



Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua  
UNAN - LEON  
Facultad de Ciencias Químicas  
ESCUELA DE FARMACIA

TESIS PARA OBTAR AL TITULO DE  
LICENCIATURA EN FARMACIA Y QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD



TEMA: VALIDACIÓN DE UN METODO DE DISOLUCIÓN DE  
TABLETAS DE GLIBENCLAMIDA 5 MG. POR HPLC.  
ELABORADAS EN LABORATORIOS RAMOS

Autores: Deyanira Delgado Gallo  
Karen Delgado Rojas  
Ersil Dimas Zelaya

Tutor: Lic. Fernando Baca Escoto

León, Nicaragua  
Mayo, 2001





178.033

C. 1

## AGRADECIMIENTO

**A DIOS**, nuestro señor todo poderoso quien nos guió y ayudó en nuestra sabiduría y dedicación en la finalización de nuestros estudios así como también le pedimos de antemano nos bendiga y proteja en la continuación de nuestro futuro profesional.

**A NUESTROS PADRES**, que nos brindaron todo el amor y apoyo incondicional a lo largo de nuestra carrera con el fin de llegar a ser profesionales útiles a la sociedad.

**A NUESTRO TUTOR**, Lic. Fernando Baca, quien supo guiarnos y orientarnos en el logro y finalización de éste trabajo monográfico.

Y de forma muy especial a la Lic. Saura Mendoza, por su disposición en la realización de éste trabajo.





*Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua*  
*UNAN - LEON*  
*Facultad de Ciencias Químicas*  
*ESCUELA DE FARMACIA*

---

## **DEDICATORIA**

**A MI PADRE, Moisés Delgado** por su amor y apoyo incondicional que me brindó a lo largo de mi carrera.

**A MI MADRE, Rosa Gallo** quien por ser mujer tuvo el don más lindo el de darme la vida, gracias por tus consejos, sacrificios y esmeros, este esfuerzo te lo debo a ti.

Les dedico mi gran sacrificio que con grandes ilusiones comencé y con orgullo he concluido.

**Deyanira Delgado Gallo.**

---



*Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua  
UNAN - LEON  
Facultad de Ciencias Químicas  
ESCUELA DE FARMACIA*

**A DIOS**, por ser mi fuente de sabiduría para hacer frente a mis dificultades, por haberme permitido culminar mi carrera y gozar de mi felicidad junto a mis seres queridos.

**A MI PADRE**, Héctor Delgado quien con su sacrificio y esfuerzo permitió culminar mi carrera.

**A MI MADRE**, Elba Rojas quién percibe antes de nadie la hendidura de mi corazón, no pides que te busque si te necesito, porque mis cosas se reflejan en ti y pides mi felicidad como algo que es también esencial para ti.

**A MI HERMANA**, quien siempre está a mano dispuesta y entregada a escucharme.

**Karen Vanessa Delgado.**

---



## DEDICATORIA

A Dios quien tiene la respuesta a todo, quien me ayuda durante las angustias y me guía a través de toda dificultad.

A mi Padre, Ernesto Dimas por haberme brindado su apoyo, confianza durante mis estudios y con sacrificio y esfuerzo ha hecho realidad mis sueños.

A mi Madre, Silvia por haberme dado la vida y apoyo que generosamente me brindó cuando lo necesitaba.

Y a todos mis familiares que de una u otra forma estuvieron conmigo cuando los necesitaba, a todos ellos gracias.

***Ersil Dimas Zelaya***

---



## **INDICE**

1. INTRODUCCIÓN	3
2. OBJETIVOS	5
• GENERAL.	
• ESPECIFICOS	
3. MARCO TEORICO	8
4. MATERIAL Y METODO	39
5. RESULTADO	45
6. ANALISIS DE RESULTADO	52
7. CONCLUSION	56
8. RECOMENDACIONES	58
9. BIBLIOGRAFIA	60
10. ANEXOS	63



*Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua*  
*UNAN - LEON*  
*Facultad de Ciencias Químicas*  
*ESCUELA DE FARMACIA*

---

# INTRODUCCIÓN



*Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua*  
*UNAN - LEON*  
*Facultad de Ciencias Químicas*  
*ESCUELA DE FARMACIA*

Una parte integral del desarrollo de un método analítico, es la validación del mismo, ya que este debe probar que es efectivo. La validación generalmente incluye una evaluación de la precisión de la linealidad-exactitud y proporciona una medida del comportamiento del método.

La validación del método se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudio de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa en este caso en términos de parámetros analíticos.

En los últimos años, la pruebas de disolución de sustancias sólidas, ha suscitado gran atención, especialmente por su aplicación al estudio de productos medicamentosos, relacionando este proceso con la biodisponibilidad de fármacos en el organismo.

Existe enorme interés por conocer los factores de los cuales depende el proceso de disolución con el objeto de obtener datos precisos que puedan ser utilizados en el control de calidad de la industria farmacéutica y aseguren la disponibilidad biológica del fármaco en el lugar de absorción.

Los ensayos de tabletas no sólo se efectúan como ensayos de calidad o para comprobar únicamente que las tabletas se ajustan a las normas, o correspondan a las especificaciones de las farmacopeas, sino que sirven simultáneamente para el desarrollo de normas óptimas para su fabricación, por lo que se considera de suma importancia realizarles muchas pruebas de: estabilidad, disolución, etc.

Las pruebas de disolución comenzaron a surgir como un tema dominante dentro de la academia farmacéutica y la industria de drogas. En la parte final de la década de 1960 la Biofarmacia fue establecida como una disciplina de importancia en las ciencias farmacéuticas y las pruebas de disolución se convirtieron en un requerimiento obligatorio por parte de la farmacopea de



*Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua*  
*UNAN - LEON*  
*Facultad de Ciencias Químicas*  
*ESCUELA DE FARMACIA*

los Estados Unidos para varias formas de dosificación, no obstante la disolución está aún lejos de ser comprendida perfectamente.

La disolución no es capaz de predecir la eficacia terapéutica, más bien, es una arma cualitativa que puede proveer información de utilidad sobre la disponibilidad biológica de una droga al igual que la consistencia entre un lote de droga y otro.

Los métodos analíticos de disolución deberán ser debidamente validados ya que ayudara al desarrollo integral de los métodos así como el de garantizar la confiabilidad del mismo.



*Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua*  
*UNAN - LEON*  
*Facultad de Ciencias Químicas*  
*ESCUELA DE FARMACIA*

# OBJETIVOS



**OBJETIVO GENERAL:**

Validar el método de disolución de tabletas de Glibenclamida 5 mg elaborada en LABORATORIO RAMOS por HPLC.



### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Realizar prueba de disolución que garantice la disponibilidad biológica de la droga.
2. Determinar cual o que solvente es el más adecuado como medio de disolución.
3. Determinar el tiempo y velocidad de disolución que permitan una mayor liberación del principio activo
4. Analizar cuantitativamente las tabletas de Glibenclamida 5mg por el método de espectrofotometría UV visible.



*Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua*  
*UNAN - LEON*  
*Facultad de Ciencias Químicas*  
*ESCUELA DE FARMACIA*

---

# MARCO TEORICO



*Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua*  
*UNAN - LEON*  
*Facultad de Ciencias Químicas*  
*ESCUELA DE FARMACIA*

Entre las formas farmacéuticas sólidas las tabletas son quizás las más empleadas. La farmacopea Americana las define como: formas sólidas que contienen un principio activo con o sin adición de diluyente; varía en su forma, tamaño y peso, dependiendo de la cantidad de principio activo y del modo de administración a que están destinadas.(6)

Las tabletas proporcionan una de las formas más convenientes para la administración oral de medicamentos sólidos y en menor escala para la preparación extemporánea de soluciones Y desde el punto de vista industrial tiene la ventaja de ser producida rápida y económicamente, de resistir la manipulación y el almacenamiento por períodos de tiempos más o menos largos y desde el punto de vista del consumidor tienen la ventaja de proporcionar formas compactas de dosis exactas que son rápidamente absorbidas por el organismo.(6)

De las formas sólidas las tabletas son quizás las más implicadas por lo cual, se les debe proporcionar la mejor calidad, para asegurar ésta, al comprimido elaborado se le debe proceder a realizar prueba de disolución, comprobar su aspecto( olor, color, tamaño ), uniformidad de dosis, prueba de desintegración, dureza, entre otros ensayos que aseguren sus especificaciones.(3)

Las pruebas de disolución comenzaron a surgir como un tema dominante dentro de la academia farmacéutica y la industria de drogas. En la parte final de la década de 1960 la Biofarmacia fue establecida como una disciplina de importancia en las ciencias farmacéuticas y las pruebas de disolución se convirtieron en un requerimiento obligatorio por parte de la farmacopea de los Estados Unidos para varias formas de dosificación, no obstante la disolución está aún lejos de ser comprendida perfectamente.(3)

La disolución es el proceso por el cual un soluto sólido de relativamente poca solubilidad entra en solución (3)



La velocidad de disolución de las sustancias sólidas está determinada por la velocidad de difusión de una capa muy delgada de solución saturada que se forma instantáneamente alrededor de las partículas sólidas.(3)

La disolución no es capaz de predecir la eficacia terapéutica, más bien, es un arma cualitativa que puede proveer información de utilidad sobre la biodisponibilidad biológica de la droga al igual que la consistencia entre un lote de una droga y otro.(3)

Difícil es el hecho de que la exactitud y precisión del procedimiento de prueba dependen en gran medida de las estrictas observancias de numerosos parámetros sutiles y controles operacionales detallados.(3)

A causa de éstos inconvenientes la disolución se considera hoy como la prueba más importante del control de calidad y se realiza sobre las formas farmacéuticas de dosificación.(3)

### FACTORES QUE AFECTAN LA VELOCIDAD DE DISOLUCIÓN

Los factores que afectan la velocidad de disolución de las formas de dosificación de las drogas pueden clasificarse bajo las categorías principales según se delinean más abajo:(3)

- 1) Factores relacionados con las propiedades fisicoquímicas de la droga.

Las propiedades fisicoquímicas de las drogas juegan un papel preponderante en el control de su disolución a partir de la forma de dosificación.(3)



La solubilidad acuosa de la droga es el factor principal que determina su velocidad de disolución, en realidad los datos de solubilidad de drogas podrían usarse como grosero índice predictivo de la posibilidad de problemas futuros

con la biodisponibilidad, un factor que debe ser tomado en cuenta en el diseño de las formulaciones.(3)

Otros factores que afectan la velocidad de disolución incluyen el tamaño de partícula, el estado cristalino, tal como el polimorfismo y el estado de hidratación, la solvatación, la complejación, al igual que los tensioactivos y otros aditivos reactivos.

Otras propiedades físicas tales como la densidad, viscosidad y la humidificación contribuyen a los problemas generales de disolución. Las características de adsorción de la droga también poseen un efecto significativo sobre la disolución de ciertas drogas.(3)

#### **Efectos del tamaño de la partícula sobre la velocidad de disolución:**

La superficie aumenta al disminuir el tamaño de partícula, las velocidades de disolución más altas pueden lograrse a través de la reducción del tamaño de partícula, éste efecto ha sido apoyado por la velocidad de disolución superior observada después de la micronización, la micronización aumenta la superficie expuesta al medio de disolución y, por lo tanto, aumenta la velocidad de disolución, no siempre equivalente, más bien es el aumento de la superficie efectiva, o el área expuesta al medio de disolución, y no la superficie absoluta, lo que es directamente proporcional a la velocidad de disolución.(3)

Las propiedades físicas de las partículas de drogas más que el tamaño, afectan además, indirectamente, la superficie efectiva modificando la velocidad de deslizamiento del solvente nuevo que se pone en contacto con el sólido. Estas propiedades incluyen la forma de la partícula y la densidad.(3)

**Efectos del estado cristalino de la droga sobre la velocidad de disolución:**



Las características de fases sólidas de las drogas tales como la amorficidad, el estado de hidratación y la estructura polimórfica, han demostrado poseer una influencia significativa sobre la velocidad de disolución, ejemplo: la Novobiocina amorfa posee mayor solubilidad y mayor velocidad de disolución que la forma cristalina.(3)

## 2) Factores relacionados con la forma de dosificación sólidas

Los efectos de varias formulaciones y factores de procesamiento en la manufacturación sobre la velocidad de disolución y la biodisponibilidad de los componentes activos de tabletas han sido bien documentado por varios investigadores desde principios de la década de 1960. La discusión de hallazgos originales y más recientes pueden ciertamente servir de guía para el científico farmacéutico, especialmente durante los estadios iniciales del diseño de formulación y desarrollo de productos.(3)

### **Efecto de la fuerza de compresión sobre la velocidad de disolución:**

Existen gran influencia de la fuerza de compresión en el proceso de fabricación de tabletas sobre la densidad aparente, porosidad, dureza, tiempo de desintegración y tamaño primario de partícula promedio de las tabletas comprimidas.(3)

La alta compresión puede inhibir la humidificación de la tableta debido a la formación de una capa sellante más firme y eficaz por parte del lubricante bajo la alta presión y temperatura que usualmente acompaña a una intensa fuerza compresiva.(3)

### **Efecto de los parámetros de prueba sobre la velocidad de disolución:**



**Agitación:** la relación entre la intensidad de la agitación y la velocidad de disolución varía considerablemente de acuerdo con el tipo de agitación que

se usa, el grado de flujo laminar y turbulento que hay en el sistema, la forma y el diseño del agitador y las propiedades físicos- químicas del sólido.(3)

La velocidad de agitación genera un flujo que cambia continuamente la interfase sólida - líquida existente entre el solvente y la droga, de un manera similar a la velocidad de flujo laminar reproducible, que es esencial para obtener resultados en los cuales se puede confiar, se debe mantener a un nivel relativamente bajo la velocidad de agitación, o la velocidad del flujo.(3)

Otros factores que afectan la correlación entre la agitación y la velocidad de disolución incluyen la densidad de fase sólida, el tamaño y característica del sólido, el agitador, el calor de solución del soluto.(3)

**Efectos de factores de formulación sobre la velocidad de disolución de tabletas:**

Se ha demostrado que la velocidad de disolución de una droga puede ser alterada significativamente cuando se le mezcla con varios aditivos durante el proceso de fabricación de formas de dosificación sólida. Estos aditivos se agregan para satisfacer ciertas funciones farmacéuticas tales como diluyentes, tinturas, fijadores, agentes granulantes, desintegrantes y lubricantes.(3)

Se sabe que la mala formulaciones de tabletas ocasionan una marcada disminución de la biodisponibilidad y un impedimento de la respuesta clínica.(3)

**Efectos de los factores de procesamiento sobre la velocidad de disolución de tabletas:**

La multiplicidad de factores de procesamiento usados para hacer tabletas influyen grandemente sobre las velocidades de disolución de los componentes



activos. El método de granulación, el tamaño, la densidad, el contenido de humedad y la edad de los gránulos, al igual que la fuerza de compresión usada para hacer las tabletas, contribuyen a las características de velocidad de disolución del producto final.(3)

Método de granulación: se ha demostrado que el proceso de granulación, en general, aumenta la velocidad de disolución de drogas pobremente solubles, el uso de diluyentes, tales como el almidón, lactosa secada por rociado y celulosa microcristalina, tienden a aumentar la hidrofiliidad de los componentes activos y aumentar sus características de disolución.(3)

La cuidadosa formulación y adecuada secuencia de mezcla y el tiempo de agregar los diversos componentes son los criterios principales que afectan las características de disolución.(3)

Temperatura: como la solubilidad de la droga depende de la temperatura, su cuidadoso control durante el proceso de disolución es muy importante y debe ser mantenido dentro de los 0.5 grados centígrados, generalmente una temperatura de 37 grados centígrados.(3)

Medio de disolución: la selección del líquido adecuado para las pruebas de disolución dependen principalmente de la solubilidad de la droga, al igual que de razones meramente prácticas y económicas.(3)

Ph del medio de disolución: es de práctica común usar agua destilada a menos que los estudios muestren que hay necesidad específica para usar como solución ácida con el fin de generar datos de disolución que posean sentido.(3)

Tensión superficial del medio de disolución: la tensión superficial posee un efecto significativo sobre la velocidad de liberación de formas de dosificación sólidas.(3)

Un aumento significativo en la velocidad de disolución se ha demostrado en drogas escasamente solubles cuando se agregaron tensioactivos al medio de disolución.(3)



### **VALORACIÓN:**

Para la valoración de solución de referencia y solución de muestra, se utiliza el método de Espectrofotometría U.V.(1)

La espectrofotometría consiste en la medición de la absorción, por las diferentes sustancias de una radiación electromagnéticas de longitudes de onda situadas en una banda definida y estrecha esencialmente monocromática.

Para mayor comodidad en las referencias éste intervalo espectral puede considerarse como si estuviera constituido por dos zonas, la ultravioleta ( 190 nm - 380nm ) y la visible (380 nm - 780 nm ).

La espectrofotometría en la zona visible es la medida de la absorción de la luz visible, que generalmente no es monocromática pero que se selecciona mediante el empleo de filtros pigmentados o de interferencia. Los espectros ultravioletas y visibles de una sustancia no tiene en general un alto grado de especificidad, sin embargo, son muy adecuados para las valoraciones cuantitativas y en el caso de muchas sustancias, constituyen un medio útil adicional de identificación.(1)

### **PROCEDIMIENTO DE VALORACIÓN:**

Solución de referencia: pesar 5.5 mg de la sustancia de referencia de glibenclamida y diluir cuantitativamente con solución 0.1M de HCl en Metanol hasta obtener una concentración conocida 100 mcg/ ml.(1)

Solución de la muestra: pesar no menos de 20 tab. y obtener su precio promedio y pulverizar una cantidad de polvo equivalente a 5 mg de glibenclamida, pasar a un vaso de precipitado, agregar 40 ml de solución 0.1M de HCl en Metanol, calentar ligeramente centrifugar y separar el líquido



sobrenadante, pasándola a un matraz volumétrico de 200 ml, repetir la extracción con tres porciones de 20 ml cada una, de solución 0.1M de HCl

en Metanol, reunir los extractos combinados en el mismo matraz y llevar al aforo con el mismo disolvente, mezclar.(1)

Determinar la absorbancia de ambas soluciones en celdas de 1 cm a la longitud de onda de máxima absorbancia (300 nm aproximadamente) utilizando solución 0.1 M de HCl en Metanol como blanco de ajuste.(1)

Calcular la cantidad en mg de  $C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$  en la porción tomada de tabletas mediante la fórmula siguiente:

$$CD (A_m/A_{ref})$$

En donde:

C: Es la concentración en mcg/ml de Glibenclamida en la solución de referencia.

D: factor de dilución de la muestra.

$A_m$  y  $A_{ref}$ : Son las absorbancias obtenidas con la solución de la muestra y de referencia respectivamente.(1)

#### **METODO ALTERNATIVO (CROMATOGRAFIA POR HPLC)**

Para la valoración de la solución de referencia y solución de la muestra se puede utilizar el HPLC. La Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) utiliza la participación entre una fase móvil y una fase estacionaria para obtener una separación entre los componentes de la muestra, siendo esta especial por la manera de usar una bomba para producir un flujo en las columnas delgadas empaquetadas con perlas pequeñas de fase estacionaria y



el uso de un detector sensible con celdas pequeñas para producir y detectar una separación superior. (8)

Para obtener un tiempo corto en la separación se usa un flujo relativamente rápido, este produce una alta presión en el sistema y no la causa para la buena separación. (8)

### **VALIDACIÓN**

La industria farmacéutica está especialmente interesada en la validación de métodos analíticos debido al incremento de nuevos productos que tienen que ver con la salud y que requiere de métodos de análisis apropiados. (7)

Una parte integral del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, es decir, el método debe probarse para determinar su efectividad. (7)

La validación generalmente incluye una evaluación de la precisión, linealidad, exactitud y especificidad, y proporciona una medida del comportamiento del método. (7)

La validación del método puede definirse como el proceso por el cual queda establecido por estudios de laboratorios que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. (7)

#### **Atributos del método de análisis:**

**Sensibilidad:** es una propiedad del método para presentar un gran cambio en la respuesta cuando se produce un pequeño cambio en la concentración. (7)



*Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua*  
*UNAN - LEON*  
*Facultad de Ciencias Químicas*  
*ESCUELA DE FARMACIA*

**Precisión:** es el método analítico que mide el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestras homogéneas del producto. (7)

Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación. (7)

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales. (7)

**Exactitud:** es el grado de concordancia entre el valor obtenido y el valor de referencia, se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestra a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la misma. (7)

**Linearidad:** es una habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los pueden ser obtenidos por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado. (7)

**Repetibilidad:** es el grado de concordancia obtenida entre determinaciones independientes, realizadas bajo las mismas condiciones (analista, aparato, laboratorio, tiempo). (7)

**Reproducibilidad:** es el grado de concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes. (7)

**Especificidad:** es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancias de interés y no a otros componentes de la muestra. (7)

**Cantidades mínimas detectables o límites de detección:** es la mínima concentración de una sustancia en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones de operación(7).



**Cantidad mínima cuantificable o límite de cuantificación:** es la menor concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada

con precisión o exactitud aceptable bajo las condiciones de operación establecidas. (7)

## **DETERMINACIONES**

### **Linearidad del sistema.**

Se determina construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta medida ) utilizando cuando menos 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo análisis cuando menos por duplicados para cada dilución. (7)

El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método; para control de calidad y de seguimiento de la estabilidad de un fármaco en una forma farmacéutica, deberá estar incluida la concentración seleccionada como 100 %.(7)

**Nota :** se considera el 100% como la concentración de la muestra en la solución final a analizar, que proporciona una respuesta adecuada dependiendo del método de cuantificación(7)

## **CRITERIOS:**

### **Linearidad del sistema:**

$$CV \leq 1.5 \%$$

$$r \geq 0.99$$



$$r^2 \geq 0.98$$

**Nota:** para métodos microbiológicos  $r \geq 0.98$ .

**Precisión del sistema:**

Se ha determinado por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema(7)

**CRITERIO:**

$$CV \leq 1.5\%$$

**Nota:** para métodos microbiológicos  $CV \leq 3 \%$ .

**LINEARIDAD DEL METODO**

Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos 3 diferentes cantidades de la sustancia de interés, (placebos cargados ), cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado. (7)

Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema incluyendo siempre la correspondiente a 100%.(7)

La amplitud del estudio dependerá del uso y aplicaciones del método, (control de calidad, estudio de calidad, etc.) y deberá llevarse a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación. (7)

**CRITERIO:**



*Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua*  
**UNAN - LEON**  
*Facultad de Ciencias Químicas*  
**ESCUELA DE FARMACIA**

$$m = 1$$
$$b = 0$$
$$r^2 \geq 0.98$$

Los porcentajes recuperados y los CV a cada nivel y los globales de todo el intervalo de la linealidad deben estar de acuerdo a la tabla I. (7)

**Nota :** en métodos de cuantificación de fármacos en fluidos biológicos la amplitud del estudio dependerá de las cantidades mínimas y máximas esperadas. (7)

#### **Exactitud y Repetibilidad al 100%**

Se determina de, cuando menos, 6 placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancias de interés para obtener la concentración del 100%, utilizando el método propuesto. Haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista. (7)



**CRITERIO:**

El porcentaje recuperado y el CV deberán de estar de acuerdo con la tabla I (7)

Tabla I:

<u>METODO</u>	<u>PROMEDIO DE RECOBRO</u>	<u>CV</u>
Cromatográficos	98 - 102 %	$\leq 2\%$
Titrimétricos	98 - 102 %	$\leq 2\%$
Químicos y Espectrofotométricos	97 - 103%	$\leq 3\%$
Microbiológicos	95 - 105%	$\leq 5\%$

**Precisión (Reproducibilidad )**

Se determina de una muestra homogénea del producto cercana al 100% de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analista, en dos días diferentes y por triplicado. (7)

**CRITERIO**

El CV total debe cumplir con los siguientes criterios.

Método		
Cromatográficos	$\leq$	2%
Químicos y Espectrofotométrico	$\leq$	3%
Microbiológicos	$\leq$	5%



Notas : 1) Dependiendo de la naturaleza de la muestra, el CV puede incrementarse.

2) Si se requiere (n) establecer la (s) fuente (s) de variación del método (lo cual no constituye un requisito mínimo dentro de la validación ).

## FORMULAS

Linearidad del sistema:

1) Tabular los resultados con base al siguiente formato:

Concentración de Dilución de la Solución patrón	Propiedad medida
(x)	(y)
X1	Y11,Y12,.....,Y1n
X2	Y21,Y22,.....,Y2n
.	.
.	.
.	.
Xt	Yt1,Yt2,.....,Ytn

t= número de diluciones.

n= número de replicaciones (propiedad medida) de cada dilución de la solución patrón.

Para proceder a los siguientes cálculos, es necesario que el número de replicaciones por dilución, sean equivalentes.

2) Cálculos preliminares para coeficientes de correlación y coeficientes de determinación:



$$\begin{aligned}
 \Sigma X &= n(X_1 + X_2 + \dots + X_t) \\
 \Sigma Y &= Y_{11} + Y_{12} + \dots + Y_{1n} + Y_{21} + Y_{22} + \dots + Y_{2n} + \dots + Y_{t1} + \dots + Y_{t2} + \dots + Y_{tn} \\
 \Sigma X^2 &= n(X_1^2 + X_2^2 + \dots + X_t^2) \\
 \Sigma Y^2 &= Y_{11}^2 + Y_{12}^2 + \dots + Y_{1n}^2 + Y_{21}^2 + Y_{22}^2 + \dots + Y_{2n}^2 + \dots + Y_{t1}^2 + Y_{t2}^2 + \dots + Y_{tn}^2 \\
 \Sigma XY &= X_1(Y_{11} + Y_{12} + Y_{1n}) + X_2(Y_{21} + Y_{22} + \dots + Y_{2n}) + \dots + X_t(Y_{t1} + Y_{t2} + \dots + Y_{tn})
 \end{aligned}$$

3) Cálculos finales para coeficientes de correlación y coeficiente de determinación

$$r = \left( \frac{[nt(\Sigma XY) - (\Sigma X)(\Sigma Y)]}{[nt(\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2] - [nt(\Sigma Y^2) - (\Sigma Y)^2]} \right)^{1/2}$$

$$r^2 = \frac{[nt(\Sigma XY) - (\Sigma X)(\Sigma Y)]^2}{[nt(\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2] - [nt(\Sigma Y^2) - (\Sigma Y)^2]}$$

4) Cálculos preliminares para el coeficiente de variación

4.1 Calcular para cada punto de la linealidad del sistema el siguiente factor.

$$F = \frac{\text{Propiedad medida (Y)}}{\text{Concentración de la dilución de la solución patrón (X)}}$$



Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua  
UNAN - LEON  
Facultad de Ciencias Químicas  
ESCUELA DE FARMACIA

$$F_{11} = \frac{Y_{11}}{X_1}$$

$$F_{12} = \frac{Y_{12}}{X_1}$$

$$F_{1n} = \frac{Y_{1n}}{X_1}$$

.

.

.

$$F_{t1} = \frac{Y_{t1}}{X_t}$$

$$F_{t2} = \frac{Y_{t2}}{X_t}$$

$$F_{tn} = \frac{Y_{tn}}{X_t}$$





4.2 Calcular la suma de los factores, la suma de cuadrados de factores y la media del factor.

$$\Sigma F = F_{11} + F_{12} + F_{1n} + \dots + Ft_1 + Ft_2 + Ft_n$$

$$\Sigma F^2 = F_{11}^2 + F_{12}^2 + F_{1n}^2 + \dots + Ft_1^2 + Ft_2^2 + Ft_n^2$$

$$\bar{F} = \frac{\Sigma F}{N}$$

Donde :

N = Número de puntos de la linearidad del sistema.

5) Cálculos finales para el coeficiente de variación.

$$DE = \left( \frac{N(\Sigma F^2) - (\Sigma F)^2}{N(N-1)} \right)$$

$$CV = \frac{DE}{\bar{F}} \times 100$$

### Precisión del Sistema

1) Tabular los resultados

$Y_1, Y_2, Y_3, \dots, Y_n$

2) Cálculos preliminares



$$\Sigma Y = Y_1 + Y_2 + Y_3 + \dots + Y_n$$

$$\Sigma Y^2 = Y_1^2 + Y_2^2 + Y_3^2 + \dots + Y_n^2$$

$$\bar{y} = \frac{\Sigma Y}{N}$$

$$DE = \left[ \frac{N(\Sigma Y^2) - (\Sigma Y)^2}{N(N-1)} \right]^{1/2}$$

### 3) Cálculos finales

$$CV = \frac{DE}{\bar{y}} \times 100$$

### Linealidad del método

a) Cantidad adicionada - Cantidad recuperada

1) Tabular los resultados con base al siguiente formato:

t = Número de cantidad adicionada

n = Número de replicaciones (Cantidad recuperada) por cada cantidad adicionada.

Para proceder a los siguientes cálculos es necesario que el número de recuperados (replicaciones) de cada cantidad adicionada, sean equivalentes.



### 2) Cálculos preliminares

$$\sum X = X_{11} + X_{12} + \dots + X_{1n} + X_{21} + X_{22} + \dots + X_{2n} + \dots + X_{t1} + X_{t2} + \dots + X_{tn}$$

$$\sum Y = Y_{11} + Y_{12} + \dots + Y_{1n} + Y_{21} + Y_{22} + \dots + Y_{2n} + \dots + Y_{t1} + Y_{t2} + \dots + Y_{tn}$$

$$\sum X^2 = X_{11}^2 + X_{12}^2 + \dots + X_{1n}^2 + X_{21}^2 + X_{22}^2 + \dots + X_{2n}^2 + \dots + X_{t1}^2 + X_{t2}^2 + \dots + X_{tn}^2$$

$$\sum Y^2 = Y_{11}^2 + Y_{12}^2 + \dots + Y_{1n}^2 + Y_{21}^2 + Y_{22}^2 + \dots + Y_{2n}^2 + \dots + Y_{t1}^2 + Y_{t2}^2 + \dots + Y_{tn}^2$$

$$\sum XY = X_{11}Y_{11} + X_{12}Y_{12} + \dots + X_{1n}Y_{1n} + X_{21}Y_{21} + X_{22}Y_{22} + \dots + X_{2n}Y_{2n} + \dots + X_{t1}Y_{t1} + X_{t2}Y_{t2} + \dots + X_{tn}Y_{tn}$$

### 3) Cálculos finales

$$m = \frac{nt(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{nt(\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

$$b = \frac{Y - m(X)}{nt}$$

$$r^2 = \frac{[nt(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)]^2}{nt(\sum X^2) - (\sum X)^2 [nt(\sum Y^2) - (\sum Y)^2]}$$



**b) Porcentaje recuperado**

Calcular el porcentaje recuperado (R) para cada cantidad recuperada, con la siguiente ecuación

$$R = \frac{y}{x} \times 100$$

1) Tabular los resultados

$$R_1, R_2, R_3, \dots, R_n$$

2) Cálculos preliminares

$$\sum R = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_n$$

$$\sum R^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \dots + R_n^2$$

$$\bar{R} = \frac{\sum R}{N}$$

$$DE = \left( \frac{N(\sum R^2) - (\sum R)^2}{N(N-1)} \right)^{1/2}$$

4) Cálculos finales

$$CV = \frac{DE}{\bar{R}} \times 100$$



### Exactitud y Repetibilidad al 100%

- 1) Tabular los resultados del porcentaje recuperado (R) con base al siguiente formato:

$$R_1, R_2, R_3, \dots, R_n$$

- 3) Cálculos preliminares

$$\Sigma R = R_1 + R_2 + R_3 + \dots + R_n$$

$$\Sigma R^2 = R_1^2 + R_2^2 + R_3^2 + \dots + R_n^2$$

$$\bar{R} = \frac{\Sigma R}{N}$$

$$DE = \left( \frac{N(\Sigma R^2) - (\Sigma R)^2}{N(N-1)} \right)^{1/2}$$

- 5) Cálculos finales

$$CV = \frac{DE}{\bar{R}} \times 100$$

### Precisión (Reproducibilidad)

El siguiente procedimiento es aplicable únicamente cuando se utilicen dos días, dos analistas y tres determinaciones.



1) Tabular los resultados con base al siguiente formato:

	1	2
1	$Y_{111}$ $Y_{112}$ $Y_{113}$	$Y_{211}$ $Y_{212}$ $Y_{213}$
2	$Y_{121}$ $Y_{122}$ $Y_{123}$	$Y_{221}$ $Y_{222}$ $Y_{223}$

2) Cálculos preliminares

$$Y = Y_{111} + Y_{112} + Y_{113} + Y_{121} + Y_{122} + Y_{123} + Y_{211} + Y_{212} + Y_{213} + Y_{221} + Y_{222} + Y_{223}$$

$$\sum Y^2 = Y_{111}^2 + Y_{112}^2 + Y_{113}^2 + Y_{121}^2 + Y_{122}^2 + Y_{123}^2 + Y_{211}^2 + Y_{212}^2 + Y_{213}^2 + Y_{221}^2 + Y_{222}^2 + Y_{223}^2$$

—  $Y_{\dots}$

$$y = \frac{\quad}{N}$$

$$DE = \left( \frac{N(\sum Y^2) - (Y_{\dots})^2}{N(N-1)} \right)^{1/2}$$

N = Número total de determinaciones (en este caso específico N= 12)

3) Cálculos finales



$$CV = \frac{DE}{y} \times 100$$

## CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

Desde los años 1970, la técnica de HPLC se ha desarrollado rápidamente y por su amplia potencia el día de hoy es uno de los métodos analíticos más importantes (8).

La Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) utiliza la participación entre una fase móvil y una fase estacionaria para obtener una separación entre los componentes de la muestra, siendo esta especial por la manera de usar una bomba para producir un flujo en las columnas delgadas empaquetadas con perlas pequeñas de fase estacionaria y el uso de un detector sensible con celdas pequeñas para producir y detectar una separación superior. Para obtener un tiempo corto en la separación se usa un flujo relativamente rápido, este produce una alta presión en el sistema, la cual es una limitación del sistema y no la causa para la buena separación. (8).

### Razones por las cuales se utiliza HPLC:

Gran variabilidad de configuración aparativa.  
Gran cantidad de diferentes sistemas de fase estacionaria.  
Gran número de fases móviles y modificaciones de ella.  
Amplio campo de uso.

### Aplicaciones de HPLC

- Para sustancias solubles en un solvente a una mezcla de solvente.
- Sustancias muy polares y/o iónicas.
- Sustancias de alto peso molecular.
- Sustancias termolábiles.

### Campos de uso del HPLC:



- Control de pureza y calidad del producto.
  - Análisis de medicamento.
  - Análisis de sustancias afectivas de matrices biológicas.
  - Análisis de residuos de plaguicidas.
  - Análisis de sustancias tóxicas para el medio ambiente.
- 
- Análisis de polímeros sintéticos.
  - Separación y limpiezas de biopolímeros.
  - Aislamiento de productos sensibles

La fase móvil tiene diferentes funciones entre las cuales podemos mencionar:

- La muestra debe ser soluble en la fase móvil.
- Inmiscibilidad con la fase estacionaria.
- Debe existir un equilibrio de distribución entre las dos fases.
- Se debe de facilitar la salida de la muestra de fase estacionaria.

Criterios de selección del solvente:

- Solubilidad de la muestra.
  - Reactividad baja (inerte).
  - Miscibilidad con otros solventes.
- 
- Viscosidad
  - Índice de refracción.
  - Transparencia en U.V- Visible.

Al seleccionar un solvente debemos tener en cuenta la pureza con las siguientes características:

- Calidad de los solventes.



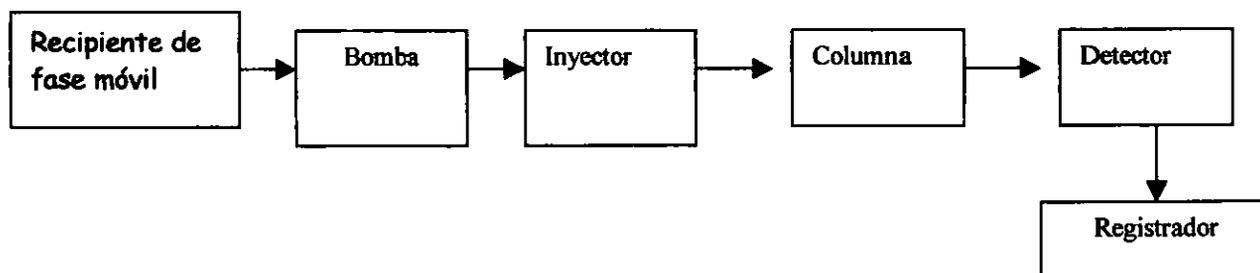
- Impurezas pueden influir la polaridad y cambiar así la selectividad y la fuerza de elusión del solvente.
- Impurezas involátiles de la preparación.
- Partículas mecánicas (utilizar filtros de 1-10  $\mu\text{m}$ ).
- Ácidos o bases encontradas pueden enturbiar la celda del detector.
- Corrosión del equipo (al introducirse partículas metálicas en el sistema).
- Transparencia de los solventes en U.V-Visible.

La cromatografía líquida de alta resolución es la técnica más utilizada en la actualidad, debido a su sensibilidad, eficiencia, versatilidad, exactitud y sobre todo a su gran aplicabilidad a sustancias que son de gran interés para la industria así como en muchos campos de la ciencia. (8).

Utiliza instrumental sofisticado que contrasta notablemente con los simples dispositivos que le precedieron (clásica). (8).

En este método se utilizan columnas de diámetros muy reducidos. Este tipo de columnas es muy eficaz, pero ofrece gran resistencia al flujo de la fase móvil, es decir una gran caída de presión, por lo que se hace necesario el empleo de un sistema de bombeo de alta presión (cientos de atmósferas) que haga fluir la fase móvil a una velocidad razonable a través de la columna. Por lo que el equipo para HPLC, tiende a ser más complejo y más caro que los de otro tipo de cromatografía. (8).

#### Diagrama básico de un sistema de HPLC





Como en todas las técnicas analíticas, los pequeños problemas a la larga pueden llegar a tener un mayor impacto en la exactitud y durabilidad del sistema. Aún con la evolución de los cromatógrafos líquidos en la era de la computadora, hay un problema que ésta no puede resolver y es la presencia de gases disueltos en el líquido (burbujas) las que originan ensanchamiento de las bandas. Al igual que las partículas de polvo en suspensión las que son perjudiciales a los componentes del HPLC (bomba, columna). Para evitar tales problemas se recomienda que se filtre y se desgasifique los solventes para HPLC antes de ser usados. (8).

Los métodos de filtración más comunes usados para la filtración de los solventes HPLC son : 1) Filtros a la entrada del solvente, 2) Filtración al vacío. (8).

La desgacificación puede hacerse mediante un sistema de bombeo a vacío, un sistema de destilación, agitación y calefacción o burbujeando gas inerte (He) no soluble en la fase móvil. (8).

### Programación del solvente

La elusión de la fase móvil se puede hacer de dos maneras:

- 1) **Isocrática:** composición constante de la fase móvil.
- 2) **Elusión en gradiente (gradiente de elusión):** se usan sistemas de dos o más disolventes que difieren significativamente en su polaridad. La proporción de los dos disolventes se varía de forma programada, unas veces en forma continua y otras en una serie de pasos. Esta elusión en gradiente con frecuencia incrementa la eficacia de la separación, mejora la resolución en mejor tiempo posible, se obtiene una mayor simetría en los picos, asegura una alta precisión y exactitud.



Los instrumentos modernos de HPLC suelen llevar incorporadas válvulas simétricas que introducen los líquidos desde dos o más depósitos a velocidad que varían continuamente. (8).

### **Sistema de bombeo**

Los requisitos más importantes que deben reunir las bombas o sistemas de bombeo de HPLC son estrictos e incluyen:

- 1) Proporcionar presión estable superiores a los 6000 Psi (lb/in<sup>2</sup>).
- 2) Mantener el flujo libre de pulsaciones.
- 3) Velocidad de flujo de 0.1-10 ml/min.
- 4) Control y reproducibilidad del flujo del solvente.
- 5) Resistente a la corrosión por diversos solventes.

### **Sistema de inyección de la muestra**

Exige cuidadosos diseños, puesto que debe resistir alta presión, tener un volumen pequeño y sus cavidades deber ser bien barridas por la fase móvil. Se utiliza el sistema de válvulas inyectoras (bucles) son intercambiables, permiten elegir volúmenes de 10-500  $\mu$ L. La muestra se introduce en la válvula mediante una jeringa y se inyecta en la columna accionando la válvula de forma tal que la disposición de entrada y salida se invierte. Estos bucles se fabrican solo de materiales inertes (acero inoxidable, teflón) y su diseño es tal que resisten presiones muy elevadas. (8).

### **Columnas y fase estacionaria**

En ellas es donde se lleva a efecto la separación de los componentes de la mezcla en estudio. Se fabrican generalmente con tubos de acero inoxidable, aunque también pueden ser de vidrio de paredes gruesas cuando se aplican presiones bajas(8)..



La mayoría de las columnas tienen longitud de 10 y 30 cm, diámetros internos de 40 - 10 mm, los rellenos típicos tienen tamaño de partículas de 5 - 10  $\mu$ m. Este tipo de columnas suele contener de 40000 - 60000 platos/m. (8).

Recientemente se han conseguido micro columnas de alta resolución de 3 - 7.5 cm y de 1 - 4.6 mm de diámetro interno, tamaño de partícula del relleno de 3 - 5  $\mu$ m y contienen más de 100000 platos/m, su ventaja es la rapidez y el consumo mínimo de disolvente(8)..

El tipo más común de relleno para HPLC lo constituyen partículas de Sílice, que se sintetizan mediante aglomeraciones de partículas de Sílice submicroscópicas en condiciones que originan partículas mayor con un diámetro muy uniforme. Las partículas resultantes se recubren a veces con una fina película orgánica unida física o químicamente a la superficie. Otros materiales de relleno pueden ser: Alúmina, Polímeros porosos y resinas intercambiadores de iones. (8).

### Detectores

No existe uno que sea universal es decir de gran sensibilidad, por lo que el sistema dependerá de la naturaleza de la muestra. Los más usados se basan en la absorción de radiación U.V/Visible. (8).

Se clasifican en : Detectores en una propiedad de la fase móvil (es más general que selectivo) ejemplo de ellos son los detectores de índice de refracción.

Detectores basados en una propiedad de la sustancia a separar, ejemplo; detectores de fluorescencia. (8).



Los más utilizados en HPLC son :

Detectores U.V

Detectores de índice de refracción.

Detectores de fluorescencia.

Detectores de fluorescencia inducida por láser.

Detectores electroquímicos.



*Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua*  
*UNAN - LEON*  
*Facultad de Ciencias Químicas*  
*ESCUELA DE FARMACIA*

---

# **MATERIAL Y METODO**



## **MATERIAL**

### **Equipos:**

Beaker 250ml	Espectrofotometro U.V
Probeta 50, 100, 1000 ml	Disolutor de 2 paletas
Pipeta 10, 5 ml	Balanza analítica electrónica
Espatula	Equipo HPLC
Erlenmayer 250 ml	Columna C18
Mortero y pilón (coors)	Desgacificador
Tubos de ensayo	Equipo para filtración
Balón de 10, 50, 100 y 1000 ml	
Filtro, poro 0.2 nm	
Papel de aluminio	

### **Reactivos:**

Agua destilada  
Metanol grado HPLC  
HCl  
Estándar de Glibenclamida  
Tabletas de Glibenclamida



## MÉTODO

### Valoración:

- 1) Solución de referencia: se pesan 5.5 mg de p.a de Glibenclamida y diluir cuantitativamente con solución 0.1 N de HCl en Metanol llevando al aforo en un balón de 50 ml para obtener una concentración de 100 ug/ml, pasándolo luego por ultrasonido durante 5 min para total disolución.
- 2) Solución de la muestra: pesar y pulverizar finamente no menos de 20 tabletas, obtener su peso promedio y pesar la cantidad de polvo equivalente a 5 mg.
- 3) Llevar a un balón de 50 ml y agregar 20 ml aproximadamente de HCl 0.1 N en Metanol, calentar a temperatura entre 45 y 50°C durante 5 min, centrifugar por 5 min y separar el líquido sobrenadante, llevar al aforo y poner en ultrasonido por 5 min.
- 4) Encender el aparato (espectrofotometro) y dejar calentar por 10 min.
- 5) Determinar la absorbancia de ambas soluciones a una longitud de onda maxima de 300 nm, utilizar celdas de 1cm y solución de HCl 0.1 N en Metanol.
- 6) La celda debe ser lavada previamente con la solución a utilizar para no crear interferencia.
- 7) Calcular la cantidad en mg en la porción tomada de tabletas mediante la siguiente fórmula:

$CD (A_m/A_{ref})$

C: Concentración en ug /ml de Glibenclamida en la solución de referencia

D: Factor de dilución



Am y Aref: Absorbancia obtenidas de la solución de referencia y solución muestra.

#### Disolución:

1) Encender el aparato y prepararlo a temperatura adecuada y con el medio de disolución (metanol / Agua 70:30) con un volumen de 500ml en cada vaso a utilizar y esperar que se alcance la temperatura 37°C programando el aparato a 100 rpm durante 45 min.

2) Una vez alcanzada la temperatura se colocan las tabletas ( una en cada vaso), se toman alícuotas de 5 ml cada 5 min luego se llevan al cromatógrafo para ser analizadas.

#### CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

- Equipo HPLC - Bomba isocrática
- Fase móvil metanol / agua (70:30)
- Fase estacionaria: columna C18
- Solvente: Fase móvil
- Longitud de onda de lectura: 302nm
- Flujo 1.4ml / min
- Presión máxima = 370 barr

#### PREPARACION DE LA FASE MOVIL METANOL / AGUA

- Tomar en una probeta 70ml de Metanol y vaciar en un balón, con la misma probeta tomar 30ml de agua destilada y vaciar al mismo balón.
- Agitar con electrodo magneto y magnético.
- Filtrar y desgasificar al vacío.



## PROCEDIMIENTO A USAR EN HPLC

- 1) Encender el aparato y editar el método.
- 2) La fase móvil metanol / agua (70:30) deberá estar en el recipiente (previamente filtrado)
- 3) Se debe regular el flujo iniciando de 0.1, 0.2, 0.4 etc hasta llegar a 1.4 ml /min como máximo, utilizando columna C18.
- 4) Mantener una presión máxima de 370 Barr. a una longitud de onda de 302 nm.
- 5) Se realizan 3 inyecciones con jeringa de volumen de 50 uL, inyectando la solución de referencia esperando pasar los 5 min para obtener el reporte.
- 6) Se procede a inyectar las muestras lavando la jeringa previo antes de cada inyectada con cada una de las muestras y esperar 5 min para obtener el reporte.

Con los datos del reporte calculamos concentración de la muestra y el valor de Q con la siguiente fórmula: (ver anexo)

$$CM = \frac{\text{Area de la muestra}}{\text{Area del patrón}} \times Cp$$

## LINEARIDAD DEL SISTEMA

- Preparar una solución patrón de 150 ug/ml usando como cosolvente metanol /agua 70:30 y de esta solución madre preparar soluciones de concentración 25, 50, 75, 100 y 125 ug/ml en balones de 50 y aforar con metanol/agua 70:30 y realizar el análisis por duplicado para cada disolución.

## PRECISION (REPRODUCIBILIDAD)

- Preparar una solución patrón de 100 ug /ml (concentración teórica), luego es analizada por dos analistas en dos días diferentes.



- Solvente metanol/agua 70:30.
- Fase móvil metanol/agua 70:30

#### **LINEARIDAD DEL METODO**

- Preparar una solución a 100ug/ml usando como solvente metano/agua 70:30 y de esta solución madre tomar alicuotas para preparar soluciones que tengan 25:50 y 75 ug/ml llevando a balones de 50ml y aforar con solvente.

- Fase móvil metanol/agua 70:30

Determinando también exactitud y repetibilidad.



*Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua*  
*UNAN - LEON*  
*Facultad de Ciencias Químicas*  
*ESCUELA DE FARMACIA*

---

# RESULTADOS



Siguiendo los procedimientos establecidos por la Farmacopea se obtuvo el siguiente resultado en la valoración por Espectrofotometría U.V:

Concentración de la muestra teórica 100ug/ml

Concentración del patrón 110 ug/ml

Absorbancia media de la muestra: 0.69010 nm

Absorbancia media del patrón: 0.6882 nm

$$CM = \frac{\text{Absorbancia del patrón}}{\text{Absorbancia de la muestra}} \times Cp$$

$$CM = \frac{0.6882}{0.69010} \times 110$$

$$CM = 109.55 \text{ ug/ml}$$

Valor que cae dentro del rango establecido, no menos de 90 y no más de 110 %.

**PRUEBA DE DISOLUCION**



Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua  
UNAN - LEON  
Facultad de Ciencias Químicas  
ESCUELA DE FARMACIA

CUADRO No. 1

Medio de disolución	Hay Disolución	No hay disolución
Agua destilada		X
Hidróxido de Sodio 0.1N	X	
Solución Buffer PH 7.6		X
Solución Buffer PH 8		X
Metanol		X
Metanol / Agua 50:50		X
Metanol / Agua 70:30	X	

Se utilizaron tabletas de:

Laboratorio Nacional:

Ramos

Laboratorio Extranjeros:

Apotex, Medicuba, Hoechst Marion Roussel



Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua  
UNAN - LEON  
Facultad de Ciencias Químicas  
ESCUELA DE FARMACIA

Con los cuales obtuvimos los siguientes resultados :

Tiempo de Liberación (Minutos)	Ramos (Area)	Apotex (Area)	Medicuba (Area)	Hoechst Marión Roussel
5	2.5	45.9	14	4.5
10	3.8	52.3	30.2	7.4
15	6	53.3	41.8	8.9
20	7.7	53.4	45.9	11.9
25	9.5	53.5	47	14.3
30	11.4	54.3	49.2	16.3
35	12.8	54.4	53.5	18.3
40	14.5	55.2	53.7	19.2
45	15.7	55.8	55	29.9



Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua  
UNAN - LEON  
Facultad de Ciencias Químicas  
ESCUELA DE FARMACIA

CONCENTRACION Y PORCENTAJE ENCONTRADO

CUADRO No. 3

	RAMOS	APOTEX	MEDICUBA	HOECHST MARION ROUSSEL
5'	CM= 0.4118616 %= 4.1186 %	CM= 7.5655183 %= 75.6 %	CM= 2.3075655 %= 23.07	CM= 0.7417174 %= 7.41
10'	CM= 0.6263392 %= 6.26	CM= 8.6204054 %= 86.20	CM= 4.9777484 %= 49.77	CM= 1.2197132 %= 12.19
15'	CM= 0.988956 %= 9.88	CM= 8.7852315 %= 87.85	CM= 6.8897313 %= 68.89	CM= 1.4669523 %= 14.6
20'	CM= 1.2691610 %= 12.691	CM= 8.8017141 %= 88.01	CM= 7.565518 %= 75.6	CM= 1.961430 %= 19.61
25'	CM= 1.565848 %= 15.658	CM= 8.8196802 %= 88.19	CM= 7.746827 %= 77.46	CM= 2.357013 %= 23.57
30'	CM= 1.879017 %= 18.79	CM= 8.950057 %= 89.5	CM= 8.109444 %= 81.09	CM= 2.686665 %= 26.86
35'	CM= 2.1097741 %= 21.097	CM= 8.966540 %= 89.66	CM= 8.818196 %= 88.18	CM= 3.016317 %= 30.16
40'	CM= 2.389978 %= 23.89	CM= 9.0988401 %= 90.98	CM= 8.851162 %= 88.51	CM= 3.164661 %= 31.64
45'	CM= 2.587769 %= 25.87	CM= 9.197296 %= 91.97	CM= 9.0654359 %= 90.65	CM= 4.928300 %= 49.28



### RESULTADOS DE LINEARIDAD DEL SISTEMA (TABLA 1)

COEF.CORREL	0.999543028
COEF.DETERM	0.99908626
PROMEDIO	0.327478183
SUMA	3.274781832
DESV.STAND	0.003841991
CV	1.173205303

Cumple con los criterios:

Tabla 1.1

$\bar{y}$	=	125.568333
DE	=	0.449909585
CV	=	0.397 %

Ya que  $CV < 1.5 \%$ , se cumple con el criterio de precisión del sistema.

$CV < 1.5\%$

$r \geq 0.99$

$r^2 \geq 0.98$

### RESULTADOS DE LINEARIDAD DEL METODO (Tabla 2)

PENDIENTE	0.998726190
INTERCEPTO	-0.036666667
COEF.CORREL	0.999953462
COEF.DETER	0.999906926
DESVES.STAND	0.285071872
PROMEDIO	99.825
CV	0.285571622

Se cumple con los criterios de linealidad del método



**EXACTITUD Y REPETIBILIDAD (Tabla 2.2)**

$$\bar{R} = 89947.92 \quad DE = 0.07932 \quad CV = 0.079 \%$$

Ya que se  $CV \leq 2\%$  se cumple con el criterio de exactitud y repetibilidad.

**PRECISION (TABLA 2.3)**

$$\bar{Y} = 100.1731554$$

$$DE = 0.345526607$$

$$CV = 0.344929 \%$$

Como  $CV$  es menor del  $2\%$  se cumple con el criterio para el método cromatográfico.



*Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua*  
*UNAN - LEON*  
*Facultad de Ciencias Químicas*  
*ESCUELA DE FARMACIA*

# **ANALISIS DE RESULTADOS**



- Los reportes obtenidos en el Espectrofotómetro U.V son:

Grafico 1: Espectro del blanco

Grafico 2: Picos del patrón y muestra a longitud de onda de 300 nm utilizada para realizar la valoración.

Grafico 3: Se muestran las absorbancia del patrón y muestra a 302 nm, las absorbancia son bajas debido a que se tuvo que trabajar con concentraciones pequeñas ya que la concentración declarada por la muestra es también pequeña.

Mediante tales reportes obtuvimos resultados de los cuales se encuentran dentro de los rangos establecidos para la valoración de las tabletas de Glibenclamida.

Grafico 4: Muestra la cuantificación del método de valoración, obteniendo resultados de confiabilidad con un margen de error cercano al 0 % y un coeficiente de correlación igual a 0.99997, cumpliendo los criterios establecidos.

En el cuadro 1: Se muestran los resultados de las pruebas de disolución utilizando para dichas pruebas diferentes medios.

No hay disolución en agua debido a la poca solubilidad del p.a en agua.

En Hidróxido de sodio 0.1N si hubo disolución, pero al leer en el U:V se obtuvieron absorbancia muy pequeñas por lo que era necesario utilizar un agente complejante como el B- ciclodextrin, el cual no esta disponible ni al alcance del laboratorio.



*Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua  
UNAN - LEON  
Facultad de Ciencias Químicas  
ESCUELA DE FARMACIA*

Con solución Buffer de Fosfato monobásico de potasio se realizó la prueba de disolución a un PH básico (PH 8 y 7.6), también era necesario el uso de agentes complejantes ya que los valores no eran considerables para determinar el grado de disolución.

Con Metanol presenta solubilidad pero no hay disolución, ya que las propiedades tecnológicas que se encuentran en su formulación poseen efectos significativos sobre la disolución de la droga.

En metanol/agua 50:50 no hay disolución en esta proporción en cambio en metanol/agua 70:30 sí, se observó disolución por lo que se escogió esta mezcla dando una disolución a las tabletas.

En el Cuadro # 1 se utilizaron diferentes medios de disolución, donde observamos una lenta e incompleta disolución e incluso en metanol/agua (50:50). En cambio en metanol/agua a una proporción 70:30, la droga presento mejor disolución.

Se escogió este medio por estudios realizados en sistemas de : CO-Solventes de metanol acuoso, lo que brinda un medio más accesible para la desintegración de la droga, poco soluble o insoluble en agua.

En el cuadro 2 y 3 se muestran los resultados y cálculos registrados en el HPLC donde la tableta de Glibenclamida del Laboratorio Ramos presenta una menor area, una concentración de muestra y un valor de Q menor en relación con las otras marcas estudiadas lo cual determina que el grado de disolución de la tableta no es el requerido. Esto puede ser que en el momento de la formulación no se agrega la cantidad requerida de agentes desintegrantes para que así se de su completa desintegración. Y por ende ocasiona una disminución en relación a la disolución, otro aspecto importante es la dureza de la tableta ya que presento mayor dureza que las marcas extranjeras, por lo que hay que tomar en cuenta la influencia de la fuerza de compresión en el momento de la fabricación, donde no se afecte la dureza y tiempo de



*Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua*  
*UNAN - LEON*  
*Facultad de Ciencias Químicas*  
*ESCUELA DE FARMACIA*

desintegración ya que una mayor compresión de la requerida puede causar inhibición de la humedificación de la tableta.

**Ver Tabla 1, 1.1, 2, 2.2. 2.3**

Con estos resultados obtenidos en la validación del método cromatográfico se comprueba la confiabilidad que existe tanto en linealidad del sistema como linealidad del método, donde se cumplen todos los criterios establecidos.



*Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua*  
*UNAN - LEON*  
*Facultad de Ciencias Químicas*  
*ESCUELA DE FARMACIA*

# CONCLUSION



*Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua  
UNAN - LEON  
Facultad de Ciencias Químicas  
ESCUELA DE FARMACIA*

No encontrada una bibliografía que refiera la validación del método de disolución por Cromatografía por HPLC, para el principio activo estudiado podemos decir que hemos encontrado un método de análisis, rápido, confiable, altamente reproducible y con elevada sensibilidad utilizando como fase móvil metanol/agua 70.30

Por medio de las pruebas de disolución que se le realizaron a las tabletas de Glibenclamida 5 mg elaboradas en el Laboratorio Ramos utilizando diferentes medio de disolución observamos que no existe una completa disolución lo cual nos garantiza que no habrá biodisponibilidad biológica de la droga. Comparando con los datos de tabletas de otros laboratorios extranjeros.

Por lo tanto podemos decir que los dato obtenidos a través de la linearidad del método y linearidad del sistema utilizados para la validación de este método se encuentran dentro de los parámetros para HPLC cumpliendo así con los criterios establecidos.

Los coadyuvantes empleados en la preparación de formulaciones farmacéuticas sólidas, así como los precedimientos de fabricación (mezcla, granulación, fuerza de compresión, etc.) pueden ejercer muy diversos efectos sobre las características de disolución de los principios medicamentosos contenidos en ella.

Por lo tanto, si el proceso de solución se encuentra bloqueado la absorción del fármaco no tiene lugar, lo que origina fallas terapéuticas. Si la velocidad es lenta o incompleta, el nivel sanguíneo alcanzado con este fármaco, resultará bajo e insuficiente para lograr un efecto terapéutico adecuado..



*Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua*  
*UNAN - LEON*  
*Facultad de Ciencias Químicas*  
*ESCUELA DE FARMACIA*

# RECOMENDACIONES

## RECOMENDACIONES

1. Urge que todos los profesionales que estamos a cargo de la manufactura, el control de calidad de los productos medicamentosos y al mismo tiempo a las compañías farmacéuticas a que nos preocupemos por aplicar controles físicos- químicos y biofarmacéuticos necesarios para ofrecer a la población de nuestro país formas farmacéuticas que vayan a resolver efectivamente los problemas de salud.
2. Disminuir el tamaño de partículas, mediante una pulverización adecuada como la micronización.
3. Obtener derivados más solubles que proporcionen una mayor disolución.
4. Realizar pruebas de disolución a todas las formas farmacéuticas sólidas que asegurarán las prácticas adecuadas de fabricación y además vigilar los procesos y la compra de materia prima adecuada y de mayor calidad.
5. Seguir realizando estudios con respecto a este tema con el Objetivo de brindar mayores conocimientos .



*Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua*  
*UNAN - LEON*  
*Facultad de Ciencias Químicas*  
*ESCUELA DE FARMACIA*

# BIBLIOGRAFIA



## BIBLIOGRAFIA

1. JESÚS KUMATE, ENRIQUE WOLPERT, MERCEDES LOPEZ, LIC. GUILLERMO FONSECA, FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS, SEXTA EDICIÓN, SECRETARIA DE LA SALUD, MÉXICO. 1994. - PAGES. 115, 113-115, 143-147, 125-126
2. INFORMACION DE MEDICAMENTOS, TOMO I, MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO DE ESPAÑA. PAGES. 1272, 1278.
3. ERICK W. MARTIN, ET. AL., FARMACIA PRACTICA DE REMINGTON, 17 AVA. EDICIÓN, TOMO II, PAGES. 2185, 2188
4. USP 23 NF 18, THE UNITED STATES PHARMACOPEIA NF 10, THE NATIONAL FARMULARY OFFICELA FRON JANUARY, 1 , 1995., PAG. 713
5. GOODMAN L. GILMAN, LAS BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA , NOVENA EDICIÓN, VOLUMEN II, PAGES. 1603 - 1606
6. BERTA PAREJA, MOISÉS BANANER. FARMACOTECNIA COMPODONICA EDICONES, S.A., LIMA, PERU, PAG. 1967.
7. METODOS ANALÍTICOS VALIDACIÓN COMITÉ DE VALIDACIÓN DE METODOS ANLITICOS. COLEGIO NACIONAL DE QUÍMICOS FARMACÉUTICOS, BIÓLOGOS DE MÉXICO, A.C.
8. ROBERT LEON, PH. D. EL LIBRO BASICO PARA CROMATOGRFÍA DE LIQUIDOS.



*Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua*  
*UNAN - LEON*  
*Facultad de Ciencias Químicas*  
*ESCUELA DE FARMACIA*

9. CLARKE'S ISOLATION AND IDENTIFICATION OF DRUGS.  
SECOND EDITION. J.V. JACKSON M.S. MOSS B. WIDDOP.  
LONDON. THE PHARMACEUTICAL PRESS. 1986.
  
10. EDISON CID CARMACO. CINÉTICA DE DISOLUCIÓN.  
UNIVERSIDAD DE CHILE, SANTIAGO CHILE, PROGRAMA  
REGIONAL DE DESARROLLO CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO  
WASHINGTON, DC. 1981.



*Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua*  
*UNAN - LEON*  
*Facultad de Ciencias Químicas*  
*ESCUELA DE FARMACIA*

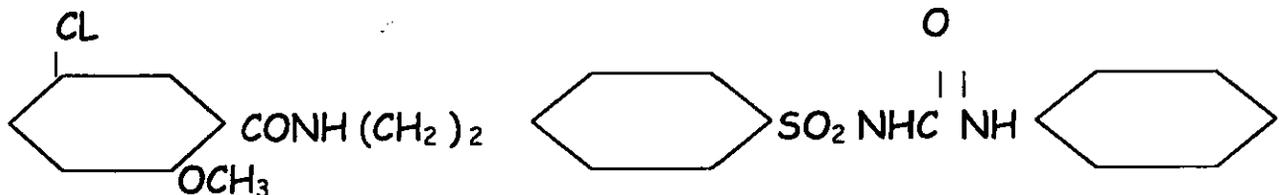
# ANEXOS



## PROPIEDADES QUIMICAS

Glibenclamida	
PUREZA	Contiene no menos del 90% y no más del 110% de $C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$
ESTRUCTURA QUIMICA	
NOMBRE QUIMICO	Glibenclamida: Benzamida 5-cloro- N 2- 4 (ciclohexilamino)carbonil amino sulfenil etil -2-metoxi
FORMULA EMPIRICA	$C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$
PESO MOLECULAR	494.00
DESCRIPCION	Polvo blanco, cristalino
PUNTO DE FUSION	Se estima entre 169 y 170°C
SOLUBILIDAD	Poco soluble en agua, soluble en solventes orgánicos corrientes
PKa	5.3

Estructura Química:



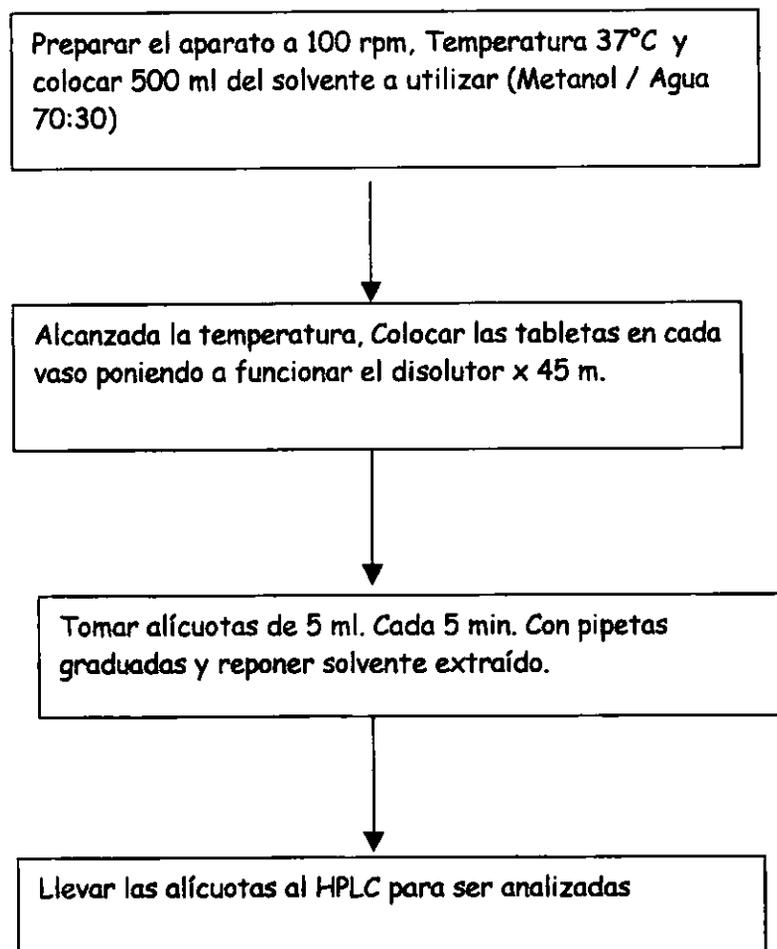


## PROPIEDADES FARMACOLOGICAS

APLICACIONES TERAPEUTICAS	Se utiliza para controlar la hiperglicemia en pacientes con Diabetes no insulino dependientes.
MECANISMO DE ACCION	Promueven el aumento de la secreción de insulina por parte de las células B de los islotes del páncreas. Disminuye la Glucogenólisis y Gluconeogénesis hepática. Aumenta la sensibilidad a la insulina de los tejidos extrapancreáticos.
ABSORCIÓN	En el tubo digestivo
UNION A LAS PROTEINAS PLASMÁTICAS	90 - 99%
VOLUMEN DE DISTRIBUCIÓN	0.2 Lt /Kg
METABOLISMO	Higado
EXCRECION	Bilis
REACCIONES ADVERSAS	Reacciones de Hipoglicemia, náuseas, vómitos, ictericia colestática, agranulocitosis, anemia aplásica y hemolíticas y reacciones de hipersensibilidad.
CONTRAINDICACIONES	Diabetes insulino dependiente, embarazo, amamantamiento, insuficiencia hepática o renal grave
TIEMPO DE VIDA MEDIA	10 horas
INTERACCIONES	Con hipoglicemiantes orales

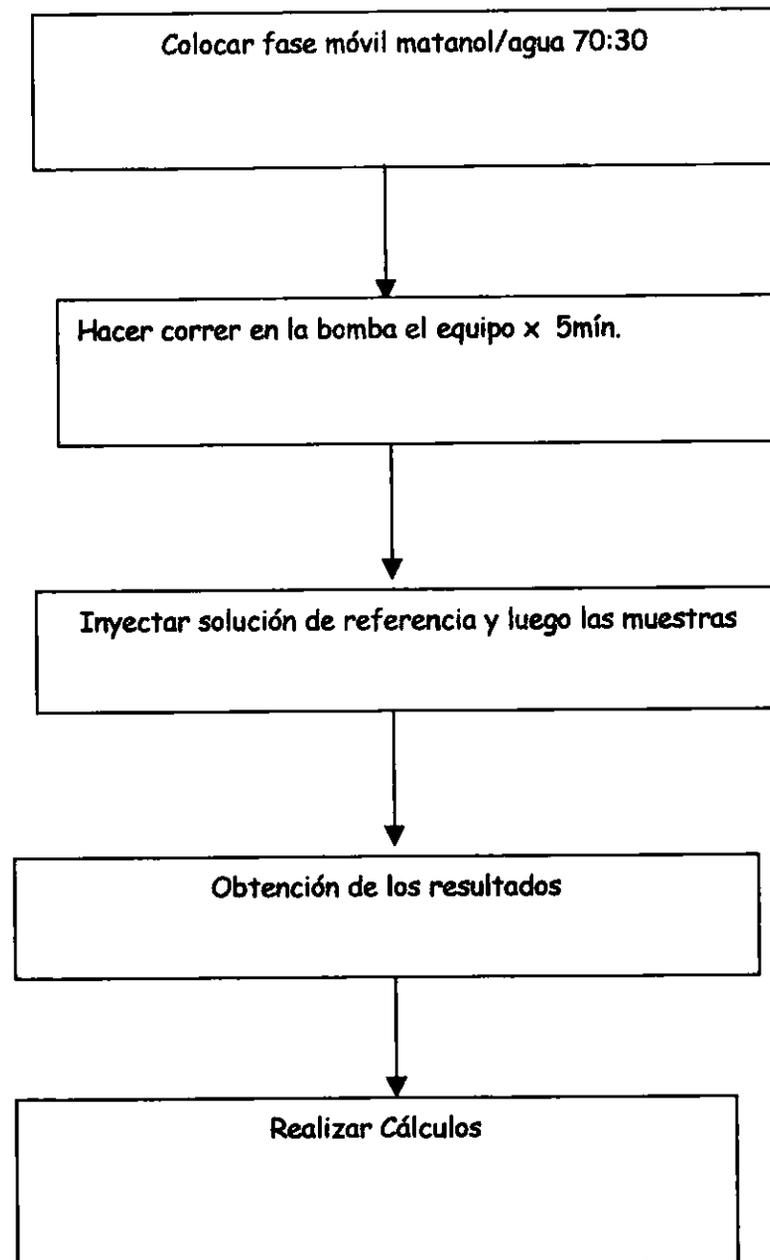


## FLUJOGRAMA DE DISOLUCION





## FLUJOGRAMA DE DISOLUCION





Resultados de la validación del método:

Linearidad del sistema: A partir de una concentración de 125 ug/ml.

Concentración ug/ml	Propiedad Medida (área)
25	148.55
25	147.91
50	296.30
50	295.71
75	444.48
75	444.99
100	592.81
100	590.77
125	740.11
125	741.95

$$\begin{aligned}\Sigma x &= 750 \\ \Sigma x^2 &= 68750 \\ \Sigma y &= 443.58 \\ \Sigma y^2 &= 2413446.639 \\ \Sigma xy &= 209465.7\end{aligned}$$

Cálculos preliminares para el coeficiente de variación:

$$\begin{aligned}\Sigma f &= 59.273 \\ \Sigma f^2 &= 351.3296792 \\ - & \\ F &= 5.9273 \\ DE &= 0.009581579 \\ CV &= 0.17683 \%\end{aligned}$$



Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua  
UNAN - LEON  
Facultad de Ciencias Químicas  
ESCUELA DE FARMACIA

Como  $CV < 1.5 \%$ , se cumple con el criterio de linealidad del sistema.

Precisión del sistema : a partir de una concentración de 125  $\mu\text{m/ml}$

Y= 126.8  $\mu\text{g}$   
125.01  $\mu\text{g}$   
125.47  $\mu\text{g}$   
126.01  $\mu\text{g}$   
125.88  $\mu\text{g}$   
124.96  $\mu\text{g}$

$\Sigma y = 753.41$   
 $\Sigma y^2 = 94605.684$   
 $\bar{y} = 125.568333$   
 $DE = 0.49909585$

$CV = 0.397 \%$

Ya que  $CV$  es  $< 1.5 \%$

Se cumple con el criterio de precisión del sistema



Linearidad del método:

Cantidad adicionada (x)	Cantidad Recuperada (y)
25	24.99212 ug/ml
25	25.00351 "
25	24.99310 "
50	50.00812 "
50	50.00286 "
50	49.88229 "
75	75.00640 "
75	74.99110 "
75	75.00092 "

$$\begin{aligned} m &= 1.000 \\ b &= 0.013 \\ r^2 &= 0.99998 \% \end{aligned}$$

Ya, que  $b = 0$ ,  $m = 1$ ,  $r^2 > 0.98$ , se cumple con los criterios de linealidad del método.



Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua  
UNAN - LEON  
Facultad de Ciencias Químicas  
ESCUELA DE FARMACIA

Exactitud y repetibilidad al 100%.

$$R1=24.99212/25*100=99.96848$$

$$R2=25.00351/25*100=100.01404$$

$$R3=24.99310/25*100=99.9724$$

$$R4=50.00812/50*100=100.01624$$

$$R5=50.00286/50*100=100.00572$$

$$R6=49.88229/50*100=99.76458$$

$$R7=75.00640/75*100=100.00853$$

$$R8=75.00640/75*100=99.98813$$

$$R9=75.0009/75*100=100.00122$$

$$\Sigma R=899.73$$

$$\Sigma R^2=89947.92$$

$$\bar{R}=99.9710$$

$$DE=0.07932$$

$$CV=0.079\%$$

Ya que  $CV < 2\%$ , se cumple el criterio de exactitud y repetibilidad al 100%.

Q: Es el porcentaje liberado del principio activo en una prueba de disolución a un tiempo determinado.

Para calcular el valor de Q se toma como el 100 % la concentración del estandar y se calcula el porcentaje en base a los mg encontrados en la prueba de disolución.

EJ.

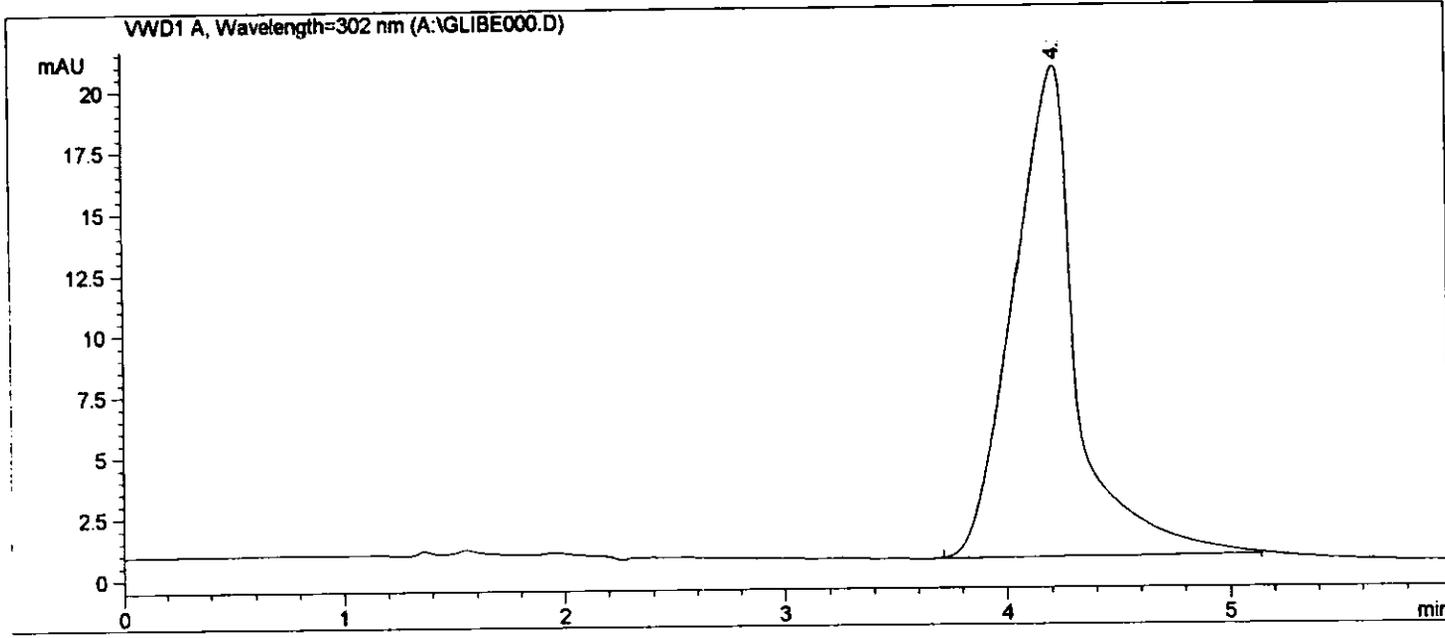
10 mcg. ( patrón )	—————>	100%
9.0654359 mcg ( 45 min )	—————>	X

X = 90.65439%.

ESTA MUESTRA SE ESTA VALORANDO CON CONCENTRACION DE

10 mcg/ml

=====  
Injection Date : 4/5/2001 11:02:43 AM  
Sample Name : glibenclamida Vial : 1  
Acq. Operator : KAREN, DEYA, ERSIL  
Acq. Instrument : Instrument 1  
Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GLIBE.M  
Last changed : 4/5/2001 10:58:01 AM by KAREN, DEYA, ERSIL  
Analysis Method : C:\HPCHEM\3\METHODS\ENAKEL.M  
=====



=====  
External Standard Report  
=====

Sorted By : Signal  
Calib. Data Modified : 4/26/2001 10:30:39 AM  
Multiplier : 1.0000  
Dilution : 1.0000  
Sample Amount : 9.60000 [mcg/ml] (not used in calc.)

=====  
Area Percent Report  
=====

Sorted By : Signal  
Calib. Data Modified : 4/26/2001 10:30:39 AM  
Multiplier : 1.0000  
Dilution : 1.0000  
Sample Amount : 9.60000 [mcg/ml] (not used in calc.)

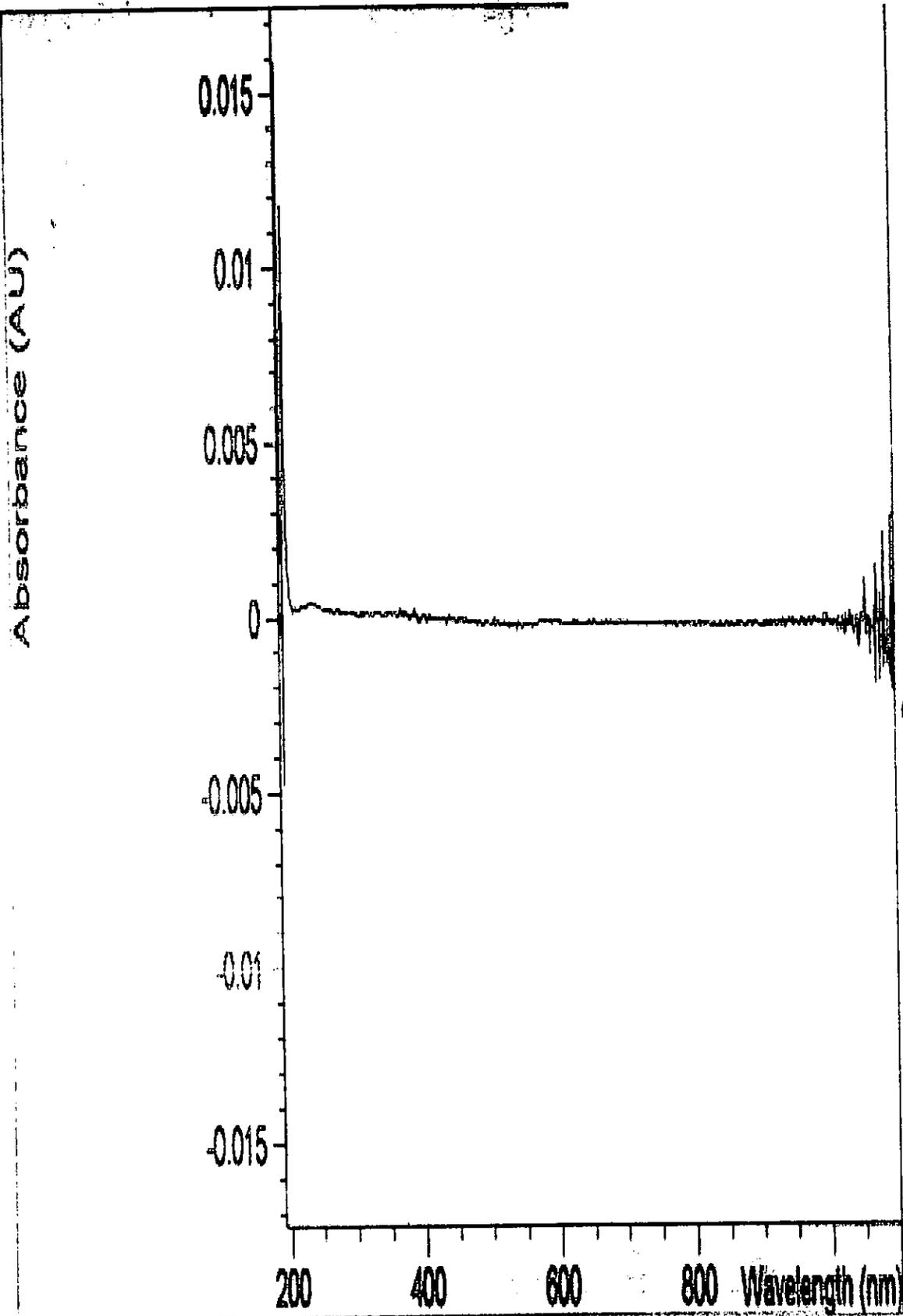
Signal 1: VWD1 A, Wavelength=302 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area %	Name
1	4.220	BB	0.2993	395.10251	100.0000	?

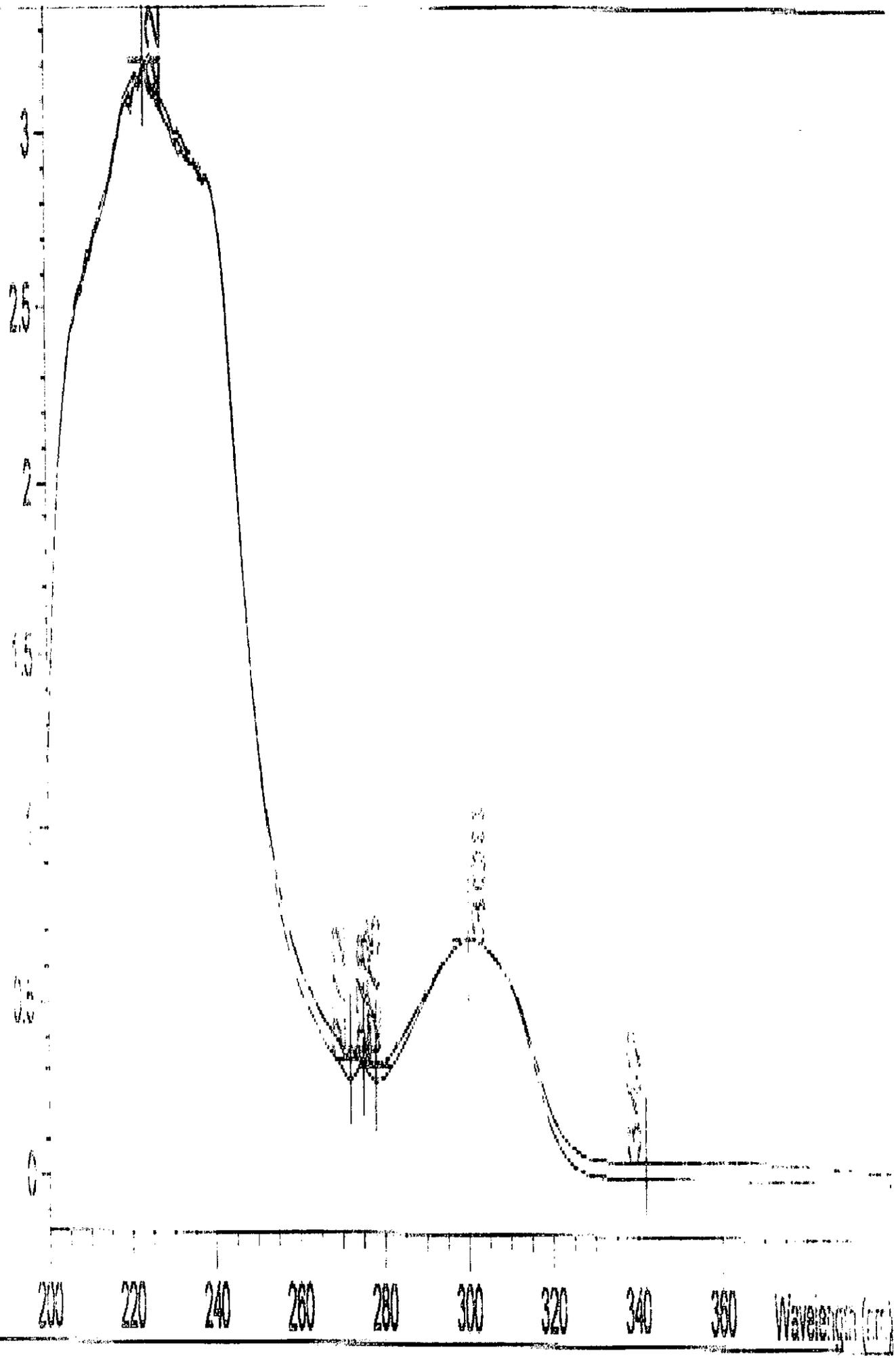
Totals : 395.10251

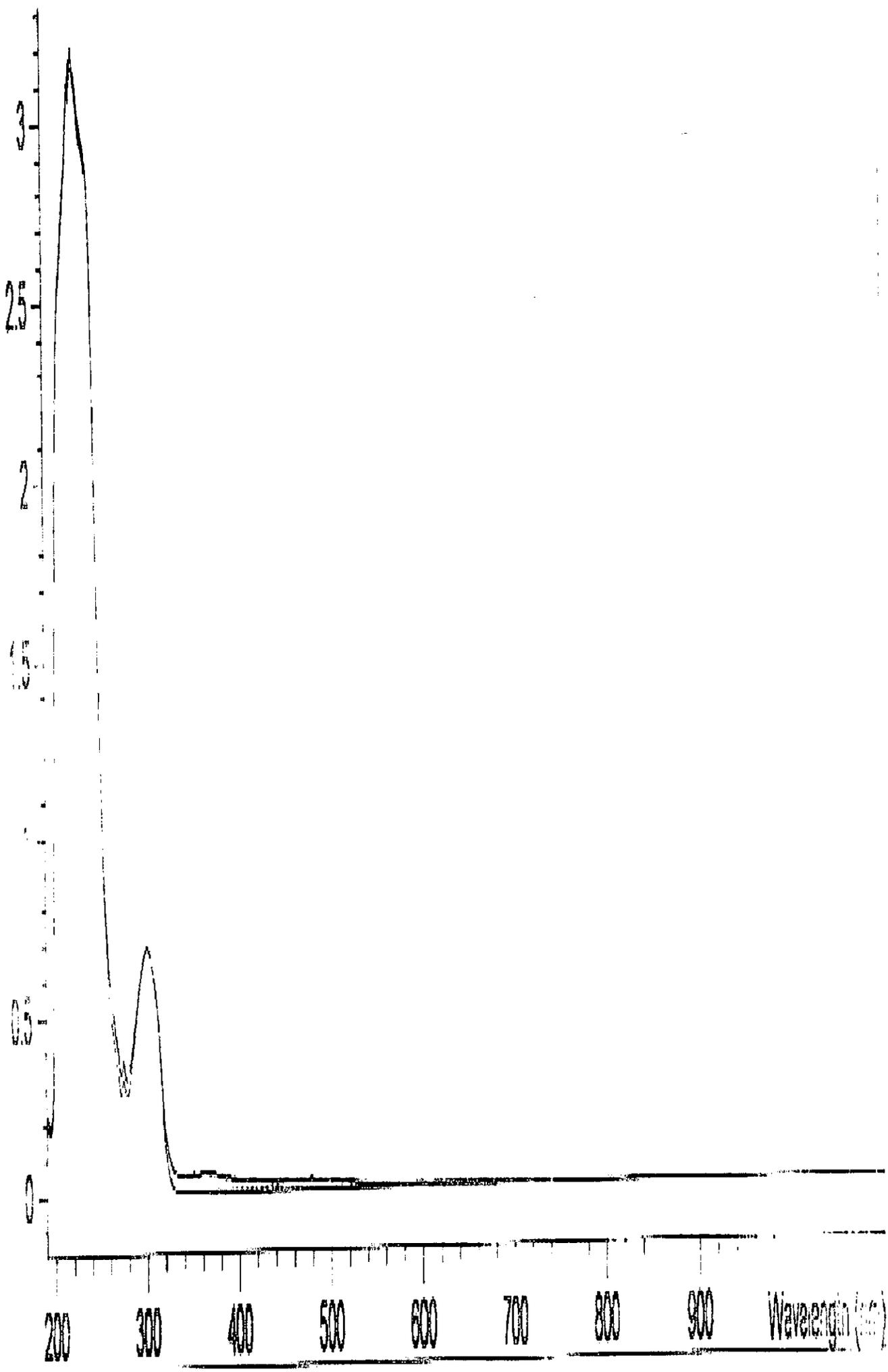
Results obtained with enhanced integrator!

# Last Blank Spectrum



200 220 240 260 280 300 320 340 360



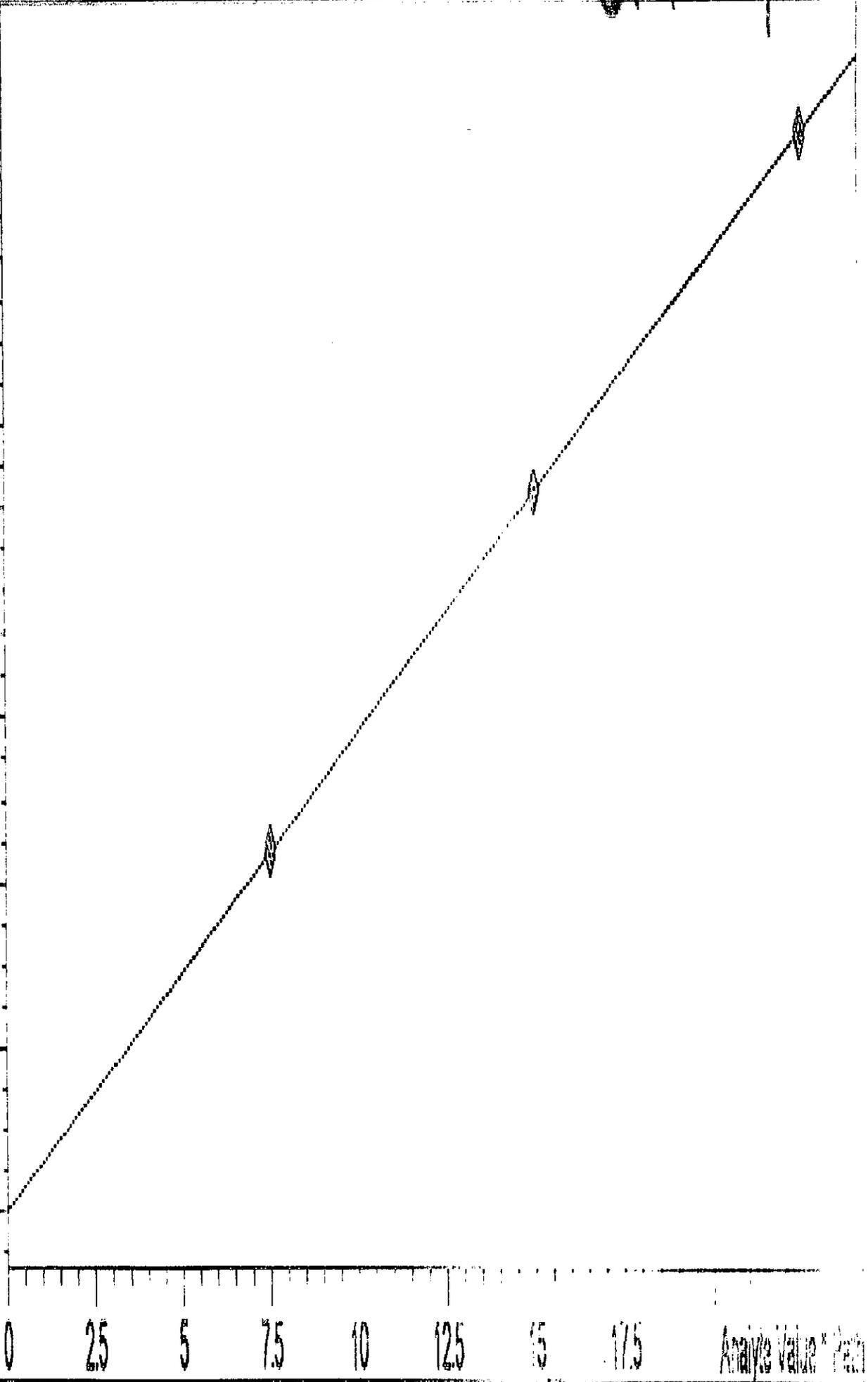


ABSORBANCE (AU)

Wavelength (nm)

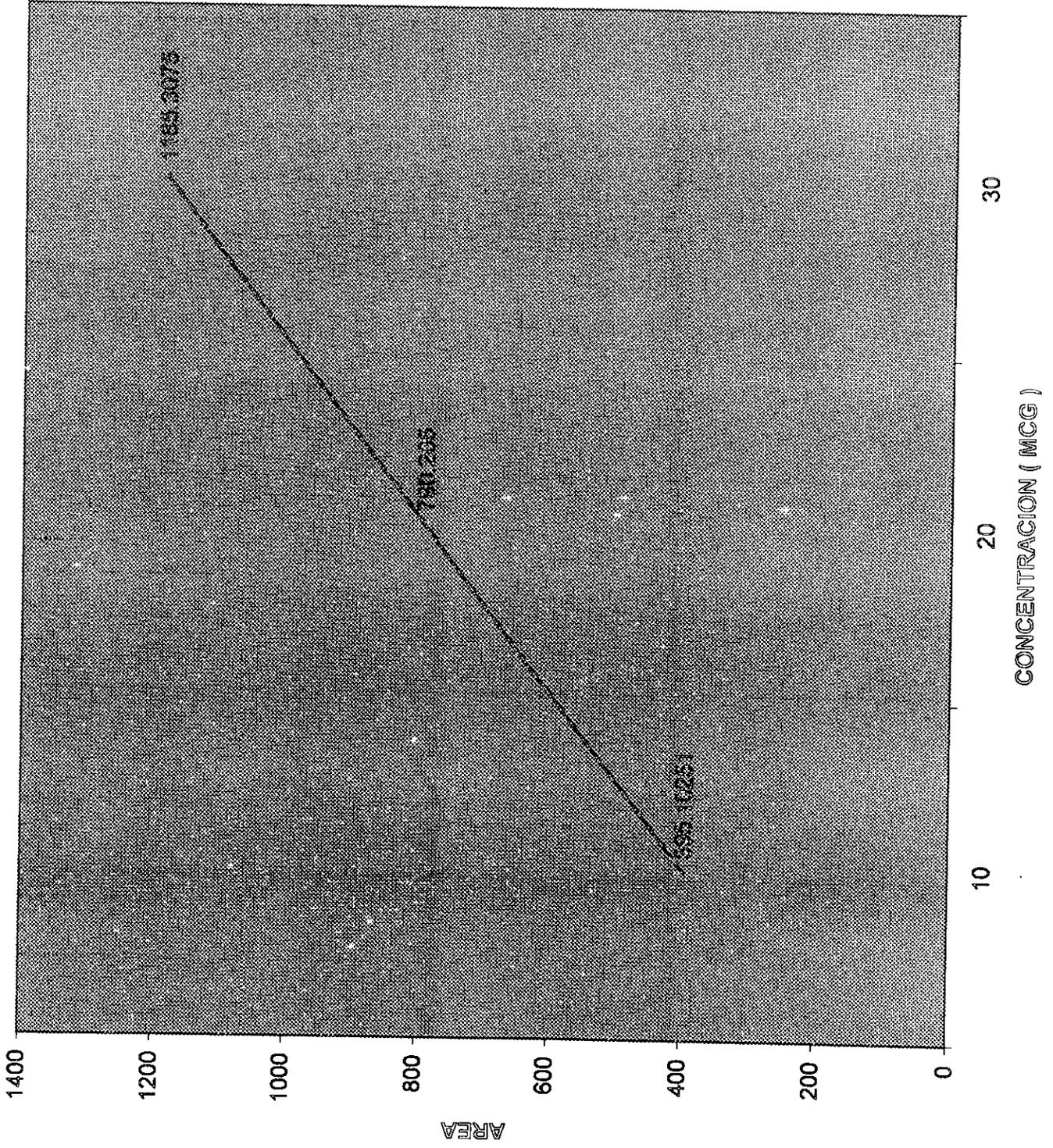
Wavelength Result

0.14  
0.12  
0.1  
0.08  
0.06  
0.04  
0.02  
0

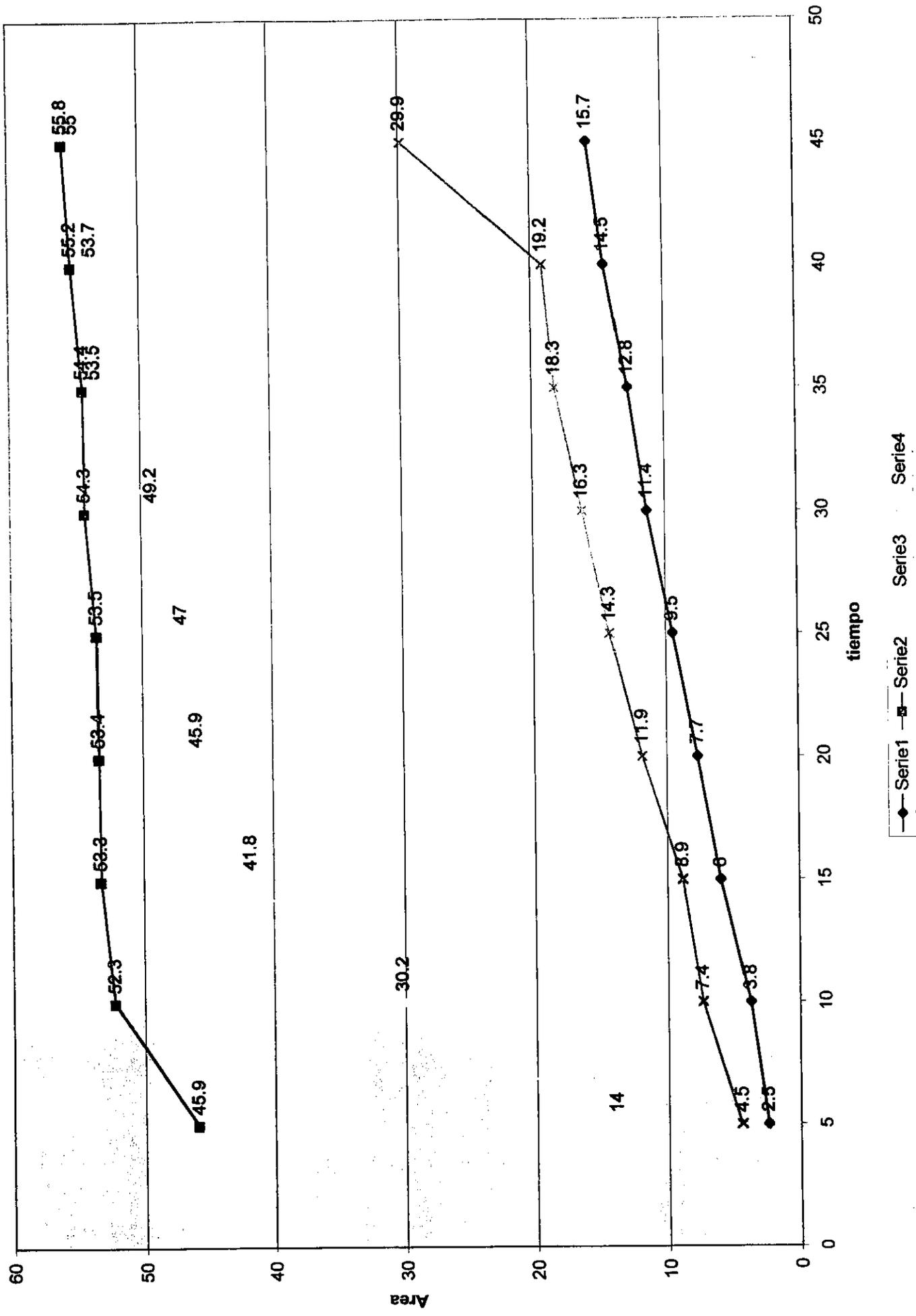


Analyse Value \* Factor

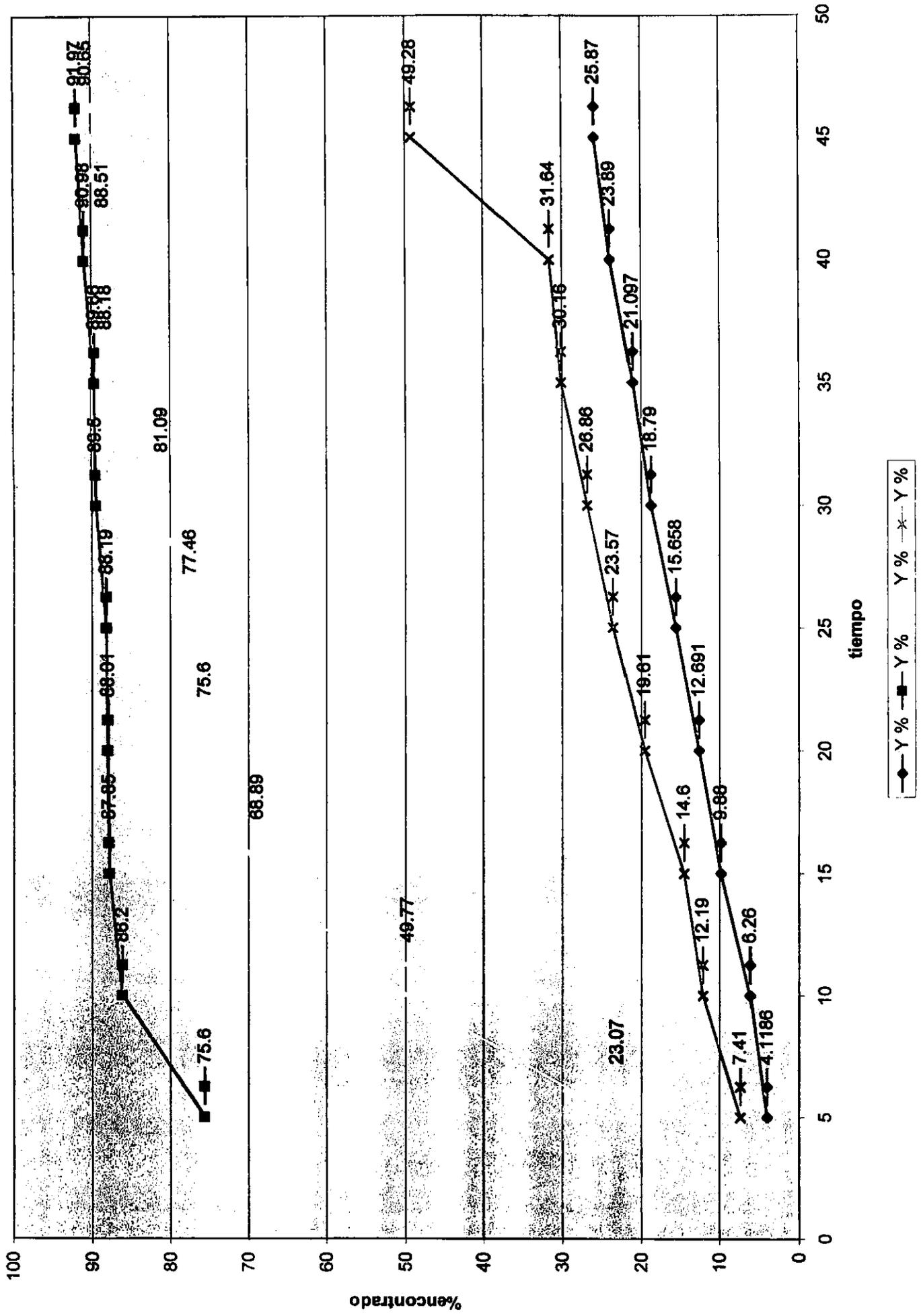
CURVA PATRON



Comparación de Area vs tiempo de Liberación de tabletas de Glibenclamida 5 mg



Comparación de porcentajes encontrados vs tiempos de liberación de tabletas de Glibenclamida 5 mg.





—◆— Serie 1

### Linealidad del método

