



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Propuesta de un método alternativo para la cuantificación de
glibenclamida en estudios de perfil de disolución por CLAR

TESIS

Para la obtención del título de

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

presentado por

Jesús Salomón Bárcenas Hernández

Asesor: Dr. Vicente Jesús Hernández Abad

Director: MASS Cynthia Espinosa Contreras

Fecha: 3 – Mayo - 2013

Indice

1. Resumen	6
2. Marco teórico.....	7
2.1 Glibenclamida	7
2.1.1 Estructura química	7
2.1.2 Definición y características	7
2.1.3 Mecanismo de acción	8
2.1.4 Farmacocinética de la glibenclamida	8
2.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)	9
2.2.1 Generalidades	9
2.2.2 Fundamentos cromatográficos	10
2.3 Componentes de un instrumento de CLAR.....	13
2.4 Métodos existentes para determinar glibenclamida	14
2.5 Desarrollo de métodos analíticos	15
2.6 Validación	15
2.6.1 Validación de métodos analíticos.....	16
2.7 Proceso sol-gel	16
4. Planteamiento del problema.....	18
4. Objetivos	19
4.1 Objetivo General	19
4.2 Objetivo Particular	19
5. Hipótesis.....	20
6. Diagrama de flujo	21
7. Materiales.....	22
7.1 Reactivos	22
7.2 Listado de materiales y equipos.....	22
8. Metodología.....	23
8.1 Comprobación de la solubilidad de glibenclamida en diferentes disolventes.....	23
8.2 Preparación de las soluciones buffer	23
8.3 Selección del método cromatográfico	23
8.4 Preparación de las muestras	24
8.5 Optimización del método.....	24
8.5.1 Procedimiento	24
8.6 Parámetros de validación del método propuesto	24
8.6.2 Linealidad del sistema	25

8.6.3 Precisión del sistema	25
8.6.4 Límite de detección.....	25
8.6.5 Límite de cuantificación	26
8.6.6 Linealidad del método.....	26
8.6.7 Selectividad del método.....	26
8.6.8 Estabilidad de la muestra.....	26
8.6.9 Robustez del método	27
8.6.10 Precisión intermedia	27
8.6.11 Aplicación del método a la disolución de matrices sol-gel de glibenclamida.....	28
9. Resultados y discusión.....	30
9.1 Selección del método cromatográfico	30
9.2 Adecuabilidad del sistema	32
9.3 Linealidad del sistema.....	33
9.4 Linealidad y exactitud del método	35
9.5 Límite de Detección del método.....	37
9.6 Límite de cuantificación del método	38
9.7 Selectividad del método	39
9.8 Estabilidad de la muestra.....	40
9.9 Robustez del método	40
9.11 Aplicación a la construcción de perfiles de disolución de glibenclamida a partir de matrices sol-gel.....	43
10. Conclusiones.....	45
11. Referencias:	46

Agradecimientos

A DIOS, por brindarme sabiduría y la capacidad de superar todos los obstáculos que se presentaron a lo largo de mi vida.

A mi familia, por darme el apoyo, el amor y la voluntad necesaria para llegar al final. Los quiero.

A Ariadne, por darme una razón más para seguir adelante a lo largo de mi vida, TÚ.

A la UNAM, por darme las herramientas con las cuales construí mi conocimiento y desarrollé parte de mi potencial analítico.

A la MASS Cynthia Espinosa Contreras, la M. en C. Elizabeth Sánchez González y en especial al Dr. Vicente Jesús Hernández Abad, por brindarme la confianza de trabajar en el LIF, trabajar en los equipos y permitirme aumentar mi conocimiento; pero sobre todo, por brindarme su amistad.

A mis compañeros de laboratorio: Dany, Darsy, Nico, Luz, Adair, Thalia y Lulú, por hacer más ameno las horas de arduo trabajo y aclarar mi mente en tiempos de duda, aunque en algunos momentos, los resultados no sirvieran de nada.

A los profesores que sembraron en mí la semilla de la investigación, el raciocinio y la convicción, para nunca quedarme con dudas. A ustedes GRACIAS!!!

A todos los que directa o indirectamente, dejaron alguna huella en mi vida, sea física, mental o emocional, ya que de ellos se formó mi carácter.

AGRADECIMIENTO

El desarrollo de esta tesis fue financiado en su totalidad con recursos del proyecto PAPIIT IT119211 “Matrices de componentes híbridos preparadas por el método sol-gel, para desarrollar dispositivos de liberación controlada de principios activos”, por lo que se agradece el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México.

1. Resumen

Se ha observado que la cuantificación de la glibenclamida (un fármaco de clase II del BCS) liberada a partir de tabletas, presenta una gran variabilidad cuando se utiliza el método de la USP, debido a la baja solubilidad del fármaco en agua y disolventes polares, aun cuando éstos son indicados en la monografía de referencia.

Para resolver éste problema, se realizó el diseño de una metodología por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), que permitiera aumentar la exactitud y precisión del método, además de disminuir el gasto de disolventes y el tiempo de análisis de la glibenclamida liberada a partir de matrices sol-gel que la contuvieran.

Para ello, experimentalmente se probaron diversos pH's y proporciones de fase móvil, para determinar las condiciones ideales del método.

Una vez seleccionadas, se evaluó la adecuabilidad del sistema, y posteriormente la linealidad del mismo, obteniéndose una variación menor al 1% en el primer caso y un coeficiente de determinación mayor al 99% en el segundo caso.

En la validación del método se evaluaron la linealidad, exactitud, estabilidad de la muestra, límites de detección y cuantificación, precisión intermedia y robustez, cuyos resultados fueron aceptables dentro de las especificaciones establecidas por las guías de referencia.

Por último, se aplicó el método para la construcción del perfil de disolución de glibenclamida liberada a partir de matrices sol-gel. Se obtuvo una cuantificación repetible y confiable, con coeficientes de variación bajos. Se concluyó que el método diseñado es la mejor alternativa para la cuantificación de glibenclamida.

2. Marco teórico

2.1 Glibenclamida

2.1.1 Estructura química (Figura 1)¹

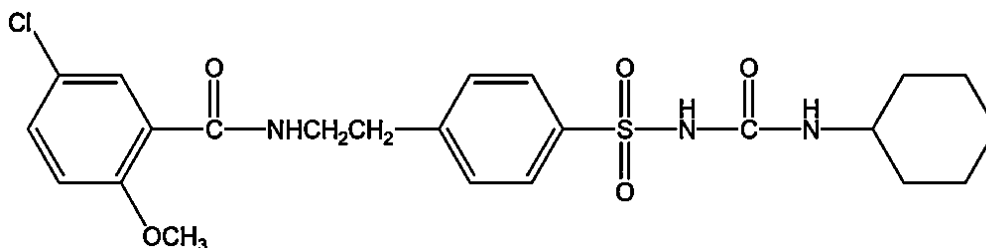


Figura 1. Estructura de la glibenclamida

Esta molécula posee un pKa de 5.3. Tiene una solubilidad de 4 µg/mL en agua a pH 3, de 600 µg/mL a pH 9 y de 3 mg/mL en etanol.²

2.1.2 Definición y características

De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud (OPS), la diabetes es, en la actualidad, una de las enfermedades de alta prevalencia en la población mundial, y específicamente en México, al ser considerada como la primera causa de muerte.³

Al ser una enfermedad de alta prevalencia entre la población, se precisa el uso de fármacos de rápida acción contra los síntomas y tratamiento de ésta. Uno de éstos es la glibenclamida, un hipoglucemiante de segunda generación, perteneciente al grupo de las sulfonilureas.⁴

Este compuesto pertenece al tipo II en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS), lo que indica que posee una alta permeabilidad, pero una baja solubilidad en agua, por lo que los métodos de cuantificación aplicados a la disolución son basados en mezclas con disolventes.⁵

2.1.3 Mecanismo de acción

La glibenclamida reduce la glucosa sanguínea al estimular la liberación de insulina dependiente de las células β de los Islotes de Langerhans por el páncreas, además de aumentar la sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina.⁶

Molecularmente existe un aumento de la salida de potasio de las células β , lo que aumenta la entrada de calcio y favorece la exocitosis de los gránulos de insulina (figura 2). Además de su acción hipoglucemiante, la glibenclamida produce una diuresis leve, por la mejora de la depuración renal de agua libre.⁶

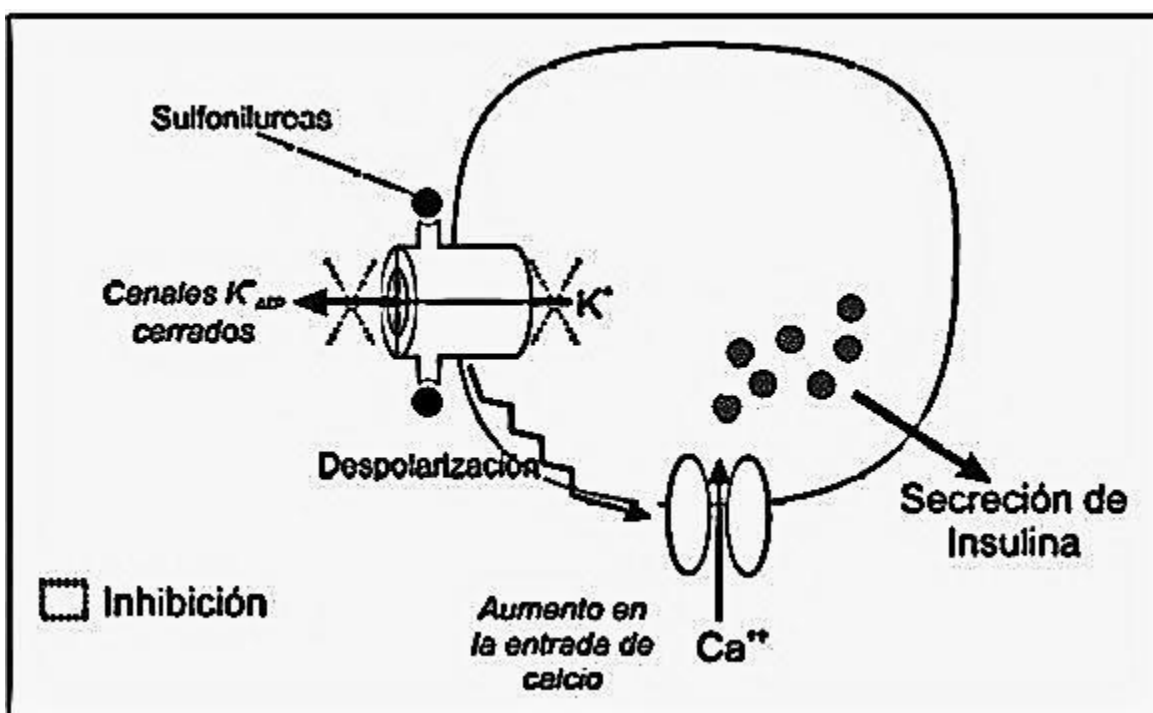


Figura 2 Mecanismo de acción de las sulfonilureas⁶

2.1.4 Farmacocinética de la glibenclamida

La glibenclamida se administra únicamente por vía oral (tabletas).⁷

Su absorción por vía oral se reparte a lo largo del tracto digestivo (estómago, duodeno y colon).⁸

Su afinidad a proteínas plasmáticas es de 99%, lo que le confiere una tiempo de vida media de aproximadamente 10 horas.⁷

El principal metabolito de la glibenclamida es el derivado 4-trans-hidroxi y un segundo metabolito que también se produce es el derivado 3-cis-hidroxi. Estos metabolitos probablemente no contribuyan a la acción hipoglucemiante en los seres humanos, ya que se ha visto que son débilmente activos (1/400 y 1/40 del efecto total, respectivamente) en conejos.⁷

Se excreta como metabolitos en la bilis y en la orina, aproximadamente en un 50% por cada vía. Esta doble vía excretora es cualitativamente diferente a la de otras sulfonilureas, que se excretan principalmente por la orina.⁷

La glibenclamida se metaboliza en el hígado en los productos con actividad hipoglucemiante muy baja, ya antes mencionados.

La dosis inicial habitual es de 2,5 mg/día o menos, y la dosis de mantenimiento promedio es de 5-10 mg/día administrados en una dosis única por la mañana; dosis de mantenimiento superiores a 20 mg/día no se recomiendan.⁷

Este fármaco tiene pocos efectos adversos diferentes a su potencial para causar hipoglucemia.

Para la cuantificación de esta molécula se pueden aplicar algunas técnicas analíticas, como la CLAR.

2.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

2.2.1 Generalidades

La cromatografía es ahora una de las técnicas más utilizadas para la determinación de cualquier tipo de sustancias, gracias a su alta confiabilidad y a la gran capacidad para separar las sustancias.⁹

Esta técnica, que data de principios del siglo XX, con la separación de pigmentos por Tswett en 1906 y posteriormente fue evolucionando hasta que en 1969 se crean los primeros cromatógrafos de líquidos, los cuales obligan a la revista *Journal of Gas Chromatography* a cambiar su nombre a *Journal of Chromatographic Science*.⁹

Entre los principales técnicas cromatográficos se encuentran las cromatografías en papel, capa fina, sólida sobre una placa de vidrio (también llamada cromatografía preparativa), de líquidos inmóviles, geles y de partículas sólidas empacadas en columnas; siendo en esta última, las fases móviles líquidas o de gas.¹⁰

La evolución de estos sistemas dio un avance en el desarrollo de sistemas más eficientes y con resultados más confiables.

2.2.2 Fundamentos cromatográficos

2.2.2.1 Cromatograma

Es la representación gráfica de la señal obtenida en forma eléctrica, por el detector, que es transformada por un software para ser representada en forma de líneas y picos.

La gráfica se realiza a través de dos ejes, los cuales se representan por la intensidad de la señal contra el tiempo o el volumen de elución.¹⁰

Los solutos son representados por los picos, los cuales pueden ser identificados por la altura, el área o la anchura de los picos.

Para usar ésta técnica en la cuantificación de sustancias, estas características de los picos deben ser proporcionales a la cantidad de sustancia obtenida por la respuesta del detector.¹¹

2.2.2.2 Coeficiente de distribución

La cromatografía es un método de separación que emplea dos fases, una estacionaria y una móvil.^{10,11}

Las sustancias a ser separadas son arrastradas en el sistema por la fase móvil y a través de la fase estacionaria manteniendo siempre un equilibrio entre las dos fases, definido como coeficiente de distribución K_d , el cual se define en la ecuación 1 como:

(Ecuación 1)

$$K_d = \frac{x_e}{x_m}$$

donde X_e es la fracción de la sustancia o sustancias en la fase estacionaria y X_m es la fracción en la fase móvil.^{10,11}

Cuando las sustancias avanzan a través de la fase estacionaria, éstas se retienen y reparten debido a la afinidad hacia ésta fase, ocurriendo los fenómenos de adsorción y absorción.⁹⁻¹¹

2.2.2.3 Volumen del sistema y volumen de retención

El volumen de la columna es el espacio disponible para la fase móvil en el sistema cromatográfico, también relacionado con el volumen necesario para eluir una sustancia que no pudo ser retenida en la fase estacionaria y se representa por la siguiente fórmula:

(Ecuación. 2)
$$V_0 = t_0 F$$

donde V_0 es el volumen del sistema, t_0 es el tiempo muerto y F es la velocidad de flujo de la fase móvil.¹¹

Por otro lado, el volumen de retención se define como el volumen de fase móvil requerido para eluir un compuesto retenido en la fase estacionaria. La fórmula para definir el concepto se muestra en la ecuación tres:

(Ecuación 3)
$$V_r = t_r F$$

donde V_r es el volumen de retención, t_r es el tiempo de retención y F es la velocidad de flujo de la fase móvil.

2.2.2.4 Tiempo de retención y Tiempo muerto

En un cromatograma, se muestran los picos separados a diferentes distancias. Estas distancias se deben al tiempo en que el soluto se encuentra en la fase móvil más el tiempo que se encuentra en la fase estacionaria, sin moverse. A esto se le conoce como tiempo de retención (t_r).^{9,11}

El tiempo muerto o t_0 se define como el tiempo en que el disolvente y las sustancias no retenidas pasan a través de la columna (figura 3).^{9,11}

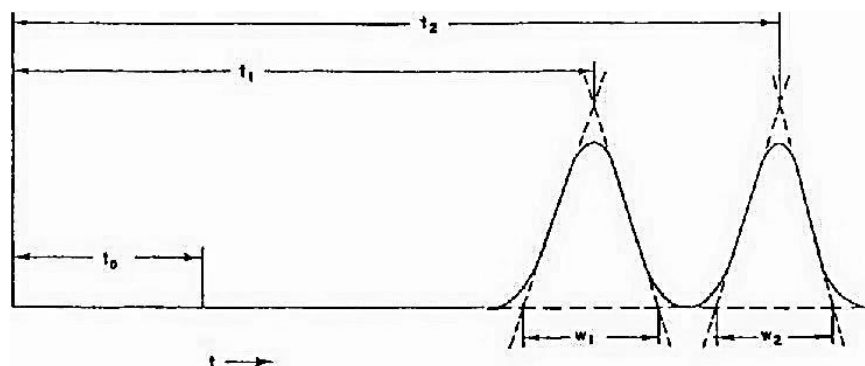


Figura 3. Representación básica de un cromatograma. Se muestran el tiempo muerto (t_0), los tiempos de retención de las muestras hipotéticas 1 y 2 (t_1 y t_2), y los anchos de pico de las mismas muestras (w_1 y w_2).⁹

2.2.2.5 Factor de capacidad

Para una separación cromatográfica ideal, la columna debe poseer la capacidad de retener muestras y la habilidad para separar los componentes de una muestra eficientemente. Así, se define el factor de capacidad k'_r como la medida directa de la fuerza de interacción de una muestra con el material de empaque. La expresión se muestra en la ecuación cuatro:

(Ecuación 4)

$$k'_r = \frac{t_r - t_0}{t_0} = \frac{v_r - v_0}{v_0}$$

donde t_r es el tiempo que tarda un soluto en alcanzar el detector y t_0 es el tiempo en que las especies no retenidas tarda en alcanzar el mismo.⁹

Este factor también puede ser calculado en términos de volumen, donde v_r es el volumen de retención y v_0 es el volumen del sistema, que es el volumen de la columna que no es ocupado por el material de empaque.¹¹

2.2.2.6 Selectividad

Es una medida de la diferencia entre los tiempos o volúmenes de retención entre dos o más picos, y qué tan eficientemente éstos son separados entre sí. Normalmente se define como α , y se representa por la ecuación siguiente:

(Ecuación 5)

$$\alpha = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0} = \frac{V_2 - V_0}{V_1 - V_0} = \frac{k'_2}{k'_1}$$

La selectividad de una columna se encuentra en función del material de empaque, aunque se tiene algún control por medio de la fase móvil o la temperatura. El valor de α puede variar desde la unidad, cuando los tiempos de retención de los solutos

son idénticos ($t_2 = t_1$), hasta el infinito, si el primer componente de interés se eluyó en el volumen del sistema.⁹⁻¹¹

El conjunto de todos los parámetros establecen una mejor resolución de los picos cromatográficos (fig. 4)

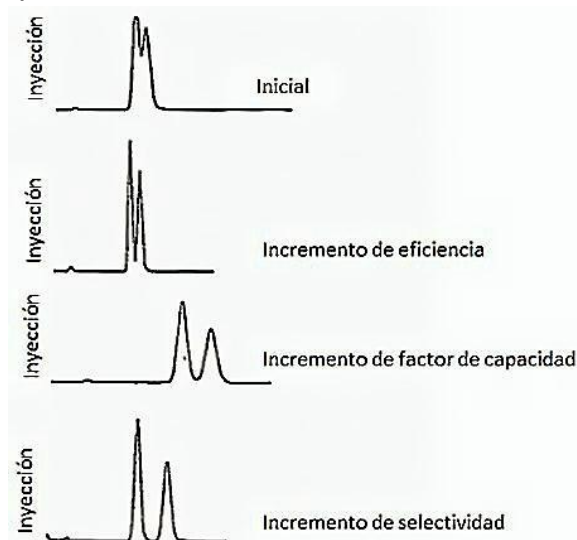


Figura 4. Importancia de cada parámetro en la resolución de un cromatograma¹⁰

2.3 Componentes de un instrumento de CLAR

Para el desempeño óptimo de un instrumento de CLAR, los componentes mínimos que deben conocerse e identificarse se muestran en la figura 5:

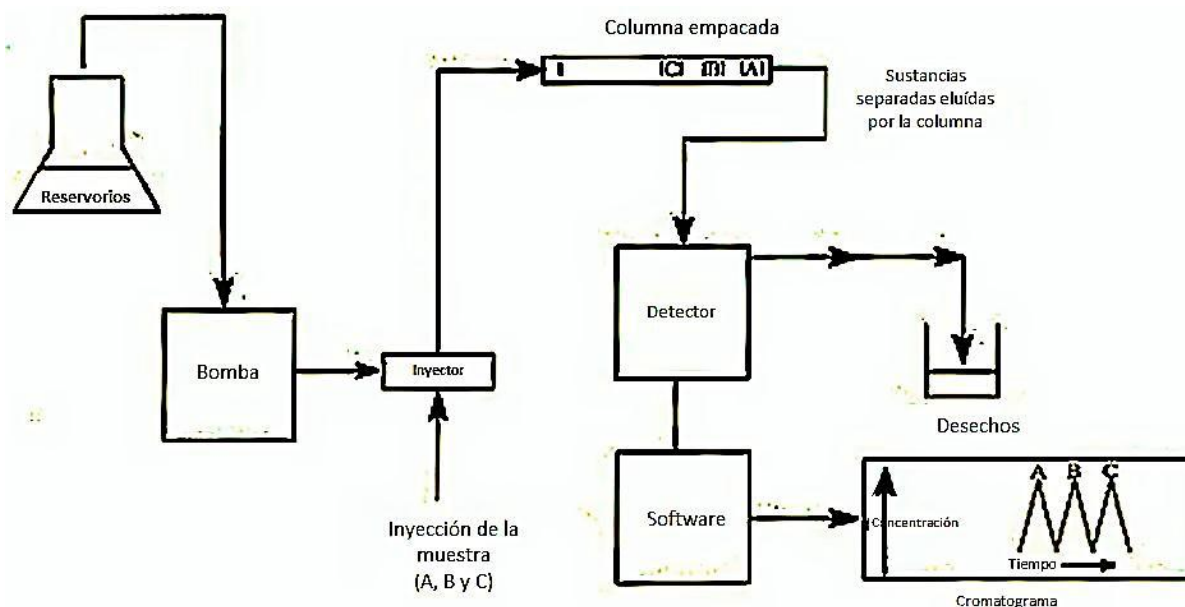


Figura 5. Componentes generales de un instrumento para CLAR¹⁶

- Reservorios: Contienen las fases móviles y los disolventes de lavado.
- Bomba: Componente que entrega a flujo constante la fase móvil en el sistema cromatográfico. Está diseñada para ser inerte frente a cualquier condición (pH, temperatura, sales y solventes orgánicos)
- Inyector: Permite La introducción de las muestras en el flujo de la fase móvil, antes de que éste entre a la columna
- Columna: Permite la separación de los analitos en la muestra inyectada.
- Detector: Convierte el cambio de efluencia de la columna cromatográfica en una señal eléctrica de fácil interpretación
- Software: Codificador de la señal eléctrica, que además permite controlar todos los parámetros de la CLAR ^{9,11}

2.4 Métodos existentes para determinar glibenclamida

En el cuadro 1 se muestran algunos de los diferentes métodos aplicados para la cuantificación de la glibenclamida, con base en las propiedades de la misma

Cuadro 1. Algunos de los métodos existentes para la cuantificación de glibenclamida		
Método	Descripción	Referencia
Volumétrico	Consiste en la disolución de una pequeña muestra de glibenclamida en dimetilformamida (DMF), la cual se titula con hidróxido de sodio usando fenolftaleína como indicador hasta el vire rosa.	1
	Se disuelve una muestra de glibenclamida en etanol y se titula en hidróxido de sodio, usando fenolftaleína como indicador, hasta la presencia de color rosa.	12
Espectrofotométrico	El método está basado en la determinación de la molécula al absorber la radiación UV en etanol como disolvente a una longitud de onda de 300 nm	13
Cromatográfico	Columna L7 250 X 4.6 mm Fase móvil: Acetonitrilo: Buffer de fosfatos pH 3 (47:53) con lectura a 300 nm	14
	Columna C8 250 X 4.6 mm Fase móvil: Acetonitrilo: Agua (1:1) con lectura a 254 nm	15
	Columna C18 100 X 4.6 mm Fase móvil Acetonitrilo: Buffer de fosfatos pH 7.5 con lectura a 203 nm.	16

Primeramente, para establecer un método por CLAR, es necesario plantear una serie de condiciones que permitan establecer parámetros de control inicial y su optimización.

2.5 Desarrollo de métodos analíticos

Para diseñar un método analítico, se debe establecer, como primer punto, el enfoque del estudio, que permita conocer los puntos a desarrollar y modificar en el diseño experimental.

En un desarrollo de un método por CLAR, se siguen estos 5 pasos básicos: ¹⁷

1. Selección de la técnica por CLAR
2. Selección de las condiciones iniciales de trabajo
3. Optimización de la selectividad del método
4. Optimización del sistema
5. Validación del método

Además se deben mantener ciertas condiciones para diseñar y desarrollar un método analítico, que permitan aumentar el valor del método, tales como: ^{17,18}

- Ser simple
- Poder aplicarse en la mayoría de las columnas
- El diseño en la fase móvil debe probarse en combinaciones binarias, antes de pensar en ternarias
- Se debe investigar en todas las opciones que permitan aumentar la resolución de las respuestas obtenidas, para acelerar la optimización del método

Una vez cumplidas todas éstas condiciones, el método será apto para ser validado

2.6 Validación

La validación se define como la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones de calidad establecidas ¹⁹, pero en este caso, se aplica hacia un método analítico.

En México, de acuerdo con la NOM-059-SSA1-2006, es obligatorio que los métodos analíticos se encuentren validados. ²⁰

2.6.1 Validación de métodos analíticos

Es la documentación que demuestra que el método cumple para lo que fue diseñado. Para establecer la validación de algún método (en especial con los métodos por CLAR), se debe cumplir con las siguientes características:

- Linealidad del sistema y del método: En la cual se debe de mostrar la relación lineal existente entre la concentración y la respuesta obtenida, en un intervalo definido de concentraciones, para el estándar de referencia y el producto a cuantificar.
- Especificidad: Es la respuesta ocasionada al leer la muestra, únicamente por la sustancia de interés, y no por las impurezas u otras sustancias (excipientes, productos de degradación) que se encuentran en contacto con ésta misma.
- Exactitud: Intenta demostrar que existe una concordancia entre los valores obtenidos y los valores reales (o valores de referencia)
- Precisión del sistema y el método: El parámetro muestra el grado de errores aleatorios procedentes de las variables del mismo nombre, las cuales no pueden ser controladas.
- Estabilidad de la muestra: En este parámetro es posible observar el cambio entre la concentración de la muestra a lo largo de la secuencia analítica.
- Repetibilidad: Muestra el error ocasionado por el analista en una concentración específica.
- Límite de detección y límite de cuantificación: Usados para evaluar la relación entre la señal más baja obtenida con el método y la señal del ruido del sistema.
- Precisión intermedia: Se evalúa la robustez del método al variar una o más condiciones de laboratorio, deliberadamente, como los analistas, el día de análisis, etc.^{21,22}

2.7 Proceso sol-gel

El proceso sol-gel es una ruta química para la síntesis de redes óxido-inorgánicas con una amplia variedad de usos tecnológicos.²³

Aunque ésta técnica es relativamente vieja (desde los años 60's del siglo pasado), la aplicación tecnológica para encapsular fármacos se remonta a finales de los años 80's.

La generación del sol (dispersión coloidal de un sólido en un líquido), se efectúa por medio de una reacción de policondensación a partir de precursor de silicio, titanio o zinc, entre otros, soportado en un solvente orgánico (de preferencia un alcohol igual al radical de la cadena terminal del alcóxido metálico), los cuales reaccionan a temperaturas relativamente bajas (60°C), en comparación a los procesos de fabricación de vidrios (temperaturas mayores de 1000°C).²³⁻²⁵

Una vez generada la reacción, el sol comienza a gelar, convirtiéndolo en un sólido rodeado por una fase líquida, la cual va disminuyendo a medida que éste comienza a perder solvente y agua residual de la reacción de policondensación, hasta formar un sólido poroso (añejamiento), el cual posee las propiedades necesarias para soportar el fármaco y liberarlo en presencia de un medio de disolución o extracción. Como último paso, el gel se seca por diversos métodos hasta obtener un vidrio casi transparente, por lo que puede ser triturado, para obtener un polvo cerámico con las sustancias de interés incluidos en los poros del gel.²⁴

4. Planteamiento del problema

La glibenclamida es un fármaco perteneciente a la familia de las sulfonilureas, con actividad hipoglucemiante. Actualmente es utilizada para el tratamiento de la diabetes Tipo II. Pertenece al grupo II del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica de Fármacos (por poseer baja solubilidad y alta permeabilidad).

Debido a la relevancia de la correcta dosificación de este fármaco, se han buscado alternativas viables para su dosificación en sistemas de liberación modificada, entre ellos, se busca probar la tecnología sol-gel como una alternativa para su entrega en forma controlada.

Por esta nueva alternativa tecnológica, se debe cuantificar de manera inequívoca a la glibenclamida dentro de la matriz, para asegurar la calidad y confiabilidad de dicha formulación. En los últimos años, se han desarrollado diversos métodos para obtener confiabilidad en la cuantificación de la glibenclamida, pero hasta el momento se siguen presentando algunas dificultades (uso de reactivos costosos, métodos complejos, mucha variabilidad en los resultados, entre otros), por esto, se ha optado a la cromatografía de líquidos de alta resolución como una técnica que permita eliminar la mayor cantidad de estas dificultades, para su cuantificación.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) es una técnica analítica que permite la separación de compuestos por sus propiedades químicas y fisicoquímicas, lo que la convierte en una de las más confiables para el desarrollo de métodos analíticos que permiten la cuantificación en éstos mismos.

Con base en lo anterior, se parte entonces de la pregunta ¿Existe una metodología por HPLC que permita la cuantificación de glibenclamida en matrices sol-gel de forma confiable?

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

- Diseñar un método de cuantificación por CLAR que sirva para construir los perfiles de disolución de glibenclamida liberada a partir de matrices sol-gel

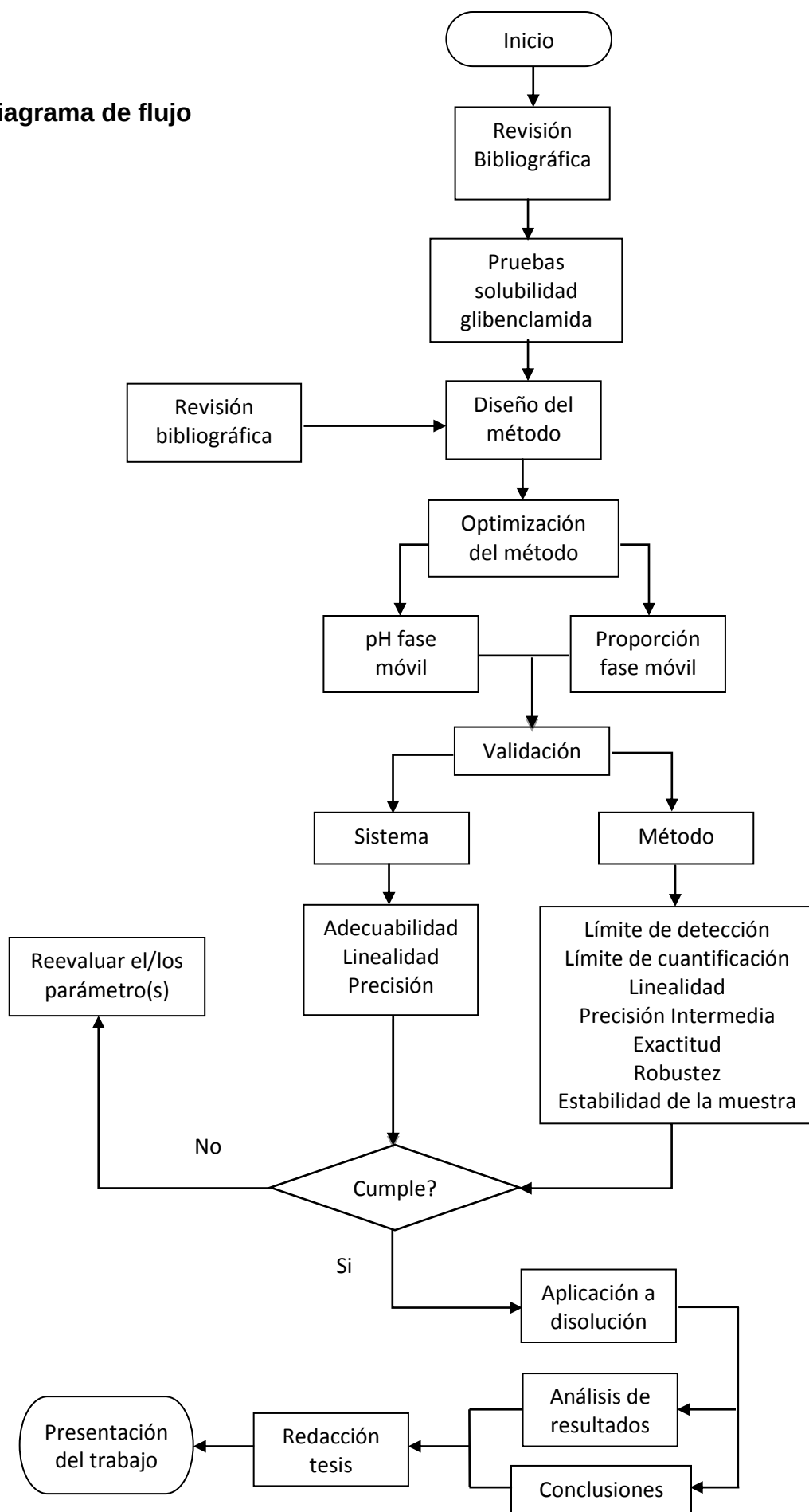
4.2 Objetivo Particular

- Desarrollar el método por CLAR a partir de la información de estudios previos.
- Demostrar que el método es útil para su cuantificar glibenclamida en matrices sol-gel.
- Evaluar la aplicabilidad del método en la construcción de perfiles de disolución de matrices sol-gel de glibenclamida

5. Hipótesis

- El método diseñado cumplirá con los parámetros necesarios para ser validado y aplicado a la cuantificación en los perfiles de disolución.
- El método será confiable en la cuantificación de glibenclamida en perfiles de disolución.

6. Diagrama de flujo



7. Materiales

7.1 Reactivos

- Acetonitrilo Burdick & Jackson Lote CW196
- Glibenclamida Eur. Pharm. (Donación)
- Glibenclamida Estándar Secundario
- Fosfato dibásico de potasio JT Baker B14C13
- Fosfato monobásico de potasio JT Baker G13C22
- Agua desionizada
- Fosfato monobásico de amonio JT Baker G04C05
- Metanol Honeywell Lote DG024

7.2 Listado de materiales y equipos

Materiales	Equipos
Pipetas volumétricas 1 y 10 mL	Inyector Varian Modelo M410 N°. de serie 50321
Vasos de precipitado 250 mL	Bomba Varian ProStar Modelo 240 N° de serie 00871
Matraces aforados 250 mL	Detector Varian ProStar Modelo 325 LC N°. de serie 005093
Reservorios de vidrio 100 mL	Disolutor USP II Vakil Modelo MK700
Columna para HPLC Dionex C ₁₈ de 250 mm x 46 mm	Sonicador de baño VWR Modelo 75D
Filtrador Milipore	Bomba de Vacío Gast
Filtros de Nylon	Microbalanza Mettler M75
Viales de vidrio 1 mL	Balanza Analítica OHAUS-Explorer Pro EP214
Vasos de precipitado P 600 mL	
Probetas graduadas 500 mL	
Micropipeta Eppendorf 100-1000 µL	

8. Metodología

8.1 Comprobación de la solubilidad de glibenclamida en diferentes disolventes

Se realizó una investigación bibliográfica para establecer la máxima solubilidad de la glibenclamida en diferentes disolventes y a diferentes pH's en medios acuosos, y los disolventes adecuados para la fase móvil de inyección de las muestras. Una vez establecido el dato, se disolvieron muestras de 1 mg en metanol, etanol, acetonitrilo, solución buffer pH 9 y pH 3 para verificar la información reportada.

8.2 Preparación de las soluciones buffer

Solución buffer de fosfatos pH 3: Se disolvieron en 400 mL de agua bidestilada 2.3495 gramos de fosfato monobásico de potasio y 0.4766 gramos de fosfato dibásico de potasio.

Solución buffer de fosfatos pH 9.5: Se disolvieron en 400 mL de agua bidestilada 3.4662 gramos de fosfato dibásico de potasio y 0.038 gramos de fosfato tribásico de sodio dodecahidratado. La solución se filtró y se sonicó durante 30 minutos.

Solución buffer de fosfatos pH 5.25: Se disolvieron en 400 mL de agua bidestilada 3.445 gramos de fosfato monobásico de potasio y 0.0302 gramos de fosfato dibásico de potasio. La solución tuvo el mismo tratamiento que las anteriores.

8.3 Selección del método cromatográfico

Condiciones de trabajo

Equipo: Sistema Varian compuesto de un cromatógrafo de líquidos modelo 240, un detector de longitud de onda UV-Vis ProStar modelo 325 y un inyector ProStar modelo M410.

Longitud de onda: 254 nm

Condiciones de lectura: 25°C

Columna cromatográfica: Dionex C₁₈ (250 mm x 4.6 mm de diámetro)

Velocidad de flujo: 2 mL/min

La fase móvil fue preparada diariamente filtrándose con un equipo Milipore®, filtrándose usando un filtro de membrana de 0.22 μm de diámetro de poro, y sometida a desgaseificación con ultrasonido en baño de agua antes de su uso.

8.4 Preparación de las muestras

Se pesaron con exactitud 3 muestras equivalentes a 350 μg de estándar secundario de glibenclamida y se aforaron a 10 mL con fases móviles de acetonitrilo: buffer pH 3, acetonitrilo: buffer pH 9.5 y acetonitrilo: buffer pH 5.25 respectivamente, todas a una relación 50:50. Las muestras fueron inyectadas con su respectiva fase móvil a un volumen de 50 μL cada una.

8.5 Optimización del método

Una vez encontrado el pH óptimo de la solución acuosa, se cambió la proporción de la fase móvil, para asegurar la mayor eficiencia y resolución de la respuesta cromatográfica.

8.5.1 Procedimiento

Se pesó una muestra equivalente a 350 μg de estándar de glibenclamida y se aforó a 10 mL con fase móvil de acetonitrilo: buffer pH 5.25, a una proporción 55:45 respectivamente. Se inyectaron 50 μL de ésta muestra a una velocidad de flujo de 2 mL/min.

8.6 Parámetros de validación del método propuesto

8.6.1 Adecuabilidad del sistema

Se preparó una muestra de glibenclamida equivalente a 150 $\mu\text{g/mL}$, disolviendo 1.8 mg de glibenclamida estándar secundario en un matraz aforado de 10 mL con fase móvil de acetonitrilo: buffer de fosfatos pH 5.25. Se colocó una fracción de la muestra en un vial y se inyectaron 5 veces volúmenes de 50 μL . De los resultados obtenidos, se obtuvo el C.V. de los siguientes parámetros, por medio del software del cromatógrafo:

- Número de platos teóricos
- Asimetría USP
- ABC
- Tiempo de retención
- Resolución USP

La Adecuabilidad del sistema se comprobó considerando que el C.V. de todos los parámetros mencionados era menor al 2%

8.6.2 Linealidad del sistema

Se preparó una solución stock de 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$, disolviendo 25 mg de estándar secundario de glibenclamida en un matraz aforado de 25 mL, agregando 3 mL de etanol y aforando con fase móvil acetonitrilo: buffer de fosfatos pH 5.25 en proporción 55:45 respectivamente.

De esta solución stock, se tomaron 6 alícuotas, de 0.5, 0.75, 1.0, 1.25 y 1.5 mL cada una, se le agregó a cada matraz 0.1 mL de estándar de glibenclamida y se aforaron a 10 mL con fase móvil (Concentraciones de 40, 80, 120, 160 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las muestras se colocaron en viales y se inyectaron en el cromatógrafo.

Con las áreas bajo la curva obtenidas, se calcularon la ecuación de la recta, el coeficiente de determinación (r^2), el intervalo de confianza de la ordenada al origen y se realizaron las pruebas estadísticas t de Student y F de Fisher para la pendiente y para la ordenada al origen.

8.6.3 Precisión del sistema

De la solución stock, se inyectaron 6 muestras de 50 μL a una concentración de 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se calculó el coeficiente de variación entre ellas.

8.6.4 Límite de detección

Se prepararon 6 muestras de placebo disolviendo, en 6 matraces aforados de 10 mL, 60 mg de matriz sol-gel y aforando con fase móvil, se sometieron a condiciones de ultrasonido en un baño de agua durante 5 minutos, se filtraron y se inyectaron 50 mL de cada muestra.

Independientemente, se prepararon 3 curvas con 3 concentraciones de placebo adicionado a concentraciones de 4, 8 y 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

De los datos obtenidos, se calculó la media de los valores máximos de los placebos, la pendiente de la curva de concentraciones, la desviación estándar de los blancos y el límite de detección.

8.6.5 Límite de cuantificación

Con los datos obtenidos de la linealidad del sistema, se obtuvieron los valores teóricos de las concentraciones utilizadas, por medio de la interpolación en la curva.

El límite de cuantificación se establece cuando la variación entre los valores

8.6.6 Linealidad del método

Se prepararon seis curvas de glibenclamida materia prima con placebo (60 mg de matriz de sol-gel vacía en cada matraz) en un intervalo de concentraciones de 90 a 210 $\mu\text{g/mL}$, equivalentes a concentraciones del 60% al 140% del intervalo de trabajo. Los matraces fueron sonicados por 5 minutos, las muestras se filtraron y se colocaron en viales. Se inyectaron volúmenes de 50 μL de cada vial.

Con las áreas bajo la curva obtenidas, se calcularon la ecuación de la recta, el coeficiente de determinación (r^2), el intervalo de confianza de la ordenada al origen y se realizaron las pruebas estadísticas t de Student para la pendiente y F de Fisher para la ordenada al origen.

8.6.7 Selectividad del método

Se prepararon tres muestras que contenían placebo (60 mg de matriz sol-gel vacía), una muestra blanco (fase móvil), y una muestra de placebo adicionado (60 mg de matriz sol-gel más 2.5 mg de glibenclamida, las cuales fueron aforadas a 10 mL cada una, sonicadas por 5 minutos, filtradas y colocadas en viales. Se inyectaron volúmenes de 50 μL de cada vial.

Se determinó si el ABC obtenida a partir de la muestra de placebo adicionado en el tiempo de retención de la glibenclamida era debida solamente a esta, y no a la presencia de alguna sustancia similar, o a la interacción con alguno de los componentes del placebo.

8.6.8 Estabilidad de la muestra

Se prepararon por triplicado, tres placebos adicionados a una concentración de 150 $\mu\text{g/mL}$, las cuales se sonicaron por cinco minutos, se filtraron y se colocaron en viales.

Ocho viales de cada muestra se colocaron a cuatro temperaturas diferentes (22°C bajo cero, 5°C, 20°C y 30°C respectivamente) y éstos fueron inyectados a las 0, 1, 2, 4, 6, 20 y 24 horas.

De los valores de ABC obtenidos, se calcularon las diferencias absolutas entre las muestras y un análisis de varianza de un factor para determinar la condición y tiempo máximo de almacenamiento de las muestras.

8.6.9 Robustez del método

Cambio de la preparación de la solución buffer pH 5.25

Buffer de fosfatos pH 5.25 (mencionada en la página 22)

Buffer de fosfato de monobásico de amonio pH 5.25: Se disolvieron en 400 mL de agua, 2.3 gramos de fosfato monobásico de amonio. La solución se filtró y sonicó por 30 minutos.

Cambio en la longitud de onda de lectura de las muestras

De seis muestras preparadas independientemente a 150 µg/ mL, se inyectaron 50 µL y se leyeron con una diferencia de ± 10 nm del método cromatográfico a 254 nm (264 y 244 nm respectivamente).

Cambio en la proporción de la fase móvil

Se cambió la proporción de la fase móvil establecida acetonitrilo: buffer de fosfatos pH 5.25 (55:45) a una proporción de 60:40 respectivamente.

A partir de las ABC de estos experimentos, se calcularon los efectos, las varianzas de efecto y los errores estandarizados del efecto, y posteriormente se calcularon t de Student de cada efecto (proporción de la fase móvil y preparación de la solución buffer).

8.6.10 Precisión intermedia

Este parámetro expresa la variación dentro de un mismo nivel de cambio, que permite enfocarse en la desviación de una serie de parámetros de control específicos.

Por cada tratamiento, se realizaron por sextuplicado, muestras de placebo adicionado a una concentración de 150 µg/mL con 60 mg de matriz sol-gel vacía. Las muestras se sonicaron, se filtraron y se colocaron en viales para su inyección (50 µL) en el sistema cromatográfico.

Para esto, se realizó una tabla de ANAdeVA de dos factores, de acuerdo al modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j(i) + \varepsilon_{ij}(k)$$

donde se observa que $\beta_j(i)$ representa el efecto anidado al factor α_i . La representación de la matriz del diseño experimental se muestra en la figura 6:

Factor		Analista	
Día	1	1	2
		T1A1 ₁	T2A1 ₁
		T1A1 ₂	T2A1 ₂
		T1A1 ₃	T2A1 ₃
		T1A1 ₄	T2A1 ₄
		T1A1 ₅	T2A1 ₅
		T1A1 ₆	T2A1 ₆
	2	T1A2 ₁	T2A2 ₁
		T1A2 ₂	T2A2 ₂
		T1A2 ₃	T2A2 ₃
		T1A2 ₄	T2A2 ₄
		T1A2 ₅	T2A2 ₅
		T1A2 ₆	T2A2 ₆

Figura 6. Matriz del diseño experimental para la precisión intermedia

8.6.11 Aplicación del método a la disolución de matrices sol-gel de glibenclamida

A partir de las matrices sol-gel de glibenclamida se pesaron 6 muestras de 1.5 gramos, equivalentes a aproximadamente 33 mg de glibenclamida; se colocaron en 6 vasos con 500 mL de medio a pH 9.5 y lauril sulfato de sodio al 0.01%. El medio se mantuvo durante todo el estudio a 37°C.

La disolución se siguió durante 6 horas, cada 10 minutos durante la primera hora, cada 20 minutos hasta las 2 horas, cada 30 minutos hasta la tercera y cada hora hasta la sexta.

De cada vaso, se tomaron muestras de 2 mL en cada tiempo y de estas, se inyectaron 50 μ L en el cromatógrafo. Se inyectaron muestras control a 150 μ g/ mL y con estas, se calculó el porcentaje disuelto en cada vaso.

El método se consideró adecuado a la disolución si los coeficientes de variación eran menores del 20% en el primer punto, y menores de 10% en los subsecuentes puntos.

9. Resultados y discusión

9.1 Selección del método cromatográfico

En la figura 7 se muestra un cromatograma de estándar secundario de glibenclamida, con una fase móvil ACN: Buffer fosfatos pH 9.5 (50:50)

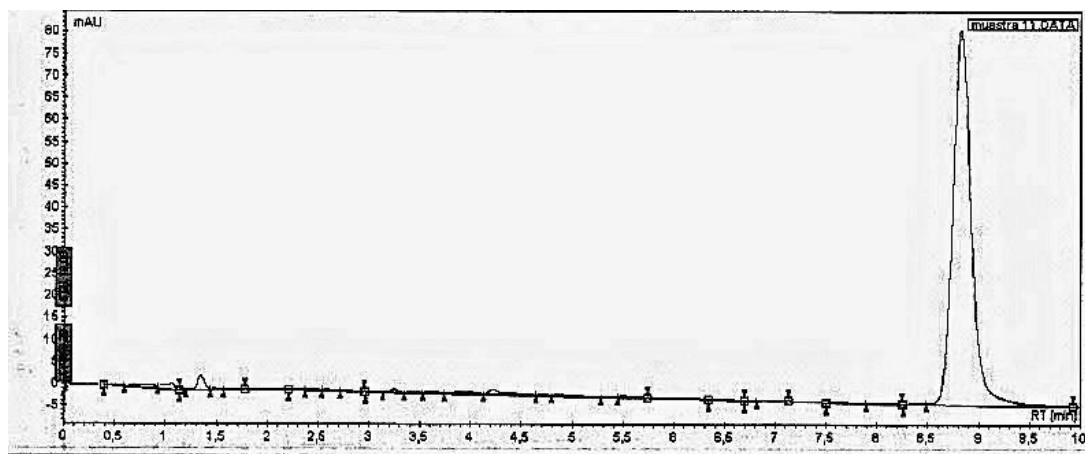


Figura 7. Cromatograma de Glibenclamida estándar (35 mg/mL).

Se aprecia en el cromatograma de la figura 7 un pico con un tiempo de retención muy alto, con base en los criterios de exclusión propuestos (8.5 minutos), además de una anchura de 1 minuto, así que este método propuesto no era adecuado, ya que hacer una lectura de una gran cantidad de muestras con estos tiempos tendría como consecuencia un gasto excesivo del equipo y recursos, y no tendría viabilidad al realizar el manejo de un gran volumen de muestras.

Enseguida se evaluó otro método, con una lectura a pH 3, y con las mismas proporciones de la fase móvil, mostrando el siguiente cromatograma:

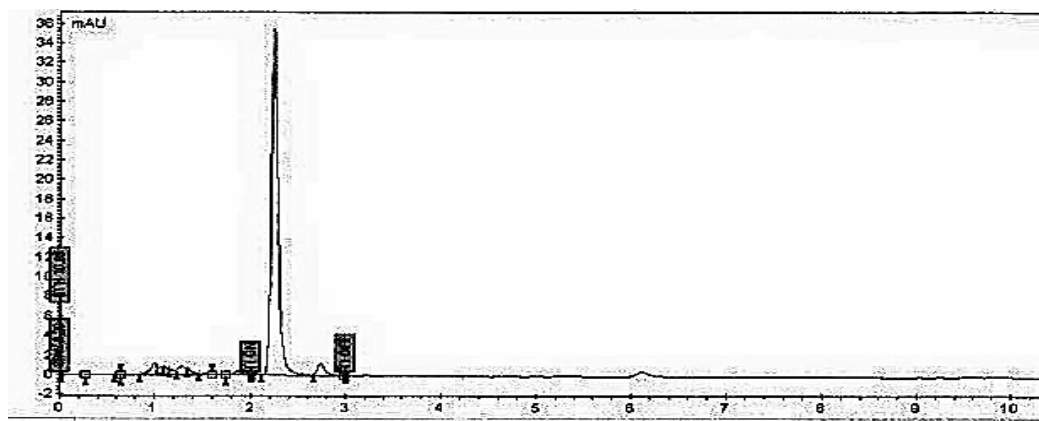


Figura 8. Cromatograma de Glibenclamida STD (35 mg/mL) a pH 3

El cromatograma de la figura 8 muestra un pico bien definido, con un tiempo de retención de 2.1 minutos y un buen ancho de pico (0.2 minutos), pero tampoco es aceptable, ya que éste se encuentra muy cerca del frente del disolvente, además que el pH de la fase acuosa no permitía que la glibenclamida se encontrara totalmente soluble (cerca de 4 µg/mL).²⁹

Se evaluó un nuevo método a pH 5.25, donde existiera la máxima solubilidad de la glibenclamida.⁵

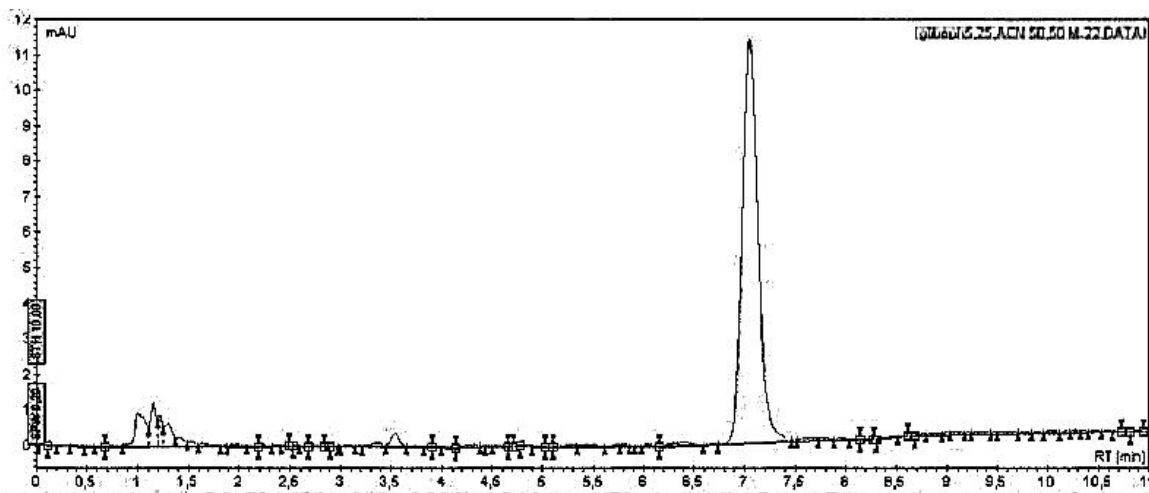


Figura 9. Glibenclamida STD (35 mg/mL); pH 5.25

En la figura 9 se puede observar el frente del disolvente, un pico bien definido a los 7 minutos, y aunque el ancho de pico es algo grande (0.6 min), es susceptible a mejorar al modificar la proporción de la fase móvil, como lo muestra el cromatograma de la figura 10.

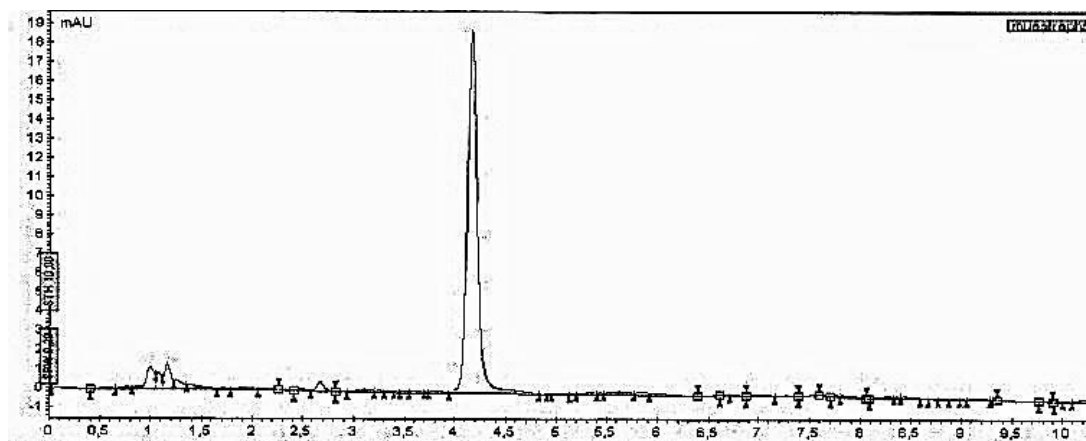


Figura 10. Glibenclamida STD (35 mg/mL); fase móvil ACN:Buffer fosfatos pH 5.25 (55:45)

En el cromatograma de la figura 10 se aumentó la proporción de acetonitrilo en 5%, observándose un decremento del tiempo de retención hasta los 4 minutos, con un ancho de pico de 0.3 minutos.

De ésta manera, las condiciones del método óptimas para su validación y la aplicación al método de disolución fueron (Tabla 2):

Tabla 2. Condiciones cromatográficas óptimas
Longitud de onda: 254 nm
Condiciones de lectura: 25°C
Columna cromatográfica: Dionex C ₁₈ (250 mm x 4.6 mm de diámetro)
Velocidad de flujo: 2 mL/min
Fase móvil: Acetonitrilo: buffer de fosfatos pH 5.25 (55:45)

A partir de la optimización del método, se procedió a realizar la validación del mismo, comenzando con la adecuabilidad del sistema cromatográfico, esencial para determinar las características del equipo y si permite o no el desarrollo de la validación.

9.2 Adecuabilidad del sistema

La tabla 3 muestra los resultados generales de adecuabilidad del sistema, utilizando 5 parámetros cromatográficos importantes en los ensayos cromatográficos (tiempo de retención, asimetría, área bajo la curva o ABC, número de platos teóricos y factor de capacidad).

Tabla 3. Resultados y conclusiones de adecuabilidad del sistema					
Factor	Tiempo de retención (min)	Asimetría USP	Área bajo la curva (mUA*seg)	Número de platos teóricos	Factor de capacidad (K')
Promedio	4.138	1.066	2360.44	8902.564	0.458
Desviación estándar	0.040	0.009	9.624	87.692	0.004
C.V. (%)	0.958	0.839	0.408	0.985	0.976
Conclusión	No se rechaza	No se rechaza	No se rechaza	No se rechaza	No se rechaza

Los resultados muestran que los parámetros de una inyección múltiple de una misma muestra poseen un coeficiente de variación menor al 1%, por lo que se concluye que el equipo tiene un buen desempeño para continuar con los parámetros de validación.

9.3 Linealidad del sistema

Con los datos de ABC obtenidos, se construyó la curva Concentración Vs. ABC, la cual nos permite observar gráficamente la pendiente y el coeficiente de correlación

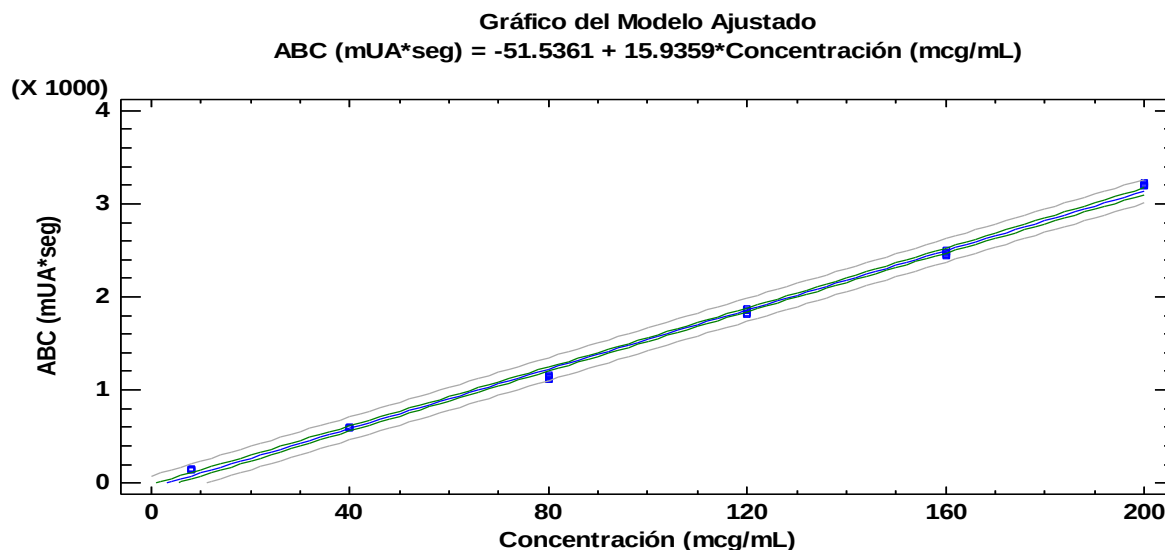


Gráfico 1. Curva de linealidad de sistema. Los valores de concentración son expresados en microgramos por mL, mientras que la respuesta es expresada en miliunidades de absorbancia por segundo

Posteriormente, se le realizaron análisis estadísticos a los datos obtenidos a partir de la curva, mostrados en las tablas 4 y 5:

Tabla 4. Parámetros de la recta de linealidad del sistema

Concentración (µg/mL)	Promedio de ABC	SD	CV
40	592.10	6.95	1.17
80	1133.95	22.01	1.94
120	1837.24	25.25	1.37
160	2469.82	26.72	1.08
200	3206.04	24.58	0.77

Tabla 5. Datos de la curva de linealidad de sistema

m	16.409
b	-121.29
r²	0.9972
IC (m)	14.36 18.46

De la tabla 4 se observan los coeficientes de variación por nivel menores a 2%, lo que nos muestra que la precisión del sistema no se rechaza, por lo que se procedió a realizar los cálculos de la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de determinación.

La tabla 5 muestra el coeficiente de determinación (r^2), concluyéndose que el 99.72% de los datos se pueden explicar por el modelo lineal, además de obtener una ecuación de la recta que predice los datos de la siguiente manera:

(Ecuación 7)
$$ABC = 16.409 []_{gliben} - 121.290$$

Se observó además que el intervalo de confianza para la pendiente no incluyó al cero. Para aceptar ésta afirmación se realizó una tabla de ANAdeVA de 1 factor, con una F de Fisher como estadígrafo, y una t de Student de dos colas para la pendiente.

Ho: m=0	
Ha: m≠0	
SC Total	3.72*10 ⁹
SC rl	3.71*10 ⁹
SC error	1.03*10 ⁷

Tabla 6. Tabla de <u>ANAdeVA</u> de regresión de linealidad del sistema				
Fuente	Producto simbólico desarrollado	g.l.	SC	CM
Regresión	k-1	1	3711985255	3711985255
Error de regresión	kj-k	28	10332403.14	369014.398
Total	kj-1	29	3722317658	

F	F _{tablas}	Conclusión
10059.18814	4.196	Ho no se rechaza

De acuerdo con la tabla de ANAdeVA, si la F calculada es mayor a la F de tablas, existe una relación lineal entre la concentración de glibenclamida y el ABC de los picos de los cromatogramas, por lo que se concluye que existe linealidad en el sistema de medición.

Para la pendiente:

Ho: m=0

Ha: m≠0

m	15.936
----------	--------

t_{calc}	100.863
-------------------------	---------

t _{tablas}	Conclusión
-2.048 2.048	Ho se rechaza

De acuerdo con el valor de t_{calc} la hipótesis nula se rechaza, por lo que se concluye igualmente que existe relación lineal significativa entre la concentración de la glibenclamida y el ABC obtenida de los picos cromatográficos.

9.4 Linealidad y exactitud del método

Tabla 7. Tabla de ANAdeVA para el cálculo de F de regresión y F de falta de ajuste de exactitud del método

Fuente	gl	SC	CM	F _{calc}	Conclusión
Regresión	1	5367963.67	5367963.67	11012.3042	Ho no se rechaza
Error regresión	28	13648.6407	487.451453		
Falta de ajuste	3	72337742.9	24112581	8.33490596	Ho no se rechaza
Error puro	25	72324094.3	2892963.77		

F_{tablas}
4.196

Las conclusiones de la tabla 7 muestran que el método presenta una relación lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada, además, que no existe evidencia para rechazar el ajuste lineal de los datos.

Tabla 8. Datos de recta de exactitud del método

m	0.9954
b	-0.3624
r ²	0.9975
S _{y/x}	22.07830276
S _{b'}	14.8029
IC (m)	0.71 3.04
IC (b)	-29.23 28.50

Los datos de la tabla 8 muestran que el coeficiente de determinación explica el 99.75% de los datos según el modelo lineal, el intervalo de confianza para la pendiente incluye la unidad, por lo que no existe error sistemático consistente, y el intervalo de confianza para la ordenada al origen incluye el cero, por lo que el método también carece de error sistemático constante.

Tabla 9. Parámetros de exactitud del método	
Promedio %R	99.52
SD	1.242
t_{calc}	0.07
t_{tablas}	1.70
Conclusión	El método es exacto

La prueba de t de Student mostró una t calculada menor a la de tablas, por lo que se concluye que el método es exacto.

Como conclusión final, se puede decir que el método es exacto en el rango de concentraciones de 90 a 210 µg/mL.

Por último, se muestra la gráfica de linealidad del método y la prueba de hipótesis contrastando la cantidad adicionada con la respuesta analítica, donde se muestra el comportamiento de los datos en la curva, de acuerdo al gráfico 2:

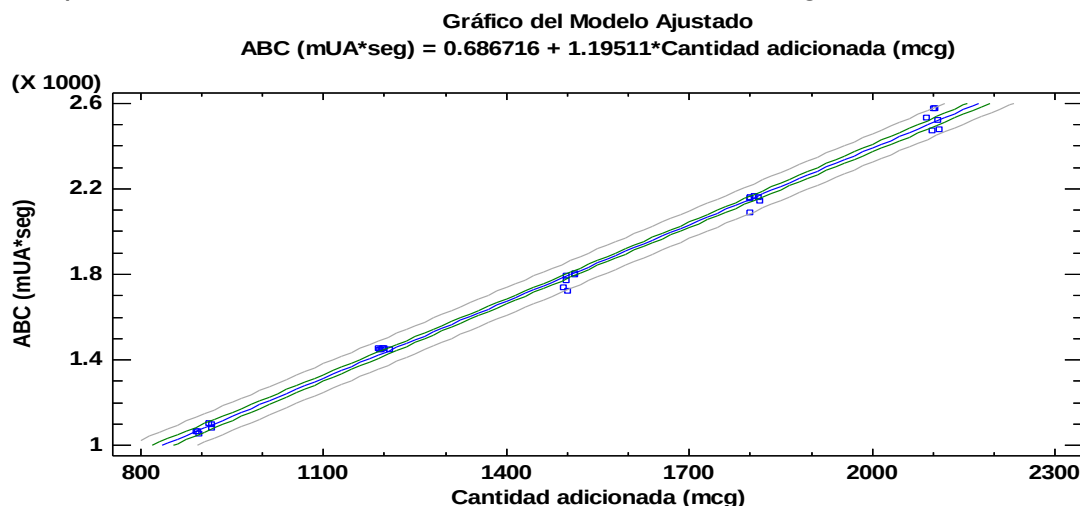


Gráfico 2. Curva de linealidad de sistema. Los valores de cantidad adicionada son expresados en microgramos, mientras que el ABC en miliunidades de absorbancia por segundo

El coeficiente de determinación de la linealidad cantidad adicionada con respecto a la respuesta analítica nos dice que el 99.65% de los datos son explicados por el modelo lineal. La ecuación de la recta que predice los datos de la linealidad del método es:

(Ecuación 8)
$$ABC = 1.1951 \text{Cantidad}_{adicionada} + 0.6867$$

SC Total	7765069.79
SC rl	7737809.14
SC error	27260.6488

Tabla 11. Tabla de <u>ANAdEVA</u> de regresión de linealidad del método			
Fuente	gl	SC	CM
Regresión	1	7737809.14	7737809.14
Error regresión	28	27260.6488	973.594598
F	F _{tablas}	Conclusión	
7947.670579	4.196	Ho no se rechaza	

Ya que la F calculada es mayor a la F de tablas, existe una relación lineal significativa entre el área bajo la curva de los picos propios de la glibenclamida y la cantidad adicionada de la misma.

9.5 Límite de Detección del método

Los resultados de las lecturas de los blancos se expresan en términos de altura de pico.

Tabla 12. Valores de altura máxima de pico de blancos para límite de detección	
Blanco	Altura máxima (mUA)
1	2.2
2	0.9
3	0.9
4	1.3
5	1.4
6	1.5

Tabla 13. Valores crudos para límite de detección del método	
Concentración (µg/mL)	Altura de pico (mUA)
4	12.9
	12.4
	12.3
8	25.3
	25.9
	24.9
	35.6
12	35.3
	35.1

Con los datos de la tabla 13 se calcularon las sumas de los parámetros para calcular la desviación estándar de los blancos por la siguiente ecuación:

(Ecuación 9)
$$DEB = \sqrt{\frac{n(\sum Z_i^2) - (\sum Z_i)^2}{n'(n'-1)}}$$

Los datos obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 14. Valores de desviación estándar de los blancos y límite de detección	
Parámetro	Valor
DEB	1.21
m	2.85
LD	1.27

La tabla 14 muestra que el límite de detección del método para la glibenclamida es de 1.27 mUA bajo las condiciones de trabajo establecidas, lo que es una concentración aproximada de 405 ng/mL.

9.6 Límite de cuantificación del método

Los resultados utilizados para calcular el límite de cuantificación corresponden a las concentraciones de la linealidad del sistema (tabla 5) y la ecuación de la recta obtenida.

Estos valores de concentración se interpolaron y se calcularon los valores teóricos de las áreas bajo la curva, para calcular los valores de t de tablas de cada dilución y determinar la mínima dilución en donde se podía cuantificar la glibenclamida.

Tabla 15. Valores de ABC para límite de cuantificación				
Concentración (μg/mL)	Promedio de ABC (mUA*seg)	ABC interpolado (mUA*seg)	SD	CV
40	592.10	586.01	6.95	1.17
80	1133.95	1223.45	22.01	1.94
120	1837.24	1860.89	25.25	1.37
160	2469.82	2498.33	26.72	1.08
200	3204.37	3190.00	24.58	0.77

Los resultados de las t's calculadas y sus conclusiones se muestran en la tabla 16:

Tabla 16. Valores de T y conclusiones de límite de cuantificación del método

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	$ t_{\text{calc}} $	t_{tablas}	Conclusión
40	2.15		Se cuantifica
120	2.29	3.16	Se cuantifica
160	2.61		Se cuantifica

La tabla muestra que a la concentración más baja de la linealidad del sistema (40 $\mu\text{g/mL}$), se puede cuantificar con precisión y exactitud.

9.7 Selectividad del método

En la figura 11 se observa el cromatograma del placebo, en el cual no se muestra un pico representativo cercano a los 4 minutos, dando a ver que por sí mismo, el placebo no presenta una señal parecida a la glibenclamida, ni picos significativos antes o después de éste tiempo.

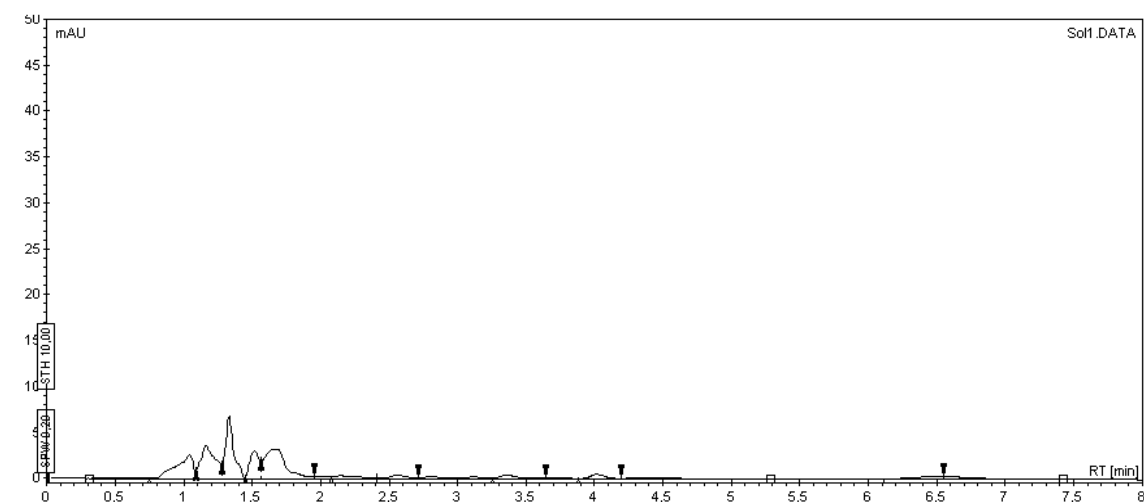


Figura 11. Cromatograma placebo (matriz sol-gel vacía) a 6 mg/mL. Fase móvil ACN: Buffer fosfatos pH 5.25 (55:45) a 2 mL/min y 254 nm

En la figura 12 se observa que la señal de la glibenclamida no se desplaza de su tiempo de retención (4 minutos), además de no presentar picos antes o después del ya mencionado, concluyéndose que el método es selectivo para la matriz sol-gel de glibenclamida, además que ésta no interacciona con alguno de los componentes de la matriz.

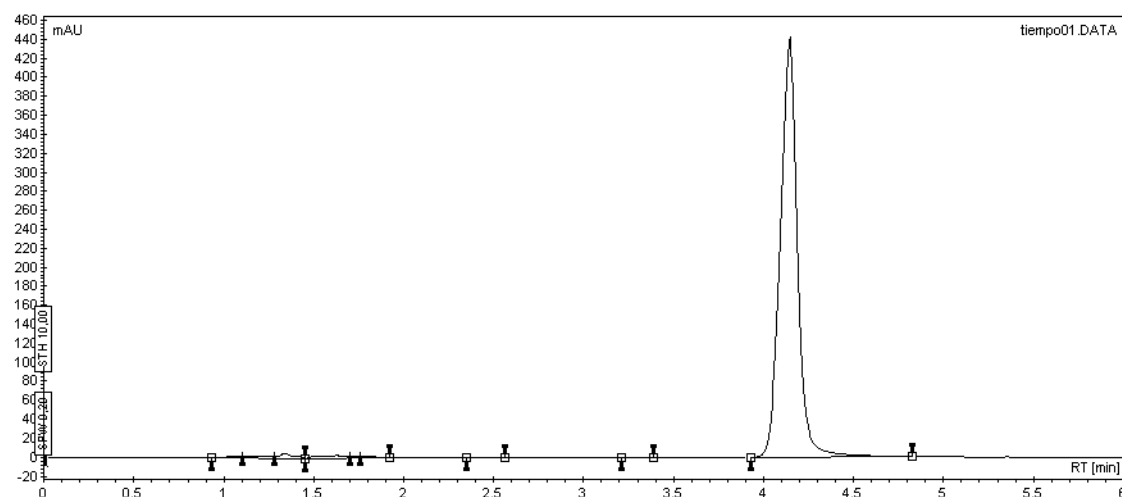


Figura 12. Cromatograma de placebo adicionado (matriz sol-gel vacía) con glibenclamida 250 $\mu\text{g/mL}$. Fase móvil ACN: Buffer de fosfatos pH 5.25 (55:45) a 2 mL/min y 254 nm

9.8 Estabilidad de la muestra

Con los siguientes datos, se determinó la diferencia entre las muestras a partir de la prueba de ANAdeVA por cada condición de temperatura.

En la tabla 17 se muestran los estadígrafos F de Fisher para cada una de las condiciones de almacenamiento a las que se sometieron las muestras.

Tabla 17. Pruebas F de condiciones para estabilidad de la muestra			
Condición	F_{calc}	F_{tablas}	Conclusión
22°C bajo cero	1.047	2.848	Ho no se rechaza
3°C	0.816		Ho no se rechaza
20°C	0.982		Ho no se rechaza
30°C	0.986		Ho no se rechaza

9.9 Robustez del método

Tabla 18. Valores t de cada efecto de robustez del método					
Variable	Efecto	Error STD del efecto	t_{efecto}	t_{tablas}	Conclusión
pH	0.8547	0.6763	1.26	2.01	La variable no presenta efecto en la respuesta
λ_{244}	0.2515	0.8637	0.29		La variable no presenta efecto en la respuesta
λ_{264}	2.3485	1.3416	1.75		La variable no presenta efecto en la respuesta

Como se puede observar en la tabla 18, el efecto de la preparación de la solución buffer y del cambio de la longitud de onda 10 nm por debajo y por encima del método, no presenta un efecto significativo en el ABC obtenido.

Por otro lado, se observó que a longitudes bajas, la glibenclamida absorbe una cantidad mayor de energía, lo que provoca que la absorbancia observada aumente considerablemente (aproximadamente un 250%). Esto se debe al llamado efecto hipsocrómico, que establece que en solventes polares, se forman interacciones débiles entre la molécula y el disolvente, por medio de interacciones dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido y puentes de hidrógeno, aumentando la energía en proporción a la cantidad de glibenclamida que se encuentra disuelta.³⁰

Además, se comprobó que, aunque estadísticamente no hay diferencia en la preparación de la solución amortiguadora si se utiliza una o dos sales en su preparación, al inyectar una muestra sin diluir, que parte de una solución con pH básico (9.5), el poder amortiguador de la solución con una sal es mínimo (ya que el pH del sistema se eleva hasta 8.5), que si se prepara con dos sales (el pH del sistema se eleva hasta 6). Se puede apoyar la afirmación anterior, ya que los picos obtenidos a partir de la solución amortiguadora con una sal se encontraban deformados ligeramente, la asimetría aumentaba aproximadamente un 10%, y la eficiencia se veía disminuida alrededor de un 30%.³¹

9.10 Precisión intermedia

Se calculó el estadígrafo F de Fisher con el error anidado, por un ANADEVA de dos factores. Los resultados se muestran en la tabla 19:

Tabla 19. Tabla de ANAdeVA de factores para precisión intermedia

Fuente	gl	SC	CM	F	F _{tablas}		Conclusión
ANALISTA	1	8.442	8.442	3.785	0.094	6.944	Ho no se rechaza
DIA	2	7.852	3.926	1.760	0.094	6.944	Ho no se rechaza
ERROR	20	44.612	2.231				
Total	23	60.907					

Los resultados muestran que el analista y el día no influyen en el método, además que el error distribuido en el modelo no es estadísticamente significativo para aumentar el valor de las F calculadas.

En la tabla 20 se muestra un compilado de los parámetros evaluados, criterios de aceptación y conclusión

Tabla 20. Compilado general de parámetros y conclusiones de la validación del método por HPLC de glibenclamida					
Parámetro		Criterio de aceptación	Resultado		Conclusión
Adecuabilidad del sistema	Tiempo de retención	CV < 2%	0.958		No se rechaza
	Asimetría		0.839		No se rechaza
	Número de platos teóricos		0.985		No se rechaza
	Área bajo la curva		0.408		No se rechaza
	Factor de capacidad		0.975		No se rechaza
Linealidad del sistema	Coeficiente de determinación (r^2)	$r^2 < 0.98$	0.9973		No se rechaza
	F de Fisher para la pendiente	$F_{\text{calc}} > 4.196$	10474.012		No se rechaza
Precisión del sistema	CV por nivel	CV < 2%	Todos los CV menores al 2%		No se rechaza
Linealidad del método	Coeficiente de determinación (r^2)	$r^2 < 0.98$	0.9975		No se rechaza
	Intervalo de confianza para la media	IC (m) debe incluir la unidad	-0.71	3.04	No se rechaza
	Intervalo de confianza para la pendiente	IC (b) debe incluir al cero	-29-23	28.50	No se rechaza
	F de Fisher para el modelo	$F_{\text{calc}} > 4.196$	7947.67		No se rechaza
Exactitud del método	t de Student	$t < 1.70$	0.07		No se rechaza
Robustez	t de Student de cada efecto	$t < 2.01$	todas las t < 2.01		No se rechaza
Precisión intermedia	F de Fisher para cada factor anidado	$0.094 < F < 6.944$	F= 3.785 F= 1.76		
Límite de cuantificación	t de Student	$t < 3.16$ en cada nivel	el valor de t es menor		No se rechaza

Tabla 20. Compilado general de parámetros y conclusiones de la validación del método por HPLC de glibenclamida (continuación)

Estabilidad de la muestra	F de Fisher para cada condición	$F_{\text{calc}} < 2.848$	-22°C: 1.046	No se rechaza
			3°C: 0.816	No se rechaza
			20°C: 0.982	No se rechaza
			30°C: 0.986	No se rechaza
Límite de detección	DEB	---	1.27 mUA	No se rechaza

9.11 Aplicación a la construcción de perfiles de disolución de glibenclamida a partir de matrices sol-gel

Una vez que el método fue validado, se evaluó su aplicación al perfil de disolución de matrices sol-gel de glibenclamida, las cuales fueron fabricadas con una concentración de 22.5 mg de glibenclamida por cada gramo de matriz. Los resultados de porcentaje disuelto hasta la sexta hora se muestran en la tabla 21:

Tabla 21. Promedios y CV's de porcentajes disueltos			
Tiempo (min)	Promedio	SD	CV
10	21.07	1.66	7.86
20	31.73	1.74	5.47
30	37.51	1.15	3.06
40	39.36	1.48	3.77
50	40.58	1.06	2.61
60	41.51	1.31	3.15
80	42.64	0.92	2.17
100	43.83	0.97	2.22
120	45.11	1.36	3.02
150	46.37	1.49	3.21
180	46.16	2.25	4.87
240	46.98	2.38	5.06
360	46.37	2.02	4.36
480	47.12	2.63	5.58

Se observa que el método pudo utilizarse para cuantificar la glibenclamida liberada por la matriz sol-gel, además que los porcentajes disueltos no presentan una variación muy grande, como se observa en el gráfico tres:

Disolución de matrices sol-gel de glibenclamida

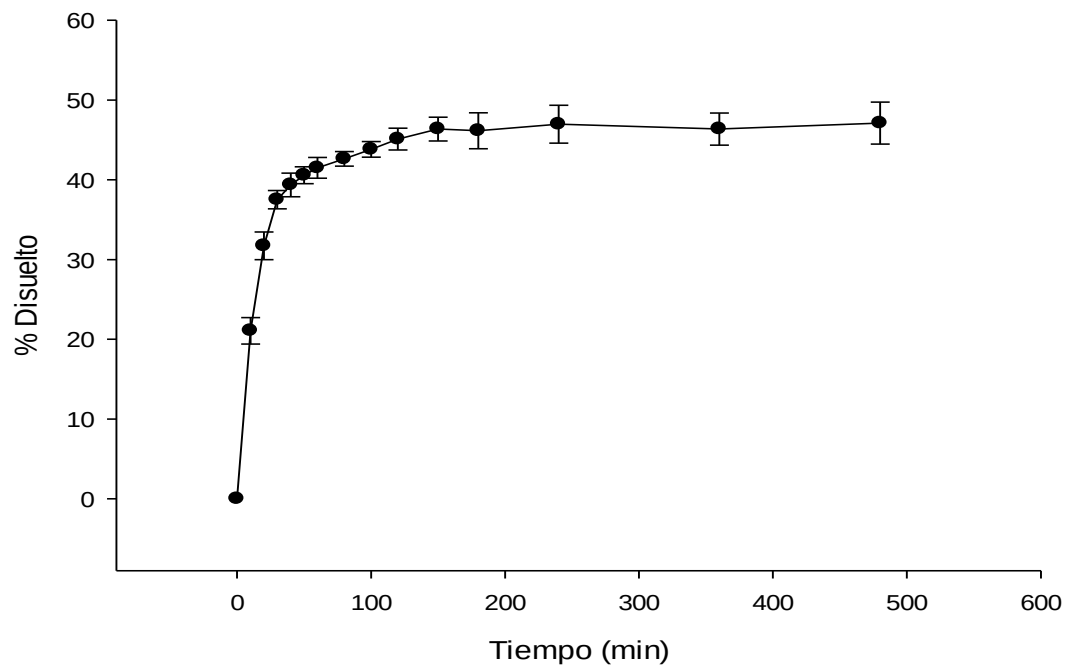


Gráfico 3. Perfil de disolución de matrices sol-gel 22.5 mg/ g. de matriz en 500 mL de medio pH 9.5 con laurilsulfato de sodio al 0.01%

10. Conclusiones

En el caso de la glibenclamida, la dificultad de encontrar un medio disolvente en el cual se pudiera cuantificar con exactitud y precisión fue descartada, además de que las condiciones cromatográficas permiten el manejo de las muestras en un amplio rango de concentraciones.

Se logró diseñar un método cromatográfico en donde la glibenclamida tuviera un tiempo de retención por debajo de los 7 minutos cumpliendo con los criterios de inclusión y mejorando muchas otras propuestas de métodos ya existentes, además de cumplir con los parámetros de adecuabilidad del sistema establecidos por la FEUM.

El método cumplió con los parámetros de validación, por lo que se pudo implementar para la cuantificación de glibenclamida liberada a partir de matrices sol-gel.

El método es viable para la cuantificación de glibenclamida en perfiles de disolución.

11. Referencias:

1. Korean Pharmacopoeia. 9th ed. Korea: Korea Food and Drug Administration; 2007. 455-456
2. Sweetman S, editor. Martindale: The Complete Drug Reference. 36th ed. London: Pharmaceutical Press; 2002. 440
3. Secretaria de Salud. Programa de acción Diabetes Mellitus. SSA. México, 2011
4. Löbenberg, R., Amidon, G.L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. Eur. J. Pharm. Biopharm. 2000; 50: 3-12
5. Zoeller T, et al. Improving glyburide solubility and dissolution by complexation with hydroxybutenyl-beta-cyclodextrin. J. Pharm. Pharmacol. 2009; 61: 23-30.
6. Contreras F, Romero B, Suárez N, González M, Fouilloux C, Guevara E et al. Receptores Sur y Sulfonilureas en el tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2. AVFT [Internet]. Julio 2002 [Revisado 2 Agosto 2012]; 21(2): 148-155. Disponible en:
http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642002000200003&lng=es
7. Flórez, J. Farmacología Humana. 3ed. Elsevier: España; 1997: 935-938.
8. Brockmeier D., Grigoleit H.G., Leonhardt H. Absorption of glibenclamide from different sites of the gastrointestinal tract. Eur. J. Clin. Pharmacol. 1985; 29: 193-197
9. Stout T, Dorsey. High Performance Liquid Chromatography en: Ohannesian L, Streeter A, Handbook of Pharmaceutical Analysis. Marcel Dekker, USA: 2002; 103-143,150-154
10. Weston A, Brown P, HPLC and CE. Principles and Practice. Academic Press. USA: 1997; 7-21, 24-28, 71-129
11. Kazakevich Y, LoBrutto R, HPLC for Pharmaceutical Scientists. John Wiley & Sons. USA: 2007; 9, 15-22, 27-37, 347-380, 455-499

- 12.** British Pharmacopoeia. Glibenclamide tablets. 9th ed. The Stationary Office Limited, UK: 1998(Vol. II); 433
- 13.** López A, Felizola A, Hernández V, Cuartero T, Validación de un método analítico espectrofotométrico para cuantificar glibenclamida tabletas de 5 mg. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, México: 2005; 36: 33-41
- 14.** British Pharmacopoeia. Glibenclamide tablets. 10th ed. The Stationary Office Limited, UK: 2000 (Vol. II); 468
- 15.** United States Pharmacopoeia Convention, Inc. United States Pharmacopoeia 32/ National formulary 27. Rockville, MD: U.S Pharmacopeial Convention, Inc. 2010; 2483-2486
- 16.** Rydberg T., Wåhlin-Boll E. Determination of glibenclamide and its two major metabolites in human serum and urine by column liquid chromatography. Journal of Chromatography B. 1991; 564: 223-233
- 17.** Shabir G.A. HPLC Method Development and Validation for Pharmaceutical Analysis. Pharmaceutical Technology Europe. [Internet] Marzo 2004 [Revisado el 29 de junio de 2012]; Disponible en: <http://www.pharmtech.com/pharmtech/article/articleDetail.jsp?id=89002>
- 18.** Ermer J, Miller J. Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Germany: 2005; 21-125
- 19.** SSA. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998 Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
- 20.** SSA. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006; Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico-farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.
- 21.** Belal F, Sharaf ElDin M, Aly F. Hefnawy M, El-Awady M. Spectrophotometric analysis of a mixture of glyburide and metformin HCl in pharmaceutical preparations. Der Pharma Chemica. 2011; 3: 53-64

22. Qureshi S., McGilberay I. Typical variability in drug dissolution testing: study with USP and FDA calibrator tablets and marketed drug (glibenclamide) product. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1999; 7: 249-258
23. Reyes N. Síntesis, caracterización y aplicaciones potenciales en catálisis de materiales híbridos metálico-orgánico-inorgánico a partir del proceso sol-gel. Tesis de Licenciatura. UNAM. FES Zaragoza. México D.F. 2011; 3-9
24. Ramírez M., Huriache R., Espinosa G., Hernández G. Estado del arte del proceso sol-gel en México. *Ciencia ergo sum*. 2010; 17(2), 183-188
25. Dimitriev Y., Ivanova Y., Iordanova R. History of sol-gel science and technology (Review). *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*. 2008; 43 (2): 181-192
26. Center of Drug Evaluation and Research. Guidance of Validation of Chromatographic Methods. CDER, 1994
27. FDA. Guideline for submitting supporting documentation in drug applications for the manufacture of drug substances. CDER, 1987
28. Tsong Y. Recent Issues in Stability Study. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*. 2003; 13 (3): vii-ix
29. Avdeef A. Solubility of sparingly-soluble ionizable drugs. *Advance Drugs Delivery Reviews*. 2007; 59: 568-590
30. Abd-Elgawad R., Shimaa E., Voltametric and spectrophotometric study of the complexation of glibenclamide with β -cyclodextrine. *J Inc Phenom Macrocycl Chem*, 2010; 68: 417-421
31. Bosch E., Espinosa S., Rosés M. Retention of Ionizable compounds on high-performance liquid chromatography III. Variation of pK values of acids and pH values of buffers in acetonitrile-water mobile phases. *Journal of Chromatography A*. 1998; 824: 137-146