
ARTÍCULO ORIGINAL

Clorhidrato de pioglitazona: una perspectiva analítico-instrumental por espectroscopia Raman y HPLC

Jesús Fernando Vértiz-Beltrán,^{**} Raquel Ávila-Rodríguez,^{*} Rocío Terrones-Gurrola,^{*} Luis Abelardo Camacho,^{****} Azahel Rangel-López,^{*} Isaac Campos-Cantón,^{***} Ángel Antonio Vértiz-Hernández^{*}

* Coordinación Académica Región Altiplano.^{**} Facultad de Ciencias Químicas, ^{***} Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
**** Facultad de Medicina, Universidad Juárez del Estado de Durango.

Pioglitazone hydrochloride a instrumental analytical perspective by Raman spectroscopy and HPLC

ABSTRACT

Introduction. The thiazolidinediones (pioglitazone) increases the action of insulin and produces the glycemic control in the patients with type 2 diabetes mellitus. Also, the pharmacological effect may be affected by the purity and pioglitazone plasma concentration. Therefore, the instrumental techniques offer a tool for characterization, identification and/or quantification of the pioglitazone; Raman spectroscopy offers several advantages due to its easy application methodology and structural analysis and the HPLC technique is the gold standard vs. other qualitative and quantitative techniques. **Objective.** The aim of this work is to develop and validate analytical techniques for the characterization of pioglitazone hydrochloride by Raman spectroscopy and quantitative analysis in human plasma by HPLC. **Material and methods.** The pioglitazone hydrochloride was analyzed by Raman spectroscopy with a 678 mW power and 3 integration time seconds. The analytical method for quantification by HPLC was validated with the guidelines of the NOM-177SSA1-1998. **Results.** The Raman technique allowed us to elucidate the functional groups of the pioglitazone hydrochloride and the HPLC technique was linear, accurate, precise, specific and sensitive in the range of 30 to 2,000 ng/mL under the chromatographic conditions specified. **Conclusions.** The structure analysis by Raman spectroscopy allowed us a complete characterization of the functional groups of pioglitazone hydrochloride effectively and non-destructively. Likewise, the analytical technique for the pioglitazone hydrochloride quantification by HPLC was linear, accurate, precise and sensitive in the range of 30 to 2,000 ng/mL under the guidelines.

Key words. Pioglitazone. Characterization. Raman. HPLC. Quantification.

RESUMEN

Introducción. La pioglitazona incrementa la acción de la insulina, por ello disminuye la insulinorresistencia en la diabetes mellitus tipo 2. Asimismo, la pureza y la concentración plasmática de la pioglitazona modifican el efecto farmacológico; las técnicas instrumentales ofrecen caracterización, identificación y/o cuantificación de estas moléculas farmacológicas. La espectroscopia Raman es de fácil metodología y aplicación en el análisis estructural y el HPLC representa el estándar de oro entre muchas técnicas cualitativas y cuantitativas. **Objetivo.** Desarrollar y validar las técnicas por espectroscopia Raman y HPLC para la caracterización del clorhidrato de pioglitazona. **Material y métodos.** Se analizó el clorhidrato de pioglitazona por espectroscopia Raman bajo una potencia de 678 mW y un tiempo de integración de 3 s; asimismo, la técnica por HPLC se validó bajo los lineamientos de la NOM-177SSA1-1998. **Resultados.** La espectroscopia Raman permitió dilucidar los grupos funcionales de la molécula de clorhidrato de pioglitazona sin extracción de la muestra; sin embargo, no demostró ser lineal, exacta y precisa en un rango de 30 a 2,000 ng/mL. El análisis HPLC fue lineal, exacto, preciso, sensible, selectivo y robusto en un rango de 30 a 2,000 ng/mL. **Conclusiones.** La espectroscopia Raman permitió una completa caracterización de los grupos funcionales de manera eficaz y no destructiva, no así un análisis cuantitativo; asimismo, la técnica analítica por HPLC demostró ser lineal, exacta, precisa, sensible, selectiva y robusta en un rango de 30 a 2,000 ng/mL permitiéndonos hacer un confiable análisis cuantitativo de clorhidrato de pioglitazona.

Palabras clave. Tiazolidinedionas. Pioglitazona. Raman. HPLC. Cuantificación.

INTRODUCCIÓN

Los hipoglucemiantes orales son un grupo muy heterogéneo de compuestos que se han clasificado con base en su mecanismo de acción, uno de los grupos más importantes en la actualidad son las tiazolidinedionas.¹

Hoy día se cuenta con dos compuestos aprobados de este grupo para ser prescritos en Estados Unidos de América: maleato de rosiglitazona (AvandiaTM) y el clorhidrato de pioglitazona (Actos®); anteriormente se contaba con una tercera tiazolidinediona, la TroglitazonaTM; sin embargo, fue retirada del mercado por presentar hepatotoxicidad.²

Tanto la pioglitazona como la rosiglitazona son utilizadas en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, y también está aprobada su administración en pre-diabéticos y en personas prescritas con síndrome metabólico.^{2,3}

Bioquímicamente las tiazolidinedionas se caracterizan por incrementar la acción de la insulina sin necesidad de aumentar la producción de ésta, es por eso que son indispensables como tratamiento una vez que se ha desarrollado una insulinorresistencia para disminuir los niveles de glucemia.³ Caracterizar, identificar y cuantificar estos compuestos farmacológicos, ya sean puros o en diversos medios, incluyendo a aquellos de carácter biológico, puede llevarse a cabo por diversas técnicas, como cromatografía y espectroscopia. Una de las herramientas espectroscópicas es la técnica Raman, como base de las espectroscopias vibracionales más importantes, pues proporciona características fundamentales que pueden ser empleadas para elucidar estructuras a nivel molecular. En general, la técnica Raman es mejor en vibraciones simétricas de grupos no polares, mientras que el infrarrojo (IR) es mejor en vibraciones asimétricas de grupos polares.⁴

La espectroscopia Raman se basa en un evento de dispersión inelástica de dos fotones de luz, donde el fotón incidente sobre la materia es de mayor energía que la energía vibracional cuántica. Al incidir el fotón pierde parte de su energía, lo que produce una vibración molecular, mientras que el resto de la energía dispersa se encuentra en un fotón con frecuencia reducida. La tecnología Raman presenta puntos favorables, pues no requiere preparación de muestras líquidas, sólidas o gaseosas; asimismo, la caracterización de espectrogramas es posible aun en modos de baja frecuencia. Permite análisis cuantitativos y caracterización de muestras en soluciones acuosas sin tratamiento, pues el agua no interfiere en las lecturas de los espectrogramas.⁴

La espectroscopia Raman estudia modos de baja frecuencia y se basa en los fenómenos de dispersión inelástica de la luz monocromática. En este fenómeno, la interacción con fotones u otras excitaciones en el sistema provocan que la energía de los fotones del láser experimenten un desplazamiento de energía, mismos que proporcionan información sobre los modos del fotón en el sistema. En este contexto, en la dispersión Raleigh las moléculas dispersan la luz sin cambios en la frecuencia de los fotones no así en el efecto Raman, donde la radiación dispersada difiere ligeramente de la incidente (choque inelástico).⁵

El resultado de esta interacción es la alteración de los niveles vibracionales y/o rotacionales de la molécula, es así como la modificación en la energía de la molécula $m \Delta E$ se refleja en las diferentes frecuencias del fotón incidente iv y el dispersado $d v$:

$$(1) \quad mid \Delta E = hv - hv$$

Cuando la molécula gana energía, $m\Delta E$ es positiva y dv es menor que iv originando las líneas de Stokes en el espectro Raman. Cuando pierde energía, $m\Delta E$ es negativa y dv es mayor que iv dando lugar a las líneas anti-Stokes en el espectro Raman. Así, la cantidad del cambio de polarizabilidad determinará la intensidad de dispersión Raman en un patrón de frecuencias de desplazamiento expresado por el número de ondas (unidades de longitud recíproca) en el espectro Raman.

Existen maneras de convertir entre longitud de onda del espectro y número de ondas de desplazamiento en el espectro Raman; por ejemplo, utilizando la fórmula

$$(2) \quad \Delta w = \left[\frac{1}{2\lambda_0} - \frac{1}{2\lambda_1} \right]$$

Donde:

Δw es el desplazamiento de Raman expresado en número de ondas.

λ_0 es la longitud de onda de excitación.

λ_1 es la longitud de onda del espectro de Raman.

Las unidades elegidas para expresar el número de ondas en el espectro de Raman es el centímetro recíproco (cm^{-1}).⁵

En otro contexto, la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC, por sus siglas en inglés) es la técnica analítica más utilizada con respecto a otras técnicas de medición; ésta debe su popularidad a su sensibilidad, su fácil adaptación, a las determinacio-

nes cuantitativas exactas, a su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles, además de su aplicabilidad en muchos campos de la ciencia.⁶

En cromatografía de líquidos los compuestos eluyen por la interacción de la fase estacionaria (columna empaquetada) con una fase móvil de composición constante (isocrática) o variable (gradiente). Cada compuesto migra con una velocidad diferente, resultando en una relación de elución más rápida o más lenta.⁶

La elución isocrática es la más utilizada para la separación de los compuestos y puede describirse utilizando las siguientes ecuaciones.

Tiempo de retención es el tiempo de elución característico para cada compuesto bajo condiciones controladas y constantes, habla de la huella digital del compuesto.

$$(3) \quad t_R = t_0 \cdot k' + t_0$$

Donde:

t_R : corresponde al tiempo de retención del analito.
 t_0 : es el tiempo muerto.
 k' : es el factor de capacidad.

Dicho factor de capacidad relaciona el equilibrio de distribución de la muestra dentro de la columna con las propiedades termodinámicas de la columna y con la temperatura. Para un conjunto dado de parámetros de operación, k' es una medida del tiempo transcurrido en la fase estacionaria en relación con el tiempo transcurrido en fase móvil.

$$(4) \quad k' = \frac{(t_R - t_0)}{t_0}$$

Otro parámetro es el factor de resolución que indica la calidad de una separación, como una medida numérica de la separación entre dos compuestos y es representado por R_s :

$$(5) \quad R_s = \frac{2(t_{r,2} - t_{r,1})}{(W_{b,2} + W_{b,1})}$$

Donde:

$t_{r,1}$ y $t_{r,2}$: son los tiempos de retención de dos compuestos independientes; asimismo, la W_b representa el ancho de banda de estos picos.

La separación es importante; sin embargo, la detección de los compuestos separados es igualmente

importante, ya que la definición de respuesta del detector depende de la sensibilidad del detector a la masa o la concentración. Para los detectores sensibles a la concentración la respuesta (R) viene dada por la siguiente relación:

$$(6) \quad R = \frac{h \cdot w \cdot F}{s \cdot M}$$

Donde:

s : es la velocidad de registro en cm/min.

M : es la masa de soluto inyectada, en ng (puede ir de μg a pg).

F : es el flujo, en mL/min.

La técnica cromatográfica es ampliamente utilizada en análisis cuantitativo y cualitativo; sin embargo, no es la técnica ideal para dilucidar estructuras químicas como la espectroscopia Raman, ambas técnicas pueden ser complementarias, ya que la tecnología Raman no sólo permite dilucidar grupos funcionales, sino también es capaz de medir e inferir el grado de polimorfismo químico⁷ y la técnica por HPLC es un estándar de oro para el análisis cuantitativo.

Actualmente la espectroscopia Raman se utiliza para caracterizar tumores malignos y benignos,^{8,9} para identificación y caracterización de comunidades microbianas.¹⁰ También se utiliza en diversos sectores, en medicina se ha aplicado en el análisis de tejidos y células; en la industria petroquímica, esta técnica se utiliza para control de calidad de polímeros y emulsiones. La aplicación de la espectroscopia Raman muestra ser efectiva en distintas áreas y en condiciones adecuadas puede permitir la identificación y caracterización de múltiples compuestos.^{5,11}

Con base en las ventajas que ofrecen ambas técnicas se planteó el análisis de la estructura del clorhidrato de pioglitazona por Raman y la validación de la técnica analítica para cuantificación por HPLC.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

- *Parte 1.* Análisis estructural por espectroscopia RAMAN de clorhidrato de pioglitazona.

Se analizó por triplicado un estándar de grado HPLC de clorhidrato de pioglitazona en estado sólido por espectroscopia Raman bajo una potencia controlada de 678 mW y un tiempo de integración de 3 s

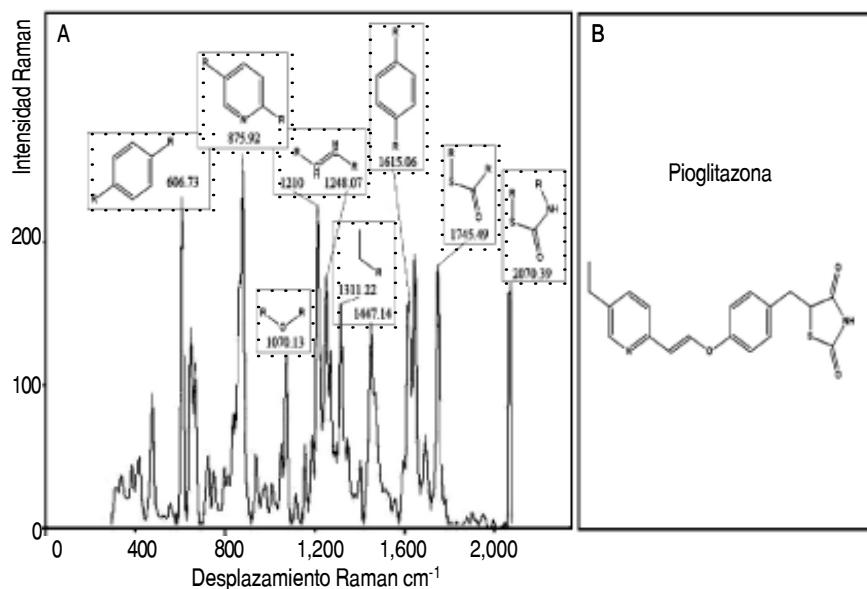


Figura 1. A. Espectrograma y estructura molecular del clorhidrato de pioglitazona diluido por espectroscopía Raman. B. Estructura química completa de clorhidrato de pioglitazona.

en un equipo marca Ocean Optics® modelo QE65000. Este equipo cuenta con: un conector de fibra óptica SMA 905, una fuente de luz láser a una longitud de onda de 786 nm y con una potencia de 499 nW, un detector Hamamatsu S7031-1006 de alta sensibilidad, un detector gamma con un rango de 200 hasta 1,100 nm y un software Spectra Suite® para el procesamiento de las señales.

Se prepararon soluciones para los diferentes ensayos partiendo de una solución madre de clorhidrato de pioglitazona de 62,500 ng/mL en agua tridestilada, a partir de la solución madre se tomaron los volúmenes necesarios para preparar las diluciones en un rango de 30 a 2,000 ng/mL como curva de calibración y 50, 1,000, 1,900 ng/mL para los puntos control de calidad (PC). Las muestras se prepararon con plasma humano correspondiente a la mezcla de seis donadores y se fortificaron con soluciones de pioglitazona hasta alcanzar los 500 μ L de volumen total con base en la fórmula 7.

$$(7) \quad V_2 = \frac{V_1 C_1}{C_2}$$

Se determinaron los parámetros de selectividad, linealidad, recobro absoluto, precisión y exactitud (intradía e interdía), sensibilidad, selectividad y robustez bajo la NOM-177SSA-1998.²³ Para el caso de la espectroscopía Raman no se realizó extracción de la muestra, ya que se partió de la premisa marcada por autores como Larkin (2007); la tecnología Raman permite análisis cuantitativos y caracterización de muestras en soluciones acuosas sin la

necesidad de un tratamiento de extracción del analito, pues el agua y otros componentes no interfieren en las lecturas de los espectrogramas.

- Parte 2. Validación del método analítico para análisis cuantitativo.

La preparación de muestras para validación HPLC, de la misma manera que en la espectroscopía Raman, consistió en una solución madre de clorhidrato de pioglitazona de 62,500 ng/mL en agua tridestilada, a partir de la solución madre se tomaron los volúmenes necesarios para preparar las diluciones en un rango de 30 a 2,000 ng/mL como curva de calibración y 50, 1,000, 1,900 ng/mL para los puntos control de calidad (PC). Las muestras se prepararon con plasma humano correspondiente a la mezcla de seis donadores y se fortificaron con soluciones de pioglitazona en un volumen constante, éste representa 5% de 500 μ L (volumen total) con base en la fórmula 7.

La extracción del clorhidrato de pioglitazona del plasma humano para el análisis por HPLC se realizó por medio de extracción líquido-líquido con acetato de etilo. La fase orgánica después de agitación se llevó a sequedad bajo corriente de N₂ para finalmente reconstituirse con 400 μ L de fase móvil. La cuantificación de la pioglitazona fue en un HPLC (Agilent serie 1100), con una columna de fase inversa Zorbax SB-C18, 3.5 μ m, 4.6 x 250 mm (Agilent) y fase móvil agua/acetonitrilo 50:50 V/V más 1 mL de ácido acético por cada 900 mL de fase móvil; un flujo de 1.2 mL/min y un detector uv-vis a

una longitud de onda de 269 nm. El volumen de inyección fue de 100 μ L a 22 °C, con tiempo de corrida de 3 min.

Los parámetros de validación del método analítico para ambas técnicas instrumentales se realizó de acuerdo con la NOM-177-SSA1-1998 e incluyó los parámetros de selectividad, linealidad, recobro absoluto, precisión y exactitud (intradía e interdía), sensibilidad (límite de cuantificación y límite de detección) y estabilidad de las muestras (estabilidad a largo plazo y en ciclos de congelación).

RESULTADOS

El espectrograma del clorhidrato de pioglitazona (Figura 1) presenta picos situados en 606.73 cm^{-1} y en 2070.39 cm^{-1} , en 875.92 cm^{-1} con una intensidad fuerte, en 1070.13 cm^{-1} con intensidad media-débil, en 1,210 cm^{-1} y 1,248.07 cm^{-1} , en 1311.22 cm^{-1} y 1447.14 cm^{-1} con intensidad media, otros picos se sitúan en 1,615.06 cm^{-1} con una intensidad fuerte y, por último, un pico en 1,745.49 cm^{-1} con intensidad media. Los picos corresponden a los grupos más representativos de las tiazolidinedionas mismos que se refieren encerrados en la figura 1 en un recuadro punteado.

Al realizar un análisis de linealidad como punto de partida para una validación de la técnica espectroscopia Raman se obtuvieron coeficientes de determinación y correlación $r^2 \leq 0.489$ y $r \leq 0.7992$ para linealidad, con ello, no fue posible establecer por ciento de coeficientes de correlación (%CV) y de desviación relativa (%DR) para el análisis de precisión y exactitud ni los demás parámetros de validación.

En otro contexto, el análisis por HPLC permitió identificar al clorhidrato de pioglitazona que eluyó con un tiempo de retención de 1.73 min (Figura 2). A nivel cuantitativo se demostró una eficiente técnica de extracción, la cual alcanzó un por ciento de recobro de 75% para pioglitazona en plasma, cumplió to-

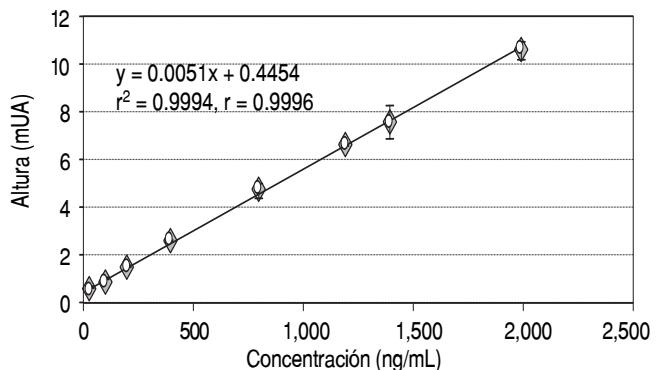


Figura 3. Curva de calibración para pioglitazona obtenida por espectroscopía HPLC. Cada punto representa el promedio \pm EE de $n = 3$, con $r \geq 0.99$.

dos los criterios de validación establecidos; fue lineal en un rango de 30-2,000 ng/mL (Figura 3). El límite de cuantificación fue de 30 ng/mL y el de detección de 9 ng/mL. El coeficiente de variación en el análisis de precisión intra día fue $\leq 8.42\%$ y para interdía $\leq 12.61\%$, en el análisis de exactitud intradía fue el % DR $\leq -9.77\%$ y ≤ 109.76 como por ciento de recobro e interdía $\leq 13.98\%$ y $\leq 113.98\%$ para %DR y por ciento de recobro, respectivamente (Cuadro 1). La selectividad del método se demostró tras el análisis de los cromatogramas del blanco matriz (pool 6), blanco reactivo, blanco fase móvil, matriz + pioglitazona, matriz hemolizada con pioglitazona, matriz hemolizada sin pioglitazona, en donde no se observaron ruidos que pudieran interferir en el tiempo de retención del clorhidrato de pioglitazona (1.73 min). Cumplió con los criterios de exactitud y precisión para el análisis de estabilidad a largo plazo (-70 °C). Bajo estos mismos criterios el método no sufrió modificaciones al aplicar intencionadas modificaciones de $\pm 3\%$ en las condiciones de temperatura, pH, flujo y proporción de fase móvil obteniéndose %DR y CV < 1%.

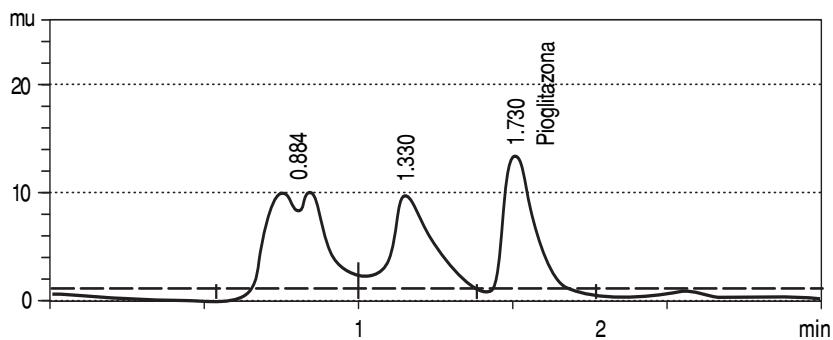


Figura 2. Cromatograma correspondiente a pioglitazona en una concentración de 30 ng/mL. El tiempo de corrida de 2.5 min y el tiempo de retención (TR) de 1.73 min.

Cuadro 1. Precisión y exactitud para el método de pioglitazona en plasma humano según la NOM-177 SSA-1998.

Punto	Promedio	D.E	%C.V		Criterio		Resultado	
Intradía								
PC1	0.88	0.6	7.77	-	≤ 20	-	A	Precisión
PC2	5.79	0.45	7.87	-	≤ 15	-	A	
PC3	10.51	0.88	8.42	-	≤ 15	-	A	
% DR % Recobro								
PC1	54.88	7.04	12.83	-9.77	≤ 20	109.76	A	Exactitud
PC2	1,049.58	89.5	8.53	-4.96	≤ 15	104.95	A	
PC3	1,974.06	173.5	8.8	-3.9	≤ 15	103.89	A	
Interdía								
PC1	0.805	0.06	8.55	-	≤ 20	-	A	Precisión
PC2	11.51	0.53	4.66	-	≤ 15	-	A	
PC3	18.78	2.36	12.61	-	≤ 15	-	A	
% DR % Recobro								
PC1	46.54	7.03	15.1	6.91	≤ 20	94.87	A	Exactitud
PC2	1,139.83	5.479	0.48	-13.98	≤ 15	113.89	A	
PC3	1,900	12.72	0.67	0.97	≤ 15	91.55	A	

DE: desviación estándar. %CV: por ciento de coeficiente de variación. % DR: por ciento de desviación relativa. A: criterio de aceptación. PC: punto control.

DISCUSIÓN

El espectrograma del clorhidrato de pioglitazona (Figura 1) presenta picos situados en 606.73 cm⁻¹ y en 2070.39 cm⁻¹ se localizan exactamente en la misma región, con esto se muestra que el movimiento surgido de la interacción de C-H de la estructura aromática junto con la unión de N-C-S (propias de las tiazolidinedionas) podría utilizarse para identificar compuestos de este tipo en diferentes espectrogramas ^(A) ^(G).⁴ También se observan otros picos de importancia, como el que se encuentra en 875.92 cm⁻¹ con una intensidad fuerte y que denota el movimiento de un anillo de piridina di-sustituido, piridinas de este tipo muestran picos muy fuertes en la región próxima a 980 cm⁻¹ hasta 1,050 cm⁻¹ ^(B); el pico en 1070.13 cm⁻¹ con intensidad media-débil ingresa dentro del rango de 800 cm⁻¹ a 1,140 cm⁻¹, corresponde a la interacción entre C-O-C con estiramiento ^(C), pero debido a que los átomos de carbono se hallan ligados doblemente a otros carbonos, la rigidez es mayor y, por tanto, la movilidad disminuye al igual que la intensidad del pico; los picos en 1,210 cm⁻¹ y 1,248.07 cm⁻¹ se posicionan en el rango donde predominan las vibraciones C = C del

tipo alifático, se localizan aproximadamente desde 1,200 cm⁻¹ hasta 1,300 cm⁻¹ ^(H); los picos contiguos en 1,311.22 cm⁻¹ y 1447.14 cm⁻¹ con intensidad media corresponden a R-CH₂-CH₃, donde el CH₃ presenta torsión y se sitúa generalmente entre 1,440 cm⁻¹ y 1,470 cm⁻¹ ^(I), mientras que el CH₂ presenta giro en un rango muy próximo a 1,305 cm⁻¹ ^(I); otro de los picos se sitúa en 1,615.06 cm⁻¹ con una intensidad fuerte que corresponde a un movimiento de anillo en el cuadrante de un compuesto aromático y cuyo rango comprende desde 1,590 cm⁻¹ hasta 1,619 cm⁻¹ ^(E); por último también se halla otro pico en 1,745.49 cm⁻¹ con intensidad media, éste es atribuido a la forma estructural de R-CO-S-R y también corresponde una frecuencia entre 1,735 cm⁻¹ y 1,750 cm⁻¹ ^(F).⁴

La técnica ha sido utilizada para el análisis químico y la forma física, el análisis de la forma física ha implicado cuantificación de polimorfismo, hidratos, la forma amorfa y, recientemente, la conformación de proteínas. Se han cuantificado sistemas de polvos, pero –aunque esto se ha extendido a formulaciones farmacéuticas como tabletas, cápsulas, microesferas y suspensiones– parece ser que el análisis cuantitativo por espectroscopia Raman en sólidos farmacéuticos es crítica.¹² Asimismo, no hay

muchos datos de la técnica para ensayos farmacológicos como biodisponibilidad donde se requiere de la validación de técnicas bajo normativas y parámetros bien determinados. Esta técnica ha sido empleada en análisis cuantitativo de formas sólidas clorhidrato de ranitidina,¹³ amorfos de indometacina en estado sólido,¹⁴ aminofilina y diclofenaco sódico, captopril¹⁵ y prednisolona en tabletas, entre otras.¹⁶ Asimismo, hay múltiples reportes del uso de la espectroscopía Raman en detección de cánceres como el nasofaríngeo,¹⁷ de placas ateroscleróticas e, incluso, calidad de obras de arte.¹⁸ Sin embargo, en soluciones plasmáticas de concentraciones ascendentes con bajos cambios de concentración en el orden de los ng/mL como las utilizadas para validación de métodos analíticos por HPLC no muestra linealidad, precisión ni exactitud en el rango 30-2,000 ng/mL bajo los criterios de la NOM-177SSA-1998. Hasta hoy día la técnica Raman ha demostrado ser muy útil como técnica no invasiva para identificar y eventualmente cuantificar la presencia de medicamentos y sustancias fisiológicas, tal es el caso de la determinación de concentraciones cercanas a la concentración inhibitoria mínima (CIM) para ceftazidima y anfotericina B. Asimismo, ha sido útil en la determinación de glucosa (realizada a concentraciones cerca de los primeros niveles patológicos de pacientes con diabetes) en el humor acuoso del ojo,²⁰ no así para pequeños cambios en el orden de concentración como el requerido en este trabajo.

En el caso de los análisis cuantitativos por HPLC con respecto a soluciones con bajos niveles de variación en la concentración en el orden de microgramos, nanogramos y picogramos la cromatografía de líquidos sigue siendo el estándar de oro.^{19,21,22} Por ello, el método presentado aquí comparado con métodos similares muestra que las condiciones cromatográficas alcanzadas en este estudio fueron mejores en función al pH de la fase móvil (5.4 vs. 2.1), la columna fue de 3.5 μm de tamaño de partícula vs. 4 y 5 μm de otros estudios. Estas condiciones permitieron una mejor separación de los componentes de la muestra. La temperatura a la que se llevó a cabo la separación fue de 22 °C, y la fase móvil menos elaborada (sin sales), en contraste con los métodos descritos por otros autores.

Con respecto a los parámetros de validación marcados por la NOM-177-SSA1-1998²³ y a las guías propuestas por el centro de referencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS),²⁴ los indicadores de linealidad marcados con un límite referencia de $r \geq 0.99$ y $r^2 \geq 0.98$ se alcanzaron durante la validación,

ya que los valores experimentales de r y r^2 superaron el 0.99 (Figura 1).²³

El recobro absoluto calculado por el método de las pendientes mostró 75% de recuperación del analito con respecto a la matriz biológica para pioglitazona, mismo que se mantuvo constante durante todas las corridas analíticas. El límite de cuantificación fue de 30 ng/mL y el de detección de 9 ng/mL, valores que fueron calculados con respecto a los criterios de exactitud y precisión cumpliendo con los criterios marcados por la NOM177-SSA1-1998.²² El coeficiente de variación en el análisis precisión intra-día fue de $\leq 8.42\%$ y para inter-día $\leq 12.61\%$, en el análisis de exactitud intra-día fue por ciento de desviación relativa (% DR) de $\leq -9.77\%$ y ≤ 109.76 como por ciento de recobro e inter-día, de $\leq 13.98\%$ y $\leq 113.98\%$ para % DR y por ciento de recobro respectivamente (Cuadro 1), estos valores están por debajo de lo marcado por la NOM-177-SSA1-1998²³ que indica que deben ser para el %DR $\leq 20\%$ y 15% con base en los puntos control bajo y medio, alto, respectivamente; de la misma manera se cumplió para el %CV en el caso de precisión.²⁴ No se observaron interferencias en los picos cromatográficos a los 1.73 min (TR para clorhidrato de pioglitazona) permitiendo una correcta interpretación del cromatograma y, al modificar las condiciones críticas del método analítico temperatura, pH, flujo y proporción de fase móvil en $\pm 3\%$ se cumple con los criterios de exactitud y precisión que marca la NOM177-SSA1-1998.²³

CONCLUSIONES

La espectroscopía Raman permitió una completa caracterización de los grupos funcionales sin la aplicación de una técnica de extracción de la muestra, no hubo interferencias en la caracterización de la molécula de clorhidrato de pioglitazona y permitió hacer un análisis no destructivo. Asimismo, la técnica analítica por HPLC demostró ser lineal, exacta, precisa, selectiva, robusta y sensible en un rango de 30 ng/mL a 2,000 ng/m permitiendo hacer un confiable análisis cuantitativo de clorhidrato de pioglitazona.

AGRADECIMIENTOS

A PROMEP por el apoyo con número PROMEP/103.5/12/3953 para la realización de esta parte del proyecto, así como a la Coordinación Académica Región Altiplano de la UASLP.

REFERENCIAS

1. Carretero M. Pioglitazona; Monoterapia oral en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Actualidad científica* 2005; 24(2): 112-4.
2. Norris SL, Lee NJ, Severance S, Thakurta S, Chan B. Drug Class review Thiazolidinediones. Oregon: Health & Science University (inedited); 2008, p. 5-7.
3. Colthup NB, Wiberly SE, Daly LH. Introduction to infrared and Raman spectroscopy. En: Flórez J, Armijo JA, África M. Farmacología Humana. Barcelona: Masson; 2005, p. 54.
4. Larkin PJ. Infrared and Raman spectroscopy, Principles and spectral interpretation. Massachusetts: Elsevier; 2007; 1-2. (A) 81, (B) 94, (C) 104, (D) 74, (E) 205, (F) 100, (G) 113, (D) 82, (I) 76, (D).
5. Medina Valtierra J, Sato-Berrú RY, Frausto Reyes C. La espectroscopía Raman molecular y su aplicación ambiental. *Conciencia Tecnológica* 2003; 23.
6. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. Fundamentos de química analítica. México: Thompson; 2005, p. 988-1006.
7. Medina-Valtierra J, Sato-Berrú M, Frausto-Reyes. La espectroscopía molecular Raman y su aplicación ambiental. *Conciencia Tecnológica* 2006; 23: 4-5.
8. Douda J, Calva PA, Torchynska TV. Marcadores cuánticos para la detección de cancer revisión. *Superficies y vacío* 2008; 21(4): 10-7.
9. Ling XF, Xu YZ, Weng SF, Li WH, Zhi XU, Hammaker RM, et al. Investigation of normal and malignant tissue sample from the human stomach using fourier transform Raman Spectroscopy Appl. *Spectrosc* 2002; 56: 570-3.
10. Cervantes-Contreras M, Pedroza-Rodríguez AM. El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopía Raman. *Superficies y vacío* 2008; 20(3): 1-5.
11. Sato-Berrú RY, Medina-Gutiérrez C, Medina-Valtierra J, Frausto-Reyes C. Aplicación de la Espectroscopía Raman para la caracterización de pesticidas orgánicos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 2004; 20: 1.
12. Strachan CJ, Rades T, Gordon KC, Rantanen J. Raman spectroscopy for quantitative analysis of pharmaceutical solids". *J Pharm Pharmacol* 2007; (2): 179-92.
13. Chieng N, Rehder S, Saville D, Rades T, Aaltonen J. Quantitative solid-state analysis of three solid forms of ranitidine hydrochloride in ternary mixtures using Raman spectroscopy and X-ray powder diffraction. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 49(1): 18-25. Doi: 10.1016/j.jpba. 2008.09.054.
14. Heinz A, Savolainen M, Rades T, Strachan CJ. Quantifying ternary mixtures of different solid-state forms of indomethacin by Raman and near-infrared spectroscopy. *Eur J Pharm Sci* 2007; 3: 182-92.
15. Mazurek S, Szostak R. Quantitative determination of diclofenac sodium and aminophylline in injection solutions by FT-Raman spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal* 2006; 40(5): 1235-42.
16. Mazurek S, Szostak R. Quantitative determination of captopril and prednisolone in tablets by FT-Raman spectroscopy. *J Pharm Biomed Anal* 2006; 40(5): 1225-30.
17. Li SX, Chen QY, Zhang YJ, Liu ZM, Xiong HL, Guo ZY, Mai HQ, et al. Detection of nasopharyngeal cancer using confocal Raman spectroscopy and genetic algorithm technique. *J Biomed* 2012; Opt 17: 12: 125003.
18. Lattermann A, Matthäus C, Bergner N, Beleites C, Romeike BF, Krafft C, Brehm BR, et al. Characterization of atherosclerotic plaque depositions by Raman and FTIR imaging. *J Biophotonics* 2013; 6(1): 110-21.
19. Pattana S, Penporn N, Aurasorn S. High-performance liquid chromatographic method for the determination of pioglitazone in human plasma using ultraviolet detection and its application to a pharmacokinetic study. *J Chromatography B* 2006; 843: 164-9.
20. Sideroudi T, Pharmakakis N, Papatheodorou G, Voyatzis G. Non-invasive detection of antibiotics and physiological substances in the aqueous humor by Raman spectroscopy. *Lasers Surg Med* 2006; 38(7): 695-703.
21. Kolte BL, Raut BB, Deo AA, Bagool MA, Shinde DB. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of pioglitazone and metformin in pharmaceutical-dosage form. *J Chromatogr* 2004; 42: 27-31.
22. Zhong WZ, Williams MG. Simultaneous quantitation of pioglitazone and its metabolites in human serum by liquid chromatography and solid phase extraction. *Elsevier Science* 2003; 14: 465-73.
23. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. Disponible en http://www.google.com.mx/?t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=3&ved=0CD0QFjAC&url=http%3A%2F%2Fwww.dof.gob.mx%2Fnota_detalle.php%3Fcodigo%3D5298030%26fecha%3D06%2F05%2F2013&ei=TBaBUsS4CPbG4AP2z4C4CQ&usg=AFQjCNGUEK0wypGkfLqZh1uyqlTxjnvQ&sig2=tTfy9pCHZXg19A6NhH8g&bvm=bv.56146854,d.dmg; consultado en Noviembre 11, 2013.
24. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Disponible en: <http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/cmc3.pdf>

Reimpresos:

Ángel Antonio Vértiz-Hernández

Coordinación Académica Región Altiplano
Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Carretera Cedral km 5+600
Ejido San José de las Trojes
78700, Matehuala, SLP
Tel.: (+52) 488-882-72-15
Fax: (+52) 488-882-73-18
Correo electrónico:
antonio.vertiz@uaslp.mx, vertiza@gmail.com

Recibido el 16 de diciembre 2013.

Aceptado el 18 de marzo 2014.