



**Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Farmacia
Programa de Magíster en Ciencias Farmacéuticas**

**DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD QUÍMICA DE
DAPAGLIFLOZINA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA**



Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al grado de Magíster en Ciencias Farmacéuticas

POR: EMILY STEPAHNIE CHAN JIANG

Profesor Guía: MSc. Marta Gloria de Diego Glaría
Dpto. de Farmacia, Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

**Julio, 2020
Concepción, Chile**

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Quien suscribe, EMILY STEPAHNIE CHAN JIANG, RUT: 26.167.226-K, pasaporte: PA0240386, alumna del Programa de Magíster en Ciencias Farmacéuticas, de la Facultad de Farmacia, de la Universidad de Concepción, declara ser autora de la tesis **DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD QUÍMICA DE DAPAGLIFLOZINA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA** y conceder derecho de publicación, comunicación al público y reproducción de esa obra, en forma total o parcial en cualquier medio y bajo cualquier forma del mismo, a la Universidad de Concepción, Chile, para formar parte de la colección material o digital de cualquiera de las Bibliotecas de la Universidad de Concepción y del Repositorio UDEC. Esta autorización es de forma libre y gratuita, y considera la reproducción de la obra con fines académicos y de difusión tanto nacional como internacionalmente.

Asimismo, quien suscribe declara que dicha obra no infringe derechos de autor de terceros.



.....
(EMILY STEPAHNIE CHAN JIANG)

RESUMEN

La estabilidad de un medicamento se relaciona con su potencia y eficacia. Si un medicamento se degrada puede producirse una disminución de su efecto terapéutico y propiciar la formación de productos tóxicos lo cual conllevaría a un producto inseguro para el paciente. Dapagliflozina (DAPA) es un medicamento utilizado para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 que posee una estructura química con grupos susceptibles a sufrir degradación, por lo tanto, es importante evaluar su estabilidad mediante métodos analíticos adecuados.

Se evaluó la estabilidad química de DAPA mediante un método indicador de estabilidad por cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos (DAD) en presencia de sus principales productos de degradación. La separación cromatográfica se logró con una columna de núcleo sólido RP-18, usando acetonitrilo y agua como fase móvil en modo de elución isocrática, a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min y detección UV a 225 nm. Se demostró que el método cumple con las normas de validación de la ICH, con respecto a linealidad ($r^2 = 0.9995$) en un intervalo de concentraciones de 50 - 150 $\mu\text{g/mL}$, selectividad, precisión, exactitud y límites de detección y cuantificación. DAPA es inestable en condiciones de hidrólisis neutra, térmica y calor / humedad, con la formación de dos productos de degradación que se identificaron preliminarmente por HPLC-DAD-ESI-MS/MS. Se evaluó la cinética de degradación de DAPA que correspondió a orden uno en las condiciones de mayor degradación. El método se aplicó para la determinación de DAPA en comprimidos comerciales de 10 mg, los cuales resultaron dentro de los límites aceptados por farmacopea. En conclusión, el método es adecuado para el análisis de rutina y puede ser utilizado para la determinación cuantitativa y evaluación de la estabilidad química de DAPA en preparaciones farmacéuticas.

ABSTRACT

The stability of a drug is related to its potency and efficacy. If a drug is degraded, its therapeutic effect may decrease and lead to the formation of toxic products, which would lead to an unsafe product for the patient. Dapagliflozin (DAPA) is a drug used for the treatment of type 2 diabetes mellitus that has a chemical structure with groups susceptible to degradation, therefore, it is important to evaluate its stability using appropriate analytical methods.

The chemical stability of DAPA was evaluated using a stability-indicating method by liquid chromatography with diode array detector (DAD) in the presence of its main degradation products. Chromatographic separation was achieved with a core-shell RP-18 column, using acetonitrile and water as the mobile phase in isocratic elution mode, at a flow rate of 1.0 mL/min and UV detection at 225 nm. The method was developed according with the ICH validation standards, with respect to linearity ($r^2 = 0.9995$) in a concentration range of 50 - 150 $\mu\text{g/mL}$, selectivity, precision, accuracy, and limits of detection and quantification. DAPA is unstable under neutral hydrolysis, thermal, and heat / humidity conditions, with the formation of two degradation products that were preliminarily identified by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. The degradation kinetics of DAPA were evaluated corresponding to first-order under the most degraded conditions. The method was applied for the determination of DAPA in commercial 10 mg tablets, which were within the limits accepted by pharmacopoeia. In conclusion, the method is suitable for routine analysis and can be used for the quantitative determination and evaluation of the chemical stability of DAPA in pharmaceutical preparations.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Diabetes mellitus	1
1.2. Medicamento en estudio	4
1.3. Cromatografía	8
1.3.1. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)	9
1.3.2. HPLC-DAD	17
1.3.3. HPLC-ELSD	19
1.3.4. HPLC-MS	22
1.4. Validación de un método analítico	25
1.4.1. Linealidad	25
1.4.2. Intervalo	26
1.4.3. Selectividad	26
1.4.4. Exactitud	27
1.4.5. Precisión	27
1.4.6. Límite de detección (LOD)	28
1.4.7. Límite de cuantificación (LOQ)	29
1.4.8. Robustez	29
1.5. Estabilidad de los medicamentos	30
1.5.1. Métodos indicadores de estabilidad	35
1.5.2. Cinética de degradación	37
1.6. Métodos analíticos para la determinación de dapagliflozina propanodiol monohidrato	42
2. HIPÓTESIS	50
3. OBJETIVOS	51
3.1. Objetivo general	51
3.2. Objetivos específicos	51
4. MATERIALES	52
4.1. Sistema cromatográfico	52

4.2.	Equipos de laboratorio	53
4.3.	Reactivos, solventes y estándares.....	54
4.4.	Material de laboratorio	55
4.5.	Material cromatográfico.....	56
4.6.	Otros.....	56
5.	METODOLOGÍA	58
5.1.	Preparación de estándares	58
5.2.	Método analítico por HPLC-DAD	58
5.2.1.	Desarrollo y optimización de método.....	58
5.2.2.	Selección de FM	59
5.2.3.	Modo de uso FM.....	62
5.2.4.	Selección del SI	62
5.2.5.	Selección de la concentración del SI	62
5.2.6.	Selección de la λ	63
5.2.7.	Selección de la columna cromatográfica	63
5.2.8.	Flujo de FM.....	64
5.2.9.	Temperatura del horno de la columna	64
5.3.	Preparación de la FM.....	64
5.4.	Tratamiento de muestra	64
5.5.	Condiciones cromatográficas finales	65
5.6.	Validación del método cromatográfico	66
5.7.	Estudios de estabilidad	69
5.7.1.	Hidrólisis ácida y básica	70
5.7.2.	Hidrólisis neutra	71
5.7.3.	Oxidación.....	72
5.7.4.	Temperatura	72
5.7.5.	Temperatura / Humedad relativa	73
5.7.6.	Fotólisis en estado sólido	73
5.7.7.	Fotólisis en solución	74

5.8.	Cinética de degradación de DAPA.....	74
5.9.	Método analítico por HPLC-ELSD	75
5.9.1.	Desarrollo y optimización de método.....	75
5.10.	Método HPLC-DAD-ESI-MS/MS para la detección de DAPA y derivados 77	
5.10.1.	Desarrollo y optimización de método	77
5.11.	Cuantificación de dapagliflozina propanodiol monohidrato en presentaciones comerciales.....	78
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	79
6.1.	Método analítico por HPLC-DAD	79
6.1.1.	Selección de FM	79
6.1.2.	Modo de uso FM.....	81
6.1.3.	Selección de SI.....	81
6.1.4.	Selección de la concentración del SI.....	83
6.1.5.	Selección de la λ	83
6.1.6.	Selección de la columna cromatográfica	85
6.1.7.	Flujo de FM.....	88
6.1.8.	Temperatura del horno de la columna	89
6.2.	Tratamiento de muestra	89
6.3.	Validación del método indicador de estabilidad	95
6.3.1.	Linealidad	95
6.3.2.	Selectividad	96
6.3.3.	Exactitud	97
6.3.4.	Precisión	98
6.3.5.	LOD y LOQ	99
6.3.6.	Robustez.....	100
6.4.	Estudios de estabilidad	102
6.4.1.	Hidrólisis ácida y básica	102
6.4.2.	Hidrólisis neutra	103

6.4.3.	Oxidación	104
6.4.4.	Temperatura	104
6.4.5.	Temperatura / Humedad relativa	106
6.4.6.	Fotólisis en estado sólido y en solución	109
6.5.	Cinética de degradación	110
6.5.1.	Cinética de degradación con temperatura	110
6.5.2.	Cinética de degradación con temperatura / humedad	111
6.6.	Método indicador de estabilidad por HPLC-ELSD	113
6.7.	Método HPLC-DAD-ESI-MS/MS para la detección de DAPA y derivados 116	
6.8.	Cuantificación de dapagliflozina propanodiol monohidrato en presentaciones comerciales.....	121
7.	LIMITACIONES	123
8.	CONCLUSIONES	124
9.	GLOSARIO	126
10.	BIBLIOGRAFÍA	129



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 6-1. FM utilizadas.	79
Tabla 6-2. Selección del SI.	81
Tabla 6-3. Comparación de columnas.	85
Tabla 6-4. Comparación de R_s entre DAPA, SI y PD utilizando diferentes tipos de columna.	86
Tabla 6-5. Parámetros cromatográficos de DAPA, SI y PD utilizando una columna fused-core.	87
Tabla 6-6. Tratamientos de muestras ensayados.	94
Tabla 6-7. Selectividad del método analítico.	96
Tabla 6-8. Exactitud del método analítico.	98
Tabla 6-9. Precisión del método analítico.	99
Tabla 6-10. LOD-LOQ.	99
Tabla 6-11. Validación del LOQ.	100
Tabla 6-12. Variación porcentaje de fase acuosa.	100
Tabla 6-13. Variación flujo de la FM.	101
Tabla 6-14. Variación temperatura.	102
Tabla 6-15. Porcentaje de degradación de DAPA según el tiempo, bajo la condición de hidrólisis neutra.	103
Tabla 6-16. Porcentaje de degradación de DAPA según el tiempo, bajo la condición de temperatura.	105
Tabla 6-17. Porcentaje de degradación de DAPA según el tiempo, bajo la condición de temperatura / humedad relativa.	107
Tabla 6-18. Método HPLC-DAD-ESI-MS/MS para la identificación de DAPA y PD.	118
Tabla 6-19. Cuantificación de dapagliflozina propanodiol monohidrato en presentaciones comerciales.	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Estructura química de dapagliflozina propanodiol monohidrato.	5
Figura 1-2. Modificación de la superficie polimérica de Purospher®.	11
Figura 1-3. Ejemplo de macroporos y mesoporos.	14
Figura 1-4. Ejemplo de un núcleo fusionado.	16
Figura 1-5. Etapas en el proceso de detección del ELSD.	20
Figura 1-6. Gráfico de cinética de orden cero.	40
Figura 1-7. Gráfico de cinética de primer orden.	41
Figura 6-1. Espectrograma de DAPA 100 µg/mL.	84
Figura 6-2. Espectrograma del SI 100 µg/mL.	84
Figura 6-3. Cromatograma de solución estándar de DAPA 100 µg/mL + SI 100 µg/mL. Sistema cromatográfico A, columna Merck Purospher® STAR RP-18 endcapped, flujo 1.0 mL/min y λ 225 nm.	84
Figura 6-4. Cromatograma de método indicador de estabilidad para DAPA 150 µg/mL + SI 100 µg/mL. Columna de empaque “fused-core”, flujo 1.0 mL/min y λ 225 nm. PD 1 y PD 2 (productos de degradación).	88
Figura 6-5. Curva de calibración de DAPA.	95
Figura 6-6. Selectividad del método analítico.	97
Figura 6-7. Picos coeluidos al utilizar FM ACN : H ₂ O (37 : 63 v/v).	101
Figura 6-8. Cromatograma de hidrólisis neutra. Representativo de una muestra de DAPA 150 µg/mL + SI 100 µg/mL sometida a hidrólisis neutra por 12 días. Columna de empaque “fused-core”, flujo 1.0 mL/min y λ 225 nm. PD 1 y PD 2 (productos de degradación).	104
Figura 6-9. Cromatograma de DAPA bajo condición: Temperatura. Representativo de una muestra de DAPA 150 µg/mL + SI 100 µg/mL sometida a calor seco por 51 días. Columna de empaque “fused-core”, flujo 1.0 mL/min y λ 225 nm. PD 1 y PD 2 (productos de degradación).	106
Figura 6-10. Cromatograma de DAPA bajo condición: Temperatura / Humedad relativa. Representativo de una muestra de DAPA 150 µg/mL + SI 100 µg/mL sometida a calor húmedo por 51 días. Columna de empaque “fused-core”, flujo 1.0 mL/min y λ 225 nm. PD 1 y PD 2 (productos de degradación).	108

Figura 6-11. Espectrograma del PD 1. t_R 2.1 min.	109
Figura 6-12. Espectrograma del PD 2. t_R 3.1 min.	109
Figura 6-13. Cinética de degradación de DAPA bajo condición: Temperatura.	111
Figura 6-14. Cinética de degradación de DAPA bajo condición: Temperatura / Humedad relativa.	112
Figura 6-15. Diagrama de Pareto para DAPA.	113
Figura 6-16. Gráfica de Efectos Principales para DAPA.	114
Figura 6-17. Cromatograma de hidrólisis neutra utilizando HPLC-ELSD. Representativo de una muestra de DAPA 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + SI 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sometida a hidrólisis neutra por 12 días. Columna de empaque “fused-core”, flujo 1.0 mL/min y λ 225 nm.	115
Figura 6-18. Espectros de masa de PD 1, PD 2 y DAPA obtenidos de la condición de degradación: Temperatura / Humedad relativa a los t_R que se observan en la Tabla 6-18.	119
Figura 6-19. Cromatograma de DAPA. a. DAPA b. DAPA / MET.	122
Figura 6-20. Espectrograma referente al t_R 2.3 min.	122
Figura 6-21. Espectrograma referente al t_R 2.5 min.	122

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1-1. Límite de detección.	29
Ecuación 1-2. Límite de cuantificación.	29
Ecuación 1-3. Reacción química.	38
Ecuación 1-4. Velocidad de una reacción química.	38
Ecuación 1-5. Velocidad de reacción de orden cero.	39
Ecuación 1-6. Velocidad de reacción de primer orden.	40
Ecuación 1-7. Constante de velocidad de primer orden.	40
Ecuación 1-8. Velocidad de reacción de segundo orden.	41
Ecuación 5-1. Resolución. Para dos picos vecinos (A y B).	60
Ecuación 5-2. Factor de cola.	61
Ecuación 5-3. Número de platos teóricos.	62
Ecuación 5-4. Cálculo del $t_{90\%}$	75



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Diabetes mellitus

La Diabetes Mellitus (DM) se puede clasificar en DM tipo 1, DM tipo 2 y Diabetes Gestacional. Un 5 a 10% de los casos diagnosticados de diabetes se atribuyen a la DM tipo 1, aunque su diagnóstico no esté bien definido, se conoce que factores tipo autoinmunes, genéticos y ambientales pueden ser los causantes del desarrollo de esta enfermedad ("Organización Panamericana de la Salud (OPS). Diabetes,").

La DM tipo 2 se considera una epidemia mundial, que se caracteriza por ser una enfermedad crónica metabólica, provocada por varios factores que causan un mal funcionamiento en la captación o secreción de insulina, conllevando a una hiperglicemia que afecta al paciente provocándole complicaciones micro y macrovasculares asociadas a la enfermedad. Las complicaciones macrovasculares tales como enfermedad coronaria, ataque cerebrovascular y enfermedad arterial periférica, son las causantes de la mayor parte de las muertes en estos pacientes y son la principal razón de retinopatía diabética y discapacidad a largo plazo (Allel, López, & Puccio, 2012; "Gobierno de Chile. Ministerio de Salud. Guía de Práctica Clínica Tratamiento Farmacológico de la Diabetes Mellitus tipo 2. 2016-2017,").

La diabetes se produce cuando el páncreas (glándula ubicada detrás del estómago), no produce suficiente cantidad de insulina o cuando el cuerpo

no puede utilizar la misma en forma apropiada. La función de la insulina es estimular el transporte de glucosa de la sangre al interior de las células donde se convierte en energía y con esto se obtiene la energía necesaria para realizar las actividades diarias. Si este proceso no se logra de la manera más adecuada, la glucosa se acumulará en la sangre dando origen a la diabetes ("Organización Mundial de la Salud (OMS). Diabetes," ; "Sociedad Chilena de Endocrinología y Diabetes. Educación sobre Diabetes,").

Según la novena edición del Diabetes Atlas de la Federación Internacional de Diabetes, la incidencia y prevalencia continúan aumentando masivamente a nivel mundial. Se calcula que alrededor de 463 millones de personas en todo el mundo, o el 9.3% de los adultos de 20 a 79 años, tienen diabetes. Alrededor del 79.4% viven en países de bajo y medio ingreso. De acuerdo a las estimaciones, para el año 2030, se proyecta 578 millones de personas y para el 2045, se calcula 700 millones de adultos que vivirán con diabetes. Dentro de la región Sur y Centro América (SACA), la diabetes afecta a un 8.5% (6.7 - 11.3%) de la población, para el año 2030 aumentará a 9.5% (7.4 - 12.6%) y para el 2045 será 9.9% (7.8 - 13.2%). Existen 13 millones de personas dentro de la región SACA con diabetes no diagnosticada y esto correspondería a 42% de la población ("International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas," 2019).

En la Encuesta Nacional de Salud 2016 - 2017 realizada en Chile, se demuestra que la diabetes sigue en aumento. En el año 2010 un 9.4%

de la población padecía diabetes, pero esta cifra en la actualidad ha aumentado a un 12.3%; dando como resultado que Chile se coloque dentro de los países con más alta prevalencia de diabetes a nivel mundial ("Sociedad Chilena de Endocrinología y Diabetes. Educación sobre Diabetes,"). También de acuerdo a esta encuesta se sospecha que un 18.3% de los chilenos mayores de 45 a 64 años y 30.6% de los mayores de 65 años padece la enfermedad ("Departamento de Epidemiología. ENCUESTA NACIONAL DE SALUD 2016-2017 Primeros resultados.,").

Al existir una creciente prevalencia mundial de la enfermedad se pone en manifiesto la necesidad de nuevas opciones de tratamiento para la DM tipo 2, en el cual en la mayoría de los casos se requiere una terapia en combinación y también por los efectos secundarios indeseables de los tratamientos que se encuentran disponibles actualmente ("Informe mundial sobre la Diabetes. Organización Mundial de la Salud ", 2016).

Existen diversos grupos farmacológicos para el tratamiento de la DM tipo 2, por ejemplo: sulfonilureas, biguanidas, inhibidores de la alfa-glucosidasas, glitinidas, tiazolidinedionas, análogos del GLP-1, inhibidores de la dipeptidil peptidasa (DPP-4) y los inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa 2 (SGLT2). Dentro del grupo de biguanidas, se encuentra la metformina (MET) que es recomendada como primera línea en terapia inicial en pacientes con DM tipo 2 (Poretsky, 2010).

Para el tratamiento de la DM tipo 2 que tengan contraindicación o no toleren el uso de MET se utilizan los inhibidores del SGLT2, los cuales

son medicamentos bajo prescripción médica, aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU. (FDA), cuyo uso en conjunción con dieta y ejercicio son eficaces para reducir la glucemia en adultos con DM tipo 2. Los fármacos inhibidores del SGLT2 son la canagliflozina, dapagliflozina y empagliflozina que están disponibles en el mercado como forma farmacéutica sin asociación o en formulaciones combinadas con otros hipoglucemiantes como la MET y saxagliptina (FDA, 2015; Hsia, Grove, & Cefalu, 2017).

1.2. Medicamento en estudio

Dapagliflozina (DAPA) fue aprobada el 8 de enero de 2014 por la FDA. Pertenece al grupo de los inhibidores de SGLT2, el cual es indicado en adultos de 18 años de edad o mayores con DM tipo 2. Se puede utilizar en monoterapia cuando la dieta y el ejercicio por sí solos no logran un control glucémico adecuado, o en pacientes en los que no se considere adecuado el uso de MET debido a intolerancia. También se utiliza en combinación con otros medicamentos hipoglucemiantes incluyendo insulina, cuando estos, junto con dieta y ejercicio, no logren un control glucémico adecuado ("Farxiga (dapagliflozin) tablets," 2014).

La fórmula química de DAPA es (2S,3R,4R,5S,6R)-2-[4-cloro-3-[(4-etoxifenil)metil]fenil]-6-(hidroximetil)oxano-3,4,5-triol y la fórmula molecular es $C_{21}H_{25}ClO_6$, cuyo peso molecular es 408.87 g/mol. DAPA se presenta como dapagliflozina propanodiol monohidrato (Figura 1-1) cuya nombre comercial es Forxiga®, el cual es un polvo blanco cristalino,

inodoro, ligeramente soluble en cloroformo, dimetilsulfóxido (DMSO) y metanol (MeOH), con un punto de fusión entre 74 - 78°C y un peso molecular de 502.98 g/mol (PubChem; "Toronto Research Chemicals. Safety Data Sheet - Dapagliflozin Propanediol Hydrate," 2018).

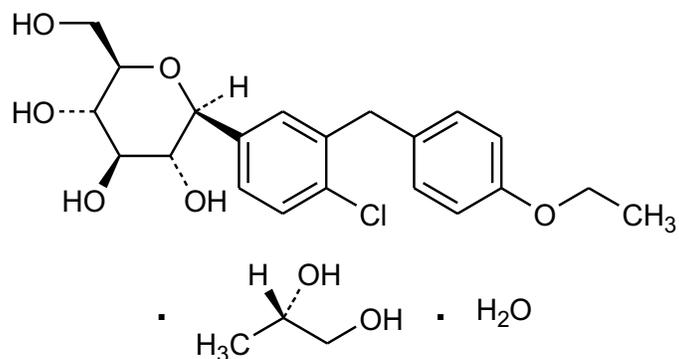


Figura 1-1. Estructura química de dapagliflozina propanodiol monohidrato.

De acuerdo al Informe Público Europeo de evaluación (EPAR), la dosis recomendada es de 10 mg de DAPA una vez al día en monoterapia y en tratamiento adicional en combinación con otros medicamentos hipoglucemiantes incluyendo insulina. Cuando DAPA se usa en combinación con insulina o un secretagogo de la insulina, como una sulfonilurea, puede considerarse una dosis menor de insulina o del secretagogo de la insulina para disminuir el riesgo de hipoglucemia.

La eficacia glucémica de DAPA puede verse afectada en aquellos pacientes que tienen su sistema renal comprometido debido a una insuficiencia renal, o puede ser inexistente en pacientes con insuficiencia

renal grave (Albarrán & Ampudia-Blasco, 2013; "Ficha Técnica Forxiga 10 mg. Comprimidos recubiertos con película.,").

El SGLT2 se expresa de forma selectiva en el riñón, es el transportador predominante responsable de la reabsorción de la glucosa tras la filtración glomerular para devolverla a la circulación. A pesar de la presencia de hiperglucemia en la DM tipo 2, la reabsorción de la glucosa filtrada continúa. DAPA mejora los niveles de glucosa plasmática en ayunas y postprandial reduciendo la reabsorción renal de la glucosa, lo que conduce a la excreción de glucosa en orina. Esta excreción de glucosa (efecto glucosúrico) se observa después de la primera dosis, es continua durante el intervalo de administración de 24 horas y se mantiene durante el tratamiento. La cantidad de glucosa eliminada por el riñón mediante este mecanismo depende de la concentración de glucosa en sangre y de la tasa de filtración glomerular (TFG). DAPA no altera la producción endógena normal de glucosa en respuesta a la hipoglucemia. Actúa independiente de la secreción de insulina y de la acción de la insulina ("Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Anexo I. FICHA TÉCNICA O RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO. FORXIGA,").

En cuanto a sus propiedades farmacocinéticas, DAPA se absorbe bien y con rapidez tras su administración oral. Las concentraciones plasmáticas máximas, se alcanzan normalmente luego de 2 horas, tras su administración en ayunas. La biodisponibilidad oral absoluta de DAPA tras la administración de una dosis de 10 mg es del 78%. DAPA se une

a las proteínas plasmáticas en un 91% aproximadamente. Se metaboliza a través de la enzima uridina difosfato glucuronil transferasa (UGT) 1A9 expresada en hígado y riñones, formando principalmente dapagliflozina 3-O-glucoronido, el cual es un metabolito inactivo; ni este ni otros metabolitos se relacionan con los efectos hipoglucemiantes. De los metabolitos minoritarios, los principales compuestos oxidativos son del resultado de la O-desalquilación del grupo etoxi y la hidroxilación del resto bi-aril-metano (Aylsworth, Dean, VanNorman, & Nkemdirim Okere, 2014; Bronson, Black, Dhar, Ellsworth, & Merritt, 2013; "Ficha Técnica Forxiga 10 mg. Comprimidos recubiertos con película.,").

En Chile se encuentra registrado tanto Forxiga® (contiene solamente dapagliflozina propanodiol monohidrato) como Xigduo XR que es un comprimido recubierto de liberación prolongada que contiene dapagliflozina (como propanodiol) y metformina clorhidrato. Xigduo XR está indicado en adultos de 18 años de edad o mayores con DM tipo 2 como adyuvante a la dieta y el ejercicio para mejorar el control glucémico y en aquellos pacientes no controlados adecuadamente con la dosis máxima tolerada de MET en monoterapia y además en pacientes que ya se están tratando con la combinación de DAPA y MET en comprimidos separados ("Ficha Técnica Xigduo 5 mg / 1000 mg comprimidos recubiertos con película.," ; "XIGDUO XR 5 / 1000 mg Comprimidos Recubiertos de Liberación Prolongada.," ; "XIGDUO XR 10 / 1000 mg Comprimidos Recubiertos de Liberación Prolongada.,").

Para este estudio fue seleccionada DAPA, considerando que posee dentro de su estructura química, grupos funcionales susceptibles a la degradación, como fenoles, hidroxilos y éteres que son propensos a una variedad de reacciones como hidrólisis, oxidación y fotólisis, por lo que es importante estudiar su estabilidad, debido a que si el compuesto se degrada existiría una disminución de la actividad terapéutica. También es importante indicar que se seleccionó DAPA porque se utiliza como medicamento para una enfermedad crónica y además por su reciente año de aprobación (2014).

1.3. Cromatografía

La cromatografía es la técnica analítica utilizada con mayor frecuencia en el análisis farmacéutico. Se basa en la migración diferencial de los compuestos entre dos fases, una estacionaria y otra móvil. Esta técnica relaciona diversos conjuntos de métodos que permiten separar e identificar compuestos químicos estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios. Las ventajas que posee la cromatografía es su simplicidad, rapidez, relativamente bajo costo y su gran utilidad como herramienta de separación (Miller, 2005; Watson, 2012).

Cuando ocurre una separación cromatográfica, la muestra se disuelve en una fase móvil (FM) que puede ser un gas (GC), un líquido (LC) o un fluido supercrítico (CFS). Esta FM se hace pasar a través de una fase

estacionaria (FE) inmisible, que puede ser un sólido o un líquido y que se mantiene fija en una columna o sobre una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen entre la FM y la FE. Aquellos compuestos que son retenidos con fuerza por la FE se mueven lentamente con el flujo de la FM; por el contrario, los componentes que interactúan débilmente con la FE, se mueven con rapidez. Como resultado de la diferencia en la movilidad, los compuestos de la muestra se separan en bandas o zonas distintas que pueden determinarse de manera cualitativamente y cuantitativamente (Skoog, Holler, & Crouch, 2008).

1.3.1. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)

Dentro de la cromatografía líquida se encuentra la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC), la cual es una técnica de separación muy utilizada debido a su gran versatilidad, rapidez y excelentes resultados, siendo además un muy buen método analítico cuantitativo. Se aplica en casi todos los laboratorios donde se realizan análisis químicos, bioquímicos y farmacéuticos, tanto de rutina como de investigación.

Mediante HPLC se logra la separación de los componentes de una mezcla, en donde una FM líquida se bombea bajo presión a través de una columna de acero inoxidable que contiene partículas de FE con un diámetro que varía entre 3 a 10 mm (Guillermina & Quiroga, 2013; Watson, 2012).

A través de las décadas en búsqueda de mejores separaciones y con una rapidez adecuada, se ha modificado la composición de los materiales de relleno. Estos materiales de relleno han cambiado desde partículas peliculares de gran tamaño, pasando por partículas totalmente porosas más pequeñas, hasta partículas esféricas con diámetros inferiores a 2 μm . A continuación, se detallan algunos de los materiales de relleno comúnmente utilizados:

✓ Microparticuladas

Hacia finales de los 60, las primeras fases disponibles en cromatografía líquida eran del tipo pelicular con partículas entre 40 y 50 μm , siendo los soportes porosos los más utilizados durante la historia de la HPLC. En esa época se emplearon geles de sílice microparticulados y luego se produjo la transición desde materiales peliculares hacia partículas porosas de bajo diámetro (Miller, 2005).

Dentro de las columnas microparticuladas se encuentran las columnas HPLC Purospher®, que se basan en una sílice libre de metales de alta pureza propiciando excelentes separaciones con muy buena simetría del pico. El material base para las columnas de HPLC de alta pureza Purospher® está hecho de tetraalcoxisilano. Existen dentro de esta categoría la Purospher® C-8, C-18 para cromatografía en fase reversa (relleno apolar) y Purospher® NH₂ y Si para cromatografía en fase normal (relleno polar). También se encuentran dentro de

esta gama, las columnas de Purospher® STAR RP-18, que están diseñadas para uso universal y son elaboradas en base a sílice de alta pureza, ofrecen las mejores características de retención integral, estabilidad de pH sobresaliente de pH 1.5 a 10.5 en un amplio rango de temperatura y adecuadas para fases móviles acuosas de hasta 100%. La modificación de la superficie polimérica de Purospher® STAR RP-18 endcapped (Figura 1-2), proporciona una cobertura virtualmente perfecta de la superficie, evitando así las interacciones silanofílicas (Merck, 2008-2009).

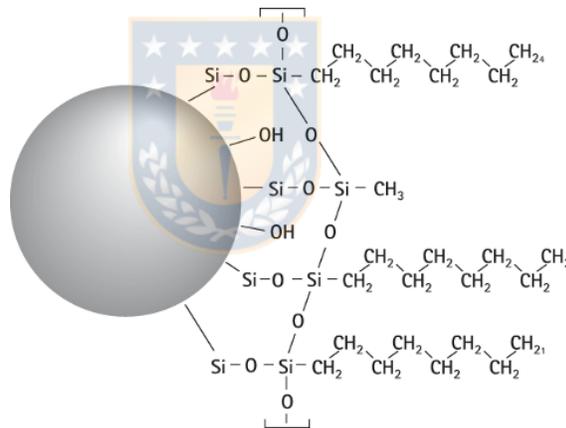


Figura 1-2. Modificación de la superficie polimérica de Purospher®.

✓ Monolítica

En el año 1970 surge la idea de crear columnas monolíticas, pero se informaron a fines de la década de los 90. El laboratorio Merck introdujo dichas columnas en el 2001, reemplazando en gran parte a las columnas microparticuladas, debido a que

durante su uso muestran una presión más baja a velocidades de flujo más alta conllevando de esta manera a dar lugar a una alta eficiencia (Miller, 2005).

Las columnas monolíticas consisten en una pieza de un material poroso continuo y herméticamente sellado contra la pared de un tubo (o capilar), de manera que la FM pasa a través de toda la columna, sin que exista ningún tipo de espacio intersticial libre. Las columnas monolíticas se dividen en dos grandes tipos: (i) las columnas monolíticas poliméricas, que consisten en la obtención de polímeros orgánicos mediante polimerización in-situ de los monómeros orgánicos adecuados y (ii) las columnas monolíticas de base sílice, preparadas a partir de un proceso de sol-gel dentro de la columna. Debido al pequeño tamaño de sus esqueletos de sílice y a sus amplios macroporos (through-pores) se alcanza mayor eficiencia de separación que con columnas de partículas empaquetadas a una similar presión de trabajo (Moldoveanu & David, 2013; Nuñez, 2008).

Las columnas monolíticas de sílice se caracterizan por presentar mayores porosidades que las columnas de partículas empaquetadas, con una mayor eficiencia, superiores permeabilidades y además permiten trabajar a mayores flujos de FM (mayores presiones). Sin embargo, existen desventajas,

pues una mayor porosidad implica que hay una menor cantidad de sílice en la columna, lo que llevará a una menor cantidad de fase estacionaria después de realizar la correspondiente modificación química (que es la que le proporcionará funcionalidad a la columna). Esto se traducirá en menores factores de retención de los analitos y una disminución en su capacidad de separación (Nuñez, 2008).

Dentro de las columnas monolíticas se encuentran las columnas para HPLC Chromolith® que mezclan velocidad y eficiencia. No están rellenas con partículas de sílice pequeñas como las columnas para HPLC convencionales. Al contrario, cada columna consiste en una sola varilla de gel de sílice polimérico de gran pureza con una estructura de poro bimodal de macroporos y mesoporos (Figura 1-3). Los macroporos reducen la contrapresión de la columna, permitiendo así flujos significativamente más rápidos. Los mesoporos forman una fina estructura porosa, lo que crea una superficie activa para separaciones de alta resolución. Para una mayor eficiencia, pueden acoplarse múltiples columnas para alcanzar un mayor recuento de platos teóricos con una contrapresión todavía muy baja. La exclusiva tecnología de sílice monolítica reduce al mínimo la contrapresión a la vez que maximiza la velocidad, la robustez y la selectividad a diferencia de las columnas para

HPLC convencionales que suelen experimentar una contrapresión elevada (Merck).

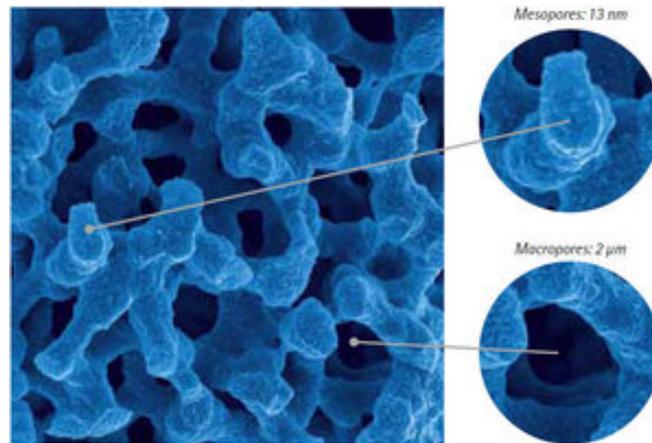


Figura 1-3. Ejemplo de macroporos y mesoporos.

✓ Núcleo sólido

Las nuevas mejoras en el diseño del material de relleno de una columna cromatográfica han permitido la creación de las columnas de núcleo sólido que debido a sus ventajas han ido reemplazando a las columnas microparticuladas. En el año 2006 a través de Kirkland (Advanced Materials Technology Inc.), se introdujo en el mercado la tecnología de estas columnas (Kirkland, Schuster, Johnson, & Boyes, 2013; Unger, Lamotte, & Machtejevas, 2017).

Las partículas de core-shell consisten en un núcleo sólido recubierto con una capa de sílice porosa que se deposita en

capas o en un solo revestimiento, según el fabricante. El diámetro del núcleo sólido y la capa porosa varían entre diferentes fabricantes y el tamaño de partícula requerido. Las columnas están disponibles comercialmente en tamaños de partículas que varían de 1.3 a 5 μm (Taylor, 2014).

La tecnología de partículas core-shell proporciona sorprendentes aumentos en la eficiencia del pico y la resolución a presiones más bajas, proporcionando la habilidad de obtener un rendimiento alto (Phenomenex, 2020).

Dentro de las columnas de núcleo sólido se encuentran las columnas HPLC Ascentis® Express, basadas en la tecnología de partículas fused-core (núcleo fusionado), proporcionan más del doble de velocidad y eficiencia a la mitad de la contrapresión que las columnas de menos de 2 μm . El innovador proceso de fabricación de partículas con núcleo fusionado produce una distribución de tamaño de partícula muy estrecha permitiendo el uso de fritas de porosidad grandes que resisten la obstrucción, conllevando al resultado de una columna más resistente. Las partículas porosas tradicionales no se fabrican de manera que produzcan distribuciones de tamaño de partícula extremadamente estrechas (Merck, 2020b).

Para este trabajo se utilizó la columna Ascentis® Express 5 μm C-18, la cual es una columna de cromatografía líquida de alta

velocidad y alto rendimiento basada en el diseño de partículas fused-core altamente eficiente. La partícula fused-core (Figura 1-4) proporciona una delgada capa porosa de sílice de alta pureza que rodea un núcleo de sílice sólido. Este diseño de partículas exhibe una eficiencia de columna muy alta debido a las trayectorias de difusión poco profundas en la cubierta porosa de 0,5 micras de grosor y al tamaño de partícula global altamente uniforme de 5 micras. La fase estacionaria de dimetil octadecilo densamente adherida permite que se puedan analizar compuestos básicos, ácidos o neutros en fase reversa (Merck, 2020a).

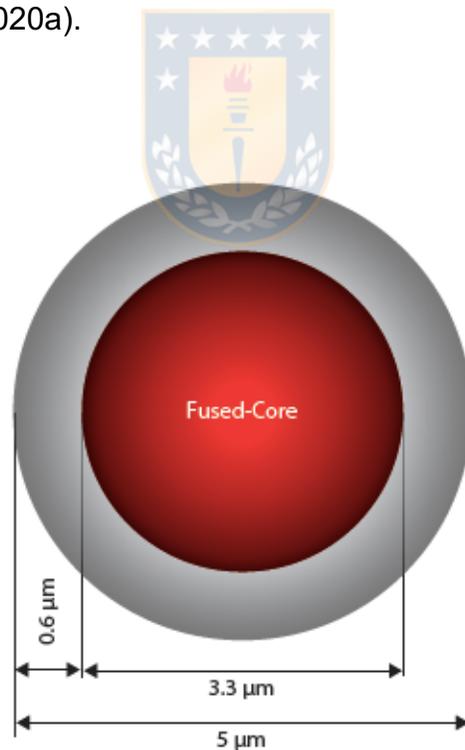


Figura 1-4. Ejemplo de un núcleo fusionado.

1.3.2. HPLC-DAD

El detector ultravioleta (UV) es el detector más utilizado en HPLC, ya que posee buena sensibilidad, permite detectar analitos en cantidades de nanogramos, y muchos compuestos poseen una estructura química que absorbe al UV. Este detector no es destructivo y permite la utilización de gradiente de fase móvil, con la única limitación de que los solventes a utilizar sean transparentes en la longitud de onda (λ) de trabajo. Existen dos tipos de detectores UV: los de λ fija o fotométrico y los de λ variable o espectrofotométrico. El detector fotométrico normalmente emite la mayor parte de la energía a una λ fija de 254 nm; en cambio, el espectrofotométrico es más versátil, ya que permite programar y trabajar en un rango más amplio del espectro y con esto favorecer la sensibilidad de los compuestos que no absorben a 254 nm. Dentro de la categoría de detectores espectrofotométricos se encuentra el detector de arreglo de diodos (DAD) el cual se basa en un modo de óptica inversa; ya que a diferencia de los detectores convencionales, el haz de radiación que atraviesa la muestra, es dispersado por medio de una red de difracción fija, siendo recogidas simultáneamente todas las longitudes de onda dispersadas mediante una matriz de fotodiodos o arreglo de diodos (Moffat, Osselton, & Widdop, 2011; Quattrocchi, Abelaira, & Laba, 1992). Una ventaja del detector DAD es que permite el uso de un computador para clasificar las señales, de modo que se tenga disponibilidad al espectro UV-Vis todo el tiempo. También permite realizar diversas tareas

como: analizar la pureza del pico comparando los espectros UV en varios puntos a lo largo de este, cuyos valores deberían estar entre 1.0 y 1.5 para así poder confirmar la presencia de un solo analito en dicho pico cromatográfico; la confirmación del compuesto (agregando información espectral al tiempo de retención) y reprocesar cualquier λ como un cromatograma (Aubry, Tattersall, & Ruan, 2009; Miller, 2005).

La pureza del pico cromatográfico es una estimación de la probabilidad de que el pico este contaminado con algún otro componente de co-elución. Esta estimación se puede comprobar comparando los espectros de pendiente ascendente y de pendiente descendente del pico. La pureza del pico cromatográfico se calcula dividiendo los espectros de pendiente ascendente y de pendiente descendente del pico en cada longitud de onda; y luego dividiendo el valor máximo en el gráfico resultante por el valor mínimo. Si los dos espectros fueran idénticos, la división de los dos espectros resultaría en una línea recta y dividir el valor máximo por el valor mínimo en esta gráfica daría un valor de 1.00. Por lo tanto, un índice de pico de 1.00 significaría que los espectros de pendiente ascendente y descendente coincidieron exactamente indicando que el pico fue espectralmente homogéneo, lo más probable es que conste de un solo componente. Un valor por encima de 1.00 implica que los dos espectros son diferentes. Debido al ruido y otras variables, un pico con un valor de 1.00 a 1.50 generalmente se considera puro (PerkinElmer, 2013).

1.3.3. HPLC-ELSD

El detector evaporativo de dispersión de la luz (ELSD) es un detector de tipo universal basado en un fenómeno físico, que puede detectar cualquier analito no volátil que tenga o no cromóforos en su estructura química. Este detector se utiliza como un atractivo complemento a la técnica HPLC-UV, porque se podría detectar aquellos compuestos que no son posibles de visualizar a través del UV debido a la falta de cromóforos en la estructura química. Es importante destacar que no se ve afectado por las características de absorción del disolvente a diferencia del detector UV. Por lo tanto, se pueden usar disolventes que absorben la radiación UV. Como el disolvente se evapora por completo, se puede realizar un gradiente para optimizar la separación. Entre sus aplicaciones destacan el análisis de carbohidratos, lípidos y tensioactivos, sustancias que no podrían ser analizadas de forma directa con un detector UV (Adamovics, 1997; Lucena, Cárdenas, & Valcárcel, 2007).

Existen tres etapas primordiales que explican el funcionamiento de este detector las cuales son: la nebulización o atomización del efluente proveniente de la columna cromatográfica, la evaporación del disolvente (FM) y la detección propiamente tal del compuesto por dispersión de la luz (Figura 1-5).

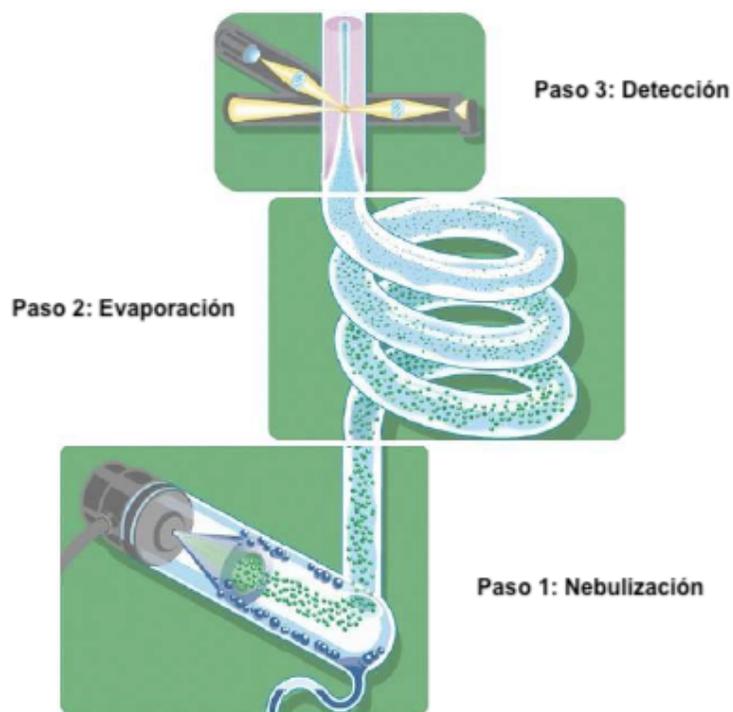


Figura 1-5. Etapas en el proceso de detección del ELSD.

Para este proceso es necesario que el efluente proveniente del sistema cromatográfico se transforme en gotas pequeñas y esto ocurre durante la nebulización, ya que el efluente se mezcla con un gas inerte (aire comprimido o nitrógeno de alta pureza) y este al pasar por el nebulizador genera un aerosol polidisperso. Cabe destacar que las gotas de mayor tamaño son eliminadas por el sistema de evacuación, mientras que el resto son arrastradas por la corriente de gas hacia el tubo de evaporación. Cuanto menor sea el tamaño de la gota, menor será la temperatura necesaria para evaporar la FM; por lo tanto, la presión del gas nebulizador es un parámetro a considerar al momento de optimizar el método desarrollado.

Como segunda etapa, el haz nebulizado pasa por el tubo evaporador a temperatura controlada, provocando que la FM sea evaporada dejando las partículas no volátiles del compuesto de interés libres de su capa de solvatación. Para esto, es necesario que la temperatura de evaporación de la FM utilizada sea inferior a la del compuesto en estudio. El detector utilizado en este trabajo está diseñado para evaporar solventes con altos puntos de ebullición a temperaturas bajas, proporcionando una reducción del potencial de evaporación o descomposición térmica del compuesto. Por consiguiente, la temperatura del tubo de evaporación es el parámetro más importante en la optimización de la detección.

Durante la etapa de detección, se hace incidir un haz de luz sobre las partículas del compuesto (libre de solvente) y se mide la dispersión que éstas producen sobre el haz incidente y luego un fotomultiplicador ubicado en un ángulo específico, convierte la señal de dispersión de la luz en una señal eléctrica que puede ser traducida en forma de señal analógica. Existe un parámetro denominado la ganancia (rango 1 a 12) que corresponde a la sensibilidad del detector, la cual es lograda por controlar el alto voltaje aplicado al fotomultiplicador para amplificar la respuesta que se obtiene.

Cabe destacar que este detector es de tipo destructivo, ya que una vez que los analitos pasan por el detector son eliminados por el sistema de evacuación sin ninguna posibilidad de recuperación (Kohler, Haerdi, Christen, & Veuthey, 1997; Megoulas & Koupparis, 2005; SEDERE, 2020).

1.3.4. HPLC-MS

La espectrometría de masas (MS) permite identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos conocidos y proporcionar información sobre las propiedades estructurales y químicas de las moléculas. El principio de funcionamiento de un espectrómetro de masas es generar moléculas cargadas o fragmentos moleculares en un medio de alto vacío o inmediatamente antes de que la muestra ingrese a dicha región. Estas moléculas ionizadas se generan en fase gaseosa. Al tener estas moléculas cargadas y en fase gaseosa, se les aplica campos eléctricos o magnéticos que permiten la determinación de su peso molecular y el peso molecular de cualquier fragmento producido por la ruptura de la molécula. La detección cromatográfica mediante MS posee límites de detección entre 10^{-8} y 10^{-10} g/mL. La espectrometría de masas es destructiva, pues requiere ionizar las muestras, mediante interfaces de ionización a presión atmosférica (Bayo & Marco, 2016; Sciex, 2018; Skoog et al., 2008; Watson, 2012) y posteriormente fragmentar la muestra ionizada, de manera de obtener la mayor cantidad de información estructural del analito.

Cabe resaltar que la utilización de la técnica MS dentro del análisis de todo tipo de muestras se debe a la gran diversidad de fuente de iones que se han diseñado para evaporar y ionizar moléculas y átomos de muestras que en condiciones normales no son gases. No existe una

fuentes de ionización únicas para MS de tipo universal, sino que va a depender de la naturaleza de las muestras (Rubinson & Rubinson, 2001). Los dos métodos más comunes para la generación de iones son la ionización por electrospray (ESI) y la ionización por impacto de electrones (EI). En cuanto a ESI, este método se aplica ampliamente debido a su compatibilidad con HPLC. Esta ionización se lleva a cabo bajo presión atmosférica y lo que ocurre es que el eluyente proveniente del sistema de HPLC pasa a través de una aguja de cuarzo o metal al que se le aplica un alto potencial eléctrico. Si se aplica un potencial positivo, entonces los iones negativos en el eluyente se eliminan al ser atraídos por la aguja, dejando así gotas de solvente cargadas positivamente. Luego bajo la influencia de un flujo de gas nitrógeno, las gotas se evaporan y a medida que esto ocurre, se rompen debido a la repulsión interna de las cargas. Al final, se producen iones en fase gaseosa que son atraídos hacia el espectrómetro de masas mediante una carga opuesta aplicada a un capilar calentado que permite una purga lenta de la atmósfera hacia el espectrómetro de masas, que tiene que funcionar a alto vacío. Para mantener un alto vacío en el instrumento, se utilizan dos etapas de bombeo, una etapa intermedia inmediatamente después del capilar calentado y una etapa de alto vacío en la etapa de separación de iones (Watson, 2012).

Para un rendimiento adecuado las presiones de funcionamiento típicas en la región del analizador de masas de un MS deben estar en el rango de 10^{-8} a 10^{-10} atm (10^{-3} a 10^{-5} Pa). De lo contrario si esto no se logra, los

iones colisionarán con moléculas o átomos neutros y se expulsarán antes de llegar al detector (Ahuja & Dong, 2005).

Los analizadores de masas más utilizados incluyen magnéticos, electrostáticos, cuadrupolos (cuadrupolo simple o triple), trampa de iones cuadrupolo, resonancia de ciclotrón de iones de transformada de fourier y tiempo de vuelo. En cuanto a los analizadores de masa cuadrupolo, estos actúan como filtros de masa para que solo los iones con una relación m/z particular puedan registrar una señal en un momento determinado. Un MS de triple cuadrupolo permite obtener un espectro de masas de iones fragmentos resultante de la descomposición de un ion principal seleccionado en el primer cuadrupolo. Los analizadores cuadrupolo constan de cuatro barras con secciones de superficie circulares o, idealmente, hiperbólicas. Las cuatro barras están dispuestas exactamente paralelas e igualmente espaciadas alrededor de un eje central (Ahuja & Dong, 2005).

Existe la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) en donde una vez ionizada la muestra en la fuente de ionización, se selecciona por MS1 una masa determinada y se hace pasar a través de una apertura hasta la cámara de colisiones. En dicha cámara, los iones colisionan con los átomos del gas que se introducen intencionalmente para romper los iones en fragmentos neutros y en otros iones. Los iones que salen de la cámara de colisiones son analizados por el segundo espectrómetro de masas, MS2 (Rubinson & Rubinson, 2001).

Una de las ventajas de la espectrometría de masas es que proporciona un método altamente específico para determinar o confirmar la identidad o estructura de diversos compuestos tales como medicamentos y materias primas utilizadas en su fabricación. Además, el acoplamiento de un espectrómetro de masas a un HPLC aporta una nueva dimensión a los estudios de especificidad. Debido a que un espectrómetro de masas separa los fragmentos por sus respectivas relaciones de m/z , cualquier diferencia en los valores m/z entre las impurezas y el principio activo permitirá una detección inequívoca independientemente de las similitudes en sus espectros UV (Ahuja & Dong, 2005; Watson, 2012).

1.4. Validación de un método analítico

Por medio de estudios de laboratorio, se realiza la validación de un procedimiento analítico el cual es un proceso que establece que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. Algunas de las características de desempeño analítico que deben considerarse para la validación se detallan a continuación (*Farmacopea de los Estados Unidos de América / Formulario Nacional (USP 40 / FN 35)*, 2017; *ICH Harmonized Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*, 1994):

1.4.1. Linealidad

Dentro de un intervalo determinado, es la capacidad que posee el método analítico de brindar resultados directamente proporcionales a la

concentración del analito en la muestra. Para esto se recomienda usar al menos 5 concentraciones del analito, luego se determina la recta de regresión lineal entre la respuesta y la concentración (nube de puntos) y se obtiene la ecuación de la recta.

1.4.2. Intervalo

Es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito (incluyendo estos niveles) en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el método analítico desarrollado. Para la valoración de un fármaco se recomienda que se consideren los intervalos comprendidos entre el 80% a 120% de la concentración objetivo.

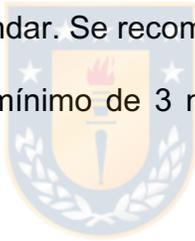


1.4.3. Selectividad

Es la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulte previsible, como: productos de degradación (PD), impurezas, excipientes, sustancias endógenas y metabolitos. Para su determinación se recomienda agregar niveles apropiados de los compuestos que potencialmente pudieran interferir en la determinación del analito, afectando su separación, luego se debe calcular la resolución ($R_s \geq 1.5$) si corresponde a un método cromatográfico.

1.4.4. Exactitud

Es el grado de concordancia entre el valor que se acepta ya sea como un valor verdadero convencional o un valor de referencia aceptado y el valor encontrado establecido en todo el intervalo. Para determinar la exactitud se puede realizar mediante la determinación de la recuperación del analito y para esto se recomienda agregar concentraciones conocidas de estándar del analito a una matriz blanco a diferentes niveles de concentración, para luego calcular el porcentaje de recuperación. Otras maneras para determinarla es la comparación con un estándar de referencia, la comparación con otro método que posee exactitud establecida y la adición estándar. Se recomienda utilizar un mínimo de 9 determinaciones, sobre un mínimo de 3 niveles de concentración que abarque todo el intervalo.



1.4.5. Precisión

Es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea. Se expresa en términos de la desviación estándar (DS) o de la desviación estándar relativa (RSD). Para la determinación de la precisión se recomienda realizar 6 muestras en el 100% de la concentración objetivo. Otras formas también es utilizar un mínimo de 9 mediciones por triplicado, analizando 3 niveles de concentración.

La precisión puede considerarse en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

✓ Repetibilidad

Es la precisión del método bajo las mismas condiciones de operación (mismo analista, mismo equipamiento) en un corto periodo de tiempo.

✓ Precisión intermedia

Expresa variaciones dentro de un laboratorio. Puede realizarse en diferentes días (3 - 5 días), diferentes analistas o diferente equipamiento. Involucra múltiples preparaciones de la misma muestra.



✓ Reproducibilidad

Se determina por la evaluación de muestras homogéneas en diferentes laboratorios (estudios interlaboratorios).

1.4.6. Límite de detección (LOD)

Es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse como un valor exacto, en las condiciones experimentales establecidas. Para la determinación del LOD (Ecuación 1-1) se puede utilizar el método basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente:

$$\text{LOD} = 3.3 * \left(\frac{\delta}{S}\right)$$

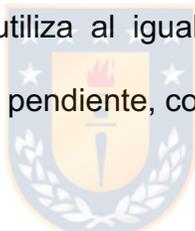
Ecuación 1-1. Límite de detección.

en donde **δ**: desviación estándar de la respuesta y **S**: pendiente de la curva de calibración.

1.4.7. Límite de cuantificación (LOQ)

Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas.

Para su determinación se utiliza al igual que el LOD, la desviación estándar de la respuesta y la pendiente, con la siguiente Ecuación 1-2:


$$\text{LOQ} = 10 * \left(\frac{\delta}{S}\right)$$

Ecuación 1-2. Límite de cuantificación.

en donde **δ**: desviación estándar de la respuesta y **S**: pendiente de la curva de calibración.

1.4.8. Robustez

Se refiere a la capacidad del método para no verse afectado por pequeñas variaciones, aunque deliberadas en los parámetros del mismo, proporcionando así una indicación de su aptitud durante condiciones

normales de uso. La robustez se puede determinar durante el desarrollo del método a través de cambios en las proporciones de los componentes de la FM, temperatura y velocidad de flujo, y comparando las resoluciones u otro parámetro para garantizar validez del procedimiento.

1.5. Estabilidad de los medicamentos

La estabilidad de un medicamento se define como la resistencia del mismo a varias reacciones químicas, físicas y microbiológicas que pueden afectar las propiedades originales de este; durante su transporte, almacenamiento y uso (vida útil) (*Farmacopea de los Estados Unidos de América / Formulario Nacional (USP 40 / FN 35)*, 2017; Lund, 1994).

Técnicamente, la estabilidad se expresa en términos cuantitativos como la vida útil, que es el tiempo durante el cual se predice que el medicamento seguirá siendo apto para su uso previsto en condiciones específicas de almacenamiento. Estas condiciones se logran manteniendo dicho producto en un envase cerrado desde su fabricación hasta que la potencia o contenido del constituyente activo original se reduzca en un 10% ($t_{10\%}$). Cabe destacar que se reconoce que el nivel de potencia mínimo aceptable para la mayoría de los medicamentos es del 90% de la potencia rotulada. Por lo tanto, la fecha de expiración se definiría como el tiempo en que el preparado habrá de mantenerse estable si se almacena en las condiciones recomendadas (vida útil) (Carstensen & Rhodes, 2000; Connors, Amidon, & Stella, 1986; Gennaro, 1987; Sinko, 2011).

Al ocurrir una degradación química del principio activo, podría provocar pérdida de la potencia o en algunos casos los PD que se generen pueden ser tóxicos, por tal motivo es importante evaluar la estabilidad de un fármaco, ya que una disminución del efecto terapéutico o cambios en sus propiedades toxicológicas afectarían la eficacia y calidad del producto farmacéutico y a su vez conllevaría a un producto inseguro para el paciente (Lund, 1994).

Dentro de una formulación, cada componente (principio activo y excipientes) puede afectar la estabilidad del producto farmacéutico. Existen diversas causas que pueden afectar dicha estabilidad; los factores intrínsecos como la estructura química del compuesto y las condiciones ambientales como la temperatura, luz, humedad, oxígeno y dióxido de carbono. Otros factores asociados a las formas farmacéuticas que influyen en la estabilidad de los fármacos son el tamaño de la partícula (especialmente en emulsiones y suspensiones), el pH, la composición del vehículo (el porcentaje de agua “libre” y la polaridad total), la compatibilidad de aniones y cationes, la fuerza iónica de la solución, el envase primario, los aditivos químicos específicos, y la unión molecular y la difusión de fármacos y excipientes y el proceso de fabricación (*Farmacopea de los Estados Unidos de América / Formulario Nacional (USP 40 / FN 35)*, 2017; Vila, 2001).

Los fármacos poseen diversas estructuras químicas, las cuales son susceptibles a sufrir diferentes vías de degradación que conllevaría a la degradación de los principios activos lo cual conduce a una pérdida de

su contenido y a la formación de PD. Normalmente las reacciones que se pueden producir son: hidrólisis, oxidación, fotólisis, deshidratación, isomerización, polimerización, descarboxilación, absorción de dióxido de carbono y las reacciones inducidas por la radiación. De todas estas, las reacciones más comunes son la hidrólisis, oxidación y fotólisis. Aquellos compuestos que presentan grupos funcionales como ésteres y amidas son más propensos a reaccionar con una molécula de agua y por lo tanto ocurriría una hidrólisis. La oxidación ocurre en grupos funcionales como fenoles, dienos conjugados, anillos aromáticos heterocíclicos, derivados nitroso y nitrito y aldehídos. Esta es catalizada por valores de pH superiores al óptimo, por iones de metales pesados polivalentes y por exposición a oxígeno y radiación UV. Generalmente, los productos de oxidación carecen de actividad terapéutica. En cuanto a las reacciones de fotodegradación sus mecanismos generalmente son muy complejos y suelen ir acompañados de oxidación en presencia de oxígeno. Con respecto a la temperatura, este es un factor que afecta la estabilidad de un fármaco, porque la mayoría de las reacciones se producen más rápido a temperaturas elevadas que a temperaturas más bajas. Cabe resaltar que la velocidad de una reacción química aumenta exponencialmente por cada 10°C que aumente la temperatura (Aulton, 2004; *Farmacopea de los Estados Unidos de América / Formulario Nacional (USP 40 / FN 35)*, 2017; Gennaro, 1987; Yoshioka & Stella, 2002).

El propósito de las pruebas de estabilidad es brindar evidencia sobre cómo la calidad de un principio activo o producto farmacéutico varía con

el tiempo bajo la influencia de factores intrínsecos del medicamento o de una variedad de factores ambientales y a su vez establecer un período o la vida útil del medicamento y determinar las condiciones óptimas de almacenamiento (*ICH Harmonized Tripartite Guideline, Stability testing of new drug substances and products, Q1A (R2), 2003*).

Según la *Conferencia Internacional de Armonización (ICH)*, los estudios de estabilidad para los principios activos y las formas farmacéuticas se realizan por medio de 3 test: test bajo condiciones forzadas de degradación, test de estabilidad acelerada y test de larga duración (Baertschi, Alsante, & Reed, 2011; *ICH Harmonized Tripartite Guideline, Stability testing of new drug substances and products, Q1A (R2), 2003*).

Los test de estabilidad bajo condiciones forzadas de degradación, se llevan a cabo con el propósito de anticipar el comportamiento de un principio activo cuando se utiliza como un producto farmacéutico. Normalmente este estudio ocurre en condiciones más severas que las utilizadas para la prueba de estabilidad acelerada. Durante el proceso de desarrollo del fármaco, dicho test se utiliza para predecir problemas de estabilidad con el objetivo de identificar los PD, que a su vez pueden ayudar a establecer las vías de degradación y la estabilidad intrínseca de la molécula y además son útiles en el desarrollo de métodos analíticos indicadores de estabilidad (Baertschi et al., 2011; *ICH Harmonized Tripartite Guideline, Stability testing of new drug substances and products, Q1A (R2), 2003*).

La naturaleza del test de degradación forzada dependerá del principio activo y del tipo de producto farmacéutico involucrado. Es probable que estas pruebas se realicen en un solo lote de la sustancia farmacéutica. En general el test debe incluir el efecto de la temperatura (e.j. 50°C, 60°C), humedad relativa (e.j. 75% H.R), oxidación (e.j. 0.3 - 3% H₂O₂), fotólisis (UV-VIS), hidrólisis (e.j. HCl 0.1 N, NaOH 0.1 N, agua). Generalmente el objetivo es facilitar aproximadamente entre un 5 - 20% de degradación de la muestra bajo cualquier condición dada, a fin de evitar cualquier reacción secundaria (Alsante et al., 2007; Baertschi et al., 2011; *ICH Harmonized Tripartite Guideline, Stability testing of new drug substances and products, Q1A (R2)*, 2003; Singh et al., 2013).

Las guías internacionales para estudios de estabilidad a largo plazo especifican $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y $60 \pm 5\%$ de humedad relativa. Los estudios acelerados se especifican a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ y a $75 \pm 5\%$ de humedad relativa. Los estudios acelerados permiten la interpretación de datos e información en las condiciones de almacenamiento además de las variaciones permitidas por la temperatura ambiente controlada (*Farmacopea de los Estados Unidos de América / Formulario Nacional (USP 40 / FN 35)*, 2017). Además, estos estudios proporcionan un pronóstico temprano, rápido y sencillo de la estabilidad del medicamento (Vila, 2001). Estos estudios son realizados por las industrias farmacéuticas y se llevan a cabo en la forma farmacéutica y envase final con el objetivo de poder determinar la fecha de vencimiento del producto.

Con la finalidad de asegurar la estabilidad de un producto farmacéutico es necesario utilizar un método analítico apropiado. Estos métodos deben ser indicadores de estabilidad, lo que quiere decir que el método debe ser capaz de diferenciar entre el compuesto intacto y sus PD, para poder medir exactamente el contenido del compuesto activo (Baertschi et al., 2011).

1.5.1. Métodos indicadores de estabilidad

Un método indicador de estabilidad se define como un método analítico que se basa en las propiedades estructurales, químicas o biológicas pertenecientes a cada ingrediente activo de un medicamento y que distinguirá cada ingrediente activo de sus PD; para que el contenido del ingrediente activo pueda medirse con precisión. Este procedimiento analítico debe ser lo suficientemente sensible para detectar y/o cuantificar uno o más PD (Alsante et al., 2007; Aubry et al., 2009; Carstensen & Rhodes, 2000).

Existen diversas opciones de técnicas de separación cromatográficas como cromatografía quiral, cromatografía en capa fina, cromatografía de gases y electroforesis capilar que son utilizadas para llevar a cabo un método indicador de estabilidad; pero la técnica más utilizada para el desarrollo y validación de un método indicador de estabilidad es la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) de fase reversa (Carstensen & Rhodes, 2000).

A pesar de que no existe una estrategia universal para el desarrollo de un método indicador de estabilidad, existen tres requisitos que son fundamentales: procurar tener suficiente muestra para demostrar la selectividad, seleccionar un método y optimizar su selectividad y sensibilidad y finalmente validar el método propuesto. De manera más detallada durante el desarrollo de un método indicador de estabilidad para que cumpla con los requerimientos regulatorios se debe realizar lo siguiente:

- ✓ Un estudio completo de la estructura del fármaco para evaluar las posibles rutas de descomposición.
- ✓ Recopilar toda la información referente a las propiedades fisicoquímicas del fármaco (pKa, logP, solubilidad, coeficiente de absorción y λ máxima).
- ✓ Estudios de estrés (degradación forzada).
- ✓ Ensayos preliminares de separación a muestras degradadas.
- ✓ Desarrollar y optimizar el método.
- ✓ Identificar y caracterizar los PD.
- ✓ Finalmente, validar el método indicador de estabilidad (Bakshi & Singh, 2002; Maggio, Vignaduzzo, & Kaufman, 2013).

Es importante destacar que al desarrollar un método indicador de estabilidad se puede obtener a través de este método un monitoreo de

los cambios en las propiedades químicas del medicamento a través del tiempo, por lo cual se hace necesario la ejecución de estudios de degradación forzada (bajo estrés o acelerados) en el medicamento y sus PD, dichos estudios son convenientes porque son una alternativa, ya que a través de ellos se obtienen muestras que contienen tanto al analito como a sus PD. A través de los métodos indicadores de estabilidad se puede obtener información valiosa que incluyen las vías de degradación del fármaco y sus PD, la estabilidad intrínseca en estado sólido y solución y las susceptibilidades que ocurren bajo degradaciones hidrolíticas, oxidativas, termolíticas y fotolíticas (Blessy, Patel, Prajapati, & Agrawal, 2014; Maggio et al., 2013).

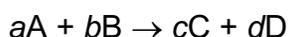


1.5.2. Cinética de degradación

Las reacciones de degradación química de los productos farmacéuticos siguen los patrones bien establecidos de la cinética química. La cinética química estudia en forma cuantitativa la velocidad de las reacciones químicas. Al aplicar la teoría de la cinética química se podrá calcular la velocidad de degradación de un medicamento, desde los resultados de estudios de estabilidad desarrollados bajo condiciones específicas. Esta teoría se basa en la ley de acción de masas, la cual expresa que la velocidad de una reacción es proporcional a la concentración molar de los reactantes (Lund, 1994).

Al momento de comenzar una reacción química, las concentraciones de los reactantes y productos cambian con el tiempo hasta que la reacción

se complete o alcance el equilibrio. La concentración de los reactantes disminuye, mientras que la de los productos aumenta con el tiempo. Por lo tanto, la velocidad de una reacción ($-d [D] / dt$) puede ser expresada por el cambio decreciente en la concentración de un reactante o en el cambio creciente en la concentración de un producto con respecto al tiempo. Una reacción química (Ecuación 1-3) se puede representar como:



Ecuación 1-3. Reacción química.

en donde a , b , c y d son los coeficientes estequiométricos que indican la relación molar de los reactantes y productos de la reacción. En general, la velocidad de una reacción química se puede expresar como (Ecuación 1-4) (Zhou, Porter, & Zhang, 2017):

$$\text{Velocidad} = k [A]^{\alpha} [B]^{\beta}$$

Ecuación 1-4. Velocidad de una reacción química.

en donde α y β son el orden de reacción con respecto a A y B; k es la constante de velocidad. El orden de la reacción general está dado por: $n = \alpha + \beta$. Debido a que las concentraciones de A y B disminuyen a medida que la reacción progresa, la velocidad de la reacción también disminuirá a través del tiempo.

Normalmente la velocidad de degradación se expresa en términos de tiempo. Los más comunes son $t_{1/2}$ o $t_{50\%}$, tiempo en el cual la cantidad de principio activo se ha reducido a la mitad, y $t_{90\%}$, que es el tiempo necesario para un 10% de degradación (Vila, 2001).

A continuación, se describen los órdenes de reacción:

✓ Reacciones de orden cero

En las reacciones de orden cero, la velocidad de la reacción es constante y no depende de la concentración de los reactivos.

La velocidad de la reacción se expresa como (Ecuación 1-5):

$$\text{Velocidad} = -\frac{d[A]}{dt} = k [A]^0 = k$$

Ecuación 1-5. Velocidad de reacción de orden cero.

en donde A es el reactivo y k es la constante de velocidad de orden cero. En este caso la disminución en la concentración de A es lineal con el tiempo, tal como se expresa: $[A]_t = [A]_0 - kt$; $[A]_t$ es la concentración de A en el tiempo t, mientras que $[A]_0$ es la concentración en el tiempo cero o la concentración inicial.

Al construir el gráfico de la concentración de los reactivos (normalmente se grafica el porcentaje residual de la concentración) frente al tiempo, se obtiene una línea recta cuya pendiente corresponde $-k$, cuyas dimensiones están dadas por $\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$ (Figura 1-6) (Lund, 1994; Zhou et al., 2017).

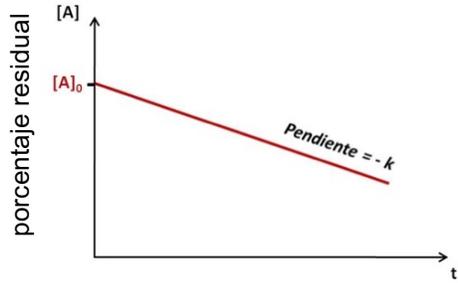


Figura 1-6. Gráfico de cinética de orden cero.

✓ Reacciones de primer orden

La velocidad de una reacción de primer orden es proporcional a la concentración de uno de los reactivos. La velocidad de la reacción se expresa como (Ecuación 1-6):

$$\text{Velocidad} = -\frac{d[A]}{dt} = k [A]$$

Ecuación 1-6. Velocidad de reacción de primer orden.

La constante de velocidad está dada por (Ecuación 1-7):

$$k = \frac{2.303}{t} \log \frac{a}{(a-x)}$$

Ecuación 1-7. Constante de velocidad de primer orden.

en donde **a** es la concentración inicial (tiempo 0) y **x** es la disminución de la concentración a tiempo *t*.

Al construir el gráfico del logaritmo de la concentración de los reactivos (normalmente se grafica el logaritmo del porcentaje residual de la concentración) frente al tiempo, se obtiene una línea recta cuya pendiente corresponde $-k/2.303$, cuyas dimensiones están dadas por s^{-1} (Figura 1-7) (Lund, 1994; Zhou et al., 2017).

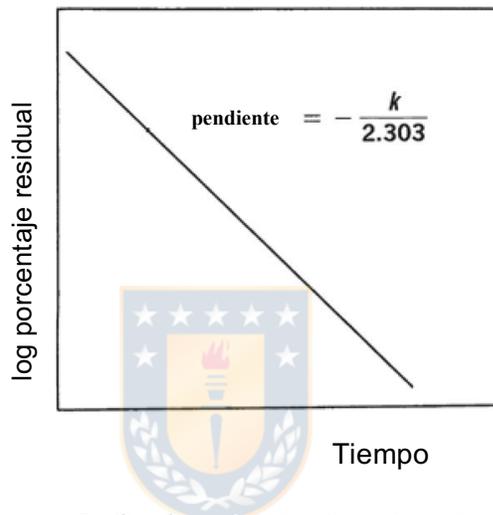


Figura 1-7. Gráfico de cinética de primer orden.

✓ Reacciones de segundo orden

Para las reacciones de segundo orden, en donde dos reactivos están involucrados la velocidad es proporcional a la concentración de ambos. La velocidad de la reacción se expresa como (Ecuación 1-8) (Lund, 1994; Zhou et al., 2017):

$$\text{Velocidad} = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = k [A] [B]$$

Ecuación 1-8. Velocidad de reacción de segundo cero.

✓ Reacciones de aparente primer orden

Estas reacciones se aplican cuando la degradación muestra una cinética de primer orden a pesar de que dos o más reactivos estén involucrados en la reacción. Esto ocurre, por ejemplo, en el caso de la hidrólisis de un medicamento, el cual se esperaría que la reacción tuviera una cinética de segundo orden, ya que la velocidad de la reacción depende de la concentración del medicamento y del agua. Sin embargo, como en la mayoría de las soluciones, el agua está presente en gran exceso (se mantiene constante); por lo tanto, su concentración permanece constante en el curso de la reacción y al momento de obtener el valor de la velocidad de la reacción, esta solo va a depender de la concentración de medicamento (Lund, 1994; Zhou et al., 2017).

✓ Reacciones complejas

Son reacciones en donde se involucra más de una etapa. Dentro de estas reacciones se incluye las reversibles, paralelas y consecutivas (Lund, 1994; Sinko, 2011; Zhou et al., 2017).

1.6. Métodos analíticos para la determinación de dapagliflozina
propanodiol monohidrato

De acuerdo a la revisión de la literatura, no hay métodos oficiales estandarizados e informados disponibles tanto para la determinación de

DAPA ni para DAPA propanodiol monohidrato, como materia prima o en forma farmacéutica. Existen métodos indicadores de estabilidad con diferentes técnicas de separación y detección para la determinación de DAPA, ya sea en matriz biológica o en forma de dosificación farmacéutica, pero en la mayoría de estos estudios no realizaron pruebas de degradación forzada para identificar los PD que estuvieran relacionados a DAPA y además, estas no se realizaron con el tiempo ni la intensidad suficiente ni tampoco se ensayaron algunos parámetros como hidrólisis, temperatura, humedad relativa entre otros.

Se han reportado diversos estudios que utilizan un método analítico por HPLC-MS/MS para la cuantificación simultánea de los inhibidores de SGLT2 en matriz biológica (Dias et al., 2019; Shah, Shrivastav, Sharma, & Yadav, 2019; van der Aart-van der Beek, Mireille A. Wessels, Heerspink, & Touw, 2020). Dentro de los estudios realizados en matriz biológica, se encuentra un artículo en donde se utiliza la microextracción líquido-líquido dispersivo asistido por ultrasonido para la determinación de tres gliflozinas (empagliflozina, canagliflozina y DAPA) en plasma humano por HPLC-DAD (Mabrouk, Soliman, El-Agizy, & Mansour, 2020). Otro estudio se realiza bajo un método espectrofluorimétrico en plasma humano; en donde es necesario derivatizar y formar un compuesto fluorescente que sea soluble en líquidos orgánicos (Omar, Ahmed, Abdel Hamid, & Batakoushy, 2019).

Existen pocos estudios para la detección de DAPA en muestras biológicas utilizando LC-MS/MS. Los métodos LC-MS/MS existentes se

basan principalmente en ESI positivo con monitoreo de reacción múltiple (MRM) (El-Zaher, Hashem, Elkady, & Allam, 2019; Goday, Shaik, & Avula, 2018; Obermeier et al., 2010) y modos de monitoreo de reacción seleccionadas (SRM). También se informan los estudios en donde involucran ESI negativo (Aubry et al., 2010; Ji et al., 2015; Shah, Shrivastav, Shah, & George, 2019).

Existen una cantidad limitada de métodos analíticos que no son indicadores de estabilidad para la determinación de DAPA como materia prima, en forma farmacéutica (Kalyan & Parle, 2019; Mante, Hemke, & Umekar, 2018) o en combinación con MET (Hadi & P, 2017; Shyamala, Nidhi b, Pooja, & Sharma, 2015) o saxagliptina (Aswini, Eswarudu, & Babu, 2018; Sivagami, Padmaja, & Babu, 2018).

Se han reportado métodos indicadores de estabilidad para determinar DAPA como materia prima o en forma farmacéutica mediante HPLC con detector UV (Illendula et al., 2018) y con detector de arreglo de diodos (D. C. J. Patel, 2017; Verma, Patel, & Patel, 2017). También existen estudios realizados en formas farmacéuticas que contienen MET (T. Deepan, Rao, & Dhanaraju, 2017; Prameela, Veni, Narayana, & Babu, 2017; Yunoos & Sankar, 2015) o saxagliptina (Thiyagarajan Deepan & Dhanaraju, 2018; A. B. Patel, Patel, & Shah, 2017) junto a DAPA.

Existen estudios que han realizado un desarrollo y validación de un método indicador de estabilidad por HPLC con DAD, pero al momento de realizar sus pruebas de degradación forzada, la temperatura utilizada para la prueba de termólisis a calor seco es de 105°C, siendo mayor que

el punto de fusión de DAPA (74 - 78°C), lo cual podría provocar que el medicamento pueda sufrir una descomposición durante la realización del ensayo. Además, dichos estudios no presentan los cromatogramas que indique los PD de DAPA (Thiyagarajan Deepan & Dhanaraju, 2018; T. Deepan et al., 2017; Kommineni, K.P.R.Chowdary, & S.V.U.M.Prasad, 2017; Sanagapati, K, G, & S, 2014). Existen estudios en donde la muestra analizada contiene más proporción de diluyente que la FM utilizada, lo cual podría conllevar a ensanchamientos de la base del pico cromatográfico (Verma et al., 2017). Otros autores dentro de su estudio de estabilidad no evaluaron la hidrólisis neutra como una condición imprescindible en un estudio de degradación (Illendula et al., 2018; D. C. J. Patel, 2017; Prameela et al., 2017). Cabe destacar que hay estudios en los cuales se realiza la degradación forzada encontrando un porcentaje de degradación mayor del 5 - 20%, lo cual indicaría que los PD formados pueden no ser primarios, con lo cual no son relevantes en condiciones normales de fabricación ni razonable para una validación de un ensayo cromatográfico (Game & Bopudi, 2018). Otro estudio indica haber realizado un análisis de degradación forzada, pero no presentan los porcentajes de degradación de sus respectivas pruebas (Ameeduzzafar et al., 2019).

Se ha informado de un método de ultra-alta resolución (UHPLC) con detector UV para la determinación simultánea de DAPA y MET. En dicho artículo se realiza un estudio de degradación forzada en donde el PD (hidroxiacetaldehído) proveniente de la condición básica se identificó por

LC-MS/MS. Cabe destacar que en dicho estudio se somete a DAPA a varias condiciones de estrés, pero no se realiza bajo la condición de hidrólisis neutra. Además, cuando se presentan los datos del porcentaje de degradación para cada condición estos son mayores de 20%. Este estudio presenta una evaluación de la cinética de degradación del medicamento, en donde sigue una cinética de pseudo primer orden bajo la condición ácida y básica. También presentan valores bajo la condición de oxidación pero no establecen cuál es la cinética que se cumple (Zaghary, Mowaka, & Hendy, 2019). Existe otro estudio en donde utilizan la misma técnica para la determinación simultánea de sitagliptina y DAPA en formulaciones de nano-emulsiones a base de lípidos (lipid-based self nanoemulsifying) (Kazi, Alqahtani, Alsaadi, Alkholief, & Alanazi, 2019). Otro estudio realizó una comparación entre el método por HPLC o por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC), para la determinación simultánea de DAPA y MET como materia prima o como una formulación farmacéutica. De acuerdo a dicho estudio, por la técnica HPTLC se obtiene mejor sensibilidad en comparación a HPLC, a diferencia de la precisión y exactitud en donde por la técnica de HPLC se logran mejores resultados. Cabe destacar que es uno de los primeros artículos reportados que utiliza la técnica por HPTLC para la determinación simultánea entre DAPA y MET (Nasser, Salama, Mostafa, & Elgawish, 2018).

También se informó sobre un método de cromatografía líquida para la determinación de canagliflozina, DAPA, empagliflozina y MET en

presencia de 1- cianoguanidina que es una impureza de la síntesis de la MET. Al final se logra el objetivo de obtener un método desarrollado y validado a través de HPLC-UV, el cual se describe como un reto debido a las diferencias entre la concentración de DAPA y empagliflozina con respecto a la MET; además, la separación de la MET con la cianoguanidina el cual no es fácil de separar simultáneamente en una sola determinación por HPLC (Hassib, Taha, Elkady, & Barakat, 2019).

En otro artículo, se presenta un estudio indicador de estabilidad para una gliflozina similar a DAPA que es la canagliflozina; en donde se encontraron dos PD bajo la degradación por oxidación. Conjuntamente, establecen que se forman dos pseudos PD bajo la condición de hidrólisis ácida cuando la canagliflozina reacciona con co-solventes como acetonitrilo y metanol. Para la caracterización de dichos PD se utilizó la técnica de LC/ESI-MS/MS y la toxicidad de los mismos se evaluó mediante métodos in-silico (Baira et al., 2018). Otro estudio reporta seis impurezas de la canagliflozina, tres provenientes de su fabricación, dos de condiciones de degradación y uno tanto de la síntesis como de degradación. Las tres impurezas debidas a condiciones de degradación se presentan en un medio con H₂O₂. De igual manera se realizó la caracterización de dichas impurezas por LC/ESI-MS/MS (Pachore et al., 2017).

Otro artículo se refiere a la empagliflozina, en el cual se realiza un completo estudio de estabilidad; utilizando la técnica UHPLC-MS, los autores proponen los diferentes mecanismos de fragmentación de 12 PD

causados en condiciones ácidas (8), básicas (2) y oxidativas (2) (Niguram & Kate, 2019). Utilizando la técnica UPLC/DAD, se establece una metodología para la determinación simultánea de empagliflozina y 3 sustancias relacionadas a la misma en plasma humano (Mabrouk, Soliman, El-Agizy, & Mansour, 2019). Al comparar estas 3 moléculas con el artículo anteriormente citado, no guardan relación dichos compuestos con los 12 PD mencionados.

Adicionalmente, se reporta otro estudio de la empagliflozina junto con la MET, cuya metodología es validada por LC-MS/MS. Dicho estudio no es un método indicador de estabilidad (Ayoub & Mowaka, 2017).

Durante la evaluación de la farmacocinética de la empagliflozina en voluntarios egipcios sanos, se utilizó el análisis LC-MS/MS para cuantificar dicho medicamento en plasma humano utilizando DAPA como estándar interno (SI), dando como resultado que no existe diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de estudio con otros grupos étnicos y por tal motivo no se sugiere un ajuste de dosis al administrar 25 mg de empagliflozina a la población en estudio (Ayoub et al., 2017).

Otro estudio indica que los inhibidores de SGLT2 deuterados en sitios susceptibles al metabolismo oxidativo tienen una vida media ($t_{1/2}$) ligeramente más largas, en ratas. Además, este estudio propone que sobre la estructura de DAPA, ocurre una transformación metabólica oxidativa en tres sitios distintos; de los cuales 2 fueron comprobados por otros autores. DAPA eventualmente podría convertirse en un derivado de

la metino-quinona a través de estos productos metabólicos, lo cual conllevaría a posibles eventos adversos in vivo (Xu et al., 2014).

En resumen, no se ha realizado a la fecha un estudio de estabilidad químico completo de DAPA, por lo cual, el objetivo del desarrollo de este trabajo es ampliar la información sobre la estabilidad química de DAPA. Para esto se realizó un estudio de estabilidad completo, bajo diferentes factores de estrés que puedan producir degradación en DAPA con formación de productos de degradación primarios o relevantes de importancia eventualmente clínica y farmacológica, cuyo porcentaje no debe ser mayor de un 20% y así poder garantizar que no se producen productos secundarios que no son representativos en una degradación en condiciones reales. Para este trabajo se utilizó un método HPLC con detector DAD, con una columna de tecnología “fused-core”, para poder optimizar el tiempo de análisis y obtener todos los parámetros cromatográficos de acuerdo a las guías de la ICH y con esto poder obtener un método indicador de estabilidad para DAPA.

2. HIPÓTESIS

- ✓ El desarrollo de las pruebas de degradación forzada de DAPA proporcionará el perfil completo de estabilidad química de este compuesto.
- ✓ El desarrollo de un método cromatográfico indicador de estabilidad para la determinación de DAPA proporcionará nuevas herramientas analíticas para evaluar la estabilidad química de este compuesto.



3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- ✓ Evaluar la estabilidad química de DAPA, como principio activo, bajo una variedad de condiciones de degradación, mediante un método cromatográfico indicador de estabilidad.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Desarrollar, optimizar y validar un método indicador de estabilidad por cromatografía líquida (LC) con detección DAD, para la determinación de DAPA.
- ✓ Determinar la estabilidad química de DAPA como principio activo frente a una variedad de condiciones de estrés (hidrólisis, temperatura, humedad, oxidación y fotólisis) por LC / DAD.
- ✓ Evaluar la cinética de degradación de DAPA en las condiciones de mayor degradación.
- ✓ Desarrollar un método indicador de estabilidad por LC con detector ELSD, para la determinación de DAPA y cualquier producto de degradación no detectado por el detector DAD.
- ✓ Realizar una identificación preliminar de los productos de degradación mediante LC-MS/MS.
- ✓ Evaluar la potencia de comprimidos comerciales de DAPA del mercado chileno por LC / DAD.

4. MATERIALES

4.1. Sistema cromatográfico

Sistema cromatográfico A:

- ✓ Cromatógrafo de líquidos Perkin Elmer® serie Flexar N3896 (Norwalk, CT, USA).
- ✓ Computador Dell Optiplex 990.
- ✓ Detector ultravioleta con arreglo de diodos Perkin Elmer® N3896.
- ✓ Software Chromera® *Chromatography Data System*, Perkin Elmer Inc.

Sistema cromatográfico B:

- ✓ Sistema HPLC YL9100® (Young Lin Instrument, Anyang, Korea).
- ✓ Degasificador por vacío YL9101®.
- ✓ Bomba cuaternaria de entrega de solvente YL9110®.
- ✓ Compartimiento de columna YL9130®.
- ✓ Válvula Rheodyne® 7725i (Idex Health and Science, Oak Harbor, USA) con bucle de 20 µL (Supelco Inc., Bellefonte, USA).
- ✓ Detector SEDEX® 85 LT-ELSD (Low Temperature Evaporative Light Scattering Detector), (Sedere S.A., Alfortville Cedex, Francia).

- ✓ Software YL-Clarity® chromatography data system, Young Lin instrument, version 3.0.4.444.

Sistema cromatográfico C:

- ✓ Cromatógrafo de líquidos Shimadzu Nexera UHPLC/HPLC (Kyoto, Japón)
- ✓ Bomba cuaternaria de entrega de solvente LC-30AD.
- ✓ Degasificador por vacío DGU-20A5R.
- ✓ Horno Prominence CTO-20AC.
- ✓ Autosampler SIL-30AC
- ✓ Detector UV-visible con arreglo de diodos SPD-M20A acoplado en tándem con un espectrómetro de masas triple cuadrupolo con trampa de iones (QTrap 3200, Applied Biosystems MDS Sciex, CA, USA).
- ✓ Software Class-VP DAD Shimadzu Chromatography data system y Analyst software para el análisis MS/MS (Versión 1.5.2, Shimadzu Co., Kyoto, Japón).

4.2. Equipos de laboratorio

- ✓ Balanza analítica Ohaus Analytical Plus® (Suiza).
- ✓ Balanza analítica Denver Instrument Company® (USA).
- ✓ Baño de ultrasonido Branson® modelo B-1200 E1 (Connecticut, USA).
- ✓ Estufa Binder® (USA).

- ✓ Equipo para filtración al vacío de FM Supelco® (Supelco Inc., Bellefonte, USA) con bomba de vacío Gast® (Benton Harbor, USA).
- ✓ Freezer Whirlpool 260® de temperatura programable (Benton Harbor, USA).
- ✓ Gabinetes de radiación ultravioleta y visible.
- ✓ Laboratorio climatizado y equipado con campana de extracción de gases.
- ✓ Peachímetro Thermo Orion®.
- ✓ Placa calefactora Thermolyne®.
- ✓ Sistema de purificación de agua Simplicity® Merck (Darmstadt, Alemania).
- ✓ Vortex Mixer, modelo VM-1000 (Digisystem Laboratory instruments Inc., Taiwan, China).

4.3. Reactivos, solventes y estándares

- ✓ Agua Bidestilada.
- ✓ Acetonitrilo (ACN) grado HPLC Merck® (Darmstadt, Alemania).
- ✓ Metanol (MeOH) grado HPLC Merck® (Darmstadt, Alemania).
- ✓ Estándar de referencia dapagliflozina propanodiol monohidrato, Pureza 98% (Toronto Research Chemicals, ON, Canadá).
- ✓ Propifenazona materia prima (SI) (Indukern S.A., España).
- ✓ Ácido clorhídrico (HCl) grado p.a. Merck® (Darmstadt, Alemania).

- ✓ Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 30% grado p.a. Merck® (Darmstadt, Alemania).
- ✓ NaOH grado p.a. Merck® (Darmstadt, Alemania).
- ✓ Estándares de pH 4.0 - 7.0 - 10.0 (Hanna Instruments INC, USA).
- ✓ Fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4) Merck® (Darmstadt, Alemania).
- ✓ Cloruro de sodio (NaCl) Merck® (Darmstadt, Alemania).
- ✓ Ácido ortofosfórico (H_3PO_4) grado p.a Merck® (Darmstadt, Alemania).
- ✓ Ácido fórmico (H-COOH) grado p.a Merck® (Darmstadt, Alemania).
- ✓ H_2O grado LC-MS Merck® (Darmstadt, Alemania).

4.4. Material de laboratorio

- ✓ Filtros de membrana Whatman® de 0,45 μm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro (Maidstone, Inglaterra).
- ✓ Micropipetas Brand® (Wertheim, Alemania).
- ✓ Material volumétrico clase A.
- ✓ Microjeringa de 100 μL Perkin Elmer®.
- ✓ Microjeringa de 100 μL Hamilton®.
- ✓ Unidad de filtro accionada por jeringa Millex® (Darmstadt, Germany).

4.5. Material cromatográfico

- ✓ Columna Merck Purospher® STAR RP-18e (125 x 4.0 mm) 5 μ m.
- ✓ Columna Merck Chromolith® HighResolution RP-18 (100 x 4.6 mm).
- ✓ Columna phenomenex KINETEX® “core-shell” C-18 (150 x 4.6 mm) 5 μ m.
- ✓ Columna Supelco Ascentis® Express C-18 (150 x 4.6 mm) 5 μ m. (Supelco, Sigma, Bellefonte, PA, USA).

4.6. Otros

- ✓ Comprimidos comerciales de Forxiga® 10 mg. Dapagliflozina 10 mg.
 - Excipientes de formulación: celulosa microcristalina, lactosa anhidra, crospovidona, dióxido de silicio, estearato de magnesio, alcohol polivinílico, dióxido de titanio, macrogol 3350, talco y óxido de hierro amarillo, c.s.
- ✓ Comprimidos comerciales de Xigduo XR®. Dapagliflozina / Clorhidrato de Metformina 10 mg / 1000 mg. Comprimidos recubiertos de liberación prolongada.
 - Excipientes de formulación: carmelosa sódica, hipromelosa, dióxido de silicio, estearato de magnesio, lactosa anhidra, crospovidona, celulosa microcristalina,

alcohol polivinílico parcialmente hidrolizado, dióxido de titanio, macrogol, talco y óxido de hierro amarillo.



5. METODOLOGÍA

5.1. Preparación de estándares

Se prepararon soluciones stock con los estándares de referencia correspondientes, los cuales se dividieron en varias porciones y fueron almacenados a -20°C . Las soluciones stock preparadas fueron las siguientes:

- ✓ Dapagliflozina (DAPA) 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en MeOH.
- ✓ Propifenazona 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en MeOH.

5.2. Método analítico por HPLC-DAD

5.2.1. Desarrollo y optimización de método

Para el desarrollo del método se ocupó el cromatógrafo de líquidos Perkin Elmer® serie Flexar N3896 con un detector UV-VIS con arreglo de diodos Perkin Elmer® serie Flexar N3896. Este equipo fue utilizado para todas las pruebas preliminares, validación del método y evaluación de las formas farmacéuticas disponibles en el mercado.

Durante este desarrollo, se efectuaron distintas pruebas en busca de las condiciones óptimas para la determinación simultánea de DAPA en presencia de sus PD y SI. Para esto se utilizó una solución estándar de DAPA 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ que fue sometida a hidrólisis (ácida, básica y neutra), oxidación, temperatura, humedad relativa y radiación (UV y VIS). Al realizar estas pruebas, el objetivo era identificar en qué condiciones de estrés, la DAPA generaría PD con el fin de poder optimizar el método.

Al tener identificadas dichas condiciones de estrés que producen degradación y luego de que el método analítico se validó, se llevó a cabo la cuantificación de la degradación de la molécula, considerando que esta estuviera dentro del rango entre 5 - 20%.

5.2.2. Selección de FM

Con respecto a la selección de la FM, se utilizaron diversos modificadores orgánicos como ACN, MeOH, en diferentes proporciones tanto solos como en mezcla. También se utilizó tampón fosfato a distintos pH, mezclándolo con los solventes anteriores mencionados. Para cada una de las mezclas se midieron diferentes parámetros cromatográficos como: el tiempo de retención (t_R), la resolución (R_s), el factor de cola (T) y el número de platos teóricos (N). En las pruebas preliminares, se utilizó la muestra de DAPA sin degradarse, con el fin de obtener un adecuado t_R . Luego durante el desarrollo del método se empleó la muestra degradada de DAPA, con el propósito de adecuar el método. A continuación, se presentan los parámetros cromatográficos utilizados:

- ✓ Tiempo de retención

El tiempo de retención (t_R) se define como el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición de la respuesta máxima. Este parámetro se utiliza para la identificación de compuestos. Los t_R cromatográficos son característicos de los compuestos que representan, pero no son únicos. La coincidencia de los t_R de una muestra y de una sustancia de

referencia puede usarse como criterio parcial en la construcción de un perfil de identidad (Guillermina & Quiroga, 2013).

✓ Resolución

La resolución (R_s) se refiere al grado de separación de dos picos adyacentes y se define como la diferencia en el t_R de estos dos picos divididos por el promedio del ancho de los picos. Como el ancho de los picos adyacentes tiende a ser similar, el promedio del ancho de los picos puede ser igual al ancho de uno de los picos (Ecuación 5-1). Un valor de R_s de 0 indica que no existe separación; un valor de R_s de 1.0 indica que se logra una separación parcial, mientras que un R_s igual a 1.5 representa separación de los dos picos. Cabe resaltar que es deseable un valor de R_s mayor a 2.0 porque tal condición indica una separación y cuantificación más robusta (Ahuja & Dong, 2005; Yost, Ettre, & Conlon, 1981).

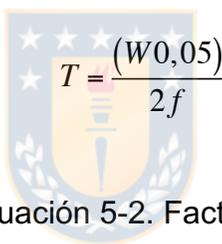
$$R_s = \frac{2 \cdot (t_{rB} - t_{rA})}{W_{bB} + W_{bA}}$$

Ecuación 5-1. Resolución. Para dos picos vecinos (A y B).

en donde t_R corresponde al tiempo de retención y W_b al ancho de base del pico cromatográfico.

✓ Factor de cola

Idealmente lo que se espera en condiciones normales, es que los picos cromatográficos tengan formas de picos gaussianos con una simetría perfecta; pero en realidad, la mayoría de los picos poseen cierta asimetría. El factor de cola (T) es una medida de asimetría del pico. Para determinarlo se utiliza el ancho del pico al 5% de la altura del pico ($W_{0.05}$) (Ecuación 5-2). Para la mayoría de los picos este factor de cola debería estar comprendido entre 0.9 y 1.4, por lo cual un valor de 1.0 indicaría un pico perfectamente simétrico (Ahuja & Dong, 2005).


$$T = \frac{(W_{0,05})}{2f}$$

Ecuación 5-2. Factor de cola.

en donde $W_{0,05}$ corresponde al ancho en el 5% de altura de pico y f es la distancia del máximo del pico hasta el borde inicial del pico al 5% de altura.

✓ Número de platos teóricos

La eficiencia de una columna cromatográfica se mide en función de su número de platos teóricos (N) (Ecuación 5-3).

$$N = 5,54 * \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$

Ecuación 5-3. Número de platos teóricos.

en donde t_R corresponde al tiempo de retención y $W_{1/2}$ corresponde al ancho de pico a media altura.

5.2.3. Modo de uso FM

Inicialmente se utilizó el modo isocrático para evaluar el t_R y la R_s entre DAPA, sus PD y el SI. No fue necesario probar un gradiente de elución, ya que los resultados con el método isocrático fueron adecuados.

5.2.4. Selección del SI

Para seleccionar el SI se evaluaron diversos compuestos con características fisicoquímicas similares a DAPA y durante el desarrollo del método se evaluó el t_R entre DAPA, PD y SI, la forma del pico y la intensidad de la señal. Los compuestos analizados fueron: acetaminofeno, primidona, benzofenona, fenobarbital sódico, lidocaína, papaverina HCl, sildenafil citrato, cloranfenicol, prednisolona, sulfametoxazol, trimetoprim y propifenazona. Todos estos compuestos se ensayaron a una concentración de 100 µg/mL.

5.2.5. Selección de la concentración del SI

Se ensayaron concentraciones similares del SI al de DAPA y se analizaron mediante el método cromatográfico, teniendo como objetivo

encontrar una concentración que resultara en un pico de forma adecuada y con una intensidad de señal cercana al de DAPA.

5.2.6. Selección de la λ

Para la elección de la λ adecuada para el análisis cromatográfico se buscó en literatura la λ de máxima absorción, la cual indicaba trabajar a un intervalo de λ cercano a 225 nm, donde ambos compuestos (DAPA y SI) tuvieran una absorción adecuada (Zaghary et al., 2019). También se obtuvo un espectrograma, para cada compuesto, utilizando el detector UV con arreglo de diodos, y con esto poder establecer el intervalo de λ donde se harían las pruebas. El intervalo de λ estudiado fue desde 200 a 240 nm. El propósito de este estudio era el de encontrar una λ donde la altura de pico fuera similar para ambos compuestos. Además, se evaluaron los espectrogramas de los PD.

5.2.7. Selección de la columna cromatográfica

Se probaron cuatro columnas con diferentes tipos de relleno, y se evaluó el t_R , N, Rs, T y la pureza de los picos obtenidos del análisis de una solución estándar (DAPA 100 $\mu\text{g/mL}$ y SI 100 $\mu\text{g/mL}$) con iguales parámetros cromatográficos. Las columnas utilizadas fueron:

- ✓ Columna Merck Purospher® STAR RP-18e (125 x 4.0 mm) 5 μm . Con tecnología de empaque microparticulado.
- ✓ Columna Merck Chromolith® HighResolution RP-18 (100 x 4.6 mm). Con tecnología de empaque monolítico.

- ✓ Columna phenomenex KINETEX® “*core-shell*” C-18 (150 x 4.6 mm) 5 μm. Con tecnología de empaque “*core-shell*”.
- ✓ Columna Supelco Ascentis® Express C-18 (150 x 4.6 mm) 5 μm. Con tecnología de empaque “*fused-core*”.

5.2.8. Flujo de FM

Para seleccionar el flujo óptimo, se requería lograr una resolución adecuada ($R_s \geq 1.5$) entre los picos de todos los compuestos y un adecuado tiempo de análisis; las pruebas anteriores se realizaron a 1.0 mL/min y con esto se obtuvieron resultados adecuados por lo que no se evaluaron otras velocidades de flujo.

5.2.9. Temperatura del horno de la columna

En los análisis preliminares se utilizó una temperatura del horno de la columna de 30°C y como se obtuvieron resultados adecuados se decidió mantener esa temperatura.

5.3. Preparación de la FM

Para la preparación de la FM se mezcló H₂O: ACN (65:35 v/v) y se filtró aplicando vacío utilizando un filtro de membrana de 0.45 μm. Esta FM se preparaba y se almacenaba en frascos de vidrio cerrados herméticamente y etiquetados para su uso posterior.

5.4. Tratamiento de muestra

Se probaron distintos tratamientos de muestra, modificando parámetros como el tiempo y etapas de ultrasonido (US) y solventes con el fin de

obtener una adecuada liberación de DAPA desde los comprimidos.

Finalmente, el tratamiento de muestra elegido fue:

- ✓ Se pesaron y trituraron 20 comprimidos de DAPA, y se calculó el promedio del peso de un comprimido. Después se agregó una cantidad equivalente a 2.5 mg de DAPA en un matraz de 25 mL.
- ✓ Se agregaron 15 mL de FM y se llevó al vórtex por 15 segundos.
- ✓ Esta muestra fue llevada a US por 15 minutos con agitación intermitente.
- ✓ Se agregaron 1 mL de SI.
- ✓ Se completó a volumen con FM c.s.p. 25 mL.
- ✓ Se filtró con papel filtro y con filtro de muestra de tamaño de poro de 0.45 μm .

5.5. Condiciones cromatográficas finales

- ✓ Equipo: Cromatógrafo Perkin Elmer® serie Flexar N3896.
- ✓ Detector: Perkin Elmer Flexar PDA N3896.
- ✓ Software: Chromera v2.0.
- ✓ Columna: Supelco Ascentis® Express C-18 (150 x 4.6 mm) 5 μm .
- ✓ Temperatura del horno de columna: 30°C.
- ✓ Volumen de inyección: 20 μL .
- ✓ Sistema elución FM: Modo isocrático.
- ✓ Flujo: 1.0 mL/min.

- ✓ λ : UV a 225 nm.
- ✓ FM: H₂O: ACN (65 : 35 v/v).
- ✓ SI: Propifenazona 100 μ g/mL.

5.6. Validación del método cromatográfico

El método desarrollado fue validado según las normas de la ICH (Guía Q2 (R1)) (*ICH Harmonized Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*, 1994) y la USP (*Farmacopea de los Estados Unidos de América / Formulario Nacional (USP 40 / FN 35)*, 2017). A continuación, se presentan los parámetros analizados:

✓ Linealidad

Para definir la linealidad del método analítico se confeccionó una curva de calibración entre la relación de la respuesta (área de pico) del estándar de DAPA y de SI, y la concentración de DAPA. Se establecieron 5 niveles de concentración que fueron inyectaron por triplicado.

Las concentraciones fueron:

- DAPA: 50 - 75 - 100 - 125 - 150 μ g/mL.
- SI: 100 μ g/mL.

Se definió la recta de regresión entre la respuesta (razón entre área de pico DAPA y SI) y la concentración; y se obtuvo el coeficiente de determinación (r^2).

✓ Selectividad

Se determinó la Rs entre DAPA, SI y PD para demostrar una adecuada separación entre todos los picos. Para esto se analizaron las muestras de DAPA sometidas a condiciones de hidrólisis, oxidación y fotólisis y a dichos resultados se les confirmó la pureza del pico por DAD. Además, se realizaron pruebas analizando DAPA en presencia de los principales excipientes presentes en formulaciones comerciales y además en presencia de MET, ya que se encuentra disponible la asociación DAPA / MET en el mercado chileno.

✓ Exactitud

Este parámetro se evaluó mediante el cálculo del porcentaje de recuperación de DAPA, para lo cual se preparó una matriz blanco que se ajustaba a los excipientes que se usan comúnmente en los comprimidos de DAPA (celulosa microcristalina, lactosa, dióxido de silicio, estearato de magnesio, alcohol polivinílico, dióxido de titanio y talco); con esto se simulaba un comprimido real a lo cual se le agregó concentraciones conocidas de estándar de DAPA al 75 - 100 - 125% de la concentración objetivo y además el SI. En total se realizaron 9 análisis, evaluando por triplicado los 3 niveles de concentración; utilizando el tratamiento de muestra completo. Para el cálculo del porcentaje de recuperación fue necesario cuantificar las muestras y compararlas contra el estándar de

referencia de DAPA. Para evaluar este parámetro se aplicó un test estadístico de hipótesis usando T-student.

✓ Precisión

La precisión del método se determinó por medio de la precisión entre ensayos y la precisión intermedia, calculando el coeficiente de variación (CV) en cada caso. Se realizaron mediciones de la misma muestra siendo está sometida al tratamiento analítico completo. La precisión entre ensayos se llevó a cabo en 6 muestras independientes al 100% de la concentración objetivo, en el mismo día con las mismas condiciones experimentales; para la precisión intermedia se evaluó mediante la realización del ensayo en tres días diferentes.

✓ LOD

Para determinar el LOD se utilizó la ecuación 1-1 (Pág 29), basada en la desviación estándar (DS) de la respuesta y la pendiente. Se desarrolló una curva de calibración entre la respuesta (relación de área de picos) y la concentración. Se analizaron 3 niveles de concentración, a concentraciones bajas de DAPA. Los niveles de concentración fueron 3.0 - 6.0 - 9.0 µg/mL. Este procedimiento se repitió 3 veces y de cada una de las curvas se obtuvo la DS de los interceptos y el promedio de sus pendientes. Posteriormente, se calculó de forma teórica el LOD de acuerdo a la ecuación 1-1 (Pág 29).

✓ LOQ

Se realizó el mismo procedimiento que con el LOD pero aplicando la ecuación 1-2 (Pág 29). Una vez obtenido el límite de cuantificación teórico de DAPA, se prepararon tres soluciones con una concentración cercana a la obtenida, para posteriormente ser cuantificada y así comprobar dicho límite. Para esto, se preparó una solución de DAPA a 1.0 µg/mL.

✓ Robustez

Para la robustez se realizaron diversas variaciones en los siguientes parámetros y se evaluó a través de t_R , N, T, Rs y la pureza del pico cromatográfico. Estos parámetros fueron:

- Composición de la fase acuosa de la FM: 63 - 65 - 67%.
- Velocidad de flujo de FM: 0.8 - 1.0 - 1.2 mL/min
- Temperatura del horno de la columna: 28 - 30 - 32°C.

5.7. Estudios de estabilidad

Para los estudios de estabilidad se realizaron pruebas de degradación forzada, llamadas también pruebas de estrés, con el objetivo de obtener información sobre las condiciones que conllevarían a la degradación de DAPA. En un inicio de manera preliminar, en la etapa de desarrollo del método, se utilizaron muestras con concentraciones altas de DAPA, correspondiente a 500 µg/mL para evidenciar fácilmente en cuales condiciones se producirían PD. Luego de este procedimiento, en la etapa

de determinación del porcentaje de degradación, se cuantificó la degradación de DAPA en las pruebas de estrés que presentaron PD, usando muestras con una concentración de 150 µg/mL y de SI a 100 µg/mL.

Las condiciones de estrés estudiadas y que son detalladas en la guía de la ICH Q1A (R2) (*ICH Harmonized Tripartite Guideline, Stability testing of new drug substances and products, Q1A (R2), 2003*) fueron: hidrólisis (ácida, básica y neutra), oxidación, humedad, temperatura y fotólisis (en estado sólido y en solución). Para cada una de las condiciones se analizó una solución blanco (sin DAPA). Esta solución blanco fue sometida a las mismas condiciones de estrés que la muestra en estudio. También se analizó un control almacenado al mismo tiempo el cual, no fue sometido a las pruebas de estrés. Dicho control fue en solución o en estado sólido según correspondiera. Con estas pruebas lo que se quería lograr era obtener una degradación entre el 5 - 20% del principio activo, ya que con esto se garantizaría que se obtuvieran PD primarios y, por lo tanto, cada una de las pruebas debieron ser adecuadas para alcanzar y estar dentro de este rango.

A continuación, se presentan los métodos utilizados para realizar todas las pruebas de estrés.

5.7.1. Hidrólisis ácida y básica

Se preparó una solución de DAPA 500 µg/mL en ACN. De esta solución se transfirió 5 mL a un matraz aforado de 10 mL (DAPA 250 µg/mL), se

completó a volumen con HCl 0.2 N, NaOH 0.2 N y se midió el pH usando tiras reactivas. Después de cada una de estas soluciones se extrajeron 3 alícuotas de 3 mL y se colocaron en tubos pyrex y se almacenaron en una placa calefactora a 70°C por 3 días. Luego del tiempo estipulado, los tubos fueron enfriados en un vaso precipitado para detener la hidrólisis; una vez fríos, los 3 mL de la solución fueron transferidos cuantitativamente a un matraz aforado de 5 mL. En este matraz aforado se agregaron 200 µL de SI (2500 µg/mL); en el caso de la hidrólisis ácida se neutralizó con NaOH 0.1 N, para la hidrólisis básica se neutralizó con HCl 0.1 N, previamente y luego se aforó con H₂O bidestilada. Finalmente, se obtuvo una solución con una concentración final de DAPA 150 µg/mL y SI 100 µg/mL.



5.7.2. Hidrólisis neutra

Se preparó una solución de DAPA 500 µg/mL en ACN. De esta solución se transfirieron 5 mL a matraces aforados de 10 mL (DAPA 250 µg/mL) y se completaron a volumen con H₂O bidestilada. Después de esta solución se extrajeron 3 alícuotas de 3 mL y se colocaron en tubos pyrex y se almacenaron en una placa calefactora a 70°C por 3, 5, 7 y 12 días. Luego del tiempo estipulado, los tubos fueron enfriados en un vaso precipitado para detener la hidrólisis; una vez fríos, los 3 mL de la solución fueron transferidos cuantitativamente a un matraz aforado de 5 mL. En este matraz aforado se agregaron 200 µL de SI (2500 µg/mL);

luego se aforó con H₂O bidestilada obteniendo así una solución con una concentración final de DAPA 150 µg/mL y SI 100 µg/mL.

5.7.3. Oxidación

Se preparó una solución de DAPA 500 µg/mL en ACN. De esta solución se transfirió 5 mL a un matraz aforado de 10 mL (DAPA 250 µg/mL), se completó a volumen con H₂O₂ 6%. Después se extrajeron 3 alícuotas de 3 mL y se colocaron en tubos pyrex y se colocaron en un gabinete sin exposición a la luz y a temperatura ambiente. A la vez se preparó un control de la misma forma, pero se completó a volumen con H₂O bidestilada en vez de H₂O₂. Estos se mantuvieron por 3 días y luego de dicho tiempo, los 3 mL de la solución fueron transferidos cuantitativamente a un matraz aforado de 5 mL. En este matraz aforado se agregaron 200 µL de SI (2500 µg/mL); seguidamente se aforó con H₂O bidestilada obteniendo así una solución con una concentración final de DAPA 150 µg/mL y SI 100 µg/mL.

5.7.4. Temperatura

En una estufa con calor seco a 65°C, se colocó aproximadamente 120 mg de DAPA en un pesafiltro, por 51 días. Luego se realizó un muestreo en diversos días en duplicado, donde se pesó el equivalente a 1.5 mg de DAPA y se colocó en un matraz de 10 mL, se le agregó 8 mL de FM, se lleva a vórtex por 15 seg y luego a US por 15 min. Después se le añadió 400 µL de SI (2500 µg/mL); luego se aforó con FM y vórtex 15 seg. Esta

solución fue filtrada con filtro muestra, dando así una solución final de DAPA a 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y SI 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Para corregir el peso de los muestreos anteriores, se tomó como peso inicial a cero días una muestra luego de dejarla 2 horas en la estufa, con esto se garantiza que cualquier humedad no interferiría con el ensayo.

5.7.5. Temperatura / Humedad relativa

Se preparó una solución sobresaturada de NaCl, para esto se pesó aproximadamente 144 g de NaCl y se colocaron en un desecador con 200 mL de H₂O destilada; con el fin de obtener un ambiente de humedad relativa al 75%. Luego de un día (tiempo necesario para lograr la saturación), se colocó en el desecador un pesafiltro sin tapa con aproximadamente 120 mg de DAPA. Posteriormente este desecador fue tapado y llevado a una estufa a 65°C por un total de 51 días. Se realizó un muestreo (duplicado) en diversos días en donde se pesó el equivalente a 1.5 mg de DAPA y se colocó en un matraz de 10 mL al cual se le agregó 8 mL de FM y se lleva a vórtex por 15 seg y luego a US por 15 min. Después se le añadió 400 μL de SI (2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$); luego se aforó con FM y vórtex 15 seg. Esta solución fue filtrada con filtro muestra, dando así una solución final de DAPA a 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y SI 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

5.7.6. Fotólisis en estado sólido

Se pesó una cantidad aproximada a 20 mg de DAPA, el cual se dispersó en 4 placas Petri separadas formando así una capa fina de polvo aproximadamente de 1 mm de espesor. Estas placas fueron expuestas

dos a radiación UV y 2 a radiación visible, protegiendo una placa Petri con papel aluminio en cada tipo de radiación para usarlas como control de las muestras. Las muestras fueron sometidas 7 días a los efectos de la radiación, posteriormente, se preparó una solución de DAPA a 500 µg/mL y se procedió de la misma forma anterior hasta obtener una solución de 250 µg/mL que fue filtrada con filtro muestra y analizada con el método desarrollado.

5.7.7. Fotólisis en solución

Tanto para la exposición a radiación UV (365 nm) y radiación visible, se preparó una solución de DAPA 500 µg/mL. Para obtener esta solución se pesó un equivalente a 12.5 mg de DAPA y se llevaron un matraz de 25 mL, vórtex 15 seg y luego US 15 min. Esta solución fue filtrada con papel y fraccionada en dos viales; uno de color ámbar (control) y otro vial transparente (muestra). Estos dos viales fueron sometidos a la radiación UV (365 nm) y radiación visible. Todos los viales estuvieron bajo radiación durante 7 días, después se analizó el contenido de cada vial, preparando una solución de 250 µg/mL de DAPA, tomando una alícuota de 5 mL y colocándola en un matraz de 10 mL y aforándola con H₂O bidestilada (*ICH Harmonized Tripartite Guideline, Photostability Testing of New Drug Substances and Products, Q1B, 1996*).

5.8. Cinética de degradación de DAPA

Un parámetro de extraordinario valor es el período de validez, que se define como el tiempo necesario para que se degrade el 10% del principio

activo contenido en una forma farmacéutica. Este porcentaje representa un límite de degradación razonable y es útil en el establecimiento de la caducidad del medicamento (Vila, 2001).

Para determinar la cinética de degradación de DAPA se construyeron gráficos del porcentaje remanente y del logaritmo del porcentaje remanente frente al tiempo, determinando la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación (r^2) en las condiciones donde ocurrió mayor porcentaje de degradación. El orden de la reacción correspondió al gráfico donde se obtuvo una mayor relación lineal (mayor r^2). Por medio de las ecuaciones obtenidas se calculó la constante de degradación (k) y se determinó el periodo de tiempo en el cual DAPA se descompone al 10% de su concentración original ($t_{90\%}$), según las siguientes relaciones (Ecuación 5-4):


$$k \text{ (días}^{-1}\text{)} = -2.303 \times \text{pendiente} \quad t_{90\%} \text{ (días)} = \frac{2.303}{k} \log \frac{90}{81}$$

Ecuación 5-4. Cálculo del $t_{90\%}$.

en donde k corresponde a la constante de degradación.

5.9. Método analítico por HPLC-ELSD

5.9.1. Desarrollo y optimización de método

El propósito de utilizar el detector ELSD era detectar cualquier posible PD que no presente cromóforos en su estructura, por lo tanto, no fue

detectado por el detector DAD luego de someter a DAPA a condiciones de degradación forzada.

Cabe resaltar que no fue necesario validar el método, ya que en este caso solo se requería la detección de los PD y no la cuantificación de DAPA, por lo cual, sólo fue necesario determinar la especificidad del método. Al utilizar este equipo, se emplearon los mismos parámetros empleados en el método HPLC-DAD.

Durante el desarrollo del método, se realizó un diseño de experimento (factorial) en donde se evaluaron factores como: Temperatura de nebulización (°C), presión del gas nebulizador (bar) y la ganancia. Este diseño se realizó con el fin de estudiar el efecto individual y de interacción de los factores seleccionados sobre la respuesta, con el fin de obtener una buena señal de detección de DAPA, PD y SI y con los t_R similares al método HPLC-DAD. Este diseño se realizó a dos niveles (2^3) con un punto central y se obtuvieron 9 experimentos que se realizaron por duplicado (Pulido & Salazar, 2008). Los factores y niveles evaluados fueron:

- Temperatura de nebulización (°C): 30 - 40.
- Presión de gas nebulizador (bar): 3.0 - 4.0.
- Ganancia: 1 - 9.

Para la optimización del método se utilizó una solución de DAPA 100 µg/mL y SI 100 µg/mL. Además, se utilizó la misma FM utilizada en el método HPLC-DAD a un flujo de 1.0 mL/min. La respuesta obtenida para

cada experimento se evaluó mediante la altura de DAPA. Una vez obtenidos los resultados de cada experimento, se utilizó el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI, para la interpretación de los mismos. Con este software a través de gráficos y diagramas se pudo obtener las condiciones óptimas para la detección de DAPA, SI y PD. Luego de optimizado el método se analizaron las muestras degradadas obtenidas de los estudios de estabilidad, correspondientes a las condiciones de hidrólisis neutra, térmica y calor / humedad.

5.10. Método HPLC-DAD-ESI-MS/MS para la detección de DAPA y derivados

5.10.1. Desarrollo y optimización de método

Para la identificación preliminar de los productos de degradación provenientes de las condiciones de estrés con mayor porcentaje de degradación, se utilizó un espectrómetro de masas acoplado con un método HPLC (Sistema cromatográfico C) (Pág 53). La separación cromatográfica se logró con una columna de núcleo sólido Ascentis® Express 5 μm C-18, usando ACN / 0.1% H-COOH como FM en modo de elución isocrática, a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min, con detección DAD a 225 nm, temperatura del horno de la columna a 30°C y volumen de inyección de 10 μL .

Para desarrollar el método se debieron optimizar los parámetros de la fuente de ionización y de la celda de colisión del espectrómetro para

asegurar la mejor ionización y fragmentación del estándar de DAPA, y así, tener la mejor probabilidad de observar los productos de degradación de este compuesto. Los parámetros que fueron optimizados son: modo de ionización, temperatura de secado, gas nebulizador, gas de secado, potencial de desagrupación (DP), potencial de entrada (EP), potencial de salida de la celda de colisión, energía de colisión (CE) y rango de masas a analizar.

Para la identificación se debe comparar con los patrones de fragmentación de estándares disponibles o con los reportados en la bibliografía.

5.11. Cuantificación de dapagliflozina propanodiol monohidrato en presentaciones comerciales.

Se cuantificaron dos presentaciones comerciales presentes en el país de comprimidos de DAPA 10 mg mediante el método desarrollado (Forxiga® y Xigduo XR®).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Método analítico por HPLC-DAD

6.1.1. Selección de FM

Para la selección de la FM, se utilizó el sistema cromatográfico A (Pág 52), con una columna Merck Purospher® STAR RP-18 endcapped, 125 x 4 mm, 5 μ m, a flujo de 1.0 mL/min y λ de 225 nm (ya que la DAPA presenta una absorción adecuada). A continuación, se presentan los resultados de las FM que fueron evaluadas durante el desarrollo del método (Tabla 6-1):



Tabla 6-1. FM utilizadas.

FM	Proporción (v/v)	Resultado		
		t _R (min)	N	T
MeOH : H ₂ O	50 : 50	> 30 min	-	-
MeOH : H ₂ O	30 : 70	> 30 min	-	-
MeOH : H ₂ O	35 : 65	> 30 min	-	-
ACN : KH ₂ PO ₄ (pH 4.53)	30 : 70	15.00	8559	1.06
ACN : KH ₂ PO ₄ (pH 4.53)	35 : 65	7.00	6362	1.11
ACN : KH ₂ PO ₄ (pH 3.74, con H ₃ PO ₄ 0.1%)	30 : 70	26.40	9337	1.06

ACN : KH₂PO₄ ajustado con NaOH 0.2 N (pH 5.78)	30 : 70	22.00	8865	1.05
ACN : H₂O	50 : 50	2.00	3680	1.37
ACN : H₂O	30 : 70	18.00	8939	1.04
ACN : H₂O	40 : 60	4.00	5400	1.17
ACN : H₂O	35 : 65	7.30	6824	1.08

Inicialmente al seleccionar la FM, se utilizó la DAPA sin degradar. Al utilizar las FM que contienen MeOH, se observó que el tiempo de análisis era superior a 30 minutos por lo cual se descartó la utilización de la misma.

Al utilizar el tampón fosfato (KH₂PO₄) a distinto pH, se observa que los t_R, N y T, dieron similares a los obtenidos utilizando ACN : H₂O, en la misma proporción, por lo tanto; se descartó la utilización de dicho tampón para simplificar la preparación de la FM y se seleccionó la mezcla ACN : H₂O (35 : 65 v/v) como FM preliminar, ya que el pico de DAPA se evidenció simétrico, eficiente y con un adecuado t_R. Para la selección final de la FM, se probó la muestra de DAPA degradada, para lo cual, se inyectaron las soluciones generadas luego de los estudios preliminares de degradación forzada de DAPA para evidenciar sus PD y que estos no se solaparan. La Rs obtenida de manera preliminar entre DAPA y sus PD fue de 10.50, lo que indica que hay una buena separación cromatográfica. Tanto para las pruebas preliminares como para el

desarrollo del método analítico se utilizó la mezcla de ACN : H₂O (35 : 65 v/v) sin realizarle ninguna modificación.

6.1.2. Modo de uso FM

Al obtener un adecuado t_R y R_s de DAPA con respecto a sus PD, no fue necesario utilizar un gradiente de elución; por consiguiente, se seleccionó el modo isocrático para el método analítico.

6.1.3. Selección de SI

Para la elección de SI, se utilizó el sistema cromatográfico A (Pág 52), con una columna Merck Purospher® STAR RP-18 endcapped, 125 x 4 mm, 5 μ m, a flujo de 1.0 mL/min y λ de 225 nm, con FM ACN : H₂O (35 : 65 v/v). Antes de elegir un SI, previamente se realizó la degradación de DAPA de manera preliminar, para tener en cuenta los PD que se formarían y, por lo tanto, que este SI no tuviese un t_R similar a DAPA ni a los PD. En la Tabla 6-2, se muestran los resultados de los compuestos estudiados a través de soluciones de 100 μ g/mL.

Tabla 6-2. Selección del SI.

Compuesto	t_R (min)	Forma de pico	Intensidad de señal (mAu)
PD 1	2.60	Simétrico	19101.98
PD 2	4.10	Simétrico	12071.45
DAPA	7.00	Simétrico	100775.69

Acetaminofeno	1.21	Simétrico	527614.77
Primidona	1.54	Simétrico	242262.67
Benzofenona	28.51	Simétrico	27145.17
Fenobarbital sódico	7.70	Asimétrico	-
Papaverina HCl	6.47	Asimétrico	81804.90
Sildenafil Citrato	7.90	Asimétrico	-
Cloranfenicol	2.72	Simétrico	275968.53
Prednisolona	2.63	Simétrico	125046.96
Sulfametoxazol	2.60	Asimétrico	180230.09
Trimetoprim	2.00	Asimétrico	-
Lidocaína	4.40	Asimétrico	-
Propifenazona	6.10	Simétrico	188640.75

Los compuestos como el acetaminofén y primidona eluyeron con el frente del solvente, por lo cual se descartaron. La benzofenona a pesar de que presentaba un pico simétrico su t_R era mucho mayor (28 min) que el de DAPA, por lo cual fue descartado.

El fenobarbital sódico, la papaverina HCl y sildenafil citrato presentaron un t_R similar que DAPA por lo que podrían interferir en los resultados producto de una baja resolución; por lo tanto, fueron descartados.

El cloranfenicol, la prednisolona, sulfametoxazol, trimetoprim tuvieron t_R similar a uno de los PD de DAPA, por lo cual fueron descartados. Además, en los compuestos que presentaron mucha asimetría no se les pudo medir de manera adecuada la intensidad de la señal producto del ensanchamiento del pico.

Al evaluar la propifenazona, presentó un t_R adecuado, ya que no interfirió con ningún pico, presentando una buena resolución ($R_s > 1.5$) con respecto al pico de DAPA y por lo tanto se eligió como SI; por su excelente intensidad de señal, simetría de pico y R_s en cuanto a los PD y DAPA.

6.1.4. Selección de la concentración del SI

La concentración seleccionada del SI fue de 100 $\mu\text{g/mL}$, ya que se obtuvo una altura del pico similar a la de DAPA a la concentración objetivo.

6.1.5. Selección de la λ

Se analizaron los espectrogramas de DAPA y del SI (figura 6-1 y 6-2) respectivamente, con el fin de encontrar el área de absorción adecuada de radiación UV (zona de meseta) para ambos compuestos y en la cual los dos tuvieran una señal similar a la misma concentración. Se encontró que con una λ de 225 nm los dos compuestos presentaron una absorción adecuada, por lo cual se seleccionó esta λ . Es importante destacar que no se seleccionó una λ por debajo de 225 nm, a pesar de que ambos compuestos (DAPA y SI), presentan sus máximos de absorción a esta λ (200 nm), debido que el ACN utilizado en la FM, tiene absorción desde 190 nm (λ de corte) y también esta λ es cercana al UV de vacío (Moffat et al., 2011). El resultado final luego de tener el SI junto con DAPA se evidencia en el cromatograma presentado en la Figura 6-3.

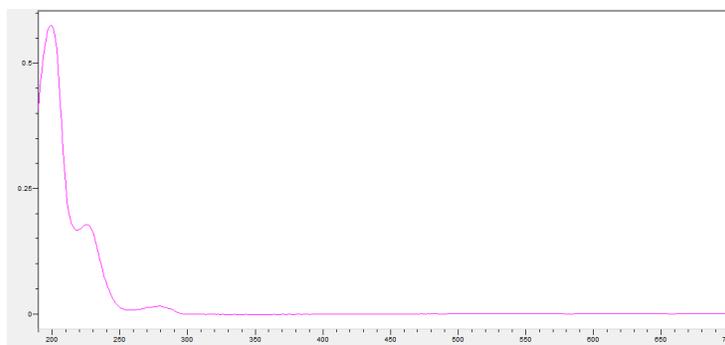


Figura 6-1. Espectrograma de DAPA 100 µg/mL.

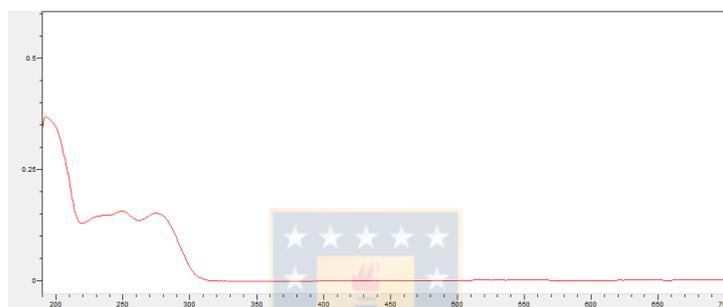


Figura 6-2. Espectrograma del SI 100 µg/mL.

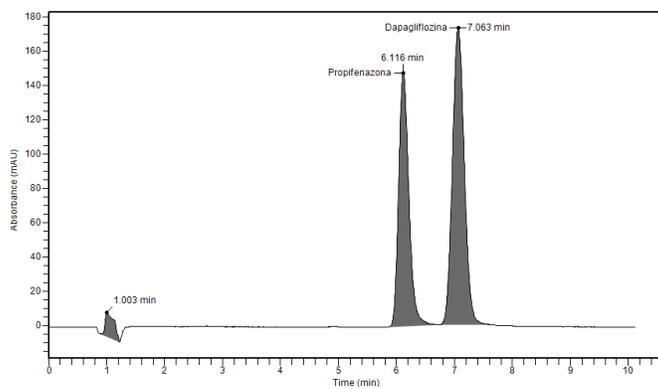


Figura 6-3. Cromatograma de solución estándar de DAPA 100 µg/mL + SI 100 µg/mL. Sistema cromatográfico A, columna Merck Purospher® STAR RP-18 endcapped, flujo 1.0 mL/min y λ 225 nm.

6.1.6. Selección de la columna cromatográfica

Al tener la FM, el SI y λ seleccionada, se prosiguió a seleccionar una columna con la cual se obtuviera una buena señal, una adecuada separación entre todos los analitos en un tiempo de análisis corto, para lo cual se probaron columnas cromatográficas con distinto tipo de relleno y se realizó una comparación entre las columnas utilizadas.

En la Tabla 6-3 se muestran los resultados obtenidos respecto a t_R , eficiencia (N), asimetría del pico (T) y pureza del pico, empleando las 4 columnas. La Tabla 6-4 muestra la R_s de los compuestos estudiados, en donde se aprecia que la R_s es mayor a 1.5, concluyendo que existe una buena separación cromatográfica utilizando cualquiera de las columnas presentadas, pero con la columna core-shell la R_s entre DAPA y SI, resultó inferior a 1.5 debido al solapamiento de los picos.

Tabla 6-3. Comparación de columnas.

Columna	Estándar	t_R (min)	N	T	Pureza Pico
Microparticulada (125 x 4.0 mm)	DAPA	7.09	5329	1.10	1.07
	Propifenazona	6.13	4749	1.27	1.05
Monolítica (100 x 4.6 mm)	DAPA	5.11	12878	1.02	1.03
	Propifenazona	4.15	11301	1.25	1.05
Fused-core (150 x 4.6 mm)	DAPA	5.21	16607	1.06	1.03
	Propifenazona	4.74	17856	1.17	1.04
Core-shell (150 x 4.6 mm)	DAPA	Los picos entre ambos compuestos se solaparon			
	Propifenazona				

Tabla 6-4. Comparación de R_s entre DAPA, SI y PD utilizando diferentes tipos de columna.

Compuestos	R_s			
	Microparticulada	Monolítica	Fused-core	Core-shell
DAPA y SI	2.72	5.91	3.25	-
SI y PD 2	12.03	14.60	14.66	-
PD 2 y PD 1	7.82	8.75	10.96	4.70
Valor ref.:	$R_s > 1.5$			

Con la columna microparticulada se obtuvo una adecuada separación de la DAPA, SI y todos los PD, pero la eficiencia de la columna fue menor y el t_R mayor, comparada con las otras columnas (según Tabla 6-3). A pesar que con la columna monolítica se obtuvo un t_R levemente menor que la fused-core, debido a su longitud más pequeña (50 mm menor), se eligió la columna fused-core por presentar mejor separación de los PD, mayor eficiencia (N) que las demás columnas y una apropiada simetría del pico cromatográfico (T), y cabe destacar que su t_R es adecuado para un análisis cromatográfico rápido. En la tabla 6-5, se presentan los datos finales utilizando la columna fused-core corroborando de manera tal que no existe ningún pico co-eluido y con una adecuada eficiencia, simetría y t_R .

Tabla 6-5. Parámetros cromatográficos de DAPA, SI y PD utilizando una columna fused-core.

Columna	Compuestos	t _R (min)	N	Rs	T	Pureza Pico
Fused- core (150 x 4.6 mm)	DAPA	5.21	16607	3.25	1.06	1.04
	Propifenazona	4.74	17856	14.66	1.17	1.03
	PD 1	2.16	10661	7.07	1.34	1.25
	PD 2	3.08	13514	10.96	1.21	1.45

Es importante destacar que con los avances tecnológicos en materia de relleno de columnas, las monolíticas y las de relleno sólido a pesar de su mayor costo, permiten la separación de mezclas de compuestos en un menor tiempo de análisis, conllevando de esta manera a la reducción de tiempo y gastos de solventes, aspectos muy importantes en los laboratorio de análisis.

Finalmente, la Figura 6-4 hace referencia a un cromatograma de DAPA, sus PD y el SI, con lo cual se muestra la capacidad indicadora de estabilidad del método desarrollado.

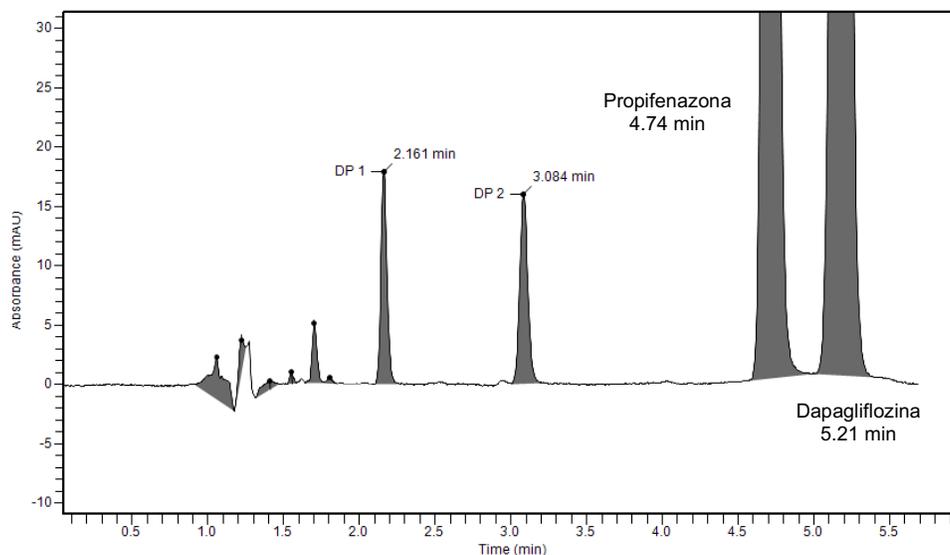


Figura 6-4. Cromatograma de método indicador de estabilidad para DAPA 150 µg/mL + SI 100 µg/mL. Columna de empaque “fused-core”, flujo 1.0 mL/min y λ 225 nm. PD 1 y PD 2 (productos de degradación).

Para que un pico se considere puro debe encontrarse el valor de pureza de pico entre 1.0 - 1.5, debido a que el nivel del ruido que presenta la línea base puede afectar la determinación. Según los resultados obtenidos de valores de pureza para los picos, se confirma que el método es indicador de estabilidad, y por lo tanto se confirma que no hay picos co-eluidos (Tabla 6-5) (Pág 87).

6.1.7. Flujo de FM

Se seleccionó un flujo de 1.0 mL/min para la validación de todo el método analítico propuesto, ya que con este flujo se obtuvieron resultados satisfactorios.

6.1.8. Temperatura del horno de la columna

Se seleccionó la temperatura de 30°C para la validación de todo el método analítico propuesto, ya que con esta temperatura se obtuvieron resultados adecuados.

6.2. Tratamiento de muestra

Al momento de seleccionar el mejor tratamiento de muestra, se realizaron diversas modificaciones que permitieron poder extraer la mayor cantidad de principio activo desde la forma farmacéutica para su posterior cuantificación. Uno de los solventes orgánicos utilizados fue MeOH, a pesar que la FM no tiene este solvente, se probó debido a que DAPA es soluble en este solvente orgánico. También se tomó en cuenta y a manera de precaución no sobrepasar los límites del porcentaje del modificador orgánico de la FM para evitar ensanchamientos de los picos, considerando la fuerza de cada solvente (Snyder, Kikland, & Glaich, 1997). A continuación, se detalla cada uno de ellos:

Opción 1:

- ✓ Se pesaron y trituraron 10 comprimidos de DAPA y se calculó el promedio del peso de un comprimido. Después se agregó una cantidad equivalente a 2.5 mg de DAPA en un matraz de 25 mL.
- ✓ Se agregaron 11.25 mL de MeOH y se llevó al vórtex por 15 segundos. La cantidad de MeOH corresponde al 45% del matraz utilizado.

- ✓ Esta muestra fue llevada a US por 15 minutos con agitación intermitente.
- ✓ Se agregó 1 mL de SI.
- ✓ Se completó a volumen con H₂O bidestilada c.s.p. 25 mL.
- ✓ Se filtró con papel filtro y con filtro de muestra de tamaño de poro de 0.45 µm.

Opción 2:

- ✓ Se pesaron y trituraron 10 comprimidos de DAPA y se calculó el promedio del peso de un comprimido. Después se agregó una cantidad equivalente a 2.5 mg de DAPA en un matraz de 25 mL.
- ✓ Se agregaron 2.5 mL de MeOH, 15 mL de FM y se llevó al vórtex por 15 segundos. La cantidad de MeOH corresponde al 10% del matraz utilizado.
- ✓ Esta muestra fue llevada a ultrasonido por 15 minutos con agitación intermitente.
- ✓ Se agregó 1 mL de SI.
- ✓ Se completó a volumen con FM c.s.p. 25 mL.
- ✓ Se filtró con papel filtro y con filtro de muestra de tamaño de poro de 0.45 µm.

Opción 3:

- ✓ Se pesaron y trituraron 10 comprimidos de DAPA y se calculó el promedio del peso de un comprimido. Después se agregó

una cantidad equivalente a 2.5 mg de DAPA en un matraz de 25 mL.

- ✓ Se agregaron 9 mL de ACN y se llevó al vórtex por 15 segundos. La cantidad de ACN corresponde al 36% del matraz utilizado.
- ✓ Esta muestra fue llevada a US por 15 minutos con agitación intermitente.
- ✓ Se agregó 1 mL de SI.
- ✓ Se completó a volumen con H₂O bidestilada c.s.p. 25 mL.
- ✓ Se filtró con papel filtro y con filtro de muestra de tamaño de poro de 0.45 µm.

Opción 4:

- ✓ Se pesaron y trituraron 10 comprimidos de DAPA y se calculó el promedio del peso de un comprimido. Después se agregó una cantidad equivalente a 2.5 mg de DAPA en un matraz de 25 mL.
- ✓ Se agregaron 15 mL de H₂O bidestilada y se llevó al vórtex por 15 segundos.
- ✓ Esta muestra fue llevada a ultrasonido por 15 minutos con agitación intermitente.
- ✓ Se agregó 1 mL de SI.
- ✓ Se completó a volumen con ACN c.s.p. 25 mL.
- ✓ Se filtró con papel filtro y con filtro de muestra de tamaño de poro de 0.45 µm.

- ✓ Cabe destacar que la opción 4, el porcentaje del modificador orgánico (ACN) es el mismo de la opción 3 (36%), con la única variante del orden de adición durante el tratamiento.

Opción 5:

- ✓ Se pesaron y trituraron 10 comprimidos de DAPA y se calculó el promedio del peso de un comprimido. Después se agregó una cantidad equivalente a 2.5 mg de DAPA en un matraz de 25 mL.
- ✓ Se agregaron 15 mL de FM y se llevó al vórtex por 15 segundos. La cantidad de FM corresponde al 60% del matraz utilizado.
- ✓ Esta muestra fue llevada a ultrasonido por 5 minutos con agitación intermitente.
- ✓ Se agregó 1 mL de SI.
- ✓ Se completó a volumen con FM c.s.p. 25 mL.
- ✓ Se filtró con papel filtro y con filtro de muestra de tamaño de poro de 0.45 μm .

Opción 6:

- ✓ Se pesaron y trituraron 10 comprimidos de DAPA y se calculó el promedio del peso de un comprimido. Después se agregó una cantidad equivalente a 2.5 mg de DAPA en un matraz de 25 mL.
- ✓ Se agregaron 15 mL de FM y se llevó al vórtex por 15 segundos.

- ✓ Esta muestra fue llevada a ultrasonido por 10 minutos con agitación intermitente.
- ✓ Se agregó 1 mL de SI.
- ✓ Se completó a volumen con FM c.s.p. 25 mL.
- ✓ Se filtró con papel filtro y con filtro de muestra de tamaño de poro de 0.45 μm .

Opción 7:

- ✓ Se pesaron y trituraron 10 comprimidos de DAPA y se calculó el promedio del peso de un comprimido. Después se agregó una cantidad equivalente a 2.5 mg de DAPA en un matraz de 25 mL.
- ✓ Se agregaron 15 mL de FM y se llevó al vórtex por 15 segundos.
- ✓ Esta muestra fue llevada a ultrasonido por 15 minutos con agitación intermitente.
- ✓ Se agregó 1 mL de SI.
- ✓ Se completó a volumen con FM c.s.p. 25 mL.
- ✓ Se filtró con papel filtro y con filtro de muestra de tamaño de poro de 0.45 μm .

En la Tabla 6-6 se muestran los resultados obtenidos de los tratamientos de muestras realizados.

Tabla 6-6. Tratamientos de muestras ensayados.

Tratamientos	Recuperación (%)
Opción 1: 11.25 mL MeOH / 15 min US	87.25
Opción 2: 2.5 mL MeOH y 15 mL FM ACN: H₂O (35:65) / 15 min US	90.69
Opción 3: 9 mL ACN / 15 min US	89.90
Opción 4: 15 mL H₂O bidestilada / 15 min US	87.75
Opción 5: 15 mL FM ACN: H₂O (35:65) / 5 min US	89.56
Opción 6: 15 mL FM ACN: H₂O (35:65) / 10 min US	90.16
Opción 7: 15 mL FM ACN: H₂O (35:65) / 15 min US	91.36

Se eligió la opción 7 como tratamiento de muestra, ya que el porcentaje de recuperación fue el más alto, además que se utilizó la FM como solvente para la extracción del principio activo de la forma farmacéutica. También los resultados indican que el tiempo de ultrasonido óptimo fue de 15 minutos. En las pruebas iniciales (opción 1 - 4), se utilizó MeOH, ACN y H₂O bidestilada como primer solvente, con los cuales se obtuvo un porcentaje de recuperación levemente inferior al obtenido con FM, por tal motivo, se seleccionó la FM ACN : H₂O (35 : 65 v/v) como solvente para el tratamiento de muestra. Posteriormente teniendo seleccionado el solvente, se probaron distintos tiempos de sonicación con el objetivo de seleccionar el tiempo óptimo de sonicación, de esta forma se seleccionó 15 minutos debido a que el porcentaje de extracción fue levemente

superior. Cabe mencionar, que los porcentajes de extracción resultaron similares en todos los tratamientos evaluados, a pesar de utilizar diversos métodos y solventes. Es preciso indicar que el tratamiento escogido es adecuado, ya que en los estudios de exactitud, los porcentajes de recuperación resultaron cercanos al 100%, y en este estudio, el tratamiento de muestra se hizo con comprimidos reales en los cuales se considera como 100% el valor rotulado.

6.3. Validación del método indicador de estabilidad

6.3.1. Linealidad

En la Figura 6-5 se presenta la curva de calibración de DAPA, la cual muestra el tipo de relación entre la respuesta obtenida (relación área DAPA / área SI) y la concentración de DAPA.

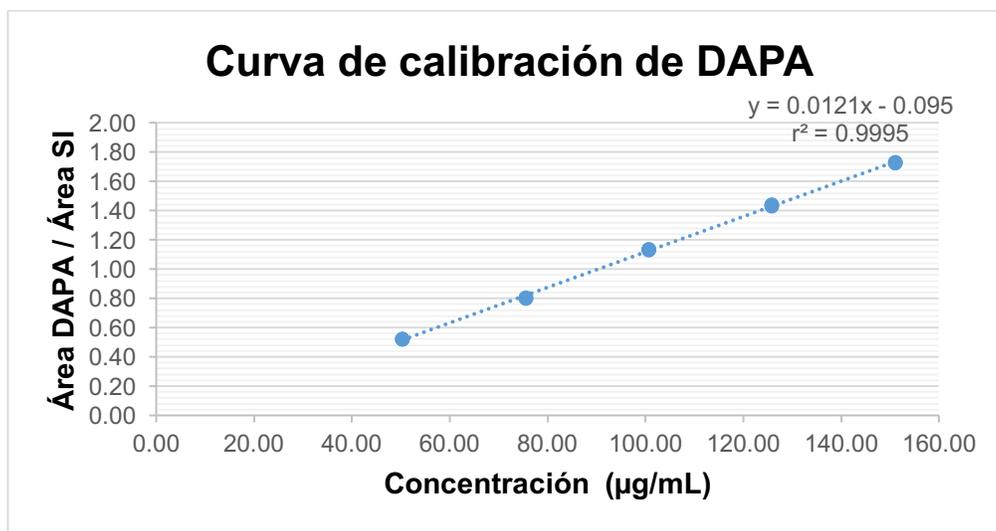


Figura 6-5. Curva de calibración de DAPA.

Existe una correlación lineal entre la concentración de DAPA y la respuesta (área DAPA / área SI), ya que se obtuvo la ecuación de regresión lineal y un coeficiente de determinación (r^2) ≥ 0.9995 . Sumado a esto, se realizó el procedimiento estadístico análisis de varianza (ANOVA) lo que confirma ($p < 0.005$) la relación lineal entre las concentraciones 50 - 150 $\mu\text{g/mL}$.

6.3.2. Selectividad

En la Tabla 6-7 se muestran los resultados obtenidos de la resolución de DAPA, su SI y sus PD. Datos obtenidos del cromatograma de la Figura 6-4 (Pág 88).



Tabla 6-7. Selectividad del método analítico.

Comparación de R_s entre PD, SI y DAPA	
Compuestos	R_s
DAPA y SI	3.23
SI y PD 2	14.20
PD 2 y PD 1	10.75
Valor ref.:	$R_s > 1.5$

Se realizaron 3 estudios para evaluar la selectividad. En uno de ellos se demostró que existía una $R_s > 1.5$ entre DAPA y SI, al igual que para SI y PD 2 y PD 2 con el PD 1, lo que indica que el método resultó ser selectivo para DAPA y sus PD. Cabe destacar que, para este trabajo, el objetivo para los PD era solamente su identificación, más no su cuantificación.

Para el otro estudio con la ayuda del detector DAD, se evidenció que todos los picos de la Figura 6-4, son puros (pureza de pico entre 1.0 - 1.5), lo que demuestra que no existe interferencias de otros picos en los analitos estudiados. Tanto la pureza del pico para DAPA (1.04) y SI (1.03), confirman la selectividad del método para DAPA, su SI y sus PD. En el último estudio, utilizando los excipientes comúnmente usados en la fabricación de comprimidos de DAPA, no se observó ningún pico. Cabe destacar que en el mercado chileno se encuentra una formulación junto con MET y se puede apreciar en la Figura 6-6, que dicho pico no interfiere con el pico de DAPA, SI y PD.

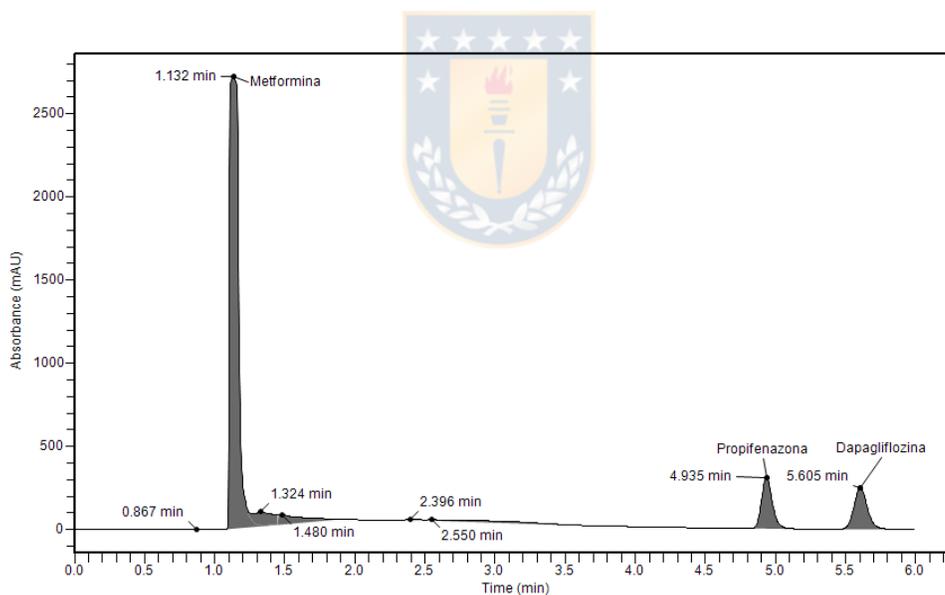


Figura 6-6. Selectividad del método analítico.

6.3.3. Exactitud

Los resultados de las pruebas de exactitud se muestran en la Tabla 6-8.

Tabla 6-8. Exactitud del método analítico.

Niveles de concentración	Concentración agregada (µg/mL)	Concentración medida (µg/mL)	Recuperación (%)
75	75.53	75.26 ± 0.33	99.64 ± 0.44
100	100.60	100.46 ± 0.75	99.86 ± 0.74
125	125.75	125.89 ± 0.87	100.11 ± 0.69

De acuerdo a los resultados obtenidos se demuestra una adecuada exactitud del método analítico, ya que el porcentaje de recuperación de DAPA se encuentra dentro del 98 - 102% como se establece en la norma (*Farmacopea de los Estados Unidos de América / Formulario Nacional (USP 40 / FN 35), 2017; ICH Harmonized Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), 1994*).

Para este parámetro se aplicó un test estadístico de hipótesis usando t-student, en donde se obtuvo lo siguiente:

$$t \text{ calculado} = -0.624$$

$$t \text{ tabla} = -2.306$$

t calculado menor t tabla, por lo tanto, el porcentaje de recuperación puede ser igual a 100% con un $\alpha = 0.05$.

6.3.4. Precisión

Los resultados de la precisión del método analítico se muestran en la Tabla 6-9.

Tabla 6-9. Precisión del método analítico.

Concentración (µg/mL)	Coeficiente de variación (%)	
	Entre ensayos	Intermedia
100	1.29	1.11

Al realizar las 6 determinaciones al 100% de la concentración objetivo, el coeficiente de variación es adecuado ($CV \leq 2.0$), para la precisión entre ensayos y la precisión intermedia, lo cual indica que el método es preciso para la determinación de DAPA (*Farmacopea de los Estados Unidos de América / Formulario Nacional (USP 40 / FN 35), 2017; ICH Harmonized Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), 1994*).



6.3.5. LOD y LOQ

En la Tabla 6-10 se presentan los resultados de la determinación del LOD y LOQ basados en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente.

Tabla 6-10. LOD-LOQ.

	Promedio pendientes	DS Interceptos	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
DAPA	0.010	0.0009	0.28	0.86

Se realizó la validación del LOQ mediante la realización de un análisis por triplicado de una muestra de DAPA de concentración similar al LOQ

teórico. En este caso la concentración fue de 1.015 µg/mL. Los resultados se muestran en la Tabla 6-11. Cabe destacar que el valor de recuperación se encuentra dentro del 80 - 120%, lo cual indica que es un valor adecuado para validar el LOQ. Los resultados de los límites obtenidos son adecuados para determinación en productos farmacéuticos.

Tabla 6-11. Validación del LOQ.

Validación del LOQ	Concentración agregada (µg/mL)	Concentración medida (µg/mL)	Recuperación (%)
DAPA	1.015	0.987	97.26

6.3.6. Robustez

Los resultados de las pruebas de robustez se muestran en las tablas 6-12, 6-13 y 6-14.

Tabla 6-12. Variación porcentaje de fase acuosa.

Proporción ACN : H₂O (% v/v)	t_R DAPA (min)	N	T	R_s	Pureza Pico
33:67	6.80	17860	0.98	7.62	1.03
35:65	4.96	17022	1.00	2.46	1.03
37:63	4.05	-	-	1.12	2.04

Los resultados muestran que se debe tomar precaución al momento de preparar la FM, ya que se produce una variación importante en los tiempos de retención. Al aumentar la proporción de fase acuosa aumenta el t_R aumentando el tiempo de análisis, y al disminuir la proporción de fase acuosa se coeluyen los picos entre DAPA y SI debido a la disminución de los t_R por disminución de la polaridad de la FM, como se muestra en la figura 6-7.

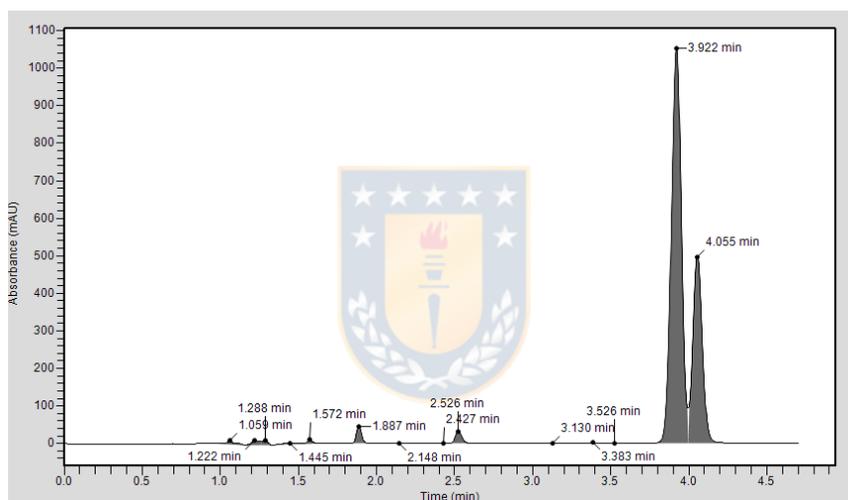


Figura 6-7. Picos coeluidos al utilizar FM ACN : H₂O (37 : 63 v/v).

Tabla 6-13. Variación flujo de la FM.

Flujo (mL/min)	t_R DAPA (min)	N	T	R_s	Pureza Pico
0.8	6.21	18925	1.02	2.54	1.04
1.0	4.96	17022	1.00	2.46	1.03
1.2	4.18	15441	1.02	2.61	1.02

El método resultó ser robusto para leves cambios del flujo, ya que prácticamente no hay variación en los parámetros evaluados. Con flujo 0.8 mL/min se observa un aumento de más de un minuto en el t_R pero este no afecta la separación ni la forma de los picos.

Tabla 6-14. Variación temperatura.

T°	t_R DAPA (min)	N	T	R_s	Pureza Pico
28	4.97	16985	1.01	2.42	1.03
30	4.96	17022	1.00	2.46	1.03
32	5.01	17356	1.00	2.68	1.03

En el caso de la temperatura del horno de la columna, no se observan cambios relevantes en los parámetros estudiados; por lo tanto, el método es robusto para fluctuaciones de este tipo.

6.4. Estudios de estabilidad

6.4.1. Hidrólisis ácida y básica

Los estudios de estabilidad arrojaron que no se forman PD de DAPA en el caso de la hidrólisis ácida y básica y además no disminuyó su porcentaje de recuperación, por lo tanto, se consideró estable para estas condiciones.

6.4.2. Hidrólisis neutra

El porcentaje de DAPA degradado en la hidrólisis neutra se muestra en la Tabla 6-15.

Tabla 6-15. Porcentaje de degradación de DAPA según el tiempo, bajo la condición de hidrólisis neutra.

Tiempo (días)	Degradación (%)
3	5.70
5	10.93
7	11.52
12	14.38

En el caso de la hidrólisis neutra, se reflejó una disminución del porcentaje de recuperación de DAPA, que fue mayor al aumentar el tiempo de degradación, obteniendo la formación de 2 PD primarios o relevantes (t_R 2.1 y 3.0 min) (Figura 6-8), destacando que la degradación se encuentra entre un 5 - 20%. La importancia de la formación de estos PD, radica en que se pueden generar bajo condiciones normales de elaboración o almacenamiento de comprimidos de DAPA, lo que conllevaría a una disminución del efecto terapéutico para el cual fue prescrito o un aumento de su toxicidad. Cabe resaltar que no hay interferencias en los PD encontrados, ya que mediante análisis con el detector DAD, se encontró que la pureza del pico fue adecuada (entre 1.0 - 1.5).

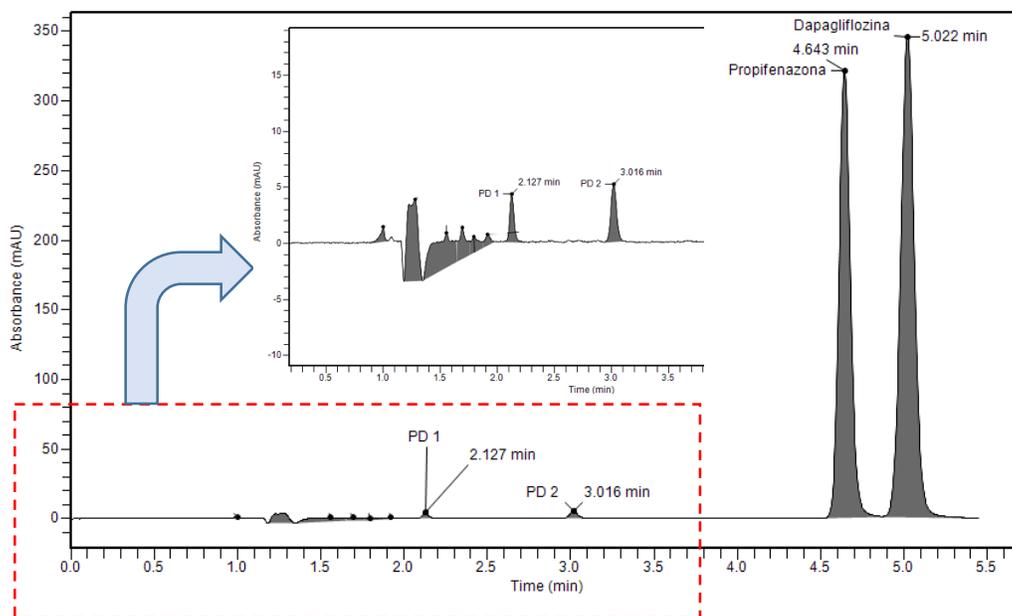


Figura 6-8. Cromatograma de hidrólisis neutra. Representativo de una muestra de DAPA 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + SI 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sometida a hidrólisis neutra por 12 días. Columna de empaque “fused-core”, flujo 1.0 mL/min y λ 225 nm. PD 1 y PD 2 (productos de degradación).

6.4.3. Oxidación

Los resultados obtenidos muestran que la solución de DAPA en presencia de H_2O_2 3% protegido de la luz y a temperatura ambiente, no presenta formación de PD, ni tampoco disminución de la concentración de DAPA; por lo tanto, se considera estable en dicha condición. La pureza de los picos de DAPA y SI se encontraron dentro del rango de pureza (entre 1.0 - 1.5) demostrando que no hay solapamiento de picos.

6.4.4. Temperatura

La molécula de DAPA resultó ser susceptible a la degradación por medio de la temperatura a 65°C, bajo calor seco, por un período de 51 días, presentando un aumento en el porcentaje de degradación con la

identificación de 2 PD en el análisis cromatográfico. El porcentaje de degradación de DAPA bajo la condición de temperatura se muestra en la tabla 6-16.

Tabla 6-16. Porcentaje de degradación de DAPA según el tiempo, bajo la condición de temperatura.

Tiempo (días)	Degradación (%)
1	1.43
3	2.79
5	4.02
14	7.30
28	7.89
40	10.45
47	12.02
51	13.11

Además, se presenta el cromatograma en donde se refleja la formación de 2 PD primarios o relevantes (t_R 2.1 y 3.1 min), que tienen el mismo t_R y espectrograma que los obtenidos mediante hidrólisis neutra, por lo tanto, probablemente corresponden a los mismos compuestos (Figura 6-9). No obstante, la proporción o intensidad del pico cromatográfico correspondiente al PD 1 es significativamente mayor a la de PD 2. La pureza del pico de DAPA y de los PD se encontró dentro del rango entre 1.0 - 1.5 y con esto quedó demostrado que no hay solapamiento de picos.

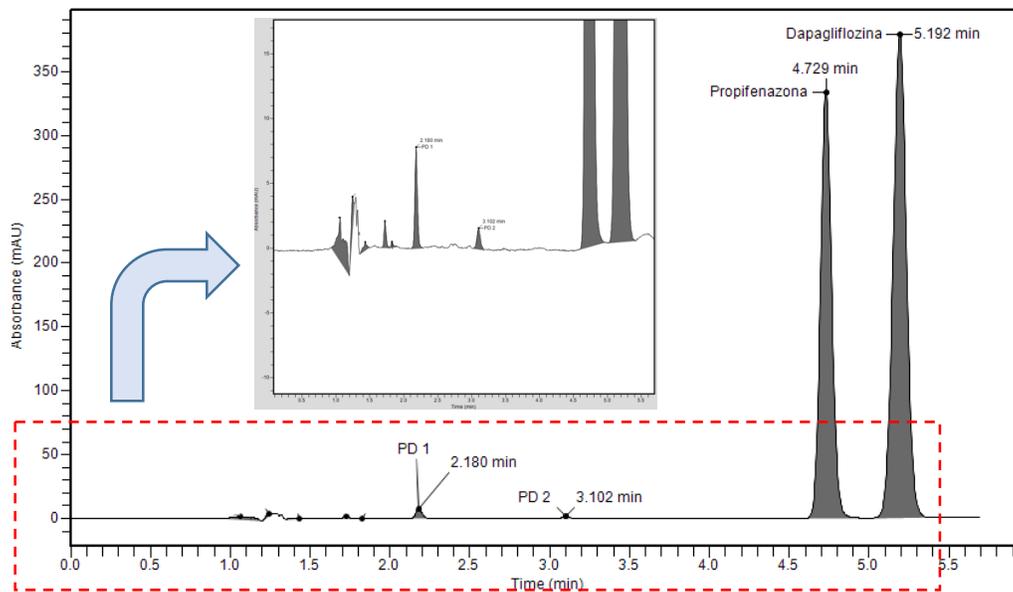


Figura 6-9. Cromatograma de DAPA bajo condición: Temperatura. Representativo de una muestra de DAPA 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + SI 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sometida a calor seco por 51 días. Columna de empaque “fused-core”, flujo 1.0 mL/min y λ 225 nm. PD 1 y PD 2 (productos de degradación).

Como se mencionó para la degradación bajo hidrólisis neutra, la importancia de la degradación del compuesto, radica en que se puede degradar bajo condiciones normales de elaboración o almacenamiento, lo que conllevaría a una disminución del efecto terapéutico o un aumento de su toxicidad. Por lo tanto, es importante evitar exponer el compuesto a la temperatura para evitar la degradación.

6.4.5. Temperatura / Humedad relativa

Los resultados luego de someter a DAPA por 51 días a un ambiente de 75% H.R, bajo calor húmedo a una temperatura de 65°C, se concluye que es susceptible a degradación en este medio, provocando la

formación de 2 PD, siendo esta la condición en donde se produce mayor porcentaje de degradación como se muestra en la Tabla 6-17.

Tabla 6-17. Porcentaje de degradación de DAPA según el tiempo, bajo la condición de temperatura / humedad relativa.

Tiempo (días)	Degradación (%)
1	1.70
3	3.64
5	5.12
7	5.40
9	7.28
14	8.21
20	9.87
28	11.41
40	15.01
51	18.95

A continuación, se presenta el cromatograma en donde se refleja los 2 PD primarios o relevantes (t_R 2.1 y 3.0 min) (Figura 6-10). que tienen el mismo t_R y espectrograma que los obtenidos mediante hidrólisis neutra y calor seco, por lo tanto, probablemente corresponden a los mismos compuestos. La pureza del pico de DAPA se encontró dentro del rango entre 1.0 - 1.5 y con esto quedó demostrado que no hay solapamiento de picos.

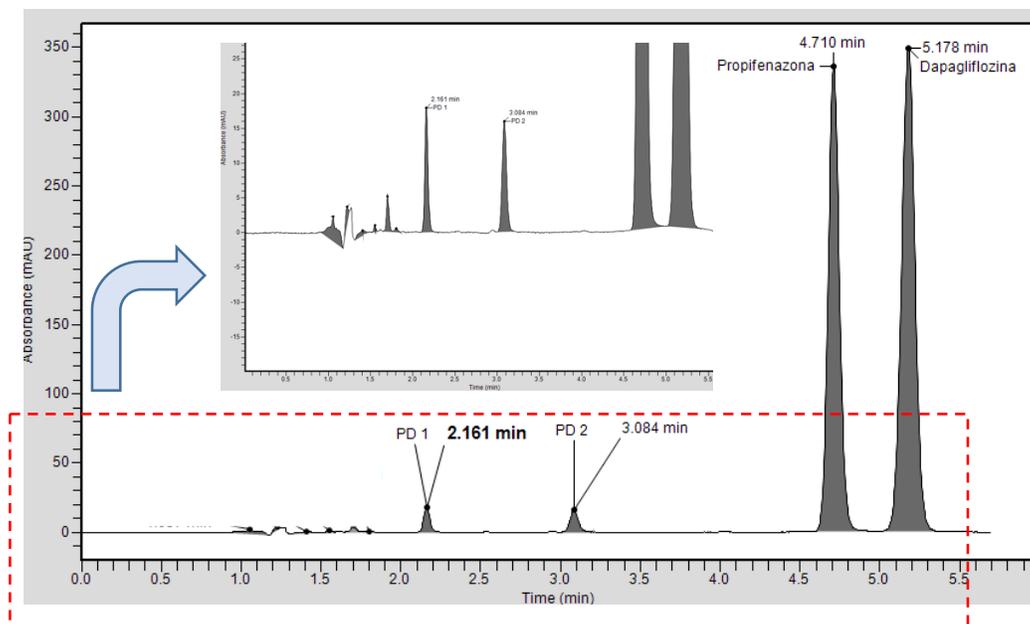


Figura 6-10. Cromatograma de DAPA bajo condición: Temperatura / Humedad relativa. Representativo de una muestra de DAPA 150 $\mu\text{g/mL}$ + SI 100 $\mu\text{g/mL}$ sometida a calor húmedo por 51 días. Columna de empaque “fused-core”, flujo 1.0 mL/min y λ 225 nm. PD 1 y PD 2 (productos de degradación).

De igual manera se presentan los espectrogramas del PD 1 y PD 2 (Figura 6-11 y 6-12), los cuales son similares al de DAPA (Pág 84), y son iguales entre ellos bajo las tres condiciones en las que se produce degradación, demostrando que probablemente corresponden a los mismos compuestos.

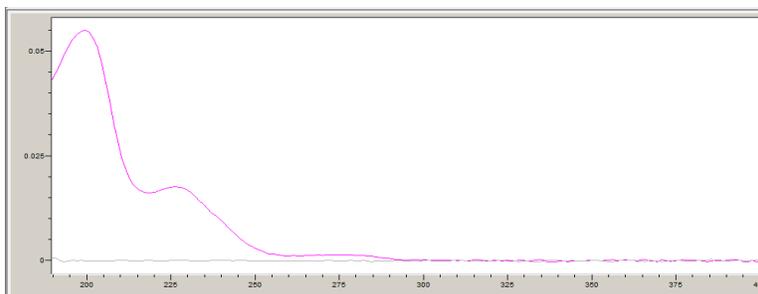


Figura 6-11. Espectrograma del PD 1. t_R 2.1 min.

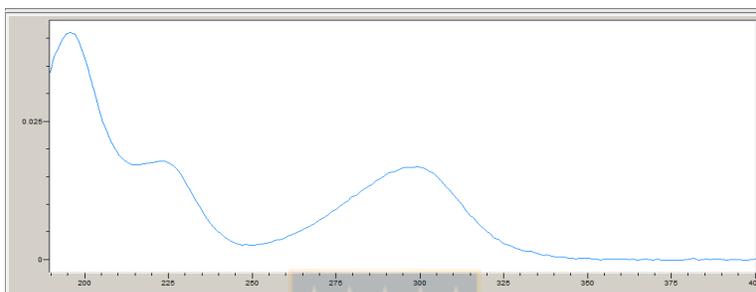


Figura 6-12. Espectrograma del PD 2. t_R 3.1 min.

Al igual como se mencionó anteriormente, si el medicamento se degrada se puede producir una disminución de su efecto terapéutico o un aumento de su toxicidad, por lo cual es muy importante determinar en qué condiciones el compuesto puede degradarse.

6.4.6. Fotólisis en estado sólido y en solución

Los resultados muestran que DAPA no es susceptible a degradación tanto por radiación UV como por radiación VIS, ya sea en estado sólido o solución. Esto queda demostrado porque luego de 7 días no hay cambios en la concentración ni se observan PD en el análisis cromatográfico realizado, lo que indica que es estable a esta condición.

6.5. Cinética de degradación

En las condiciones en que se produjo mayor degradación se evaluó la cinética, para lo cual se midieron varios puntos para obtener una curva adecuada. A continuación, se muestran los resultados.

6.5.1. Cinética de degradación con temperatura

Con esta condición, se realizó el estudio de la cinética de degradación, encontrando que la reacción es de primer orden (Figura 6-13), ya que se obtuvo una relación lineal entre el logaritmo del porcentaje remanente y el tiempo, indicando así que la degradación depende de la concentración de DAPA. Además, se calculó un $t_{90\%}$ de 44 días, lo que indica que es el tiempo necesario para que el medicamento se degrade en un 10%.

Para calcular el $t_{90\%}$, se requirió el valor de la constante de degradación (k) (Pág 75), expresada en días⁻¹, que indica que al ser pequeño este valor, el valor de $t_{90\%}$ se reflejaría en más días.

$$k \text{ (días}^{-1}\text{)} = -2.303 \times (-0.0010313)$$

$$t_{90\%} \text{ (días)} = \frac{2.303}{k} \log \frac{90}{81}$$

$$k \text{ (días}^{-1}\text{)} = 0.0024$$

$$t_{90\%} \text{ (días)} = \frac{2.303}{0.00237508} \log \frac{90}{81}$$

$$t_{90\%} \text{ (días)} = 44$$

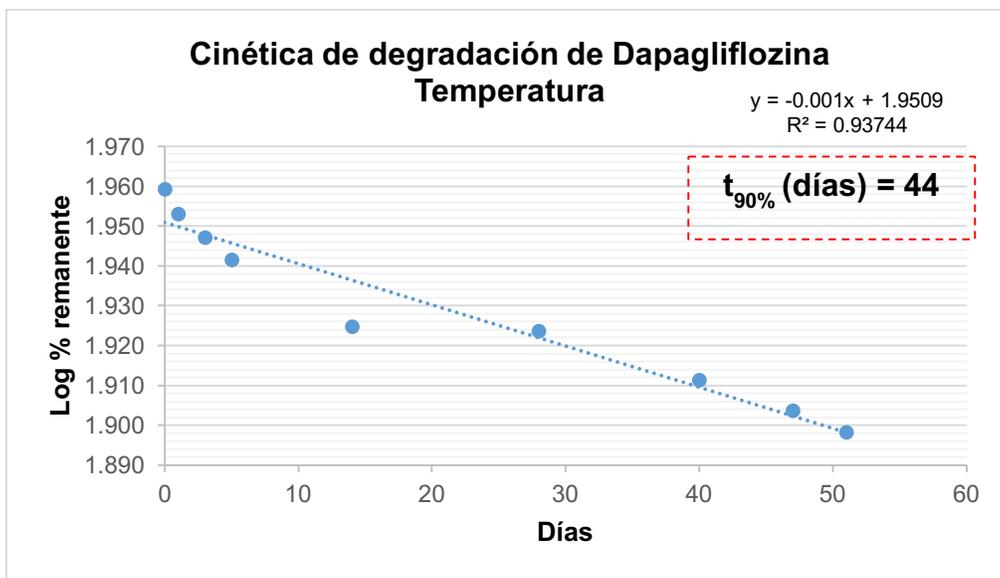


Figura 6-13. Cinética de degradación de DAPA bajo condición: Temperatura.

6.5.2. Cinética de degradación con temperatura / humedad

Al igual que con la condición de temperatura, se realizó el estudio de la cinética de degradación encontrando que la reacción es de primer orden (Figura 6-14), ya que se obtuvo una relación lineal entre el logaritmo del porcentaje remanente y el tiempo, indicando que la degradación es dependiente de la concentración de DAPA. Además, se calculó un $t_{90\%}$ de 29 días, un tiempo menor en comparación que los 44 días con temperatura (calor seco), lo que indica que este medicamento es más susceptible a la temperatura y humedad; por lo tanto, debe protegerse de ambientes húmedos.

Para calcular el $t_{90\%}$, se requirió el valor de la constante de degradación (k) (Pág 75), expresada en días^{-1} , a diferencia de la condición de

temperatura, en esta condición se obtuvo un valor de k relativamente superior, indicando un $t_{90\%}$ menor.

$$k \text{ (días}^{-1}\text{)} = -2.303 \times (-0.0015816)$$

$$t_{90\%} \text{ (días)} = \frac{2.303}{k} \log \frac{90}{81}$$

$$k \text{ (días}^{-1}\text{)} = 0.0036$$

$$t_{90\%} \text{ (días)} = \frac{2.303}{0.0036424} \log \frac{90}{81}$$

$$t_{90\%} \text{ (días)} = 29$$

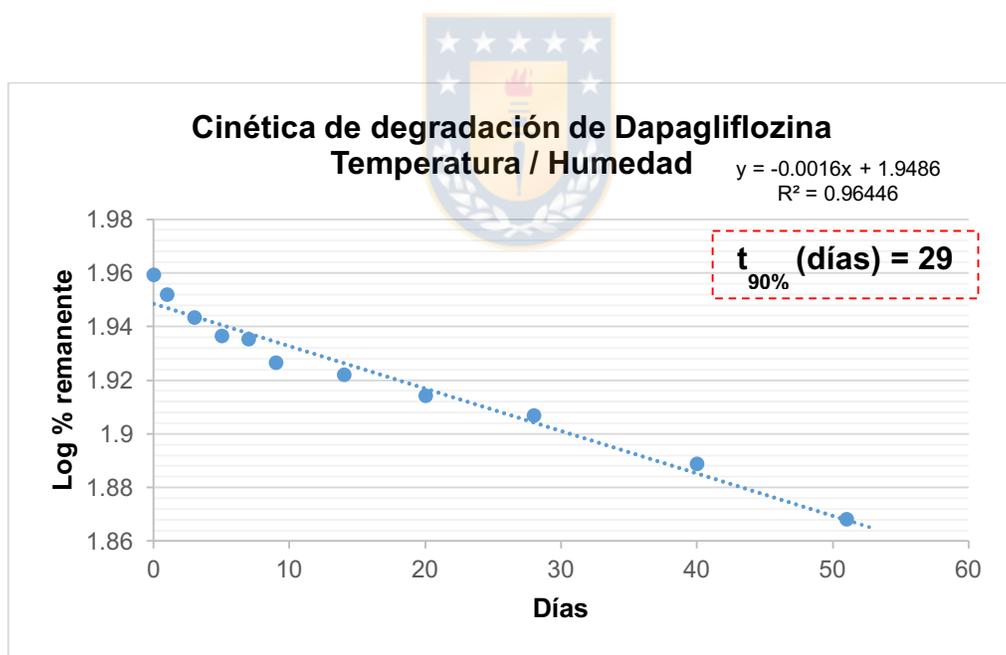


Figura 6-14. Cinética de degradación de DAPA bajo condición: Temperatura / Humedad relativa.

6.6. Método indicador de estabilidad por HPLC-ELSD

Para la optimización de método, se seleccionó la altura de DAPA como respuesta a optimizar, ya que demostró tener valores más reproducibles que el área.

Al colocar los valores de altura obtenidos junto con los factores modificados en el software estadístico se obtuvieron dos tipos de gráficos para DAPA, con esto se logró identificar el tipo de influencia de los factores sobre la respuesta obtenida y si ésta es o no significativa. Los gráficos se presentan a continuación:

Diagrama de Pareto Estandarizado para Altura

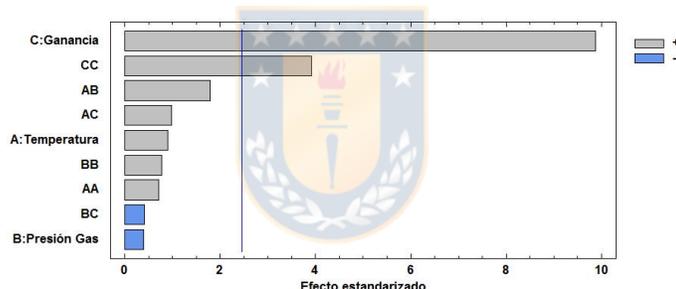


Figura 6-15. Diagrama de Pareto para DAPA.

En el diagrama de Pareto se puede apreciar las variables que tienen influencia estadísticamente significativa en la respuesta a optimizar (altura) (Figura 6-15); también es posible observar el tipo de influencia que presentan sobre dicha respuesta. En este caso se aprecia que la ganancia es la variable que tiene mayor influencia de forma significativa en la señal obtenida (altura). Es preciso indicar que ninguna posible

interacción entre los factores demostró afectar significativamente la señal o respuesta obtenida para DAPA.

Gráfica de Efectos Principales para Altura

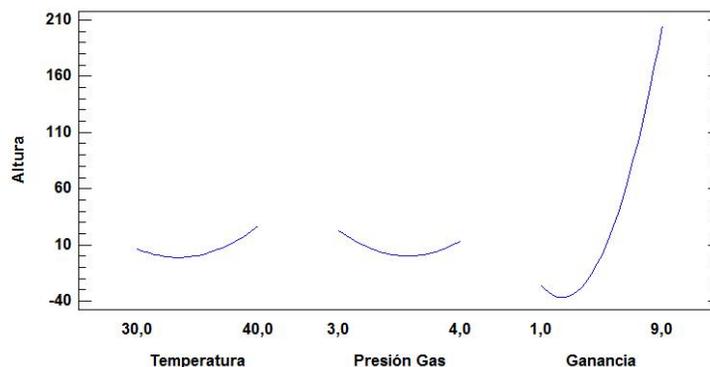


Figura 6-16. Gráfica de Efectos Principales para DAPA.

En la gráfica de efectos principales para altura de DAPA (Figura 6-16), queda demostrado que la ganancia es el factor principal que afecta significativamente la señal de DAPA. Al aumentar la ganancia se obtiene una mayor altura con respecto al pico de DAPA.

Luego de realizar el diseño factorial, se obtuvo con el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI, las condiciones óptimas: temperatura de nebulización 40°C, presión del gas 4.0 bar y la ganancia 9.

Después de optimizado el método se analizaron las muestras degradadas correspondientes a hidrólisis neutra, térmica y calor/humedad, y en ninguna de las tres condiciones se evidenció la formación de PD. Lo que demuestra que no se detectaron PD que no absorban al UV a la concentración analizada.

De igual forma se modificó la ganancia de 9 a 12 (ganancia máxima), con el objetivo de poder apreciar algún PD, pero tampoco se logró observar en las condiciones donde se obtuvo mayor porcentaje de degradación (Figura 6-17), debido a la concentración muy baja en la que pueden estar presentes. Es importante indicar que con este cambio, se obtuvo una buena respuesta en el pico de DAPA y SI y se corrobora los t_R (4.92 min - DAPA y 4.43 min - SI) con los obtenidos con el método HPLC-DAD.

Un factor a considerar es la menor sensibilidad de este tipo de detector en comparación al detector UV, lo que pudiera atribuirse al resultado obtenido (Cleaver & Bullock, 2015; Lafosse, Dreux, Morin-Allory, & Colin, 1985; Megoulas & Koupparis, 2005; Stolyhwo, Colin, & Guiochon, 1983). De esta forma no se pudo detectar los PD detectados con el detector DAD, considerando que la señal de ellos es bastante menor en comparación con la señal de DAPA.

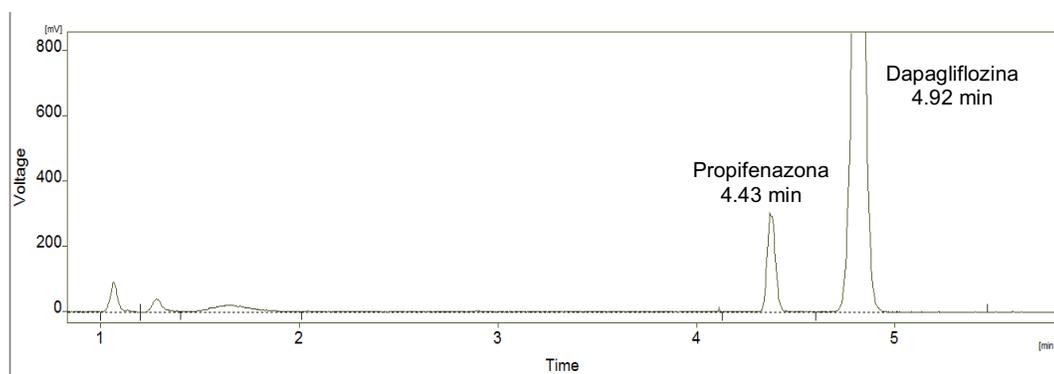


Figura 6-17. Cromatograma de hidrólisis neutra utilizando HPLC-ELSD. Representativo de una muestra de DAPA 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + SI 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sometida a hidrólisis neutra por 12 días. Columna de empaque “fused-core”, flujo 1.0 mL/min y λ 225 nm.

6.7. Método HPLC-DAD-ESI-MS/MS para la detección de DAPA y derivados

De manera cualitativa, mediante HPLC-DAD-ESI-MS/MS se obtuvo el espectro de masas de DAPA estándar y se logró la identificación preliminar de dos posibles PD de DAPA y la detección de dos sin ser identificados. Las condiciones finales utilizadas en el espectrómetro de masas fueron: modo de ionización, negativa; temperatura de secado, 350°C; potencial de desagrupación (DP) – 40 V; potencial de entrada (EP) – 7 V; potencial de salida de la celda de colisión, – 3500 V; gas nebulizador, 35 psi; gas de secado, 25 psi; gas cortina, 30 psi; energía de colisión (CE), – 25 y rango de masas a analizar, 100 – 800 m/z .

En la figura 6-18, se presenta el espectro de masas de DAPA estándar cuyo ión molecular tiene m/z 453, este valor pertenece al aducto con el ácido fórmico. El patrón de fragmentación de DAPA estándar es: m/z 353, 341, 329, 317, 301, 287, lo que coincide con lo publicado por Aubry et al., 2010 y Obermeier et al., 2010. Los fragmentos 317 y 287 m/z pueden explicarse por la ruptura del azúcar, lo cual es sustentado por los autores Cuyckens & Claeys, 2004. En la tabla 6-18 se presentan los iones moleculares y fragmentos para DAPA y PD, y en las condiciones de degradación (hidrólisis neutra, temperatura y temperatura/humedad) en las que se presentaron los PD. Para los PD se puede observar que los iones productos coinciden con posibles pérdidas de moléculas de H₂O. Además, se presentan dos PD desconocidos cuya estructura no se logró

identificar debido a que los espectros obtenidos no entregan suficiente información y hasta el momento no se ha encontrado alguna publicación en donde estén descritos.



Tabla 6-18. Método HPLC-DAD-ESI-MS/MS para la identificación de DAPA y PD.

Compuesto	tR (min)	Ion molecular [M-H] ⁻ (m/z)	Fragmentos hijos (m/z)	Hidrólisis neutra	Temperatura	Temperatura / Humedad	Referencias
PD 1	4.7	469 (523)	423, 333, 195, 345	X	X	X	(Karumanchi et al., 2020; Obermeier et al., 2010; "TLC Pharmaceutical Standards. DAPAGLIFLOZIN (D-6230)," ; Xu et al., 2014)
Desconocido 1	6.3	453	347, 385, 411, 225, 333	-	X	-	-
PD 2	6.5	467	343, 421, 331, 403, 367, 301	X	X	X	("TLC Pharmaceutical Standards. DAPAGLIFLOZIN (D-6229),")
Desconocido 2	8.6	537	375, 417, 443, 331, 399	-	-	X	-
DAPA	10.6	453	329, 317, 301, 353, 287, 341	X	X	X	Comparación con estándar

DAPA, dapagliflozina; MS, espectrometría de masas; PD, productos de degradación; t_R, tiempo de retención

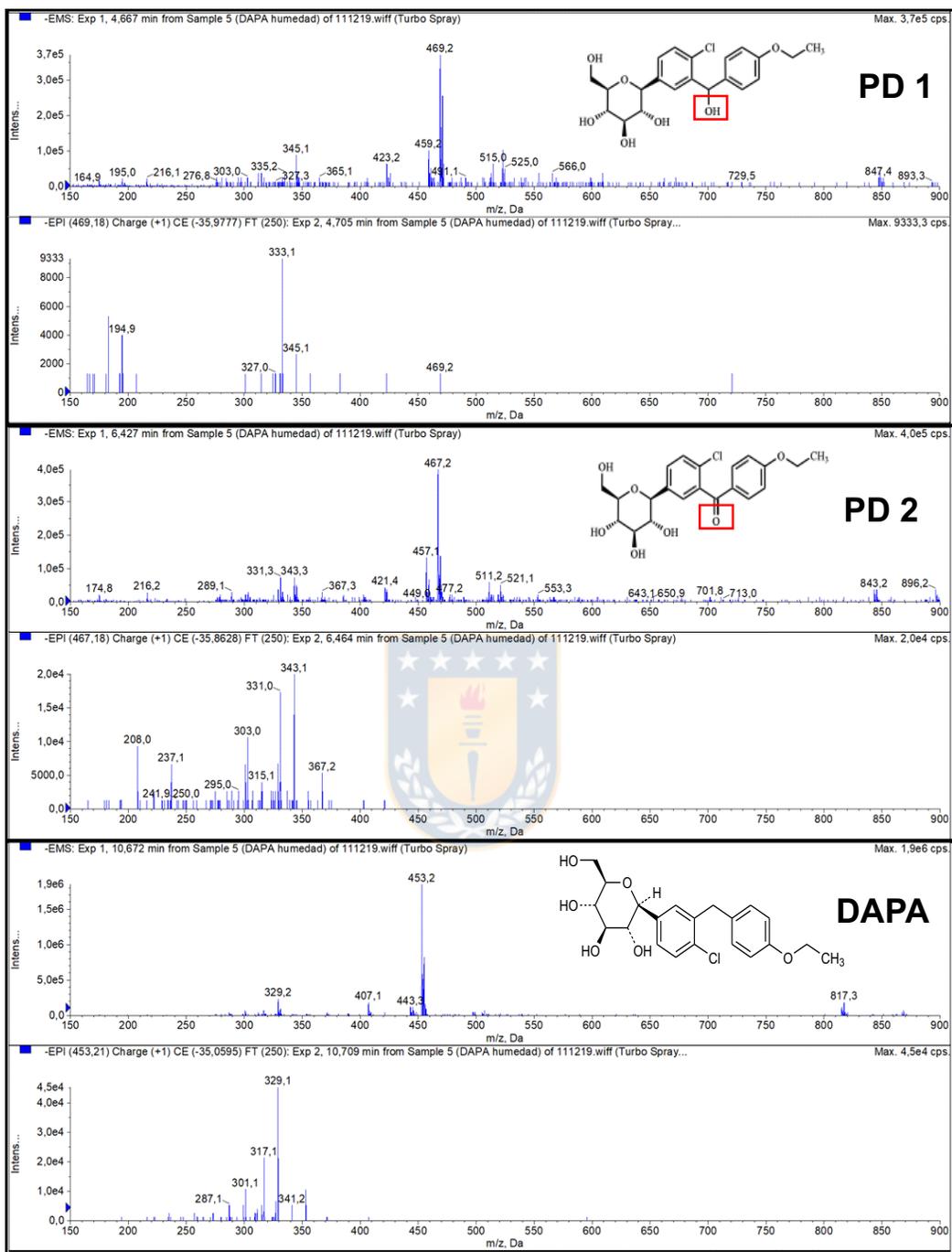


Figura 6-18. Espectros de masa de PD 1, PD 2 y DAPA obtenidos de la condición de degradación: Temperatura / Humedad relativa a los t_R que se observan en la Tabla 6-18.

De acuerdo a la literatura analizada, se reportó un estudio en el cual validaron una metodología por LC-MS/MS para la determinación de DAPA en plasma de ratones sanos y enfermos; esta metodología empleó el modo de ionización negativa al igual que utilizan ácido fórmico para la formación del aducto (Aubry et al., 2010).

De acuerdo al estudio preliminar, durante las condiciones de hidrólisis neutra, temperatura y temperatura / humedad, a la molécula de DAPA pudo ocurrirle una auto-oxidación en su grupo bencílico generando así el PD 1 (hidroxilación bencílica dapagliflozina; m/z 423) y PD 2 (oxo dapagliflozina; m/z 421) (Figura 6-18), respectivamente (Baertschi et al., 2011). Ambos PD corresponden a metabolitos minoritarios de la DAPA, debido a que la misma se metaboliza predominantemente a través de la UGT1A9 a otro metabolito inactivo el cual es la dapagliflozina 3-O-glucorónido siendo este el metabolito primario de la DAPA (Ganorkar et al., 2020; Komoroski et al., 2009). A pesar de que sean minoritarios estos metabolitos, son importantes debido a que si la molécula de DAPA se degrada y forma estos PD que son similares a los metabolitos, se infiere que puede ocurrir una pérdida de la potencia del medicamento lo que conlleva a una pérdida de la actividad terapéutica para el cual fue provisto. La vía metabólica por hidroxilación se puede justificar por diversos autores, en donde establecen que este producto se puede originar en pequeños niveles y son excretados a través de la orina o heces (Karumanchi et al., 2020; Obermeier et al., 2010; Xu et al., 2014).

6.8. Cuantificación de dapagliflozina propanodiol monohidrato en presentaciones comerciales.

Los resultados de la determinación de la potencia de comprimidos comerciales de 10 mg de DAPA, se muestran en la Tabla 6-19.

Tabla 6-19. Cuantificación de dapagliflozina propanodiol monohidrato en presentaciones comerciales.

Producto	Porcentaje medido (%)	Contenido (mg)
DAPA (Lote 1)	91.25 ± 0.27	9.13
DAPA (Lote 2)	91.39 ± 0.17	9.14
DAPA / MET	90.97 ± 0.29	9.10

A pesar de que para este producto no se encuentra un método oficial dentro de la USP, se considera que las tres presentaciones pertenecientes al mismo laboratorio farmacéutico, cumplieron con los requisitos, debido a que la USP establece que para un producto farmacéutico la cantidad de principio activo debe estar entre un 90 -110% de lo señalado en el envase.

Cabe indicar que en los cromatogramas de las tres muestras no se observó la presencia de PD, lo cual demostraría que el producto no se ha degradado (Figura 6-19). Es importante tener en cuenta que, aunque los resultados de los tres productos están dentro de los límites, el valor está muy cerca del límite inferior del 90%, y el producto se analizó

aproximadamente 18 meses antes de la fecha de vencimiento. Por lo tanto, es posible que el producto se degrade durante su almacenamiento, con lo cual, su contenido de DAPA sería inferior al 90%.

Es importante resaltar que se realizó el espectro UV de los picos que aparecieron a un t_R de 2.3 y 2.5 minutos para determinar si podían corresponder a PD de DAPA, y se concluyó que estos no se relacionan con los espectros de los PD de DAPA (Figura 6-20 y 6-21).

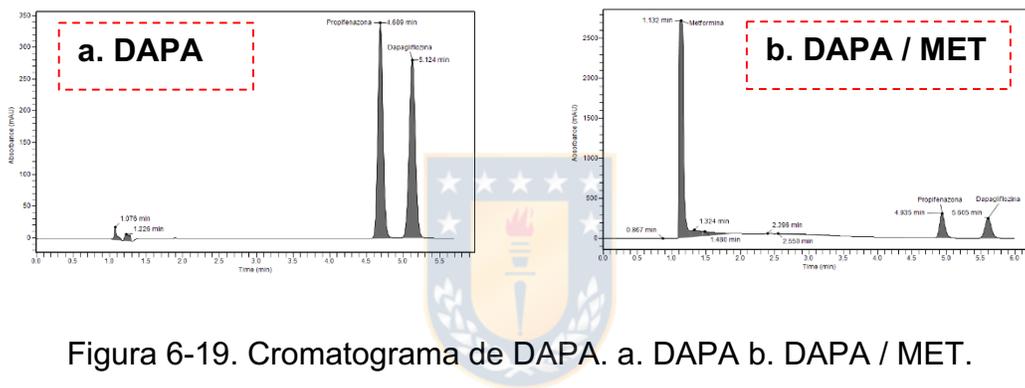


Figura 6-19. Cromatograma de DAPA. a. DAPA b. DAPA / MET.

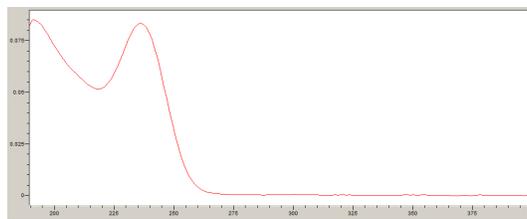


Figura 6-20. Espectrograma referente al t_R 2.3 min.

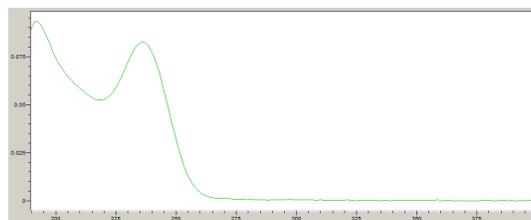


Figura 6-21. Espectrograma referente al t_R 2.5 min.

7. LIMITACIONES

- ✓ Durante este trabajo debido a la poca literatura actual disponible, se dificultó el poder definir si son o no activos los PD detectados e identificados como metabolitos minoritarios. En este trabajo no se incluyó este tipo de estudio que permitiera establecer este argumento.



8. CONCLUSIONES

- ✓ Se logró desarrollar y optimizar un método indicador de estabilidad por HPLC-DAD para la determinación de DAPA que puede ser utilizado en estudios de estabilidad y en control de calidad del compuesto.
- ✓ Como FM se utilizó ACN: H₂O (35 : 65 v/v) y como fase estacionaria una columna “fused-core” C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm), a una λ de 225 nm y un flujo de 1.0 mL/min.
- ✓ El método desarrollado es indicador de estabilidad, porque permitió la determinación de DAPA en presencia de sus PD sin interferencias.
- ✓ El método validado resultó ser lineal en un rango de 50 - 150 µg/mL, exacto, preciso, selectivo, robusto y con límites de detección y cuantificación adecuados.
- ✓ El estudio de estabilidad de DAPA arrojó que es inestable en condiciones de hidrólisis neutra, temperatura y temperatura-humedad, con formación de 2 PD, y que es estable bajo condiciones de hidrólisis ácida, básica, oxidación y fotólisis.
- ✓ La condición de degradación que fue más susceptible fue bajo temperatura / humedad, por lo tanto, DAPA se debe almacenar en lugares frescos y secos, evitando altas temperaturas y lugares húmedos.

- ✓ Las cinéticas de degradación evaluadas, tanto para la condición de temperatura como temperatura / humedad, siguió un patrón de cinética de primer orden, indicando de esta manera que la degradación es dependiente de la concentración de DAPA y el $t_{90\%}$ calculado fue de 44 y 29 días, respectivamente.
- ✓ El método por HPLC-ELSD resultó ser adecuado para la determinación de DAPA, no obstante, no se detectó ningún PD que no presentara absorción al UV a la concentración analizada.
- ✓ A través de HPLC-DAD-ESI-MS/MS se obtuvo el espectro de masas de DAPA estándar y se logró la identificación preliminar de dos posibles PD que presentaron la misma estructura química que dos metabolitos minoritarios de DAPA (hidroxilación bencílica dapagliflozina y oxo dapagliflozina). De igual manera se detectaron 2 PD más sin ser identificados.
- ✓ La potencia en presentaciones comerciales de DAPA se encuentra dentro de los rangos indicados por la USP (90 - 110%).

9. GLOSARIO

ACN: Acetonitrilo

CE: Energía de colisión

CFS: Cromatografía de fluidos supercríticos

CV: Coeficiente de variación

DAD: Detector de arreglo de diodos

DAPA: Dapagliflozina

DM: Diabetes mellitus

DMSO: Dimetilsulfóxido

DP: Potencial de desagrupación

DPP-4: Inhibidores de la dipeptidil peptidasa

DS: Desviación estándar

ELSD: Detector evaporativo de dispersión de la luz

EP: Potencial de entrada

EPAR: Informe Público Europeo de evaluación

ESI: Ionización por electrospray

FE: Fase estacionaria

FM: Fase móvil

FO: Fase orgánica

GC: Cromatografía de gases

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HCl: Ácido clorhídrico

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

HPTLC: Cromatografía en capa fina de alta resolución

ICH: Conferencia Internacional de Armonización

K₂HPO₄: Fosfato de potasio dibásico

LC: Cromatografía líquida

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

MeOH: Metanol

MET: Metformina

MRM: Monitoreo de reacción múltiple

MS: Espectrometría de masas

N: Número de platos teóricos

NaCl: Cloruro de sodio

NaOH: Hidróxido de sodio

PD: Productos de degradación

RSD: Desviación estándar relativa

R_s: Resolución

SACA: Sur y Centro América

SGLT2: Inhibidores del cotransportador de sodio - glucosa 2

T: Factor de cola

TFG: Tasa de filtración glomerular

t_R: Tiempo de retención

UGT: Uridina difosfato glucuronil transferasa

UHPLC: Cromatografía líquida de ultra alta - resolución

USP: Farmacopea de los Estados Unidos de América



UV: Ultravioleta

VIS: Visible

λ : Longitud de onda



10. BIBLIOGRAFÍA

- Adamovics, J. A. (1997). *Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals* (2nd ed.): Marcel Dekker, Inc.
- Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Anexo I. FICHA TÉCNICA O RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO. FORXIGA. Retrieved from https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/forxiga-epar-product-information_es.pdf
- Ahuja, S., & Dong, M. W. (2005). *HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL ANALYSIS BY HPLC*. United Kingdom: Elsevier Inc.
- Albarrán, O. G., & Ampudia-Blasco, F. J. (2013). Dapagliflozina, el primer inhibidor SGLT 2 en el tratamiento de la diabetes tipo 2. *Medicina Clínica*, 141, 36-43. doi:10.1016/s0025-7753(13)70062-9
- Allel, L., López, C., & Puccio, J. M. (2012). Protocolo de referencia y contrarreferencia en Diabetes Mellitus. Retrieved from http://www.ssmn.cl/descargas/protocolos_referencia_contrareferencia/hospital_clinico_san_jose/endocrinologia/diabetes_mellitus.pdf
- Alsante, K. M., Ando, A., Brown, R., Ensing, J., Hatajik, T. D., Kong, W., & Tsuda, Y. (2007). The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. *Adv Drug Deliv Rev*, 59(1), 29-37. doi:10.1016/j.addr.2006.10.006

- Ameeduzzafar, El-Bagory, I., Alruwaili, N. K., Imam, S. S., Alomar, F. A., Elkomy, M. H., . . . Elmowafy, M. (2019). Quality by design (QbD) based development and validation of bioanalytical RP-HPLC method for dapagliflozin: Forced degradation and preclinical pharmacokinetic study. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 43(1-2), 53-65. doi:10.1080/10826076.2019.1667820
- Aswini, R., Eswarudu, M. M., & Babu, P. S. (2018). A novel RP-HPLC method for simultaneous estimation of dapagliflozin and saxagliptin in bulk and pharmaceutical dosage form. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(12). doi:10.13040/ijpsr.0975-8232.9(12).5161-67
- Aubry, A.-F., Gu, H., Magnier, R., Morgan, L., Xu, X., Tirmenstein, M., . . . Arnold, M. (2010). Validated LC–MS/MS methods for the determination of dapagliflozin, a sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor in normal and ZDF rat plasma. *Bioanalysis*, 2(12), 2001–2009. doi:10.4155/BIO.10.139
- Aubry, A.-F., Tattersall, P., & Ruan, J. (2009). Development of Stability Indicating Methods. In S. S. B. Media (Ed.), *Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development* (pp. 139-161).
- Aulton, M. E. (2004). *Farmacia: La ciencia del diseño de las formas farmacéuticas* (2da ed.). España: ELSERVIER.
- Aylsworth, A., Dean, Z., VanNorman, C., & Nkemdirim Okere, A. (2014). Dapagliflozin for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Ann*

Pharmacother, 48(9), 1202-1208.

doi:10.1177/1060028014540450

Ayoub, B. M., & Mowaka, S. (2017). LC-MS/MS Determination of Empagliflozin and Metformin. *J Chromatogr Sci*, 55(7), 742-747.

doi:10.1093/chromsci/bmx030

Ayoub, B. M., Mowaka, S., Elzanfaly, E. S., Ashoush, N., Elmazar, M. M., & Mousa, S. A. (2017). Pharmacokinetic Evaluation of Empagliflozin in Healthy Egyptian Volunteers Using LC-MS/MS and Comparison with Other Ethnic Populations. *Sci Rep*, 7(1), 2583. doi:10.1038/s41598-017-02895-7

Baertschi, S. W., Alsante, K. M., & Reed, R. A. (2011). *Pharmaceutical Stress Testing Predicting Drug Degradation* (2nd ed. Vol. 210). USA: Informa Healthcare.

Baira, S. M., Kalariya, P. D., Nimbalkar, R., Garg, P., Srinivas, R., & Talluri, M. (2018). Characterization of forced degradation products of canagliflozine by liquid chromatography/quadropole time-of-flight tandem mass spectrometry and in silico toxicity predictions.

Rapid Commun Mass Spectrom, 32(3), 212-220.

doi:10.1002/rcm.8032

Bakshi, M., & Singh, S. (2002). Development of validated stability-indicating assay methods—critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28, 1011–1040.

Bayo, A. G. d. M., & Marco, D. J. Y. (2016). *HPLC instrumental*. Valencia: Universitat Politècnica de Valencia.

- Blessy, M., Patel, R. D., Prajapati, P. N., & Agrawal, Y. K. (2014). Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs-A review. *J Pharm Anal*, 4(3), 159-165. doi:10.1016/j.jpha.2013.09.003
- Bronson, J., Black, A., Dhar, T. G. M., Ellsworth, B. A., & Merritt, J. R. (2013). To Market, To Market—2012. In (pp. 471-546).
- Carstensen, J. T., & Rhodes, C. T. (2000). *Drug Stability Principles and Practices* (3rd ed. Vol. 107). USA: Marcel Dekker, Inc.
- Cleaver, G., & Bullock, S. (2015). Developments in ELSD Technology to Improve Sensitivity and Linearity of Response over a Wider Dynamic Range. Retrieved from <https://www.chromatographytoday.com/article/autosamplers/36/agilent-technologies/developments-in-elsd-technology-to-improve-sensitivity-and-linearity-of-response-over-a-wider-dynamic-range/1862>
- Connors, K. A., Amidon, G. L., & Stella, V. J. (1986). *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A handbook for pharmacists* (2nd ed.). USA: John Wiley & Sons Inc.
- Deepan, T., & Dhanaraju, M. D. (2018). Stability indicating HPLC method for the simultaneous determination of dapagliflozin and saxagliptin in bulk and tablet dosage form. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 31(1), 39-43. doi:10.1515/cipms-2018-0009
- Deepan, T., Rao, M. V. B., & Dhanaraju, M. D. (2017). Development of Validated Stability Indicating Assay Method for Simultaneous

Estimation of Metformin and Dapagliflozin by RP- HPLC. *European Journal of Applied Sciences* 9(4), 189-199.
doi:10.5829/idosi.ejas.2017.189.199

Departamento de Epidemiología. ENCUESTA NACIONAL DE SALUD 2016-2017 Primeros resultados. Retrieved from https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/11/ENS-2016-17_PRIMEROS-RESULTADOS.pdf

Dias, B. C. L., Fachi, M. M., de Campos, M. L., Degaut, F. L. D., Peccinini, R. G., & Pontarolo, R. (2019). A new HPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of SGLT2 inhibitors and metformin in plasma and its application to a pharmacokinetic study in healthy volunteers. *Biomed Chromatogr*, 33(11), e4663.
doi:10.1002/bmc.4663

El-Zaher, A. A., Hashem, H. A., Elkady, E. F., & Allam, M. A. (2019). A validated LC-MS/MS bioanalytical method for the simultaneous determination of dapagliflozin or saxagliptin with metformin in human plasma. *Microchemical Journal*, 149.
doi:10.1016/j.microc.2019.104017

Farmacopea de los Estados Unidos de América / Formulario Nacional (USP 40 / FN 35). (2017). Twinbrook Parkway, Rockville: United Book Press Inc.

Farxiga (dapagliflozin) tablets. (2014). Retrieved from https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2019/202293s015lbl.pdf

FDA. (2015). La FDA actualiza las etiquetas de los inhibidores del SGLT2 para la diabetes a fin de incluir advertencias sobre concentraciones de ácido demasiado altas en la sangre e infecciones graves del tracto urinario. Retrieved from <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/la-fda-actualiza-las-etiquetas-de-los-inhibidores-del-sgl2-para-la-diabetes-fin-de-incluir>

Ficha Técnica Forxiga 10 mg. Comprimidos recubiertos con película. Retrieved from https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/112795007/FT_112795007.html

Ficha Técnica Xigduo 5 mg / 1000 mg comprimidos recubiertos con película. Retrieved from https://cima.aemps.es/cima/dohtml/ft/113900009/FT_113900009.html

Game, M. D., & Bopudi, N. (2018). Development and Validation of Stability Indicating HPLC Method for Estimation of Dapagliflozin in Marketed Formulation. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research*, 12(3), 123-144.

Ganorkar, S. B., Sharma, S. S., Patil, M. R., Bobade, P. S., Dhote, A. M., & Shirkhedkar, A. A. (2020). Pharmaceutical Analytical Profile for Novel SGL-2 Inhibitor: Dapagliflozin. *Crit Rev Anal Chem*, 1-13. doi:10.1080/10408347.2020.1777524

Gennaro, A. R. (1987). *Remington Farmacia* (17th ed.). Buenos Aires Editorial Médica Panamericana S.A.

Gobierno de Chile. Ministerio de Salud. Guía de Práctica Clínica Tratamiento Farmacológico de la Diabetes Mellitus tipo 2. 2016-2017. Retrieved from https://diprece.minsal.cl/wrdprss_minsal/wp-content/uploads/2018/01/DIABETES-MELLITUS-TIPO-2-1.pdf

Goday, S., Shaik, A. R., & Avula, P. (2018). Development and Validation of a LC-ESI-MS/MS Based Bioanalytical Method for Dapagliflozin and Saxagliptin in Human Plasma. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 52(4s), S277-S286. doi:10.5530/ijper.52.4s.108

Guillermina, M., & Quiroga, P. (2013). *Análisis farmacéutico*. Buenos Aires: Editorial de la Universidad de la Plata.

Hadi, S. A., & P, B. R. K. (2017). Simultaneous estimation of metformin and dapagliflozin tablets by RP-HPLC. *WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 6(11), 1188-1199. doi:10.20959/wjpps201711-10476

Hassib, S. T., Taha, E. A., Elkady, E. F., & Barakat, G. H. (2019). Validated Liquid Chromatographic Method for the Determination of (Canagliflozin, Dapagliflozin or Empagliflozin) and Metformin in the Presence of (1-Cyanoguanidine). *J Chromatogr Sci*, 57(8), 697-707. doi:10.1093/chromsci/bmz042

Hsia, D. S., Grove, O., & Cefalu, W. T. (2017). An Update on SGLT2 Inhibitors for the Treatment of Diabetes Mellitus. *Current Opinion*

in Endocrinology, Diabetes and Obesity, 24(1), 73-79.

doi:10.1097/MED.0000000000000311

ICH Harmonized Tripartite Guideline, Photostability Testing of New Drug Substances and Products, Q1B. (1996). Geneva, Switzerland.

ICH Harmonized Tripartite Guideline, Stability testing of new drug substances and products, Q1A (R2). (2003). Geneva, Switzerland.

ICH Harmonized Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). (1994).

Illendula, S., Niranjana, B., Kumar, K. P., Rao, G. K., Rao, K. N. V., & Dutt, K. R. (2018). Development and validation of stability indicating quantitative estimation of dapagliflozin in bulk and pharmaceutical dosage form by RP-HPLC. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences* 05(01), 615-620.

Informe mundial sobre la Diabetes. Organización Mundial de la Salud (2016). Retrieved from <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254649/9789243565255-spa.pdf?sequence=1>

International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. (2019). 9th Retrieved from https://diabetesatlas.org/upload/resources/material/20200121_115939_2407-IDF-Advocacy-Guide-SP-Final-lowres-210120.pdf

Ji, Q. C., Xu, X. H., Ma, E., Liu, J., Basdeo, S., Liu, G. W., . . . Arnold, M. E. (2015). Selective Reaction Monitoring of Negative Electrospray Ionization Acetate Adduct Ions for the Bioanalysis of Dapagliflozin

in Clinical Studies. *Analytical Chemistry*, 87(6), 3247-3254.

doi:10.1021/ac5037523

Kalyan, S., & Parle, A. (2019). A Validated LC-MS/MS Method for Determination of Dapagliflozin in Tablet Formulation. *iOSR Journal of Pharmacy* 9(8), 01-06.

Karumanchi, K., Natarajan, S. K., Chavakula, R., Korupolu, R. B., Bonige, K. B., & Peruri, B. G. (2020). Synthesis of metabolites of dapagliflozin: an SGLT2 inhibitor. *Journal of Chemical Sciences*, 132(1). doi:10.1007/s12039-020-1747-x

Kazi, M., Alqahtani, A. A., Alsaadi, B. S., Alkholief, M., & Alanazi, F. K. (2019). UHPLC Method Development for Determining Sitagliptin and Dapagliflozin in Lipid-Based Self-Nanoemulsifying Systems as Combined Dose in Commercial Products and its Application to Pharmacokinetic Study of Dapagliflozin in Rats. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 53(1), 79-87. doi:10.1007/s11094-019-01959-4

Kirkland, J. J., Schuster, S. A., Johnson, W. L., & Boyes, B. E. (2013). Fused-core particle technology in high-performance liquid chromatography: An overview. *J Pharm Anal*, 3(5), 303-312. doi:10.1016/j.jpha.2013.02.005

Kohler, M., Haerdi, W., Christen, P., & Veuthey, J.-L. (1997). The evaporative light scattering detector: some applications in pharmaceutical analysis. *Trends in analytical chemistry*, 16(8).

- Kommineni, V., K.P.R.Chowdary, & S.V.U.M.Prasad. (2017). Development of a new stability indicating RP-HPLC method for simultaneous estimation of saxagliptine and dapagliflozin and its validation as per ich guidelines. *INDO AMERICAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 4(09), 2920-2932. doi:10.5281/zenodo.892231
- Komoroski, B., Vachharajani, N., Boulton, D., Kornhauser, D., Gerald, M., Li, L., & Pfister, M. (2009). Dapagliflozin, a novel SGLT2 inhibitor, induces dose-dependent glucosuria in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther*, 85(5), 520-526. doi:10.1038/clpt.2008.251
- Lafosse, M., Dreux, M., Morin-Allory, L., & Colin, J. M. (1985). Some Applications of a Commercial Light Scattering Detector for Liquid Chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography*, 8, 39-41.
- Lucena, R., Cárdenas, S., & Valcárcel, M. (2007). Evaporative light scattering detection: trends in its analytical uses. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388, 1663 - 1672 doi:10.1007/s00216-007-1344-6
- Lund, W. (1994). *The Pharmaceutical Codex* (12th ed.). London The Pharmaceutical Press.
- Mabrouk, M. M., Soliman, S. M., El-Agizy, H. M., & Mansour, F. R. (2019). A UPLC/DAD method for simultaneous determination of empagliflozin and three related substances in spiked human plasma. *BMC Chem*, 13(1), 83. doi:10.1186/s13065-019-0604-9

- Mabrouk, M. M., Soliman, S. M., El-Agizy, H. M., & Mansour, F. R. (2020). Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for determination of three gliflozins in human plasma by HPLC/DAD. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 1136, 121932. doi:10.1016/j.jchromb.2019.121932
- Maggio, R. M., Vignaduzzo, S. E., & Kaufman, T. S. (2013). Practical and regulatory considerations for stability-indicating methods for the assay of bulk drugs and drug formulations. *Trends in analytical chemistry*, 49, 57-70. doi:10.1016/j.trac.2013.05.008
- Mante, G. V., Hemke, A. T., & Umekar, M. J. (2018). RP-HPLC Method for Estimation of Dapagliflozin from its Tablet. *International Journal of ChemTech Research*, 11(1), 242-248.
- Megoulas, N. C., & Koupparis, M. A. (2005). Twenty Years of Evaporative Light Scattering Detection. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 35(4), 301–316. doi:10.1080/10408340500431306
- Merck. Columnas para HPLC Chromolith® monolíticas. Retrieved from http://www.merckmillipore.com/CL/es/products/analytcs-sample-prep/chromatography-for-analysis/analytical-hplc/chromolith-hplc-columns/chromolith-monolithic-hplc-columns/okmb.qB.YSYAAAE_fBB3.Lxj,nav
- Merck. (2008-2009). ChromBook 2008/09. Chromatography at Merck - Experience drives Innovation. Retrieved from http://www.hplc.eu/Downloads/Merck_ChromBook_2008_09.pdf

- Merck. (2020a). Ascentis® Express C18, 5 µm HPLC Columns. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=111065793>
- Merck. (2020b). Fused-Core Columns Technology. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/hplc/columns/ascentis-express/fused-core-advantage.html>
- Miller, J. (2005). *Chromatography. Concepts and Contrasts* (2nd ed.). New Jersey: Jhon Wiley & Sons, Inc.
- Moffat, A. C., Osselton, M. D., & Widdop, B. (2011). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material* (4th ed.). United Kingdom: Pharmaceutical Press
- Moldoveanu, S. C., & David, V. (2013). *Essentials in Modern HPLC Separations*. USA: Elsevier Inc.
- Nasser, S., Salama, I., Mostafa, S. M., & Elgawish, M. S. (2018). Comparative high-performance liquid chromatographic and high-performance thin-layer chromatographic study for the simultaneous determination of dapagliflozin and metformin hydrochloride in bulk and pharmaceutical formulation. *JPC - Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 31(6), 469-476. doi:10.1556/1006.2018.31.6.7
- Niguram, P., & Kate, A. S. (2019). Structural characterization of forced degradation products of empagliflozin by high resolution mass

spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 42(13-14), 417-428.
doi:10.1080/10826076.2019.1625368

Nuñez, O. (2008). Columnas monolíticas de base sílice: propiedades, preparación, modificaciones químicas y aplicaciones en cromatografía de líquidos. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/267509003_Columnas_monoliticas_de_base_silice_propiedades_preparacion_modificaciones_quimicas_y_aplicaciones_en_cromatografia_de_liquidos

Obermeier, M., Yao, A. K., Koplowitz, B., Zhu, M., Li, W., Komoroski, B., . . . Humphreys, W. G. (2010). In Vitro Characterization and Pharmacokinetics of Dapagliflozin (BMS-512148), a Potent Sodium-Glucose Cotransporter Type II Inhibitor, in Animals and Humans. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 38(3), 405–414.

Omar, M. A., Ahmed, H. M., Abdel Hamid, M. A., & Batakoushy, H. A. (2019). New spectrofluorimetric analysis of dapagliflozin after derivatization with NBD-Cl in human plasma using factorial design experiments. *Luminescence*, 34(6), 576-584.
doi:10.1002/bio.3640

Organización Mundial de la Salud (OMS). Diabetes. Retrieved from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>

Organización Panamericana de la Salud (OPS). Diabetes. Retrieved from https://www.paho.org/chi/index.php?option=com_content&view=article&id=178:diabetes&Itemid=1005

Pachore, S. S., Akula, S., Aaseef, M., Usha Jyothi, M., Vemuri, S., Prakash, L. R., . . . Dahanukar, V. H. (2017). Synthesis and Characterization of Potential Impurities of Canagliflozin. *ChemistrySelect*, 2(28), 9157-9161. doi:10.1002/slct.201701973

Patel, A. B., Patel, D. R., & Shah, Z. (2017). Development and validation of stability indicating method for the simultaneous estimation of Saxagliptin Hydrochloride and Dapagliflozin using RP HPLC method in tablet dosage form. *WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 6(10), 444-458. doi:10.20959/wjpps201710-10263

Patel, D. C. J. (2017). Simultaneous Estimation of Dapagliflozin in Api and Pharmaceutical Dosage Form by Development and Stability Indicating Hplc Method. *WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 1618-1632. doi:10.20959/wjpps20177-9601

PerkinElmer. (2013). Chromera User's Guide. In. USA.

Phenomenex. (2020). Tecnología Core-Shell de UHPLC/HPLC para BioSeparaciones. Retrieved from <https://www.phenomenex.com/Products/AerisDetail/Aeris?culture=es>

Poretzky, L. (2010). *Principles of Diabetes Mellitus* (2nd ed.). USA: Springer.

Prameela, K. L., Veni, P. R. K., Narayana, P. V. V. S., & Babu, B. H. (2017). Development and validation of stability indicating reverse Phase high performance liquid chromatography method with Photodiode array detection for the simultaneous estimation of hypoglycemic agents, Dapagliflozin and Metformin. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 8(3), 328-336. doi:10.22376/ijpbs.2017.8.3.p328-336

PubChem. Dapagliflozin Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9887712> - section=Top

Pulido, H. G., & Salazar, R. d. I. V. (2008). *Análisis y diseño de experimentos* (2da ed.). México McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S.A.

Quattrocchi, O., Abelaira, S., & Laba, R. (1992). *Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica*. Argentina.

Rubinson, K. A., & Rubinson, J. F. (2001). *Análisis Instrumental*. España: Pearson Educación S.A

Sanagapati, M., K, D., G, N. R., & S, S. (2014). Development and Validation of stability-Indicating RP-HPLC method for determination of Dapagliflozin. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, 4(3), 350-353.

- Sciex. (2018). Serie de instrumentos 3200. Guía del usuario del sistema. Retrieved from <https://sciex.com/Documents/manuals/3200-system-user-guide-es.pdf>
- SEDERE. (2020). The Low-Temperature Evaporative Light-Scattering Detector (LT-ELSD). Retrieved from <http://www.sedere.com/the-low-temperature-evaporative-light-scattering-detector-lt-elsd/>
- Shah, P. A., Shrivastav, P. S., Shah, J. V., & George, A. (2019). Simultaneous quantitation of metformin and dapagliflozin in human plasma by LC-MS/MS: Application to a pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr*, 33(4), e4453. doi:10.1002/bmc.4453
- Shah, P. A., Shrivastav, P. S., Sharma, V., & Yadav, M. S. (2019). Challenges in simultaneous extraction and chromatographic separation of metformin and three SGLT-2 inhibitors in human plasma using LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal*, 175, 112790. doi:10.1016/j.jpba.2019.112790
- Shyamala, Nidhi b, K. M., Pooja, & Sharma, J. (2015). Validated RP-HPLC method for simultaneous estimation of metformin hydrochloride and dapagliflozin in tablet dosage form. *American Journal of Biological and Pharmaceutical Research* 2(2), 109-113.
- Singh, S., Junwal, M., Modhe, G., Tiwari, H., Kurmi, M., Parashar, N., & Sidduri, P. (2013). Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 49, 71-88. doi:10.1016/j.trac.2013.05.006

- Sinko, P. J. (2011). *MARTIN'S PHYSICAL PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES Physical Chemical and Biopharmaceutical Principles in the Pharmaceutical Sciences* (6th ed.). New Jersey: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business.
- Sivagami, B., Padmaja, B. R., & Babu, M. N. (2018). A Highly Validated RP-HPLC Method Development for the Simultaneous Estimation of Dapagliflozin and Saxagliptin in Tablet Dosage Forms. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 10(05). doi:10.25004/ijpsdr.2018.100503
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2008). *Principios de análisis instrumental* (6ta ed.). México: Cengage Learning Editores.
- Snyder, L. R., Kikland, J. J., & Glaich, J. L. (1997). *Practical HPLC Method Development*. USA: John Wiley & Sons, Inc. .
- Sociedad Chilena de Endocrinología y Diabetes. Educación sobre Diabetes. Retrieved from <https://soched.cl/web/2018/01/29/cual-es-la-frecuencia-de-diabetes-en-chile-como-se-si-tengo-diabetes/>
- Stolyhwo, A., Colin, H., & Guiochon, G. (1983). Use of light scattering as a detector principle in liquid chromatography *Journal of Chromatography* 265, 1-18.
- Taylor, T. (2014). Core–Shell Particles for HPLC — Present and Future. Retrieved from <http://www.chromatographyonline.com/core-shell-particles-hplc-present-and-future>

TLC Pharmaceutical Standards. DAPAGLIFLOZIN (D-6229). Retrieved from <http://www.tlcstandards.com/ProdDetail.aspx?ID=D-6229&name=DAPAGLIFLOZIN>

TLC Pharmaceutical Standards. DAPAGLIFLOZIN (D-6230). Retrieved from <http://www.tlcstandards.com/ProdDetail.aspx?ID=D-6230&name=DAPAGLIFLOZIN>

Toronto Research Chemicals. Safety Data Sheet - Dapagliflozin Propanediol Hydrate. (2018). Retrieved from <https://www.trc-canada.com/prod-img/MSDS/D185398MSDS.pdf>

Unger, K. K., Lamotte, S., & Machtejevas, E. (2017). Column technology in liquid chromatography. In *Liquid Chromatography* (pp. 39-89).

van der Aart-van der Beek, A. B., Mireille A. Wessels, A., Heerspink, H. J. L., & Touw, D. J. (2020). Simple, fast and robust LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of canagliflozin, dapagliflozin and empagliflozin in human plasma. *Journal of Chromatography B*. doi:10.1016/j.jchromb.2020.122257

Verma, M. V., Patel, C. J., & Patel, M. M. (2017). Development and Stability Indicating HPLC Method for Dapagliflozin in Api and Pharmaceutical Dosage Form. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 9(5), 33-41. doi:10.22159/ijap.2017v9i5.19185

Vila, J. L. (2001). *Tecnología Farmacéutica Volumen I: Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas*. Madrid: Editorial Sintesis S.A.

Watson, D. G. (2012). *Pharmaceutical Analysis. A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists* (3rd ed.). UK: Elsevier Ltd.

XIGDUO XR 5 / 1000 mg Comprimidos Recubiertos de Liberación Prolongada. Retrieved from <https://www.farmaciasahumada.cl/fasaonline/fasa/MFT/MFT.HTM?w=PRODUCTO-P12273.HTM>

XIGDUO XR 10 / 1000 mg Comprimidos Recubiertos de Liberación Prolongada. Retrieved from <https://www.farmaciasahumada.cl/fasaonline/fasa/MFT/MFT.HTM?w=PRODUCTO-P12274.HTM>

Xu, G., Lv, B., Roberge, J. Y., Xu, B., Du, J., Dong, J., . . . Sun, X. (2014). Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Deuterated C-Aryl Glycoside as a Potent and Long-Acting Renal Sodium-Dependent Glucose Cotransporter 2 Inhibitor for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry* 57, 1236–1251.

Yoshioka, S., & Stella, V. (2002). *Stability of Drugs and Dosage Forms*. New York: Kluwer Academic Publishers.

Yost, R. W., Ettre, L. S., & Conlon, R. D. (1981). *Introducción a la cromatografía líquida practica* USA: Perkin Elmer Corporation

Yunoos, M., & Sankar, G. (2015). A validated stability indicating high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of Metformin HCl and Dapagliflozin in bulk drug and

tablet dosage form. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8(3), 320-326.

Zaghary, W. A., Mowaka, S., & Hendy, M. S. (2019). Kinetic Degradation Study of Dapagliflozin Coupled with UHPLC Separation in the Presence of Major Degradation Product and Metformin. *Chromatographia*, 82(4), 777-789. doi:10.1007/s10337-019-03702-3

Zhou, D., Porter, W. R., & Zhang, G. G. Z. (2017). Drug Stability and Degradation Studies. In *DEVELOPING SOLID ORAL DOSAGE FORMS: Pharmaceutical Theory & Practice* (2nd ed., pp. 113-149). Amsterdam: Elsevier Inc.

