

00524
166



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN METODO ANALÍTICO PARA
CUANTIFICAR METFORMINA EN PLASMA.**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGA**

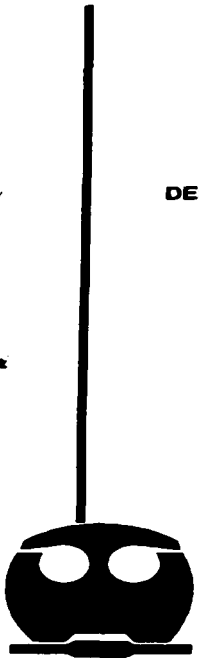
**PRESENTA:
NURIA ALEJANDRA ROSAS BECERRA**

MÉXICO D.F.

2003



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

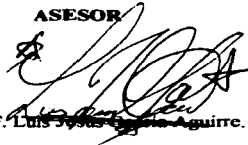
JURADO ASIGNADO

Fresidente: PROF. ALFREDO GARZON SERRA
Vocal: PROF. INES FUENTES NORIEGA
Secretario: PROF. LUIS JESUS GARCIA AGUIRRE
1er. Suplente: PROF. HELGI HELEN JUNK COOK
2°. Suplente: PROF. LIZ JANNET MEDINA REYES

LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

Laboratorio de Farmacocinética.
Edificio de investigaciones. Facultad de Medicina. 6° Piso.

ASESOR



M. en F. Luis Jesus Garcia Aguirre.

SUPERVISOR TÉCNICO



Q.F.B. Olivia Cristina León Cardoso

SUSTENTANTE



Nuria Alejandra Rosas Becerra.

DEDICATORIAS

A mis Padres

Antonio y Silvia por estar junto a mi siendo mis guías con sus consejos, cariño, sacrificio y esfuerzo por ser los mejores Padres; proporcionándome lo necesario para alcanzar esta meta la cual es una muestra de que todo lo que me han dado no ha sido en vano y la cual ha sido posible en gran parte gracias a ustedes, por lo cual quiero expresarles mi eterna gratitud y amor.

A mis hermanos

Oswaldo y Diana por su cariño, apoyo, por todos los momentos de alegría que hemos compartido, por su disponibilidad cuando necesite que alguien me escuchara, por que se que siempre podré contar con ustedes, al igual que ustedes conmigo y por que aunque no somos los mejores hermanos del mundo, somos buenos, aunque no lo demostremos.

A mis tíos

Mima y Hailu por su compañía en los viajes de madrugada al D.F. (¿verdad Mima?), por su apoyo y los buenos ratos que pasamos durante el tiempo que estuvimos juntos.

A mi abuelita (QEPD)

Por haber cuidado de mi con amor y paciencia; por haberme inculcado valores y principios que me han servido de mucho en mi vida, y por que gracias a ti tuve una niñez muy feliz; por lo que espero que en donde te encuentres compartas conmigo este logro.

A mis amigos

Algunos empiezan por orden alfabético, otros por orden de aparición...yo simplemente voy a empezar sin importar el orden ya que todos ocupan un lugar en mi Gran Corazón y no es presunción...

Clau, por acudir a mi llamado y en mi ayuda a las 6:45 a.m. cuando lo necesitaba, por esos desayunos de 1 a 2 horas en donde intercambiábamos ideas y opiniones (sobre otras personas, por supuesto), por tu compañía en esas largas horas de espera entre una clase y otra, y desde luego por presentarme a una persona muy pero muy especial para mi.

Flora y Olga por brindarme su amistad y apoyo, por su buen humor, por su confianza y sobre todo por esas platicas en las que solia ser yo quien escuchaba (y Flora la que hablaba), además de darme la oportunidad de conocerlas más a fondo

Dianis y Gira por su amistad, sinceridad, por todo el tiempo que hemos compartido, por los momentos compartidos de alegría, tristeza, desgorre y presión en todo este tiempo que he contado con su amistad.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Lupe, que puedo decir tu eres punto y aparte; pero te agradezco que me permitieras brindarte mi amistad y con la cual puedes contar siempre (siempre y cuando no cambies tu forma de ser), muchas gracias por todos esos momentos de relax cuando me contabas lo que te sucedía y todos los demás por que? que queden entre nosotros ya que me llevaría toda esta hoja y más el escribirlos. Gracias.

Jessi y Pau por darme la oportunidad de tratarlas y conocerlas más, con lo cual salí ganando dos amistades sinceras y además con un gran sentido del humor.

Tona y Ociel por ser de Guerrero, no, no es cierto por su amistad durante toda la carrera y por su peculiar forma de ser.

Carlíux por permitirme entrar en tu mundo de rarezas y compartir ratos y pintas agradables, Cuax por la confianza de compartir lo que escribes y por tu amistad un poco intermitente pero que ahí esta.

Raúl, Jaz e Isma por compartir conmigo y con todos los mencionados un cachito de su corazón brindándonos su amistad.

Gibrán por tu amistad, confianza y apoyo técnico para la realización de este trabajo.

Y por último aunque no menos importante a Uri por su paciencia, confianza, amor, por estar a mi lado todo este tiempo apoyándome en las buenas y en las malas dándome consejos y echándome porras y también presionándome y brindándome muchos ratos de tranquilidad y confianza. Y por su gran ayuda para realizar este trabajo.

Y muchas gracias a todos por que a pesar de ser tan diferentes formamos un gran equipo que ha disfrutado de muchas Quemadas de Batas y fiestas.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por permitirme llegar hasta aquí.

A mi asesor

Gracias por su paciencia, apoyo y su disponibilidad de ayudar en todo momento y por el tiempo que dedicó a resolver mis dudas.

Gracias Liz, Abraham y Oli por su asesoría y el apoyo técnico para realizar este trabajo.

Gracias a Elvia, Elsa, Mary, Cindy, Elisa, Cesar y Diego por que el ambiente de trabajo en el Laboratorio fuera agradable.

Gracias a Mire, Edith, Belem, Lolis, Carlitos y Artur por el apoyo para terminar este trabajo.

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México y sus profesores por darme una educación Profesional y grandes amigos.

INDICE	
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	3
3. GENERALIDADES.....	5
3.1. Validación de métodos analíticos.....	5
3.2. Monografía de metformina.....	7
3.2.1. Propiedades fisicoquímicas.....	7
3.2.2. Indicaciones terapéuticas.....	8
3.2.3. Farmacocinética.....	8
3.2.4. Farmacodinamia.....	9
3.2.5. Contraindicaciones.....	10
3.2.6. Efectos adversos.....	10
3.2.7. Interacciones.....	10
3.2.8. Presentaciones, Forma Farmacéutica y Formulación.....	13
3.3 Métodos analíticos para cuantificar metformina en plasma.....	15
3.4 Diabetes.....	17
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	23
4.1 Desarrollo del método analítico.....	23
4.1.1 Material, reactivos y equipo.....	24
4.1.2 Preparación de las soluciones.....	25
4.1.3 Preparación de la curva patrón.....	26
4.1.4 Selección de la columna cromatográfica.....	27
4.1.5 Elección de la fase móvil.....	28
4.1.6 Método de extracción.....	28

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	39
5.1 Desarrollo del método por CLAR para cuantificar metformina en plasma.....	39
5.2 Validación del método analítico para cuantificar metformina en plasma.....	41
5.2.1 Linealidad del método.....	41
5.2.2 Precisión y exactitud.....	43
5.2.2.1 Repetibilidad.....	43
5.2.2.2 Reproducibilidad.....	44
5.2.3 Límite de detección.....	45
5.2.4 Límite de cuantificación.....	45
5.2.5 Selectividad.....	45
5.2.6 Recobro absoluto.....	47
5.2.7 Estabilidad.....	48
5.2.7.1 Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente.....	48
5.2.7.2 Estabilidad de la muestra en congelación.....	49
5.2.7.3 Estabilidad de la muestra bajo ciclos de congelación-decongelación.....	50
5.2.7.4 Estabilidad de la muestra en refrigeración.....	51
5.2.7.5 Estabilidad de la muestra procesada.....	52
5.3 Análisis de las muestras.....	54
6. CONCLUSIONES.....	58
7. BIBLIOGRAFÍA.....	59
APÉNDICE I.....	61

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Preparación de la curva patrón.....	26
Tabla 2. Condiciones cromatográficas.....	39
Tabla 3. Parámetros cromatográficos evaluados.....	40
Tabla 4. Linealidad del método para cuantificar metformina en plasma.....	41
Tabla 5. Repetibilidad del método.....	43
Tabla 6. Reproducibilidad del método.....	44
Tabla 7. Recobro absoluto de metformina en plasma.....	47
Tabla 8. Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente.....	48
Tabla 9. Estabilidad de la muestra en congelación.....	49
Tabla 10. Estabilidad de la muestra bajo ciclos de congelación-descongelación.....	60
Tabla 11. Estabilidad de la muestra en refrigeración.....	51
Tabla 12. Estabilidad de la muestra procesada.....	53
Tabla 13. Seguimiento de las curvas de calibración.....	55
Tabla 14. Seguimiento de las muestras de control de calidad.....	56
Tabla 15. Concentración promedio de metformina en plasma respecto al tiempo.....	57

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular de metformina.....	7
Figura 2. Esquema del método de extracción.....	29
Figura 3. Esquema de extracción para cuantificar metformina en plasma.....	40
Figura 4. Gráfica promedio de log área vs. log concentración plasmática de metformina.....	42
Figura 5. Selectividad del método.....	46
Figura 6. Gráfica de Concentración plasmática promedio de metformina vs. tiempo.....	57

1. RESUMEN

El presente trabajo tuvo como finalidad desarrollar y validar un método analítico por CLAR para la determinación de metformina en plasma, y mostrar su aplicación para determinar la concentración con respecto al tiempo en las muestras plasmáticas de seis voluntarios sanos.

Los resultados de la validación muestran que el método es exacto, preciso, selectivo y lineal en el intervalo de concentraciones de 10 a 4000 ng/mL, con un coeficiente de correlación de 0.9998. El límite de cuantificación y de detección fue de 10 ng/mL y 5 ng/mL respectivamente y tuvo un recobro absoluto reproducible en el intervalo de concentraciones estudiado.

Las muestras plasmáticas de metformina demostraron ser estables en condiciones de congelación (-70°C), refrigeración (5°C), ciclos de congelación-descongelación, temperatura ambiente y muestra procesada.

La población utilizada para mostrar la aplicación del método analítico estuvo conformada por seis voluntarios mexicanos, a los cuales se les administró una dosis única de 850 mg de metformina. Las muestras sanguíneas fueron recolectadas al tiempo 0, a los 30, 45, 60, 75, 90 minutos, 2, 2.5, 3, 4, 6, 9 y 12 horas después de su administración.

Los resultados obtenidos muestran que el método analítico validado puede ser utilizado de forma rutinaria para determinar la concentración de metformina plasma, lo cual permitirá caracterizar el perfil farmacocinético de la población en estudio, convirtiéndose en una herramienta de gran utilidad dada la alta incidencia de la diabetes en la actualidad.

2. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

Actualmente en nuestro País la incidencia de la diabetes ha aumentado considerablemente. Esta enfermedad se caracteriza clínicamente como: insulino-dependiente (tipo 1) y no insulino-dependiente (tipo 2). La diabetes mellitus es un importante problema de salud pública en México. En los últimos cinco años ha llegado a ocupar la primera causa de muerte con 11% del total de las defunciones en ambos sexos y 14% de las muertes de las mujeres. Aproximadamente el 90% de las personas con diabetes son del tipo 2. Los agentes hipoglucemiantes son medicamentos orales para el tratamiento de esta enfermedad.

La metformina es una opción para el tratamiento de la diabetes tipo 2, se indica cuando han fracasado los intentos por controlar la enfermedad con dieta, en diabetes mellitus estable del adulto, especialmente del obeso; fallas primarias y secundarias a otros hipoglucemiantes orales; diabéticos en tratamiento con sulfonilureas con tendencia al aumento de peso; sin embargo, a pesar de tener muchos años en el mercado farmacéutico nacional, no existe información sobre la disposición de dicho fármaco en la población mexicana.

Ahora bien, para caracterizar un perfil farmacocinético, es necesario contar con un método analítico que permita la cuantificación del fármaco en un fluido biológico; el cual debe ser validado.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

De acuerdo a lo anterior se efectuó el presente trabajo con los siguientes objetivos:

- Desarrollar y validar un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para cuantificar metformina en plasma.
- Aplicar el método analítico validado en el análisis de muestras plasmáticas de voluntarios sanos.

3. GENERALIDADES.

3.1. Validación de métodos analíticos.⁽¹⁾

Una vez desarrollado un método de análisis, deberá validarse, es decir, se debe confirmar y documentar que los resultados obtenidos son confiables. La validación se define como la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado.

En un ensayo de validación se consideran los siguientes parámetros:

Linealidad .^(1,2) La linealidad de un método analítico se refiere a la capacidad del método para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra en un intervalo de trabajo que comprende la concentración mínima y máxima de analito para el cual el método ha sido probado y dentro del cual se puede efectuar la interpolación en una curva estándar.

Precisión.^(1,2) La precisión esta relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el método se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, esta se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.

Repetibilidad. ⁽²⁾ Precisión de un método que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio, obtenida entre determinaciones independientes realizadas en condiciones iguales.

Reproducibilidad. ⁽²⁾ Es la precisión de un método que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en diferentes condiciones de análisis.

Exactitud. ⁽²⁾ La exactitud de un método corresponde a la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor verdadero o de referencia.

Recuperación absoluta. ⁽²⁾ Eficiencia del método analítico para cuantificar él o los compuestos por analizar.

Selectividad. ^(1,2) Se refiere a la capacidad de un método para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, es decir, que pueda producir una señal medible debida solo al analito, libre de interferencia de otros componentes, en la matriz de la muestra.

Sensibilidad. ⁽¹⁾ La sensibilidad de un método corresponde a la mínima cantidad del analito que puede producir un resultado significativo. Los parámetros a definir al evaluar la sensibilidad de un método son:

Límite de detección. ⁽¹⁾ Corresponde a la mínima concentración de analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, en las condiciones establecidas. Su determinación puede efectuarse por comparación con la respuesta de un blanco o placebo, siendo positiva cuando la señal supere la relación señal / ruido en un factor de 2 o 3.

Límite de cuantificación. ⁽¹⁾ Corresponde a la concentración mas baja del analito que puede cuantificarse con precisión y exactitud bajo las condiciones establecidas.

Estabilidad de la muestra. ⁽²⁾ Es la propiedad del compuesto por analizar de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis.

3.2. MONOGRAFÍA DE METFORMINA

3.2.1. Propiedades fisicoquímicas.^(3,4)

Polvo cristalino blanco, inodoro, soluble en agua y en etanol al 96%; prácticamente insoluble en acetona, éter y cloroformo.

Estructura Molecular

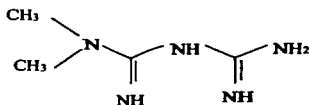


Figura 1. Estructura molecular de la metformina.

Fórmula Condensada	$C_4H_{11}N_5$
Peso Molecular	129.17 g/mol
Pka	11.25 y 2.8

Nombre Químico	N,N-Dimetilimidodicarbonimididiamida 1,1-Dimetilbiguanida
Nombre Genérico	Metformina
Nombre Comercial	Glucophage
Punto de fusión	222 a 226 ° C
Sinónimos	Diabetosan, Diabex, Metiguanide e Islotin

3.2.2. Indicaciones terapéuticas.⁽⁴⁾

La metformina esta indicada en la diabetes mellitus estable del adulto, especialmente del obeso; fallas primarias y secundarias a otros hipoglucemiantes orales y diabéticos en tratamiento con sulfonilureas con tendencia al aumento de peso.

3.2.3. Farmacocinética.^(5,6,7)

Se absorbe principalmente a partir del intestino delgado, su absorción puede extenderse alrededor de 6 horas; la unión a proteínas plasmáticas es prácticamente nula, se excreta sin cambios en la orina, a una dosis de 500 mg su vida media es de 3.16 ± 0.47 h. La dosis máxima recomendada es de 3 g, tomados en tres dosis con las comidas. La concentración máxima en plasma en una condición estable se alcanza en un promedio de 2.4 ± 0.93 h y es de 682.1 ± 160.6 ng/mL. Su biodisponibilidad es del 50-60%. La metformina se distribuye rápidamente en los tejidos y fluidos periféricos y más lentamente en los eritrocitos. Las mayores concentraciones del fármaco se encuentran en los riñones, hígado y glándulas salivares.

La metformina se elimina por los riñones, en su mayor parte sin metabolizar, mediante un proceso tubular por lo que en los ancianos se puede producir una acumulación debido a una reducción de la función renal. Los fármacos catiónicos pueden, por tanto, alterar su secreción tubular. Un 10% de la dosis es excretada en las heces. La metformina se puede acumular en pacientes con CrCl (depuración renal) < 60 ml/min, lo que puede aumentar el riesgo de acidosis láctica.

3.2.4. Farmacodinamia.^(4,5,6)

Las principales causas de la reducción de glucosa durante el tratamiento con metformina parecen ser un aumento del efecto de la insulina en los tejidos periféricos. A través de potenciar las acciones de la insulina endógena, aumenta la síntesis de glucógeno del músculo esquelético. También puede disminuir la glucosa plasmática al reducir la absorción de la glucosa desde el intestino.

Aunque el mecanismo de acción de la metformina no está completamente determinado, se cree que su principal efecto en la diabetes de tipo 2 es la disminución de la gluconeogénesis hepática. Además, la metformina mejora la utilización de la glucosa en músculo esquelético y en tejido adiposo aumentando el transporte de la glucosa en la membrana celular.

La coadministración de metformina con otros antidiabéticos, en particular con insulina y sulfonilureas aumenta la actividad hipoglucémica de estos últimos en los enfermos diabéticos.

La furosemida aumenta las concentraciones de metformina en plasma y sangre en un 22% y el ABC en un 15% sin que se observe ningún cambio significativo en el aclaramiento renal de la metformina. Por otra parte, la metformina disminuye las concentraciones máximas de furosemida en plasma y sangre en un 31% y 12%, respectivamente, siendo también reducida la vida media de eliminación de la furosemida en un 32% aunque sin ser afectado el aclaramiento renal.

Los fármacos catiónicos que son eliminados por secreción renal tubular como la amiloride, cimetidina, digoxina, dofetilida, mitodrina, morfina, procainamida, quinidina, quinina, ranitidina, triamterene, trimetoprim o vancomicina, pueden reducir la eliminación de la metformina al competir en un proceso de transporte tubular común.

No se recomienda el fármaco anti-arrítmico dofetilida en pacientes tratados con fármacos catiónicos ya que la metformina puede incrementar las concentraciones plasmáticas del primero.

Se ha observado interacción entre cimetidina y metformina con un aumento del 60% en la C_{max} de la metformina y un aumento del ABC del 40%. Otros fármacos antagonistas H-2, como la famotidina y la nizatidina parecen interactuar menos que la cimetidina, debido a una menor excreción tubular.

La coadministración de nifedipina aumenta las concentraciones plasmáticas y el ABC de metformina en un 20% y un 9%, respectivamente, con un incremento de la cantidad de metformina excretado en la orina. La vida media de eliminación no es afectada. Parece ser que la nifedipina aumenta la absorción de la metformina, hecho a tener en cuenta si ambos fármacos se administran concomitantemente.

Los pacientes bajo tratamiento antidiabético pueden tener hipoglucemias si se administran concomitantemente captopril o enalapril.

Los beta-bloqueadores pueden prolongar la hipoglucemia al interferir con la movilización de los depósitos de glucógeno o hiperglucemia inhibiendo la secreción de insulina y reduciendo la sensibilidad de los tejidos a la insulina. Los beta-bloqueadores también pueden enmascarar algunos de los síntomas de la hipoglucemia como la taquicardia y el temblor.

La administración de octreotida en pacientes tratados con antidiabéticos orales o insulina puede producir hipoglucemia debido a la disminución de la motilidad intestinal que ocasiona una reducción de los niveles de glucosa post-prandiales. Los pacientes deben ser cuidadosamente monitorizados si se administran ambas medicaciones concomitantemente.

3.2.8. Presentaciones, Forma Farmacéutica y Formulación.⁽⁵⁾

GLUCOPHAGE®FORTE. Tabletas

Farmacéuticos LAKESIDE, S.A. De C.V.

Cada tableta contiene:

Clorhidrato de metformina..... 850 mg

Excipiente c.b.p.1 tableta

Presentación comercial: Caja con 40 tabletas de 850 mg en blister pack.

GLUCOPHAGE®. Tabletas

Farmacéuticos LAKESIDE, S.A. DE C.V.

Cada tableta contiene:

Clorhidrato de metformina500 mg

Excipiente c.b.p.1 tableta

Presentación comercial: Caja con 15, 30, 60 tabletas de 500 mg en blister pack.

DIMEFOR®. Tabletas

Laboratorios LILLY.

Cada tableta contiene :

Clorhidrato de metformina 850 mg

Excipiente c.b.p. 1 tableta

Presentación comercial: Frasco con 30, 60 tabletas de 850 mg.

DABEX* Tabletas

Laboratorios MERCK S.A. DE C.V.

Cada tableta contiene:

Clorhidrato de metformina 850 mg

Excipiente c.b.p. 1 tableta

Presentación comercial: Caja con 30 tabletas de 850 mg en blister pack.

DABEX* Tabletas

Laboratorios MERCK S.A. DE C.V.

Cada tableta contiene:

Clorhidrato de metformina 500 mg

Excipiente c.b.p. 1 tableta

Presentación comercial: Caja con 60 tabletas de 500 mg en blister pack.

3.3. Métodos analíticos para cuantificar metformina en plasma.

Uno de las metodologías más utilizadas en la actualidad para realizar determinaciones de fármacos y sus metabolitos en diversos fluidos biológicos es la cromatografía de líquidos de alta resolución que es una técnica de separación basada en la migración diferencial de los componentes de una mezcla por interacción entre una fase estacionaria de gran superficie y una fase móvil que la recorre.

A continuación se describen algunos métodos analíticos para la cuantificación de metformina por cromatografía de líquidos de alta resolución:

Vesterquist y cols. ⁽⁹⁾ diseñaron un método por CLAR para cuantificar metformina en plasma, utilizando una precolumna Whatman SCX, una columna analítica Whatman SCX (250 x 4.6 mm) y una fase móvil de fosfato de amonio 0.05 M. Las muestras las sometían a una ultrafiltración durante 30 minutos, posteriormente se inyectaban al cromatógrafo y se monitoreaba a una longitud de onda de 232 nm. Bajo estas condiciones la metformina presenta un tiempo de retención alrededor de 5 minutos y la linealidad fue establecida en el rango de 0.10 a 40 mg/L con un coeficiente de correlación de 0.988.

Cheng y cols. ⁽¹⁰⁾ desarrollaron un método por CLAR y detección al ultravioleta para la determinación de metformina en plasma. Las condiciones cromatográficas usadas fueron las siguientes: una columna Hypersil HS silica (5 μ m) de 250 x 4.6 mm y una precolumna Hichrom silica HS, la columna se mantuvo a una temperatura de 40°C; la fase móvil consistió de acetonitrilo y buffer de fosfato de amonio 0.03 M y pH=7 en una proporción de 25:75 v/v, la velocidad de flujo fue de 1mL/min, el estandar interno empleado fué atenolol y la detección se realizó a una longitud de onda de 240 nm.

El método de extracción fue una extracción líquido-líquido y consistió en la acidificación de las muestras con ácido clorhídrico 1 M, posteriormente se adicionó acetonitrilo para la desproteinización de las mismas, se agitaron durante 30 seg y se centrifugaron a 1763 rpm durante 5 minutos; el sobrenadante se transfirió para que se le adicionara diclorometano, se agitó 3 segundos y se centrifugó a las condiciones dadas anteriormente; de la fase acuosa se tomó la alícuota que se inyecta al cromatógrafo.

Los resultados obtenidos fueron un tiempo de retención de 7.8 y 6.8 minutos para la metformina y el atenolol respectivamente, un coeficiente de correlación de 0.999 en un rango de concentración de 10 a 2000 ng/mL.

3.4. Diabetes^(8,12)

La diabetes es una enfermedad crónica que incapacita al organismo a utilizar los alimentos adecuadamente. Para metabolizar la glucosa adecuadamente, el organismo necesita una sustancia llamada *insulina*, la cual es una hormona producida en el páncreas, y cuya función es regular el uso de la glucosa en el organismo. La insulina trabaja permitiéndole a la glucosa alojarse en las células para que éstas la utilicen como combustible, manteniendo a su vez los niveles de glucosa en la sangre dentro de lo normal (70 a 110 mg/dl).

La diabetes consta de un grupo de síndromes caracterizados por hiperglucemia; alteraciones del metabolismo de lípidos, carbohidratos y proteínas, y aumento del riesgo de complicaciones por enfermedad vascular. La mayoría de los pacientes pueden clasificarse clínicamente como con diabetes insulino dependiente o diabetes tipo 1; o diabetes no insulino dependiente o diabetes tipo 2. La incidencia de cada tipo de diabetes varía mucho en todo el mundo. La mayoría de los diabéticos tiene diabetes no insulino dependiente; la incidencia de esta aumenta con la edad y es afectada por la etnicidad dentro de un país.

En la diabetes tipo 1 el organismo destruye las células productoras de insulina en el páncreas y como resultado se inhibe la producción de insulina. La desarrollan generalmente niños y jóvenes adultos, pero puede aparecer a cualquier edad. Las personas que pueden desarrollar este tipo de diabetes son las que tengan familiares directos con este tipo de diabetes y el riesgo aumenta en los caucásicos. El tratamiento empleado es dieta, ejercicio e inyecciones de insulina.

A diferencia de las personas que tienen diabetes tipo 1, que no producen insulina en lo absoluto, las personas con diabetes tipo 2 sí producen insulina. Sin embargo, no producen suficiente insulina o el cuerpo no aprovecha adecuadamente la insulina que producen.

La diabetes no insulino dependiente o tipo 2 es una afección caracterizada por una marcada ineficiencia del cuerpo para utilizar insulina, es decir, no es propiamente una deficiencia de insulina, sino una resistencia a la acción de la hormona en los sitios donde ocurre el metabolismo o transformación del azúcar o glucosa; por lo que se habla de una resistencia a insulina. Los mecanismos por los que esta resistencia a insulina se origina son muy variados, en su mayoría se deben a una combinación de factores genéticos asociados con factores de estilo de vida como obesidad y hábitos dietéticos inapropiados.

Eventualmente las células se cansan de producir insulina y dejan de funcionar correctamente. Entonces los niveles de azúcar en sangre aumentan y se desarrolla la diabetes. Este tipo de diabetes se desarrolla en personas mayores de 45 años generalmente con sobrepeso y los factores de riesgo son un historial familiar de diabetes, falta de ejercicio frecuente, aumento de la presión arterial y aumento en los niveles de lípidos en sangre.

La mayoría de la gente que padece diabetes tipo 2 no necesita ser tratada con insulina. Aproximadamente, un 25 % solo requiere ser tratado a través de dietas y programas de ejercicios y un 50 %, es tratado con medicamentos orales, denominados *agentes hipoglicemiantes orales* para mantener los niveles de azúcar de la sangre en valores lo más cercanos a lo normal como sea posible.

Los síntomas característicos son: poliuria (orina frecuente), polidipsia (*sed incesante*), polifagia (*hambre continua*) y otros como *visión borrosa, fatiga, sequedad de mucosas, infecciones genitales frecuentes y pérdida de peso involuntario.*

Aunque aun no hay una cura para la diabetes, ésta puede ser controlada. La meta principal en el tratamiento es mantener los niveles de azúcar en la sangre (*glicemia*) lo más cerca del rango normal como sea posible (70 a 110 mg/dl) durante la mayor cantidad de tiempo.

Los alimentos hacen que los niveles de azúcar se eleven, y el ejercicio y la insulina hacen que éstos niveles disminuyan. El control de la diabetes es un constante balance de estos tres elementos. Si este balance no se establece existe el riesgo de que suceda una de las dos emergencias en diabetes, que son: hipoglucemia (bajos niveles de azúcar en la sangre) o hiperglucemia (elevados niveles de azúcar en la sangre). Si los niveles de azúcar se mantienen muy elevados por un periodo de tiempo largo, esto puede traer como consecuencia una situación peligrosa, denominada *cetoacidosis*.

El tratamiento de la diabetes no insulino-dependiente se basa en la dieta y el ejercicio, pero en ciertas ocasiones el hacer dieta no es suficiente para controlar la diabetes por lo que se utilizan hipoglucemiantes orales; dentro de los cuales se encuentran las sulfonilureas, las tiazolidonas, inhibidores de α -glucosidasa y las biguanidas.

Las tiazolidonas disminuyen la resistencia a la insulina en los tejidos del cuerpo permitiendo así la entrada de la glucosa a las células, de esta forma ayudan a la insulina a trabajar mejor en los músculos y las grasas.

Los inhibidores de la α -glucosidasa actúan disminuyendo la absorción de azúcar en el intestino después de las comidas. Este tipo de medicamentos puede tener efectos secundarios incluyendo gases y diarrea.

Las sulfonilureas causan hipoglucemia al estimular la liberación de insulina a partir de las células pancreáticas β . La administración de estas a pacientes con diabetes tipo 2 aumentan la liberación de insulina desde el páncreas, también pueden incrementar las cifras de insulina al reducir la depuración de la hormona en el hígado.

Las sulfonilureas se utilizan para controlar la hiperglucemia en pacientes con diabetes tipo 2 en quienes es imposible alcanzar control apropiado sólo con cambios de la dieta. Solo un 2 % de las personas que comienzan usando medicamentos orales, paralizan su utilización por reacciones adversas.

Las biguanidas (la fenformina, la buformina y la metformina) producen descenso de la glucemia en los animales y sujetos pancreatoprivos, pero no se ha demostrado que puedan mantenerse durante un lapso prolongado sin insulina; a diferencia de las sulfonilureas, actúan beneficiosamente en los diabéticos adultos o del tipo 2. Pueden actuar en ausencia de insulina y de páncreas funcionante. Inhiben la absorción intestinal de glucosa; aumentan la captación de glucosa por el músculo; inhiben la gluconeogénesis hepática aumentada en los diabéticos y estimulan la glucólisis anaerobia. Su absorción es similar a la de las sulfonilureas y su volumen de distribución de alrededor de 0.1 L/kg. Son drogas de acción fugaz por lo que conviene la administración de preparados de acción prolongada para poder realizar una toma diaria.

Las biguanidas son capaces de producir , náuseas, vómitos, cólicos y diarrea.

La acidosis láctica es rara y se trata por inyección intravenosa de bicarbonato de sodio. La hipoglucemia es muy poco frecuente, nunca grave y cede rápidamente a la ingestión de azúcar. Están indicadas junto con las sulfonilureas en caso de que estas últimas solas no puedan controlar bien la diabetes o bien de entrada en los diabéticos muy obesos; se emplean solas en diabéticos muy obesos no controlables con una dieta pobre en calorías.

La fenformina es un fármaco potente, pero menos que la glibenclamida y la duración de acción es un poco mayor que la de la tolbutamida; se oxida en el organismo parcialmente y junto con su metabolito se excreta en la orina en forma rápida, su vida media es de 7 horas. La fenformina dejó de usarse debido a una relación con acidosis láctica.

La buformina es menos activa que la fenformina, se excreta en la orina como tal y su vida media es de alrededor de 5 horas; esta tiene uso limitado.

4. PARTE EXPERIMENTAL

El trabajo realizado consistió de dos partes:

1. Desarrollo y validación del método analítico.
2. Análisis de muestras plasmáticas para mostrar su aplicación.

4.1. Desarrollo del método analítico.

El desarrollo del método se basó en lo descrito por Yuen y cols. ⁽¹³⁾ con algunas modificaciones que se mencionan a continuación:

- Se adecuó la fase móvil: se cambió de solución amortiguadora de fosfato de amonio 0.05 M pH 7.0:metanol:acetonitrilo en proporción 45:15:40 v/v por una constituida por solución amortiguadora de fosfato de amonio 0.05 M pH 7.0:metanol en proporción 40:60 v/v.
- Se cambió de columna por una de características similares a la utilizada en la referencia mencionada anteriormente.
- El intervalo de concentraciones de la curva de calibración, se modificó de un intervalo de 62.5 a 4000 ng/mL por un rango de 10 a 4000 ng/mL.

4.1.1. Material, reactivos y equipo.

Sustancia de referencia.

Metformina HCl estándar secundario, lote 0112000032, estandarizado contra estándar primario de clorhidrato de metformina EP (Farmacopea Europea) lote 1.

Reactivos

Ácido perclórico, R.A. J.T. Baker

Agua desionizada, grado CLAR

Fosfato de amonio, R.A. J.T. Baker

Hidróxido de amonio, R.A. J.T. Baker

Metanol, grado CLAR J.T. Baker

Acetonitrilo, grado CLAR J.T. Baker

Plasma humano con certificado de pruebas de grupo sanguíneo, factor Rh, VDRL y VHI obtenido del Banco de Sangre del Hospital Central Sur de Alta Especialidad.

Equipo

Agitador vortex Thermolyne

Balanza analítica OHAUS

Centrifuga Eppendorf

Micropipetas Eppendorf

Pipeta repetidora Eppendorf

Sonicador Cole-Parmer

Equipo cromatográfico

Cromatógrafo de líquidos Waters Millennium equipado con:

Detector uv modelo 2487

Inyector automático 717 plus Waters

Bomba cuaternaria Controllers 600

Paquete de integración Millennium versión 32

4.1.2. Preparación de las soluciones.

Solución amortiguadora de fosfato de amonio 0.05 M pH=7.0

Pesar 5.84 g de fosfato de amonio y transferirlo a un matraz volumétrico de 1 L, disolver con 500 mL de agua CLAR ajustar el pH a 7.0 con hidróxido de amonio concentrado, y llevar a volumen con esta misma. Filtrar la solución al vacío y desgasificar durante 20 minutos.

Solución estándar de metformina de 100 µg/mL

Pesar con exactitud 10 mg de estándar de metformina, transferirlo a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con 50 mL de metanol grado CLAR y llevar a volumen con el mismo.

Solución estándar de metformina de 10 µg/mL

Tomar 10 mL de la solución de 100 µg/mL, transferirla a un matraz volumétrico de 100 mL y llevar a volumen con metanol grado CLAR.

4.1.3. Preparación de la curva patrón.

Se evaluaron los siguientes puntos correspondientes a la curva de calibración: 10, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, 3000 y 4000 ng/mL y tres puntos control, cuyos valores de concentración se encontraban dentro del intervalo, pero no pertenecían a los valores establecidos para la curva de calibración. Los valores de concentración asignados para los puntos control fueron 30, 750, 3500 ng/mL.

En la tabla 1 se esquematiza la preparación de los puntos correspondientes a la curva de calibración y puntos de control conteniendo metformina en plasma. El procedimiento fue el siguiente: depositar las alícuotas en tubos de vidrio de 16x150 mm, evaporar en baño de agua a 40°C y reconstituir en plasma agitando en vortex.

Tabla 1. Preparación de la curva patrón.

Concentración (ng/ml)	Alicuota de la solución patrón de 10 µg/ml (µl)	Volumen de plasma para reconstituir (ml)
10	1	1
30	3	1
50	5	1
100	10	1
250	25	1
500	50	1
750	75	1
1000	100	1
2000	200	1
3000	300	1
3500	350	1
4000	400	1

4.1.4. Selección de la columna cromatográfica.

Se probaron dos columnas cromatográficas de características semejantes a las empleadas en la referencia consultada.

La elección de la columna se hizo en base a la medición de los siguientes parámetros cromatográficos: factor de capacidad $2 < K < 10$, como indicador del grado de retención de la metformina entre la fase estacionaria y la fase móvil; simetría ≤ 2 , como indicador de la deformación o asimetría del pico lo cual es importante ya que de acuerdo a su magnitud se pueden presentar errores considerables de cuantificación.

Las columnas se probaron con las mismas fases móviles y los mismos métodos de extracción, modificando una variable a la vez, después de analizar los resultados obtenidos se determinaron las condiciones adecuadas para cumplir con lo mencionado anteriormente.

Las columnas de prueba fueron:

- Waters Spherisorb C18 5 μm Phenyl 4.6 x 250 mm.
- Waters Spherisorb C18 5 μm CN 4.6 x 250 mm.

4.1.5. Elección de la fase móvil.

La elección de la fase móvil se basó en la obtención de parámetros cromatográficos óptimos; simetría < 2.0 y el tiempo de retención, que garantizaran una buena separación de compuestos endógenos del plasma, facilidad de integración y cuantificación de los picos cromatográficos, la fase móvil empleada inicialmente fue solución amortiguadora de fosfato de amonio 0.05 M pH 7.0 :metanol:acetonitrilo en proporción $45:15:40$ v/v y los cambios realizados consistieron en modificar la proporción de los componentes, manteniendo el mismo pH, hasta obtener resultados que satisficieran los criterios anteriores.

4.1.6. Método de extracción.

Tomando lo reportado en el método de referencia la etapa en el proceso de extracción que se evaluó, fue la precipitación de la muestra plasmática, siendo el siguiente esquema el empleado para el desarrollo (Fig. 2):

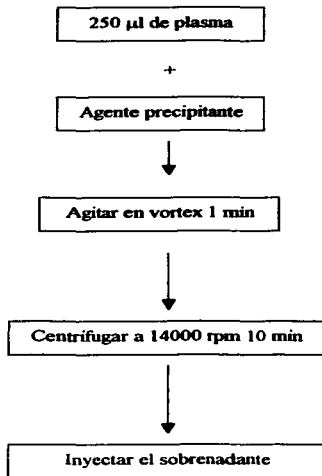


Figura 2. Esquema del método de extracción.

Los agentes precipitantes y sus volúmenes correspondientes fueron:

- Ácido tricloroacético al 10 %, 50 µl.
- Metanol HPLC, 1 ml.
- Ácido perclórico al 60 %, 10 µl.

Para seleccionar el método de extracción se consideró aquel que permitiera obtener un mayor recobro del fármaco y una mínima presencia de impurezas procedentes de componentes del plasma.

4.2. Validación del método.

El método analítico se validó de acuerdo a los criterios establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, en lo que se refiere a la validación de métodos analíticos para realizar pruebas de bioequivalencia. Los parámetros evaluados fueron los siguientes:

4.2.1. Linealidad del método

La linealidad se determinó preparando 3 curvas de calibración en plasma con 9 concentraciones diferentes a partir de pesadas independientes de metformina, el rango evaluado de concentraciones fue de 10 a 4000 ng/mL.

Las muestras se procesaron e inyectaron al cromatógrafo de acuerdo al método propuesto. Posteriormente se graficaron las relaciones log de áreas con respecto a log de la concentración de la metformina y se determinaron para las tres curvas el coeficiente de correlación (r), la pendiente (m) y la ordenada al origen (b).

El método se considera lineal si el coeficiente de correlación es mayor o igual a 0.99.

4.2.2. Precisión.

La precisión se evaluó en dos partes: repetibilidad y reproducibilidad. Para evaluar la repetibilidad se analizaron en un mismo día por quintuplicado tres concentraciones (baja, media y alta) conocidas de metformina en plasma; estas deben de ser diferentes a los puntos de la curva de calibración, pero que se encuentren en el intervalo de esta.

En el caso de la reproducibilidad se analizaron por duplicado las tres concentraciones conocidas de metformina durante tres días.

El criterio de aceptación fué que el coeficiente de variación no debe ser mayor al 15%.

4.2.3. Exactitud.

Para evaluar la exactitud se consideraron los datos de repetibilidad y reproducibilidad; para los cuales se determinó la desviación absoluta de la concentración recuperada promedio con respecto a la concentración nominal correspondiente.

El criterio de aceptación fué el siguiente: el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración debe estar dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal.

$$Desv.abs\% = 100 \times \frac{Cantidad\ adicionada - Cantidad\ recuperada}{Cantidad\ adicionada}$$

4.2.4. Selectividad.

La selectividad se evaluó analizando muestras blanco de plasma y muestras de plasma a las que se les añadió fármacos de uso común. Se consideró que se cumple esta prueba si no se presentan interferencias en el tiempo de retención de la metformina.

4.2.5. Límite de cuantificación.

Para evaluar este parámetro se preparó por quintuplicado la concentración mas baja del rango de trabajo; el limite es valido, si su valor promedio cae dentro del 20% del valor nominal y su coeficiente de variación no es mayor al 20%.

4.2.6. Límite de detección.

Este parámetro se determinó preparando por quintuplicado diluciones del último punto de la curva hasta la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica pudo distinguirse de los niveles de ruido o de una muestra libre del compuesto de interés.

4.2.7. Recobro absoluto.

El recobro se definió como el porcentaje del área de metformina recuperada después de la extracción de las muestras de la matriz biológica, comparada con el área de un estándar no sometido al proceso de extracción. Se evaluó preparando por triplicado en plasma y fase móvil tres niveles de concentración (30, 750 y 3500 ng/mL).

Las muestras plasmáticas se procesaron de acuerdo al método de extracción propuesto, y se inyectaron al cromatógrafo. Se evaluó la cantidad recuperada en base a la respuesta de las muestras plasmáticas extraídas comparadas con aquellas que no fueron sometidas al proceso de extracción. El porcentaje de esta relación debe ser reproducible en cada nivel de concentración.

4.2.8. Estabilidad.

Esta prueba consistió en determinar las condiciones de temperatura y tiempo en las que la metformina permanece estable en el plasma, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento. Se evaluó la respuesta por duplicado de muestras de tres niveles de concentración distintas a la curva de calibración, pero que se incluyen en su rango: bajo, medio y alto: 30, 750 y 3500 ng/mL respectivamente.

Los datos correspondientes a cada nivel de concentración se obtuvieron introduciendo los valores de área en la ecuación de la recta, derivada de la regresión lineal de la curva de calibración analizada el mismo día que las muestra.

Para que la metformina se considere estable en las diferentes condiciones evaluadas, la desviación absoluta de la concentración recuperada promedio para cada nivel de concentración con respecto al valor inicial debe ser menor del 15%.

4.2.8.1. Estabilidad a temperatura ambiente.

Se prepararon por duplicado 3 niveles de concentración conocida de metformina en plasma (30, 750, 3500 µg/mL), se procesaron y se inyectaron 25 µl de cada nivel de concentración (tiempo cero). El volumen restante se conservó a temperatura ambiente y posteriormente se procesó e inyectó a las 24 y 48 horas de su preparación.

4.2.8.2. Estabilidad en congelación (-70°C).

Se prepararon por duplicado en plasma los tres niveles de concentración conocida se procesaron y se inyectaron. El volumen restante se conservó a -70°C, posteriormente se descongeló para procesar e inyectar nuevamente, lo que implica un ciclo de congelación – descongelación; este ciclo se evaluó a los 19 y a los 29 días.

4.2.8.3. Estabilidad bajo ciclos de congelación – descongelación.

Para evaluar la estabilidad de metformina en plasma bajo ciclos congelación-descongelación se prepararon por duplicado tres niveles de concentración: 30, 750 y 3500 ng/mL, las cuales fueron almacenadas a -70°C , sometidas a 2 ciclos de congelación-descongelación a las 24 y 48 horas, y analizadas.

4.2.8.4. Estabilidad en refrigeración.

Se prepararon por duplicado los tres niveles de concentración conocida de metformina en plasma se procesaron y se inyectaron. El volumen restante se conservó en refrigeración para posteriormente procesarlo e inyectarlo nuevamente a las 24 y 48 horas posteriores a su preparación.

4.2.8.5. Estabilidad de la muestra procesada.

Se procesaron por duplicado tres niveles de concentración conocida de metformina en plasma, las cuales fueron colocadas a temperatura ambiente para ser inyectadas al tiempo cero y a las 7, 10 y 24 horas.

4.3. Aplicación del método.

El método analítico desarrollado y validado, fue aplicado en el análisis de muestras plasmáticas provenientes de 6 voluntarios sanos, después de la administración de una dosis oral única de 850 mg de metformina.

4.3.1. Procedimiento.

Se administró a cada voluntario 850 mg de metformina con 250 mL de agua en condiciones de ayuno.

Se colectaron de 8 a 10 mL de sangre venosa antes de cada administración y a los 30, 45, 60, 75, 90 minutos, 2, 2.5, 3, 4, 6, 9 y 12 horas después de la administración oral del fármaco. Durante cada toma de muestra se llevo registro de los signos vitales. Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm, se separó el plasma y se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

4.3.2. Voluntarios.

De acuerdo a los lineamientos propuestos en el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, la participación de todos los sujetos en el estudio de metformina fue voluntaria, para lo cual firmaron una carta de consentimiento informado, en las que se les indicó la naturaleza y fines del estudio así como de los efectos secundarios del fármaco y del proceso a seguir durante la realización de éste.

El estado de salud de los voluntarios se determinó mediante un historial clínico pruebas de gabinete, pruebas de laboratorio y detección de drogas de abuso.

4.3.2.1. Criterios de inclusión de voluntarios.

- Se incluyeron voluntarios clínicamente sanos, del sexo masculino con edades entre 18 y 40 años.

- Los voluntarios no deben ingerir ningún medicamento, por lo menos 2 semanas antes del estudio y hasta completarlo, ni consumir alcohol, café, tabaco o bebidas de cola por lo menos 48 horas antes del estudio o durante el mismo.

- El índice de masa corporal de los sujetos debe estar entre 19 y 30.

- Los voluntarios deben tener un buen estado de salud determinado por los resultados de una historia clínica.

4.3.2.2. Criterios de exclusión de voluntarios.

- Se descartó a todo voluntario que no cumpliera con los criterios de inclusión propuestos.
- No se aceptaron a los que presentaran sensibilidad o alergia a la metformina.
- Se excluyeron a los individuos que presentaron alguna alteración en sus signos vitales.
- Se rechazaron a los que presentaron trastornos gastrointestinales, hipertensión arterial e insuficiencia renal o hepática.

- Se descartaron los sujetos que mostraron antecedentes de drogadicción o de abuso de fármacos.

4.4. Análisis de las muestras.

El análisis de las muestras se realizó utilizando el método de cromatografía de líquidos de alta resolución previamente validado; en cada corrida se analizaron las muestras de tres voluntarios.

Las muestras del estudio se analizaron junto con una curva de calibración y 6 muestras de control de calidad (30, 750 y 3500 ng/mL) por duplicado; para evaluar la validez de la corrida, colocando una muestra control cada 6 muestras de voluntario. Se utilizó el integrador computacional Millennium 32 para determinar las áreas de los picos de metformina.

Las relaciones de log de área de metformina (y) y el log de las concentraciones de los estándares (x) se ajustaron por medio de un análisis de regresión log-log lineal por mínimos cuadrados a la ecuación $\log y = \log b + m \log x$, donde "log b" es la ordenada al origen (intercepto-y), y "m" es la pendiente de la curva de calibración. El área de metformina de las muestras del estudio (en términos logarítmicos) fue convertida a concentraciones usando los parámetros estadísticos generados.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

5.1. Desarrollo del método por CLAR para cuantificar metformina en plasma.

La fase móvil de elección fué solución amortiguadora de fosfato de amonio 0.05 M pH 7: Metanol en proporción 40:60 (v/v) a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min utilizando la columna Waters Spherisorb 5 µm CN, ya que estas condiciones permitieron obtener mejores parámetros cromatográficos.

El agente empleado para precipitar las muestras plasmáticas en la extracción de metformina fue el ácido perclórico al 60 %, con el cual se obtuvo un recobro superior a los obtenidos con los otros agentes evaluados.

Las condiciones cromatográficas para el análisis de las muestras se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones cromatográficas.

Detector	UV – VIS
Longitud de onda	234 nm
Columna	Waters Spherisorb 5 µm CN 4.6 x 250 mm
Fase móvil	Metanol: solución amortiguadora de fosfato de amonio 0.05 M pH 7.0 (60:40)
Velocidad de flujo	1.0 mL/min.
Volumen de inyección	25 µl
Tiempo de corrida	9.0 min.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Con las condiciones cromatográficas establecidas anteriormente se obtuvieron los siguientes parámetros cromatográficos (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros cromatográficos evaluados.

Parámetro	Valor
Tiempo de retención (tr)	8.5 min.
K	5.0
Simetría	1.2

El método de extracción seleccionado para las muestras plasmáticas se presenta en la figura 3:

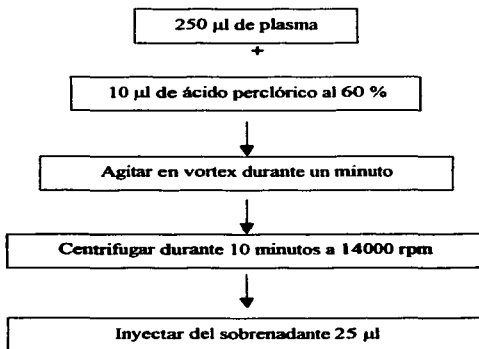


Figura 3. Esquema de extracción para cuantificar metformina en plasma.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.2. Validación del método analítico para cuantificar metformina en plasma.

Una vez establecidas las condiciones analíticas óptimas, se procedió a validar el método analítico para cuantificar metformina en plasma. Los resultados se presentan a continuación.

5.2.1. Linealidad del método.

Los resultados correspondientes a la evaluación de la linealidad del método analítico se muestran en la tabla 4, donde se puede observar que el método analítico fue lineal ($r \geq 0.99$) en el rango de concentraciones de 10 a 4000 ng/mL.

Tabla 4. Linealidad del método para cuantificar metformina en plasma.

Concentración (ng/mL)	Curva 1 log áreas	Curva 2 log áreas	Curva 3 log áreas	Promedio	D.E.	C.V.%
10	3.1379	3.0976	3.0737	3.1031	0.0324	1.0441
50	3.8014	3.7695	3.7614	3.7774	0.0211	0.5585
100	4.1358	4.0879	4.0756	4.0998	0.0318	0.7756
250	4.5376	4.4990	4.4956	4.5107	0.0233	0.5165
500	4.8579	4.8029	4.8045	4.8218	0.0313	0.6491
1000	5.1556	5.1254	5.1110	5.1307	0.0227	0.4424
2000	5.4622	5.4245	5.4165	5.4344	0.0244	0.4489
3000	5.6397	5.6027	5.5830	5.6085	0.0287	0.5117
4000	5.7658	5.7132	5.7282	5.7357	0.0270	0.4707
m	1.0173	1.0159	1.0222			
b	2.1017	2.0640	2.0399			
r	0.9999	0.9999	0.9999			

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la siguiente figura se presenta la gráfica promedio de log de áreas con respecto al log de la concentración plasmática de metformina.

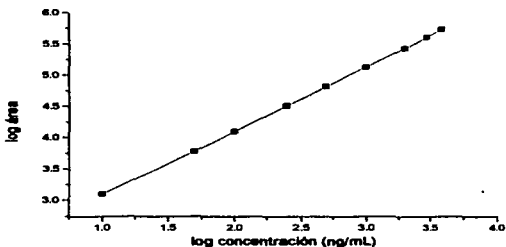


Figura 4. Linealidad del método para la determinación de metformina en plasma.

Establecido el rango de la curva de calibración, se definieron las concentraciones para evaluar los parámetros de precisión, exactitud, estabilidad, límite de cuantificación y límite de detección, las cuales difieren de la curva pero están incluidas en el rango. Las concentraciones empleadas fueron 30, 750 y 3500 ng/mL, nivel bajo, medio y alto respectivamente.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.2.2. Precisión y exactitud.

5.2.2.1. Repetibilidad.

En la tabla 5 se muestran los resultados de la prueba de repetibilidad del método, en donde se observa que el coeficiente de variación fue de 3.59 a 5.64 %, mientras que la desviación absoluta con respecto al valor nominal fue menor a 1.71 %; en ambas pruebas, la variación fue menor al límite máximo del 15%.

Tabla 5. Repetibilidad del método.

Muestra	Cantidad recuperada (ng/mL)		
1	33.21	816.14	3650.77
2	30.10	736.29	3356.45
3	30.77	735.08	3397.01
4	28.49	737.85	3356.30
5	30.00	776.40	3476.08
Promedio	30.51	760.35	3447.32
D.E.	1.72	35.69	123.79
C.V.%	5.64	4.69	3.59
Cantidad adicionada (ng/mL)	30	750	3500
Desv.abs %	1.71	1.38	1.51

5.2.2.2. Reproducibilidad.

En la tabla 6 se muestran los resultados de la prueba de reproducibilidad del método, en donde se observa que el coeficiente de variación se mantuvo en un rango de 2.95 a 5.99%, el cual no rebasa el límite máximo del 15% y la desviación absoluta con respecto al valor nominal fue menor a 1.74% en los tres niveles de concentración evaluados durante los tres días de trabajo, por lo que se considera que el método analítico es preciso y exacto.

Tabla 6. Reproducibilidad del método.

Día	Réplica número	Cantidad recuperada (ng/mL)		
		Control bajo 30 ng/mL	Control medio 750 ng/mL	Control alto 3500 ng/mL
1	1	33.21	816.14	3650.77
	2	30.10	736.29	3356.45
2	1	28.59	775.23	3585.97
	2	29.88	764.03	3493.34
3	1	29.56	744.90	3530.66
	2	28.11	741.81	3447.64
Promedio		29.91	763.07	3510.81
D.E.		1.79	29.88	103.69
C.V.%		5.99	3.92	2.95
Cantidad adicionada (ng/mL)		30	750	3500
Desviación absoluta %		0.31	1.74	0.31

5.2.3. Límite de detección.

El límite de detección correspondió a la concentración de 5 ng/mL en donde la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica fué tres veces mayor que el nivel de ruido.

5.2.4. Límite de cuantificación.

Se consideró 10 ng/mL como la cantidad mínima cuantificable, ya que esta fue la concentración más baja del rango de trabajo cuyo valor promedio cae dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal (cantidad adicionada) con un coeficiente de variación no mayor que 20%.

5.2.5. Selectividad.

En la figura 5 se presentan los cromatogramas obtenidos en la evaluación de la selectividad, después de procesar muestras plasmáticas conteniendo diversos fármacos de uso común; y se observa que ninguno de los fármacos utilizados interfiere con el pico de la metformina.

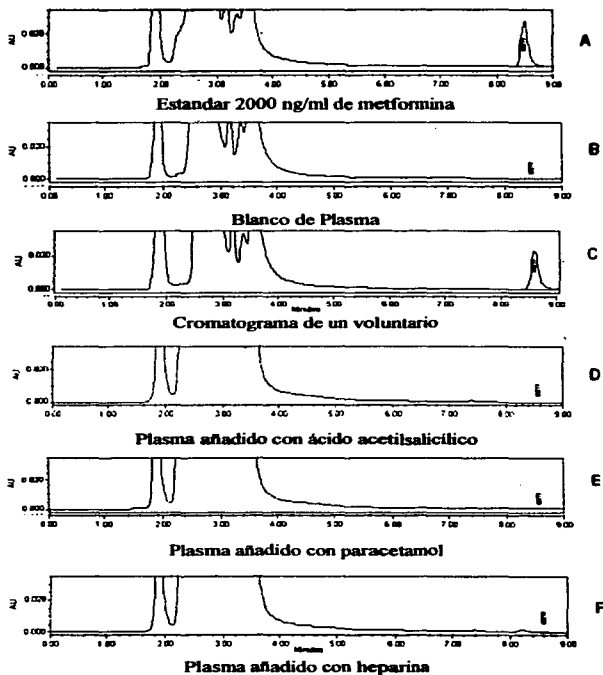


Figura 5. Selectividad del método.

5.2.6. Recobro absoluto.

En la tabla 7 se presenta el porcentaje de recobro para metformina en plasma.

Tabla 7. Recobro absoluto de metformina en plasma.

Estándar	Estándar en plasma (extraído) Área de metformina	Estándar en fase móvil (no extraído) Área de metformina	Recobro %
Control Alto 3500 ng/mL	436741.5	424264.5	102.50
	436229.5	427095.5	
	446160.0	435626.5	
	439710.3	428995.5	
Control Medio 750 ng/mL	95343.0	91666.0	103.93
	93028.0	89516.0	
	91408.0	88018.0	
	93259.7	89733.3	
Control bajo 30 ng/mL	3514.0	3388.0	103.24
	3587.0	3502.0	
	3648.0	3522.0	
	3583.0	3470.7	

El recobro de metformina fue de 103.22% en promedio, determinado a las concentraciones de 30 ng/mL (nivel bajo), 750 ng/mL (nivel medio) y 3500 ng/mL (alto), lo que indica que el método de extracción permite obtener una buena recuperación del fármaco, este porcentaje fue constante en el intervalo de concentraciones analizadas.

5.2.7. Estabilidad.

5.2.7.1. Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente.

En la tabla 8 se muestran los resultados correspondientes a la cuantificación de muestras mantenidas a temperatura ambiente durante 24 y 48 horas, después de su preparación. Se observa que las muestras presentaron una desviación absoluta menor al 15% con respecto al valor original, por lo que se considera que la metformina es estable bajo estas condiciones.

Tabla 8. Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente.

Tiempo 0			
	Bajo 30ng/mL	Medio 750ng/mL	Alto 3500ng/mL
	31.49	775.05	3684.26
	30.06	773.73	3561.99
Promedio	30.78	774.39	3623.13
Tiempo 24 horas			
	Bajo 30ng/mL	Medio 750 ng/mL	Alto 3500ng/mL
	32.09	764.21	3630.71
	29.32	757.17	3552.36
Promedio	30.71	760.69	3591.54
Desv.abs%	0.23	1.77	0.87
Tiempo 48 horas			
	Bajo 30ng/mL	Medio 750 ng/mL	Alto 3500 ng/mL
	32.23	805.32	3795.60
	32.13	824.01	3747.66
Promedio	32.18	814.67	3771.63
Desv.abs%	4.57	5.20	4.10

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.2.7.2. Estabilidad de la muestra en congelación.

En la tabla 9 se muestran los resultados correspondientes a la cuantificación de muestras sometidas a congelación (-70°C) durante 19 y 29 días, los cuales presentaron una desviación absoluta menor al 15% con respecto al valor original, por lo que se considera que la metformina es estable bajo estas condiciones.

Tabla 9. Estabilidad de la muestra en congelación.

Tiempo 0			
	Bajo 30ng/mL	Medio 750 ng/mL	Alto 3500 ng/mL
	31.49	775.05	3684.26
Promedio	30.06	773.73	3561.99
	30.78	774.39	3623.13
Tiempo 19 días			
	Bajo 30 ng/mL	Medio 750 ng/mL	Alto 3500 ng/mL
	30.72	774.68	3629.38
Promedio	31.93	768.36	3589.02
Desv.abs%	31.33	771.52	3609.20
	1.79	0.37	0.38
Tiempo 29 días			
	Bajo 30ng/mL	Medio 750 ng/mL	Alto 3500 ng/mL
	28.64	781.45	3635.99
Promedio	30.36	782.13	3649.63
Desv.abs%	29.50	781.79	3642.81
	4.14	0.96	0.54

**5.2.7.3. Estabilidad de la muestra bajo ciclos de congelación -
descongelación.**

En la tabla 10 se muestran los resultados correspondientes a la cuantificación de muestras sometidas a dos ciclos de congelación – descongelación, en esta se puede observar que los valores obtenidos, cumplen con el límite de $\pm 15\%$ del valor original, por lo que se concluye que la metformina es estable a -70°C bajo dos ciclos de congelación-descongelación (24 y 48 horas).

Tabla 10. Estabilidad de la muestra en ciclos de congelación – descongelación.

Día 0			
	Bajo 30 ng/mL	Medio 750 ng/mL	Alto 3500 ng/mL
	31.49	775.05	3684.26
	30.06	773.73	3561.99
Promedio	30.78	774.39	3623.13
1er. Ciclo			
	Bajo 30 ng/mL	Medio 750 ng/mL	Alto 3500 ng/mL
	30.72	774.68	3629.38
	31.93	768.36	3589.02
Promedio	31.33	771.52	3609.20
Desv.abs%	1.79	0.37	0.38
2°. Ciclo			
	Bajo 30 ng/mL	Medio 750 ng/mL	Alto 3500 ng/mL
	31.94	780.88	3453.34
	33.65	785.76	3558.03
Promedio	32.79	783.32	3505.68
Desv.abs%	6.56	1.15	3.24

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.2.7.4. Estabilidad de la muestra en refrigeración.

En la tabla 11 se muestran los resultados correspondientes a la cuantificación de muestras procesadas conservadas en refrigeración a 5° C durante 24 y 48 horas después de su preparación; en la cual se puede observar que los valores obtenidos cumplen con el límite del $\pm 15\%$ del valor original, con lo cual se demuestra que la metformina es estable a estas condiciones.

Tabla 11. Estabilidad de la muestra en refrigeración.

Tiempo 0			
	Bajo 30 ng/mL	Medio 750 ng/mL	Alto 3500 ng/mL
Promedio	31.49	775.05	3684.26
	30.06	773.73	3561.99
	30.78	774.39	3623.13
Tiempo 24 horas			
	Bajo 30 ng/mL	Medio 750 ng/mL	Alto 3500 ng/mL
Promedio	31.50	788.43	3646.61
	30.28	778.43	3555.72
Desv.abs%	30.89	783.43	3601.17
	0.37	1.17	0.61
Tiempo 48 horas			
	Bajo 30 ng/mL	Medio 750 ng/mL	Alto 3500 ng/mL
Promedio	33.30	771.03	3592.13
	32.64	795.41	3512.51
Desv.abs%	32.97	783.22	3552.32
	7.13	1.14	1.95

5.2.7.6. Estabilidad de la muestra procesada.

En la tabla 12 se muestran los resultados correspondientes a la cuantificación de las muestras después de ser sometidas al proceso de extracción y mantenidas a temperatura ambiente durante 7, 10 y 24 horas, de acuerdo con los resultados se concluye que la muestra procesada es estable durante 10 horas.

De acuerdo a los resultados anteriores se concluye, que las muestras de metformina en plasma fueron estables a temperatura ambiente y en refrigeración durante 48 horas; en congelación durante 29 días, durante dos ciclos de congelación – descongelación y durante 10 horas después de someterse al método de extracción ya que la desviación absoluta con respecto al valor inicial fue menor del 15 %.

Analizando los resultados de la validación, se estableció que el método analítico es confiable y adecuado para cuantificar metformina en plasma y para su aplicación en un estudio farmacocinético.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 12. Estabilidad de la muestra procesada.

Tiempo 0			
	Bajo 30 ng/mL	Medio 750 ng/mL	Alto 3500 ng/mL
	31.49	775.05	3684.26
	30.06	773.73	3561.99
Promedio	30.78	774.39	3623.13
Tiempo 7 horas			
	Bajo 30 ng/mL	Medio 750 ng/mL	Alto 3500 ng/mL
	33.63	818.60	3975.57
	31.54	825.89	3800.76
Promedio	32.59	822.25	3888.17
Desv.abs%	5.88	6.18	7.32
Tiempo 10 horas			
	Bajo 30 ng/mL	Medio 750 ng/mL	Alto 3500 ng/mL
	33.83	843.49	4168.72
	32.13	859.89	3964.09
Promedio	32.98	851.69	4066.41
Desv.abs%	7.16	9.98	12.23
Tiempo 24 horas			
	Bajo 30 ng/mL	Medio 750 ng/mL	Alto 3500 ng/mL
	39.05	939.74	3352.48
	36.26	1095.40	4055.05
Promedio	37.66	1017.57	3703.77
Desv.abs%	22.36	31.40	2.23

5.3. Análisis de las muestras.

Los resultados del seguimiento de las curvas de calibración para cuantificar metformina en plasma en el análisis de las muestras provenientes de voluntarios sanos se muestran a continuación en la tabla 13.

Esta tabla muestra que existe una mínima variación de las curvas de calibración ya que durante el análisis de las muestras el coeficiente de variación no excede el 15 % del valor original. Los valores de "r" mostrados fueron de 0.9998 o mayor; mientras que la reproducibilidad de los estándares fue del 8.90% o mejor. La exactitud fue del 6.43% o mejor para todos los puntos.

Tabla 13. Seguimiento de las curvas de calibración.

Comida	Voluntarios	Metformina en Plasma (ng/mL)										Intercepto (b)	Pendiente (m)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
1	12,3	10.71	48.79	86.19	239.06	499.86	894.00	2028.50	3019.48	4183.37	2.13	0.99	0.9998
2	4,5,6	10.33	50.35	95.42	243.90	497.57	1015.35	2031.54	2958.20	4082.38	2.07	1.01	0.9999
	promedio	10.54	48.99	90.42	242.83	495.07	967.98	2033.39	3004.82	4110.78	2.09	1.00	0.9998
	D.E (n-1)	0.19	1.26	1.13	3.36	4.51	15.75	5.94	41.06	63.35	0.03	0.01	0.00
	CV %	1.84	2.57	1.17	1.38	0.91	1.57	0.29	1.36	1.54	1.65	1.00	0.01
	Conc. nominal	10	50	100	250	500	1000	2000	3000	4000			
	Des. abs. %	5.4	2.02	3.58	2.86	0.68	0.20	1.86	0.15	2.76			

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la tabla 14 se presenta el seguimiento de las muestras control para cada corrida.

Tabla 14. Seguimiento de las muestras de control de calidad.

Corrida	Control Bajo 30 ng/mL	Control Medio 750 ng/mL	Control Alto 3500 ng/mL
1	27.66	738.39	3559.66
	24.80	734.42	3165.89
2	30.97	750.18	3441.41
	28.65	849.28	3971.89
Promedio	28.07	773.18	3595.64
D.E	2.21	48.61	320.43
C.V %	7.89	6.28	8.90
Conc. Nominal (ng/ml)	30	750	3500
Desv.abs %	6.43	3.09	2.73

Por otro lado el método analítico desarrollado y validado, mostró ser el adecuado para caracterizar el perfil de concentración plasmática con respecto al tiempo, después de administrar 850 mg de metformina (dosis oral única) a 6 voluntarios sanos, lo cual se presenta en la tabla 15 y la figura 6.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 15. Concentración promedio de metformina en plasma respecto al tiempo.

Tiempo (h)	Concentración \pm D.E.(ng/mL)
0.00	0.00 \pm 0.00
0.50	927.55 \pm 348.99
0.75	1182.70 \pm 248.83
1.0	1208.69 \pm 656.73
1.25	1441.19 \pm 334.11
1.5	1676.85 \pm 460.03
2.0	1974.49 \pm 558.21
2.5	2004.38 \pm 563.57
3.0	1709.24 \pm 574.38
4.0	1195.78 \pm 462.88
6.0	764.72 \pm 324.56
9.0	323.04 \pm 141.90
12.0	169.83 \pm 76.66

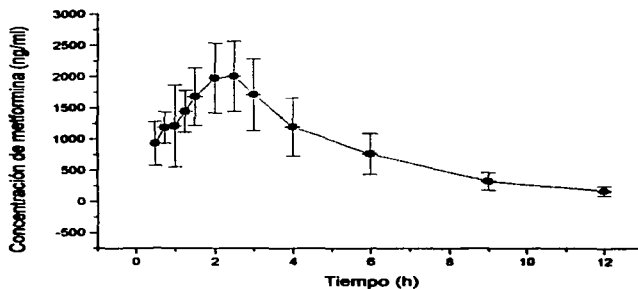


Figura 6. Gráfica de concentración plasmática promedio de metformina \pm D.E. vs. Tiempo.

6. CONCLUSIONES.

- El método analítico para cuantificar metformina en plasma, por cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, fue exacto, preciso, lineal y selectivo en el intervalo de 10 a 4000 ng/mL y estable bajo condiciones de manejo y almacenamiento como: congelación (-70°C) durante 29 días, temperatura ambiente por 48 horas, durante dos ciclos de congelación-descongelación, refrigeración (5°C) por 48 horas y como muestra procesada durante 10 horas a temperatura ambiente.
- El método analítico es sencillo lo que permite su uso de manera rutinaria para determinar la concentración de metformina en muestras plasmáticas.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Quattrocchi Oscar A.,Laba Raúl F. Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. 1ª edición. Editorial Artes Gráficas Farro S.A. Argentina 1992. pp.302-337.
2. 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 pruebas. Diario Oficial de la Federación, Primera Sección, Viernes 7 de mayo de 1999.
3. Rahway, N.J. The Merck Index. . Merck & Co. Inc. 9a edición. USA. 1980. pp. 1235.
4. Vademécum Farmacéutico. 6ª edición . Ediciones Rezza S.A. pp.957-958.
5. Rosenstein Ster Emilio. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas DEF. 45ª edición. Ediciones PLM. México 1999. pp.508, 588, 912.
6. Caille G, Lacasse Y. Bioavailability of metformin in tablet form using a new high pressure liquid chromatography assay method. Biopharm. Drug Dispos.3 (1993).pp. 257-263.
7. Scheen A.J., De Magalhaes A.C. Reduction of the acute bioavailability of metformin by the alpha-glucosidase inhibitor acarbose in normal man. Eur. J. Clin. Invest. Suppl. 3 (1994). pp. 50-54.
8. Hardman, J.G., Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman GA. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 9ª Edición. Editorial Médica Panamericana. México. 1997. pp. 19-29,1603-1607,1588-1590, 1819-1823.
9. Vesterqvist O. J. Determination of metformin in plasma by high-performance liquid chromatography after ultrafiltration. Chromatogr. B. 716 (1998) .pp. 299-304.
10. Cheng CL.J. Determination of metformin in human plasma by high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection. Chromatogr. B. 762 (2001) pp. 51-58.
11. Arancibia, A. Biodisponibilidad de Medicamentos. 1ª edición .Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.Chile. 1992. pp. 36, 239-245, 267-275, 297-309.

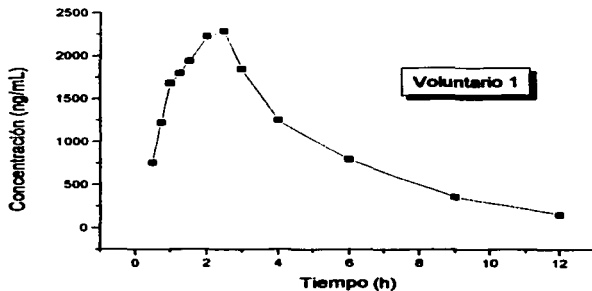
ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

12. Katzun Bertram G. Farmacología Básica y Clínica. 5ª edición. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. México 1994. pp. 45-60,1129-1138.
13. Yuen H, Peh K. Simple high performance liquid chromatographic method for the determination of metformin in human plasma. Chromatogr. Biomed. Appl., 710 (1998) pp. 243-246.

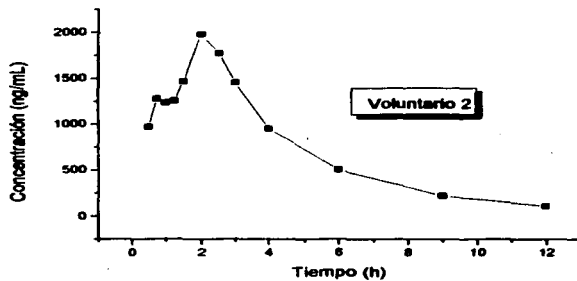
APENDICE I

Valores de Concentración plasmática de Metformina y gráfica correspondiente a cada voluntario

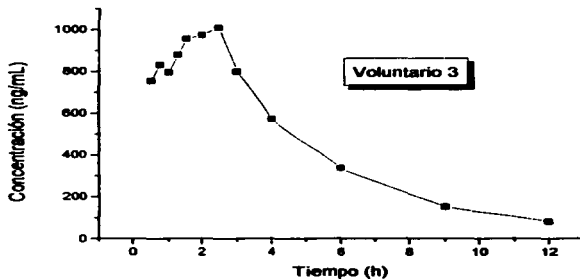
Tiempo (h)	VOLUNTARIO 1
	Concentración (ng/mL)
0.0	0.00
0.5	754.99
0.75	1221.55
1.0	1680.42
1.25	1798.97
1.5	1938.95
2.0	2223.40
2.5	2285.94
3.0	1845.15
4.0	1251.46
6.0	792.50
9.0	357.83
12.0	152.98



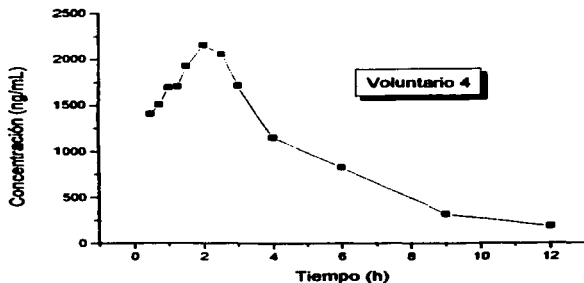
Tiempo (h)	VOLUNTARIO 2
	Concentración (ng/mL)
0.0	0.00
0.5	971.97
0.75	1277.42
1.0	1231.37
1.25	1254.84
1.5	1466.82
2.0	1977.80
2.5	1771.96
3.0	1452.31
4.0	950.92
6.0	504.96
9.0	222.61
12.0	108.44



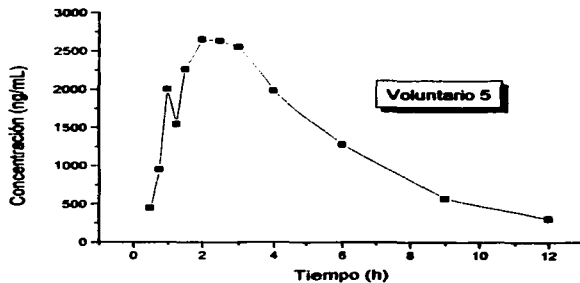
Tiempo (h)	VOLUNTARIO 3 Concentración (ng/mL)
0.0	0.00
0.5	755.88
0.75	832.25
1.0	795.56
1.25	879.33
1.5	956.24
2.0	973.67
2.5	1009.73
3.0	800.34
4.0	571.84
6.0	335.34
9.0	151.29
12.0	81.71



VOLUNTARIO 4	
Tiempo (h)	Concentración (ng/mL)
0.0	0.00
0.5	1408.19
0.75	1509.30
1.0	1693.89
1.25	1705.02
1.5	1927.49
2.0	2155.02
2.5	2057.94
3.0	1715.76
4.0	1152.22
6.0	825.42
9.0	318.39
12.0	187.96



Tiempo (h)	VOLUNTARIO 5
	Concentración (ng/mL)
0.0	0.00
0.5	449.58
0.75	949.52
1.0	1998.81
1.25	1537.09
1.5	2257.23
2.0	2646.10
2.5	2630.31
3.0	2549.01
4.0	1977.75
6.0	1277.18
9.0	567.71
12.0	299.85



Tiempo (h)	VOLUNTARIO 6
	Concentración (ng/mL)
0.0	0.00
0.5	1224.70
0.75	1306.15
1.0	1372.11
1.25	1471.93
1.5	1514.37
2.0	1870.96
2.5	2270.38
3.0	1892.89
4.0	1270.50
6.0	852.95
9.0	320.43
12.0	188.09

