL para glibenclamida.



**Figura 28. Degradación oxidativa de producto terminado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2.5%.**

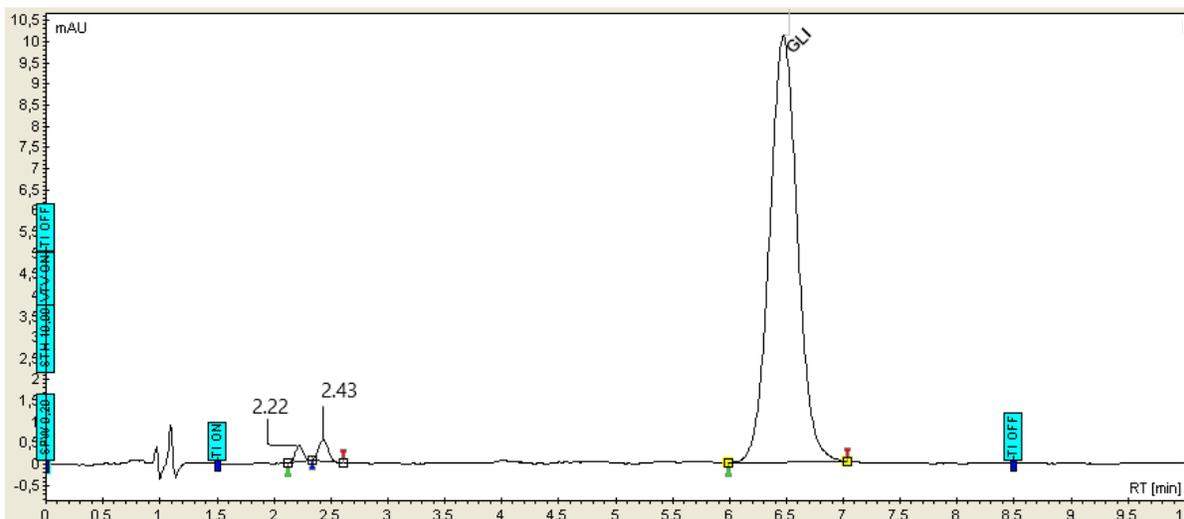
#### 7.6.4 Degradación térmica

En la Figura 29 se aprecia el cromatograma correspondiente a metformina sometida a degradación térmica a 40°C; a una concentración de 10 mg/mL.



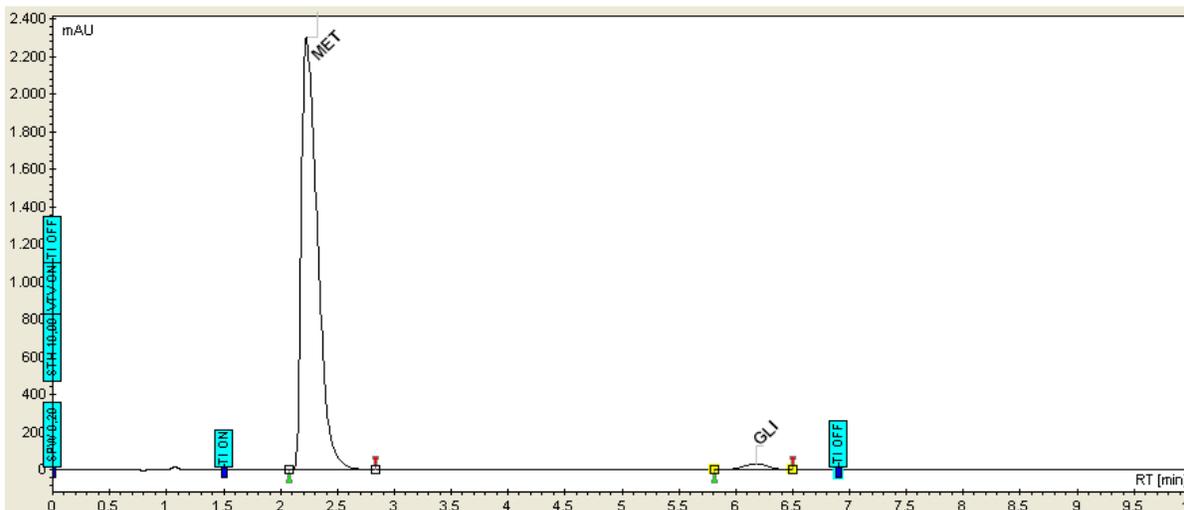
**Figura 29. Degradación térmica de MET a 40°C.**

En la Figura 30 se aprecia el cromatograma correspondiente a glibenclamida sometida a degradación térmica a 40°C; a una concentración de 100 µg/mL.



**Figura 30. Degradación térmica de GLI a 40°C.**

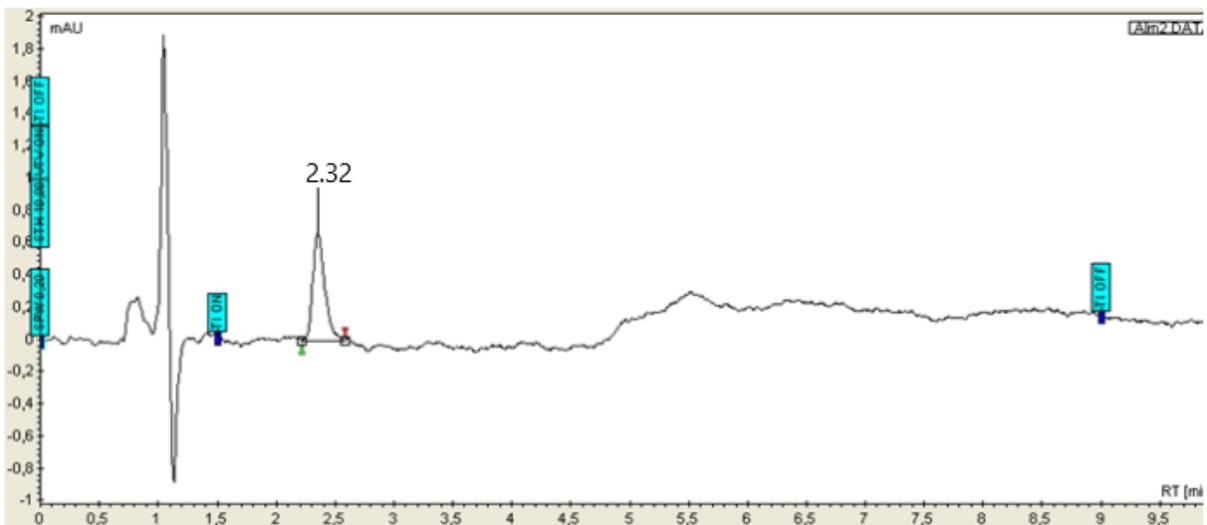
En la Figura 31 se aprecia el cromatograma correspondiente a producto terminado sometido a degradación térmica a 40°C; con una concentración de 10 mg/mL para metformina y 100 µg/mL para glibenclamida.



**Figura 31. Degradación térmica de producto terminado a 40°C.**

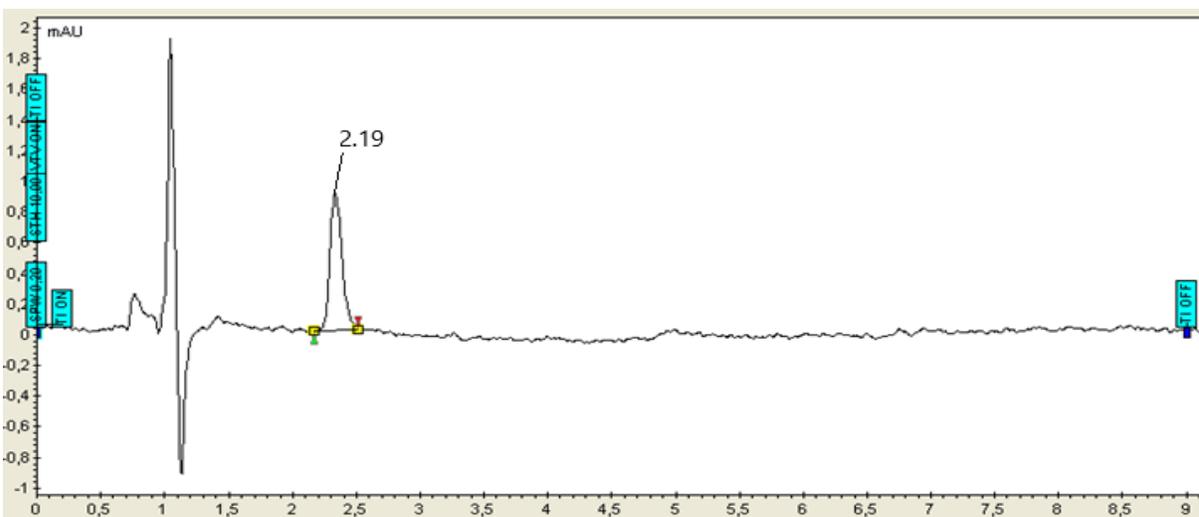
### 7.6.5 Interferencia con los excipientes

En la Figura 32 se aprecia el cromatograma correspondiente al almidón usado como excipiente para el placebo.



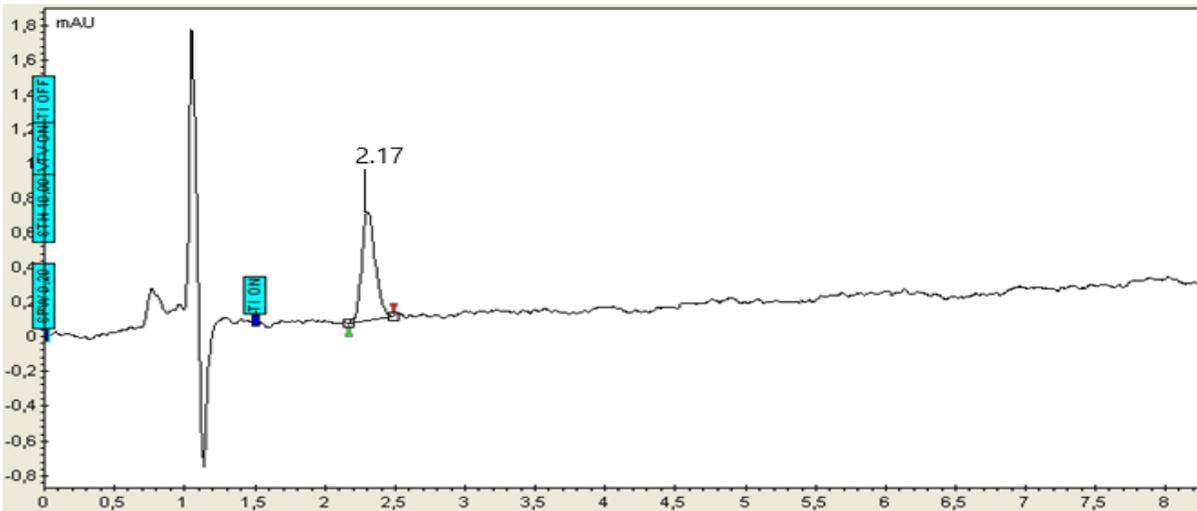
**Figura 32. Cromatograma de almidón.**

En la Figura 33 se aprecia el cromatograma correspondiente al polyplasdone usado como excipiente para el placebo.



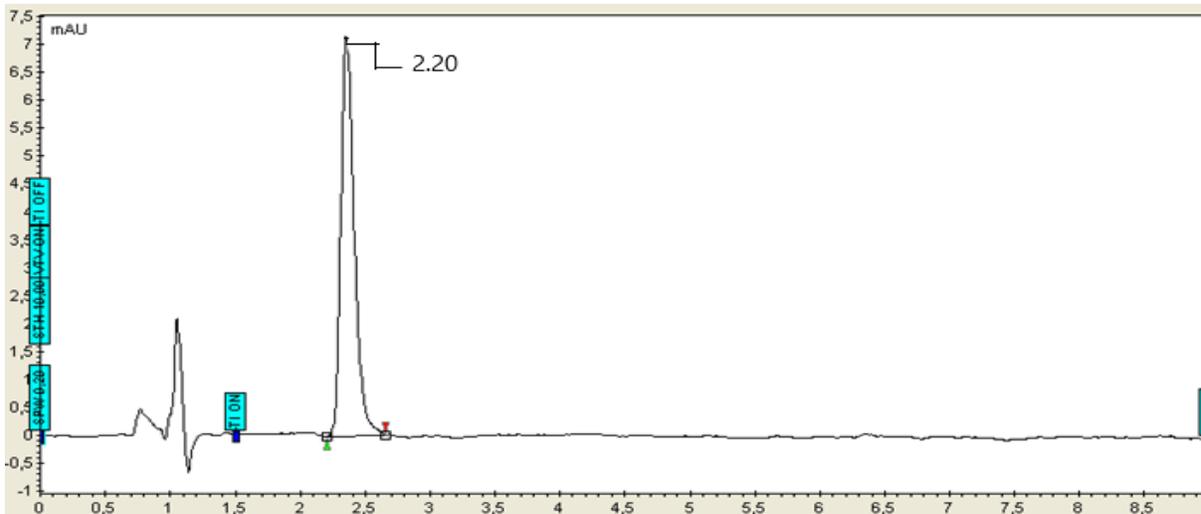
**Figura 33. Cromatograma de polyplasdone.**

En la Figura 34 se aprecia el cromatograma correspondiente a la celulosa microcristalina usado como excipiente para el placebo.



**Figura 34. Cromatograma de celulosa microcristalina.**

En la Figura 35 se aprecia el cromatograma correspondiente a todos los excipientes juntos que serían usados como placebo.



**Figura 35. Cromatograma de placebo.**

En la Figura 36 se aprecia el cromatograma correspondiente al placebo con los analitos, metformina y glibenclamida.

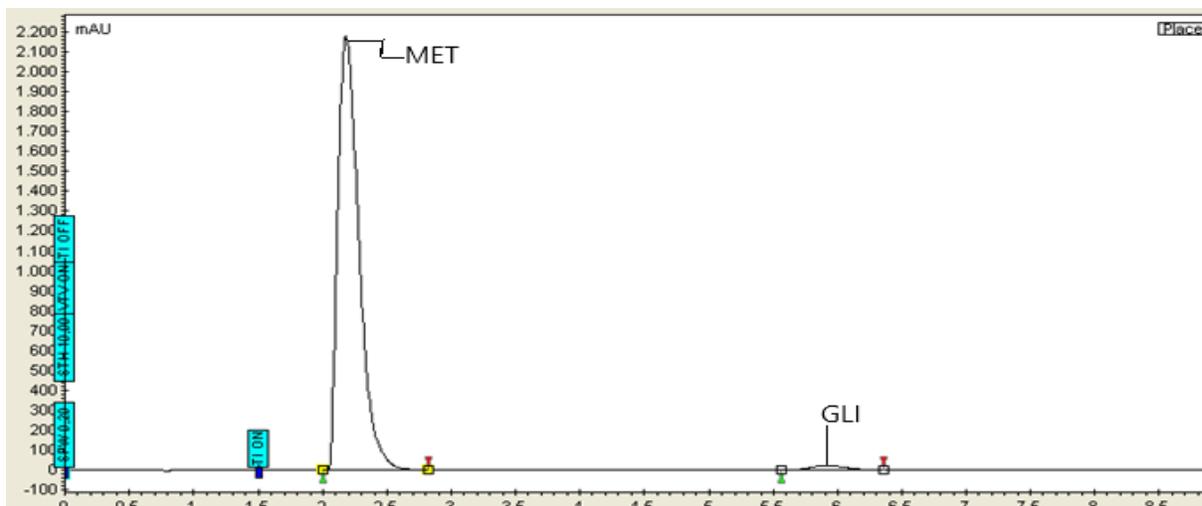


Figura 36. Cromatograma de placebo cargado.

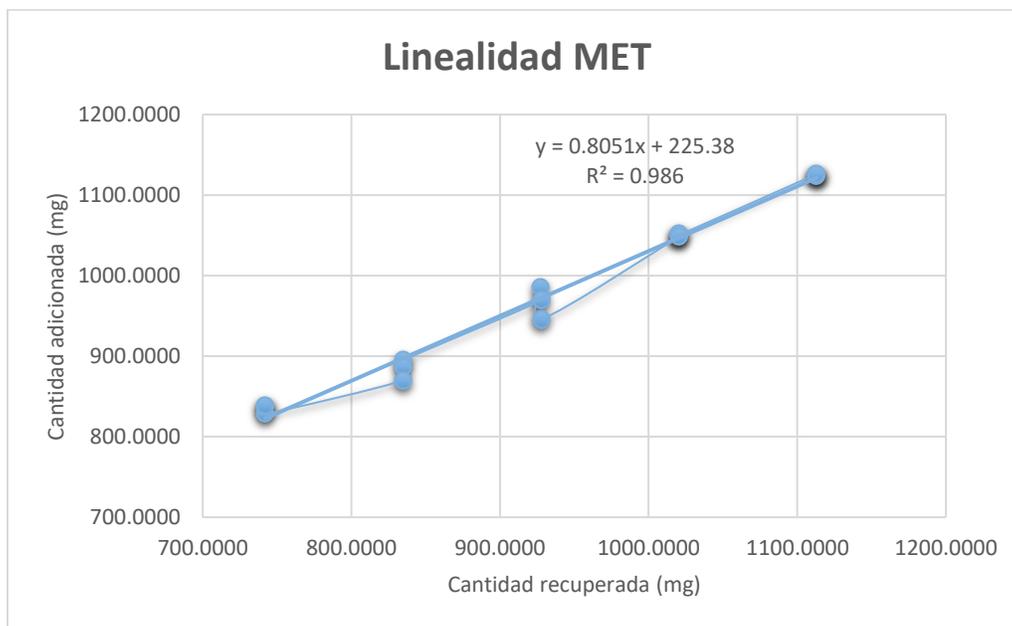
### 7.7 Linealidad del método

En el Cuadro 26 se observa el porcentaje de recobro de cada muestra de su respectivo nivel de concentración, así como el coeficiente de variación total y por nivel para metformina.

**Cuadro 26. Coeficiente de variación de porcentaje de recobro y ABC por nivel de MET.**

Resultados MET								
		ABC	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	% de Recobro	DESVEST	$\bar{x}$ de Recobro	% CV
1er	120%	24603.3	1113.09275	1123.97355	100.97753			
2da	120%	24621.5	1113.09275	1124.80499	101.05223	0.09813	101.06727	0.09709
3ra	120%	24650.9	1113.10203	1126.14810	101.17205			
1er	110%	22991.6	1020.4355	1050.34488	102.93104			
2da	110%	23040.7	1020.38913	1052.58796	103.15554	0.19860	102.94870	0.19292
3ra	110%	22951.2	1020.34275	1048.49925	102.75951			
1er	100%	20697.8	927.6113	945.55526	101.93443			
2da	100%	21571.8	927.59275	985.48295	106.24091	2.16669	104.22683	2.07882
3ra	100%	21220	927.62058	969.41137	104.50516			
1er	90%	19586.4	834.84275	894.78222	107.17973			
2da	90%	19406.1	834.75	886.54543	106.20490	1.51744	105.86265	1.43341
3ra	90%	19042.9	834.8613	869.95305	104.20330			
1er	80%	18133.7	742.00928	828.41729	111.64514			
2da	80%	18334.3	742.09275	837.58147	112.86749	0.75492	112.51216	0.67097
3ra	80%	18359.7	742.09275	838.74184	113.02386			
				X	105.32352			
				DESVEST	4.19190			
				% CV	3.98002			

En la Figura 37 se muestra el gráfico correspondiente a la curva obtenida de graficar la cantidad recuperada contra la cantidad adicionada de metformina.



**Figura 37. Gráfico de linealidad del método para MET.**

En el Cuadro 27 se observa el intervalo de confianza dentro del cual se puede encontrar el valor de la pendiente metformina en la linealidad del método.

**Cuadro 27. Intervalo de confianza para la pendiente.**

	MET	
	Superior	Inferior
IC( $\beta_1$ )	0.86248	0.74773

Los criterios de aceptación que debió cumplir son:

$$r^2 \geq 0.98$$

$$m \neq 0$$

$$b = 0$$

IC( $\beta_1$ ) tiene que incluir la unidad

CV de % de Recobro  $\leq$  2% para metformina

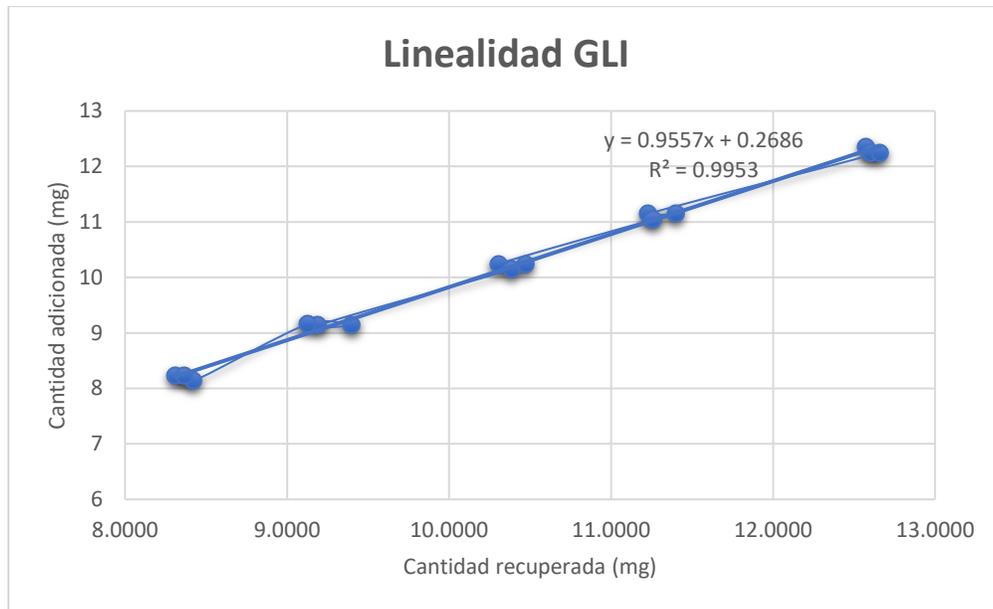
Sin embargo, el %CV del porcentaje de recobro no cumple pues es de 3.98002%.

En el Cuadro 28 se observa el porcentaje de recobro de cada muestra de su respectivo nivel de concentración, así como el coeficiente de variación total y por nivel para glibenclamida.

**Cuadro 28. Coeficiente de variación de porcentaje de recobro y ABC por nivel de GLI.**

		Resultados GLI						
		ABC	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	% de Recobro	DESVEST	$\bar{x}$ de Recobro	% CV
1er	120%	512.8	12.3492	12.57506	101.82895	0.78791	102.69904	0.76720
2da	120%	514	12.2488	12.60449	102.90385			
3ra	120%	516.3	12.2488	12.66089	103.36432			
1er	110%	457.9	11.1444	11.22878	100.75718	0.80997	101.67216	0.79665
2da	110%	464.9	11.1444	11.40044	102.29748			
3ra	110%	459.2	11.044	11.26066	101.96181			
1er	100%	420.2	10.2408	10.30429	100.61998	0.99746	101.76882	0.98012
2da	100%	427.1	10.2408	10.47350	102.27224			
3ra	100%	423.5	10.1404	10.38521	102.41425			
1er	90%	374.8	9.1364	9.19098	100.59735	1.65816	101.04326	1.64104
2da	90%	383.3	9.1364	9.39942	102.87877			
3ra	90%	372.1	9.15648	9.12477	99.65364			
1er	80%	343.3	8.1324	8.41852	103.51830	1.33254	102.03132	1.30601
2da	80%	338.9	8.2328	8.31062	100.94529			
3ra	80%	341.2	8.2328	8.36703	101.63037			
					$\bar{x}$	101.84292		
					DESVEST	1.13142		
					% CV	1.11094		

En la Figura 38 se muestra el gráfico correspondiente a la curva obtenida de graficar la cantidad recuperada contra la cantidad adicionada de glibenclamida.



**Figura 38. Gráfico de linealidad del método para GLI.**

En el Cuadro 29 se observa el intervalo de confianza dentro del cual se puede encontrar el valor de la pendiente glibenclamida en la linealidad del método.

**Cuadro 29. Intervalo de confianza para la pendiente.**

	GLI	
	Superior	Inferior
IC( $\beta_1$ )	0.99520	-5884.1166

Los criterios de aceptación que debió cumplir fueron los siguientes:

$$r^2 \geq 0.98$$

$$m \neq 0$$

$$b = 0$$

IC( $\beta_1$ ) tiene que incluir la unidad

CV% de Recobro  $\leq$  3% para glibenclamida

Contrario a metformina, glibenclamida si cumple con todos los criterios.

## 7.8 Exactitud del método

En el siguiente Cuadro 30 se muestra el coeficiente de variación del porcentaje de recobro de 6 muestras al 100% de la concentración de materia prima de metformina y glibenclamida.

**Cuadro 30. Coeficiente de variación del porcentaje de recobro de 6 muestras para exactitud del método.**

	MET	GLI	MET	GLI	MET	GLI	MET	GLI	
	ABC	ABC	Cantidad adicionada (mg)	Cantidad recuperada (mg)	% Recobro				
1	21831.20	404.10	1000.20	10.20	1009.5500	10.1853	100.93482	99.8564	
2	21767.00	393.50	1000.30	10.00	1006.5812	9.9182	100.62793	99.1818	
3	21602.40	405.00	1000.20	10.20	998.9695	10.2080	99.876979	100.0788	
4	21602.80	412.20	1000.20	10.35	998.9880	10.3895	99.878828	100.3817	
5	22015.50	417.40	1000.30	10.50	1018.0727	10.5206	101.77674	100.1960	
6	22007.80	407.60	1000.30	10.20	1017.7166	10.2736	101.74114	100.7212	
							$\bar{X}$	100.8061	100.0693
							DESVEST	0.8471	0.5238
							% CV	0.8403	0.5234

El CV de metformina es menor al 2% y el de glibenclamida menor al 3%, que son los criterios aceptables para este parámetro.

## 7.9 Precisión intermedia

En el Cuadro 31 se observa el coeficiente de variación de muestras al 100% de concentración preparadas por 2 analistas en 2 días diferentes para metformina.

**Cuadro 31. Coeficiente de variación del porcentaje de recobro para metformina.**

		MET					
		Analista					
		1	2				
	Muestra	ABC		Cant Recuperada (mg)		%Recobro	
Día 1	1	22506.7	22805.3	1017.7332	1031.2356	101.7733	103.1236
	2	22711.4	22601.6	1026.9896	1022.0245	102.6990	102.2024
	3	22457.2	22911.4	1015.4948	1036.0334	101.5495	103.6033
Día 2	1	21903.6	22336.3	1004.1411	1023.9777	100.4141	102.3978
	2	22559.8	22425.1	1034.2237	1028.0486	103.4224	102.8049
	3	22455.7	22325.8	1029.4514	1023.4963	102.9451	102.3496
						X	102.4404
						DESVEST	0.8867
						% CV	0.8656

El CV resultante de 0.8656% es aceptable ya que según el criterio de aceptación este debía ser  $\leq 2\%$ .

En el Cuadro 32 se observa el coeficiente de variación de muestras al 100% de concentración preparadas por 2 analistas en 2 días diferentes para glibenclamida.

**Cuadro 32. Coeficiente de variación del porcentaje de recobro para glibenclamida.**

		GLI					
		Analista					
		1	2				
	Muestra	ABC		Cant Recuperada (mg)		%Recobro	
Día 1	1	359.9	364.0	10.1770	10.2929	101.7696	102.9290
	2	367.4	364.5	10.3890	10.3070	103.8904	103.0704
	3	365.6	369.1	10.3381	10.4371	103.3814	104.3711
Día 2	1	384.5	388.7	9.8206	9.9278	98.2056	99.2783
	2	387.3	384.4	9.8921	9.8180	98.9207	98.1800
	3	378.6	394.8	9.6699	10.0836	96.6986	100.8363
						X	100.9610
						DESVEST	2.6207
						% CV	2.5958

El CV resultante de 2.5958% es aceptable ya que según el criterio de aceptación este debía ser  $\leq 3\%$ .

### 7.10 Estabilidad de la muestra

En el Cuadro 33 se observa el coeficiente de variación de las ABC resultantes de inyectar por triplicado una solución al 100% de concentración el mismo día que se llevó a cabo su preparación.

**Cuadro 33. Coeficiente de variación del porcentaje de recobro de la muestra al tiempo cero.**

Día 1						
Inyección	ABC		Cantidad Recuperada (mg)		% Recobro	
	MET	GLI	MET	GLI	MET	GLI
1	21799.6	385.9	999.37338	10.09439	99.93734	100.94389
2	22398.2	381.8	1026.81539	9.98714	102.68154	99.87141
3	21822.4	376.1	1000.41861	9.83804	100.04186	98.38040
			$\bar{X}$		100.88691	99.73190
			DESVEST		1.55507	1.2874
			% CV		1.54140	1.29089

En el Cuadro 34 se muestra el coeficiente de variación de la misma solución del Cuadro 33 inyectada por triplicado 24 h después.

**Cuadro 34. Coeficiente de variación del porcentaje de recobro de la muestra a las 24 h.**

Día 2						
Inyección	ABC		Cantidad Recuperada (mg)		% Recobro	
	MET	GLI	MET	GLI	MET	GLI
1	21860.2	394.3	998.55832	9.76490	99.85583	97.64896
2	21905.2	395.4	1000.61389	9.79214	100.06139	97.92138
3	21846.9	396.2	997.95079	9.81195	99.79508	98.11950
			$\bar{X}$		99.90410	97.89662
			DESVEST		0.13956	0.23624
			% CV		0.13970	0.24132

En el Cuadro 35 se muestra el coeficiente de variación de la misma solución del Cuadro 33 inyectada por triplicado pasadas 48 h.

**Cuadro 35. Coeficiente de variación del porcentaje de recobro de la muestra a las 48 h.**

Inyección	Día 3					
	ABC		Cantidad Recuperada (mg)		% Recobro	
	MET	GLI	MET	GLI	MET	GLI
1	21585	390.3	971.55426	9.88333	97.15543	98.83332
2	21795.2	388.3	981.01550	9.83269	98.10155	98.32687
3	22163.6	390.8	997.59741	9.89599	99.75974	98.95993
				$\bar{X}$	98.33891	98.70671
				DESVEST	1.31828	0.33498
				% CV	1.3405	0.3394

A continuación, en el Cuadro 36 se observa la diferencia de los coeficientes de variación del Cuadro 34 con respecto a los coeficientes del tiempo cero (Cuadro 33).

**Cuadro 36. Diferencia de la media de porcentaje de recobro del día 2 con respecto al día 1.**

	MET	GLI
Diferencia	0.98281	1.83528

A continuación, en el Cuadro 37 se observa la diferencia de los coeficientes de variación del Cuadro 34 con respecto a los coeficientes del tiempo cero (Cuadro 33).

**Cuadro 37. Diferencia de la media de porcentaje de recobro del día 3 con respecto al día 1.**

	MET	GLI
Diferencia	2.54801	1.02519

La diferencia absoluta de metformina a las 48 h excede el criterio de aceptación del 2%, mientras que la glibenclamida se mantiene dentro del criterio  $\leq 3\%$  para las 24 y 48 h.

## 7.11 Robustez

El siguiente Cuadro 38 corresponde al coeficiente de variación del porcentaje de recobro de una solución preparada disolviendo el producto terminado en fase móvil a un pH de 5.2 y corriendo la solución en el cromatógrafo con la misma fase móvil. También se muestra el tiempo de retención del pico en cada cromatograma.

**Cuadro 38. Coeficiente de variación del porcentaje de recobro con fase móvil a pH 5.2.**

pH de 5.2									
Inyección	ABC		Tr		Cantidad recuperada (mg)		% Recobro		
	MET	GLI	MET	GLI	MET	GLI	MET	GLI	
1	22033.7	384.5	2.27	6.14	1010.10538	9.83004	101.01054	98.30045	
2	21939.1	387.3	2.26	6.13	1005.76857	9.90163	100.57686	99.01629	
3	21903.6	378.6	2.23	6.13	1004.14112	9.67921	100.41411	96.79207	
							$\bar{X}$	100.66717	98.03627
							DESVEST	0.30830	1.13540
							% CV	0.30626	1.15814

En el Cuadro 39 se observa el coeficiente de variación del porcentaje de recobro con la solución preparada disolviendo el producto terminado en fase móvil con un pH de 5.1 y corriendo la solución en el cromatógrafo con la fase móvil a ese mismo pH.

**Cuadro 39. Coeficiente de variación del porcentaje de recobro con fase móvil a pH 5.1.**

pH de 5.1									
Inyección	ABC		Tr		Cantidad recuperada (mg)		% Recobro		
	MET	GLI	MET	GLI	MET	GLI	MET	GLI	
1	20973.4	394.1	1.96	5.23	1005.39541	9.67244	100.53954	96.72444	
2	21276.3	398	1.99	5.25	1019.91543	9.76816	101.99154	97.68163	
3	21145.7	394.4	1.97	5.23	1013.65490	9.67981	101.36549	96.79807	
							$\bar{X}$	101.29886	97.06805
							DESVEST	0.72829	0.53265
							% CV	0.71895	0.54874

En el Cuadro 40 se observa el coeficiente de variación del porcentaje de recobro con la solución preparada disolviendo el producto terminado en fase móvil con un

pH de 5.3 y corriendo la solución en el cromatógrafo con la fase móvil a ese mismo pH.

**Cuadro 40. Coeficiente de variación del porcentaje de recobro con fase móvil a pH 5.3.**

p H de 5.3									
Inyección	ABC		Tr		Cantidad recuperada (mg)		% Recobro		
	MET	GLI	MET	GLI	MET	GLI	MET	GLI	
1	21309.8	417.5	2.23	4.07	976.82147	10.40584	97.68215	104.05842	
2	21312.7	415.6	2.23	4.07	976.95441	10.35849	97.69544	103.58487	
3	21337.2	424.2	2.19	3.89	978.07746	10.57283	97.80775	105.72834	
							$\bar{X}$	97.72844	104.45721
							DESVEST	0.0690	1.12601
							% CV	0.0706	1.07796

El Cuadro 41 representa los datos obtenidos de la diferencia del coeficiente de variación obtenido con la muestra preparada con pH 5.1 con respecto a la preparada con el pH 5.2.

**Cuadro 41. Diferencia de la media del porcentaje de recobro de la fase móvil a pH 5.1 con respecto a la de pH 5.2.**

	MET	GLI
Diferencia	0.63169	0.96822

El Cuadro 42 presenta los datos obtenidos de la diferencia del coeficiente de variación obtenido con la muestra preparada con pH 5.3 con respecto a la preparada con el pH 5.2.

**Cuadro 42. Diferencia de la media del porcentaje de recobro de la fase móvil a pH 5.3 con respecto a la de pH 5.2.**

	MET	GLI
Diferencia	2.93872	6.42094

La diferencia absoluta de metformina con fase móvil a pH 5.3 excede el criterio de aceptación del 2%, al igual que la glibenclamida que excede el criterio de  $\leq 3\%$  para la fase móvil a pH 5.3.

## 7.12 Tolerancia

En el Cuadro 43 se muestran los datos del coeficiente de variación obtenido a partir del porcentaje de recobro de una muestra inyectada por triplicado en el cromatógrafo de líquidos marca Hitachi.

**Cuadro 43. Coeficiente de variación del porcentaje de recobro en el cromatógrafo marca HITACHI.**

Inyección	Equipo HITACHI					
	ABC		Cantidad recuperada (mg)		% Recobro	
	MET	GLI	MET	GLI	MET	GLI
1	124749105	3689410	984.5382	10.09635	98.45382	100.96354
2	124672371	3592016	983.9326	9.82983	98.39326	98.29828
3	125184842	3813263	987.9771	10.43529	98.79771	104.35288
				$\bar{X}$	98.54826	101.2049
				DESVEST	0.21814	3.03450
				% CV	0.22135	2.99838

En el Cuadro 44 se muestran los datos del coeficiente de variación obtenido a partir del porcentaje de recobro de una muestra inyectada por triplicado en el cromatógrafo de líquidos marca Varian, que es el equipo utilizado para todas las pruebas de validación.

**Cuadro 44. Coeficiente de variación del porcentaje de recobro en el cromatógrafo marca VARIAN.**

Inyección	Equipo VARIAN					
	ABC		Cantidad recuperada (mg)		% Recobro	
	MET	GLI	MET	GLI	MET	GLI
1	24021.4	438.5	1018.3041	10.27457531	101.83041	102.74575
2	23957	437.4	1015.5741	10.24880101	101.55741	102.48801
3	24031.5	436.8	1018.7323	10.23474229	101.87323	102.34742
				$\bar{X}$	101.75368	102.52706
				DESVEST	0.17132	0.20202
				% CV	0.16837	0.19704

El Cuadro 45 representa el coeficiente de variación total de los porcentajes de recobro obtenidos en ambos cromatógrafos.

**Cuadro 45. Coeficiente de variación total.**

	MET	GLI
$\bar{X}$	100.15097	101.86598
DESVEST	1.76442	2.05525
% CV Total	1.76176	2.01760

El CV debió ser  $\leq 2\%$  para metformina y  $\leq 3\%$  para glibenclamida, en ambos casos está dentro del criterio.

## 8 Análisis de resultados

### 8.1 Elección de la fase móvil

Para la elección de la fase móvil se propuso inicialmente el uso de par iónico, siendo el 1-octanosulfonato de sodio el que proporciona esta interacción con la metformina, para de esta manera retener por más tiempo el analito en la columna. Como se observa en la Figura 13 y Figura 14 la metformina sale al frente con los disolventes, mientras que la glibenclamida sale alrededor del minuto 9. Descartando el uso de esta fase móvil.

En la Figura 15 se observa el cromatograma obtenido para metformina, teniendo un tiempo de retención de 1.54 min, mientras que en la Figura 16 se observa en el minuto 11.91 el pico perteneciente a la glibenclamida. En estos cromatogramas se cambió la concentración para el 1-octanosulfonato de sodio, pasando de 5 mM a 10 mM lo que ocasiona que no solo la metformina se retuviera por más tiempo, si no que la glibenclamida también se retuviera por más tiempo, ocasionando una corrida con mayor tiempo.

El efecto del 1-octanosulfonato de sodio es la adsorción de la cadena alquílica lipofílica en la columna o fase estacionaria, haciendo que los grupos de cabeza polar del reactivo actúan como un pseudointercambiador de iones para los iones de la metformina. Siendo la cadena del 1-octanosulfonato de sodio corta, no se adapta a los requerimientos de retención y la concentración es demasiado alta.

Todos los cromatogramas se corrieron con un volumen de inyección de 20  $\mu$ L y con una velocidad de flujo de 2 mL/min. La columna seleccionada fue Luna C18(2) 5 $\mu$ m 150x4.6 mm se seleccionó esta columna debido a que ofrece una interacción

hidrofóbica con los analitos. La longitud de onda se seleccionó por referencia bibliográfica (254 nm).

## **8.2 Optimización del método**

Para obtener mejores tiempos de corrida y priorizando la separación de metformina de los disolventes, se empleó otro reactivo que al igual que el 1-octanosulfonato de sodio, nos proporciona un par iónico, el reactivo en uso fue el lauril sulfato de sodio en una concentración de 5 mM; de igual forma se empleó el reactivo fosfato de amonio monobásico en una concentración de 40 mM. La proporción de la fase móvil se modificó obteniendo una mayor proporción en la fase orgánica, para que de esta forma se obtuviera una mayor fuerza eluotrópica, obteniendo así una proporción de 40% para la parte acuosa y 60% para la parte orgánica. La columna se cambió ya que en los cromatogramas las señales de los analitos se veían afectadas debido a la saturación de la columna por las distintas pruebas realizadas para el desarrollo del método, seleccionando una columna Luna Omega® PS C18 5µm 150x4.6 mm para la validación del método. La velocidad del flujo se redujo a 1.5 mL/min, y la longitud de onda se mantuvo a 254 nm. En la Figura 17 se observa el cromatograma para una muestra cargada con los 2 analitos, obteniendo una buena resolución entre ellos, y un mejor tiempo de corrida. Esto se puede explicar debido a que la interacción electrostática generada por el lauril sulfato de sodio conduce a una aparente disminución de la carga en la superficie de la fase estacionaria.

### **8.3 Adecuabilidad del sistema**

Se descartó interferencia en el uso del sistema cromatográfico como lo muestra el Cuadro 20 obteniendo CV de respuesta de 0.41966% y 0.57321%, para metformina y glibenclamida respectivamente. En el mismo cuadro se observa una resolución (R) promedio de 12.71. Los valores obtenidos de CV cumplen con los criterios de aceptación establecidos; estos resultados nos indican que el sistema de inyección y medición opera de manera eficiente y da certeza en los resultados del método analítico.

### **8.4 Linealidad del sistema**

La evaluación de 3 curvas con 5 puntos, realizadas por 3 soluciones patrón, nos dan como resultado una  $r^2$  de 0.9936 para metformina (Figura 18) y  $r^2$  de 0.9811 (Figura 19) para glibenclamida, encontrándose una relación lineal significativa entre la cantidad de analito adicionado y la respuesta generada por el sistema cromatográfico, descartando la posibilidad de que exista un comportamiento no lineal en los resultados. Demostrado a través del cálculo de intervalos de confianza para la pendiente ( $\beta_1$ ) y una pendiente diferente a 0 (Cuadro 23 y 24).

### **8.5 Precisión del sistema**

Se evaluó la concordancia de resultados obtenidos por medio de muestras preparadas a partir de la misma solución patrón, obteniendo CV de 1.15385% para metformina y 0.78164% para glibenclamida (Cuadro 25), de los cuales ambos cumplen con los criterios de aceptación propuestos, por lo que el sistema es preciso.

## 8.6 Especificidad

La Figura 20 nos muestra que no existe ninguna señal diferente a la de metformina; mientras que para la glibenclamida se observan señales emitidas en los minutos 2.22, 2.44 y 4.03 (Figura 21). Las señales con tiempos de retención 2.22 y 2.44 representan menos del 1% de respuesta, con respecto a la respuesta total de la metformina, por lo tanto, no interfieren en la identificación de los picos de interés, y la señal con tiempo de retención 4.03 no interfiere en lo mínimo ya que ningún analito de interés tiene un tiempo de retención cercano a esta señal. Para el producto terminado (Figura 22) se observa que no existe ninguna señal diferente a las de interés, por lo que, para degradación ácida no existen interferencias en las señales de los analitos de interés.

Por otra parte, en la Figura 23 observamos que la metformina se mantiene sin ninguna señal diferente al analito de interés, se observa un ligero coleo extraño al que comúnmente se observa por el uso de par iónico, posiblemente se deba a la limpieza de la columna al momento de realizar la corrida de las muestras. Para la glibenclamida (Figura 24), de la misma forma que para metformina no se observan señales diferentes a las de interés. En el producto terminado (Figura 25) se puede observar que no hay ninguna señal que interfiera con las señales de los analitos de interés.

En la degradación oxidativa para metformina (Figura 26) no se aprecia la aparición de nuevos picos. En el cromatograma de glibenclamida (Figura 27) se observan 2 señales en los minutos 2.22 y 2.44; siendo la señal del minuto 1.61 la única nueva, esta señal no representa alguna interferencia ya que la metformina tiene un tiempo de retención de 2.1 aproximadamente y no entorpece la identificación. Para el

producto terminado se observa (Figura 28) la señal que se observa en la Figura 27 en el minuto 1.61, la cual no interfiere en la identificación de las señales de interés.

Para la degradación térmica no se observan señales nuevas emitidas en el cromatograma para metformina (Figura 29); el cromatograma de glibenclamida (Figura 30) muestra las señales identificadas como 2.22 y 2.43, que son sus tiempos de retención. Mientras que en el producto terminado (Figura 31), no se ven nuevas señales emitidas por la degradación térmica.

Al no conocer la formulación exacta del producto terminado, se propuso realizar un placebo conformado por almidón, polyplasdone y celulosa microcristalina. En la Figura 32 corresponde al cromatograma de almidón, se observa una nueva señal emitida aproximadamente a los 2.32 min, en la Figura 33 se observa esta misma señal, pero a los 2.19 min, así mismo en la Figura 34 se observa esta a los 2.17 y la Figura 35 correspondiente a la mezcla de excipientes propuestos se observa la señal a los 2.20 min. Esta señal no representa más del 1% del total de señal emitida por metformina, por lo que se descarta la interferencia con la identificación del analito de interés. Y, además de que se sospecha no sea una señal propia de los excipientes, si no alguna impureza propia del uso del par iónico que estuviese fuertemente adherida a la columna; se elimina la interferencia de excipientes con las señales de interés, ya que en la Figura 36 se observa a una muestra cargada con los excipientes y no existe señal alguna diferente a la de los analitos de interés.

## 8.7 Linealidad del método

Este parámetro se evaluó realizando 3 curvas con 5 niveles de concentración para cada analito. En la Figura 37 se muestra la curva de linealidad para metformina cuya  $r^2$  es de 0.986 y está dentro del criterio de que sea mayor o igual a 0.98, sin embargo, en el Cuadro 26 se observa el CV de los porcentajes de recobro para metformina, el cual está fuera del criterio establecido ( $\leq 2\%$ ), pues los valores del porcentaje de recobro aumentan conforme disminuye el nivel de concentración, esto debido a problemas de saturación en las soluciones con mayor cantidad de materia prima, al disminuir la cantidad de materia prima pesada para los niveles más bajos había mejor solubilidad y por ende aumentaba la cantidad recuperada. Por lo tanto, el método no es lineal para metformina pues los resultados no son directamente proporcionales a la cantidad del analito en la muestra.

En el caso de la glibenclamida, la Figura 38 muestra la curva de linealidad y el resultado de  $r^2$  que es de 0.9953, y el valor establecido indica, de igual manera que con la metformina, que debe ser mayor o igual a 0.98, por lo que el método para glibenclamida es lineal. Aunado a esto, en el Cuadro 28 se observan los porcentajes de recobro obtenidos para cada nivel de concentración y éstos se encuentran cercanos al 100% por lo que no hay una variación significativa entre la respuesta y la cantidad de analito en la muestra demostrado también por el CV total que es de 1.11%, el cual está dentro del criterio de que el valor sea  $\leq 3\%$ .

Se evaluó el parámetro de linealidad en repetidas ocasiones, esto para descartar errores de analista, obteniendo siempre los mismos resultados para las concentraciones del 140% y 60%; de esta manera se justificó el acortamiento de rango para la linealidad, reduciendo en un 10% su alcance. Se realizó un lavado

exhaustivo a la columna de 14 h, por medio de gradiente, esto para descartar que fuera problema de una columna sucia, obteniendo los resultados del Cuadro 26 y 28. La respuesta del equipo era distinta en comparación con la linealidad del sistema, pero ambos parámetros se realizaron con materia prima estandarizada debido a que no se contaba con SRef de clorhidrato de metformina. Se analizaron distintos factores, llegando a la conclusión de que se trata de la solubilidad de la muestra, ya que el volumen en el que se disuelve la pesada de metformina es demasiado pequeño, obteniendo como resultado una muestra saturada.

### **8.8 Exactitud del método**

Los datos de porcentajes de recobro que se muestran en el Cuadro 30 se encuentran cercanos a el valor del 100% para ambos analitos, con un promedio de 100.80% para metformina y 100.06% para glibenclamida. Los valores de CV (Cuadro 30) obtenidos nos indican que no existe una variación significativa entre los resultados, por lo tanto, se demuestra que las mediciones realizadas no se alejan del valor real de contenido que se está midiendo en la muestra y podemos decir que el método es exacto a este nivel de concentración evaluado.

### **8.9 Precisión intermedia**

Se evaluó el método a un nivel de concentración de la muestra del 100% variando el día y el analista. Cada analista preparó 3 muestras cada día por 2 días, obteniendo el porcentaje de recobro de cada muestra y el CV de todos los porcentajes de recobro tanto para metformina (Cuadro 31) como para glibenclamida (Cuadro 32), estos datos de CV cumplen con los establecidos para ambos analitos,

por lo que el método es preciso a este nivel de concentración aún variando las condiciones de operación (día y analista).

### **8.10 Estabilidad de la muestra**

La diferencia de la media del porcentaje de recobro que se observa pasadas 24 h de haber preparado la muestra (Cuadro 36) se encuentra dentro de los criterios establecidos del 2% para metformina y 3% para glibenclamida, sin embargo pasadas 48 h (Cuadro 37) el valor de la diferencia excede el criterio del 2%, por lo que la muestra en solución no es estable a las 48 h para metformina y la medición de su respuesta debe realizarse dentro de las 24 h aunque la diferencia para glibenclamida se mantenga dentro del criterio con un valor de 1.025%.

### **8.11 Robustez**

El pH al que se ajusta la fase móvil para correr y preparar las muestras es de 5.2, sin embargo, durante la operación puede haber variaciones que no se controlan y éstas pueden afectar el desempeño del método por lo que para evaluar la robustez se corrieron y prepararon muestras con fase móvil a pH 5.1 y 5.3. La diferencia en el porcentaje de recobro de las muestras con fase móvil pH 5.1 con respecto a las de fase móvil a pH 5.2 (Cuadro 41) entra dentro del criterio de  $\leq 2\%$  para metformina y  $\leq 3\%$  para glibenclamida, contrario a las muestras con fase móvil pH 5.3 (Cuadro 42) cuyas diferencias exceden este criterio y por lo tanto, el desempeño del método se ve alterado, pues la glibenclamida es dependiente del pH y éste es el mismo que el pKa de la molécula provocando que se encuentre más ionizada, ensanchando y afectando el ABC del pico, así como su tiempo de retención el cual se reduce (Cuadro 40) comparado con el del Cuadro 38.

## 8.12 Tolerancia

Para evaluar factores externos al método se realizó un cambio de equipo al que se usaba en condiciones normales. En el Cuadro 43 se muestran los porcentajes de recobro de la muestra corridas en la condición modificada, que es el equipo marca Hitachi y en el Cuadro 44 los porcentajes de recobro de la misma muestra a la condición normal (equipo marca Varian), con estos datos se calculó un CV total de 1.76% para metformina y 2.017% para glibenclamida (Cuadro 45), los cuales entran dentro del criterio de  $\leq 2\%$  para metformina y  $\leq 3\%$  para glibenclamida, por lo tanto el método es reproducible a diferentes condiciones de equipo.

**Cuadro 45. Resumen de los criterios de aceptación por parámetro.**

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado
Adecuabilidad del sistema	CV $\leq 2\%$ para metformina	CV MET= 0.41966
	CV $\leq 3\%$ para glibenclamida	CV GLI= 0.57321
	Resolución > 3	Resolución= 12
Linealidad del sistema	$r^2 \geq 0.98$	$r^2$ MET=0.9936
	$m \neq 0$	$r^2$ GLI= 0.9811
	IC( $\beta_1$ ) tiene que incluir la unidad	$m \neq 0$ IC( $\beta_1$ ) incluye la unidad
Precisión del sistema	CV $\leq 2\%$ para metformina	CV MET= 1.15385
	CV $\leq 3\%$ para glibenclamida	CV GLI=0.78164
Especificidad	La presencia o ausencia de señales no interfieren con las señales emitidas por los analitos.	Se presentaron señales por productos de degradación de la glibenclamida, pero estos no representan más del 1% del total de la señal emitida por metformina.

Linealidad del método	$r^2 \geq 0.98$ $m \neq 0$ $b = 0$ IC( $\beta_1$ ) tiene que incluir la unidad CV de % de Recobro $\leq 2\%$ para metformina CV de % de Recobro $\leq 3\%$ para glibenclamida	$r^2$ MET=0.986 $r^2$ GLI= 0.9953 $m \neq 0$ $b = 0$ IC( $\beta_1$ ) incluye la unidad CV MET= 3.98002 CV GLI= 1.11094
Exactitud del método	CV de % de Recobro $\leq 2\%$ para metformina CV de % de Recobro $\leq 3\%$ para glibenclamida	CV MET= 0.84032 CV GLI= 0.52344
Precisión intermedia	CV $\leq 2\%$ para metformina CV $\leq 3\%$ para glibenclamida	CV MET= 0.86560 CV GLI= 2.59577
Estabilidad de la muestra	$  di   \leq 2\%$ para metformina $  di   \leq 3\%$ para glibenclamida	$  di  $ MET (0-24 h) = 0.98281 $  di  $ GLI (0-24 h) = 1.83528 $  di  $ MET (0-48 h) = 2.54801 $  di  $ GLI (0-48 h) = 1.02519
Robustez	$  di   \leq 2\%$ para metformina $  di   \leq 3\%$ para glibenclamida	$  di  $ MET (pH 5.3) = 2.93872 % $  di  $ GLI (pH 5.3) = 6.42094 % $  di  $ MET (pH 5.1) = 0.63169 % $  di  $ GLI (pH 5.1) = 0.96822 %
Tolerancia	CV $\leq 2\%$ para metformina CV $\leq 3\%$ para glibenclamida	CV MET= 1.76176 CV GLI= 2.01760

## 9 Conclusiones

A pesar de que el método analítico desarrollado para cuantificar metformina y glibenclamida en tabletas demuestra ser preciso, específico, exacto, robusto, capaz de realizarse por analistas diferentes y en equipos diferentes, y que las muestras son estables para su medición hasta las 24 h después de haber sido preparadas, no se tiene la certeza de que los resultados obtenidos son lineales, ya que no se cumple con uno de los criterios establecidos para que sea un método analítico confiable, esto podría ocasionar que dé resultados erróneos en cuanto a una valoración se refiere. Sin embargo, al tratarse del  $CV < 2\%$  para uno de los analitos, se plantea la posibilidad de incrementar el número de corridas analíticas y delimitar el valor de desviación estándar para asegurar este criterio.

Se recomendaría un rediseño con cambios en las concentraciones y un mayor volumen de inyección, para de esta forma obtener una mayor respuesta por parte del equipo sin que se sature la columna o la respuesta del equipo.

## 10 Referencias

1. Ettre L. M. S. Tswett and the invention of chromatography. LC-GC North America [Internet]. 2003; 21 (5): 459-467. [Citado 09 de Jul 2022]. Disponible en:  
<https://cdn.sanity.io/files/0vv8moc6/chroma/1d8bd9c34045ef61d93b9002b40e9335d19de2ed.pdf/article-56954.pdf>
2. Ettre L. The Centenary of the Invention of Chromatography. Journal of Chromatographic Science [Internet]. 2003; 41(5): 225-226. [Citado 09 de Jul 2022]. Disponible en: <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1093/chromsci/41.5.225>
3. Sgariglia M, Soberón J, Sampietro D, Vttuone M. Cromatografía: conceptos y aplicaciones. Arakuku [Internet]. 2010; 2(1): 1-6. [Citado 09 de Jul 2022]. Disponible en:  
[https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/75465/CONICET\\_Digital\\_Nro.3655a360-b03b-44c8-8519-bc747d073f7c\\_A.pdf?Sequence=2&isallowed=y](https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/75465/CONICET_Digital_Nro.3655a360-b03b-44c8-8519-bc747d073f7c_A.pdf?Sequence=2&isallowed=y)
4. Schwarts J. Chromatography. Salem Press Encyclopedia of Science; 2020.
5. Coskun O. Separation techniques: Chromatography. North Clin Istanb [Internet]. 2016; 3(2):156-160. [Citado 09 de Jul 2022]. Disponible en: doi: 10.14744/nci.2016.32757
6. Fanali S, Haddad P, Poole C, Lloyd D, Schoenmakers P. Liquid Chromatography, Fundamentals and Instrumentation [Internet]. Elsevier.

2013. [Citado 11 de Jul 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/C2010-0-68614-7>
7. Hernández V, Sánchez E. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2011.
  8. Hage, D. Chromatography. Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry [Internet], 2018; 1–32. [Citado 10 de Jul 2022]. Disponible en: doi:10.1016/b978-0-12-816063-3.00001-3
  9. Robards K, Ryan D. Chapter 6 - High performance liquid chromatography: Separations. [Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods](#) [Internet]. 2nd ed. 2022; 283-336. [Citado 10 de Jul 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822096-2.00013-X>
  10. Hage, D. Chapter 8 - Chromatography and electrophoresis. [Contemporary Practice in Clinical Chemistry](#) [Internet]. 4th ed. 2019; 135-157. [Citado 10 de Jul 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815499-1.00008-9>
  11. Hage, D. Chromatography. [Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics](#) [Internet]. 6th ed. 2019; 266-294. [Citado 10 de Jul 2022]. Disponible en: <https://www.clinicalkey.com/#!/content/book/3-s2.0-B9780323359214000168>
  12. Urh M, Simpson D, Zhao K. Chapter 26 Affinity Chromatography. Guide to Protein Purification [Internet], 2nd Edition, 2009; 417–438. [Citado 10 de Jul 2022]. Disponible en: doi:10.1016/s0076-6879(09)63026-3

13. Mori S, Barth H. Size Exclusion Chromatography [Internet]. Berlín: Springer Science; 2013. [Citado 10 de Jul 2022]. Disponible en: [https://books.google.com.mx/books?id=wKbvCAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=wKbvCAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
14. Jimidar MI, Smet MD. HPLC Method development in late phase pharmaceutical development. En: Ahuja S, Rasmussen H, (eds.). Separation Science and Technology Volume 8 HPLC Method Development for Pharmaceuticals. Italia: Academic Press; 2007.373-405
15. Fanali S, Haddad P, Poole C, Lloyd D, Schoenmakers P. Liquid Chromatography, Applications [Internet]. Elsevier. 2013. [Citado 11 de Jul 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/C2010-0-68910-3>
16. Ramole R, Mohini B, Ashish J. A review: Analytical Method Development and Validation. Sys Rev Pharm [Internet]. 2021; 12(8): 450-454 [Citado 11 de Jul 2022]. Disponible en: <https://www.sysrevpharm.org/articles/a-review-analytical-method-development-and-validation.pdf>
17. Dhanashri P. A Review On Analytical Method Development. IJCRT [Internet]. 2022; 10(1): 840-854. [Citado 11 de Jul 2022]. Disponible en: <https://ijcrt.org/papers/IJCRT2201318.pdf>
18. Secretaría de Salud. NOM-059-SSA1-2015, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos. Ciudad de México: Secretaría de Salud; 2015.
19. ICH Expert Working Group. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1) [Internet]. International Conference of Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use;

2005 [citado 10 Jul 2022]. Disponible en:

<https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>

20. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 11 ed. México: Secretaría de Salud, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos; 2014.
21. The United States Pharmacopoeial Convention. The United States Pharmacopoeia 30/National Formulary 25 Rockville, M.D.: Phamacopoeia Convention, Inc.; 2007.
22. Garrido A., Teijon J. M., Blanco D. Fundamentos de química estructural. [Internet]España: TEBAR; 2006. [Citado 13 Jul 2022]. Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?id=avt8LFmp8q4C&pg=PP6&dq=Fundamentos+de+quimica+estructural&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjxvjLnMrYAhWY0YMKHU4tAKsQ6AEIKDAA#v=onepage&q=Fundamentos%20de%20quimica%20estructural&f=false>
23. Lorenzo P., Moreno A., Lizasoain L., et al. Velázquez. Farmacología Básica y clínica. [Internet]. 18 ed. China: Medica Panamericana; 2009. [Citado 13 Jul 2022]. Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?id=BeQ6D40wTPQC&printsec=frontcover&dq=Velazquez.+Farmacologia+Basica+y+clinica&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiosbWVncrYAhWT3oMKHYTAAA8Q6AEIKDAA#v=onepage&q=Velazquez.%20Farmacologia%20Basica%20y%20clinica&f=false>

24. Diabetes. OMS: Organización Mundial de la Salud. [Internet]. 2016. [Citado 14 Jul 2022]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/diabetes>
25. ¿Qué es la diabetes? Secretaria de salud. gob. mx[Internet].2022. [Citado 14 Jul 2022]. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/articulos/la-diabetes-y-sus-complicaciones>
26. Hipoglucemiantes orales. Balance Labs. [Internet]. 2016. [Citado 14 Jul 2022]. Disponible en: <https://www.diabalance.com/glosario/366-hipoglucemiantes-orales>
27. NOM—015-SSA2-2010. Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. [Internet]. 2010. [Citado 14 Jul 2022]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html>
28. Moffat A, Osselton M, Widdop B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. 4th ed. Italy: Pharmaceutical Press; 2011.
29. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 4091, Metformin; [Citado 15 Jul 2022]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Metformin>
30. Luo M, Zheng L, Wang S, Zhu J, Tang Z, Gao P. Characterization of four major degradation products in metformin by 2D LC-QTOF/MS/MS. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [Internet]. 2021; 192. [citado 15 Jul 2022]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113662>

31. British Pharmacopoeia Commission Office. British Pharmacopoeia. 7<sup>th</sup> ed. The Department of Health, British Pharmacopoeia Commission Office; 2009.
32. Chavan R, Thipparaboina R, Kumar D, Shastri N. Co amorphous systems: A product development perspective. International Journal of Pharmaceutics [Internet]. 2016; 515(1-2): 403–415. [Citado 15 de Julio 2022]. Disponible en: doi:10.1016/j.ijpharm.2016.10.043
33. Liu J, Grohgan H, Löbmann K, Rades T, Hempel, N. Co-Amorphous Drug Formulations in Numbers: Recent Advances in Co-Amorphous Drug Formulations with Focus on Co-Formability, Molar Ratio, Preparation Methods, Physical Stability, In Vitro and In Vivo Performance, and New Formulation Strategies. Pharmaceutics [Internet]. 2021; 13(3): 389. [Citado 15 de Julio 2022]. Disponible en: doi:10.3390/pharmaceutics13030389
34. Takla P. Glibenclamide. Analytical Profiles of Drug Substances. [internet] 1981; 337–355. [Citado 15 de Julio 2022]. Disponible en: doi:10.1016/s0099-5428(08)60644-9
35. Basto A, López N, Rojas R, Aguilar C, De la Cruz V, Rivera J, *et al.* Prevalence of diabetes and glycemic control in Mexico: national results from 2018 and 2020. Salud Publica Mex [Internet]. 2021; 63: 725-733. [citado 2022 Jul 12]. Disponible en: <https://doi.org/10.21149/12842>
36. Secretaría de Salud. NOM-015-SSA2-2010. Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. Ciudad de México: Secretaría de Salud; 2010.

37. Brunton L. Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica.  
12 ed. México: McGraw Hill; 2012.