



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

IDENTIFICACIÓN DE CLONAZEPAM MEDIANTE CROMATOGRAFÍA
LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA EN TABLETAS DE METFORMINA

MOGROVEJO AYOVI BETZABETH DEYANEIRA
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA
2023



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

IDENTIFICACIÓN DE CLONAZEPAM MEDIANTE
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA EN TABLETAS
DE METFORMINA

MOGROVEJO AYОВI BETZABETH DEYANEIRA
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA
2023



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

EXAMEN COMPLEXIVO

IDENTIFICACIÓN DE CLONAZEPAM MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA
DE ALTA EFICACIA EN TABLETAS DE METFORMINA

MOGROVEJO AYОВI BETZABETH DEYANEIRA
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

VALVERDE DURAN SERGIO ANDRES

MACHALA, 28 DE FEBRERO DE 2023

MACHALA
28 de febrero de 2023

Identificación de clonazepam mediante cromatografía líquida de alta eficacia en tabletas de metformina.

por Betzabeth Deyaneira Mogrovejo Ayovi

Fecha de entrega: 21-feb-2023 06:11p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2019964956

Nombre del archivo: MOGROVEJO_AYOVI_BETZABETH_DEYANEIRA_-_0705519668.pdf (124.28K)

Total de palabras: 2760

Total de caracteres: 14876

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

La que suscribe, MOGROVEJO AYOVI BETZABETH DEYANEIRA, en calidad de autora del siguiente trabajo escrito titulado IDENTIFICACIÓN DE CLONAZEPAM MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA EN TABLETAS DE METFORMINA, otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

La autora declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

La autora como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 28 de febrero de 2023



MOGROVEJO AYOVI BETZABETH DEYANEIRA
0705519668

RESUMEN

Los medicamentos durante el proceso de producción pueden ser susceptibles a la contaminación ya sea química o biológica. La metformina es un fármaco de primera elección en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, determinar su pureza permitirá conocer que el medicamento esté libre de contaminantes. Por lo antes mencionado esta investigación tiene como objetivo determinar la presencia de clonazepam mediante la revisión bibliográfica de artículos científicos para su identificación por cromatografía líquida de alta eficacia. En esta investigación se realizó un estudio descriptivo, enfocado en la resolución del caso práctico mediante la revisión de artículos científicos, para así obtener información sobre el método más adecuado para la determinación de la pureza de tabletas de metformina. La cromatografía líquida de alta eficacia es el método ideal para identificación de impurezas en los medicamentos. La fase móvil puede contener Acetonitrilo, Metanol o Trietilamina equipado con una columna C18. Con el detector UV-VIS al tener alta sensibilidad puede detectar analitos, debido a que muchos compuestos al poseer una estructura química absorben al UV.

Palabras clave: calidad, métodos cromatográficos, cromatografía de alta eficacia, metformina, clonazepam.

ABSTRACT

Drugs during the production process may be susceptible to either chemical or biological contamination. Metformin is a drug of first choice in the treatment of type 2 diabetes mellitus, determining its purity will allow knowing that the drug is free of contaminants. Due to the aforementioned, this research aims to determine the presence of clonazepam through the bibliographic review of scientific articles for its identification by high-efficiency liquid chromatography. In this investigation, a descriptive study was carried out, focused on the resolution of the practical case through the review of scientific articles, in order to obtain information on the most appropriate method for determining the purity of metformin tablets. High-efficiency liquid chromatography is the ideal method for identifying impurities in medicines. The mobile phase can contain Acetonitrile, Methanol or Triethylamine equipped with a C18 column. With the UV-VIS detector, having high sensitivity, it can detect analytes, since many compounds, having a chemical structure, absorb UV.

Keywords: quality, chromatographic methods, high performance chromatography, metformin, clonazepam.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 OBJETIVO:	2
1.2 OBJETIVO GENERAL:	2
2. DESARROLLO	3
2.1 Clonazepam	3
2.1.1 Propiedades físicas y químicas	3
2.2 Metformina	3
2.2.1 Propiedades físicas y químicas	4
2.3 Control de calidad de los medicamentos	4
2.4 Métodos cromatográficos	4
2.5 Cromatografía líquida de alta eficacia	4
2.5.1 Componentes de un cromatógrafo de la CLAE	5
3. METODOLOGIA	6
4. CONCLUSIÓN	10
5. BIBLIOGRAFÍA	11

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Validación del método por cromatografía líquida de alta resolución para la identificación de clonazepam	9
---	---

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura del clonazepam	3
Figura 2: Estructura de la metformina	4

1. INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica cumple un papel fundamental en los sistemas de asistencia sanitaria a nivel mundial, sus aportes han permitido el descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos utilizados en la prevención o en el tratamiento de múltiples enfermedades.¹ Por ello es importante que durante la fabricación de medicamentos se cumplan con criterios y regulaciones que garanticen la calidad, seguridad y eficacia para el paciente.²

Los antidiabéticos orales (ADO) son un grupo de medicamentos capaces de reducir la glucosa en sangre, estos son ampliamente utilizados por su alta adherencia del paciente.³

En el tratamiento inicial de la diabetes la correcta elección de los ADO se convierte en un tema importante, pues la Asociación Estadounidense de Diabetes y la Asociación Europea para el Estudio de la Diabetes recomiendan como fármaco de primera línea a la metformina por su buena eficacia, seguridad además de tener un costo accesible para los pacientes,⁴ este medicamento logra disminuir los niveles de glucosa hepática, aumentando su utilización. Por otra parte, se ha documentado que puede reducir la hemoglobina glicosilada (HbA1c) hasta 1.5%.⁵

Las Benzodiacepinas son medicamentos psicotrópicos que actúan a nivel del sistema nervioso central, son utilizados para tratar la ansiedad, insomnio y diferentes estados afectivos.⁶ Dentro de este grupo de medicamentos se encuentra el clonazepam, cuya principal indicación terapéutica es para control de ciertos tipos de convulsiones, aunque también es utilizado en trastornos de ansiedad, pánico, cuadros maníacos y de igual manera para el manejo de la abstinencia de otras benzodiacepinas.⁷

Los medicamentos orales como la metformina antes de ser distribuidos deberán pasar controles de calidad para determinar su pureza. En la industria farmacéutica para el control de calidad tenemos varios métodos instrumentales, los cuales permiten la determinación cualitativa y cuantitativa de un compuesto, tales como Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE), Cromatografía en Capa Fina, Cromatografía de Gases (CG), Espectrofotometría UV-VIS, Infrarrojo (IR), Espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR), entre otras.⁸

Para el análisis de medicamentos y sustancias en fluidos biológicos el CLAE es una de las técnicas más empleadas, permitiendo la caracterización, identificación y la cuantificación de

principios activos en productos farmacéuticos, frecuentemente utilizado en procedimientos para el control de calidad o desarrollo de nuevos medicamentos, convirtiéndose en la técnica de elección para la identificación de BZD si la comparamos con el método CG, debido a que el CLAE no expone a las moléculas a la degradación térmica.^{9,10}

Con lo antes ya mencionado se pretende dar solución al reactivo práctico detallado a continuación: En un Laboratorio Farmacéutica hay sospechas de lote de tabletas de metformina ha sido contaminada por error con un principio activo, presumiblemente clonazepam, por tal motivo se solicita identificar el principio activo contaminante. Y responder a la siguiente interrogante.

¿Qué métodos instrumentales usted seleccionaría para la identificar el posible principio activo causante de la alteración?

Para dar solución a la problemática planteada este trabajo de investigación tiene como objetivo determinar la presencia de clonazepam mediante la revisión bibliográfica de artículos científicos para su identificación por cromatografía líquida de alta eficacia-

1.1 OBJETIVO:

1.2 OBJETIVO GENERAL:

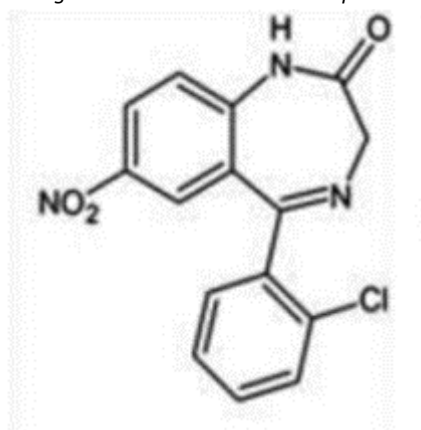
Determinar la presencia de clonazepam mediante la revisión bibliográfica de artículos científicos para su identificación por cromatografía líquida de alta eficacia.

2. DESARROLLO

2.1 Clonazepam

El clonazepam es una benzodiazepina, comúnmente prescrita en el tratamiento de diversas afecciones, por ejemplo, en los trastornos de ansiedad y la crisis epiléptica. Si se combina con otras sustancias psicoactivas, puede provocar efectos adversos, causar deterioro cognitivo y empeorar el estado de ánimo y ansiedad.¹¹

Figura 1: Estructura del clonazepam



Fuente:¹²

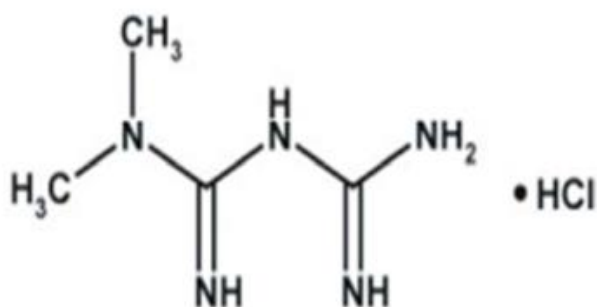
2.1.1 Propiedades físicas y químicas

El clonazepam es un derivado sintético de las benzodiazepinas, su peso molecular es de 315,71 g/mol, la fórmula molecular de este medicamento es C₁₅H₁₀ClN₃O₃. Es un polvo amarillo claro, posee un olor tenue. La solubilidad en alcohol, éter y metanol es baja, pero en acetona y cloroformo es moderadamente soluble.¹³

2.2 Metformina

La metformina es el antidiabético oral más prescrito en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, con efecto hipoglucemiante, por acción de la enzima proteína quinasa disminuye la producción de glucosa hepática, activada por adenosín monofosfato (AMPK).⁵

Figura 2: Estructura de la metformina



Fuente:¹⁴

2.2.1 Propiedades físicas y químicas

La masa molar es de 165,62 g/mol, es un polvo cristalino de color blanco. Es soluble en agua e insoluble en acetona, éter y cloroformo.¹⁵

2.3 Control de calidad de los medicamentos

Las compañías farmacéuticas representan una de las industrias más competitivas y reguladas, durante el proceso de elaboración de los medicamentos estas deben seguir ciertas normativas para garantizar que cada producto farmacéutico que salga al mercado cumplan con criterios de calidad, seguridad y eficacia.¹⁶

2.4 Métodos cromatográficos

Los métodos cromatográficos son usados para la separación de mezclas complejas, los componentes separados se distribuyen en dos fases; una fase estacionaria y una fase móvil. La clave en la separación radica en la velocidad con la que se muevan cada sustancia, la cual dependerá del grado de afinidad relativa por ambas fases. Es decir, los componentes con mayor afinidad a la fase estacionaria van a interactuar más tiempo y por ello serán más fácilmente retenidos, inversamente, los componentes afines a la fase móvil serán menos retenidos, todo esto dependerá de la polaridad de las moléculas.¹⁷

2.5 Cromatografía líquida de alta eficacia

La cromatografía líquida de alta eficacia es utilizada en la separación de componentes individuales de interés en una mezcla, o a su vez disueltos en una solución muestra. El principio básico de esta técnica se basa en el fenómeno de la cromatografía en columna, la fase móvil es bombada a alta presión a través de ella. Por ello, principalmente la CLAE es empleada para el control de calidad y también en el desarrollo de nuevos fármacos, puesto que, permite la caracterización, identificación y en la cuantificación de principios activos que se encuentran en productos farmacéuticos.¹⁸

2.5.1 Componentes de un cromatógrafo de la CLAE

1. **Reservorio:** aquí se encuentra la fase móvil. Esta fase consiste en una mezcla de sustancias polares y no polares que varían en concentración dependiendo de la muestra que se quiere analizar, la cual debe estar filtrada para evitar obstrucciones por posible material particulado.¹⁹
2. **Bomba:** se encarga de succionar la fase móvil del reservorio para hacerla fluir por todo el sistema a una velocidad precisa y constante. Aquí normalmente operan hasta 6000 psi, dependiendo de factores como tiempo, tamaño de la columna, composición de la fase móvil y flujo deseado.¹⁹
3. **Inyector:** se inyecta usualmente un volumen que varía entre 5 μL y 5 mL. El inyector puede ser automático o manual. El sistema de inyección automático permite que la muestra sea introducida a la fase móvil presurizada de manera exacta y precisa, por lo que actualmente los inyectores manuales son raramente empleados.¹⁹
4. **Horno:** se encarga de regular y mantener la temperatura dentro de la columna, ya que esta influye directamente en la retención y selectividad de la misma. Por otro lado, la columna está fabricada generalmente en acero inoxidable, tiene una longitud de 50 a 300 mm y está rellena de la fase estacionaria; además, su tamaño de partícula está entre 3 a 10 μm .¹⁹
5. **Registrador:** recolecta y procesa las señales recibidas del convertidor y los plasma en un cromatograma para su posterior lectura e interpretación.¹⁹
6. **Detector:** este es un dispositivo para el registro continuo de propiedades físicas específicas (a veces químicas) del efluente de la columna.¹⁹

3. METODOLOGIA

Para esta investigación se realizó un estudio descriptivo enfocado en la resolución del caso práctico mediante la revisión bibliográfica de artículos científicos encontrados en bases de datos confiables, tales como: Google scholar, Medline, Pubmed, para la obtención de información que permita seleccionar el método instrumental más adecuado para identificación del principio activo contaminante en tabletas de metformina.

Caso práctico

Contexto o situación del caso práctico

En un laboratorio farmacéutico hay sospechas de lote de tabletas de metformina ha sido contaminadas por error con un principio activo, presumiblemente clonazepam, razón por la cual surge la duda que dicho medicamento podría causar efectos teratogénicos en el embrión, esta situación puede desencadenarse una serie de problemas legales, además de afectar la reputación de dicho laboratorio farmacéutico por lo cual, el jefe del departamento de control de calidad solicita a sus analistas resolver este inconveniente.

Pregunta a resolver

En base a la revisión de artículos científicos, farmacopeas y otra literatura disponible ¿Qué métodos instrumentales usted seleccionaría para identificar el posible principio activo causante de la alteración? Argumenta su selección teniendo en cuenta las características físicas y químicas del medicamento. Considere el fundamento, características y ventajas del método instrumental.

Los medicamentos antes de ser comercializados deben cumplir con criterios de calidad, evitando cualquier contaminación durante la producción de los mismos. La metformina es el antidiabético oral de elección en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, por lo tanto, es importante que antes de llegar a los pacientes estas tabletas sean seguras, eficaces y que no perjudiquen la integridad física del paciente.

Dentro de las técnicas instrumentales para la identificación de principios activos tenemos a la espectrometría de gases acoplada a espectrometría de masas (GS-MS), dicha técnica cuenta con la principal ventaja del método de ionización universal, la influencia de la muestra es mínima produciendo espectros reproducibles, por lo tanto, se pueden utilizar en la

identificación de compuestos. Por otro lado, el análisis se limita a moléculas pequeñas y volátiles debido a que las temperaturas en el horno alcanzan hasta 350°C.²⁰

Otra técnica alternativa es la cromatografía en capa fina (TLC), debido a su simplicidad, menos tiempo en el análisis, se usan menos solventes, reactivos, y actualmente es muy utilizada al no necesitar de instrumentación complicada.²¹ Es importante mencionar las desventajas de la TLC, no es muy específica y posee baja sensibilidad si la comparamos con otras técnicas analíticas, por ejemplo, las moléculas con polaridad similar no pueden ser separadas, el control del flujo del solvente es limitado en las separaciones, no hay instrumentación que permita controlar la velocidad y el tiempo de separación, por último la incorrecta aplicación de la técnica dará resultados inconsistentes.²²

Para la separación, identificación y cuantificación de principios activos la cromatografía de alta eficacia (CLAE) es una de las técnicas cromatográficas más utilizadas, modernas y potentes en el análisis cualitativo de productos farmacéuticos terminados, la técnica permite la identificación de metformina como la separación de posibles contaminante como el clonazepan.²³ La CLAE cuenta con muchas ventajas a diferencia de otras técnicas, existe gran disponibilidad de equipos, columnas, materiales, teniendo un alto rango de aplicabilidad, es decir, puede analizar casi cualquier mezcla, no es destructiva con la muestra, por lo tanto los componentes una vez separados en la columna podrán ser recolectados, convirtiéndola en una técnica excelente en la purificación de muestras. Tiene gran sensibilidad, precisión y no está restringida por la volatilidad o estabilidad térmica de la muestra.¹⁹

La farmacopea Argentina recomienda analizar a la metformina con un detector ultravioleta ajustado a 218 nm y para identificar el clonazepam presente en tabletas de metformina el detector deberá estar ajustado a 254 nm.²⁴

Para la determinación de metformina (Gedway,2018) en su investigación utilizó un método de CLAE simple, la fase móvil utilizada para las corridas cromatográficas fue mediante la utilización de un tampón que consistió en formiato de amonio (pH3.5) y acetonitrilo (45:55, v/v). La metformina fue retenida en 6,9 minutos. La separación se había logrado en una Columna Alltima CN (250 mm × 4,6 mm x5 μ) aplicando el método isocrático. Los picos del fármaco habían tenido buena separación y fueron detectados mediante un detector UV a 227 nm. Por lo tanto, se puede utilizar para análisis de rutina de metformina.²⁵

Por otro lado (Vijaya, 2021) menciona que el uso de tampones reduce la vida útil de la columna, y después del análisis requiere un lavado completo, aumentando el tiempo de análisis. Por esto implementó un método de CLAE en fase reversa para la estimación de Metformina, mediante el uso de una fase móvil volátil simple. Logrando una separación adecuada del

fármaco, para esto se utilizó una columna C18 (fase estacionaria) y Acetonitrilo: Agua (50:50, v/v). La detección fue realizada a 230 nm. El tiempo de retención fue de 2,20 minutos. El análisis determinó que el porcentaje de metformina el cual fue de 99,86 %p/p. El límite de detección y cuantificación era 1,12 y 3,36 µg/mL. El método empleado obtuvo resultados en exactitud y precisión cerca del 100 % p/p, demostrando robustez y especificidad.²⁶

Mahrouse en el año 2019 realizó la determinación de clorhidrato de metformina mediante CLAE en fase reversa, con una columna Inertsil ODS (250 mm, 4,6 mm, 5 µm) se había logrado la separación cromatográfica, como fase móvil acetonitrilo : tampón fosfato. La detección UV se realizó a 220 nm. Obteniendo picos bien nítidos y separados para el fármaco citado. El método se aplicó con éxito para la determinación del principio activo en el producto terminado. Por consiguiente, el método propuesto resultó ser preciso y selectivo.²⁷

En la investigación por Deepan en el año 2017 realizó la determinación de metformina aplicando la cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa. El fármaco fue expuesto a efectos térmicos, estrés fotolítico, hidrolítico y oxidativo. Dando como resultados alta resolución entre los productos de degradación y los analitos. Por lo tanto, esta técnica es selectiva para la estimación de metformina ayudando en el control de calidad de las tabletas farmacéuticas que contienen este medicamento.¹⁴ Así mismo, en los estudios de Israa (2020) menciona que cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa aplicado en tabletas de metformina logra una buena separación, sugiriendo que el sistema es preciso.²⁸

La metformina no debe contener más del 0,1% de cualquier impureza individual y no debe sobrepasar el 0.6% de impurezas totales.²⁹

Lo que concuerda con Sivagamil (2020) el cual menciona que el método CLAE en fase reversa es adecuado en la determinación de metformina, el tiempo de retención es menos de 10 minutos y analizando todas las ventajas que presenta esta técnica cromatográfica es efectiva en el análisis de rutina para el control de calidad de medicamentos.³⁰

Para garantizar el rendimiento de la técnica cromatográfica, se deben utilizar ciertos parámetros de validación tales como, linealidad, selectividad, exactitud, recuperación, curva de calibración, límite de detección, y estabilidad.³⁰

En la siguiente tabla se detallan los parámetros requeridos para la identificación de clonazepam realizado por distintos autores.

Tabla 1: Validación del método por cromatografía líquida de alta resolución para la identificación de clonazepam

PRINCIPIO ACTIVO	LONGITUD DE ONDA UV-VIS	FASE MÓVIL Y FASE ESTACIONARIA	VELOCIDAD DE FLUJO	TIEMPO DE RETENCIÓN	AUTORES
Clonazepam	224 nm	Acetonitrilo:0,1% OPA (65:35 v/v) Columna Inertsil C18 (250×4,6mm×5um)	0,8 mL/min	4,7667 min	(Gadge, Game, Salode, Nakod., 2020)
Clonazepam	239 nm	Ácido ortofosfórico (OPA) al 0,1% (25:75, v /v) Columna Zorbax RP C-18 (4,6 × 100 mm)	0,7 mL/min	5,04 min	(Foudah, Alshehri, Shakeel, Alqarni., 2022)
Clonazepam	248nm	Trietilamina y metanol (32:68 v/v) Columna Phenomenex Gemini C18 (4,6 × 150 mm x 5,0 μm)	1,0 mL/min	3.297 min	(Sana, Reshma., 2019)
Clonazepam	231 nm	fosfato y acetonitrilo (55:45 v/v) Columna Waters C18 (150 x 4,6 mm x 3,5 μm)	1 mL/min	4.85 min	(Mondal y Kola, 2019)
Clonazepam	222 nm	KH ₂ PO ₄ , metanol y acetonitrilo (30:20:50v/v) Columna zodiac c18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μ)	1.1 mL/min	4.40 min	(Mallikarjuna, Agarwal, Kumar., 2013)

Fuente:²⁹⁻³³

4. CONCLUSIÓN

La cromatografía líquida de alta eficacia permite determinar la pureza de la metformina y la presencia de clonazepam en tiempos cortos, el detector UV-VIS logra identificar a los analitos de una muestra midiendo su absorbancia, la cual varía según las características físico-químicas del medicamento. Según la USP 25 el detector UV-VIS estará ajustado a 254nm, por otro lado, los parámetros para la identificación de los analitos serán el tiempo de retención, valor máximo de absorción los cuales serán comparados con el estándar de referencia, y posteriormente el método tendrá que ser validado.

5. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Márquez, R.; Marveya, M. Configuración Económica de La Industria Farmacéutica. *Actualidad Contables Faces* 2019, 38, 61–100.
- (2) Ramos-Martínez, B.; Alonso-Herreros, J. M.; Martín de Rosales-Cabrera, A. M.; Ramos-Martínez, B.; Alonso-Herreros, J. M.; Martín de Rosales-Cabrera, A. M. La Importancia Del Control de Calidad de Las Materias Primas Empleadas En Formulación Magistral. *Farmacia Hospitalaria* 2020, 44 (1), 32–33. <https://doi.org/10.7399/FH.11347>.
- (3) Qian, D.; Zhang, T.; Zheng, P.; Liang, Z.; Wang, S.; Xie, J.; Zhao, L.; Zhang, Y.; Situ, B. Comparison of Oral Antidiabetic Drugs as Add-On Treatments in Patients with Type 2 Diabetes Uncontrolled on Metformin: A Network Meta-Analysis. *Diabetes Therapy* 2018, 9 (5), 1945–1958. <https://doi.org/10.1007/S13300-018-0482-5/TABLES/3>.
- (4) Lee, G.; Oh, S. W.; Hwang, S. S.; Yoon, J. W.; Kang, S.; Joh, H. K.; Kwon, H.; Kim, J.; Park, D. Comparative Effectiveness of Oral Antidiabetic Drugs in Preventing Cardiovascular Mortality and Morbidity: A Network Meta-Analysis. *PLoS One* 2017, 12 (5), e0177646. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0177646>.
- (5) García Pérez, A.; Zayas González, M.; Gómez Cavada, D.; García Pérez, A.; Zayas González, M.; Gómez Cavada, D. Consideraciones Sobre El Efecto Cardiovascular de Algunos Antidiabéticos Orales. *CorSalud* 2020, 12 (4), 432–438.
- (6) Profesional De Psicología, E. Las Benzodiazepinas y Sus Efectos Sobre La Ansiedad Benzodiazepines and Their Effects on Anxiety Maité Díaz-Peñaloza* Este Es Un Artículo Open Access Bajo La Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0. 2017, 31, 169–180. <https://doi.org/10.24265/cultura.2017.v31.09>.
- (7) Cubero Alpízar, C.; Rojas Valenciano, L.; Campos Fernández, M.; Esteban, L.; Soto, H. Prescription of Clonazepam in Costa Rica. *Revista Española de Drogodependencias* 43 (3), 2018.
- (8) Daste, C. Control de Calidad En La Industria Farmacéutica, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, 2015. <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/8731/Control%20de%20Calidad%20en%20la%20Industria%20Farmac%3%A9utica.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (accessed 2023-01-20).
- (9) Taboada, J.; Pérez, J.; González, T.; Mejía, D. *Determinación de Benzodiazepinas Por HPLC*. <https://convencionsalud.sld.cu/index.php/convencionsalud22/2022/paper/viewFile/1740/951> (accessed 2023-01-20).

- (10) Qriouet, Z.; Qmichou, Z.; Bouchoutrouch, N.; Mahi, H.; Cherrah, Y.; Sefrioui, H. Analytical Methods Used for the Detection and Quantification of Benzodiazepines. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2035492>.
- (11) Dokkedal-Silva, V.; Berro, L. F.; Galduróz, J. C. F.; Tufik, S.; Andersen, M. L. Clonazepam: Indications, Side Effects, and Potential for Nonmedical Use. *Harv Rev Psychiatry* 2019, 27 (5), 279–289. <https://doi.org/10.1097/HRP.000000000000227>.
- (12) Mohamed Albakoush, A.; Ramadan Imbark Ajaj, A. Development of HPLC Methods in Identification and Quantificación of Some Benzodiazepines (Diazepam, Oxazepam, Clonazepam, Flunitrazepam). *J Med* 2017, 72–75.
- (13) Rojas, D. Desarrollo y Validación de Un Método Analítico Indicador de Estabilidad Para La Cuantificación de Clonazepam y Sus Productos de Degradación En Solución Oral Por HPLC , Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, 2020. https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/12591/Rojas_bd.pdf?sequence=1&isAllowed=y (accessed 2023-01-22).
- (14) Dhanaraju, M. D.; Deepan, T.; Rao, M. V. B. Development of Validated Stability Indicating Assay Method for Simultaneous Estimation of Metformin and Dapagliflozin by RP-HPLC. *European Journal of Applied Sciences* 2017, 9 (4), 189–199. <https://doi.org/10.5829/idosi.ejas.2017.189.199>.
- (15) Chasi, M. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS CARRERA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA, Universidad Central del Ecuador, 2017. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/13773/1/T-UCE-0008-QF019-2017.pdf> (accessed 2023-01-22).
- (16) Costigliola, A.; Ataíde, F. A. P.; Vieira, S. M.; Sousa, J. M. C. Simulation Model of a Quality Control Laboratory in Pharmaceutical Industry. *IFAC-PapersOnLine* 2017, 50 (1), 9014–9019. <https://doi.org/10.1016/J.IFACOL.2017.08.1582>.
- (17) Angulo, S.; Jaimes, L. *Desarrollo de Un Método de Análisis Por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC-DAD) Para La Caracterización de Especies de La Familia Asteraceae*; Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, 2019.
- (18) Akash, M. S. H.; Rehman, K. High Performance Liquid Chromatography. *Essentials of Pharmaceutical Analysis* 2020, 175–184. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1547-7_14.
- (19) Suarez Ospina, D.; Morales Hernández, Y. PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTO RENDIMIENTO PARA LA SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE MEZCLAS BASIC PRINCIPLES OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY FOR THE SEPARATION AND ANALYSIS OF MIXTURES. *América Revista Semilleros: Formación Investigativa* 2018, 4.

- (20) Koželj, G.; Prosen, H. Thermal (In)Stability of Atropine and Scopolamine in the Gc-Ms Inlet. *Toxics* 2021, 9 (7), 156. <https://doi.org/10.3390/TOXICS9070156/S1>.
- (21) Ciura, K.; Dziomba, S.; Nowakowska, J.; Markuszewski, M. J. Thin Layer Chromatography in Drug Discovery Process. *J Chromatogr A* 2017, 1520, 9–22. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2017.09.015>.
- (22) Vallejo-Rosero Yeraldin; Barrios-Correa Luis; Anaya-Gil Jorge. La Cromatografía En Capa Fina: Una Alternativa Vigente En La Industria Farmacéutica. *Revista de Química* 2021, 35 (2).
- (23) Nahar, L.; Onder, A.; Sarker, S. D. A Review on the Recent Advances in HPLC, UHPLC and UPLC Analyses of Naturally Occurring Cannabinoids (2010–2019). *Phytochemical Analysis*. John Wiley and Sons Ltd July 1, 2020, pp 413–457. <https://doi.org/10.1002/pca.2906>.
- (24) *Farmacopea Argentina*; 2013; Vol. 7.
- (25) Gedawy, A.; Al-Salami, H.; Dass, C. R. Development and Validation of a New Analytical HPLC Method for Simultaneous Determination of the Antidiabetic Drugs, Metformin and Gliclazide. *J Food Drug Anal* 2019, 27 (1), 315–322. <https://doi.org/10.1016/J.JFDA.2018.06.007>.
- (26) Vijaya, V.; Ujjwala, K.; Pallavi, D.; Choudhari, V. P. Development of Validated RP-HPLC Method for Estimation of Empagliflozin and Metformin in Combined Formulation. *J Pharm Res Int* 2021, 33 (60A), 1–7. <https://doi.org/10.9734/JPRI/2021/v33i60A34446>.
- (27) Mahrouse, M. A.; Lamie, N. T. Experimental Design Methodology for Optimization and Robustness Determination in Ion Pair RP-HPLC Method Development: Application for the Simultaneous Determination of Metformin Hydrochloride, Alogliptin Benzoate and Repaglinide in Tablets. *Microchemical Journal* 2019, 147, 691–706. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2019.03.038>.
- (28) Habash, I. W.; Al-Shdefat, R. I.; Hailat, M. M.; Dayyih, W. A. A Stability Indicating Rp-Hplc Method Development for Simultaneous Estimation of Alogliptin, Pioglitazone, and Metformin in Pharmaceutical Formulations. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* 2020, 77 (4). <https://doi.org/10.32383/appdr/125774>.
- (29) Monografías de Medicamentos Químicos 3. *Clorhidrato de Metformina, Tabletas de Liberación Prolongada*; 2019. https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/ES/rb/metformin-hcl-ert-rb-esp-20200131.pdf (accessed 2023-01-23).
- (30) Sivagami, B.; Purushotham, A.; Sikdar, P.; Chandrasekar, R.; Babu, M. N. A Validated Method for the Simultaneous Estimation of Linagliptin and Metformin in Tablet Dosage Forms by RP-HPLC. *Res J Pharm Technol* 2020, 13 (3), 1266–1270. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2020.00233.4>.

- (31) Mondal, P.; Kola, V. A New Stability Indicating Validated RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Escitalopram and Clonazepam in Bulk and Tablet Dosage Form. *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis* 2019, 9 (4), 193. <https://doi.org/10.5958/2231-5675.2019.00032.2>.
- (32) Mallikarjuna, R.; Agarwal, N. K.; Kumar Bichala, P.; Som, S. Method Development and Validation for the Simultaneous Estimation of Desvenlafaxine and Clonazepam in Bulk & Tablet Formulation by RP-HPLC Method. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology* 2013, 1 (4), 2320–3471.
- (33) Mahrouse, M. A.; Lamie, N. T. Experimental Design Methodology for Optimization and Robustness Determination in Ion Pair RP-HPLC Method Development: Application for the Simultaneous Determination of Metformin Hydrochloride, Alogliptin Benzoate and Repaglinide in Tablets. *Microchemical Journal* 2019, 147, 691–706. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2019.03.038>.
- (34) Gadge, S. S.; Game, M. D.; Salode, V. L.; Nakod, A. D.; Gadge, M. S. Simultaneous Estimation of Paroxetine Hydrochloride and Clonazepam in Tablet Dosage Form by HPLC. *Asian Journal of Research in Chemistry* 2020, 13 (2), 113. <https://doi.org/10.5958/0974-4150.2020.00023.1>.
- (35) Sana, F.; Reshma, B.; S, S.; N, R. Development and Validation of Analytical Method for the Simultaneous Estimation of Clonazepam and Propranolol by Using RP-HPLC. *Journal of Pharmaceutical Advanced Research* 2019.