



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN FARMACÉUTICA

**DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR  
CLAR PARA CUANTIFICAR GLIBENCLAMIDA EN  
PLASMA DE RATÓN**

**TESIS**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

**BRENDA ANABEL SERRANO PERALTA**

DIRECTOR:

**DRA. ELIZABETH GUADALUPE SÁNCHEZ GONZÁLEZ**

ASESOR:

**DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD**



MÉXICO D.F.

2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

---

## **Agradecimiento**

El desarrollo de esta tesis fue financiado en su totalidad con recursos del Programa de Apoyo para la Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT IT200815 “Diseño de matrices híbridas de liberación modificada preparadas mediante el proceso sol-gel, con actividad hipoglucemiante, aplicables en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2”, por lo que se agradece el apoyo de la Universidad Nacional Autónoma de México, a través de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico.

---

---

## TABLA DE CONTENIDO

1	Introducción.....	4
2	Marco Teórico .....	5
2.1	Sulfonilureas.....	5
2.2	Glibenclamida.....	6
2.3	Métodos existentes para cuantificar glibenclamida .....	8
2.4	Desarrollo de métodos analíticos.....	9
2.5	Cromatografía. ....	10
2.6	Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) .....	11
2.7	Tipos de CLAR. ....	12
2.8	Cromatograma. ....	14
2.9	Análisis cuantitativo .....	15
2.10	Fase estacionaria y móvil. ....	16
2.11	Análisis de fármacos en fluidos biológicos.....	17
2.12	Plasma .....	17
2.13	Preparación de la muestra biológica para el análisis. ....	18
2.13.1	Ultrafiltración. ....	18
2.13.2	Precipitación de proteínas. ....	19
2.13.3	Extracción líquido-líquido.....	19
2.13.4	Extracción en fase sólida.....	19
2.14	Validación de métodos analíticos. ....	19
3	Planteamiento del problema .....	23
4	Objetivos .....	24
5	Hipótesis .....	25
6	Diagrama de flujo .....	26
7	Desarrollo experimental.....	27
7.1	Materiales y Reactivos.....	27
7.2	Metodología.....	29
8	Resultados y análisis de resultados.....	35
8.1	Desarrollo del método .....	35
8.2	Validación de sistema.....	41
8.3	Validación de método .....	46
9	Conclusiones.....	59

---

10	Anexo I.....	60
10.1	Preparación de soluciones .....	60
10.2	Método cromatográfico .....	60
10.3	Validación de sistema.....	61
10.4	Validación de método .....	63
11	Anexo II .....	75
11.1	Fórmulas .....	75
11.2	Tabla de ANADEV A .....	76
11.3	Tabla de ANADEV A de dos factores. Estadígrafo F de Fisher.....	77
11.4	Resolución.....	78
12	Referencias .....	79

---

## 1 INTRODUCCIÓN

La importancia del avance en los tratamientos para la *diabetes mellitus* radica en que ésta se ha convertido en la enfermedad crónica degenerativa más común entre la población. Actualmente existen diferentes fármacos hipoglucemiantes que aunque presentan relación con su estructura química, regularmente las dosis en las que se administran para que puedan alcanzar el efecto terapéutico deseado son diferentes, sin embargo, la mayoría de estos fármacos son administrados en formas farmacéuticas orales con sistema de liberación inmediata que pueden llegar a causar reacciones hipoglucemiantes severas. Otro problema que se presenta, es en los pacientes geriátricos diabéticos que olvidan la toma del medicamento. Entre la gran variedad de fármacos hipoglucemiantes se encuentra la glibenclamida, un fármaco que se debe administrar en bajas dosis debido a su potencia.

Una forma de disminuir la toxicidad o reacciones hipoglucemiantes severas es administrando el fármaco con un sistema de liberación modificada, en donde la concentración máxima se alcance en un periodo corto y se mantenga de manera prolongada y que además, no requiera la ingesta diaria del medicamento. Para desarrollar adecuadamente este tipo de formulaciones, es necesario que se conozca la velocidad de aparición del fármaco en el organismo a partir de las mismas, y para ello es necesario un método que sea capaz de cuantificar al fármaco de interés en una matriz biológica.

En este trabajo, se desarrolló un método para cuantificar glibenclamida en plasma. El desarrollo se basó en la técnica analítica de cromatografía de líquidos de alta resolución, la cual es suficientemente sensible para poder cuantificar concentraciones pequeñas, una vez establecidas las condiciones cromatográficas se desarrolló la metodología para llevar a cabo el tratamiento de la muestra de plasma con fármaco. Finalmente, el método desarrollado se validó para asegurar que cumple con los requisitos para el cual fue diseñado.

---

## 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1 Sulfonilureas.

Estos compuestos son derivados de las sulfamidas. La estructura sulfonilurea constituye el grupo esencial de la actividad hipoglucemiante, diversas sustituciones en el anillo bencénico ( $R^1$ ) y en el grupo urea ( $R^2$ ) han originado compuestos cuya potencia y propiedades farmacocinéticas difieren notablemente (Figura 1).<sup>1</sup>

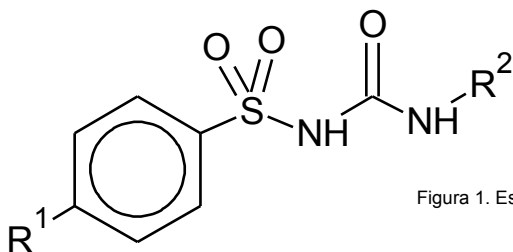


Figura 1. Estructura general de la sulfonilurea

La primera generación de las sulfonilureas incluye fármacos como la tolbutamida, tolazamida y clorpropamida, posteriormente surgió una segunda generación de sulfonilureas hipoglucemiantes que es aproximadamente 100 veces más potente que las del primer grupo, entre las cuales se incluyen fármacos como la glibenclamida y glimepirida, entre otros.<sup>1</sup>

#### 2.1.1 Absorción, biotransformación y excreción.

Las propiedades farmacocinéticas de las sulfonilureas son sus características más distintivas. Aun cuando hay diferencias en las velocidades de absorción de las distintas sulfonilureas, estas se absorben con eficacia a partir del tubo digestivo. No obstante, los alimentos y la hiperglucemia pueden reducir la absorción ya que se inhibe la motilidad gástrica e intestinal y de este modo se puede retrasar la absorción de muchos fármacos. Las sulfonilureas en plasma se encuentran en gran parte unidas a proteínas, para la glibenclamida la unión a proteínas es mayor (cerca del 90-99%, en especial a la albúmina). Si bien sus semividas de eliminación son breves (3 a 5 h), sus efectos hipoglucemiantes quedan de manifiesto durante 12-24 h, por lo que a menudo es posible administrarlos una vez al día.<sup>1</sup>

---

Todas las sulfonilureas se metabolizan en el hígado y los metabolitos se excretan en la orina. Así, las sulfonilureas deben administrarse con precaución en pacientes con insuficiencia renal o hepática.

### 2.1.2 Aplicaciones terapéuticas

Las sulfonilureas se utilizan para controlar la hiperglucemia en pacientes con *diabetes mellitus* tipo II, en quienes el páncreas no secreta cantidad suficiente de insulina, por lo que es difícil mantener niveles de glucemia normales. <sup>2</sup>

## 2.2 Glibenclamida.

### 2.2.1 Descripción.

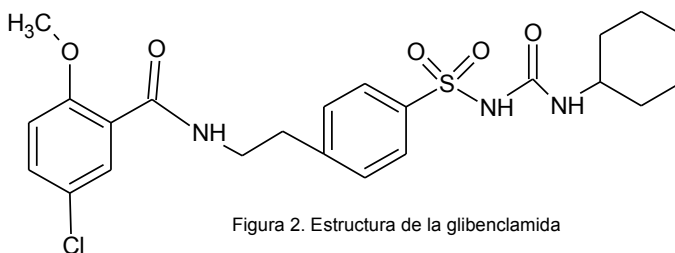


Figura 2. Estructura de la glibenclamida

Fórmula condensada: C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S

Masa molar: 494.01 g/mol

Apariencia: Polvo blanco cristalino <sup>3</sup>

### 2.2.2 Propiedades fisicoquímicas.

Punto de fusión: 172-174°C

Solubilidad: Prácticamente insoluble en agua, ligeramente soluble en etanol y metanol. Escasamente soluble en diclorometano.

UV máximo: El compuesto muestra máximos de absorción en NaOH 0.1 M a 226, 274 y 300 nm.

pKa: La glibenclamida es un ácido débil, con una constante de disociación de 5.3.

Coefficiente de reparto, Log P: 4.7 <sup>3,4</sup>



---

### 2.2.3 Dosis e Indicaciones terapéuticas.

La glibenclamida es un hipoglucemiante que pertenece a la segunda generación de las sulfonilureas. Se utiliza para el manejo de la *diabetes mellitus tipo II* y tiene una duración de acción de hasta 24 horas. La dosis que se utiliza comúnmente en formulaciones orales es de 2.5-5 mg hasta 15 mg diarios. Aunque es poco probable que produzca un beneficio adicional al aumentar la dosis por encima de los 15 mg, se han administrado hasta 20 mg diarios.<sup>4</sup>

El medicamento se administra diariamente por vía oral, por la mañana con el desayuno o con la primera comida principal. Algunos pacientes pueden requerir 20 mg repartidos en dos dosis al día. Debe administrarse inmediatamente antes de la primera comida abundante. No se debe compensar el olvido de una dosis con un aumento de la siguiente, pues existe el riesgo de una sobredosis tóxica.<sup>5</sup>

### 2.2.4 Farmacocinética.

Estudios farmacológicos en humanos muestran que después de la administración oral de glibenclamida, esta se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal (GI) alcanzando niveles plasmáticos máximos dentro de 2 a 4 h. Se une ampliamente a proteínas plasmáticas y se distribuye a varios órganos. Se metaboliza casi por completo en el hígado, siendo dos metabolitos hidroxilados los principales, 4-trans-hidroxiglibenclamida y 3-cis-hidroxiglibenclamida; ambos metabolitos no presentan actividad hipoglucemiante significativa en la concentración presente en sangre y se eliminan rápidamente en heces y orina.<sup>1,6</sup>

En un estudio farmacocinético en ratones se aplicó un parche transdérmico que contenía una dosis de 1.8 mg de glibenclamida, después de la aplicación la concentración máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ) fue de  $6.72 \pm 0.20 \mu\text{g/mL}$  en un tiempo ( $t_{m\acute{a}x}$ ) de 12 h.<sup>7</sup> Por otro lado, en un estudio llevado a cabo en ratas con diabetes inducida y ratas normales, se demostró que después de la administración oral de glibenclamida en una dosis de 10 mg/kg se alcanzó una  $C_{m\acute{a}x}$  de  $14.71 \pm 2.97 \mu\text{g/mL}$  y de  $12.78 \pm 3.39 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente, en un  $t_{m\acute{a}x}$  de 4 h.<sup>8</sup>

Comparando la administración oral, la absorción de glibenclamida es más rápida ya que la concentración máxima se alcanza en un intervalo corto de tiempo, sin embargo, con

---

los parches transdérmicos, el suministro lento y continuo de glibenclamida mejoró el control glucémico en pacientes, además de disminuir eficazmente las complicaciones asociadas con la *diabetes mellitus*.<sup>7,9</sup>

Es evidente que la farmacocinética de glibenclamida después de la administración oral es significativamente diferente para ratas diabéticas y para ratas no diabéticas; esto debido a que la glibenclamida es un sustrato de la glicoproteína-P, cuya función en el epitelio intestinal es la eliminación de fármacos y reducción de la biodisponibilidad<sup>10</sup>, sin embargo, en pacientes diabéticos la glicoproteína-P se inhibe y así se aumenta la biodisponibilidad del medicamento, por lo tanto, la absorción intestinal y la concentración máxima de glibenclamida después de la administración oral es mayor en ratas diabéticas.<sup>11</sup>

Dichos estudios farmacocinéticos en ratas indican que la glibenclamida se absorbe principalmente en el duodeno y yeyuno tanto para ratas diabéticas como para ratas no diabéticas, sin embargo, el estómago también es uno de los principales sitios de absorción, ya que en pacientes y ratas diabéticas el vaciamiento gástrico se retrasa permitiendo que la glibenclamida permanezca un mayor tiempo en el estómago y por lo tanto haya una mayor absorción.<sup>11</sup> Estudios farmacológicos en animales muestran que, como otras sulfonilureas, la glibenclamida estimula la producción y liberación de insulina de las células pancreáticas; su acción por lo tanto depende del buen funcionamiento de estas células.<sup>6</sup>

### **2.3 Métodos existentes para cuantificar glibenclamida**

Algunos de los métodos oficiales encontrados en la bibliografía para la cuantificación de glibenclamida como materia prima utilizan diferentes técnicas, como la volumetría y la espectrofotometría; pero para cuantificar glibenclamida en una matriz biológica, como el plasma, se utiliza comúnmente la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) como puede observarse en el Cuadro 1.

Método	Descripción	Referencia
Volumetría	Disolver 0.4 g de glibenclamida en 100 mL de alcohol. Aplicar calor. Titular con NaOH 0.1 M, usando fenolftaleína como indicador, hasta la presencia de una coloración rosa.	12
Espectrofotométrico	Disolver una muestra de glibenclamida en un volumen de etanol, y posteriormente realizar una dilución. Medir la radiación UV absorbida por la molécula a una longitud de onda de 230 nm.	13
Cromatografía	Columna L7 de 25 cm x 4.6 mm. Fase móvil: Acetonitrilo (ACN):NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 5.25 (55:45). Detector de UV a 254 nm. Velocidad de flujo a 2 mL/min.	14
	Columna C8 de 100 x 30.2 mm. Fase móvil: ACN: Agua: ácido acético (50:50:0.03). Detector de UV a 325 nm. Velocidad de flujo a 0.5 mL/min.	15

Cuadro 1. Métodos para cuantificar glibenclamida en diferentes muestras

Dependiendo del analito y la matriz biológica se deben establecer los requisitos necesarios para poder obtener una separación satisfactoria durante el análisis por CLAR y de esta manera llevar a cabo la cuantificación del analito.

## 2.4 Desarrollo de métodos analíticos.

Desarrollar y validar un nuevo método analítico es costoso, sin embargo algunos métodos no son suficientemente confiables, sensibles y rentables o simplemente no están disponibles.

Antes de iniciar con el desarrollo del método se deben buscar posibles metodologías existentes para el mismo analito o compuestos similares, y aunque podría no encontrarse un método que sea útil, a menudo proporciona un punto de partida.<sup>16</sup>

La amplia variedad de equipos, columnas y eluyentes hace que el desarrollo de un método por CLAR parezca complejo, sin embargo, este proceso depende de la naturaleza del analito y generalmente sigue los siguientes pasos:<sup>17</sup>

- Establecer la técnica por CLAR
- Establecer las condiciones iniciales
- Desarrollo inicial del método

- 
- Optimización del método
  - Aplicar el método
  - Validación del método

## **2.5 Cromatografía.**

La cromatografía es una de las principales técnicas para la separación e identificación de especies químicas estrechamente relacionadas en mezclas o matrices complejas. La separación se basa en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. Los componentes de la mezcla se hacen pasar a través de la fase estacionaria mediante la corriente de la fase móvil, las moléculas fuertemente retenidas por la fase estacionaria se moverán lentamente con el flujo de la fase móvil, mientras que las que se unen débilmente a la fase estacionaria serán arrastradas con rapidez por la fase móvil.

La fase estacionaria puede ser un sólido poroso de superficie activa en forma de partículas pequeñas, o bien, un soporte sólido cubierto con una fina capa de líquido, la fase móvil puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico; si se utiliza un gas se denomina cromatografía de gases, para los demás tipos de cromatografía la fase móvil siempre es líquida, incluyendo la cromatografía de capa fina.<sup>16, 18</sup>

Existen diferentes tipos de cromatografía que se pueden clasificar de distintas formas. Una clasificación se basa en la forma de contacto entre la fase estacionaria y la fase móvil:

- Cromatografía en columna. Se utiliza un tubo estrecho que contiene a la fase estacionaria, a través de la cual se hace pasar la fase móvil.
- Cromatografía en capa fina. Se fija sobre una placa plana o un papel y la fase móvil se desplaza por capilaridad o gravedad.

La otra clasificación más frecuente se basa en el tipo de fase móvil y de estacionaria, que determinan los equilibrios de los solutos entre ambas fases, distinguiéndose:

- Cromatografía de gases
  - Cromatografía de fluidos supercríticos
  - Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)
-

---

## 2.6 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

La CLAR es una técnica analítica muy conocida para la investigación y el desarrollo farmacéutico ya que tiene una alta capacidad de separación para una amplia gama de muestras. Actualmente se usa para:

- Purificar productos naturales y sintéticos
- Caracterizar metabolitos en matrices biológicas
- Análisis de principios activos, impurezas y productos de degradación
- Estudios farmacocinéticos

En la separación cromatográfica, una fase móvil circula en íntimo contacto con una fase estacionaria, al introducir una mezcla de sustancias o analitos en la corriente de la fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Esto supone que después de terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada una de las sustancias introducidas en el sistema eluirá con un tiempo de retención diferente, es decir, estarán separadas.

El tiempo de retención de un compuesto es el tiempo que transcurre desde el tiempo de inyección de la muestra en el cromatógrafo hasta el tiempo correspondiente a la altura máxima del pico cromatográfico del analito de interés <sup>19</sup>. Cada compuesto tiene un tiempo de retención diferente que depende del analito y de factores como: velocidad de flujo, naturaleza de la fase estacionaria, proporción de la fase móvil, temperatura, pH, longitud y diámetro de la columna, lo que significa que dichas condiciones deben de ser controladas si se usa el tiempo de retención como forma de identificación de un compuesto.

En los métodos desarrollados por CLAR comúnmente se utiliza un estándar interno o mezclas de compuestos, por lo que el tiempo de retención del analito de interés y del estándar interno o algún otro compuesto presente en la muestra debe de ser diferente, además, los picos cromatográficos deben presentar una buena resolución.

La resolución de un pico cromatográfico es la distancia que existe entre dos picos adyacentes, es un parámetro que describe el poder de separación del sistema cromatográfico en relación con el componente particular de la mezcla, sin embargo, para

---

llegar a una separación óptima entre compuestos, deben obtenerse picos agudos y simétricos. Hay tres parámetros que influyen en la resolución de una separación cromatográfica: <sup>19, 20</sup>.

- Eficiencia de la columna: Expresada en número de platos teóricos, cuántos más platos la columna será más eficiente
- Selectividad: Capacidad de separación de dos analitos en la columna, considerando el tiempo de retención de los máximos de los picos para cada analito.
- Factor de retención: Picos con bajo factor de retención son mejores por que se evita su ensanchamiento.

## **2.7 Tipos de CLAR.**

El tipo de cromatografía en CLAR viene determinado por la fase móvil y fundamentalmente, por la fase estacionaria. Los sistemas más usados en cromatografía se describen a continuación: <sup>18, 20</sup>

### **2.7.1 Cromatografía de adsorción**

Surge de la interacción entre el soluto y la superficie de la fase estacionaria, tal interacción es un caso de competencia en el que las moléculas de la fase móvil y las del soluto compiten por los sitios de adsorción sobre la superficie de la fase estacionaria; la fase estacionaria se constituye de un material relativamente polar con una alta superficie de contacto, la sílica gel es el material que más se utiliza, aunque materiales como alúmina y óxido de magnesio también se utilizan. Los disolventes que se utilizan para la fase móvil son relativamente no polares.

### **2.7.2 Cromatografía de reparto**

Se basa en la hidrofilia. La fase estacionaria consiste en una matriz de sílica gel que lleva unida covalentemente por enlaces siloxano una cadena de carbonos, comúnmente de 8 o 18 carbonos, y una fase móvil moderadamente polar. Las moléculas de la muestra se distribuyen entre las dos fases, la fase estacionaria en este caso es más hidrofóbica, por lo que los compuestos hidrofílicos eluirán de una manera más rápida que los compuestos hidrofóbicos ya que presentan mayor afinidad por la fase estacionaria.

---

### **2.7.3 Cromatografía de intercambio iónico**

Involucra una fase estacionaria sólida con grupos aniónicos o catiónicos en la superficie, en el cual las moléculas del soluto de carga opuesta son atraídas. Esta técnica es adecuada para separar aminoácidos o productos metabólicos.

### **2.7.4 Cromatografía de exclusión molecular**

Involucra una fase estacionaria con un tamaño de poro determinado. Los solutos se separan de acuerdo al tamaño de las moléculas; las moléculas de mayor tamaño eluyen primero seguidas de las moléculas más pequeñas. Esta técnica de separación es adecuada para muestras con compuestos con diferentes pesos moleculares.

Sin embargo, hay otros tipos de cromatografía que por su complejidad no son utilizados, pero se mencionan a continuación:

### **2.7.5 Cromatografía de partición centrifuga**

Involucra dos fases líquidas, ambas fases líquidas son inmiscibles entre sí y se mezclan para formar un sistema de dos fases. Una de las fases líquidas se utiliza como fase estacionaria, la cual es colocada en una columna o rotor mientras que este se encuentra girando a una velocidad moderada, de esta manera, la fase estacionaria se retiene en el interior del rotor por la fuerza centrífuga. La segunda fase, la fase móvil, es la que contiene a los solutos y se alimenta a presión en el rotor y se bombea a través de la fase estacionaria.<sup>21</sup>

### **2.7.6 Cromatografía de afinidad**

La cromatografía de afinidad permite la separación de mezclas proteicas por su capacidad de unión a un determinado ligando. La fase estacionaria consiste en un medio de soporte en el que el sustrato se ha unido covalentemente a una matriz cromatográfica, de tal manera que cuando se pasa la mezcla de proteínas a través de la columna cromatográfica, las proteínas que se retienen serán aquellas que se unen específicamente al sustrato, posteriormente las proteínas se eluyen mediante una solución que contenga a un sustrato libre o un compuesto que sea capaz de romper la interacción entre la proteína y sustrato.<sup>22-23</sup>

---

### **2.7.7 Cromatografía quiral**

Este tipo de cromatografía se utiliza para la separación de enantiómeros, consiste en una fase estacionaria quiral que contiene a un único enantiómero, los dos enantiómeros de un compuesto difieren en la afinidad por la fase estacionaria originando que la salida de ambos por la columna sea en diferentes tiempos.<sup>20, 24</sup>

### **2.7.8 Cromatografía interacción hidrofóbica**

Se utiliza para la purificación de proteínas y carbohidratos. Las moléculas se retienen en la columna en virtud de las interacciones hidrofóbicas que establecen con la sílica modificada de la columna, aunque estas interacciones son débiles, a menudo son muy numerosas que se necesita de la disminución de la polaridad de la fase móvil para poder eluir las moléculas retenidas.<sup>25</sup>

## **2.8 Cromatograma.**

La muestra debe ser disuelta en un líquido miscible con la fase móvil, posteriormente el inyector es el encargado de tomar un volumen de muestra, usualmente es de 5-100 µL. La separación se lleva a cabo cuando la fase móvil es bombeada a una velocidad de flujo constante a través de la columna; la interacción entre la fase estacionaria y la fase móvil dan origen a la separación, trayendo a los analitos separados hacia el detector, el detector es el encargado de dar una señal eléctrica, dicha señal es procesada por un sistema computacional que imprime el resultado como cromatograma.

Los compuestos eluidos son transportados por la fase móvil hacia el detector y registrados en forma de una campana de Gauss. Las señales detectadas son conocidas como picos, y de forma general se le conoce como cromatograma; dichos picos dan información cuantitativa y cualitativa de la mezcla o del analito en cuestión.

- Cualitativa. El tiempo de retención del analito siempre es constante bajo las mismas condiciones cromatográficas. La dimensión de la columna, tipo de fase estacionaria, velocidad de flujo, tamaño de la muestra y temperatura proporcionan las condiciones cromatográficas. Por lo tanto, un pico puede ser identificado inyectando la muestra y comparando su tiempo de retención con un estándar de referencia.
- Cuantitativa. El área del pico es proporcional a la cantidad del analito inyectado. Para determinar la concentración de una muestra se construye un gráfico de calibración y



---

se comparan las áreas de los picos de diferentes soluciones con concentración conocida con el área del pico de la muestra. <sup>18, 26</sup>

## **2.9 Análisis cuantitativo**

Los cromatogramas obtenidos muestran una serie de picos cuyas áreas se correlacionan con la concentración del compuesto inyectado. Comúnmente se trabaja con un estándar interno que se agrega a una determinada concentración tanto a los compuestos con concentraciones conocidas como a las muestras a cuantificar.

Un estándar de referencia es un compuesto altamente purificado que está bien caracterizado. Los métodos cromatográficos se basan en los estándares para proveer datos precisos, por lo tanto, la calidad y pureza de los mismos son importantes. Se utilizan estándares externos e internos para la cuantificación de un analito. <sup>20</sup>

### **2.9.1 Estándar interno.**

En este método una cantidad conocida de estándar interno se agrega a la muestra antes del análisis. El estándar interno seleccionado debe ser de alta pureza y tener una estructura química, así como propiedades físicas y químicas similares a la del analito que puedan influir en el desarrollo del método; es importante asegurarse de que el estándar interno es estable y que no interfiere con ninguno de los componentes de la muestra. Para muestras biológicas el método del estándar interno proporciona resultados más precisos. La cuantificación está basada en la relación de la respuesta del analito con respecto a la respuesta del estándar interno, ambas con una preparación similar. <sup>20, 27</sup>

### **2.9.2 Estándar externo.**

Un estándar externo es una sustancia de referencia del analito a determinar. En el método del estándar externo se preparan una serie de soluciones de concentración conocida de la sustancia de referencia, las concentraciones deben ser aproximadas a la concentración del analito y se analizan bajo las mismas condiciones de análisis. El área o altura de los picos de la sustancia de referencia se grafican en función de su concentración, la curva de calibración debe resultar una línea recta. <sup>20</sup>

---

## **2.10 Fase estacionaria y móvil.**

La interacción de dos componentes principales produce el retraso en la salida de un compuesto que pasa a través de la columna.

### **2.10.1 Fase estacionaria.**

La sílica gel es el material de mayor uso para el empaquetamiento de columnas ya que proporciona un alto rendimiento a la columna.

Consiste en una red porosa de átomos de silicio unidos de manera tridimensional por átomos de oxígeno, la superficie de la estructura molecular se compone de grupos silanoles (Si-OH) los cuales le proporcionan un carácter polar el cual es explotado en la cromatografía de adsorción, sin embargo, la estructura molecular puede ser modificada químicamente para formar fases estacionarias con propiedades específicas, un ejemplo es la sílica gel que se utiliza en la cromatografía de reparto, la cual es modificada por reacción con clorosilanos para dar un enlace Si-O-Si-C; la unión con cadenas de hidrocarburos a la sílica gel produce una superficie no polar que además de ser más estable permite el uso de mezclas de agua:disolvente como eluentes. El material más usado es aquel al que se enlazan cadenas de 18 átomos de carbono (C18), aunque también hay con 8 cadenas de carbonos (C8), esta sílicas se usan en un rango de pH de 4-8. <sup>18, 20</sup>

### **2.10.2 Fase móvil.**

Otro factor a considerar con respecto al grado de retención para un compuesto en particular, es la fase móvil.

En todas las formas de cromatografía, la calidad y la manipulación de la fase móvil debe tomarse a consideración, ya que las impurezas solubles pueden acumularse en la superficie de la fase estacionaria generando líneas base con ruido o picos falsos, por lo que se debe evitar la contaminación de los disolventes que se utilizan para la fase móvil. Actualmente se comercializan disolventes con alto grado de pureza los cuales están libres de partículas contaminantes. Existe una serie de factores que deben tomarse en cuenta a fin de evitar problemas durante el desarrollo del método analítico, por lo que los disolventes deben de cumplir con las siguientes características: <sup>26</sup>

- 
- No deben de tener respuesta por parte del detector
  - Deben de tener una baja viscosidad para proporcionar una baja presión al sistema

### **2.11 Análisis de fármacos en fluidos biológicos.**

Para el análisis de fármacos y sus metabolitos en fluidos biológicos se utilizan métodos por CLAR, usando detectores de UV, fluorométrico y/o electroquímico. La detección selectiva del fármaco dentro de una matriz biológica es una de sus ventajas, además, la fase móvil puede ser modificada para separar el pico del fármaco a partir de otros picos de interferencia. El sistema cromatográfico y el tipo de detector se deben elegir de acuerdo a la muestra, ya que cuando el fármaco se encuentra en una concentración baja se requiere un detector mucho más sensible y específico.

Los fluidos biológicos son muy complejos y los analitos de interés por lo regular están presentes en concentraciones muy bajas. Aunque el bioanálisis se desarrolla con varios instrumentos, la mayoría de ellos no se puede manejar con fluidos biológicos directamente, por lo que se debe de llevar a cabo la preparación de la muestra para extraer y aislar a los analitos. Para seleccionar una técnica de extracción se deben de considerar diversos factores, los cuales incluyen la naturaleza y condición de la muestra, así como, la concentración de fármaco.<sup>20, 26</sup>

### **2.12 Plasma**

La sangre consta de una parte líquida que se denomina plasma y por una parte sólida de elementos formes como eritrocitos, leucocitos y plaquetas. El plasma sanguíneo es un líquido claro y ligeramente amarillento que se obtiene después de sedimentar los elementos formes de la sangre no coagulada, generalmente mediante centrifugación.<sup>28</sup>

El plasma sanguíneo es un líquido compuesto en más del 90% por agua, el resto del plasma está formado por proteínas plasmáticas, lípidos, glúcidos, sales minerales y otras sustancias disueltas. Tiene la función de disolvente y medio de transporte.<sup>29</sup> Gran parte de los solutos presentes en el plasma son proteínas plasmáticas tales como factores de la coagulación, albúmina y globulinas.<sup>30</sup> La interacción más importante en torrente sanguíneo, a nivel de proteínas plasmáticas, es la fijación de fármacos ya que este tipo de sustancias por sí solas no podrían viajar por el torrente circulatorio.

---

El plasma es la parte no celular de la sangre que contiene una serie de proteínas las cuales son diferentes fisicoquímicamente con respecto al analito a cuantificar, sin embargo, a menudo hay una fuerte afinidad entre las proteínas y el fármaco por lo que el fármaco debe de ser liberado de las proteínas antes de que la muestra sea inyectada en el cromatógrafo o estas podrían precipitar por la fase móvil y obstruir el equipo, además, pueden producir adsorciones irreversibles en la columna analítica.

### **2.13 Preparación de la muestra biológica para el análisis.**

La preparación de la muestra es una etapa decisiva en los métodos de análisis, en especial en casos donde la matriz que rodea al analito es muy compleja. Las muestras de plasma contienen varios compuestos más el analito (principio activo) en bajas concentraciones, por lo que el análisis de fármacos en matrices biológicas puede llegar a ser un reto por diferentes razones:

- La muestra puede contener una o más sustancias que proporcionen una respuesta falsa durante el análisis
- Los componentes de la muestra pueden contaminar o dañar de forma irreversible el instrumento analítico
- La concentración del analito puede ser tan baja que puede no ser detectado durante el análisis.
- La muestra puede ser incompatible con el instrumento analítico.

Para la preparación de la muestra pueden utilizarse operaciones de la química analítica como: <sup>20, 26</sup>

#### **2.13.1 Ultrafiltración.**

Se emplean membranas en forma de cono que se ajustan a los tubos de la centrifuga; las alícuotas de la muestra son colocadas en la parte superior de los conos y se centrifugan ligeramente. Las membranas permiten el paso a moléculas demasiado pequeñas, sin embargo, puede haber pérdida del analito cuando está fuertemente unido a las proteínas.

---

### **2.13.2 Precipitación de proteínas.**

Se utiliza para muestras de suero y plasma, y su propósito principal es eliminar a las proteínas antes de que se lleve a cabo su análisis. La muestra de suero o plasma se mezcla con metanol o acetonitrilo el cual causa la desnaturalización de las proteínas, posteriormente la muestra se centrifuga para llevar a cabo la precipitación de las proteínas y el sobrenadante se recolecta para el análisis final; el sobrenadante es el que contiene al analito casi libre de proteínas. Se puede realizar añadiendo ácidos fuertes como, ácido perclórico o tricloroacético, sin embargo, algunos fármacos pueden verse afectados ya que pueden sufrir hidrólisis. Debe evitarse que el componente a analizar precipite junto con las proteínas.

### **2.13.3 Extracción líquido-líquido.**

Esta técnica se utiliza para fluidos biológicos como sangre y orina. Se mezcla la muestra acuosa con un disolvente orgánico inmisible en agua, resultando en un sistema de dos fases, se agita vigorosamente por un cierto periodo de tiempo y posteriormente se centrifuga. La fase orgánica es la que contiene al analito de interés. Pueden producirse pérdidas importantes del analito.

### **2.13.4 Extracción en fase sólida.**

Los compuestos a separar pueden purificarse mediante el paso de la muestra a través de una columna. Los analitos de interés son retenidos en la columna por diferentes tipos de interacciones con la fase estacionaria, la columna posteriormente es eluida de tal manera que los componentes de la matriz queden removidos. Finalmente, se lleva a cabo la elución de los compuestos con un disolvente que rompa las interacciones del analito con la fase estacionaria.

La técnica a elegir para la preparación de la muestra depende de las propiedades del analito, composición de la muestra y concentración del analito en la muestra, considerando también la viabilidad de la técnica.

## **2.14 Validación de métodos analíticos.**

Una vez desarrollado el método por CLAR, este debe validarse con el fin de establecer con un alto grado de confianza que el método analítico cumple con el propósito para el

---

cual fue desarrollado, es decir, si permite cuantificar al analito de interés de manera inequívoca con exactitud y precisión.<sup>25</sup> El desarrollo y validación del método puede ser simultánea, pero son dos diferentes procesos. El objetivo principal de la validación es demostrar la confiabilidad que tiene un método en particular para la cuantificación de un analito en una matriz biológica, tal como, sangre, suero, plasma u orina.<sup>31</sup>

Comúnmente los criterios que se evalúan en la validación de un método analítico por CLAR en fluidos biológicos son:<sup>31-33</sup>

#### **2.14.1 Selectividad/Especificidad**

El método analítico debe ser capaz de diferenciar al analito de interés y al estándar interno de metabolitos presentes en la matriz u otros compuestos en la muestra. Las sustancias potencialmente interferentes en una matriz biológica incluyen componentes endógenos de la matriz, metabolitos y productos de descomposición. Sí el método está destinado a cuantificar más de un analito, cada analito debe ser probado para garantizar que no hay interferencia.

Se debe evaluar y analizar individualmente la interferencia de al menos 6 diferentes fuentes de matriz blanco.

La respuesta analítica de las interferencias debe ser menor al 20% del límite inferior de cuantificación del analito y menor al 5% para el estándar interno.

#### **2.14.2 Límite de cuantificación (LC).**

Es la concentración mínima de analito presente en la muestra que puede ser cuantificado con exactitud y precisión. El límite inferior de cuantificación debe ser establecido de acuerdo a las concentraciones esperadas durante el desarrollo del estudio.

La concentración más baja en la curva de calibración se acepta como límite inferior de cuantificación, sí la señal del analito en la muestra es al menos 5 veces la señal proporcionada por el blanco.

---

### **2.14.3 Límite de detección.**

Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra, que bajo las condiciones de operación establecidas, puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada.<sup>34</sup>

### **2.14.4 Linealidad**

Consiste en determinar si existe relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica. Se lleva a cabo preparando al menos cinco diluciones por triplicado, a partir de una misma solución patrón, midiendo su respuesta bajo las condiciones de medición.

### **2.14.5 Precisión.**

La precisión de un procedimiento analítico expresa el grado de concordancia entre una serie de mediciones individuales de un analito cuando se aplica el mismo procedimiento de manera repetida a múltiples alícuotas de un volumen homogéneo de matriz biológica. Dentro del parámetro de precisión se evalúa:

#### **2.14.5.1 Repetibilidad.**

Expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo. En un mismo día se analizan por quintuplicado las siguientes muestras control:

- Límite inferior de cuantificación (LIC).
- Muestra control bajo (MCB): A la matriz se le adiciona 3 veces la concentración del LIC.
- Muestra de control medio (MCM): A la matriz se le adiciona una concentración intermedia entre MCB y MCA.
- Muestra de control alta (MCA): A la matriz se le adiciona una concentración entre el 75-85% de límite superior de cuantificación presente en la curva.

El % del coeficiente de variación (CV) del valor promedio, no debe ser mayor al 15%, excepto para el LIC, el cual puede ser igual o menor al 20%.

---

#### **2.14.6 Exactitud.**

Expresa en porcentaje, el grado de concordancia entre el valor que se acepta y el valor encontrado. De los datos de repetibilidad y reproducibilidad se calcula la desviación de la concentración obtenida con respecto al valor nominal (% de desviación).

El % de desviación no deber ser mayor al 15%, excepto para el LIC, el cual debe ser menor o igual al 20%.

#### **2.14.7 Estabilidad de la muestra.**

Se debe llevar a cabo la evaluación de la estabilidad de la muestra para asegurar que durante la preparación y el análisis de la muestra, así como las condiciones de almacenamiento no afectan la concentración del analito. Se determinan las condiciones de temperatura y tiempo en las que el fármaco permanece estable en la matriz biológica.

Se evalúa por triplicado la respuesta del analito a las concentraciones de las muestras de control alta y baja, las cuales son analizadas después de ser sometidas a las condiciones de ensayo evaluadas.

La concentración promedio de cada nivel debe estar dentro del 15% de la concentración nominal.

#### **2.14.8 Estabilidad ciclos de congelación-descongelación.**

La estabilidad del analito debe determinarse después de tres ciclos de congelación y descongelación. Al menos tres alícuotas de MCB y MCA deben ser almacenadas en el congelador por al menos 12 h, posteriormente se descongelan a temperatura ambiente. Después de la descongelación completa, las muestras se vuelven a congelar de nuevo aplicando las mismas condiciones en cada ciclo.

#### **2.14.9 Estabilidad en automuestreador.**

Se debe de determinar la estabilidad de las muestras procesadas en el automuestreador, durante el tiempo que dure el análisis de las muestras.



---

### 3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La glibenclamida es una sulfonilurea de segunda generación que pertenece al grupo II de la clasificación biofarmacéutica de fármacos, es decir, presenta baja solubilidad y alta permeabilidad. Es uno de los hipoglucemiantes más utilizados por sus dosis relativamente bajas (2.5-5 mg), y por su alta eficacia en pacientes con *diabetes mellitus* tipo II, sin embargo, la administración oral de glibenclamida ha sido asociada a severas, y en algunas ocasiones fatales reacciones hipoglucemiantes, por lo que la administración a partir de un sistema de liberación controlada ofrece muchas ventajas, tales como la reducción de reacciones adversas y administración sostenida del fármaco.

El desarrollo de nuevas formas farmacéuticas con sistema de liberación modificada, necesita de métodos bioanalíticos que sean capaces de cuantificar al fármaco o analito de interés en fluidos biológicos o tejidos corporales, para poder llevar a cabo estudios de farmacocinética y/o biodisponibilidad.

Dentro de las técnicas existentes para la cuantificación de fármacos y sus metabolitos en fluidos biológicos se encuentra la CLAR, una técnica que presenta mayor selectividad y sensibilidad, además, es específica, ya que el desarrollo de un método bioanalítico con esta técnica depende en su mayoría de las características fisicoquímicas del fármaco, así como, de la matriz biológica que lo contiene.

Ya que se administran bajas dosis de fármaco, es necesario el desarrollo de un método analítico sensible y específico que permita la cuantificación de glibenclamida en plasma de ratón utilizando la técnica de CLAR, y así poder llevar a cabo posteriores estudios de farmacocinética y/o biodisponibilidad a partir de matrices sol gel utilizadas como sistemas de liberación controlada administrado a ratones.

---

## 4 OBJETIVOS

### **Objetivo general.**

Desarrollar un método analítico por CLAR capaz de cuantificar glibenclamida en plasma de ratón.

### **Objetivos particulares**

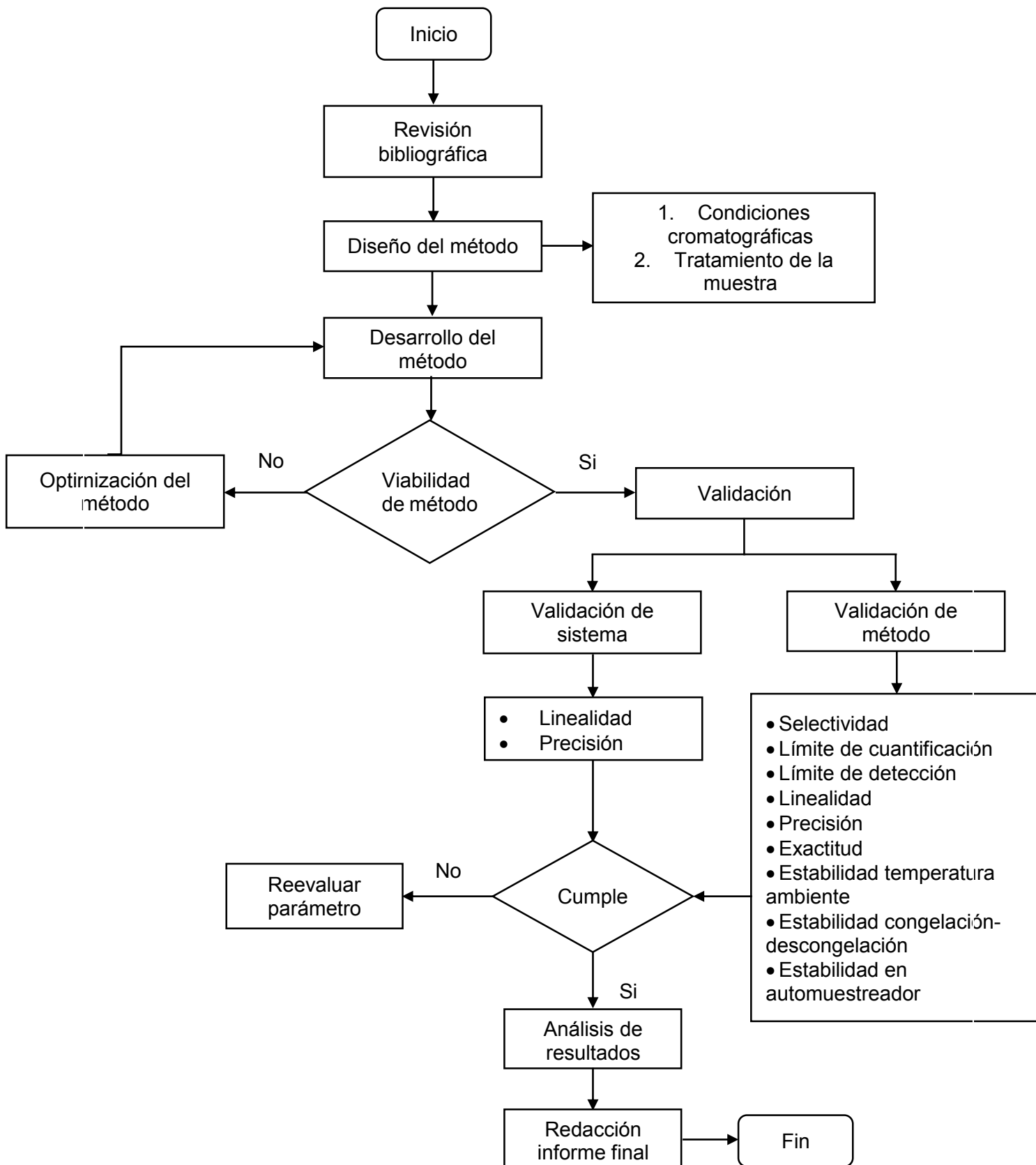
- Seleccionar las condiciones de preparación de la muestra de plasma para el análisis cromatográfico.
- Validar el método analítico desarrollado para cuantificar glibenclamida en plasma de ratón, de tal manera que la cuantificación de resultados confiables.

---

## 5 HIPÓTESIS

El desarrollo del método analítico para la cuantificación de glibenclamida en plasma sanguíneo de ratón deberá cumplir con los parámetros necesarios para que sea validado y así poder asegurar que el método proporcionará resultados confiables para que pueda ser utilizado en posteriores estudios farmacocinéticos.

6 DIAGRAMA DE FLUJO



---

## 7 DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 7.1 Materiales y Reactivos

<b>Reactivos</b>	<b>Distribuidor</b>
▪ Acetonitrilo grado cromatográfico (ACN) (GC)	Tecsiquim
▪ Fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	J. T. Baker
▪ Ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ )	Merck
▪ Agua desionizada	Milli-Q
▪ Octil sulfonato de sodio	Sigma
▪ Ácido acético glacial (AcOH)	Merck
▪ Metanol (MeOH) (GC)	Tecsiquim
▪ Metanol grado reactivo (GR)	J.T. Baker
▪ Felodipino	Laboratorios Kener
▪ Glibenclamida	Química Alkano

#### **Matriz biológica**

- Plasma de ratón

#### **Material general**

	<b>Capacidades</b>
▪ Tubos eppendorf/ tubos para microcentrifuga	2 mL
▪ Micropipetas	1-10 y 100-1000 $\mu\text{L}$
▪ Puntas para micropipeta	
▪ Gradilla para tubo eppendorf	
▪ Sistema para filtrar a vacío	

---

---

**Material de vidrio:**

## Capacidades

**Mide:**

- Matraces volumétricos 10 y 25 mL
- Pipeta volumétrica 1 y 2 mL
- Pipeta graduada 1/100 de 2 mL
- Vasos de precipitados 10, 50, 150, 600, 1000 mL
- Probeta 50 mL

**Contiene:**

- Tubos de ensaye

**Equipo**

## Marca

## Modelo/# de serie

- Cromatógrafo de líquidos Primaide
- Inyector Primaide Primaide 1210 No. ID 1418-025
- Detector UV Primaide Primaide 1410 No. ID 1418-027
- Bomba Primaide Primaide 1110 No. ID 1202-025
- Columna C8, 5  $\mu$ m, 150 x 4.60 mm Phenomenex Luna/No. Serie 652069-57
- Microcentrifuga Eppendorf 5417C
- Congelador
- Bomba para vacío
- Parrilla de agitación
- Vortex

**Instrumento**

## Marca

## Modelo/# de serie

- Microbalanza Mettler Toledo MT5 SNR. 1114470645
- Potenciómetro Cole Parmer No. serie Ep500/15468

---

## 7.2 Metodología

### 7.2.1 Desarrollo del método analítico

Se prepararon dos fases móviles, cada una con solución amortiguadora de fosfatos a diferente pH, la proporción utilizada para ambas es de 45:55, solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M: Acetonitrilo. Los valores de pH que se utilizaron fueron 5.25 y 3.5, cada una se preparó con diferente par ácido-base de fosfatos:

pH	5.25	3.5
Reactivos	$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$	$\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$

La fase móvil con solución amortiguadora de fosfatos a pH de 5.25 se empleó en el cromatógrafo de líquidos a una velocidad de 2.0 mL/min y un volumen de inyección de 50  $\mu\text{L}$ . Después de probar estas condiciones se optó por utilizar una fase móvil con un pH menor, en este caso 3.5, volumen de inyección de 25  $\mu\text{L}$  y velocidades de flujo de 2.2 y 2.5 mL/min. En ambos casos la detección se hizo a una longitud de onda de 254 nm.

Debido a la baja solubilidad que presenta la glibenclamida, se utilizaron 3 diferentes disolventes, metanol, etanol y acetonitrilo, para seleccionar en cual era más adecuado disolver al analito. Una vez seleccionado el disolvente para la preparación de las muestras, se probó una solución para llevar a cabo la precipitación de proteínas una vez que el método fuera aplicado a la matriz biológica, en este caso la solución que se probó fue de ácido acético en metanol al 1%.

En la precipitación de proteínas se utilizaron con diferentes proporciones, 1:1 y 1:2 plasma: solución de ácido acético en metanol, posteriormente las muestras se centrifugaron a una velocidad de 5000 rpm por un periodo de 10 min.

Después de haber empleado diferentes condiciones cromatográficas, disolventes y proporciones para la precipitación de las proteínas, se eligieron cuáles eran las condiciones más adecuadas para la cuantificación de glibenclamida en plasma y así llevar a cabo el tratamiento de las muestras y la validación del método analítico.

---

## **7.2.2 Validación de sistema**

La validación del sistema se llevó a cabo en un intervalo de concentración de 1-9 µg/mL utilizando las condiciones cromatográficas que se seleccionaron en el desarrollo del método analítico.

### **7.2.2.1 Linealidad de sistema**

Se prepararon por triplicado cinco niveles de concentración en metanol grado cromatográfico (GC): 1, 3, 5, 7 y 9 µg/mL. Se utilizó como estándar interno una solución de felodipino en metanol GC a una concentración de 70 µg/mL y como blanco metanol GC.

Se tomaron alícuotas de diferente volumen de la solución patrón de glibenclamida y se colocaron en diferentes matraces volumétricos de 10 mL, a cada matraz se le agregó 1 mL de solución de estándar interno y se llevó al aforo con metanol GC. La concentración final del estándar interno fue de 7 µg/mL. Ver anexo I.

Las muestras se inyectaron el mismo día de preparación utilizando las condiciones cromatográficas establecidas en el desarrollo del método, una vez obtenido el cromatograma se calculó la respuesta para cada nivel de concentración, dividiendo el área bajo la curva (ABC) de la glibenclamida entre el ABC del estándar interno, posteriormente se llevó a cabo la regresión lineal con las respuestas para obtener el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), ordenada al origen (b) y pendiente (m). El análisis estadístico se realizó evaluando la ordenada al origen y la pendiente con t de Student y se determinó el ajuste lineal con análisis de varianza (ANADEVA).

### **7.2.2.2 Precisión de sistema**

Se prepararon por sextuplicado, soluciones de glibenclamida a una concentración de 7 µg/mL en metanol GC. Se utilizó como estándar interno una solución de felodipino en metanol GC a una concentración de 70 µg/mL y como blanco metanol GC.

Se tomaron alícuotas de 700 µL de la solución patrón de glibenclamida y se colocaron en diferentes matraces volumétricos de 10 mL, a cada matraz se le agregó 1 mL de solución de estándar interno y se llevó al aforo con metanol GC. Ver anexo I.



---

Después de la inyección de la muestra, se calculó el promedio y desviación estándar de la respuesta para poder obtener el coeficiente de variación (CV). El análisis estadístico se realizó con una prueba de Ji cuadrada ( $\chi^2$ ).

### **7.2.3 Validación de método**

Para la obtención del plasma se utilizaron ratones CD-1 de sexo indistinto proporcionados por el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza Campo II. Cada ratón fue tratado de acuerdo con estándares éticos para el manejo de animales.

35

#### **7.2.3.1 Tratamiento de la muestra**

Se preparó una solución de estándar interno a una concentración de 7  $\mu\text{g/mL}$  en ácido acético al 1% en metanol. Se tomó 1 mL de la solución de estándar interno y se colocó en un tubo Eppendorf, posteriormente se le adiciono 0.5 mL de la muestra de glibenclamida en plasma. Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min, se tomó el sobrenadante y se inyectó bajo las condiciones cromatográficas establecidas en el desarrollo del método. El tratamiento del blanco se llevó a cabo colocando 1 mL de solución de ácido acético en metanol al 1% con 0.5 mL de plasma. Este tratamiento se aplicó a las muestras utilizadas para la validación del método analítico.

#### **7.2.3.2 Selectividad/Especificidad**

Se prepararon diferentes muestras para evaluar las posibles interferencias que se presenten durante la preparación, tratamiento y análisis de las muestras. Las muestras preparadas fueron (Ver anexo I):

- a. Plasma + solución de ácido acético en metanol al 1%
- b. Plasma + solución de glibenclamida (7  $\mu\text{g/mL}$ )
- c. Plasma + solución de felodipino (7  $\mu\text{g/mL}$ )
- d. Plasma + solución de felodipino (7  $\mu\text{g/mL}$ ) + solución de glibenclamida (7  $\mu\text{g/mL}$ ) + solución de ácido acético en metanol al 1%.

---

### **7.2.3.3 Límite de cuantificación y de detección**

Se prepararon cuatro soluciones a diferentes concentraciones, 0.5, 0.35, 0.25, 0.1  $\mu\text{g/mL}$ . Las muestras se inyectaron por triplicado. Con las áreas bajo de la curva obtenidas se calculó la respuesta, promedio y la desviación estándar para calcular el coeficiente de variación, el cual no debía ser mayor al 15 %. Con respecto al criterio de aceptación, el límite de cuantificación se debía determinar con base al 5% de la concentración máxima esperada (7  $\mu\text{g/mL}$ ), en este caso 0.35  $\mu\text{g/mL}$ .

### **7.2.3.4 Linealidad de método**

Se prepararon por triplicado 5 niveles de concentración en un rango de 1-9  $\mu\text{g/mL}$ . Las muestras se inyectaron el mismo día de preparación y se calculó la respuesta dividiendo el ABC de glibenclamida entre el ABC del estándar interno para cada muestra. (Ver anexo I).

Con los datos de respuesta se realizó una regresión lineal para poder determinar coeficiente de determinación ( $r^2$ ), pendiente ( $m$ ) y ordenada al origen ( $b$ ), que de acuerdo al criterio de aceptación debe de ser  $r^2 \geq 0.98$ ,  $m \neq 0$  y  $b = 0$ . El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con una  $t$  de Student para la ordenada al origen y la pendiente, determinando que cumplieran con el criterio de aceptación, mientras que el coeficiente de determinación se evaluó con ANADEVVA.

### **7.2.3.5 Precisión**

#### **7.2.3.5.1 Repetibilidad**

Se prepararon y analizaron por quintuplicado tres niveles de concentración, en este caso las concentraciones de 5, 7 y 9  $\mu\text{g/mL}$ . (Ver anexo I). Se calculó el promedio y la desviación estándar de las respuestas obtenidas en cada nivel de concentración para obtener el coeficiente de variación, el cual no debía ser mayor al 15%. El análisis estadístico de los datos se realizó con una prueba de Ji cuadrada ( $\chi^2$ ).

---

#### **7.2.3.5.2 Precisión intermedia**

Dos analistas prepararon en dos días diferentes y por separado, tres muestras de glibenclamida a una concentración equivalente al 100 %, en este caso 7 µg/mL, a partir de una solución patrón de glibenclamida. (Ver anexo I).

Se calculó la respuesta que se obtuvo por analista y día. Con los datos obtenidos se llevó a cabo el tratamiento estadístico con ANADEVIA para evaluar que existiera precisión ente los analistas, así como entre los días y que no existe interacción entre el analista y día.

#### **7.2.3.6 Exactitud**

Se utilizaron los datos de respuesta obtenidos en linealidad del método, los cuales se interpolaron en la curva de calibración para obtener el porcentaje de recuperación. Se calculó el promedio y desviación estándar, así como el coeficiente de variación el cual no debía ser mayor al 15%. El análisis estadístico para evaluar que cumple con el criterio de exactitud se llevó a cabo por comparación de medias con t de Student.

#### **7.2.3.7 Estabilidad de la muestra**

Se preparó por triplicado una solución de glibenclamida a una concentración de 7 µg/mL en plasma. Las muestras se mantuvieron en la mesa de trabajo a temperatura ambiente, y los muestreos se hicieron en los siguientes intervalos de tiempo: 0, 0.5, 1, 2, 4, 6 y 24 h. Después del muestreo se llevó a cabo el tratamiento de la muestra para su posterior inyección. (Ver anexo I).

Con las respuestas obtenidas se calculó la concentración de analito recuperada, posteriormente se calculó la desviación estándar para cada intervalo de tiempo. El análisis estadístico se llevó a cabo con Ji cuadrada, comparando la varianza de cada intervalo de tiempo contra el 15 % de la concentración nominal.

#### **7.2.3.8 Estabilidad en ciclo de congelación y descongelación**

Se preparó por triplicado una solución de glibenclamida a una concentración de 7 µg/mL en plasma. La estabilidad de la muestra se evaluó al congelar la muestra por 24 h y descongelar a temperatura ambiente, de tal manera que se cumplieran con tres ciclos

---

de congelación-descongelación. Inmediatamente después de la toma de muestra se llevó a cabo el tratamiento de las muestras para su posterior inyección. (Ver anexo 1).

Con las respuestas obtenidas se calculó la concentración de analito recuperada, posteriormente se calculó la desviación estándar para cada ciclo de congelación-descongelación. El análisis estadístico se llevó a cabo con Ji cuadrada, comparando la desviación estándar de cada ciclo contra el 15 % de la concentración nominal.

#### **7.2.3.9 Estabilidad en automuestreador (carrete)**

Después del tratamiento de tres muestras de glibenclamida en plasma a una concentración de 7 µg/mL, estas se colocaron en el carrete del equipo de cromatografía y se inyectaron por intervalos de 30 min hasta completar 4 h de estudio de estabilidad. (Ver anexo I).

Con las respuestas obtenidas se calculó la concentración de analito recuperado, posteriormente se calculó la desviación estándar para cada intervalo de tiempo. El análisis estadístico se llevó a cabo con Ji cuadrada, comparando la desviación estándar de cada intervalo de tiempo contra el 15 % de la concentración nominal.

### 8.1 Desarrollo del método

Durante el desarrollo de un método por CLAR además de considerar las propiedades fisicoquímicas del analito de interés, se deben de tomar en cuenta los objetivos a los cuales se quiera llegar. Antes de desarrollar un método analítico es conveniente buscar en la literatura un método que se pueda adaptar a las condiciones que se tienen, como equipo, reactivos, instrumentos, etc., y a los objetivos que se quieren alcanzar, como tiempos de retención cortos, picos cromatográficos con buena resolución, corridas analíticas rápidas, entre otros. Para el desarrollo de este método se partió de un método analítico previamente desarrollado y validado en una matriz farmacéutica, sin embargo algunas de las condiciones cromatográficas, así como la preparación de la muestra no permitieron que el método se pudiera adecuar a una matriz biológica, en este caso plasma, por lo que se tuvieron que variar y evaluar diferentes condiciones para saber que el método cumplía con los objetivos propuestos para su posterior validación.

Las condiciones cromatográficas con las que se partió para el desarrollo del método son:

- Columna: Columna C8, 150 x 4.6 mm de diámetro, 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula
- Longitud de onda: 254 nm UV
- Velocidad de flujo: 2.0 mL/min
- Fase móvil: Acetonitrilo: Solución amortiguadora de fosfatos pH 5.25, 0.05 M (55:45)

Con la fase móvil a pH 5.25 se obtuvo un tiempo de retención de 2.5 min para la glibenclamida y de 5 min para el estándar interno, en este caso felodipino, ambos a una concentración de 5  $\mu\text{g/mL}$  en metanol. Se utilizó un volumen de inyección de 50  $\mu\text{L}$  y una velocidad de flujo de 2 mL/min, sin embargo, el pico cromatográfico presentó cabeceo, ver figura 3.

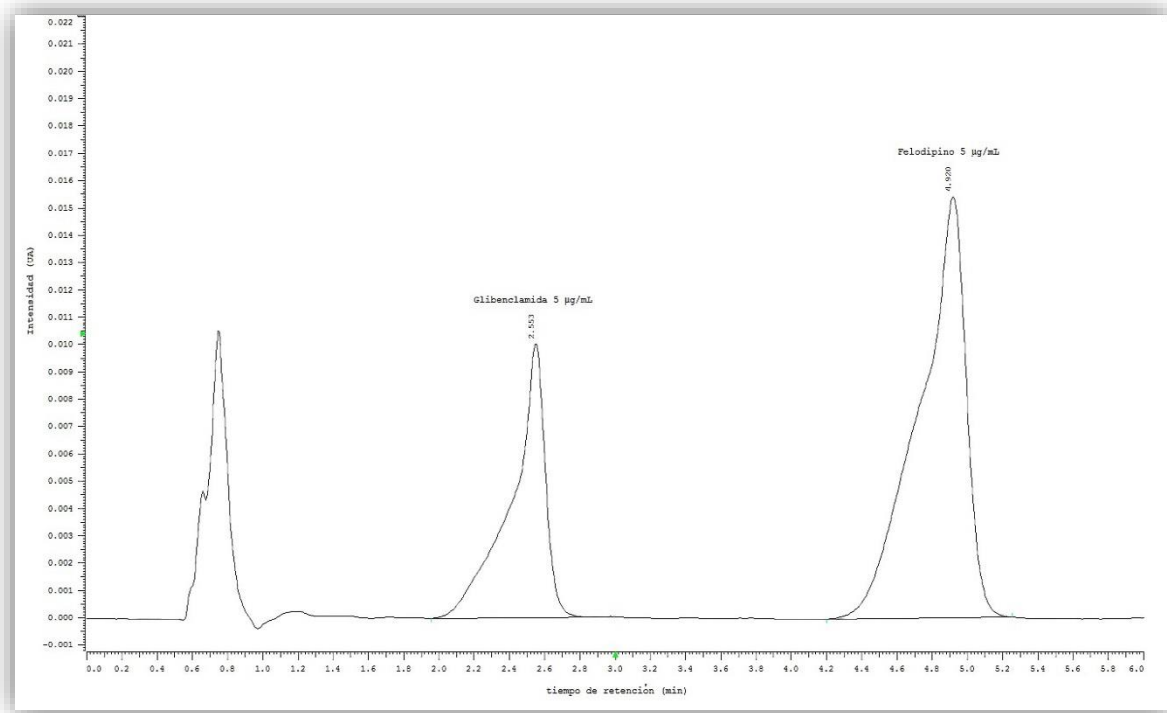


Figura 3. Cromatograma de glibenclámido y felodipino, fase móvil: solución amortiguadora de fosfatos pH 5.25, 0.05M: ACN (45:55), velocidad de flujo: 2 mL/min, vol. de inyección: 50 µL.

En la cromatografía de líquidos los analitos se representan gráficamente como una serie de picos que se identifican por su anchura, altura o área asumiendo que se obtienen picos simétricos en el cromatograma final, esto es que el pico tiene la forma de una campana de Gauss.<sup>18</sup> Sin embargo, cuando los picos presentan coleo o cabeceo, como es en el caso de la figura 3, se deben de considerar varios factores que estén causando la distorsión de los picos. Uno de los factores importantes a considerar es el tamaño de la muestra que se está inyectando, ya que cuando se inyectan volúmenes pequeños puede presentarse un cambio en la altura o área del pico cromatográfico, pero no puede haber cambios en el tiempo de retención, el ancho o la resolución del pico; por otro lado, cuando se utilizan volúmenes de inyección mayores puede haber una sobrecarga en la columna ocasionando un aumento en el ancho del pico y disminución de la resolución, esto es asumiendo que el analito está disuelto con fase móvil.<sup>17</sup> Sin embargo, el analito se disolvió con metanol lo cual hace que se considere un factor más que es la polaridad. En este caso se evaluaron tres disolventes en los cuales la muestra fuera más soluble, etanol, metanol y acetonitrilo, siendo el metanol el disolvente más adecuado, sin embargo, al usar un disolvente diferente al que se utiliza en la fase móvil se originó un cambio en la polaridad de la muestra que se vio reflejado en la definición de los picos.

---

Por lo tanto, se disminuyó el volumen de inyección a 25  $\mu$ L y de esta manera se evitaron cabeceos o distorsiones en los picos cromatográficos, véase figura 4.

Un factor importante a considerar durante el desarrollo de un método analítico es que presente tiempos de retención cortos, sin embargo, el tiempo de retención de un compuesto depende en su totalidad del comportamiento del analito con la fase estacionaria y la fase móvil, por lo que el pH de la fase móvil influye en la retención del compuesto.<sup>16, 26</sup> Considerando que el pKa de la glibenclamida es de 5.3, cuando la molécula se somete a una solución amortiguadora con un pH cercano, como es el caso de un pH 5.25, esta presenta un proceso de disociación que afecta directamente al tiempo de retención. Al disminuir el pH de la fase móvil también se disminuye el grado de disociación de un compuesto, siempre y cuando se seleccione un pH de al menos dos unidades por debajo del pKa, por ejemplo, el porcentaje que se disocia de glibenclamida a un pH de 3.5 es de 1.5%, mientras que a un pH de 5.25 el porcentaje disociado es de 47%.<sup>26</sup>

Ya que los compuestos polares o hidrofílicos tienen una mayor afinidad por la fase móvil eluyen primero y por lo tanto el tiempo de retención es corto; cuando un compuesto se disocia se forman moléculas cargadas y a su vez más polares, causando que la interacción con la fase estacionaria (no polar) sea menor y así se favorezca la interacción con la fase móvil permitiendo que el tiempo de retención se acorte.<sup>18</sup> Sin embargo, al tener un compuesto disociado, a pesar de su carácter polar, las interacciones con ambas fases ya no corresponden a las propiedades fisicoquímicas de la molécula como tal (polaridad), por lo tanto, se decidió disminuir el pH de la solución amortiguadora de fosfatos a pH 3.5 para tener al compuesto en su forma no disociada en el mayor porcentaje posible sin afectar la integridad química de la columna, de esta manera se obtuvo un tiempo de retención de 3 min para la glibenclamida, ya que es un compuesto hidrofóbico el tiempo de retención es mayor, mientras que para el felodipino el tiempo de retención fue de 5 min, ambos a una concentración de 5  $\mu$ g/mL en metanol, véase figura 4.

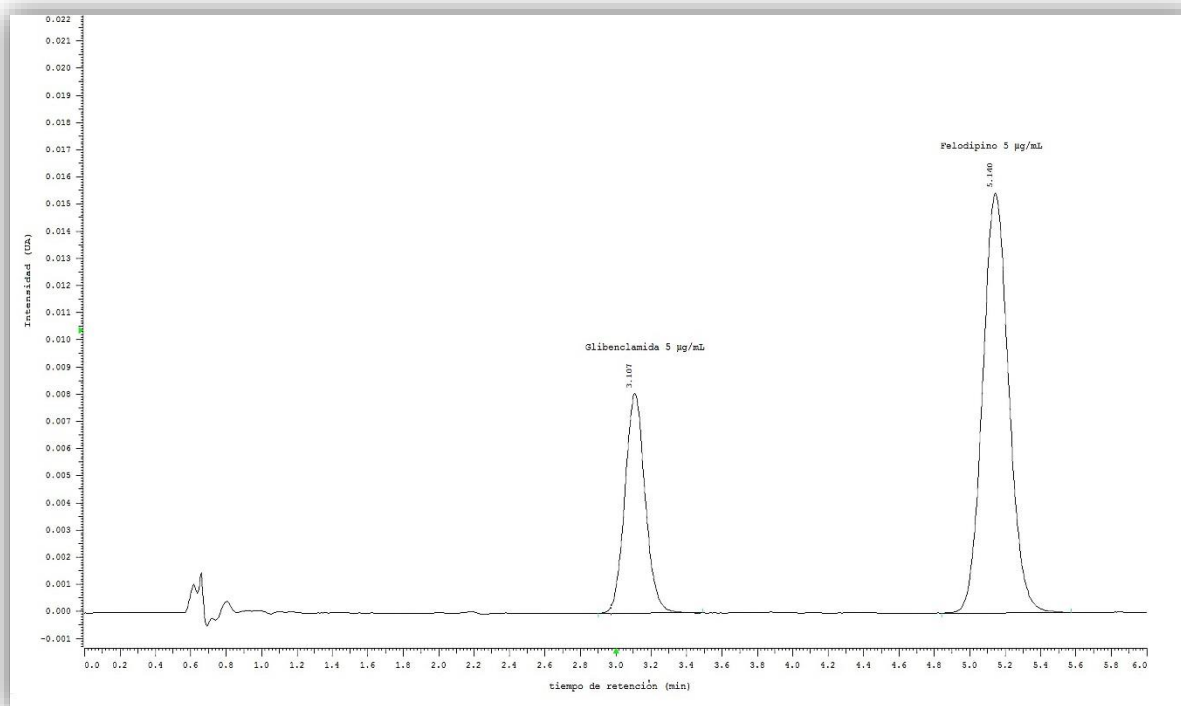


Figura 4. Cromatograma de glibenclámido y felodipino, fase móvil: solución amortiguadora de fosfatos pH 3.5, 0.05M: ACN (45:55), velocidad de flujo: 2 mL/min, vol. de inyección: 25 µL.

Un tercer factor que se consideró fue la velocidad de flujo para poder reducir el tiempo de corrida analítica, ya que a una mayor velocidad de flujo el tiempo de retención se reduce. Se probaron velocidades de flujo de 2.0, 2.2 y 2.5 mL/min, se muestran a continuación en la tabla 1.

Velocidad de flujo (mL/min)	tr glibenclámido	tr estándar interno
2.0	3.1	5.14
2.2	2.7	4.48
2.5	2.8	4.68

Tabla 1. Resultados de tr vs velocidad de flujo

Se observa en la figura 4 y tabla 1, que a una velocidad de flujo de 2.0 mL/min el tiempo de retención de la glibenclámido es de 3.10 minutos y del estándar interno de 5.14 minutos, entre las velocidades de 2.2 y 2.5 mL/min no hubo gran diferencia, siendo el tiempo de retención de la glibenclámido de 2.7 y de 2.8 minutos respectivamente, sin embargo, el tiempo de retención del estándar interno (pKa: 5.39) presenta una mayor diferencia a diferentes velocidades de flujo, ya que a 2.2 mL/min el tiempo de retención es de 4.48 y a 2.5 mL/min es de 4.68 minutos, ver figura 5. Para la selección de la



velocidad de flujo, además de considerar factores como el acortamiento de la corrida analítica, así como la resolución de los picos cromatográficos, también se consideró el desgaste del equipo, ya que a una mayor velocidad de flujo la presión del sistema aumenta causando el desgaste del equipo y de la columna de una manera más rápida.

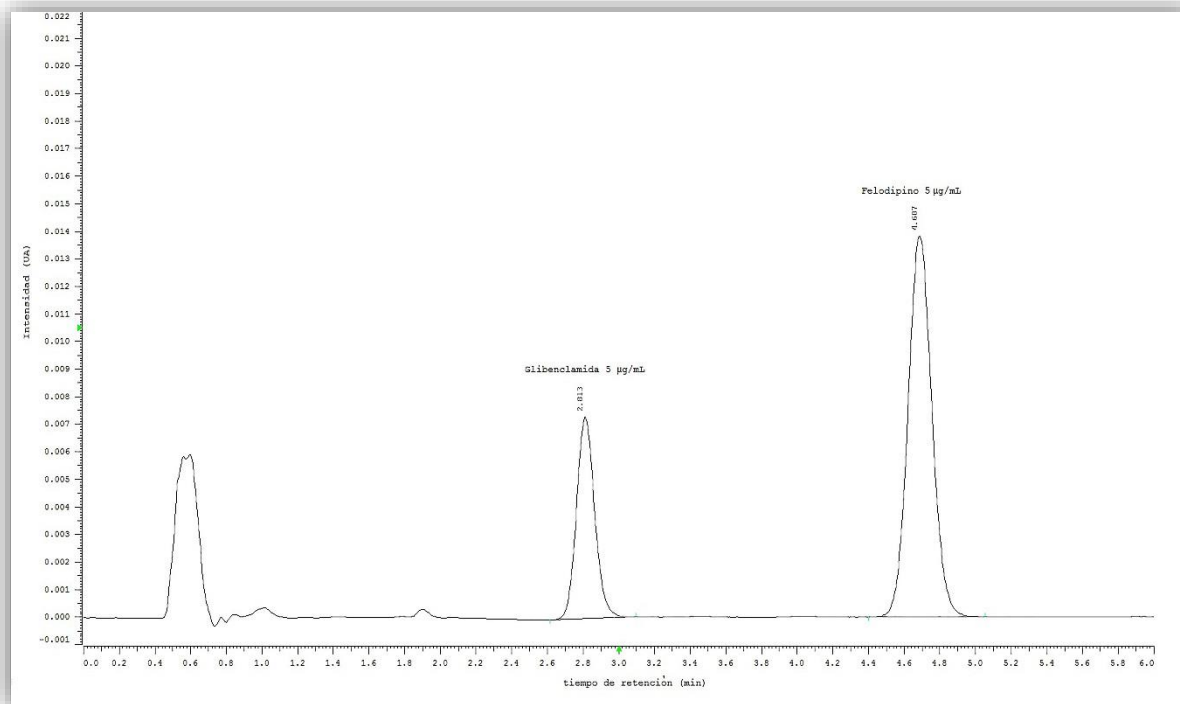


Figura 5. Cromatograma de glibenclámido y felodipino, fase móvil: solución amortiguadora de fosfatos pH 3.5, 0.05M: ACN (45:55), velocidad de flujo: 2.5mL/min, vol. de inyección: 25 µL.

Después de variar y evaluar las condiciones anteriores se seleccionó una fase móvil de solución amortiguadora de fosfatos a pH 3.5, 0.05 M: ACN en una proporción de 45:55, velocidad de flujo de 2.2 mL/min, ya que de esta manera la corrida analítica se disminuye a 5 min sin poner en riesgo al equipo, y con un volumen de inyección de 25 µL, que además de favorecer la forma de los picos cromatográficos, también favorece que el volumen de muestra sea menor cuando el método se aplique a ratones. Después de seleccionar las condiciones, este se aplicó a plasma, ver figura 6.

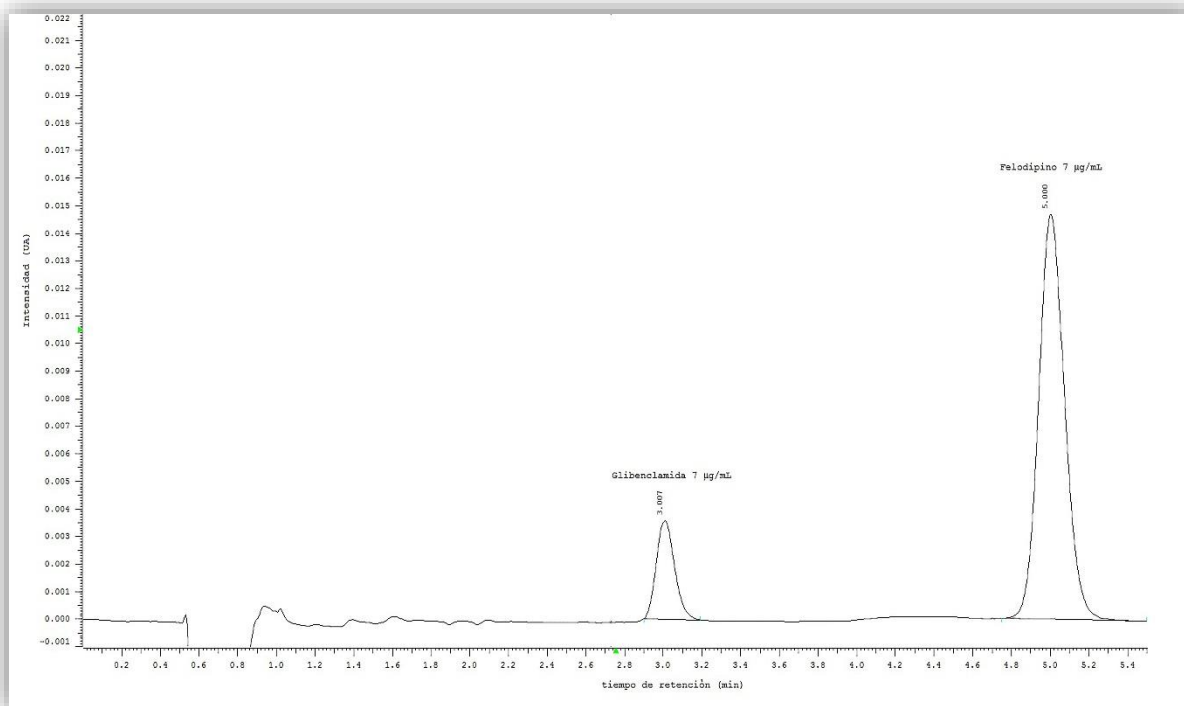


Figura 6. Cromatograma de glibenclámido y felodipino, fase móvil: solución amortiguadora de fosfatos pH 3.5, 0.05M: ACN (45:55), velocidad de flujo: 2.2 mL/min, vol. de inyección: 25  $\mu$ L.

El tratamiento de la muestra de plasma se llevó a cabo utilizando dos proporciones de plasma con solución de ácido acético en metanol, la primera proporción probada fue 1:1. Posterior a la centrifugación, las muestras se colocaron en viales para inyectarlas al cromatógrafo y en un periodo menor a los 10 min se presentó turbidez en las muestras, mientras que con una proporción 1:2 las muestras no presentaron turbidez, permitiendo la inyección de las muestras. La técnica de precipitación de proteínas consiste básicamente en la desnaturalización de estas y con la centrifugación formar el precipitado para poder obtener el sobrenadante sin proteínas, sin embargo, la proporción 1:1 no permitió que la mayoría de las proteínas se desnaturalizaran ocasionando que estas se resuspendieran después de haberse sometido a centrifugación, pudiendo ocasionar daños irreversibles en la columna cromatográfica, por esta razón se aumentó la proporción de ácido acético en metanol al 1% para desnaturalizar la mayor cantidad de proteínas que estén presentes en la muestra y así evitar daño al equipo.

---

Con base a lo expuesto anteriormente, las condiciones cromatográficas seleccionadas fueron:

- Fase móvil: Solución amortiguadora fosfatos pH 3.3, 0.05 M: ACN (55:45)
- Detector: UV, 254 nm
- Columna: C8, 5  $\mu$ m, 150 x 4.6 mm,
- Volumen de inyección: 25  $\mu$ L
- Velocidad de flujo: 2.2 mL/min

## 8.2 Validación de sistema

### 8.2.1 Linealidad del sistema

Con las áreas bajo la curva de glibenclamida y de estándar interno se calculó la respuesta para cada nivel de concentración y repetición. Se calculó la regresión lineal por el método de mínimos cuadrados y se obtuvieron los coeficientes de regresión, pendiente (m) y ordenada al origen (b), así como el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), los resultados se muestran en la tabla 2.

Especificación	Resultado
m $\neq$ 0	m=0.0609
b=0	b=-0.0020
$r^2 \geq 0.98$	$r^2=0.9995$

Tabla 2. Coeficientes de regresión y coeficiente de determinación

Una vez que se han obtenido los coeficientes de regresión para construir la ecuación de la recta, era necesario evaluarlos para determinar si describe adecuadamente la relación entre las dos variables, concentración vs respuesta.<sup>36</sup> Para comprobar la linealidad del sistema se debe de demostrar estadísticamente que la pendiente es diferente de cero y que la ordenada al origen es igual a cero.<sup>37</sup> Para comprobar que los resultados obtenidos cumplen con la especificación se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba t de Student con un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ , y de esta manera asegurar con un 95% de confianza que no hay diferencia significativa entre el valor obtenido y el valor de referencia, por lo tanto, existe una relación lineal entre las concentraciones y respuestas obtenidas,<sup>38</sup> Ver tabla 3.

Prueba t de Student para "m y b"		
Parámetro	m=0	b=0
t <sub>calc</sub>	160.4099	-0.9370
t <sub>tablas</sub>	2.145	2.145
Criterio	t <sub>calc</sub> < t <sub>tablas</sub>	
Decisión	m ≠ 0	b = 0

Tabla 3. Resultados de prueba con t de Student

Para la comprobación de los coeficientes de regresión se hizo un análisis estadístico en el cual se plantearon dos hipótesis para cada coeficiente de regresión. En el caso de la pendiente se planteó una hipótesis nula ( $H_0$ ) en donde  $m=0$  y una hipótesis alterna ( $H_A$ ) en la cual  $m \neq 0$ , después de calcular el estadístico de prueba (t de Student), ver anexo II, se decidió si se rechazaba o no la hipótesis nula ya que es la hipótesis que se comprueba, en este caso la  $H_0$  se rechazó ya que el valor de t calculada es mayor al valor de t de tablas, ver tabla 3, por lo tanto, se aceptó la  $H_A$  y se concluye que la pendiente de la recta es diferente de cero.<sup>36</sup>

Para la ordenada al origen el tratamiento de los datos fue el mismo, la  $H_0$  es que  $b=0$  y la  $H_A$  es que  $b \neq 0$ , se calculó el estadístico de prueba y a diferencia de la pendiente, la t calculada fue menor a la t de tablas (tabla 3), por lo tanto, la  $H_0$  se acepta y se concluye que la ordenada al origen es igual a cero.<sup>36</sup>

Otro parámetro importante para comprobar que el sistema cumplía con linealidad era el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) el cual debía de ser mayor a 0.98<sup>34</sup> Dicho parámetro evalúa la eficiencia de la ecuación comparando la dispersión de los datos con respecto a la recta de regresión, esto significa, que tanto se ajustan los datos de respuesta que se obtienen al modelo de regresión lineal.<sup>36</sup> Para comprobar que el coeficiente de determinación era mayor a 0.98 se utilizó el estadígrafo F de Fisher. Véase tabla 4.

Prueba F de Fisher para la correlación lineal	
Parámetro	$r^2 \geq 0.98$
$F_{\text{calc}}$	25731.33
$F_{\text{tablas}}$	4.6672
Criterio	$F_{\text{calc}} > F_{\text{tablas}}$
Decisión	Existe correlación lineal

Tabla 4. Resultados de prueba con F de Fisher

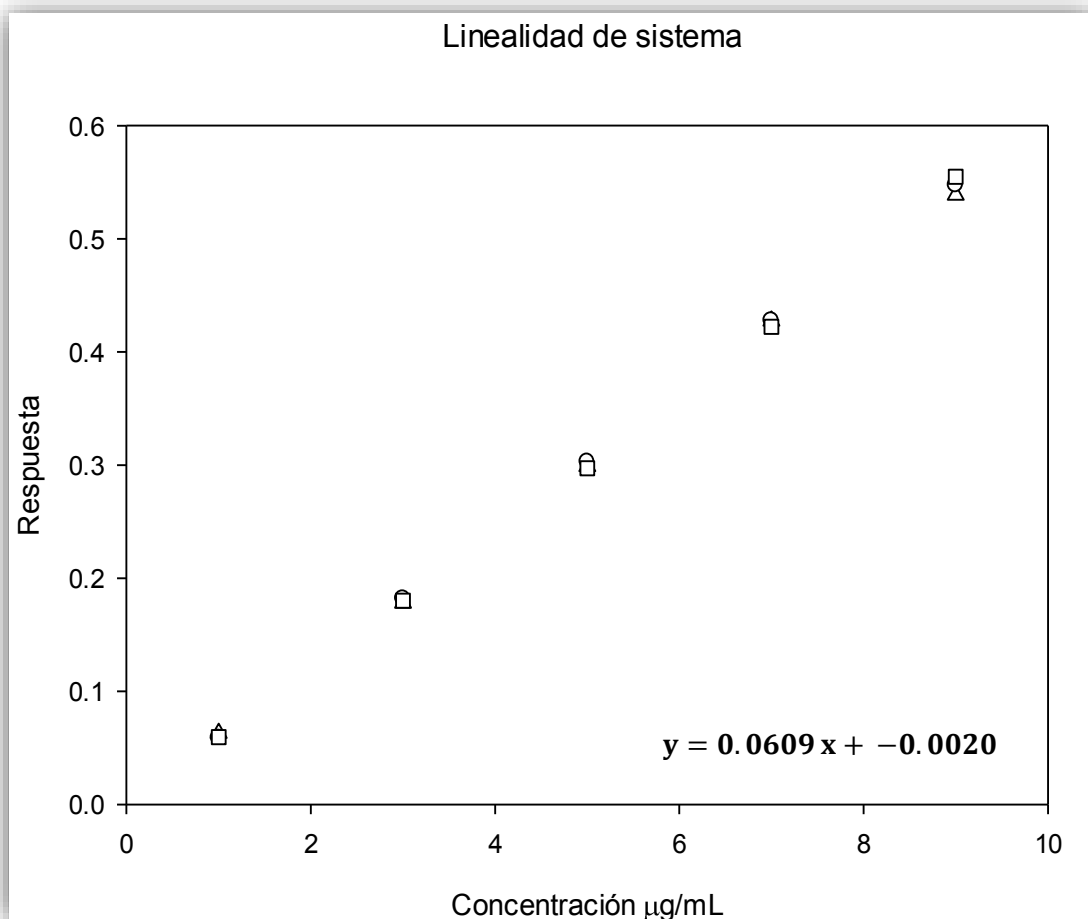
La comprobación del coeficiente de determinación se realizó mediante un análisis de varianza (ANADEVA), ver anexo II. Se calcularon los valores de F calculada y F de tablas, en este caso, sí la F calculada para la regresión es mayor a la F de tablas, existe una relación lineal significativa entre la concentración y la respuesta, de acuerdo a los resultados mostrados en la tabla 4, hay linealidad en el sistema.<sup>34</sup>

Con los datos anteriores se determinó la ecuación de la recta y se construyó un gráfico con las respuestas que se obtuvieron en cada repetición, ver gráfica 1.

La linealidad del sistema indica que la respuesta obtenida por parte del equipo es proporcional a la concentración del analito en un determinado intervalo de concentraciones.<sup>37</sup> Para evaluar la linealidad se empleó un modelo matemático que determinara que hay una relación entre la respuesta y la concentración del analito, dicho modelo matemático es la regresión, que consiste en calcular tres parámetros importantes ( $m$ ,  $b$  y  $r^2$ ), que a su vez son evaluados con pruebas estadísticas. En este caso,  $m$  y  $b$  se evaluaron con la prueba estadística  $t$  de Student en el que se hizo una comparación del valor obtenido con respecto al valor de referencia, para la linealidad del sistema se obtuvo que tanto  $m$  y  $b$  cumplen con dicha especificación, por lo que se asegura con un 95 % de confianza que existe una relación lineal directa entre la concentración del analito y la respuesta obtenida, por lo tanto, la respuesta del analito aumenta a medida que la concentración aumenta.<sup>36</sup>

Otro parámetro importante es  $r^2$  el cual debía ser mayor a 0.98. Mientras mayor sea el valor de  $r^2$  hay una mayor probabilidad de que la variación entre los datos de respuesta pueda ser explicada por el modelo de regresión lineal y que además, se encuentren dentro de la recta de regresión.<sup>36</sup> Este parámetro a diferencia de los otros dos se evaluó con ANADEVA, el cual corrobora que la variación del conjunto de datos es debida al

modelo y no al azar con un 95% de confianza, lo que permite establecer estadísticamente que el resultado de la muestra estudiada es representativa de la población y que por lo tanto, el sistema es lineal en el intervalo de concentraciones estudiado.<sup>34</sup>



Gráfica 1. Linealidad de sistema

### 8.2.2 Precisión de sistema

Se calculó la respuesta de seis determinaciones correspondientes al 100 % de la concentración, en este caso 7 µg/mL, con las área bajo la curva de glibenclamida y estándar interno, se calculó la respuesta, posteriormente el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación, tabla 5.

Especificación	Resultado
CV≤3%	CV=1.8904

Tabla 5. Variación en precisión de sistema

La precisión de sistema indica el grado de concordancia que existe entre las respuestas obtenidas bajo ciertas condiciones de análisis establecidas y a partir de diferentes muestras a una misma concentración, y se reporta como coeficiente de variación (CV).<sup>34, 37</sup> Sin embargo, para comprobar que el CV cumple con la especificación se hace una prueba estadística con Ji cuadrada ( $X^2$ ), la cual es una medida del grado de concordancia que hay entre el valor obtenido y el valor esperado en una determinación dada sin importar el número de determinaciones que se hagan,<sup>36</sup> Los resultados se muestran en la tabla 6.

Prueba de Ji cuadrada	
Parámetro	$CV \leq 3\%$
$X^2_{\text{calc}}$	4.467
$X^2_{\text{tablas}}$	11.070
Criterio	$X^2_{\text{calc}} < X^2_{\text{tablas}}$
Decisión	Existe precisión

Tabla 6. Resultado de prueba con Ji cuadrada

El análisis estadístico para la comprobación de precisión de sistema se llevó a cabo estableciendo dos hipótesis, la  $H_0$  en la cual el  $CV \leq 3\%$  y la  $H_A$  en la que el  $CV > 3\%$ . Se calculó la prueba estadística  $X^2$  con un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ , ver anexo II. El criterio de aceptación en este caso es que  $X^2$  calculada debe ser menor a  $X^2$  de tablas, de acuerdo a los resultados mostrados en la tabla 6, se acepta la  $H_0$ , y de acuerdo a esto se concluye que existe precisión en el sistema con un 95 % de confianza<sup>36</sup>, esto significa que la variación que se presenta entre las muestras analizadas es representativa del total de las muestras, por lo que si se obtienen muestras aleatorias a una misma concentración, las respuestas obtenidas serán cercanas entre sí.

---

## 8.3 Validación de método

### 8.3.1 Selectividad

El objetivo de este parámetro es asegurar que no hay señales que interfieran con la señal del analito de interés y del estándar interno, es decir, que la respuesta analítica por parte del analito y del estándar interno es inequívoca. Para evaluar este parámetro se probaron diferentes soluciones en plasma, de las cuales se obtuvo lo siguiente, ver figura 7.

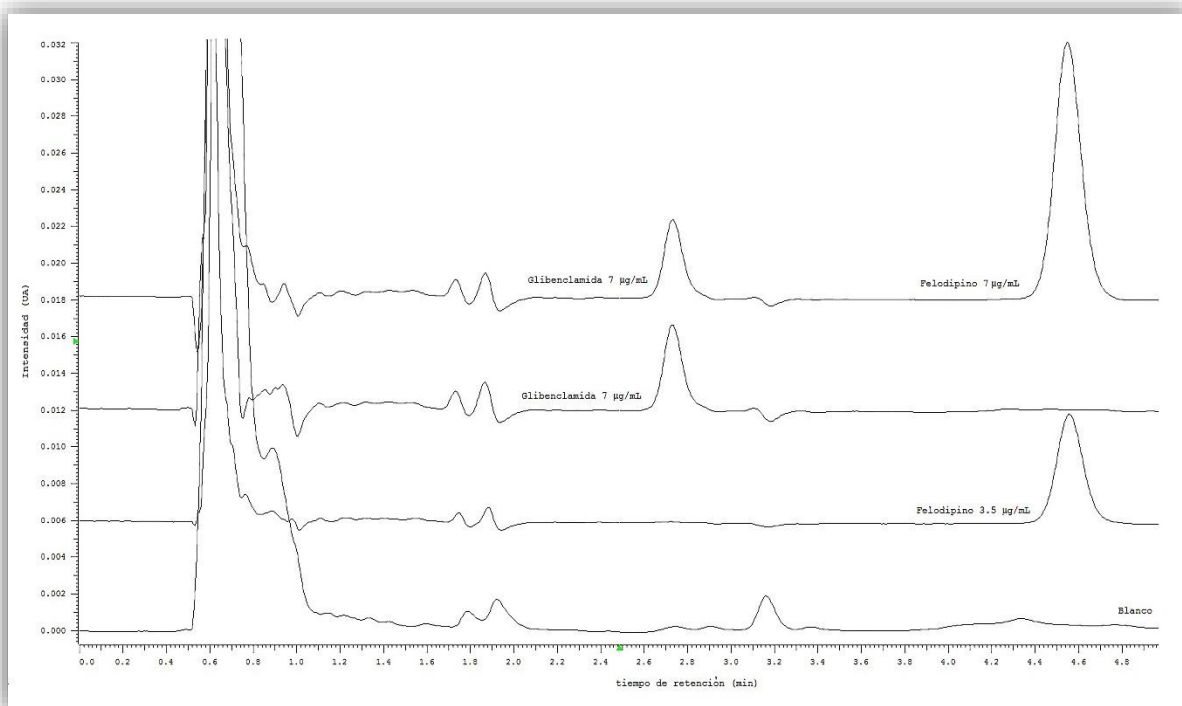


Figura 7. Selectividad de método

La figura anterior demuestra que no hay picos que interfieran tanto con la señal del analito como con la del estándar interno, además, la separación entre ellos nos ayuda a obtener una mayor resolución. En este caso para calcular la resolución se obtuvo el tiempo de retención de ambos picos así como el ancho de la base del pico. Para calcular el ancho de la base del pico se utilizó una técnica en la que se trazan dos tangentes a partir de la altura máxima del pico hasta intersectar con el eje del tiempo (X). Posteriormente, se mide la distancia que hay entre las líneas y se calcula la resolución.



---

La resolución que se obtuvo entre el pico cromatográfico de la glibenclamida y del estándar interno es de 9.07. De acuerdo a la teoría, un valor de resolución mayor o igual a 1.5 asegura que los componentes de la muestra están bien separados y por lo tanto, el área o altura del pico pueden ser cuantificados con precisión.<sup>18, 33</sup>

Para demostrar la selectividad se pueden considerar dos criterios de aceptación, el primero es que no existen picos de interferencia con el pico cromatográfico del analito, y el segundo implica una resolución mínima de 1.5 entre el pico del analito de interés y el pico adyacente.<sup>33</sup> De acuerdo con los resultados obtenidos en este parámetro, el método cumple con especificidad, esto es que el método analítico es capaz de diferenciar tanto al analito como al estándar interno de algún otro compuesto que se pueda presentar en la muestra, sin embargo para corroborar de una manera más detallada este parámetro se tienen que evaluar los metabolitos de la glibenclamida, así como sus posibles productos de degradación, en este trabajo no se pudieron evaluar ya que no se contaba con los metabolitos y/o productos de degradación.

### 8.3.2 Límite de cuantificación y detección

El objetivo de este proyecto es desarrollar un método que sea capaz de cuantificar un fármaco de interés en una matriz biológica y poder llevar a cabo estudios farmacocinéticos en los cuales se esperan concentraciones relativamente bajas, por lo tanto es importante determinar el límite de cuantificación y de detección.

Se probaron cuatro concentraciones de las cuales se calculó el coeficiente de variación, los resultados se muestran en la tabla 7.

Concentración µg/mL	CV
0.5	7.6674
0.35	4.0690
0.25	5.6067
0.1	-----

Tabla 7. Concentraciones evaluadas para establecer LC y LD,  
\*----- se obtuvo señal pero no se cuantificó.

De acuerdo con la tabla anterior, la concentración para el límite de cuantificación se encuentra por debajo de la concentración de especificación, siendo de 0.25 µg/mL el límite para cuantificar al analito en la matriz biológica, mientras que el límite de detección

---

es a una concentración de 0.1 µg/mL. Esto significa que se pueden cuantificar concentraciones menores a 0.25 µg/mL y mayores a 0.1 µg/mL. <sup>33</sup>

### 8.3.3 Linealidad del método

La linealidad del método se evaluó en el intervalo de concentraciones que se utilizaron en linealidad de sistema, la diferencia en este caso es la prueba con una matriz biológica y así poder asegurar que independientemente de la matriz que se utilice, sea metanol o una matriz biológica, plasma, las respuestas serán proporcionales a la concentración del analito.

Con las áreas bajo la curva de glibenclamida y de estándar interno se calculó la respuesta para cada nivel de concentración y repetición. Se calculó la regresión lineal por el método de mínimos cuadrados y se obtuvieron los coeficientes de regresión (m y b), así como el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), ver tabla 8.

Especificación	Resultado
m≠0	m=0.0319
b=0	b=-0.0062
$r^2 \geq 0.98$	$r^2=0.9903$

Tabla 8. Coeficientes de regresión y coeficiente de determinación

La linealidad del método se debe de demostrar comprobando que la pendiente de la ecuación de la curva de calibración es estadísticamente diferente de cero, que la ordenada al origen o intercepto es igual a cero y que el coeficiente de determinación no es diferente de 1. <sup>39</sup> Para la comprobación se realizó un análisis estadístico utilizando t de Student para la pendiente (m) y la ordenada al origen (b) con un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ , de esta se asegura con un 95% de confianza que hay relación lineal entre la concentración y la respuesta y por lo tanto no hay diferencia significativa entre el valor obtenido y el valor de referencia, <sup>38</sup> Véase tabla 9.

Prueba t de Student para m y b		
Parámetro	m=0	b=0
t <sub>calc</sub>	36.4689	1.2235
t <sub>tablas</sub>	2.145	2.145
Criterio	t <sub>calc</sub> < t <sub>tablas</sub>	
Decisión	m ≠ 0	b = 0

Tabla 9. Resultados de prueba con t de Student

La comprobación de los coeficientes de regresión se llevó a cabo planteando dos hipótesis, una hipótesis nula ( $H_0$ ) y una hipótesis alterna ( $H_A$ ) para cada coeficiente de regresión. Para la comprobación de la pendiente la  $H_0$  fue  $m=0$  y la  $H_A$ :  $m \neq 0$ , se calculó el estadístico de prueba t de Student (ver anexo II) y con base al criterio de aceptación se decidió qué hipótesis era la que se aceptaba. Para el estadígrafo t de Student, la t calculada debe de ser menor a la t de tablas para poder aceptar la  $H_0$ , de lo contrario la  $H_A$  se acepta. Las hipótesis planteadas para la ordenada al origen son,  $H_0$ :  $b=0$ ,  $H_A$ :  $b \neq 0$  y se llevó a cabo el cálculo del estadístico de prueba t de Student.

Con base a los resultados mostrados en la tabla 9, para la pendiente la hipótesis nula se rechazó concluyendo que esta es diferente de cero, mientras que la ordenada al origen es igual de cero ya que la hipótesis nula se aceptó, esto con un 95 % de confianza, lo que significa que la relación entre las variables concentración-respuesta es lineal directa, de tal manera que a medida que aumenta la concentración del analito la respuesta también aumenta. Una vez comprobados los coeficientes de regresión se puede obtener la ecuación de la recta y así poder predecir o estimar el valor de una de las variables que corresponda al valor de otra variable.<sup>36</sup>

Para la comprobación del coeficiente de determinación se construyó una tabla de análisis de varianza (ANADEVA), ver anexo II y se calculó el estadístico de prueba, en este caso F de Fisher. El criterio de aceptación es que la F calculada debe de ser mayor a la F de tablas para asegurar que existe relación lineal significativa entre la respuesta y la concentración del analito, por lo tanto hay linealidad en el método.<sup>34</sup>

---



---

Prueba F de Fischer para la correlación lineal	
Parámetro	$r^2 \geq 0.98$
$F_{\text{calc}}$	1329.98
$F_{\text{tablas}}$	4.6672
Criterio	$F_{\text{calc}} > F_{\text{tablas}}$
Decisión	Existe correlación lineal

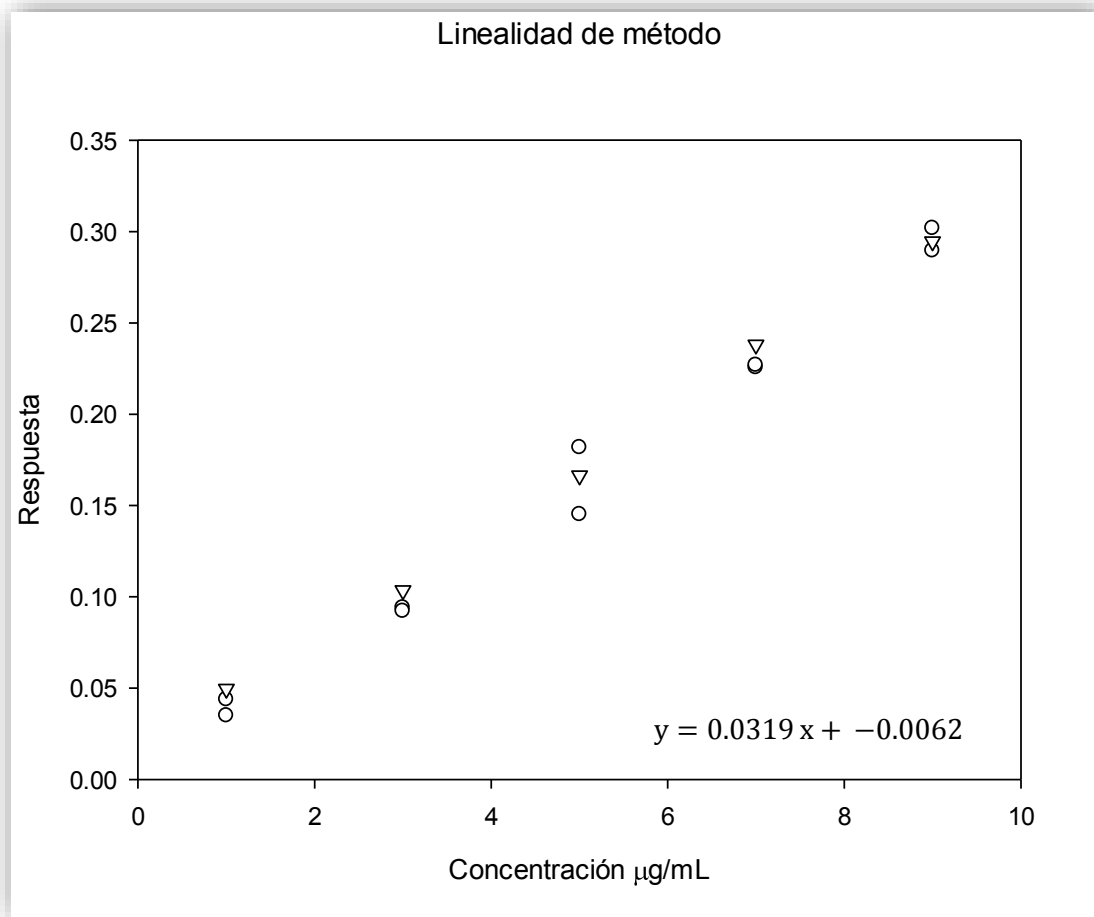
---

Tabla 10. Resultados de prueba con F de Fisher

De acuerdo a la tabla 10, el coeficiente de determinación es mayor a 0.98 ya que se cumple con el criterio de aceptación. De esta manera, hay una mayor probabilidad de que cualquier dato obtenido de manera aleatoria se ajuste al modelo matemático y se encuentre dentro de la curva de calibración obtenida.

Con los datos anteriores se determinó la ecuación de la recta y se construyó un gráfico con las respuestas que se obtuvieron en cada repetición, ver gráfica 2.

Se observa en la gráfica anterior que hay una mayor dispersión entre los datos, sin embargo al ser un método bioanalítico se permite que haya una mayor variación entre ellos, esto no significa que el método sea incorrecto solo que el rango de variación puede ser mayor ya que al utilizar una matriz biológica se pueden presentar cualquier tipo de interferencia que afecte los resultados. Por lo tanto, es necesario que se lleve a cabo la comprobación de los datos con un análisis estadístico y de esta manera asegurar que cualquier muestra obtenida de manera aleatoria y que se encuentre dentro del rango de concentración (1-9  $\mu\text{g/mL}$ ), obtendrá una respuesta proporcional a la concentración y que además el valor obtenido estará dentro de la curva de calibración. Con los resultados anteriores se asegura con un 95% de confianza que cualquier dato dentro del intervalo de concentraciones cumplirá con linealidad.<sup>36, 39-40</sup>



Gráfica 2. Linealidad de método

### 8.3.4 Precisión

#### 8.3.4.1 Repetibilidad

Se evaluaron muestras por quintuplicado, en un intervalo de concentración de 5-9 µg/mL. Con las ABC de glibenclamida y estándar interno se calculó la respuesta y con la ecuación de la recta obtenida en linealidad de método se calculó el porcentaje de recobro para cada determinación. Posteriormente se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación, el cual se muestra en la tabla 11.

Especificación	Resultado
CV ≤ 15%	CV = 5.5460

Tabla 11. Variación en precisión de sistema

La repetibilidad de método expresa la concordancia que hay entre los datos bajo las mismas condiciones de operación y se expresa en CV <sup>37</sup>. Como se muestra en la tabla 11, el coeficiente de variación obtenido cumple con la especificación siendo este menor al 15 %, sin embargo, se debe de llevar a cabo el análisis estadístico de los datos para asegurar que sin importar el número de determinaciones que se hagan, siempre y cuando se realicen bajo las mismas condiciones de análisis, los coeficientes de variación obtenidos a partir de diferentes determinaciones tendrán un cierto grado de concordancia. <sup>36</sup> En este caso, el estadístico de prueba que se utiliza es Ji cuadrada ( $X^2$ ), los resultados obtenidos se muestran en la tabla 12.

Prueba de Ji cuadrada	
Parámetro	$CV \leq 15\%$
$X^2_{\text{calc}}$	1.9138
$X^2_{\text{tablas}}$	23.6848
Criterio	$X^2_{\text{calc}} < X^2_{\text{tablas}}$
Decisión	Existe repetibilidad

Tabla 12. Resultado de la prueba con Ji cuadrada

La comprobación de repetibilidad se realizó con el estadístico de prueba  $X^2$  con un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ . Se plantearon dos hipótesis, la  $H_0$  en donde el  $CV \leq 15\%$  y la  $H_A$  en donde el  $CV > 15\%$ . Se calculó el estadístico de prueba, ver anexo II, y se hizo el contraste de los datos obtenidos. De acuerdo al criterio de aceptación,  $X^2$  calculada debe de ser menor a  $X^2$  de tablas para aceptar la  $H_0$ , de esta manera se concluye que el CV es menor al 15% con un 95% de confianza, esto significa que si se obtienen muestras aleatorias a una misma concentración, las respuestas obtenidas serán cercanas entre sí.

#### 8.3.4.2 Precisión intermedia

Dos analistas evaluaron por triplicado muestras equivalentes al 100% de la concentración en dos días diferentes, con las respuestas obtenidas se llevó acabo el tratamiento de los datos el cual consistió en un análisis de varianza de dos factores, ver anexo II. De esta manera se determinó que hay precisión entre los analistas y los días, y que sin importar el día de trabajo, así como el analista, los resultados obtenidos presentaran un grado de concordancia entre sí, siempre y cuando se trabaje bajo las

mismas condiciones de análisis. En el ANADEVVA se considera la interacción de analista-día, en este caso se presenta una interacción entre ambos factores ya que no cumple con el criterio de especificación el cual es, que F calculada debe de estar dentro del intervalo de F de tablas <sup>34</sup>. El nivel de significancia es de  $\alpha = 0.05$ . Los resultados se muestran a continuación en la tabla 13.

Fuente de variación	F <sub>calc</sub>	F <sub>tablas</sub>	Decisión
Analista	0.37		Existe precisión
Día	4.28	0.0010- 7.5709	Existe precisión
Analista-día	31.11		No existe precisión

Tabla 13. Tabla de ANADEVVA

El objetivo del análisis de varianza es comparar las medias poblacionales de los factores que se están evaluando y observar si existe interacción entre estos dos, en este caso entre analista y día. De acuerdo con la tabla anterior existe precisión entre los analistas y entre los días pero se presenta una interacción entre los factores analista-día, esto significa que independientemente del analista, cualquier de ellos que lleve a cabo el trabajo analítico y que tenga suficiente pericia analítica obtendrá resultados similares entre sí <sup>34</sup>.

La prueba estadística con F de Fisher muestra que el método es estadísticamente preciso bajo las fuentes de variación día y analista, ya que la variación del conjunto de datos es independiente de dichos factores y que puede verse afectada por la interacción entre ellos, evaluado con un nivel de significancia del 0.05. Esto quiere decir que el 95 % de las muestras analizadas por uno u otro analista en uno u otro día, cumplen con dicho parámetro.

### 8.3.5 Exactitud

La exactitud se evaluó usando los resultados obtenidos en linealidad de método, sin embargo el tratamiento de los datos fue distinto. En este caso se calculó el porcentaje de recobro de cada respuesta obtenida a partir de la ecuación de la recta. Para evaluar el parámetro de exactitud sólo se calculó el promedio de los % de recobro obtenidos, ver tabla 14.

Especificación	Resultado
$\mu=100\%$	$\bar{x}=102.04$

Tabla 14. Promedio de % de recobro para evaluar exactitud

La exactitud de un método se refiere a la diferencia que hay entre el promedio de un conjunto de datos y un valor verdadero. En este caso el valor verdadero se refiere a la concentración de analito conocida que se agregó a la matriz biológica, esta concentración corresponde al 100%. Para evaluar si el promedio difiere significativamente del valor verdadero se hace una comprobación estadística con t de Student <sup>40</sup> tabla 15.

Prueba t de Student	
Parámetro	$\mu=100\%$
$t_{calc}$	0.6429
$t_{tablas}$	2.1448
Criterio	$t_{calc} < t_{tablas}$
Decisión	Es exacto

Tabla 15. Resultados de prueba con t de Student

Para hacer la comprobación estadística se plantearon dos hipótesis, la  $H_0: \mu=100\%$  y la  $H_A: \mu \neq 100\%$ . Se calculó el estadístico de prueba t de Student con un nivel de significancia  $\alpha=0.05$ , ver anexo II, y de acuerdo al criterio de aceptación, la t calculada debe de ser menor a la t de tablas para aceptar la  $H_0$ . De acuerdo a la tabla 15, la  $H_0$  se acepta ya que la t calculada es menor a la t de tablas, de esta manera se concluye que el método es exacto ya que no hay una diferencia significativa entre el valor promedio y el valor verdadero o de referencia, por lo tanto, se asegura con un 95 % de confianza que los datos obtenidos de manera aleatoria y bajo las mismas condiciones de análisis presentaran concordancia con respecto a un valor esperado.<sup>36, 40</sup>

### 8.3.6 Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente

Las muestras se prepararon a una concentración equivalente al 100 % de la concentración, en este caso 7  $\mu\text{g/mL}$ , se almacenaron a temperatura ambiente y se hizo el muestreo cada determinado tiempo para su posterior inyección. Con el ABC de la



glibenclamida y de estándar interno se calculó la respuesta, posteriormente se calculó la cantidad de analito recuperado a partir de la ecuación de la recta obtenida en linealidad de sistema. Se calculó la desviación estándar para cada intervalo de tiempo y se hizo un análisis estadístico con Ji cuadrada. Los resultados se muestran en la tabla 16.

Tiempo	Desviación estándar	$X^2_{\text{calc}}$	$X^2_{\text{tablas}}$	Criterio	Decisión
0 min	0.11533	0.0241			Estable
30 min	0.28663	0.1490			Estable
1 h	0.01834	0.0006			Estable
2 h	0.20248	0.0744	5.9915	$X^2_{\text{calc}} < X^2_{\text{tablas}}$	Estable
4 h	0.09407	0.0161			Estable
6 h	0.76941	1.0739			Estable
24 h	0.57781	0.6057			Estable

Tabla 16. Análisis estadístico con Ji cuadrada para estabilidad T ambiente.

Para asegurar que la muestra es estable bajo ciertas condiciones de almacenamiento se debe de comprobar que la concentración promedio para cada intervalo de tiempo está dentro del 15 % de la concentración nominal, en este caso 7 µg/mL.<sup>32</sup> Sin embargo, para realizar el análisis estadístico no se puede comparar una media contra un porcentaje, tampoco se puede hacer una comparación de medias con t de Student ya que esta prueba solo mostraría que se presenta una diferencia significativa entre el promedio de las concentraciones y la concentración nominal, sin demostrar que la muestra cumple con la especificación.<sup>36</sup> Por lo tanto, se hace un análisis estadístico con Ji cuadrada utilizando la desviación estándar para cada intervalo de tiempo y comparándola contra la concentración que corresponde al 15 % de la concentración nominal.

De acuerdo con la especificación, se calculó la concentración que corresponde al 15 % de 7 µg/mL, la cual es 1.05 µg/mL. Las hipótesis que se plantearon en este caso son:  $H_0: \sigma \leq 15\%$ ,  $H_A: \sigma > 15\%$ , sin embargo, el cálculo para el estadígrafo de prueba se hizo comparando la desviación estándar de cada intervalo de tiempo contra 1.05 µg/mL. (Ver anexo II). En este caso, para asegurar que la concentración promedio de cada intervalo de tiempo no cambia en más del 15 % con respecto a la concentración nominal,  $X^2$  calculada debe de ser menor a  $X^2$  de tablas. Con base a los resultados mostrados en la

tabla 16, se concluye que las muestras cumplen con la especificación, con un 95 % de confianza. Por lo tanto, las muestras son estables a temperatura ambiente en un intervalo de 24 horas.

### 8.3.7 Estabilidad ciclo congelación-descongelación

Las muestras se prepararon a una concentración de 7 µg/mL y se sometieron a ciclos de congelación y descongelación. Se hicieron al menos 3 ciclos y se calculó la respuesta con el ABC de la glibenclamida y el estándar interno, posteriormente se calculó la cantidad de analito recuperado y con los datos obtenidos se calculó la desviación estándar para cada ciclo de congelación-descongelación.

La comprobación de los datos se llevó a cabo de la misma manera que en estabilidad a temperatura ambiente ya que la especificación es la misma. Los resultados se muestran en la tabla 17.

Ciclo	Desviación estándar	$X^2_{\text{calc}}$	$X^2_{\text{tablas}}$	Criterio	Decisión
0	0.0989	0.0177			Estable
1	0.4631	0.3890			Estable
2	0.6697	0.8136	5.9915	$X^2_{\text{calc}} < X^2_{\text{tablas}}$	Estable
3	1.9979	7.2407			<b>No es estable</b>

Tabla 17. Análisis estadístico con Ji cuadrada para estabilidad congelación-descongelación.

Los resultados del análisis estadístico muestran con un 95 % de confianza que las muestras son estables hasta el segundo ciclo de congelación-descongelación. En particular, también se consideró la estabilidad del estándar interno, ya que cuando se evaluó esta estabilidad, la solución de estándar interno, preparada en ácido acético con metanol al 1%, se sometió a refrigeración sin considerar que la molécula de felodipino es susceptible a sufrir hidrólisis acida <sup>41, 42</sup>, de tal manera que el cálculo de las respuestas se vio afectado debido a la disminución del ABC del felodipino. Sin embargo, en la estabilidad se evaluó a la muestra en general, resultando no ser estable en el tercer ciclo, a pesar de lo anterior se recomienda que la solución de estándar interno se prepare cada día de trabajo.

---

### 8.3.8 Estabilidad en automuestreador

Se hizo el tratamiento de las muestras preparadas a una concentración de 7 µg/mL y se colocaron en el automuestreador, las muestras se inyectaron cada media hora durante cuatro horas de análisis. Se calculó la respuesta y con los datos se obtuvo la concentración de analito recuperado. Se calculó la desviación estándar para cada intervalo de tiempo y se hizo el análisis estadístico con Ji cuadrada.

La comprobación de los datos se llevó a cabo de la misma manera que en estabilidad a temperatura ambiente ya que la especificación es la misma. Los resultados se muestran en la tabla 18.

Tiempo	Desviación estándar	$X^2_{\text{calc}}$	$X^2_{\text{tablas}}$	Criterio	Decisión
0 h	0.4631	0.3890			Estable
30 min	0.4811	0.4199			Estable
1 h	0.4597	0.3834			Estable
1.5 h	0.4522	0.3710			Estable
2 h	0.4487	0.3652	5.9915	$X^2_{\text{calc}} < X^2_{\text{tablas}}$	Estable
2.5 h	0.4601	0.3840			Estable
3 h	0.4646	0.3916			Estable
3.5 h	0.4487	0.3652			Estable
4 h	0.4692	0.3994			Estable

Tabla 18. Análisis estadístico con Ji cuadrada para estabilidad en automuestreador

Con los resultados anteriores se demuestra que la muestra se mantiene estable después de llevarse a cabo el tratamiento de la misma por un tiempo de al menos 4 h, ya que la concentración promedio para cada intervalo de tiempo no varía en más del 15 % de la concentración nominal. Para comprobar los resultados obtenidos se realizó un análisis estadístico con Ji cuadrada en el que se evaluó la desviación estándar para cada intervalo de tiempo, obteniendo así, con un 95 % de confianza que las muestras son estables en el automuestreador.

Al evaluar la estabilidad de un analito se consideran diferentes tipos de estabildades, en este caso se probaron tres estabildades que aseguraran que el analito se mantendrá estable en la matriz biológica durante el estudio farmacocinético. La estabilidad a

---

temperatura ambiente se realizó para garantizar que la muestra de plasma que contiene al analito se mantendrá estable durante la toma y el manejo de muestra; por otro lado, ya que la muestra se almacena en congelación es importante evaluar su estabilidad lo cual se hizo evaluando ciclos de congelación y descongelación y así determinar que el cambio de temperatura no afecta al analito dentro de la muestra. Una vez evaluadas las condiciones anteriores, se consideró que cuando se lleva a cabo un estudio farmacocinético se pueden acumular muestras que tal vez después del tratamiento no sean estables, por lo que se evaluó su estabilidad en el automuestreador resultando que las muestras se mantienen estables por un tiempo de 4 h. <sup>31-32</sup>

Los valores de tablas de t de Student, F de Fisher y Ji cuadrada, fueron tomados de la referencia No. 43.

---

## 9 CONCLUSIONES

- Las condiciones cromatográficas seleccionadas durante el desarrollo del método, así como, el tratamiento de la muestras, fueron las adecuadas para llevar a cabo de manera rápida el análisis de glibenclamida en plasma de ratón por CLAR, permitiendo que se llevará acabo la validación del método.
- Se logró desarrollar un método analítico lineal y preciso capaz de cuantificar glibenclamida en plasma de ratón empleando una metodología con estándar interno de felodipino y utilizando CLAR-UV a 254 nm.

## 10.1 Preparación de soluciones

### 10.1.1 Fase móvil.

Preparar una fase móvil de solución amortiguadora de fosfatos pH 3.5, 0.05 M y acetonitrilo grado cromatográfico (GC) en una proporción 45:55 respectivamente. Filtrar a vacío a través de una membrana de nylon de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  y desgasificar por 30 min.

#### 10.1.1.1 Solución amortiguadora de fosfatos pH 3.5, 0.05 M.

Medir en una probeta un volumen de 500 mL de agua desionizada. Pesar 3.25 g de fosfato monobásico de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y disolver con un volumen de agua desionizada medida anteriormente. Agregar 0.07 mL de ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) a la solución anterior y medir el pH. Cuando el pH sea de 3.5, pesar 2 mg de octil sulfonato de sodio y agregar a la solución amortiguadora. Mantener con agitación continua.

Nota: En caso de no obtener el pH indicado, usar una solución de ácido clorhídrico (HCl) o de hidróxido de sodio (NaOH) 1 M para llegar al pH indicado.

#### 10.1.2 Solución de ácido acético al 1% en metanol.

Colocar en una probeta de 50 mL un volumen cercano a los 30 mL de metanol grado reactivo (GR). Con una pipeta graduada medir 0.5 mL de ácido acético glacial y agregar al metanol. Completar con metanol hasta llegar a un volumen de 50 mL. Agitar.

## 10.2 Método cromatográfico

- Columna; Columna C8 de 150 x 4.6 mm de diámetro, 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula
- Longitud de onda: 254 nm UV
- Velocidad de flujo: 2.2 mL/min
- Volumen de inyección: 25  $\mu\text{L}$
- Fase móvil: Solución amortiguadora de fosfatos pH 3.5, 0.05 M:ACN (45:55)

---

## 10.3 Validación de sistema

### 10.3.1 Linealidad

Preparar 5 niveles de concentración por triplicado a partir de una misma solución patrón, (tabla 19). Medir su concentración bajo las condiciones de análisis antes mencionadas en un mismo día.

1. Preparar una solución patrón de glibenclamida a una concentración de 0.1 mg/mL. Pesar 2.5 mg de glibenclamida y colocar en un matraz volumétrico de 25 mL. Disolver con metanol GC y llevar al aforo.
2. Preparar una solución de felodipino a una concentración de 0.07 mg/mL. Pesar 1.75 mg de felodipino y colocar en un matraz volumétrico de 25 mL. Disolver con metanol GC y llevar al aforo.
3. Tomar con micropipeta alícuotas de 100, 300, 500, 700 y 900  $\mu\text{L}$  de la solución patrón de glibenclamida y colocar por separado en matraces volumétricos de 10 mL.
4. A cada matraz volumétrico agregar 1 mL de solución de estándar de felodipino y llevar al aforo con MeOH GC. Agitar.
5. Realizar por triplicado los últimos dos puntos.
6. Usar como blanco metanol.

Solución patrón de glibenclamida	Alícuota	Solución de felodipino	Aforo con MeOH	Concentración final
0.1 mg/mL	100 $\mu\text{L}$	1 mL	10 mL	1.0 $\mu\text{g/mL}$
	300 $\mu\text{L}$	1 mL	10 mL	3.0 $\mu\text{g/mL}$
	500 $\mu\text{L}$	1 mL	10 mL	5.0 $\mu\text{g/mL}$
	700 $\mu\text{L}$	1 mL	10 mL	7.0 $\mu\text{g/mL}$
	900 $\mu\text{L}$	1 mL	10 mL	9.0 $\mu\text{g/mL}$

Tabla 19. Linealidad de sistema

7. Inyectar las muestras con las condiciones cromatográficas mencionadas en el numeral 10.2.

- 
8. Calcular la respuesta con el área bajo la curva (ABC) de los cromatogramas. Dividir el ABC de glibenclamida entre el ABC del felodipino de cada muestra inyectada.
  9. Calcular la pendiente (m), ordenada al origen (b) y coeficiente de determinación ( $r^2$ ) por regresión lineal con las respuestas obtenidas.
  10. Construir una curva de calibración concentración vs respuesta con cada una de las respuestas obtenidas para cada nivel de concentración.
  11. Evaluar  $m \neq 0$  y  $b=0$  con la prueba estadística t de Student, con un nivel de significancia de 0.05.
  12. Evaluar  $r^2 \geq 0.98$  con la prueba estadística de F de Fisher, con un nivel de significancia de 0.05.
  13. Criterio de aceptación:
    - $r^2 \geq 0.98$
    - $m \neq 0$
    - $b=0$

### **10.3.2 Precisión**

Preparar por sextuplicado un solo nivel de concentración correspondiente al 100% a partir de una misma solución patrón. Medir su concentración bajo las condiciones de análisis antes mencionadas en un mismo día.

1. Preparar una solución patrón de glibenclamida a una concentración de 0.1 mg/mL. Pesar 2.5 mg de glibenclamida y colocar en un matraz volumétrico de 25 mL. Disolver con metanol GC y llevar al aforo.
2. Preparar una solución de felodipino a una concentración de 0.07 mg/mL. Pesar 1.75 mg de felodipino y colocar en un matraz volumétrico de 25 mL. Disolver con metanol GC y llevar al aforo.
3. Tomar con micropipeta 6 alícuotas de 700  $\mu$ L de la solución patrón de glibenclamida y colocar por separado en matraces volumétricos de 10 mL.



- 
4. Agregar a cada matraz volumétrico 1 mL de solución de felodipino y llevar al aforo con MeOH GC. Agitar.
  5. Usar como blanco metanol.
  6. Inyectar las muestras con las condiciones de cromatográficas mencionadas en el numeral 10.2.
  7. Calcular la respuesta dividiendo el ABC de la glibenclamida entre el ABC del felodipino.
  8. Con los datos de respuesta, calcular promedio ( $\bar{x}$ ), desviación estándar ( $\sigma$ ) y coeficiente de variación (CV).
  9. Realizar un análisis estadístico con una prueba de Ji cuadrada ( $\chi^2$ ).
  10. Criterio de aceptación:
    - $CV \leq 3\%$

#### **10.4 Validación de método**

##### **10.4.1 Especificidad de método**

Evaluar todas las posibles interferencias que se puedan presentar cuando se lleva a cabo el análisis de las muestras.

1. Preparar las siguientes muestras en una proporción de 1:2 en tubo eppendorf.
    - a. Plasma + Solución de estándar de felodipino (7  $\mu\text{g/mL}$ )
    - b. Plasma + Solución de glibenclamida (7  $\mu\text{g/mL}$ )
    - c. Plasma + Solución de ácido acético en metanol al 1%
    - d. Plasma + Solución estándar de felodipino (7  $\mu\text{g/mL}$ ) + Solución. de glibenclamida (7  $\mu\text{g/mL}$ ) + Solución de ácido acético al 1% en metanol
  2. Centrifugar las muestras a 5000 rpm durante 10 min.
  3. Tomar el sobrenadante e inyectar en el cromatógrafo bajo las condiciones cromatográficas mencionadas en el numeral 10.2.
-

---

#### 4. Criterio de aceptación

- La resolución entre el pico del analito de interés y el pico de cualquier otro compuesto presente en la muestra, debe ser de mínimo de 1.6. (Anexo II)

#### 10.4.2 Límite de cuantificación (LC) y límite de detección (LD)

LC: Determinar con base al 5% de la concentración máxima reportada para el analito de interés, en este caso de 7 µg/mL.

LD: Concentración más baja de analito en la muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada.

1. Preparar una solución patrón de glibenclamida a una concentración de 0.1 mg/mL. Pesar 2.5 mg de glibenclamida y colocar en un matraz volumétrico de 25 mL, disolver con metanol GC y llevar al aforo.
2. Preparar una solución de felodipino a una concentración de 7 µg/mL. Pesar 1.75 mg de felodipino y colocar en un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y llevar al aforo con metanol GC. Tomar con pipeta volumétrica 1 mL de la solución anterior y colocar en un matraz volumétrico de 25 mL. Aforar con solución de AcOH/MeOH grado reactivo (GR) al 1% y agitar.
3. Tomar con micropipeta alícuotas de 10, 25, 35 y 50 µL de la solución patrón de glibenclamida y colocar por separado en matraces volumétricos de 10 mL, ver tabla 20. Llevar al aforo con plasma y agitar en vortex durante 1 min.

Solución patrón de glibenclamida	Alícuota	Aforo con plasma	Concentración final
0.1 mg/mL	50 µL	10 mL	0.5 µg/mL
	35 µL	10 mL	0.35 µg/mL
	25 µL	10 mL	0.25 µg/mL
	10 µL	10 mL	0.10 µg/mL

Tabla 20. Límite de cuantificación y de detección de método

4. Colocar en un tubo eppendorf 1 mL de solución de felodipino a 7 µg/mL y 0.5 mL de cada solución de glibenclamida.

- 
5. Preparar un blanco de la siguiente manera: Colocar en un tubo eppendorf 1 mL de solución de AcOH/MeOH al 1% y 0.5 mL de plasma.
  6. Centrifugar las muestras durante 10 min a una velocidad de 5000 rpm.
  7. Tomar el sobrenadante y colocar en viales. Inyectar las muestras con las condiciones cromatográficas mencionadas en el numeral 10.2.
  8. Calcular la respuesta dividiendo el ABC de la glibenclamida entre el ABC del felodipino.
  9. Calcular el promedio de la respuesta, desviación estándar y coeficiente de variación.
  10. Criterio de aceptación:
    - LC: La respuesta del analito en el límite de cuantificación debe ser al menos 5 veces la respuesta comparada con el blanco.
    - LD: La señal proporcionada por glibenclamida puede distinguirse cerca de la línea base del cromatograma.

#### **10.4.3 Linealidad**

Preparar 5 niveles de concentración por triplicado a partir de una misma solución patrón, (tabla 21). Medir su concentración bajo las mismas condiciones de análisis antes mencionadas en un mismo día.

1. Preparar una solución patrón de glibenclamida a una concentración de 0.1 mg/mL. Pesar 2.5 mg de glibenclamida y colocar en un matraz aforado de 25 mL, disolver con metanol GC y llevar al aforo.
  2. Preparar una solución de estándar de felodipino a una concentración de 7 µg/mL. Pesar 1.75 mg de felodipino y colocar en un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y llevar al aforo con metanol GC. Tomar 1 mL de la solución anterior y colocar en un matraz aforado de 25 mL y llevar al aforo con solución de AcOH/MeOH GR al 1%.
  3. Tomar con micropipeta alícuotas de 100, 300, 500, 700. y 900 µL de la solución de glibenclamida y colocar por separado en matraces volumétricos de 10 mL. Llevar al aforo con plasma y agitar en vortex durante 1 min. Realizar por triplicado.
-

Solución patrón de glibenclamida	Alícuota	Aforo con plasma	Concentración
0.1 mg/mL	100 $\mu$ L	10 mL	1.0 $\mu$ g/mL
	300 $\mu$ L	10 mL	3.0 $\mu$ g/mL
	500 $\mu$ L	10 mL	5.0 $\mu$ g/mL
	700 $\mu$ L	10 mL	7.0 $\mu$ g/mL
	900 $\mu$ L	10 mL	9.0 $\mu$ g/mL

Tabla 21. Linealidad de método

4. Colocar en un tubo eppendorf 1 mL de la solución de felodipino a 7  $\mu$ g/mL y 0.5 mL de cada solución de glibenclamida.
5. Preparar un blanco de la siguiente manera: Colocar en un tubo eppendorf 1 mL de solución de AcOH/MeOH al 1% y 0.5 mL de plasma.
6. Centrifugar las muestras durante 10 min a una velocidad de 5000 rpm.
7. Tomar el sobrenadante y colocar en viales. Inyectar las muestras con las condiciones cromatográficas mencionadas en el numeral 10.2.
8. Calcular la respuesta dividiendo el ABC de la glibenclamida entre el ABC del felodipino.
9. Calcular la pendiente (m), ordenada al origen (b) y coeficiente de determinación ( $r^2$ ) por regresión lineal con las respuestas obtenidas.
10. Construir una curva de calibración concentración vs respuesta con las respuestas obtenidas para cada nivel de concentración y determinar la ecuación de la recta.
11. Evaluar  $m \neq 0$  y  $b = 0$  con la prueba estadística t de Student, con un nivel de significancia de 0.05.
12. Evaluar  $r^2 \geq 0.98$  con la prueba estadística F de Fisher, con un nivel de significancia de 0.05.

---

13. Criterio de aceptación:

- $r \geq 0.98$
- $m \neq 0$
- $b = 0$

#### 10.4.4 Precisión

##### 10.4.4.1 Repetibilidad

Preparar 3 niveles de concentración por quintuplicado a partir de una misma solución patrón (tabla 22). Medir su concentración bajo las mismas condiciones de análisis antes mencionadas en un mismo día.

1. Preparar una solución patrón de glibenclamida a una concentración de 0.1 mg/mL. Pesar 2.5 mg de glibenclamida y colocar en un matraz aforado de 25 mL, disolver con metanol GC y llevar al aforo.
2. Preparar una solución de estándar de felodipino a una concentración de 7 µg/mL. Pesar 1.75 mg de felodipino y colocar en un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y llevar al aforo con metanol GC. Tomar 1 mL de la solución anterior y colocar en un matraz aforado de 25 mL y llevar al aforo con solución de AcOH/MeOH GR al 1%.
3. Tomar con micropipeta alícuotas de 500, 700. y 900 µL de la solución de glibenclamida y colocar por separado en matraces volumétricos de 10 mL. Llevar al aforo con plasma y agitar en vortex durante 1 min. Realizar por triplicado.

Solución patrón de glibenclamida	Alícuota	Aforo con plasma	Concentración
0.1 mg/mL	500 µL	10 mL	5.0 µg/mL
	700 µL	10 mL	7.0 µg/mL
	900 µL	10 mL	9.0 µg/mL

Tabla 22. Repetibilidad de método

4. Colocar en un tubo eppendorf 1 mL de la solución de felodipino a 7 µg/mL y 0.5 mL de cada solución de glibenclamida.

- 
5. Preparar un blanco de la siguiente manera: Colocar en un tubo eppendorf 1 mL de solución de AcOH/MeOH al 1% y 0.5 mL de plasma.
  6. Centrifugar las muestras durante 10 min a una velocidad de 5000 rpm.
  7. Tomar el sobrenadante y colocar en viales. Inyectar las muestras con las condiciones cromatográficas mencionadas en el numeral 10.2.
  8. Calcular la respuesta dividiendo el ABC de la glibenclamida entre el ABC del felodipino.
  9. Calcular el porcentaje de recobro para cada respuesta con la ecuación de la recta obtenida en linealidad de método.
  10. Calcular el promedio de los % de recobro, desviación estándar y coeficiente de variación.
  11. Realizar un análisis estadístico con una prueba de Ji cuadrada ( $\chi^2$ ).
  12. Criterio de aceptación:
    - $CV \leq 15\%$

#### **10.4.4.2 Precisión intermedia**

Dos analistas deben preparar muestras por triplicado muestras correspondientes al 100 % de la concentración para cada día de trabajo. Dos días como mínimo.

1. Preparar una solución patrón de glibenclamida a una concentración de 0.1 mg/mL. Pesar 2.5 mg de glibenclamida y colocar en un matraz aforado de 25 mL, disolver con metanol GC y llevar al aforo.
2. Preparar una solución de estándar de felodipino a una concentración de 7  $\mu\text{g/mL}$ . Pesar 1.75 mg de felodipino y colocar en un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y llevar al aforo con metanol GC. Tomar 1 mL de la solución anterior y colocar en un matraz aforado de 25 mL y llevar al aforo con solución de AcOH/MeOH GR al 1%.

3. Tomar con micropipeta tres alícuotas de 700  $\mu\text{L}$  de la solución de glibenclamida y colocar por separado en matraces volumétricos de 10 mL. Llevar al aforo con plasma y agitar durante 1 min en vortex.
4. Colocar en un tubo eppendorf 1 mL de la solución de felodipino a 7  $\mu\text{g/mL}$  y 0.5 mL de cada solución de glibenclamida.
5. Preparar un blanco de la siguiente manera: En un tubo eppendorf colocar 1 mL de solución de AcOH/MeOH al 1% y 0.5 mL de plasma.
6. Centrifugar las muestras por 10 min a una velocidad de 5000 rpm.
7. Tomar el sobrenadante y colocar en viales. Inyectar las muestras con las condiciones cromatográficas mencionadas en el numeral 10.2.
8. Repetir el procedimiento en un día diferente con los mismos analistas.
9. Calcular las respuestas dividiendo el ABC de la glibenclamida entre el ABC del felodipino.

		Analista		$\sum_{\text{Días}}$
		1	2	
Día	1			
	2			
$\sum_{\text{Analistas}}$				$\sum_{A+D}$

$\sum_{A1D1}:$   
 $\sum_{A2D1}:$   
 $\sum_{A1D2}:$   
 $\sum_{A2D3}:$

Tabla 23. Precisión intermedia

10. Calcular las sumatorias ( $\sum_{i=0}^n$ )  $A_1D_1$ ,  $A_2D_1$ ,  $A_1D_2$ ,  $A_2D_2$ , la sumatoria de cada analista y la de cada día, y la sumatoria de todas las respuestas obtenidas.
11. Elaborar una tabla de ANDEVA y hacer el análisis estadístico con la prueba F de Fisher con un nivel de significancia de 0.05. (Anexo II).

---

## 12. Criterio de aceptación

- F calculada (analista) < F tablas; hay precisión entre analistas
- F calculada (día) < F tablas; hay precisión entre días
- F calculada (día-analista) < F tablas; no existe interacción entre analista-día

### 10.4.5 Exactitud

Usar los datos de linealidad de método.

1. Calcular la respuesta dividiendo el ABC de la glibenclamida entre el ABC del felodipino.
2. Calcular el porcentaje de recobro para cada respuesta con la ecuación de la recta obtenida en linealidad de método.
3. Calcular el promedio de los % de recobro obtenidos.
4. Hacer un análisis estadístico con una prueba de t de Student y un nivel de significancia de 0.05.
5. Criterio de aceptación.
  - $CV \leq 15\%$

### 10.4.6 Estabilidad de la muestra

Preparar por triplicado muestras equivalentes al 100 % de la concentración a partir de una misma solución patrón. Medir su concentración inmediatamente después de su preparación y después de someter las muestras a las condiciones de ensayo.

1. Monitorear la temperatura del laboratorio cada 30 min, desde el inicio del estudio de estabilidad hasta que termine.
2. Preparar una solución patrón de glibenclamida a una concentración de 0.1 mg/mL. Pesar 2.5 mg de glibenclamida y colocar en un matraz aforado de 25 mL, disolver con metanol GC y llevar al aforo.
3. Preparar una solución de estándar de felodipino a una concentración de 7 µg/mL. Pesar 1.75 mg de felodipino y colocar en un matraz volumétrico de 10 mL, disolver



- 
- y llevar al aforo con metanol GC. Tomar 1 mL de la solución anterior y colocar en un matraz aforado de 25 mL y llevar al aforo con solución de AcOH/MeOH GR al 1%.
4. Tomar con micropipeta tres alícuotas de 700  $\mu$ L de la solución de glibenclamida y colocar en diferentes matraces volumétricos de 10 mL. Aforar con plasma y agitar durante 1 min en vortex.
  5. Colocar en un tubo eppendorf 1 mL de la solución de felodipino a 7  $\mu$ g/mL y 0.5 mL de cada solución de glibenclamida.
  6. Preparar un blanco de la siguiente manera: Colocar en un tubo eppendorf 1 mL de solución de AcOH/MeOH al 1% y 0.5 mL de plasma.
  7. Centrifugar las muestras durante 10 min a una velocidad de 5000 rpm.
  8. Tomar el sobrenadante y colocar en viales. Inyectar las muestras con las condiciones cromatográficas mencionadas en el numeral 10.2.
  9. Almacenar las soluciones de glibenclamida y felodipino a temperatura ambiente.
  10. Tomar muestra en los siguientes intervalos de tiempo: 30 min, 1, 2, 4, 6 y 24 h. Repetir a partir del paso #5 y usar el blanco previamente preparado.
  11. Calcular la respuesta dividiendo el ABC de la glibenclamida entre el ABC del felodipino. Con las respuesta estimar el valor de la concentración de analito recuperado a partir de la ecuación de la recta de linealidad de sistema.
  12. Calcular la desviación estándar de las concentraciones de analito recuperado para cada intervalo de tiempo.
  13. Comparar la desviación estándar contra el 15 % de la concentración nominal. Usar Ji cuadrada para hacer el análisis estadístico con un nivel de significancia de 0.05.
  14. Criterio de aceptación:
    - La concentración promedio de cada intervalo de tiempo debe de estar dentro del 15 % de la concentración nominal.
-

---

#### 10.4.7 Estabilidad ciclos de congelación-descongelación

Preparar por triplicado muestras equivalentes al 100 % de la concentración a partir de una misma solución patrón. Medir su concentración inmediatamente después de su preparación, y después de someter las muestras a las condiciones de ensayo.

1. Monitorear la temperatura del laboratorio, así como la del congelador donde se van almacenar las muestras.
2. Preparar una solución patrón de glibenclamida a una concentración de 0.1 mg/mL. Pesar 2.5 mg de glibenclamida y colocar en un matraz aforado de 25 mL, disolver con metanol GC y llevar al aforo.
3. Preparar una solución de estándar de felodipino a una concentración de 7 µg/mL. Pesar 1.75 mg de felodipino y colocar en un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y llevar al aforo con metanol GC. Tomar 1 mL de la solución anterior y colocar en un matraz aforado de 25 mL y llevar al aforo con solución de AcOH/MeOH GR al 1%.
4. Tomar con micropipeta tres alícuotas de 700 µL de la solución de glibenclamida y colocar en diferentes matraces volumétricos de 10 mL. Aforar con plasma y agitar durante 1 min en vortex.
5. Colocar en un tubo eppendorf 1 mL de la solución de felodipino a 7 µg/mL y 0.5 mL de cada solución de glibenclamida.
6. Preparar un blanco de la siguiente manera: Colocar en un tubo eppendorf 1 mL de solución de AcOH/MeOH al 1% y 0.5 mL de plasma.
7. Centrifugar las muestras durante 10 min a una velocidad de 5000 rpm.
8. Tomar el sobrenadante y colocar en viales. Inyectar las muestras con las condiciones cromatográficas mencionadas en el numeral 10.2.
9. Congelar las soluciones de glibenclamida por 24 h y descongelar a temperatura ambiente, y almacenar la muestra blanco en refrigeración.

- 
10. Tomar muestra después de descongelar la muestra y repetir a partir del paso #5. Utilizar el blanco previamente preparado. La solución de felodipino se prepara cada día de análisis.
  11. Volver a almacenar las muestras en el congelador por 24 h y repetir el tratamiento de la muestra. Repetir hasta cumplir con los 3 ciclos de congelación-descongelación.
  15. Calcular la respuesta dividiendo el ABC de la glibenclamida entre el ABC del felodipino. Con las respuesta estimar el valor de la concentración de analito recuperado a partir de la ecuación de la recta de linealidad de sistema.
  12. Calcular la desviación estándar de la concentración de analito recuperado para cada ciclo de congelación-descongelación.
  13. Comparar la desviación estándar contra el 15 % de la concentración nominal. Usar Ji cuadrada para hacer el análisis estadístico con un nivel de significancia de 0.05.

#### Criterio de aceptación

- La concentración promedio de cada ciclo congelación-descongelación debe de estar dentro del 15 % de la concentración nominal.

#### **10.4.8 Estabilidad en automuestreador**

Preparar por triplicado muestras equivalentes al 100 % de la concentración a partir de una misma solución patrón. Medir su concentración inmediatamente después de su preparación, y después de someter las muestras a las condiciones de ensayo.

1. Preparar una solución patrón de glibenclamida a una concentración de 0.1 mg/mL. Pesar 2.5 mg de glibenclamida y colocar en un matraz aforado de 25 mL, disolver con metanol GC y llevar al aforo.
2. Preparar una solución de estándar de felodipino a una concentración de 7 µg/mL. Pesar 1.75 mg de felodipino y colocar en un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y llevar al aforo con metanol GC. Tomar 1 mL de la solución anterior y colocar en un matraz aforado de 25 mL y llevar al aforo con solución de AcOH/MeOH GR al 1%.

- 
3. Tomar con micropipeta tres alícuotas de 700  $\mu$ L de la solución de glibenclamida y colocar en diferentes matraces volumétricos de 10 mL. Aforar con plasma y agitar durante 1 min en vortex.
  4. Colocar en un tubo eppendorf 1 mL de la solución de felodipino a 7  $\mu$ g/mL y 0.5 mL de cada solución de glibenclamida.
  5. Preparar un blanco de la siguiente manera: Colocar en un tubo eppendorf 1 mL de solución de AcOH/MeOH al 1% y 0.5 mL de plasma.
  6. Centrifugar las muestras durante 10 min a una velocidad de 5000 rpm.
  7. Tomar el sobrenadante y colocar en viales. Inyectar las muestras con las condiciones cromatográficas mencionadas en el numeral 10.2.
  8. Mantener el vial en el inyector.
  9. Inyectar las muestras anteriores cada media hora hasta completar 4 h de estudio.
  16. Calcular la respuesta dividiendo el ABC de la glibenclamida entre el ABC de felodipino. Con las respuesta estimar el valor de la concentración de analito recuperado a partir de la ecuación de la recta de linealidad de sistema.
  10. Calcular la desviación estándar de la concentración de analito recuperado para cada intervalo de tiempo.
  11. Comparar la desviación estándar contra el 15 % de la concentración nominal. Usar Ji cuadrada para hacer el análisis estadístico con un nivel de significancia de 0.05.
  12. Criterio de aceptación
    - La concentración promedio de cada intervalo de tiempo debe de estar dentro del 15 % de la concentración nominal.

---

## 11 ANEXO II

### 11.1 Fórmulas

- Media aritmética/Promedio

$$Y = \frac{\sum Y_i}{n}$$

- Desviación estándar

$$s = \sqrt{\frac{\sum (Y - Y_i)^2}{n - 1}}$$

- Coeficiente de variación

$$CV = \frac{S}{Y} (100)$$

- t de Student calculada

$$t_{calc} = \frac{Y - \mu}{s/\sqrt{n}}$$

- Ji ( $X^2$ ) calculada

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

---

## 11.2 Tabla de ANADEV A

Factor de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calc
Regresión	1	SCR	$MCR = SCR$	$\frac{MCR}{MCER}$
Error de regresión	n-2	SCER	$MCER = \frac{SCER}{n-2}$	

Tabla 24. Tabla de ANADEV A un solo factor

Calcular la suma de cuadrados de regresión (SCR)

$$SCR = m^2 \left[ \sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n} \right]$$

Calcular la suma de cuadrados del error de regresión (SCER)

$$SCER = \sum Y_i^2 - m \sum X_i Y_i - b \sum Y_i$$

Calcular la suma de cuadrados del total (SCT)

$$SCT = \sum Y_i^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{n}$$

### 11.3 Tabla de ANADEVa de dos factores. Estadígrafo F de Fisher

Calcular la suma de los valores para cada analista ( $Y_{i..}$ ), día ( $Y_{.j}$ ), combinación día-analista ( $Y_{ij.}$ ), la suma total de todos los datos ( $Y_{...}$ ), y la suma de cada dato elevado al cuadrado ( $\sum\sum\sum Y^2_{ijk}$ ).

		Respuesta		$\sum_{\text{Días}}$
		Analista		
		1	2	
Día	1	$Y_{ij.}$	$Y_{ij.}$	$Y_{.j}$
	2	$Y_{ij.}$	$Y_{ij.}$	$Y_{.j}$
$\sum_{\text{Analistas}}$		$Y_{i..}$	$Y_{i..}$	$\sum_{A+D} =$ $Y_{...}$

$$\begin{aligned} &\sum_{A1D1}: \\ &\sum_{A2D1}: \\ &\sum_{A1D2}: \\ &\sum_{A2D3}: \end{aligned}$$

Tabla 25. Tabla de ANADEVa dos factores

Anotar el número de analistas, días y repeticiones

- a: \_\_\_\_\_
- d: \_\_\_\_\_
- r: \_\_\_\_\_

Calcular la suma de cuadrados del analista:

$$SC_{Ai} = \frac{\sum Y^2_{i..}}{dr} - \frac{Y^2_{...}}{adr}$$

Calcular la suma de cuadrados de día

$$SC_{Dj} = \frac{\sum Y^2_{.j}}{ar} - \frac{Y^2_{...}}{adr}$$

Calcular la suma de cuadrados de analista-día

$$SC_{Dj(i)} = \frac{\sum\sum Y^2_{ij.}}{r} - \frac{\sum Y^2_{i..}}{dr} - \frac{\sum Y^2_{.j}}{ar} + \frac{Y^2_{...}}{adr}$$

Calcular la suma de cuadrados del error

$$SC_{Ek(ij)} = \sum\sum\sum Y^2_{ijk} - \frac{\sum\sum Y^2_{ij.}}{r}$$

Construir tabla de ANAdeVA

Factor de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F calc
Analista	a-1	SC Ai	$MC Ai = \frac{SC Ai}{a - 1}$	$F Ai \frac{MC Ai}{MC Ek(ij)}$
Día	d-1	SC Dj	$MC Dj = \frac{SC Dj}{d - 1}$	$F Dj \frac{MC Dj}{MC Ek(ij)}$
Analista-día	(a-1)(d-1)	SC Dj(i)	$\frac{MC Dj(i)}{SC Dj(i)}$ $= \frac{MC Dj(i)}{(a - 1)(d - 1)}$	$F Dj(i) \frac{MC Dj(i)}{MC Ek(ij)}$
Error	adr	SC Ek(ij)	$\frac{MC Ek(ij)}{SC Ek(ij)}$ $= \frac{MC Ek(ij)}{adr}$	

Tabla 26. Tabla de ANAdeVA

### 11.4 Resolución

La resolución es el grado de separación que existe entre dos picos adyacentes. El siguiente modelo matemático trata de explicar la resolución.<sup>19</sup>

$$R_s = \frac{(tr_2 - tr_1)}{((0.5) * (W_1 + W_2))}$$

tr<sub>2</sub>: Tiempo de retención del segundo pico

tr<sub>1</sub>: Tiempo de retención del primer pico

W<sub>2</sub>: Ancho de la base del segundo pico

W<sub>1</sub>: Ancho de la base del primer pico



---

## 12 REFERENCIAS

1. Brunton Laurence. Goodman & Gillman: Las bases farmacológicas de la terapéutica. Undécima edición. Colombia: McGraw-Hill Interamericana; 2007
2. Floréz Jesús. Farmacología Humana. Quinta Edición. Barcelona, España: Elsevier Masson; 2008.
3. Florey Klaus. Analytical profiles of drug substances. Vol.: X. USA: Academic Press; 1985.
4. Martindale: The complete Drug Reference. Thirty-sixth edition. Great Britain: Pharmaceutical Press; 2009.
5. Vademecum.es [Internet] . Madrid, España: Vademecum Spain; 2010 [Actualizado 3 de Diciembre 2010; citado 12 Febrero 2015]. Disponible en: <http://www.vademecum.es/principios-activos-glibenclamida-a10bb01>
6. Adis Editorial. Glibenclamide: A review. Drugs. 1971; 1: 116-140.
7. Mutalik S., Udupa N. Glibenclamide transdermal patches: Physicochemical, pharmacodynamic, and pharmacokinetic evaluations. Journal of pharmaceutical sciences. 2004; 93: 1577-1594.
8. Prasad N., Jyothsna G. Influence of atorvastatin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of glyburide in normal and diabetic rats. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2011; 42: 285-289.
9. Sridevi S., Chary MG., Krishna DR., Prakash V. Pharmacodynamic evaluation of transdermal drug delivery system of glibenclamide in rats. Indian Journal of pharmacology. 2000; 32: 309-312.
10. Lüllmann, Mohr, Hein. Farmacología: texto y atlas. 6ta edición. Madrid España: Editorial Medica Panamericana; 2008.
11. Yuqing L., Yuhui W., Fan Z., Dan., Xinan W. Changes in the pharmacokinetics of glibenclamide in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. Acta Pharmaceutica Sinica B. 2012; 2(2): 198-204.

- 
12. British Pharmacopoeia. Vol. I, Stationery Office; Har/Cdr Edition London 2013.
  13. Eapen C., Prasanth VG., Rai A. Development of UV spectrometric method of glibenclamide (glyburide) in bulk and pharmaceutical formulations. International Journal of ChemTech Research. 2012; 4(1): 56-360.
  14. US Pharmacopoeia Convention, Inc. United States Pharmacopoeia 36/National formulary 31. Rockville, MD: U.S Pharmacopeial Convention, Inc. 2013. Vol. 2
  15. Niopas I., Daftsios A. A validated high- performance liquid chromatographic method for the determination of glibenclamide in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. Journal of pharmaceutical and Biomedical analysis. 2002; 28: 653-657
  16. Dong Michael. Modern HPLC for practicing scientists. First edition. United States of America: Wiley & Sons, Inc.; 2006.
  17. Snyder LI., Kirkland J., Dolan J. Introduction to modern liquid chromatography. Third edition. USA: Wiley; 2010.
  18. Meyer Veronika. Practical High Performance Liquid Chromatography. 5th edition. Great Britain: John Wiley & Sons Inc.; 1988.
  19. Hernández V., Mendoza M., Mora J., Sánchez E. Introducción a las técnicas cromatográficas instrumentales más utilizadas en el análisis farmacéutico. México: UNAM FES Zaragoza; 2008.
  20. Moffat A., Osselton D., Widdop B., Watts J. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. Vol. 1. Third Edition. Great Britain: Pharmaceutical Press; 2004.
  21. Kromaton [Homepage on the internet]. France: Rousselet Robalet; c2016 [Consultado el 10 de Febrero de 2016]. Disponible en: [www.kromaton.com/en/the-acp/techonologies](http://www.kromaton.com/en/the-acp/techonologies)
  22. Biología celular [Homepage on the internet]. Colombia. Facultad de ciencias: [Consultado el 10 de Febrero de 2016]. Disponible en: [www.javeriana.edu.co/facultades/ciencias/neurobioquimica/libros/celular/cromatografia.htm](http://www.javeriana.edu.co/facultades/ciencias/neurobioquimica/libros/celular/cromatografia.htm)
-

- 
23. Affinity chromatography [Homepage on the internet]. United Kingdom: [Consultado el 10 de Febrero de 2016]. Disponible en: [www.ucl.ac.uk/~ycbdab/enzpur/affinity.htm](http://www.ucl.ac.uk/~ycbdab/enzpur/affinity.htm)
  24. Chromedia Analytical Sciences [Homepage on the internet] Chromedia; c2016 [Consultado el 10 de Febrero de 2016]. Disponible en: [www.chromedia.org/chromedia](http://www.chromedia.org/chromedia)
  25. Facultad de química [Homepage on the internet]. México: Facultad de química; [Consultado el 10 de Febrero de 2016]. Disponible en: [www.depa.fquim.unam.mx/proteinas/estructura/EPrcp.htm](http://www.depa.fquim.unam.mx/proteinas/estructura/EPrcp.htm)
  26. Honoré S., Pedersen S., Einar K. Introduction to pharmaceutical chemical analysis. First edition. United Kingdom: John Wiley & Sons; 2012.
  27. Chamberlain Joseph. The analysis of drugs in biological fluids. 2nd edition. United States of America: CRS Press Inc.; 1995.
  28. Pertierra A., Teijón J., Blanco D., Villaverde C., Mendoza C., Ramírez J. Fundamentos de bioquímica estructural. 2da edición. Madrid, España: Tébar S.L.; 2006.
  29. Alex Merí. Fundamentos de la fisiología de la actividad física y el deporte. España: Editorial Médica Panamericana; Febrero 2005.
  30. Cediel J., Cárdenas M., García A., Chuaire L., Payán C., Villegas V., Sánchez C. Manual de histología: Tejidos fundamentales. 1ra Edición. Colombia: Colección Lecciones de Medicina Universidad del Rosario; 2009.
  31. Committee for Medicinal Products for Human Use. (2011). Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. London, United Kingdom.
  32. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de
-

---

Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad.

33. Center for Drug Evaluation and Research. (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. United States Department of Health and Human Services. Rockville, Maryland.
34. Sánchez J., Mora J., Hernández V. Validación de métodos analíticos. México: UNAM FES Zaragoza; 2006.
35. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
36. Wayne WD. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 3ra edición. México: Editorial Limusa, S. A de C. V. Grupo Noriega editors; 1998.
37. International Conference of Harmonization, Q2A (R1) Harmonized Tripartite Guideline, Validation of analytical procedures: Text and methodology, 1996.
38. Daffay B., Rojas F., Guerrero I., Roa L., Rodríguez L., Soto M., Aguilera M., Sandoval S. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la Validación de métodos". 1ra edición. Santiago; Instituto de salud pública Chile; Diciembre 2010.
39. Bressolle F., Bromet-Petit M., Audran M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic, methods applications to pharmacokinetics. Journal of chromatography B: Biomedical applications. 1996;(686): 3-10.
40. Karnes T., Shiu G., Shah V. Validation of bioanalytical methods. Pharmaceutical research. 1991;8(4): 421-426.
41. Kumara SG., Rajendra KJM., Seshagiri R. Development and validation of stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of enalapril maleate and felodipino in bulk and tablet dosage form. World journal of pharmaceutical research. 2015;4(4): 2087-2100-
42. Satinder A., Stephen S. Handbook of modern pharmaceutical analysis Vol III. First edition. USA: Academic Press; 2001.

- 
43. Guerra T., Marques MJ., López JM. Cuaderno de problemas resueltos y propuestos de probabilidad y estadística. México: UNAM FES Zaragoza; Febrero 2009.
  44. LCGC Solutions for separation scientists [Homepage on the internet]. North America: John W Dolan; c2014 [actualizada 01 Octubre 2014; consultado 23 Octubre 2015]. Disponible en: [www.chromatographyonline.com](http://www.chromatographyonline.com)
  45. Pharmtech.com Advacing development and manufacturing [Homepage on the internet], North America: Chulam A Shabir; c2004 [actualizada 01 Marzo 2004; consultado 22 Noviembre 2015]. Disponible en: [www.pharmtech.com](http://www.pharmtech.com)