



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**Optimización y validación de un método analítico para la cuantificación de  
Metformina en plasma de muestras provenientes de un estudio de  
bioequivalencia para tabletas de liberación prolongada por CLAR acoplado a un  
espectrómetro de MS-MS**

**Tesis**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**MARÍA DE LOURDES BULFEDA CASTILLO**



**Ciudad Universitaria, CDMX, 2017**



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:**

**PRESIDENTE:** Profesor: ALFREDO RAFAEL GARZON SERRA

**VOCAL:** Profesor: JUAN MANUEL RODRÍGUEZ

**SECRETARIO:** Profesor: MARÍA ISABEL RUIZ OLMEDO

**1er. SUPLENTE:** Profesor: KENNETH RUBIO CARRASCO

**2° SUPLENTE:** Profesor: DOMÍNGUEZ ROMERO ALLAN NOÉ

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**INVESTIGACIÓN FARMACOLÓGICA Y BIOFARMACÉUTICA, S. A. P. I. DE C. V.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**DRA. en C. MARÍA ISABEL RUIZ OLMEDO**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

**M. en A. OMAR EMMANUEL HERNÁNDEZ PIÑA**

**SUSTENTANTE:**

**MARÍA DE LOURDES BULFEDA CASTILLO**

## ÍNDICE GENERAL

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>Generalidades</b>	<b>14</b>
2.1	Diabetes	14
2.2	Tipos de diabetes	14
2.2.1	Diabetes mellitus tipo II	15
2.3	Generalidades del principio activo	15
2.4	Propiedades farmacológicas	16
2.5	Métodos bioanalíticos para la cuantificación de metformina	17
2.5.1	Cromatografía	17
2.5.1.1	Clasificación de los métodos cromatográficos	18
2.5.2	Detectores	19
2.5.2.1	Espectrometría de masas	19
2.6	Optimización del método bioanalítico	25
2.7	Validación de métodos bioanalíticos	26
<b>3</b>	<b>Objetivos</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>Metodología</b>	<b>31</b>
4.1	Materiales, equipos e instrumentos	31
4.1.1	Material	31
4.1.2	Equipos e instrumentos	31
4.1.3	Reactivos y disolventes	32
4.1.4	Sustancias de referencia	33
4.1.5	Matriz biológica	33
4.2	Optimización del método bioanalítico	33

4.3	Validación del método bioanalítico	35
4.3.1	Preparación de soluciones	35
4.3.2	Preparación de muestras estándar de calibración y controles de calidad en plasma	38
4.3.3	Método de extracción de la muestra	39
4.3.4	Adecuabilidad del sistema	39
4.3.5	Selectividad	40
4.3.5.1	Selectividad de inicio	40
4.3.5.2	Selectividad de la matriz biológica	40
4.3.5.3	Selectividad a fármacos de uso común	41
4.3.6	Acarreamiento (Prueba de arrastre)	41
4.3.7	Respuesta cruzada	42
4.3.8	Linealidad	42
4.3.9	Precisión del método	43
4.3.9.1	Repetibilidad	43
4.3.9.2	Reproducibilidad	43
4.3.10	Exactitud	44
4.3.11	Efecto matriz	44
4.3.12	Estabilidad del analito	44
4.3.12.1	Estabilidad del analito en la matriz biológica	45
4.3.12.1.1	Estabilidad a corto plazo	45
4.3.12.1.2	Estabilidad a largo plazo	45
4.3.12.2	Estabilidad de la muestra procesada	46
4.3.12.2.1	Estabilidad en el automuestreador	46
4.3.12.2.2	Estabilidad en refrigeración	46
4.3.12.3	Ciclos de congelación-descongelación	46
4.3.12.4	Estabilidad del analito en solución	47
<b>5</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>48</b>
5.1	Condiciones cromatográficas	48
5.1	Validación del método bioanalítico	52

5.1.1	Adecuabilidad del sistema	52
5.1.2	Selectividad de la matriz biológica y fármacos de uso común	53
5.1.3	Acarreamiento (Prueba de arrastre)	57
5.1.4	Respuesta cruzada	58
5.1.5	Linealidad	61
5.1.6	Precisión y exactitud	64
5.1.6.1	Repetibilidad	64
5.1.6.2	Reproducibilidad	65
5.1.7	Efecto matriz	66
5.1.8	Estabilidad del analito	67
5.1.8.1	Estabilidad del analito en la matriz biológica	67
5.1.8.1.1	Estabilidad a corto plazo	67
5.1.8.1.2	Estabilidad a largo plazo	69
5.1.8.2	Estabilidad de la muestra procesada	70
5.1.8.2.1	Estabilidad en el automuestreador	70
5.1.8.2.2	Estabilidad en refrigeración	71
5.1.8.3	Estabilidad de ciclos de congelación-descongelación.	71
5.1.8.4	Estabilidad del analito en solución	72
<b>6</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>78</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características y propiedades fisicoquímicas de metformina. ....	16
Tabla 2. Farmacocinética de metformina. ....	17
Tabla 3. Variantes de componentes del sistema de espectrometría de masas. ....	20
Tabla 4. Métodos bioanalíticos para la cuantificación de metformina en plasma humano. .....	25
Tabla 5. Parámetros mínimos para la validación del método (NOM-177 VS RESOLUÇÃO RDC No. 27) .....	27
Tabla 6. Componentes del CLAR acoplado al detector de MS-MS. ....	32
Tabla 7. Equipos e instrumentos empleados .....	32
Tabla 8. Condiciones evaluadas durante la optimización del método .....	34
Tabla 9. Preparación de la curva de calibración y muestras control de calidad en plasma humano con heparina como anticoagulante.....	38
Tabla 10. Condiciones cromatográficas del CLAR.....	48
Tabla 11. Condiciones de ionización en la interface. ....	49
Tabla 12. Parámetros dependientes de Metformina HCl y Metformina-d6 HCl (E. I.) ...	49
Tabla 13. Resultados de la adecuabilidad del sistema cromatográfico, por corrida analítica. ....	52
Tabla 14. Relación de ponderación vs $\Sigma$ ER %.....	61
Tabla 15. Resultados de las curvas de calibración del método bioanalítico para cuantificar metformina en plasma (concentración recuperada, ng/mL). ....	62
Tabla 16. Parámetros de las curvas de calibración del método bioanalítico para cuantificar metformina en plasma. ....	62
Tabla 17. Repetibilidad del método bioanalítico para cuantificar metformina en plasma. .....	64
Tabla 18. Reproducibilidad del método bioanalítico para cuantificar metformina en plasma. ....	65
Tabla 19. Evaluación del efecto matriz para la muestra muestras equivalentes al Control de Calidad Bajo (CCB) a una concentración de 8.984 ng/mL.....	66
Tabla 20. Evaluación del efecto matriz para la muestra muestras equivalentes al Control de Calidad Alto (CCA) a una concentración de 2345.884 ng/mL.....	67

Tabla 21. Estabilidad de metformina en plasma a temperatura ambiente (15 – 30°C) 16.0 horas .....	68
Tabla 22. Estabilidad de metformina en plasma en refrigeración (2-8°C) 15.8 horas....	68
Tabla 23. Estabilidad de metformina en plasma en congelación (temperatura no mayor a -20°C) 99.0 horas (4.1 días).....	69
Tabla 24. Estabilidad de metformina en plasma a largo plazo en congelación a -70 ± 10 °C durante 120 días.....	69
Tabla 25. Estabilidad de metformina en muestra procesada en automuestreador a 10°C por 29.1 horas, 1.2 días. ....	70
Tabla 26. Estabilidad de metformina en muestra procesada en automuestreador a 10°C por 57.7 horas, 2.4 días. ....	70
Tabla 27. Estabilidad de metformina en muestra procesada en refrigeración (2-8 °C) 23.6 horas (0.98 días). ....	71
Tabla 28. Estabilidad de metformina a cuatro ciclos de congelación-descongelación (- 70°C) .....	71
Tabla 29. Estabilidad de la solución estándar principal A de metformina (99.825 µg/mL) a temperatura ambiente (15-30 °C) 4.9 días (116.5 horas). ....	72
Tabla 30. Estabilidad de la solución estándar principal A de metformina (99.825 µg/mL) en refrigeración (2-8°C) 4.9 días (116.5 horas).....	73
Tabla 31. Estabilidad de la solución estándar principal A de metformina (99.825 µg/mL) en refrigeración (2-8°C) 10.9 días (262.4 horas).....	73
Tabla 32. Estabilidad de la solución estándar principal A de metformina (99.825 µg/mL) en refrigeración (2-8°C) 10.9 días (261.5 horas).....	74
Tabla 33. Estabilidad de la solución estándar de trabajo C de metformina (0.250 µg/mL) a temperatura ambiente (15-30°C) 4.9 días (116.5 horas). ....	75
Tabla 34. Estabilidad de la solución estándar de trabajo C de metformina (0.250 µg/mL) en refrigeración (2-8°C) 10.9 días (262.4 horas).....	75
Tabla 35. Estabilidad de la solución estándar de trabajo C de metformina (0.250 µg/mL) en congelación (-70°C) 4.9 días (116.9 horas). ....	76



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de Islotes de Langerhans.....	14
Figura 2. Estructura química de metformina. ....	15
Figura 3. Esquema de los componentes básicos de un espectrómetro de masas .....	20
Figura 4. Esquema de ionización por ESI. ....	23
Figura 5. Diagrama de la estructura de un cuadrupolo. ....	24
Figura 6. Diagrama del método de extracción para metformina en plasma.....	39
Figura 7. Espectro de masas del blanco de reactivos.....	50
Figura 8. Iones precursores de metformina (130.1 m/z) y metformina-d6 (136.2 m/z)..	50
Figura 9. Transición de metformina (130.1→71.4 m/z).....	51
Figura 10. Transición de metformina-d6 (136.2→77.2 m/z).....	51
Figura 11. Selectividad a la matriz biológica y fármacos de uso común para metformina y metformina-d6 (E. I.).....	56
Figura 12. Cromatogramas correspondientes a la prueba de arrastre. ....	58
Figura 13. Cromatogramas de la prueba de respuesta cruzada.....	60
Figura 14. Curvas de calibración para cuantificar metformina en plasma. ....	63

## ABREVIATURAS

Abreviaturas	Significado
% v/v	Porcentaje volumen a volumen
°C	Grados Celcius
ADA	Asociación Americana de Diabetes (American Diabetes Association)
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria
B	Blanco
CCA	Control de Calidad Alto
CCB	Control de Calidad Bajo
CCBB	Control de Calidad Bajo B
CCD	Control de Calidad Diluido
CCM	Control de Calidad Medio
CI	Ionización Química (Chemical Ionization)
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC: High Performance Liquid Chromatography).
$C_{m\acute{a}x}$	Concentración máxima
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
Conc.	Concentración
CP	Estándar de calibración
$C_p$	Concentración plasmática
CV	Coefficiente de variación
DB	Doble blanco (Matriz sin E. I.)
dL	Decilitro
DM	Diabetes mellitus
DMNID	Diabetes mellitus no insulino dependiente
DOF	Diario Oficial de la Federación
E. I.	Estándar interno
EI	Impacto de electrones (Electron Impact)
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
ESI	Ionización por electrospray (Electrospray Ionization)

F	Folio de plasma
FD	Bombardeo rápido con átomos (Fast-Atom-Bombardment)
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FI	Ionización de campo (Field Ionization)
FMN	Factor de matriz normalizado
g	Gramo
h	Hora(s)
H	Plasma hemolizado
IFaB	Investigación Farmacológica y Biofarmacéutica
IMC	Índice de masa corporal
Kg	Kilogramo
L	Plasma lipémico
LC	Cromatografía de líquidos (Liquid Chromatography)
LIC	Límite inferior de cuantificación
Ln	Logaritmo natural
LSC	Límite superior de cuantificación
m/z	Relación masa carga
m <sup>2</sup>	Metro cuadrado
MADC	Modelo abierto de dos compartimentos
MALDI	Desorción/Ionización por láser asistida por una matriz (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)
mg	Miligramo
min	Minuto(s)
mL	Mililitro
MS-MS	Masas-Masas
MTF	Metformina
nm	Nanómetro
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
P. M.	Peso molecular
PNA	Polisacáridos no amiláceos

r	Coeficiente de correlación
SDS	Dodecilsulfato de sodio
Sol.	Solución
T. R.	Tiempo de retención
T <sub>máx</sub>	Tiempo máximo
V <sub>d</sub>	Volumen de distribución
XR	Liberación prolongada (Extend release)
μL	Microlitro(s)
μm	Micrómetro(s)

## 1 Introducción

La Diabetes Mellitus (DM) es un grave problema de salud pública y de alto costo que ocurre sin distinción de edad, género o nivel socioeconómico. Se considera que la prevalencia de dicha enfermedad va en ascenso en todo el mundo (Altagracia-Martínez, 2007); en el 2014, se estimó que 422 millones de personas presentaban dicha afección (WHO, 2016) y para el 2016 en nuestro país figuró entre las primeras causas de muerte, afectando a 11 millones de mexicanos tanto niños como adultos lo cual equivale a 9.4% de la población en general sensada en ese año. (OMET, 2016)

El uso adecuado de los hipoglucemiantes como la metformina, comúnmente utilizada para la DM tipo 2, evitan el encarecimiento de la farmacoterapia y la automedicación, estimulando el cumplimiento de las instrucciones médicas y previniendo los efectos adversos y enfermedades que se presentan como consecuencia de complicaciones de la misma, razón por la cual, el costo del tratamiento es uno de los factores que se debe contemplar.

Con la finalidad de dar continuidad al tratamiento del padecimiento así como de otros que aquejan a la población; COFEPRIS y otras instancias regulatorias internacionales, como ANVISA por ejemplo, autorizan a empresas privadas denominadas como Terceros Autorizados para realizar la evaluación de la intercambiabilidad de medicamentos de prueba mediante estudios analíticos y/o clínicos según corresponda con base a lo descrito en la NOM-177-SSA1-2013 para el caso de México y la RESOLUÇÃO RDC N.º27 para el caso de Brasil. Dichos lineamientos definen los requisitos necesarios para llevar a cabo estudios de bioequivalencia, los cuales en el caso de metformina, ayudan a dictaminar si el medicamento de prueba cumple con los requisitos de intercambiabilidad al ser comparados con un medicamento de referencia.

Al ser un medicamento de primera línea la metformina presenta un alto índice de ventas en el mercado y en el caso de México diversas compañías farmacéuticas de medicamentos genéricos la ven como un nicho de venta con base a la incidencia que la DM-2 presenta en nuestro país.

El presente trabajo tiene como objetivo describir la optimización y validación de un método bioanalítico para cuantificar metformina en plasma el cual fue aplicado para realizar la cuantificación de muestras provenientes de estudios de bioequivalencia para tabletas de liberación prolongada de metformina a dos dosis: 500 y 1000 mg. Para ello se utilizó una técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa acoplada a un detector de espectrometría de masas-masas.

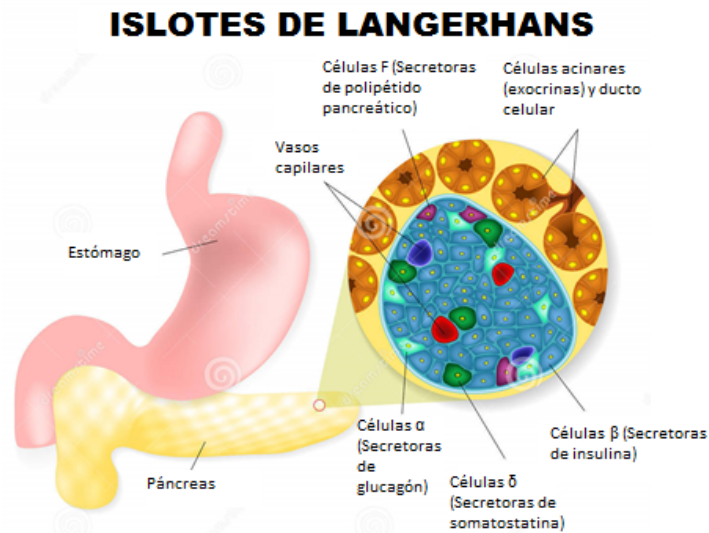
La optimización del método se llevó a cabo con la finalidad de obtener un método más sensible con un intervalo de cuantificación de 3 a 3000 ng/mL (capaz de cuantificar dos dosis de metformina), empleando la detección de espectrometría de MS-MS (debido a que cuenta con mayor sensibilidad que el espectrofotómetro UV-VIS) y con menor tiempo de análisis por muestra (reducción del tiempo de inyección). Además, con la actualización de la NOM-177-SSA1, realizada por la COFEPRIS en el 2013, fue necesario incluir la evaluación de parámetros de desempeño como el límite inferior de cuantificación y el efecto matriz normalizado parámetros que no eran evaluados con anterioridad.

Seguido de la optimización, el método bioanalítico fue validado con base a los criterios estipulados en los procedimientos normalizados de operación de IFaB; los cuales se basan en las especificaciones estipuladas por la regulación Mexicana (COFEPRIS) y/o Brasileña (ANVISA) según sea el criterio más estricto, con la finalidad de evaluar productos farmacéuticos de prueba y así determinar la bioequivalencia en ambos países.

## 2 Generalidades

### 2.1 Diabetes

El páncreas endocrino contiene cuatro tipos de células agrupadas en los islotes de Langerhans: las células  $\beta$ , secretoras de insulina y amilina, (polipéptido que antagoniza las acciones de la insulina); las células  $\alpha$ , que liberan glucagón; las células  $\delta$ , secretoras de somatostatina; y las células F, secretoras del polipéptido pancreático. La existencia de un defecto en la secreción y/o en las acciones de la insulina son las causas responsables de la aparición de Diabetes Mellitus (DM). (Velázquez B. y cols., 2008)



**Figura 1.** Esquema de Islotes de Langerhans.

La DM es una alteración del metabolismo caracterizada por el aumento de los niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia), que describe una alteración metabólica con etiologías múltiples (desórdenes en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas), causada por el efecto de la secreción o acción de una hormona: la insulina. (Altagracia-Martínez, 2007)

### 2.2 Tipos de diabetes

Dependiendo de la extensión de la enfermedad y/o causas los tipos de diabetes son: mellitus tipo I o diabetes juvenil, mellitus tipo II, mellitus gestacional, por defectos

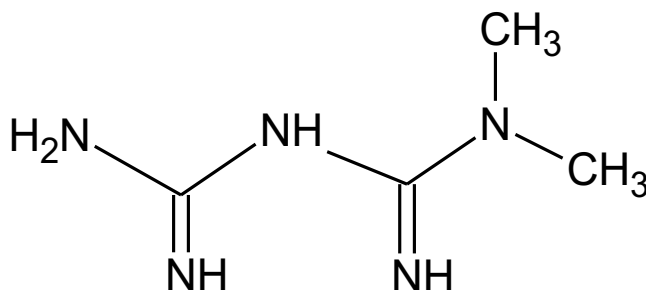
genéticos en células  $\beta$  o en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exocrinas o endocrinas, o por fármacos inductores de la diabetes o infecciones (ADA, 2010).

### 2.2.1 Diabetes mellitus tipo II

Es conocida como diabetes del adulto o no insulino dependiente (DMNID). La incidencia de casos es del 90-95% de los pacientes. La causa es la combinación de la resistencia a la acción de la insulina y una inadecuada respuesta compensatoria de la secreción de insulina. Con frecuencia el diagnóstico no es inmediato ya que la hiperglucemia se va desarrollando gradualmente y en etapas tempranas a menudo no es suficientemente grave como para que el paciente note alguno de los síntomas clásicos de diabetes. Razón por la cual, tal población está en mayor riesgo de desarrollar complicaciones vasculares. Éstos pacientes generalmente utilizan metformina como medicamento de primera línea para su tratamiento (ADA, 2010).

### 2.3 Generalidades del principio activo

Metformina (clorhidrato de 1,1-dimetilbiguanida) pertenece al grupo de las biguanidas, medicamentos derivados de guanidina dos grupos de guanidina en los que existe una ligadura monopolar de dos grupos metilo. Químicamente es una base hidrofílica que se encuentra a pH fisiológico como un catión (>99.9%), consecuentemente su difusión pasiva a través de membranas celulares es muy limitada. (Grahame-Smith D. G. y Aronson J. K., 2002).



**Figura 2.** Estructura química de metformina.



**Tabla 1.** Características y propiedades fisicoquímicas de metformina.

Características y propiedades fisicoquímicas		
Características	Valor	
Número CAS	657-24-9	
Nombre IUPAC	3-(diaminometildiona)-1,1-dimetilguanidina	
Fórmula química	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub>	
Propiedades	Valor	Observación
Físicas	Cristal blanco e inodoro	
Punto de fusión	223-226°C	
P. M. clorhidrato de metformina	165.63 g/mol	La dosis de metformina se encuentra como sal, pero las concentraciones en fluidos biológicos se expresan como base libre.
P. M. de la base	129.16 g/mol	
pka	2.8 y 11.5	Debido al valor de constante de disociación ácida existe como especie catiónica hidrófila a valores de pH fisiológicos (7.35-7.45). El pka de 11.5 hace a metformina una base más fuerte que la mayoría de otros fármacos básicos con menos de 0.01% no ionizados en sangre.
Log P	-1.43	La solubilidad en lípidos de la especie no ionizada es baja. Debido a los dos sustituyentes metilo, los cuales imparten menor lipofilia. Por ende, la rápida difusión pasiva a través de las membranas celulares es poco probable.
Ión precursor y fragmento	130.1 m/z → 71.4 m/z	El ión fragmento descrito es el de mayor abundancia relativa al aplicar una energía de colisión 35 y 50.
Solubilidad	Agua: (20°C) Soluble (1:2) Etanol: ligeramente insoluble Cloroformo: prácticamente insoluble Éter: prácticamente insoluble	

(DRUGBANK, 2015), (Graham G. y cols, 2011), (Paudel Chhetri, 2014)

## 2.4 Propiedades farmacológicas

La metformina proviene de la galegina un derivado de guanidina encontrado en la hierba *Galega Officinalis* (lila francesa o ruda cabruna) sintetizado por primera vez en el año de 1922. (Paudel Chhetri, 2014)

Es un fármaco considerado como de primera línea para el tratamiento DM-2 y se utiliza concomitantemente con sulfonilureas o insulina para mejorar el control de los niveles de azúcar en la sangre; además, aumenta el metabolismo no oxidativo de la glucosa (Graham G. y cols, 2011) y suprime su producción hepática en un 75%. Adicionalmente, colabora en el transporte y utilización de glucosa por el músculo esquelético y acelera la velocidad de absorción intestinal generando que los niveles de azúcar se normalicen en sangre. (Setter S. M., y cols., 2003)

Además, del uso de este principio activo en la DM-2, la metformina también se administra para el tratamiento del síndrome poliquístico de ovario, la diabetes gestacional y muestra un compromiso temprano en el tratamiento de cáncer. Por otro lado también es utilizada en pacientes obesos, debido a que su efecto hipoglucemiante no depende de la secreción de insulina. (Grahame-Smith D. G. y Aronson J. K., 2002).

La metformina tiene una biodisponibilidad oral de 40 a 60%. Presenta una farmacocinética la cual se ajusta a un modelo abierto de 2 compartimentos, es decir; metformina llega directamente a la circulación, pero se distribuye con diferente velocidad en dos zonas del cuerpo: central y periférica. Según la clasificación biofarmacéutica es un principio activo Clase III: alta solubilidad, baja permeabilidad. (Provisional BCS Classification)

**Tabla 2.** Farmacocinética de metformina.

Proceso	Características
<b>Absorción</b>	Se produce principalmente en el intestino delgado y se completa a las 6 horas, con un valor de $T_{máx}$ alcanzado después de 2 a 3 horas. La administración conjunta con los alimentos disminuye el grado de absorción, aumentado el $T_{máx}$ , a 40 min.
<b>Distribución</b>	La unión a proteínas plasmáticas, es insignificante; por lo tanto, no es desplazada por la unión competitiva de otros fármacos. Su $V_d$ es de 62 a 276 L. Se tiende a acumular en tracto gastrointestinal, glándulas salivales y riñones.
<b>Metabolismo</b>	No se han identificado metabolitos o conjugados de la metformina. Al ser un hidrófilo es excretado con metabolismo insignificante.
<b>Eliminación</b>	El $t_{1/2}$ de eliminación es de 2 a 6 horas y el recambio lento de 8-20 horas. La depuración renal, se reporta en un intervalo de 20.1 a 36.9 L/h y 26.5 a 42.4 L/h, respectivamente. Éstos valores indican que metformina experimenta excreción tubular activa. Se excreta principalmente por riñón (80 a 100%)

Fuente: (Setter S. M., y cols., 2003).

## 2.5 Métodos bioanalíticos para la cuantificación de metformina

### 2.5.1 Cromatografía

La comparación de la biodisponibilidad relativa de las diferentes formas farmacéuticas del mismo fármaco requiere el análisis del componente activo en las matrices biológicas como sangre, orina y tejidos. Entre las técnicas más poderosas que dispone el analista para la determinación de la concentración de un fármaco es la cromatografía (Genaro, A., 2003), (Matuszewski, 2003)

El proceso cromatográfico contempla la separación de los componentes de una mezcla, para ello, una muestra (o su extracto) se disuelve en una fase móvil (líquida), la cual es impulsada a través de una fase estacionaria, que debe ser inmisible con ella, y que puede ser sólida o líquida. Las fases se eligen de tal forma que los componentes de las muestras presenten diferencia en cuanto a sus propiedades físico-químicas (solubilidad, tamaño, fuerza iónica, polaridad, afinidad, etc.) para cada fase. (Hernández, J. M., 2005). La clave de la separación, es la velocidad con la que se mueve cada sustancia dependiendo de la afinidad relativa por ambas fases, los componentes más afines a la fase estacionaria avanzan lentamente (más retenidos) mientras que los más afines a la fase móvil (menos retenidos) se mueven con mayor rapidez. (Depto de Química Analítica, 2007)

#### 2.5.1.1 Clasificación de los métodos cromatográficos

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar con base a la naturaleza de la fase estacionaria y móvil aunado a el mecanismo de retención; por ejemplo:

La **Cromatografía de líquidos de alta resolución**: (CLAR) Es una técnica analítica de separación utilizada ampliamente como medio de pre-concentración y por ende proporciona alta sensibilidad al ser aplicada, se pueden obtener determinaciones cuantitativas confiables y es ideal para la separación de especies no volátiles o termolábiles.

La fase móvil es un líquido polar y la fase estacionaria es sílice (en la mayoría de los casos) no polar ésta, se encuentra en un soporte debidamente empaquetado denominado columna cromatográfica. Para aumentar la eficiencia en la separación de los analitos contenidos en la muestra, el tamaño de partícula puede ser disminuido y entre más pequeño y homogéneo sea éste, el número de platos teóricos aumentará y la resolución entre los picos será mayor permitiendo una mejor separación de los componentes de la muestra. Se requiere que la fase móvil a un flujo ya sea variable o constante sea introducida a la columna mediante bombas las cuales trabajan a altas presiones, como consecuencia del paso de la fase móvil a través de la fase estacionaria el(los) analito(s) de interés podrán ser eluidos de la fase estacionaria y migrarán a la

fase móvil con base a la polaridad de los grupos funcionales que estos presenten para ser detectados (Depto de Química Analítica, 2007), (Genaro, A., 2003), (Hernández, J. M., 2005).

## 2.5.2 Detectores

Un detector es un instrumento con la capacidad de registrar la presencia de una sustancia y enviar la señal eléctrica correspondiente a un analizador y así generar el registro. Las características ideales de un detector son: alta sensibilidad, respuesta lineal o específica, reproducibilidad y rapidez. Además, una respuesta selectiva y altamente predecible para una o más clases de analitos.

Según las características y concentraciones de los compuestos implicados en la muestra se puede seleccionar el detector adecuado para cumplir el objetivo deseado. De manera general se distinguen dos tipos de detectores:

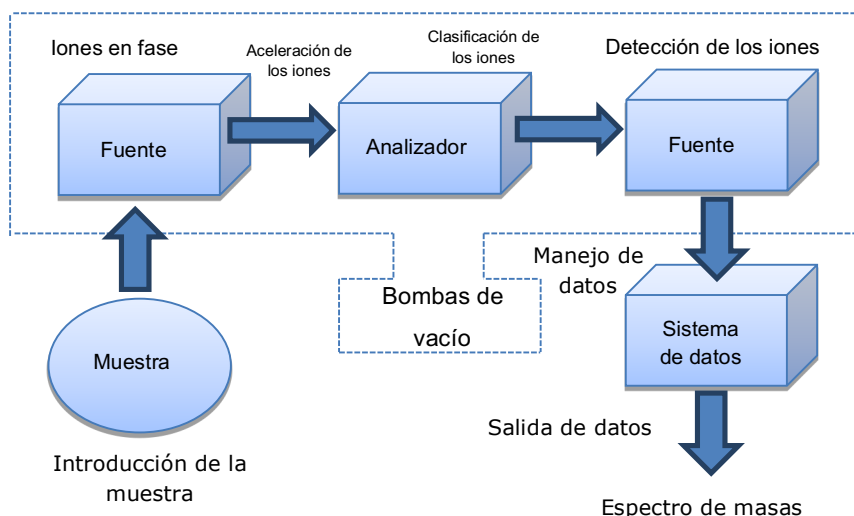
- ◆ Basados en la propiedad de la disolución: los que miden índice de refracción, la constante dieléctrica y la densidad.
- ◆ Miden una propiedad de los compuestos que se desean separar: los de absorbancia, fluorescencia y los de espectrometría de masas.

### 2.5.2.1 Espectrometría de masas

La técnica de espectrometría de masas es una técnica analítica poderosa y costosa que proporciona información tanto cualitativa (estructura) como cuantitativa (masa molecular o concentración) de las moléculas analizadas. (Cocho de Juan, J. A., 2008). La cual consiste en mediciones de la relación de  $m/z$  de los iones formados cuando la muestra adquiere carga. (De Hoffman, E., 2005). El proceso de la espectrometría de masas comprende básicamente cuatro etapas:

- Ionización de la muestra en fase gaseosa adquiriendo carga negativa o positiva. (Electrospray, ionización atmosférica a presión constante, MALDI etc.)
- Aceleración de los iones por un campo eléctrico.
- Dispersión de los iones según su relación masa/carga.

- Detección de los iones y producción de la correspondiente señal eléctrica que es representada en un espectro de masas que muestra la abundancia relativa de las señales en función de su relación m/z. (Figura 3). (Cocho de Juan, J. A., 2008), (Depto de Química Analítica, 2007).



**Figura 3.** Esquema de los componentes básicos de un espectrómetro de masas  
Fuente: (Plascencia Villa, G., 2003)

### Instrumentación

Los espectrómetros de masas tienen siete componentes mayores: un sistema de entrada, una fuente de iones, un analizador de masas, un detector, un sistema de vacío, un sistema de control y un sistema de datos. El sistema de entrada, junto con la fuente de iones y el tipo de analizador de masas definen el tipo de espectrómetro y las capacidades del sistema. (Tabla 3) (Plascencia Villa, G., 2003)

**Tabla 3.** Variantes de componentes del sistema de espectrometría de masas.

Componente	Variantes
<b>Sistema de entrada</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Indirecto</li> <li>2. Directo</li> <li>3. Columna capilar, sistemas cromatográficos</li> </ol>
<b>Fuente de ionización</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Impacto electrónico</li> <li>2. Ionización química</li> <li>3. Ionización de campo</li> <li>4. Deserción de campo</li> <li>5. Bombardeo con átomos rápidos</li> <li>6. Electrospray (ESI), incluyendo nanospray y microspray</li> <li>7. Matrix-assisted laser desorption (MALDI)</li> </ol>

Componente	Variantes
Analizador de masas	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cuadrupolo</li> <li>2. Trampa de iones (Ion-Trap)</li> <li>3. Tiempo de vuelo (Time-of-flight TOF)</li> <li>4. Analizador FT-ICR</li> </ol>

Fuente: (Plascencia Villa, G., 2003)

## Entrada de la muestra

Los iones para ser detectados por el espectrómetro de masas deben estar en fase gaseosa con la finalidad de que el movimiento de los mismo sea controlado por campos electromagnéticos y así ser detectados y analizados por la obtención de una respuesta. Dependiendo del tipo de entrada y técnica de ionización usada, la muestra puede estar en estado sólido, líquido o gaseoso (Plascencia Villa, G., 2003), (Synder, 2012). La empleada en el presente proyecto fue de manera líquida ya que se utilizó una cromatografía de líquidos de alta resolución bajo previa separación del analito de interés.

## Métodos de ionización

Las fuentes de ionización de los espectrómetros de masas de manera general se encargan de transformar a los componentes de una muestra en iones mediante la transferencia de una carga. En muchos casos el sistema de entrada y la fuente de iones están combinados en un único componente. En todos los casos, se obtiene un haz de iones positivos o negativos dependiendo de los grupos funcionales de las moléculas contenidas en la muestra. Los métodos de ionización se dividen en dos categorías: (Depto de Química Analítica, 2007), (Cañada, P., 2011).

- Fuentes de fase gaseosa: Primero se volatiliza la muestra y luego se ioniza. Muestras no volátiles y térmicamente inestables.
- Fuentes de desorción: La muestra en estado sólido o líquido, se transforma directamente en iones gaseosos. Muestras no volátiles o termodinámicamente inestables.

La ionización de la muestra puede efectuarse en condiciones de alto vacío, por impacto electrónico (EI), o a presión atmosférica (API). En este último caso, si se trata de un análisis en fase líquida, se realizará una ionización por electrospray (ESI), mientras que,

si es en fase gaseosa, se efectuará una ionización química a presión atmosférica (APCI) o bien una fotoionización (APPI). Las técnicas de ionización más empleadas son ESI y APCI (Cocho de Juan, J. A., 2008), (Cañada, P., 2011). A continuación, se describen las características de ESI, ya que fue la técnica de ionización empleada en el presente trabajo.

### **Ionización por electrospray (ESI):**

Las características que definen la ionización por electrospray con respecto a otras técnicas de ionización son tres:

- Capacidad de producir iones con cargas múltiples, permitiendo que compuestos de peso molecular muy alto queden registrados con cargas múltiples en un rango  $m/z$  mucho menor.
- Las muestras por analizar deben ser introducidas en solución, posibilitando así una compatibilidad natural entre ESI con muchos tipos de técnicas de separación (CLAR, electroforesis capilar).
- Se trata de una técnica especialmente “blanda” lo que posibilita, por ejemplo, la preservación en la fase gas de interacciones no covalentes entre moléculas existentes en solución, así como el estudio de conformaciones moleculares en tres dimensiones.

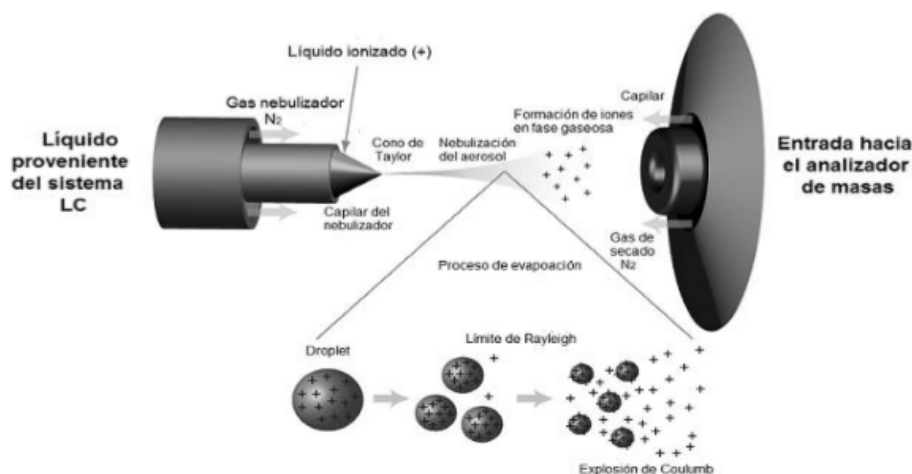
Además de realizar análisis de moléculas de pesos superiores a 100,000 daltones, es ampliamente utilizado en aplicaciones de ciencias bioquímicas y biomédicas, debido a su capacidad de analizar moléculas altamente polares tales como péptidos, oligonucleótidos y oligosacáridos (Cocho de Juan, J. A., 2008).

Para su ionización, el analito es introducido en la fuente en solución. Posteriormente, pasa a través de un tubo capilar de acero inoxidable, al cual se le aplica un voltaje y asume una forma cónica, llamada cono de Taylor.

Este mecanismo genera la nebulización de las gotas cargadas en el capilar, con una carga superficial de la misma polaridad que el propio capilar. Las gotas son repelidas del capilar hacia el cono de la fuente de muestreo del electrodo con la ayuda de una

elevada temperatura en la fuente ESI y/o de gas nitrógeno. A medida que las gotas atraviesan el espacio entre el capilar y el cono, van reduciendo su tamaño, por evaporación del solvente, lo que supone un incremento de la densidad de carga superficial conforme disminuye el radio de las gotas.

Finalmente, la fuerza del campo eléctrico en las gotas cargadas alcanza un punto crítico en el cual es cinética y energéticamente posible el paso a fase gaseosa para los iones de la superficie. En ese momento, la tensión superficial no es capaz de mantener la carga (límite de Rayleigh), por lo que se produce una “explosión Coulómbica” y la gota se rompe en gotas más pequeñas. El proceso puede repetirse hasta que sólo existan moléculas de analito cargadas “desnudas”, que no son estrictamente iones, y pueden tener una o varias cargas (Cocho de Juan, J. A., 2008), (Plascencia Villa, G., 2003) (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema de ionización por ESI.

### **Analizador de masas**

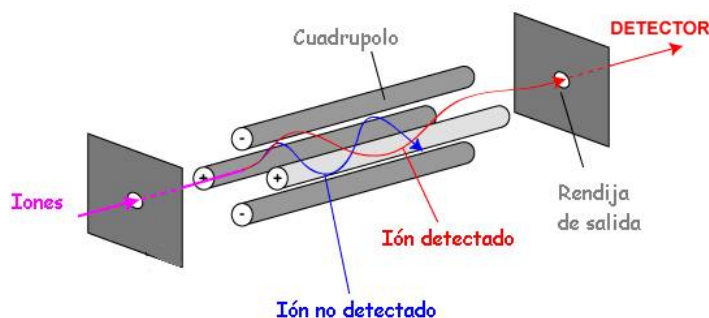
Su objetivo es limitar los iones que llegan al detector y lo hace mediante el poder de resolución (mayor selectividad). Para ello, los campos electromagnéticos separan los iones de acuerdo a sus relaciones  $m/z$  y una hendidura (óptica de iones) la cual permite la focalización de los iones de interés, con lo que se logra incrementar el poder de resolución y sensibilidad. Las diferentes relaciones  $m/z$  se analizan en la salida del detector y las corrientes de iones se registran como una función del tiempo. (Plascencia



Villa, G., 2003). Existen diferentes tipos de analizadores: cuadrupolo, trampa de iones, tiempo de vuelo, transformada de Fourier (FT-ICR) (Synder, 2012). A continuación, se describe el analizador de masas de cuadrupolo, el cual es componente del equipo con el cual se trabajó para el presente proyecto.

## Cuadrupolo

La separación de las sustancias se basa en la relación  $m/z$  mediante la aplicación de un campo eléctrico variable con el tiempo, provocando una diferencia de potencial en las barras; de esta manera, cuando un haz de iones atraviesa la fuente, éstos se mueven a lo largo de la misma realizando oscilaciones completas. Cada relación  $m/z$  presenta una combinación de voltajes única, por lo que tan solo un intervalo estrecho de  $m/z$  puede pasar al mismo tiempo a través del cuadrupolo (Figura 5) (Plascencia Villa, G., 2003)



**Figura 5.** Diagrama de la estructura de un cuadrupolo.

La combinación de CLAR con un espectrómetro de masas con cuadrupolo se le denomina LC-MS. Hoy en día se encuentran equipos disponibles, que tienen acoplados uno o más cuadrupolos, a lo que se le conoce como espectrometría de masas en tándem o LC/MS-MS. Éstos cuentan con 3 cuadrupolos (triple cuadrupolo o QQQ). Su funcionamiento consiste en tres etapas: (Jiménez, P, A., 2012)

1. La molécula de interés previamente ionizada y volatilizada, pasa a través del primer cuadrupolo (Q1) donde se focaliza un ion en relación a su  $m/z$ .

2. Este ion (ion precursor) es transferido a un segundo cuadrupolo (Q2) que se comporta como una célula de colisión donde interacciona con un gas de colisión y se fragmenta.
3. En un tercer cuadrupolo (Q3) se focaliza uno o varios de los iones producto proveniente de la fragmentación del ion precursor.

## 2.6 Optimización del método bioanalítico

En el año 2013 COFEPRIS publicó la actualización de la NOM-177-SSA1, en donde se estableció la evaluación de los parámetros de desempeño para la validación de métodos bioanalíticos por espectrometría de masas y parámetros como el límite inferior de cuantificación y el efecto matriz normalizado fueron contemplados. Ello tuvo como consecuencia que metodologías analíticas previamente validadas contemplaran periodos de optimización para poder evaluar las exigencias de los nuevos parámetros de desempeño que se solicitaron lo cual impactó al método de metformina que el Tercer Autorizado tenía validado; ya que la metodología se transfirió de cromatografía convencional a un espectrómetro de MS-MS, por ende, una optimización y validación debían ser ejecutadas con la finalidad de aumentar la sensibilidad, disminuir el tiempo de corrida analítica y el volumen de muestra a utilizar, así como incluir un estándar interno deuteriado. Ya que el método previo tenía un tiempo de corrida de 10 min y un LIC de 20 ng/mL que no permitía caracterizar todos los tiempos de muestreo del MADC.

En la tabla 4 se presenta el resumen de algunos parámetros cromatográficos por espectrometría de masas que fueron utilizados como antecedentes para la optimización del método bioanalítico de metformina en plasma humano, el cual con base a las necesidades del laboratorio requería ser enfocado a la evaluación de la bioequivalencia para tabletas de metformina de 500 y 1000 mg de liberación prolongada.

**Tabla 4.** Métodos bioanalíticos para la cuantificación de metformina en plasma humano.

Sistema cromatográfico y tipo de detección	Intervalo de concentración y dosis	Método de extracción	Condiciones Cromatográficas
CLAR-UV (Cheng y cols., 2001)	10-2000 ng/mL  500 mg	Precipitación de proteínas con ACN	Columna: C <sub>18</sub> 4.6x250 mm, 5µm Fase móvil: ACN: NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 0.03 M pH 7 25:75 % v/v Flujo: 1 mL/min, λ: 240 nm

Sistema cromatográfico y tipo de detección	Intervalo de concentración y dosis	Método de extracción	Condiciones Cromatográficas
CLAR MS/MS (De Oliveira, D., 2004)	20-5000 ng/mL	Precipitación de proteínas con MeOH a -70°C y limpieza con diclorometano	Columna: C <sub>18</sub> 4.6x150 mm, 4 µm Fase móvil: MeOH: CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> 50 mM 10:90 % v/v Flujo: 1.2 mL/min. ESI, modo positivo 130.1 m/z → 70.9 m/z
CLAR UV (Jun Li, y cols., 2007)	31.3-8000 ng/mL 1000 mg	Precipitación de proteínas con MeOH	Columna: C <sub>18</sub> 4.6x250 mm, 5µm Fase móvil: Metanol: NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.01 M pH 3.5 40:60 % v/v Flujo: 1 mL/min. λ: 233 nm
CLAR MS/MS (Sengupta P. y cols., 2009)	100–15000 ng/mL 500 mg	Líquido- líquido (diclorometano:alcohol isoamílico (9:1 v/v))	Columna: c <sub>18</sub> 33 x 4.6 mm 5 µm MeOH: HCOOH 0.5% en agua Flujo: 0.6 mL/min. ESI, modo positivo 130.1 m/z → 71.1 m/z
CLAR-UV (Arayane M. S y cols., 2010)	5–25 µg/mL	Precipitación de proteínas	Columna: Purospher Star RP18 4.6x250 mm, 5µm Fase móvil: MeOH: H <sub>2</sub> O: trietilamina pH 3 20:80:0.05 % v/v/v Flujo: 1 mL/min. λ: 229 nm
CLAR MS/MS (Polagani, Srinivasa Rao. y cols., 2013)	12–1200 ng/mL 500 mg	Precipitación de proteínas	Columna: Alltima HP C18 50x4.6 mm, 3 µm Fase móvil: ACN: CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> 10 mM pH 3 40:60 % v/v Flujo: 1.1 mL/min ESI, modo positivo 130.1 m/z → 60.1 m/z
CLAR MS/MS (Bonde S. L. y cols., 2013)	25 – 3000 ng/mL	Precipitación de proteínas con ACN	Columna: Hypurity C18 50x4.6 mm, 5 µm Fase móvil: ACN: HCOONH <sub>4</sub> 10 mM pH 3.5 40:60 % v/v Flujo: 1 mL/min ESI, modo positivo 130.0 m/z → 71.0 m/z
CLAR UV (Attimarad, M. y cols., 2014)	0.05 – 20 µg/mL	Precipitación de proteínas con ACN	Columna: Chromolith C18 50x4.6 mm, 5 µm Fase móvil: ACN: NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM y SDS 10 mM pH 4.5 70:30 % v/v Flujo: 2.5 mL/min λ: 208 nm

## 2.7 Validación de métodos bioanalíticos

La validación se define como el proceso que se establece para la obtención de evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el cual fue diseñado (Secretaría de Salud, 2013). Es un proceso encaminado a demostrar que el método usado para cuantificar un analito en una matriz biológica (plasma, sangre, orina, saliva, uñas, etc.) garantiza la confiabilidad de los resultados obtenidos (Instituto de Salud Pública Chile, 2010).

Así mismo, los criterios y lineamientos de los Procedimientos Normalizados de Operación creados en IFaB, se apegan a los lineamientos estipulados por la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA-1-2013 la cual “establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad.” y la normatividad de ANVISA (RESOLUÇÃO RDC No. 27); tomando en cuenta el criterio más exigente. Los parámetros mínimos requeridos por la NOM-177 y ANVISA en la validación del método bioanalítico se enlistan en la tabla 5.

**Tabla 5.** Parámetros mínimos para la validación del método (NOM-177 VS RESOLUÇÃO RDC No. 27)

Parámetro	Similitudes	Diferencias	Criterios de aceptación
<b>Selectividad</b>	<p>Demstrar la no interferencia de compuestos endógenos de la matriz biológica, mediante la evaluación individual de al menos 6 unidades de ésta. Adicionalmente, una fuente lipémica y hemolizada. Considerar posibles interferencias de fármacos de uso común, metabolitos, anticoagulantes, compuestos endógenos de la matriz biológica u otras sustancias que puedan estar presentes en la matriz.</p>	<p>RESOLUÇÃO RDC No. 27 indica que si las primeras 6 muestras no cumplen, se pueden evaluar otras 6, si no cumplen, se deberá modificar el método. Adicionalmente se tiene la NOTA Técnica 4 en donde se describen los análisis necesarios ante medicamentos concomitantes.</p>	<p>Para ambas normatividades el cumplimiento de la prueba depende si las interferencias próximas al tiempo de retención son menor al 20% para el LIC del analito y del 5% para el E. I.</p>
<b>Efecto matriz</b>	<p>Analizar individualmente, al menos 6 unidades de matriz doble blanco, adicionalmente considerar matriz biológica lipémica y hemolizada.</p>	<p>RESOLUÇÃO RDC No. 27 solicita analizar 8 muestras de fuentes distintas, siendo 4 normales, 2 lipémicas y 2 hemolizadas. Adicionalmente se tiene la NOTA Técnica 4 en donde se describen los análisis necesarios ante medicamentos concomitantes en caso de presentar un E. I. análogo.</p>	<p>Las dos normatividades señalan que el C. V. debe ser menor al 15%; sin embargo, la NOTA Técnica 4, resalta que en caso de que las muestras hemolizadas arrojen un resultado divergente, éstas se pueden discriminar del cálculo y no podrán ser analizadas durante el estudio.</p>
<b>Acarreo/Efecto residual</b>	<p>Realizar un mínimo de 3 inyecciones de la misma muestra DB siendo una antes y dos después de una inyección del LSC.</p>	<p>RESOLUÇÃO RDC No. 27 menciona que en todo caso de no evitar el efecto residual, el método puede ser adaptado para controlar el efecto sobre la precisión y exactitud.</p>	<p>La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debe ser menor al 20% para el LIC y del 5% para el E. I.</p>

Parámetro	Similitudes	Diferencias	Criterios de aceptación
<b>Curva de calibración</b>	<p>Establecer el intervalo de la curva, en función a las concentraciones esperadas del analito. Caracterizar por lo menos 6 concentraciones distintas. Evaluar un mínimo de 3 curvas. Definir un modelo matemático que describa adecuadamente la relación entre la concentración y la respuesta, la cual debe ser continua y reproducible en el intervalo de trabajo.</p> <p>Cada curva de calibración debe incluir una muestra de blanco de matriz y muestra DB.</p>	<p>RESOLUÇÃO RDC No. 27 indica, 6 muestras a diferentes concentraciones del analito, en un modelo lineal y 8 concentraciones para modelos no lineales.</p>	<p>Los datos de concentración recuperada de la curva de calibración deben estar dentro del 15% de la concentración nominal, excepto para el LIC, puede ser menor o igual al 20%. Al menos el 75% de las concentraciones de la curva con un mínimo de 6 estándares, debe cumplir.</p>
<b>Precisión Repetibilidad</b>	<p>Analizar en un mismo día al menos por quintuplicado las muestras control LIC, CCB, CCM, CCA y CCD. Calcular la concentración obtenida para cada nivel interpolando su respuesta analítica en la curva de calibración.</p>	<p>Sin diferencia</p>	<p>El CV% del valor promedio no debe ser maor que el 15%, excepto para el LIC, debe ser menor o igual a 20%</p>
<b>Precisión Reproducibilidad</b>	<p>Analizar al menos por quintuplicado en tres corridas analíticas diferentes y en al menos 2 días, las muestras control LIC, CCB, CCM y CCA. Calcular la concentración obtenida para cada nivel interpolando su respuesta analítica en la curva de calibración. La adición de otro analista o el uso de otro equipo, debe cumplir con los criterios de reproducibilidad.</p>	<p>Conforme a la RESOLUÇÃO RDC No. 27 se debe analizar un mínimo de 5 muestras de por lo menos 5 concentraciones: LIC, CCB, CCM, CCA y CCD, en un mínimo de 3 corridas diferentes en días distintos.</p>	<p>El CV% del valor promedio no debe ser maor que el 15%, excepto para el LIC, debe ser menor o igual a 20%</p>
<b>Exactitud</b>	<p>De los datos de repetibilidad y reproducibilidad calcular la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal (% de desviación).</p>	<p>Conforme a la RESOLUÇÃO RDC No. 27 se debe analizar un mínimo de 5 muestras de por lo menos 5 concentraciones: LIC, CCB, CCM, CCA y CCD, en un mínimo de 3 corridas diferentes en días distintos.</p>	<p>El valor promedio del % de desviación no debe ser mayor a 15%, excepto para el LIC, menor a 20%.</p>
<b>Estabilidad de la muestra</b>	<p>Evaluar por triplicado la respuesta del analito a las concentraciones CCB y CCA, las cuales son analizadas inmediatamente después de su preparación y después de ser sometidas a las condiciones del ensayo. Determinar las condiciones de temperatura y tiempo entre otros, en las que el fármaco permanezca estable en la matriz biológica, durante su manejo, toma de muestra, almacenamiento y</p>	<p>Sin diferencia</p>	<p>Los controles se interpolan en una curva de calibración recién preparada y las concentraciones obtenidas se comparan con su respectiva concentración nominal. La concentración promedio debe estar dentro del 15% de la concentración nominal.</p>

Parámetro	Similitudes	Diferencias	Criterios de aceptación
	procesamiento analítico.		
<b>Estabilidad a corto plazo</b>	Evaluar el analito en la matriz biológica a la temperatura y tiempo de procesamiento de la muestra.	Sin diferencia	La concentración promedio debe estar dentro del 15% de la concentración nominal.
<b>Estabilidad a largo plazo</b>	Evaluar el analito en la matriz biológica, bajo las condiciones de almacenamiento en las que se mantendrán las muestras, por un periodo de tiempo por lo menos equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis.	Conforme a la RESOLUÇÃO RDC No. 27 se debe analizar el tiempo 0 de las muestras resguardadas.	La concentración promedio debe estar dentro del 15% de la concentración nominal.
<b>Estabilidad de la muestra procesada</b>	Evaluar el analito en la muestra procesada a temperatura ambiente o bajo las condiciones de almacenamiento a ser usadas durante el estudio.	Sin diferencia	La concentración promedio debe estar dentro del 15% de la concentración nominal.
<b>Estabilidad en el automuestreador</b>	Evaluar el analito en la muestra procesada a la temperatura del inyector o automuestreador.	Sin diferencia	La concentración promedio debe estar dentro del 15% de la concentración nominal.
<b>Estabilidad de ciclos de congelación-descongelación</b>	El analito en la matriz biológica, almacenadas a temperatura de congelación en que estarán las muestras reales por al menos 12 h, descongelarlas a temperatura ambiente y volver a congelar por al menos 12 h. Al menos 3 ciclos.	Sin diferencia	La concentración promedio debe estar dentro del 15% de la concentración nominal.
<b>Estabilidad en solución</b>	Demostrar estabilidad del analito y E. I., en al menos una muestra inyectada por triplicado de una solución de referencia principal (de mayor concentración) y una solución de trabajo (de menor concentración)	Sin diferencia	Cumplen si la desviación de la respuesta analítica promedio con respecto a la obtenida con muestras recién preparadas, no es mayor que 10%.

Fuente: (Secretaría de Salud, 2013), (ANVISA, 2012)

### 3 Objetivos

Con base a lo indicado por la Regulación Brasileña, unidades analíticas en territorio mexicano deben ser certificadas para realizar estudios de biodisponibilidad/bioequivalencia de manera que con la evaluación de un solo estudio, un medicamento de prueba pueda obtener el registro en México y Brasil.

Adicionalmente y ante la diversidad de factores que afectan a un padecimiento crónico, como es el caso de la diabetes, existen en el mercado diversas formulaciones de preparados farmacéuticos a diferentes dosis que se encuentran a la venta y por ende es necesario realizar estudios de bioequivalencia a dichos medicamentos de prueba que tienen un menor costo y demuestran ser seguros y eficaces. Razón por la cual el presente proyecto tiene como objetivos:

- ◆ Realizar la optimización del método bioanalítico por espectrometría de MS-MS para la cuantificación de metformina en plasma.
- ◆ Validar el método bioanalítico para la cuantificación de metformina en plasma humano, el cual pueda ser aplicado a estudios de bioequivalencia para formulaciones de tabletas XR a dosis de 500 y 1000 mg, bajo los lineamientos Procedimientos Normalizados de Operación de IFaB, que incluyen los requisitos más exigentes de la normatividad mexicana y/o brasileña, empleando un cromatógrafo de líquidos acoplado a un detector de espectrometría de MS-MS.

## 4 Metodología

La optimización y validación del método bioanalítico, se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector de MS-MS, de acuerdo a los lineamientos estipulados en las regulaciones mexicana y/o brasileña, de forma conjunta (ver tabla 5).

### 4.1 Materiales, equipos e instrumentos

#### 4.1.1 Material

- Matraces volumétricos clase A de 10, 20, 50, 100, 1000 y 2000 mL
- Probeta graduada de 100, 500 y 1000 mL
- Puntas para pipeta repetidora
- Viales para automuestreador
- Insertos de polipropileno
- Placas de 96 pozos de polipropileno con tapas
- Pipetas Pasteur
- Vasos de precipitados de vidrio de 100, 250, 500 y 1000 mL
- Vasos de precipitados de polipropileno de 100, 250, 500 y 1000 mL
- Frascos de vidrio con tapa de rosca de 100, 500, 1000 y 2000 mL
- Tubos de vidrio silanizado de 16 x 100 mm
- Gradillas
- Microtubos transparentes de 2 mL
- Puntas para micropipeta 100-1000  $\mu$ L
- Puntas para micropipeta 200  $\mu$ L
- Espátula
- Charola para pesar
- Guantes de nitrilo

#### 4.1.2 Equipos e instrumentos

- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución acoplado a un detector de MS-MS:



**Tabla 6.** Componentes del CLAR acoplado al detector de MS-MS.

Componente	Marca
Bomba A	Shimadzu
Bomba B	Shimadzu
Automuestreador	Shimadzu
Cambiador de placas	Shimadzu
Desgasificador	Shimadzu
Módulo de comunicación	Shimadzu
Horno para columna	Shimadzu
Fuente	ABSciex
Detector	ABSciex
Generador de nitrógeno	Peak
Bomba de vacío	Agilent Technologies
Estación de procesamiento de datos	Dell

**Tabla 7.** Equipos e instrumentos empleados

Instrumento	Marca
Balanza analítica	Ohaus
Balanza granataria	Ohaus
Agitador vórtex	Scientific Industries
Agitador vórtex multi-tubo	VWR
Ultracongelador	REVCO
Sistema desionizador de agua Purelab flex	ELGA
Pipeta repetidora electrónica	Eppendorf
Micropipeta volumen variable de 100 – 1000 µL	Eppendorf
Micropipeta de volumen fijo de 200 µL	Eppendorf
Micropipeta volumen variable de 10-100 µL	Eppendorf
Refrigerador	Tor Rey
Congelador	Frigidaire
Centrífuga	Hettich
Centrífuga	Hettich
Potenciómetro	Thermo Scientific
Baño de ultrasonido	Crest ultrasonics

#### 4.1.3 Reactivos y disolventes

- Agua grado cromatográfico (CLAR), (H<sub>2</sub>O), CAS 7732-18-5 obtenida del sistema desionizador de agua.

- Agua grado cromatográfico (CLAR), (H<sub>2</sub>O), CAS 7732-18-5, Honeywell o J. T. Baker.
- Metanol grado cromatográfico (CLAR), (MeOH), (CH<sub>3</sub>OH), CAS 67-56-1, Honeywell o J. T. Baker.
- Acetonitrilo grado cromatográfico (CLAR), (ACN), (CH<sub>3</sub>CN), CAS 75-05-8, Honeywell o J. T. Baker.
- Acetato de amonio, grado masas (CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>), CAS 631-61-8, Fluka.
- Ácido acético glacial, grado reactivo (CH<sub>3</sub>COOH), CAS 64-19-7 J. T. Baker.

#### 4.1.4 Sustancias de referencia

- Metformina clorhidrato. Sustancia de Referencia Primaria, FEUM, lote 100249, pureza 100.0%
- Metformina-d6 HCl (E. I.) Sustancia de Referencia Primaria, TLC, lote 1147-002A4, pureza 99.9%

#### 4.1.5 Matriz biológica

El fluido biológico empleado en la preparación de muestras para la optimización y validación del método bioanalítico fue plasma humano fresco con heparina como anticoagulante, proveniente de voluntarios sanos de Biological Special Corporation, el cual contó con la documentación que amparó su bioseguridad. Los plasmas, fueron de seis donadores (folios F-1770, F-1777, F-1778, F-1779, F-1780 y F-1781), los cuales se mezclaron para formar un pool o mezcla, fraccionado en frascos de polipropileno y almacenado en congelación a una temperatura no mayor a -20 °C.

Al igual que en la optimización y validación del método, las muestras provenientes del estudio de bioequivalencia, fueron de plasma humano con heparina como anticoagulante.

## 4.2 Optimización del método bioanalítico

Para la optimización del método bioanalítico se buscaron condiciones cromatográficas y extracción del analito de interés que aumentaran la sensibilidad del método, en publicaciones anteriores (tabla 4) y con base a las propiedades fisicoquímicas del

analito de interés se inicio con la realización de la ionización de una muestra conteniendo 100 ng/mL de metformina clorhidrato, con la finalidad de obtener los parámetros de ionización dependientes del compuesto y del flujo. Se realizaron diversas evaluaciones para averiguar las mejores condiciones cromatográficas donde se obtuviera una respuesta adecuada para tener un LIC de 3 ng/mL, simetría de pico, resolución, selectividad y una respuesta adecuada para el analito. Una vez establecida la primera etapa de la optimización, se integró el estándar interno, que fue una sustancia de referencia de metformina clorhidrato deuteriada-d6. Y los parámetros dependientes del flujo y condiciones cromatográficas previamente estipulados se adecuaron al estándar. De igual manera se ionizó la molécula para obtener los parámetros dependientes de este compuesto. En la siguiente tabla se observan las condiciones evaluadas durante el desarrollo (Tabla 8):

**Tabla 8.** Condiciones evaluadas durante la optimización del método

Optimización	Evaluación de Variables
<b>Condiciones cromatográficas</b>	Columna cromatográfica:
	✓ Fortis H <sub>2</sub> O 4.6X100 mm 3 μm,
	✓ Kinetex HILIC 3X150 mm 2.6 3 μm,
	✓ Polaris 5 C18 A 4.6x150 mm 5 μm
	Temperatura columna: 30, 40 y 50°C
	Volumen de inyección: 10, 5 μL
	pH de la fase acuosa: 6, 5, 4
	Proporción de fase móvil (acuoso: orgánico): 70:30:, 80:20 y 90:10 % v/v
<b>Extracción</b>	Fase de lavado: H <sub>2</sub> O:ACN 50:50, 80:20, 90:10 % v/v
	Con precolumna Gemini C18 4x3 mm, sin precolumna
	Precipitación de proteínas con ACN sin enfriar y en frío (-20°C)
<b>Dilución de la muestra</b>	Precipitación de proteínas con MeOH sin enfriar y en frío (-20°C)
	Precipitación de proteínas con ACN sin enfriar y en frío (-20°C) y extracción líquido-líquido con diclorometano
	No dilución
	Mezcla de:
	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ ACN:H<sub>2</sub>O 50:50 % v/v</li> <li>✓ ACN:CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 5 mM pH 4 50:50 % v/v</li> <li>✓ MeOH:H<sub>2</sub>O 50:50 % v/v</li> <li>✓ MeOH:CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 5 mM pH 4 50:50 % v/v</li> <li>✓ CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 5 mM pH 4, 500 μL</li> <li>✓ H<sub>2</sub>O 500 μL</li> </ul>
	Dilución: 5, 10, 20 a 500 μL todas las evaluaciones

Finalmente, obtenidas las condiciones de detección, cromatográficas y de extracción del analito se procedió a la validación del método bioanalítico.

### 4.3 Validación del método bioanalítico

La validación del método bioanalítico se realizó conforme a los requisitos y parámetros establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA-1-2013, en lo referente al apartado de criterios y requisitos para el análisis de muestras biológicas de un estudio de biodisponibilidad o bioequivalencia (Validación de métodos bioanalíticos) y la normatividad de ANVISA (Resolução RDC No. 27), de manera conjunta.

Cabe mencionar que, los métodos bioanalíticos empleados para la cuantificación de muestras biológicas deben ser validados en el sitio de análisis y alcanzar el propósito para el que han sido desarrollados. (Secretaría de Salud, 2010)

#### 4.3.1 Preparación de soluciones

- **Solución de acetato de amonio ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) 5 mM pH 5 en agua grado cromatográfico (componente acuoso de la fase móvil).**

Transferir 1 mL de solución de acetato de amonio 5 M a un matraz volumétrico de 1 L y llevar a volumen con agua grado cromatográfico. Ajustar el pH a 5.0 con ácido acético concentrado, filtrar y desgasificar en baño de ultrasonido durante 15 min.

- **Acetonitrilo (ACN) grado cromatográfico (componente orgánico de la fase móvil).**

Transferir 1 L de acetonitrilo grado cromatográfico a un frasco con tapón de rosca de 1 L. Filtrar y desgasificar en baño de ultrasonido durante 15 min.

- **Solución de lavado, agua grado cromatográfico: acetonitrilo grado cromatográfico ( $\text{H}_2\text{O}$ : ACN) 50:50 v/v.**

Medir en una probeta graduada 500 mL de agua grado cromatográfico y 500 mL de acetonitrilo grado cromatográfico, transferir a un frasco de vidrio con tapa de rosca de 1 L y mezclar. Desgasificar en baño de ultrasonido durante 15 min.

- **Solución reactivo, agua grado cromatográfico: acetonitrilo grado cromatográfico: metanol grado cromatográfico (H<sub>2</sub>O: ACN: MeOH) 80:10:10 v/v/v.**

Medir en una probeta graduada 160 mL de agua grado cromatográfico, 20 mL de acetonitrilo grado cromatográfico y 20 mL de metanol grado cromatográfico, transferir a un frasco de vidrio con tapa de rosca de 500 mL y mezclar.

- **Agente precipitante, metanol grado cromatográfico: acetonitrilo grado cromatográfico (MeOH: ACN) 50:50 v/v.**

Medir en una probeta graduada 250 mL de metanol grado cromatográfico y 250 mL de acetonitrilo grado cromatográfico, transferir a un frasco de vidrio con tapa de rosca de 500 mL, mezclar y resguardar a una temperatura no mayor a -20 °C al menos 30 min previo a su uso en la técnica de extracción.

- **Solución estándar principal de metformina (100 µg/mL). Solución A.**

Pesar con exactitud 6.4 mg de sustancia de referencia de metformina clorhidrato (equivalente a 5 mg de metformina) y transferir a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver con 1 mL de acetonitrilo grado cromatográfico y llevar a volumen con agua grado cromatográfico.

- **Solución estándar intermedia de metformina (5 µg/mL). Solución B.**

Transferir cuantitativamente 1 mL de la solución A (100 µg/mL) de metformina a un matraz volumétrico de 20 mL y llevar a volumen con solución reactivo.

- **Solución estándar intermedia de metformina (0.250 µg/mL). Solución C.**

Transferir cuantitativamente 1 mL de la solución B (5 µg/mL) de metformina a un matraz volumétrico de 20 mL y llevar a volumen con solución reactivo.

➤ **Solución estándar principal de metformina-d6 HCl E.I. (100 µg/mL) Solución I.**

Pesar con exactitud 2 mg de sustancia de referencia de metformina-d6 HCl, transferir a un matraz volumétrico de 20 mL, disolver con 1 mL de acetonitrilo grado cromatográfico y llevar a volumen con agua grado cromatográfico.

➤ **Solución estándar de trabajo de metformina-d6 HCl E.I. (10 µg/mL). Solución II.**

Transferir cuantitativamente 2 mL de la solución I (100 µg/mL) de metformina-d6 HCl a un matraz volumétrico de 20 mL y llevar a volumen con solución reactivo.

➤ **Solución para evaluar la adecuabilidad del sistema (metformina 175 ng/mL, metformina-d6 HCl (E. I.) 250 ng/mL) Solución AD1.**

Transferir cuantitativamente 700 µL de la solución B (5 µg/mL) de metformina y 500 µL de la solución II (10 µg/mL) de metformina-d6 HCl (E. I.) a un matraz volumétrico de 20 mL y llevar a volumen con solución reactivo. Dividir la solución en alícuotas de 1.5 mL en microtubos de 2 mL y almacenarlas a  $-70 \pm 10$  °C. Descongelar un tubo cada día de trabajo.

Cada día de trabajo procesar una muestra doble blanco, para ello colocar 100 µL de una mezcla de plasmas (mínimo seis folios) libre del analito en microtubo de 2 mL, adicionar 200 µL del agente precipitante a una temperatura no mayor a  $-20$  °C, agitar a 2500 rpm durante 2 minutos, centrifugar a 14000 rpm durante 5 min a  $4$  °C, transferir 100 µL del sobrenadante a un tubo de vidrio silanizado de 16 x 100 mm, evaporar a sequedad bajo corriente de aire en baño maría a  $60$  °C durante aproximadamente 20 minutos y reconstituir con 400 µL de una de las alícuotas de adecuabilidad descongelada.

### 4.3.2 Preparación de muestras estándar de calibración y controles de calidad en plasma

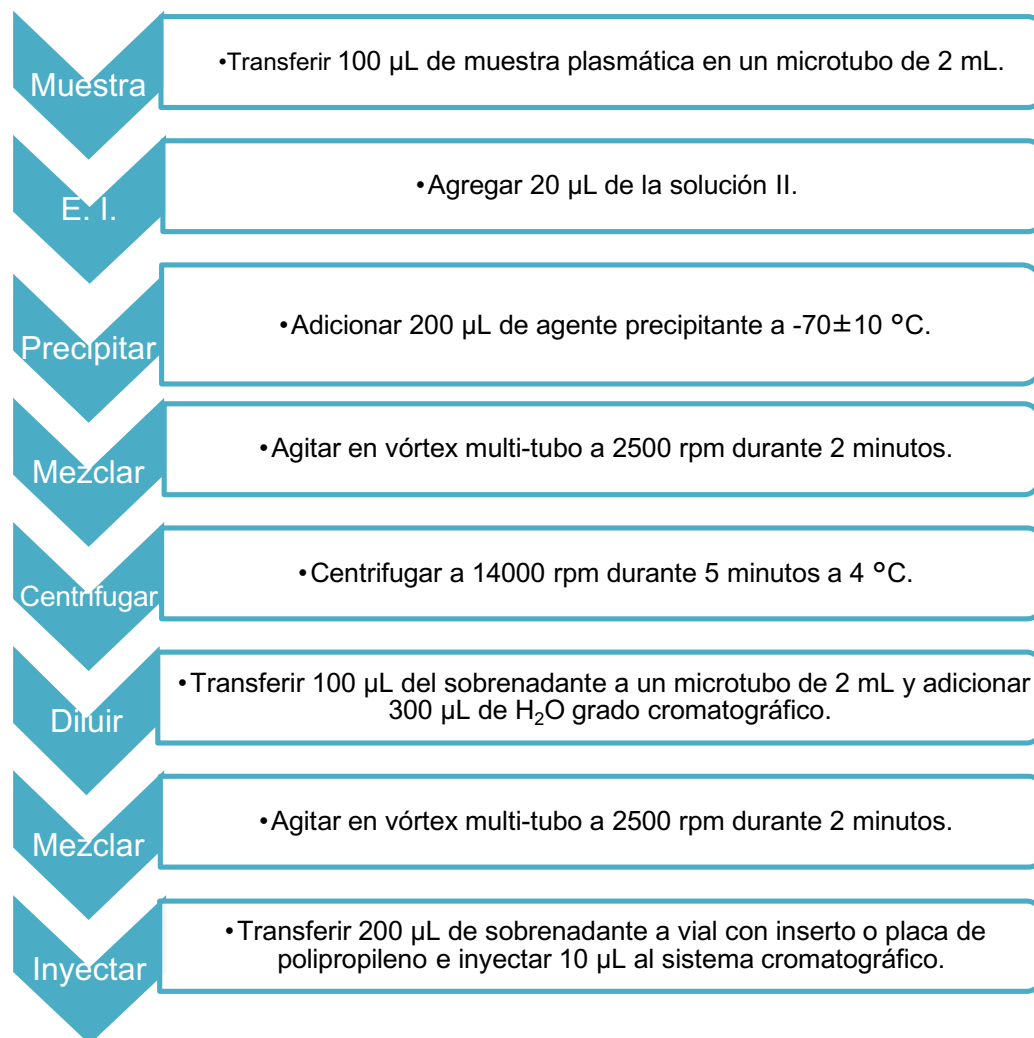
**Tabla 9.** Preparación de la curva de calibración y muestras control de calidad en plasma humano con heparina como anticoagulante.

MTF Sol. C (0.250 µg/mL) µL	MTF Sol. B (5 µg/mL) µL	MTF Sol. A (100 µg/mL) (µL)	Volumen de H <sub>2</sub> O:MeOH:ACN 80:10:10 v/v/v	Conc. en sistema MTF (ng/mL)	Alícuota de muestra en sistema (µL)	Volumen de plasma (µL)	Conc. en plasma MTF (ng/mL)	Nivel
240	-	-	760	60	25	475	3	CP1
480	-	-	520	120	25	475	6	CP2
720	-	-	280	180	25	475	9	CCB
-	100	-	900	500	25	475	25	CP3
-	400	-	600	2000	25	475	100	CP4
-	800	-	200	4000	25	475	200	CCBB
-	-	100	900	10000	25	475	500	CP5
-	-	200	800	20000	25	475	1000	CP6
-	-	300	700	30000	25	475	1500	CCM
-	-	320	680	32000	25	475	1600	CP7
-	-	430	570	43000	25	475	2150	CP8
-	-	470	530	47000	25	475	2350	CCA
-	-	530	470	53000	25	475	2650	CP9
-	-	600	400	60000	25	475	3000	CP10
-	-	800	200	80000	25	475	4000	CCD

CP1 a CP10 son considerados estándares de calibración, CCB, CCBB, CCM, CCA y CCD son controles de calidad bajo, bajo B, medio, alto y diluido, respectivamente.

### 4.3.3 Método de extracción de la muestra

Extraer cada muestra plasmática de acuerdo al siguiente esquema:



**Figura 6.** Diagrama del método de extracción para metformina en plasma.

### 4.3.4 Adecuabilidad del sistema

Para verificar que el funcionamiento del sistema sea adecuado, además de tener un monitoreo de la columna cromatográfica durante todas las corridas analíticas de la validación se evaluó la adecuabilidad mediante 6 inyecciones consecutivas de una solución que contenía 175 ng/mL de metformina y 250 ng/mL de metformina-d6 HCl (E. I.) (Solución AD1).



El sistema se consideró adecuado al cumplir con un C. V.  $\leq 10\%$  en la relación de áreas y un C. V.  $\leq 2\%$  en el tiempo de retención.

### **4.3.5 Selectividad**

#### **4.3.5.1 Selectividad de inicio**

Para evaluar la selectividad del sistema, muestras procesadas se inyectaron en el orden siguiente: un blanco de reactivos (BR, muestra con los reactivos empleados durante el procesamiento de muestras sin la adición de matriz biológica, analito ni E. I.), un doble blanco (DB, muestra de matriz biológica sin la adición del analito de interés ni el E. I.) y un blanco (B, muestra de la matriz biológica sólo con la adición del estándar interno).

Las muestras DB y B se procesaron de acuerdo al método de extracción de la figura 6, y se inyectaron de acuerdo a las condiciones cromatográficas establecidas.

Para que dicha prueba fuera aceptada no debía presentar interferencias en el tiempo de retención de metformina y metformina-d6 o la(s) interferencia(s) debía(n) ser  $\leq 20\%$  de la respuesta analítica obtenida en el LIC para metformina y  $\leq 5\%$  con respecto a la respuesta del estándar interno.

#### **4.3.5.2 Selectividad de la matriz biológica**

Se demostró la no interferencia de compuestos endógenos de la matriz biológica, mediante el análisis de las seis fuentes individuales, que conforman el pool de plasma con heparina como anticoagulante, con el cual se realizó la validación (F-1770, F-1777, F-1778, F-1779, F-1780, F-1781) una fuente de plasma hemolizado (H-1757) y una fuente de plasma lipémico (L-1709); los folios anteriores se procesaron de forma individual como muestra doble blanco, de acuerdo al diagrama de extracción de la figura 6.

Los resultados se compararon con la respuesta promedio de cinco réplicas de muestras preparadas del LIC (Límite Inferior de Cuantificación).

De esta manera se evaluó el método contra posibles interferencias en los tiempos de retención de metformina y metformina-d6 HCl (E. I.)

El método bioanalítico se consideró selectivo a la matriz biológica si las muestras no presentaban interferencias en los picos de interés o la respuesta era menor o igual al 20% respecto al LIC de metformina y menor o igual al 5% comparada con la respuesta de metformina-d6 (E. I.).

#### **4.3.5.3 Selectividad a fármacos de uso común**

Para evaluar la selectividad del método contra posibles interferencias en el tiempo de retención de metformina y metformina-d6 (E. I.) se procesaron muestras doble blanco (DB) con la adición de fármacos de uso común a las siguientes concentraciones: ácido salicílico (300 µg/mL), paracetamol (20 µg/mL), naproxeno (50 µg/mL), cafeína (4 µg/mL) y nicotina (50 ng/mL).

Los resultados se compararon con la respuesta promedio de cinco réplicas de muestras preparadas del LIC (Límite Inferior de Cuantificación).

El método bioanalítico se consideró selectivo a los fármacos de uso común si no presentaba interferencias en el tiempo de retención para el analito de interés o en el del E. I. o la respuesta era menor o igual al 20% respecto al LIC de metformina y menor o igual al 5% comparada con la respuesta de metformina-d6 (E. I.).

#### **4.3.6 Acarreamiento (Prueba de arrastre)**

Se evaluó si el sistema cromatográfico presentaba algún arrastre mediante la inyección de una muestra DB (doble blanco) por triplicado, siendo una antes y dos después de una muestra a una concentración equivalente al LSC (Límite Superior de Cuantificación). Los resultados se compararon respecto a la respuesta de cinco réplicas de muestras preparadas a la concentración del LIC (Límite Inferior de Cuantificación).

El método bioanalítico se consideró sin arrastre si las muestras no presentaban interferencias en los picos de interés o la respuesta era menor o igual al 20% respecto

al LIC de metformina y menor igual al 5% comparada con la respuesta de metformina-d6 (E. I.).

#### 4.3.7 Respuesta cruzada

Para determinar qué tan selectivo es el sistema cromatográfico con el método bioanalítico se analizaron las siguientes muestras: doble blanco de la matriz biológica (DB), el punto más alto de los estándares de calibración (LSC: MTF) para metformina sin estándar interno (E.I.) y un blanco (B: muestra de la matriz biológica con la adición del estándar interno. Se inyectaron de manera alternada en una secuencia, evaluando la selectividad del sistema contra posibles interferencias en los tiempos de retención de metformina y metformina-d6 HCl (E. I.).

El criterio de aceptación para esta prueba fue que las muestras en ausencia de MTF o MTF-d6 HCl no presentarán ninguna interferencia para el tiempo de retención de MTF o MTF-d6 HCl, en el caso de que la presente, debe ser menor al 20% de la muestra límite inferior de cuantificación para metformina (LIC) y menor al 5% para el estándar interno (metformina d-6 HCl).

#### 4.3.8 Linealidad

Para determinar la capacidad del método bioanalítico de obtener una respuesta proporcional a la concentración de metformina en el intervalo de trabajo de 3 a 3000 ng/mL utilizando 10 estándares de calibración, de concentraciones de 3, 6, 25, 100, 200, 500, 1000, 1600, 2150, 2650 y 3000 ng/mL de metformina como lo describe la tabla 9, se prepararon y procesaron tres curvas de calibración con una muestra doble blanco (DB) y una muestra blanco (B) para cada curva de calibración.

Para poder definir el modelo matemático de la curva de calibración la concentración recuperada debe estar dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel, excepto para el LIC, ya que puede ser menor o igual que el 20%. Y al menos el 75% de las concentraciones de la curva de calibración debieron cumplir con dicho criterio. Además, la regresión lineal por mínimos cuadrados a la ecuación  $y = mx + b$  debe dar un coeficiente de correlación ( $r$ ) mayor o igual a 0.99, para cada curva de calibración.

Con las concentraciones recuperadas, se definió un modelo matemático que describe la relación entre la concentración y la respuesta, a partir del cálculo del error relativo ( $\Sigma ER\%$ ) de tres ponderaciones diferentes y junto con el arreglo matemático más simple (sin ponderación), con la finalidad de seleccionar el modelo matemático que describiera una relación de la respuesta contra la concentración para la cuantificación de metformina.

#### **4.3.9 Precisión del método**

##### **4.3.9.1 Repetibilidad**

Se prepararon, procesaron y analizaron cinco réplicas de muestras a la concentración del LIC y muestras control a concentraciones de CCB, CCBB, CCM, CCA y CCD, en un mismo día de trabajo. La muestra control CCD se preparó para un factor de dilución de 2, (que será aplicado a las muestras durante el estudio), a una concentración de 4000 ng/mL, de la cual se tomó 50  $\mu\text{L}$  de muestra y se completó el volumen a 100  $\mu\text{L}$  con matriz biológica libre de fármaco.

Se calculó la concentración obtenida para cada nivel interpolando la respuesta analítica en una curva de calibración de reciente preparación. Además, se calculó el promedio, desviación estándar (%D. E.) y coeficiente de variación (% C. V.) de la concentración recuperada.

El valor máximo del coeficiente de variación aceptado para cada nivel de las muestras CC es del 15%, a excepción del LIC que es 20%.

##### **4.3.9.2 Reproducibilidad**

Se evaluaron las muestras indicadas en la repetibilidad, pero se llevan a cabo en 2 días de trabajo.

Los cálculos y criterios de aceptación son los mismos que para la repetibilidad, cada día de prueba.

#### 4.3.10 Exactitud

Para determinar la concordancia entre el valor obtenido y el valor nominal, se realizó una comparación de los datos de repetibilidad y reproducibilidad calculando la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal (% desviación absoluta). Empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ desviación absoluta} = \left| \frac{\text{Concentración nominal} - \text{Concentración recuperada}}{\text{Concentración nominal}} \right| \times 100$$

El valor promedio del % de desviación absoluta no debe ser mayor al 15% del valor nominal correspondiente, a excepción del LIC que es del 20%.

#### 4.3.11 Efecto matriz

Para evaluar la supresión iónica debida a la matriz biológica, se analizaron por duplicado de forma individual las 6 unidades de matriz biológica que conforman el pool con el cual se validó el método (folios: F-1770, F-1777, F-1778, F-1779, F-1780 y F-1781); adicionalmente se consideró 2 fuentes lipémicas (folios F-1708, F-1709) y 2 hemolizadas (Folios: F-1687 y F-1757).

Se extrajo cada muestra como DB y se les adicionó metformina y metformina-d6 HCl (E. I.) en solución para obtener la respuesta analítica correspondiente.

Se compararon las respuestas analíticas obtenidas respecto a las respuestas del analito y del E. I. en solución. Esta determinación se realizó con soluciones a concentraciones equivalentes del CCB y CCA. Para cada unidad se obtuvo un FMN (Factor matriz normalizado) por el E. I., conforme la siguiente fórmula:

$$FMN = \frac{\text{Respuesta de metformina en la matriz} \times \text{Respuesta de metformina - d6 HCl en solución}}{\text{Respuesta de metformina en solución} \times \text{Respuesta de metformina - d6 HCl en la matriz}}$$

El criterio de aceptación para esta prueba fue que metformina y metformina-d6 HCl (E. I.) presentarán un C. V. % del FMN menor al 15%.

#### 4.3.12 Estabilidad del analito

Para evaluar la capacidad del analito de interés para mantenerse en las diferentes condiciones de temperatura y tiempo, durante su manejo, toma de muestra,

almacenamiento y procesamiento analítico, se consideró la concentración recuperada de metformina en muestras CCB y CCA preparadas por triplicado y habiendo sido sometidas a las distintas condiciones de almacenamiento por un tiempo equivalente o mayor al que serán sometidas las muestras del estudio.

#### **4.3.12.1 Estabilidad del analito en la matriz biológica**

##### **4.3.12.1.1 Estabilidad a corto plazo**

Se evaluó la estabilidad de metformina en plasma, almacenando a temperatura ambiente (15-30°C), en refrigeración (2-8 °C) y en congelación (temperatura no mayor a -20°C) muestras control de calidad por triplicado preparadas a una concentración de 9 y 2350 ng/mL (CCB y CCA, respectivamente).

Después de someter las muestras a las condiciones del ensayo se procesaron (figura 6) y analizaron, interpolando en una curva de calibración de preparación reciente y las concentraciones obtenidas se compararon contra la concentración nominal. La concentración promedio de cada nivel debe estar dentro del 15% de la concentración nominal. (% desviación absoluta).

$$\% \text{ desviación absoluta} = \left| \frac{\text{Concentración nominal} - \text{Concentración recuperada}}{\text{Concentración nominal}} \right| \times 100$$

##### **4.3.12.1.2 Estabilidad a largo plazo**

Para evaluar la estabilidad de metformina en plasma a largo plazo, las series de muestras control de calidad (CCB y CCA, cada nivel de concentración por triplicado) fueron sometidas a una temperatura de congelación  $-70 \pm 10$  °C por un periodo de tiempo equivalente al que transcurrió desde la obtención de la muestra hasta su análisis.

Seguido de someter las muestras a las condiciones del ensayo, se procesaron y analizaron, de la misma manera que lo estipula la estabilidad a corto plazo, siendo los mismos criterios de aceptación.

#### **4.3.12.2 Estabilidad de la muestra procesada**

##### **4.3.12.2.1 Estabilidad en el automuestreador**

Para determinar la estabilidad de metformina, bajo condiciones de muestra procesada a la temperatura del automuestreador (10°C) se prepararon, procesaron (Figura 6) y almacenaron en el automuestreador a 10°C (de 24 a 48 horas), muestras control de calidad por triplicado a una concentración de 9 y 2350 ng/mL (CCB y CCA, respectivamente).

Dichas muestras se analizaron interpolando en una curva de calibración de reciente preparación y las concentraciones obtenidas se compararon contra la concentración nominal. La concentración promedio de cada nivel debe estar dentro del 15% de la concentración nominal. (% desviación absoluta).

##### **4.3.12.2.2 Estabilidad en refrigeración**

Para evaluar la estabilidad de metformina en la muestra procesada en refrigeración 2-8 °C, se prepararon muestras control de calidad por triplicado conteniendo metformina en plasma a dos niveles de concentración (CCB 9 ng/mL y CCA 2350 ng/mL) las cuales fueron procesadas y almacenadas en refrigeración.

Dichas muestras se analizaron interpolando en una curva de calibración de reciente preparación y las concentraciones obtenidas se compararon contra la concentración nominal. La concentración promedio de cada nivel debía estar dentro del 15% de la concentración nominal. (% desviación absoluta).

##### **4.3.12.3 Ciclos de congelación-descongelación**

Se realizó la evaluación a ciclos de congelación-descongelación, se prepararon muestras control de calidad por triplicado conteniendo 9 y 2350 ng/mL de metformina en plasma a los niveles de CCB y CCA. Las muestras fueron almacenadas a -70 °C y sometidas a cuatro ciclos de congelación-descongelación, con un período mínimo de 12 horas, entre cada ciclo. Las muestras fueron procesadas e inyectadas al sistema cromatográfico.

Dichas muestras se analizaron interpolando en una curva de calibración de reciente preparación y las concentraciones obtenidas se compararon contra la concentración nominal. La concentración promedio de cada nivel debe estar dentro del 15% de la concentración nominal. (% desviación absoluta).

#### 4.3.12.4 Estabilidad del analito en solución

Para demostrar la estabilidad de la solución estándar principal (concentración alta) y la solución estándar de trabajo (concentración baja) de metformina, se prepararon las diluciones apropiadas, considerando la linealidad y detector de medición empleado, que a continuación se indican a partir de las soluciones estándar principal y de trabajo para metformina de reciente preparación y de soluciones que fueron almacenadas en refrigeración (2-8°C), temperatura ambiente (15-30°C) y congelación (-70 °C).

- Solución estándar principal de metformina A (100 µg/mL): En un matraz volumétrico de 10 mL se adicionó 25 µL de la solución de metformina 100 µg/mL y se llevó a volumen con solución reactivo. Se realizaron inyecciones de 10 µL de esta solución (0.25 µg/mL), por triplicado, al sistema cromatográfico.
- Solución estándar de trabajo de metformina C (0.25 µg/mL): Se inyectaron directamente de esta solución 10 µL, por triplicado, al sistema cromatográfico.

Los valores promedio de la respuesta analítica de las soluciones en estudio fueron comparados con respecto al valor promedio obtenido por el análisis por triplicado de una solución de reciente preparación.

Ya que se empleó un isótopo como estándar interno (metformina-d6 HCl), no fue necesario realizar un ensayo de estabilidad en solución. Los periodos y condiciones de estabilidad evaluados para metformina son aplicables al estándar interno.

Las soluciones fueron consideradas estables si la desviación de la respuesta analítica promedio con respecto a la obtenida con muestras recién preparadas, no fuera mayor que 10%.



## 5 Resultados y discusión

### 5.1 Condiciones cromatográficas

En la tabla 10, se muestran las condiciones cromatográficas y de detección obtenidas de la optimización del método, basándose en los lineamientos a cumplir por los Procedimientos Normalizados de Operación de IFaB:

- La determinación del patrón de fragmentación se obtuvo mediante el escaneo de la sustancia de referencia en la fase móvil determinando un ión precursor que se muestra en la tabla 12.
- La fase móvil utilizada es solución de acetato de amonio 5 mM pH 5.0 en H<sub>2</sub>O grado cromatográfico: ACN grado cromatográfico 80:20 v/v con base a una evaluación de la estabilidad del número de cuentas, evaluada durante la optimización de los parámetros dependientes del analito.
- La columna utilizada fue elegida a partir de las propiedades fisicoquímicas del compuesto, además de la respuesta y tiempo de retención obtenido en la columna no polar.
- Se optó por una técnica de precipitación de proteínas con acetonitrilo: metanol en una proporción 50: 50 v/v, con base a la forma de pico y disminución del efecto matriz.
- Para la elección del estándar interno ante la legislación brasileña se optó por un estándar deuteriado.

**Tabla 10.** Condiciones cromatográficas del CLAR.

Condiciones cromatográficas	
Detector	Masas-Masas
Columna	Polaris 5 C18-A 4.6 x 150 mm 5.0 µm
Fase móvil	CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> 5 mM pH 5.0 H <sub>2</sub> O grado cromatográfico : ACN grado cromatográfico 80:20 v/v
Fase de lavado	H <sub>2</sub> O grado cromatográfico : ACN grado cromatográfico 50:50 v/v
Velocidad de flujo	0.5 mL/min
Volumen de inyección	0.5 µL
Temperatura horno para columna	40 °C
Temperatura automuestreador	10 °C

Condiciones cromatográficas	
Tiempo de retención aproximado	Metformina HCl 3.6 min Metformina-d6 HCl 3.6 min

**Tabla 11.** Condiciones de ionización en la interface.

Condiciones de la interface	
Curtain Gas	40 psi
Collision Gas	10 L/min
Ion Spray Voltage	4500
Temperatura	500 °C
Ion Source Gas 1	40 psi
Ion Source Gas 2	50 psi

**Tabla 12.** Parámetros dependientes de Metformina HCl y Metformina-d6 HCl (E. I.)

Condiciones de las señales		
	<i>Metformina HCl</i>	<i>Metformina-d6 HCl (E. I.)</i>
Interface	ESI	ESI
Polaridad	Positivo	Positivo
Precursor Ion	130.1	136.2
Product Ion	71.2	77.2
Dwell	500	500
DP (volts)	29	29
EP (volts)	6.4	6.4
CEP (volts)	17	17
CE (volts)	26	26
CXP (volts)	2.2	2.2

En las siguientes figuras: 7, 8, 9 y 10 se pueden observar los espectros de masas del blanco de reactivo, los iones precursores de metformina y metformina-d6, las transiciones del analito y estándar interno; respectivamente.

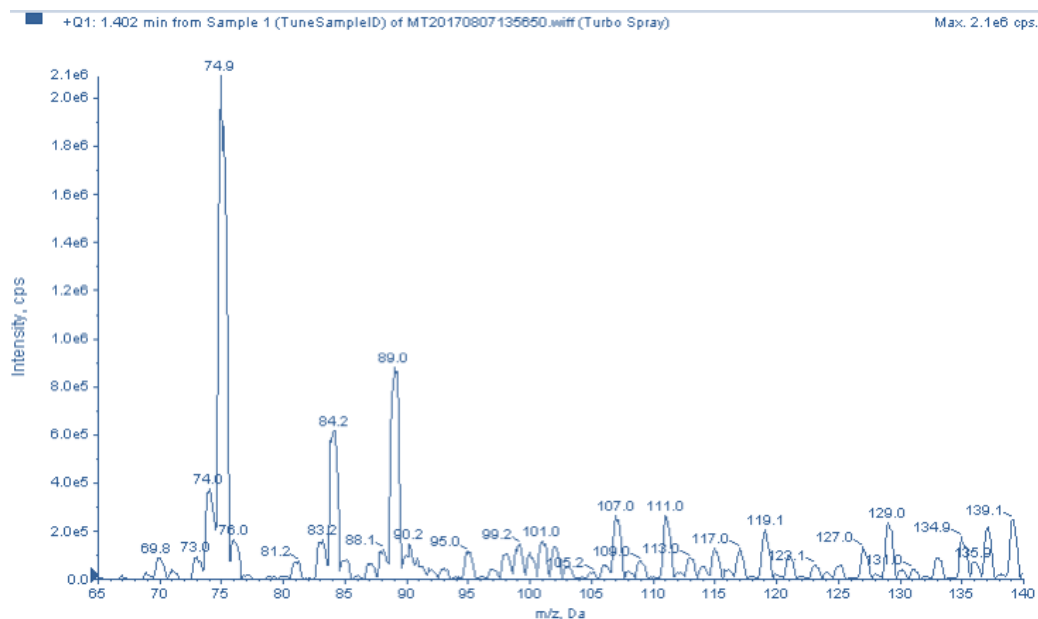


Figura 7. Espectro de masas del blanco de reactivos.

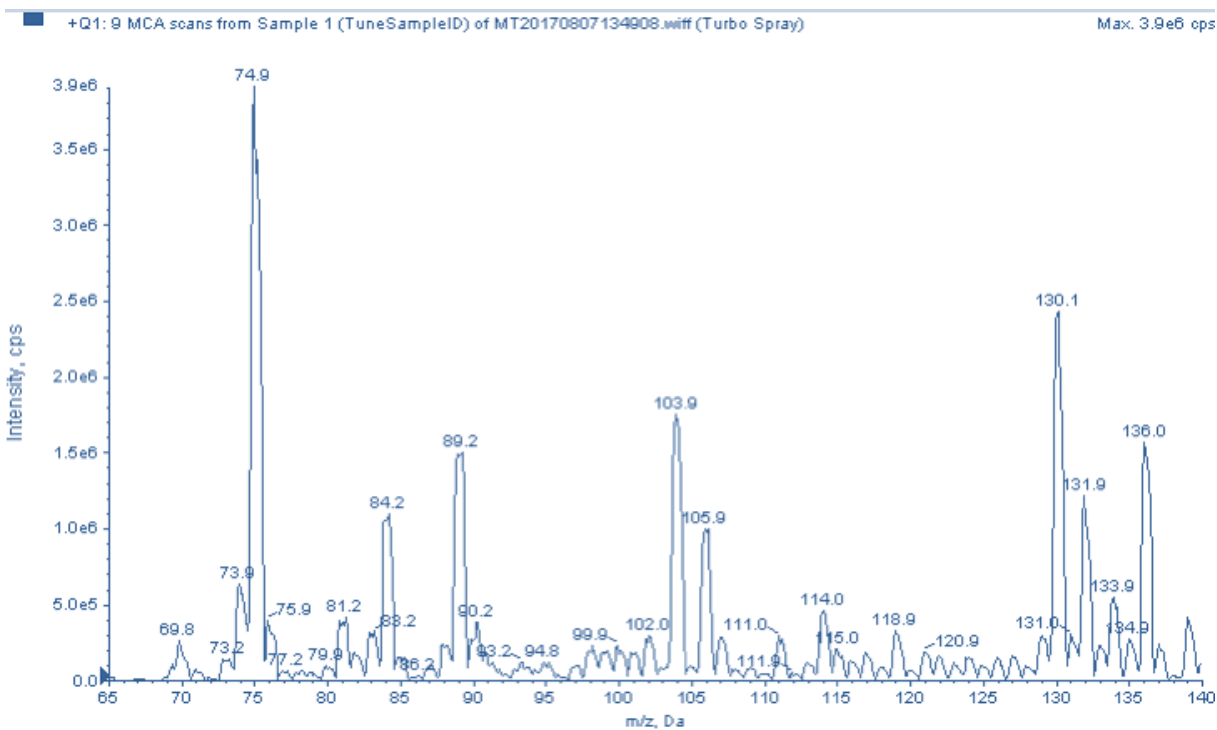
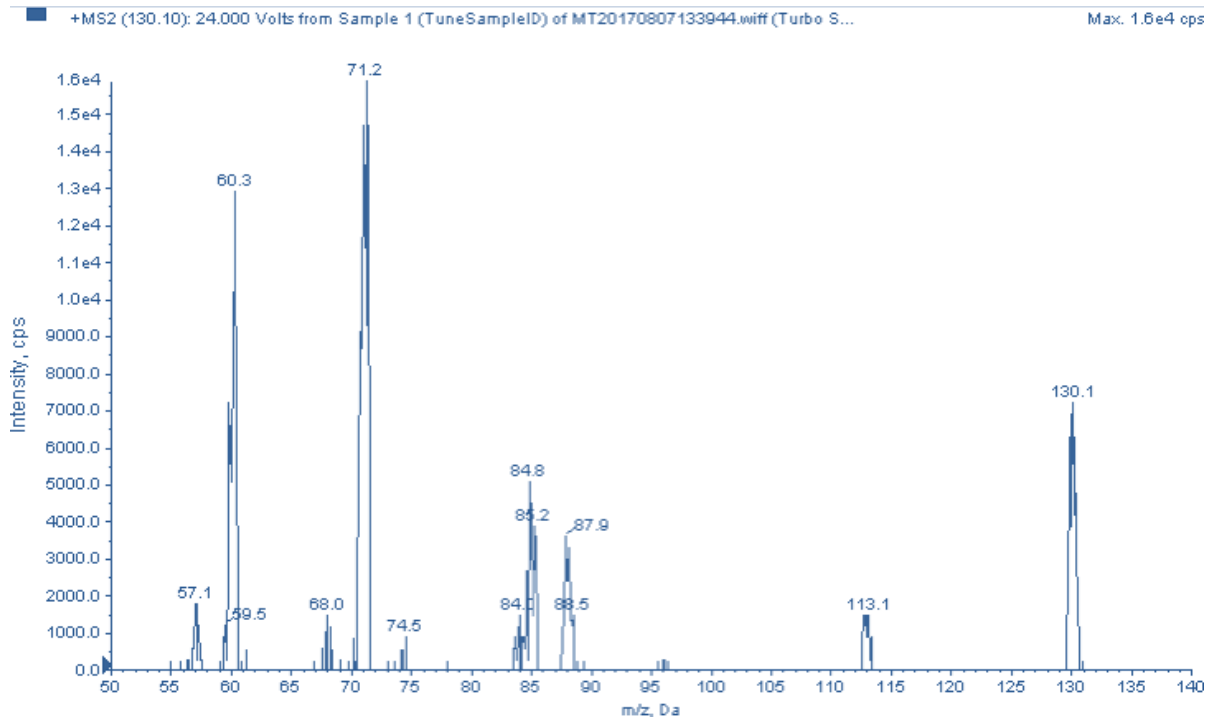
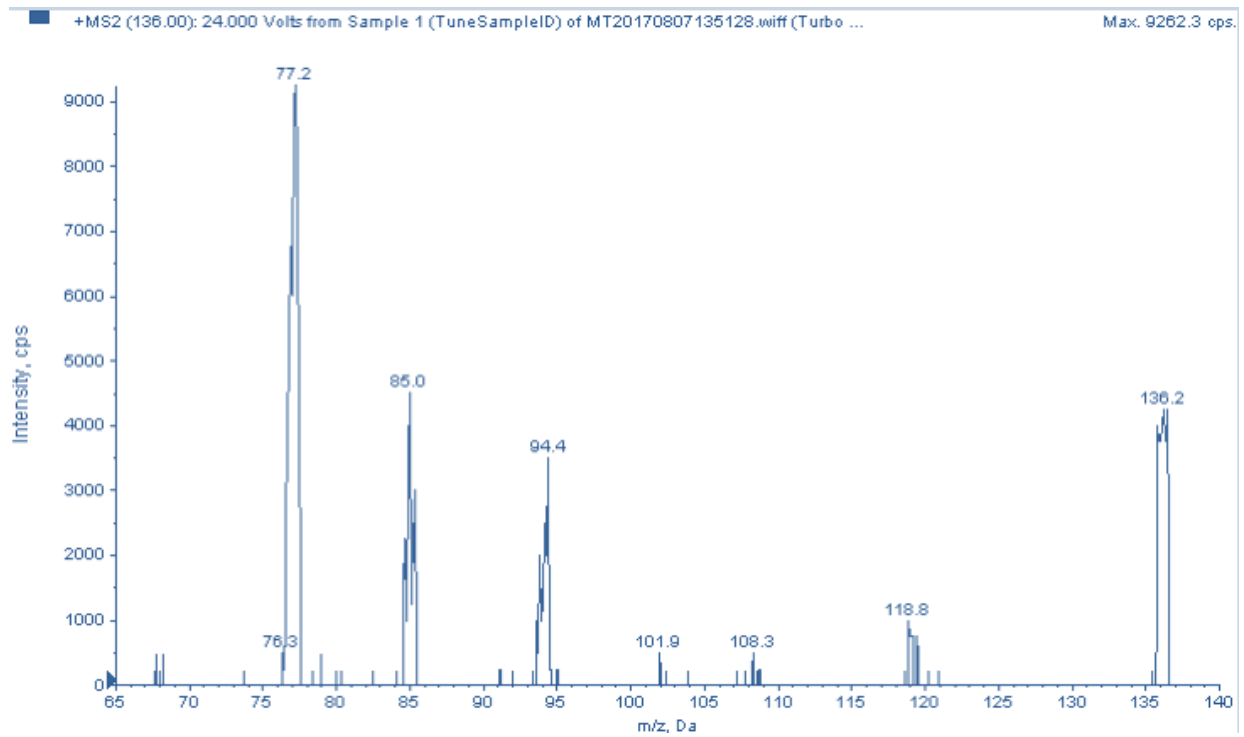


Figura 8. Iones precursores de metformina (130.1 m/z) y metformina-d6 (136.2 m/z).



**Figura 9.** Transición de metformina (130.1→71.4 m/z).



**Figura 10.** Transición de metformina-d6 (136.2→77.2 m/z).

## 5.1 Validación del método bioanalítico

### 5.1.1 Adecuabilidad del sistema

Los resultados promedio de las corridas analíticas se muestran a continuación en la tabla 13.

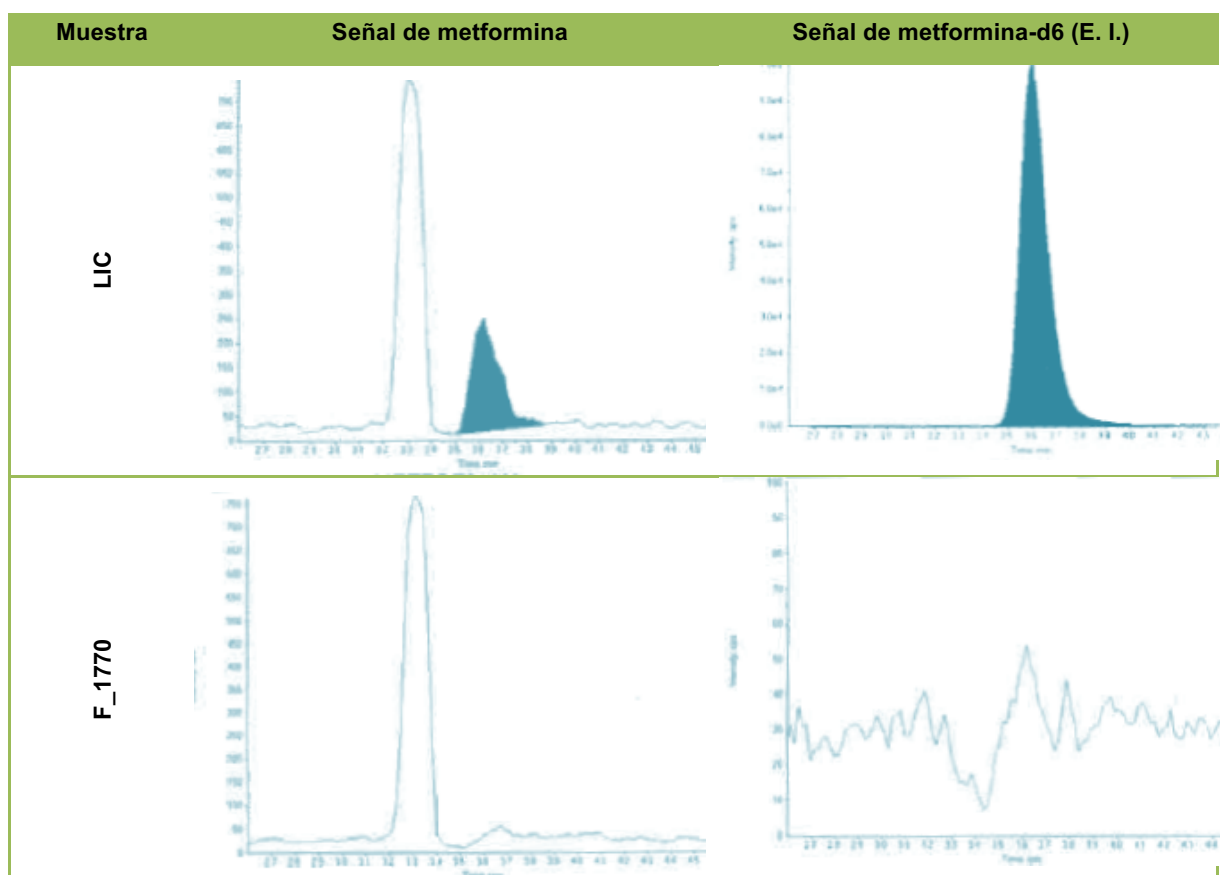
**Tabla 13.** Resultados de la adecuabilidad del sistema cromatográfico, por corrida analítica.

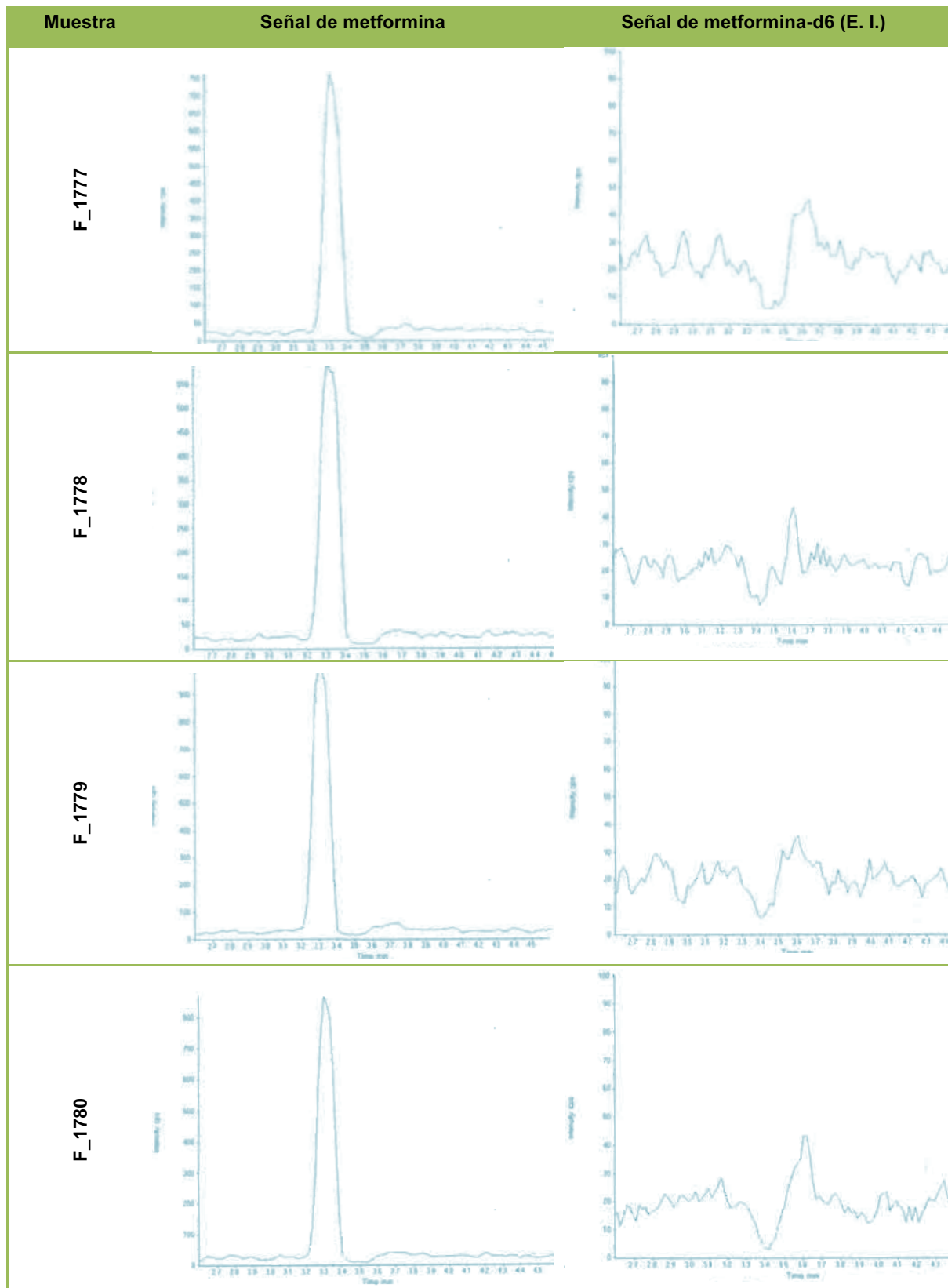
Corrida analítica	Metformina			Metformina-d6 HCl (E. I.)				
	Promedio área	Promedio tiempo de retención (min)	C.V. % Tiempo de retención	Promedio área	Promedio tiempo de retención (min)	C.V. % Tiempo de retención	Relación de áreas	C.V. % área relativa
1	842985.695	3.597	0.081	826793.351	3.585	0.073	1.020	0.450
2	907438.738	3.609	0.029	882866.890	3.596	0.045	1.028	0.168
3	1067209.892	3.605	0.038	1039394.953	3.593	0.049	1.027	0.374
4	892167.440	3.611	0.057	871833.173	3.598	0.081	1.024	0.229
5	814665.427	3.611	0.032	801740.670	3.599	0.029	1.016	0.314
6	860079.308	3.611	0.021	842816.156	3.599	0.027	1.021	0.173
7	1157386.303	3.615	0.051	1131620.035	3.603	0.044	1.023	0.279
8	1043087.256	3.614	0.023	1012521.176	3.602	0.014	1.030	0.698
9	1064591.103	3.621	0.051	1043237.836	3.609	0.054	1.021	0.675
10	1544864.877	3.601	0.021	1537760.037	3.587	0.021	1.005	0.360

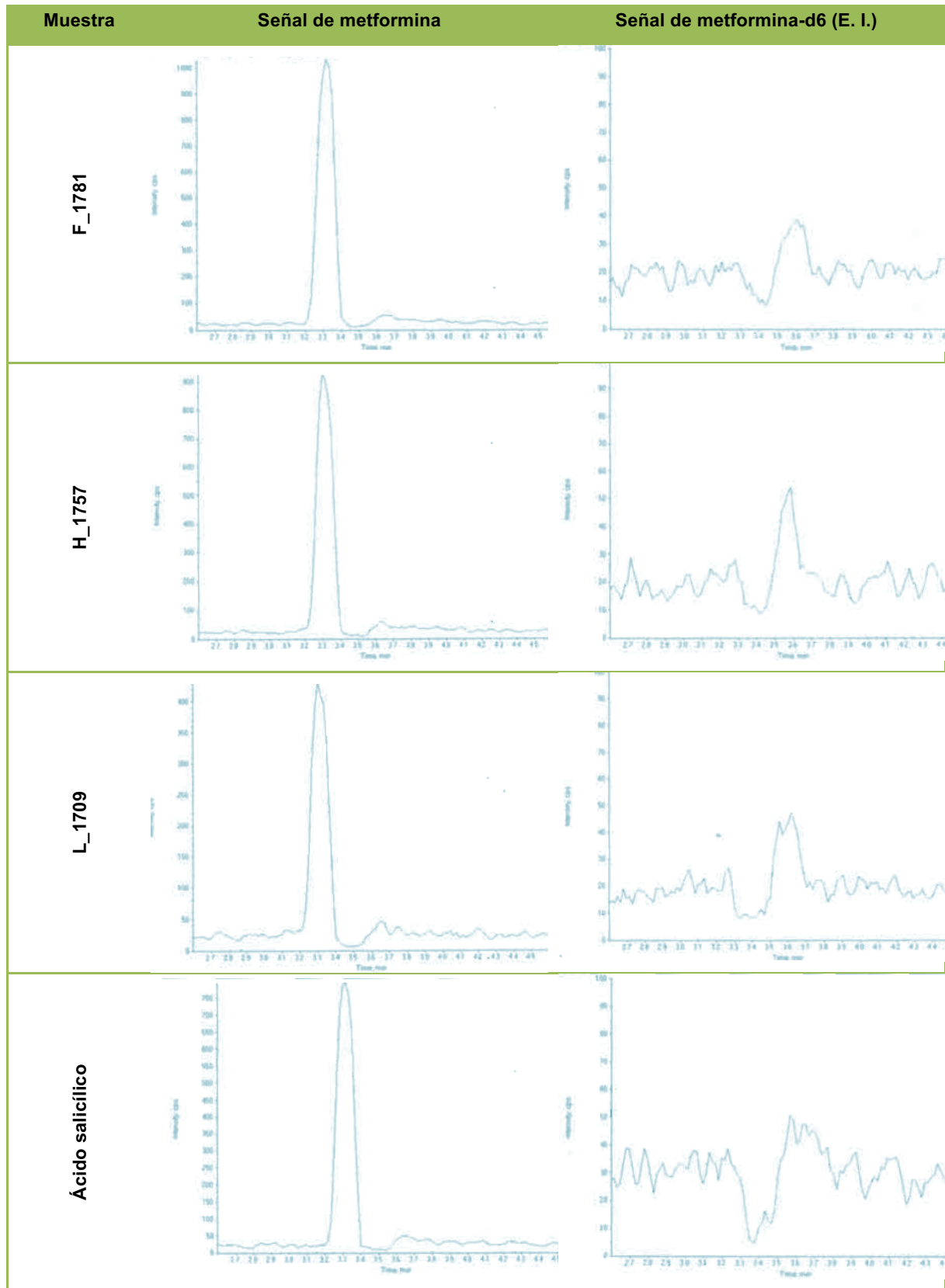
En las corridas analíticas se demostró que los parámetros fundamentales en cromatografía no excedieron el coeficiente de variación mayor al 10 % para la relación de áreas y tiempo de retención un C. V. %  $\leq 2.0$ .

### 5.1.2 Selectividad de la matriz biológica y fármacos de uso común

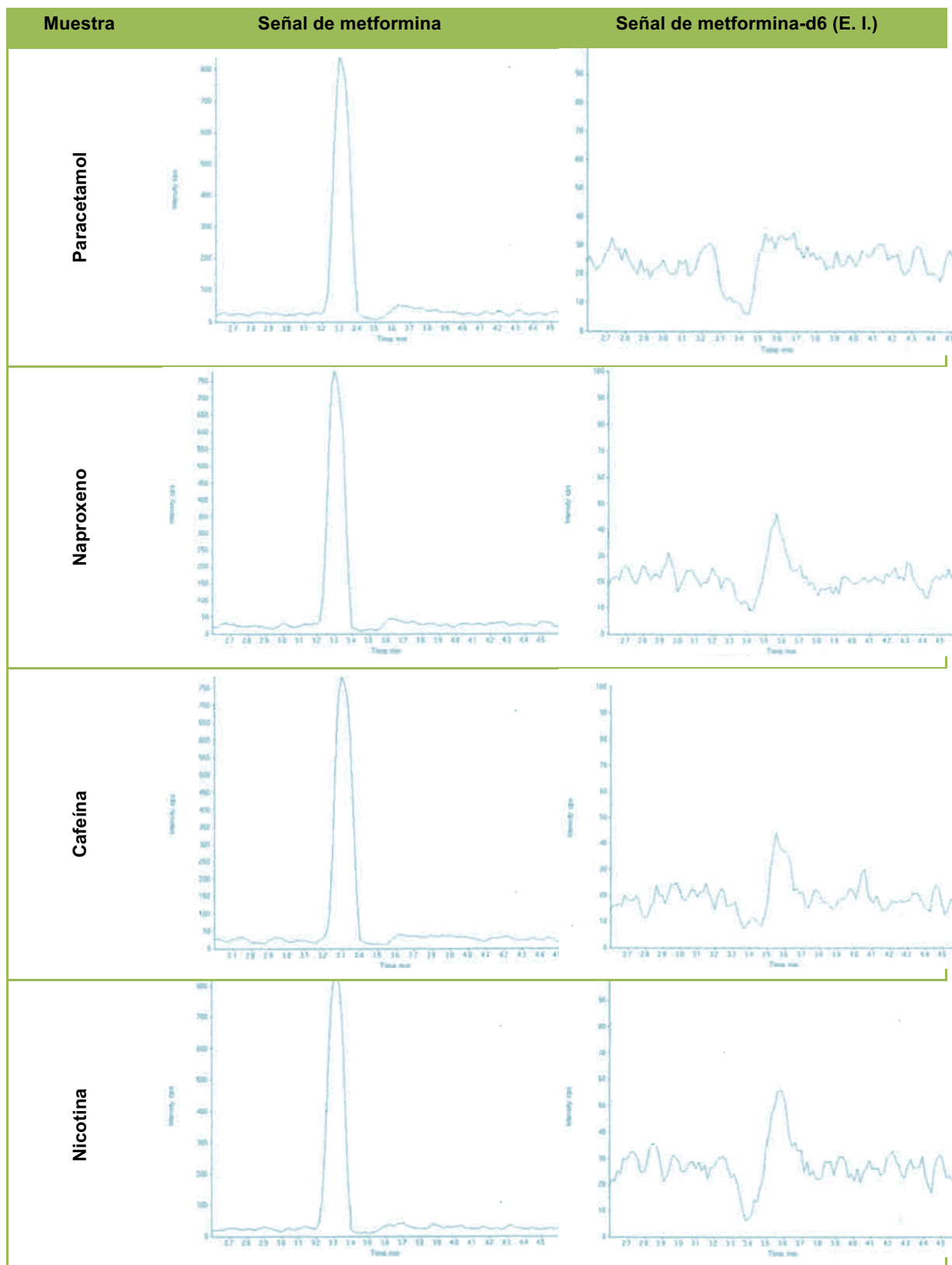
En la figura 11 se muestran los resultados de la prueba de selectividad a la matriz biológica y fármacos de uso común para metformina y metformina d-6 HCl (E. I.), donde se puede observar que el método es selectivo a 6 fuentes distintas, adicionalmente, a plasma lipémico, hemolizado y a fármacos como ácido salicílico, paracetamol, naproxeno, cafeína y nicotina; ya que no presenta interferencias próximas al tiempo de retención de metformina y metformina-d6 (E.I.) o la respuesta fue menor o igual al 20 % respecto al LIC de metformina y menor o igual al 5 % comparada con el E. I. (pico cromatográfico de interés, sombreado).







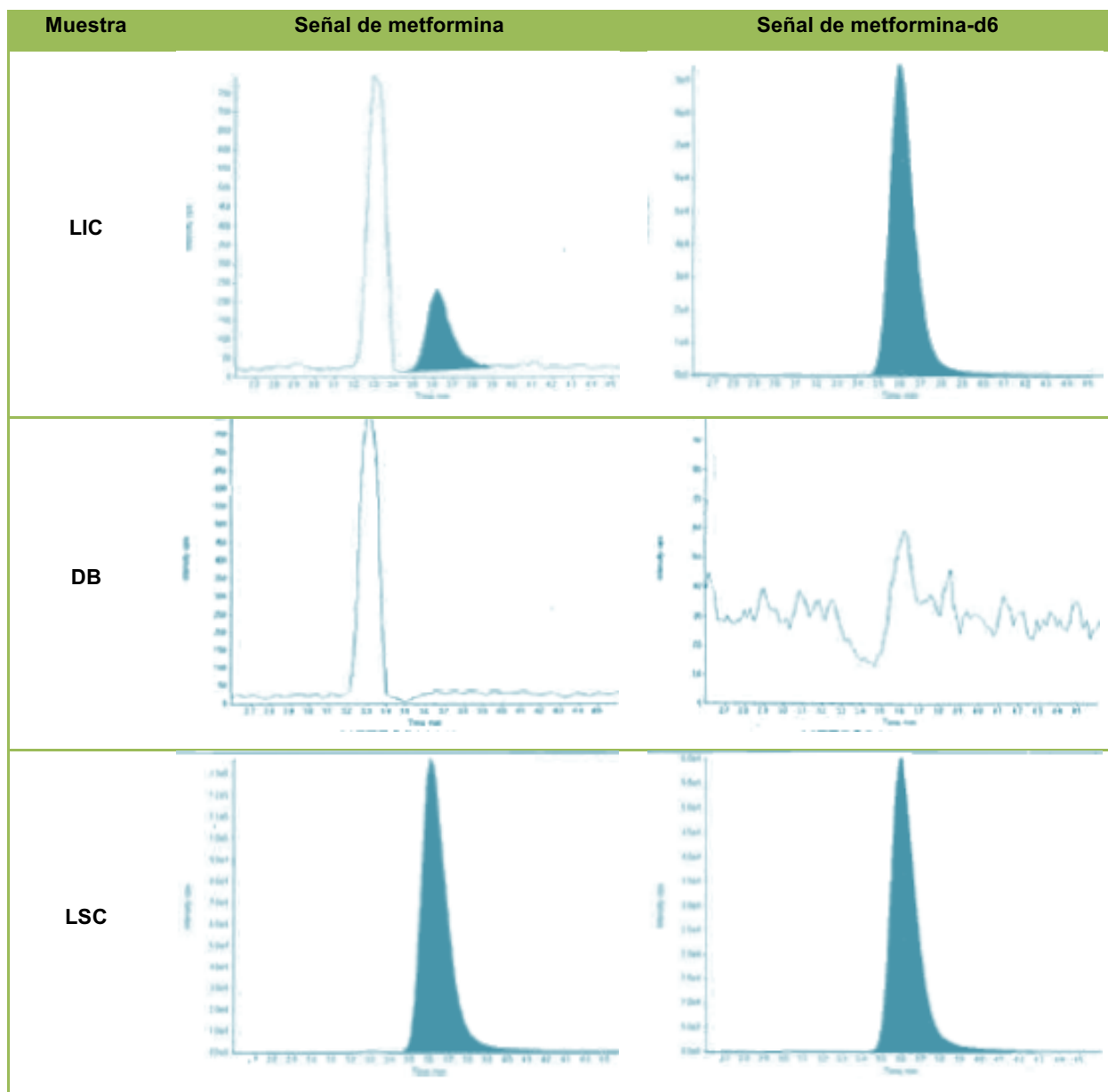


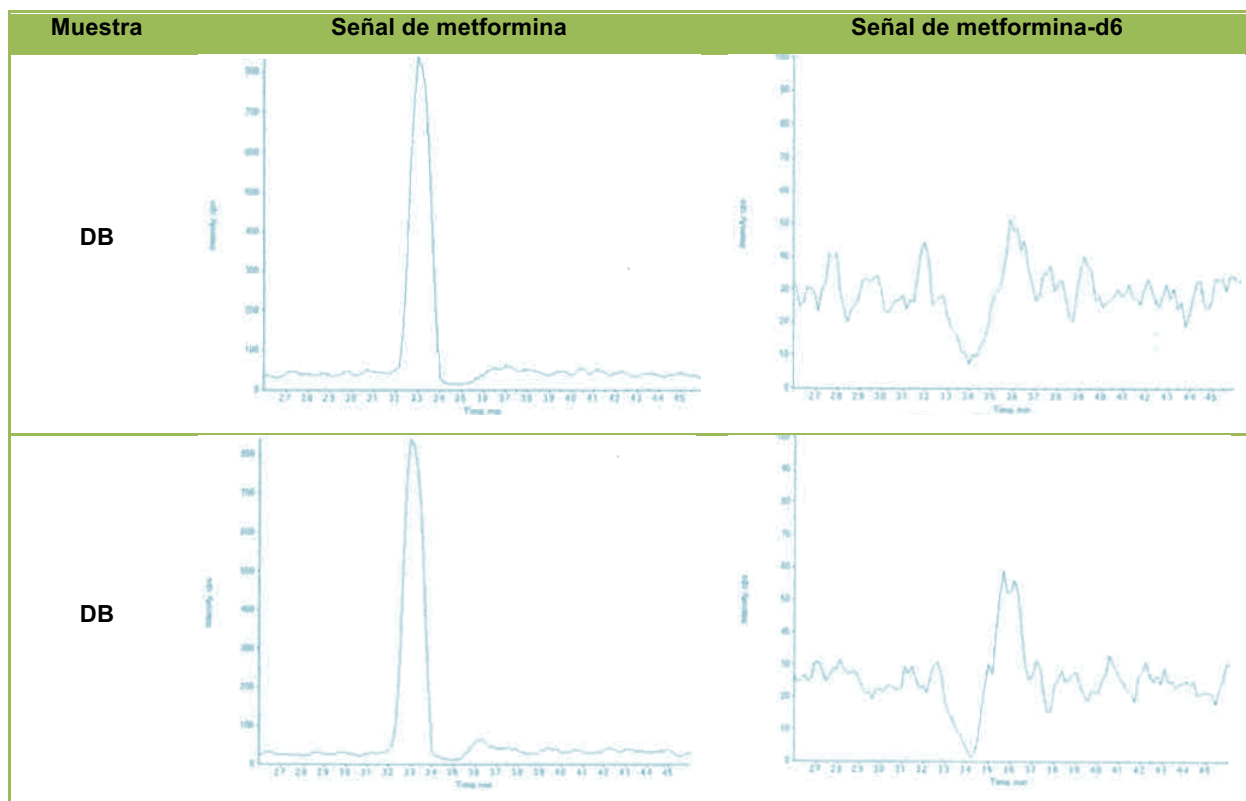


**Figura 11.** Selectividad a la matriz biológica y fármacos de uso común para metformina y metformina-d6 (E. I.)

### 5.1.3 Acarreamiento (Prueba de arrastre)

En la figura 12 se observan los cromatogramas obtenidos en la prueba de arrastre, donde se muestra que no existen interferencias en los picos de interés de las muestras doble blanco para el tiempo de retención del analito y el E.I., al compararlas con muestra del LIC, las cuales no presentaron pico o la respuesta fue menor o igual al 20% respecto al LIC de metformina y menor o igual al 5% comparada con el E.I., e intercalando un LSC (Pico cromatográfico de interés, sombreado).

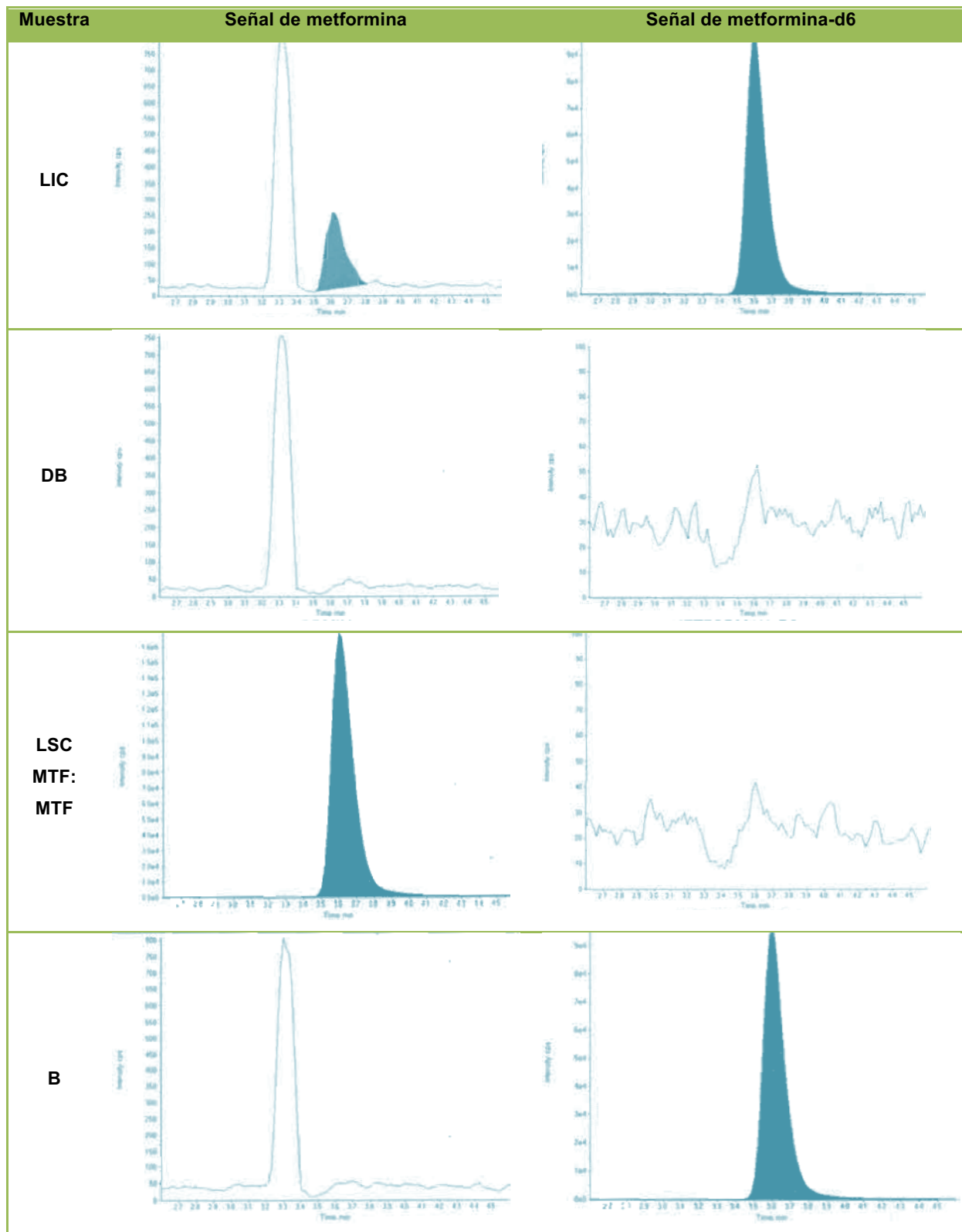




**Figura 12.** Cromatogramas correspondientes a la prueba de arrastre.

#### 5.1.4 Respuesta cruzada

No se observó interferencia en los tiempos de retención de los analitos ausentes en cualquiera de las muestras evaluadas o la respuesta fue menor o igual al 20 % respecto al LIC de metformina y menor o igual al 5 % comparada con el E. I.. Ver figura 13. Por las evaluaciones de selectividad (selectividad a la matriz biológica, a fármacos de uso común, acarreo y respuesta cruzada) se consideró al sistema selectivo para la cuantificación de metformina.



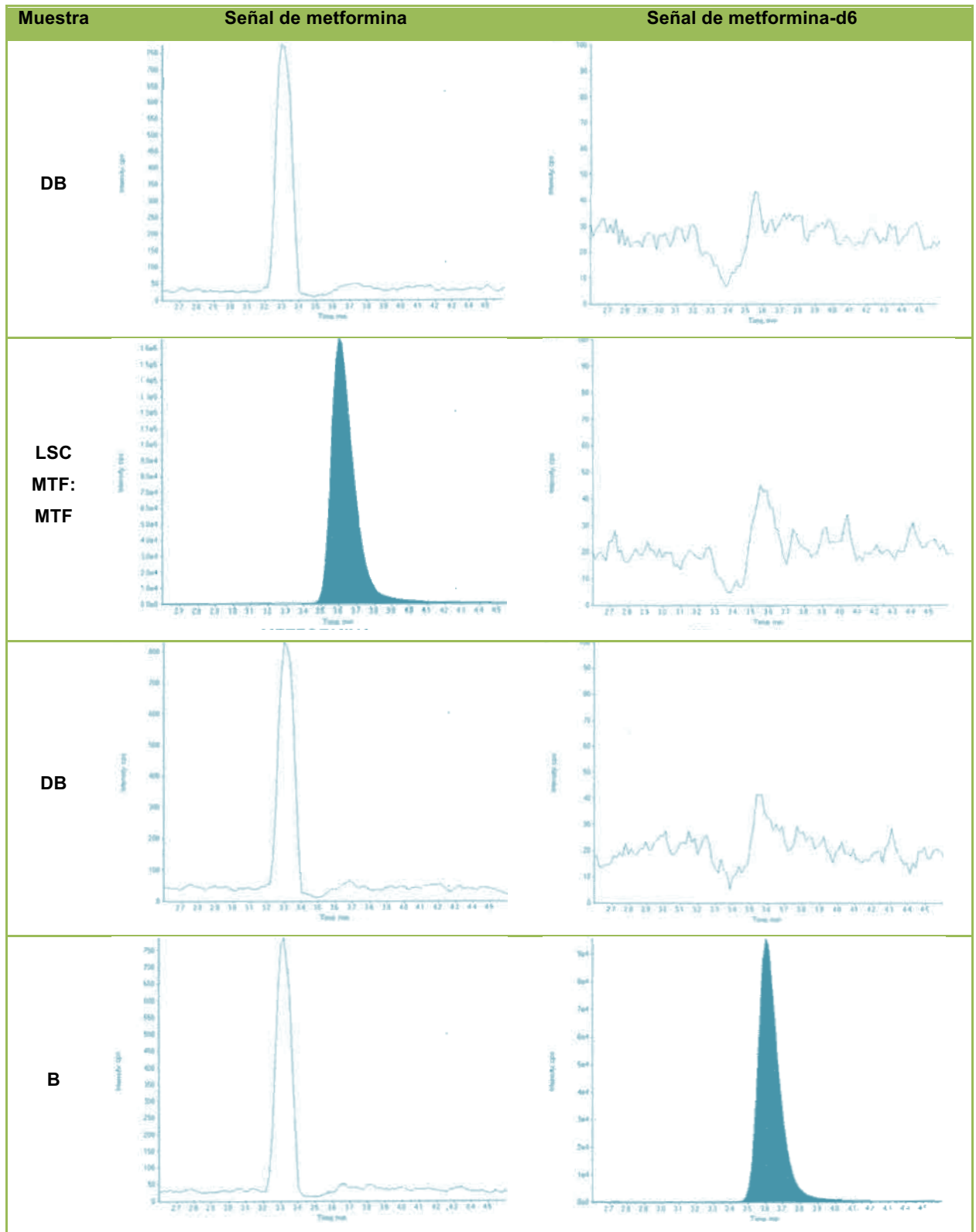


Figura 13. Cromatogramas de la prueba de respuesta cruzada.

### 5.1.5 Linealidad

**Tabla 14.** Relación de ponderación vs  $\Sigma$ ER %

Ponderación	$\Sigma$ ER %
Ninguna	277.892
$1/x$	47.499
$1/x^2$	45.456
$1/y$	47.576

La relación entre la respuesta cromatográfica con respecto a la concentración en la curva de calibración fue ajustado a través de una regresión lineal por mínimos cuadrados a la ecuación  $y = mx + b$ , con ajuste  $1/x^2$  donde:  $y$ : Respuesta analítica (relación de áreas de metformina/metformina-d6 HCl (E. I.) obtenida para su respectiva concentración nominal de metformina.  $x$ : Concentración nominal de metformina.

El método fue lineal ( $1/x^2$ ), ver tabla 14, en el intervalo de concentraciones de 3– 3000 ng/mL, y en los estándares que constituyeron la curva de calibración se dio cumplimiento a la desviación porcentual, (ver tabla 15).

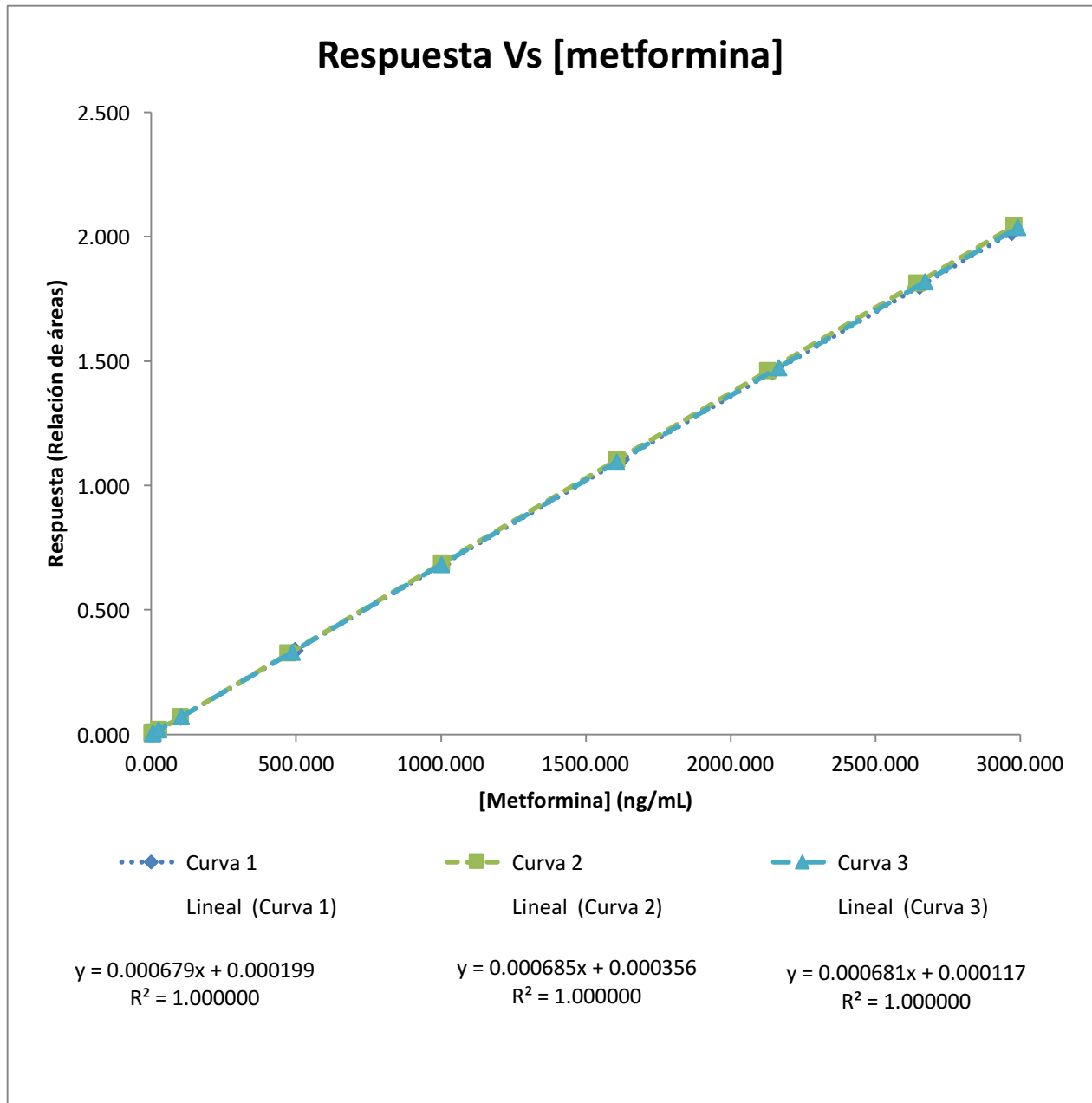
**Tabla 15.** Resultados de las curvas de calibración del método bioanalítico para cuantificar metformina en plasma (concentración recuperada, ng/mL).

Concentración recuperada de metformina (ng/mL)										
Concentración nominal (ng/mL)	2.995	5.989	24.956	99.825	499.124	998.249	1597.198	2146.234	2645.359	2994.746
<b>Curva 1</b>	3.027	5.868	24.773	100.841	494.379	1005.508	1621.846	2144.687	2652.297	2969.523
<b>Curva 2</b>	2.855	6.545	25.064	100.339	472.622	1002.495	1607.487	2129.835	2644.048	2979.706
<b>Curva 3</b>	3.038	5.823	24.682	102.506	485.006	1001.445	1605.504	2164.564	2671.421	2991.193
<b>Promedio</b>	2.973	6.079	24.840	101.229	484.002	1003.149	1611.612	2146.362	2655.922	2980.141
<b>D. E.</b>	0.103	0.404	0.200	1.134	10.913	2.109	8.918	17.425	14.042	10.842
<b>C. V. (%)</b>	3.452	6.654	0.803	1.121	2.255	0.210	0.553	0.812	0.529	0.364
<b>Desv. Abs. (%)</b>	0.723	1.497	0.466	1.406	3.030	0.491	0.902	0.006	0.399	0.488

**Tabla 16.** Parámetros de las curvas de calibración del método bioanalítico para cuantificar metformina en plasma.

	Pendiente	Ordenada	r
<b>Curva 1</b>	0.000679	0.000419	0.9999
<b>Curva 2</b>	0.000685	0.000423	0.9991
<b>Curva 3</b>	0.000681	0.000362	0.9998
<b>Promedio</b>	0.000681667		
<b>D. E.</b>	0.0000031		
<b>C. V. %</b>	0.448		

Los resultados reportados en las tablas anteriores (15 y 16) se obtuvieron de los datos generados por el software Analyst® de Sciex con un ajuste  $1/x^2$ . En la figura 14 se reportan los datos de pendiente (b), ordenada al origen (x) y coeficiente de correlación (r) para las 3 curvas de calibración graficando concentración nominal vs respuesta (relación de áreas) de metformina.



**Figura 14.** Curvas de calibración para cuantificar metformina en plasma.



## 5.1.6 Precisión y exactitud

### 5.1.6.1 Repetibilidad

Los resultados correspondientes a la prueba de precisión y exactitud intradía se reportan en la tabla 17, donde se puede observar que el coeficiente de variación (%CV) y desviación absoluta (Desv. Abs. %) en cada uno de los niveles de concentración evaluados cumplen al presentar valores menores al 15% y menor al 20% para el LIC.

**Tabla 17.** Repetibilidad del método bioanalítico para cuantificar metformina en plasma.

Concentración recuperada de MTF en plasma (ng/mL)						
Muestra	Límite Inferior de Cuantificación (LIC)	Control de Calidad Bajo (CCB)	Control de Calidad Bajo B (CCBB)	Control de Calidad Medio (CCM)	Control de Calidad Alto (CCA)	Control de Calidad Diluido (CCD)
<b>Concentración nominal de MTF (ng/mL)</b>	2.995	8.984	199.650	1497.373	2345.884	3992.994
<b>1</b>	3.560	9.066	206.924	1505.496	2475.608	3955.818
<b>2</b>	3.418	9.374	199.293	1556.558	2435.878	4044.837
<b>3</b>	3.620	8.162	206.964	1541.103	2602.923	4082.165
<b>4</b>	2.857	8.399	204.522	1551.431	2444.936	4097.833
<b>5</b>	2.924	8.893	201.451	1562.338	2431.061	4112.781
<b>Promedio</b>	3.276	8.779	203.831	1543.385	2478.081	4058.687
<b>D. E.</b>	0.360	0.494	3.395	22.574	71.907	62.816
<b>C. V. (%)</b>	10.992	5.622	1.666	1.463	2.902	1.548
<b>Desv. Abs. (%)</b>	9.376	2.284	2.094	3.073	5.635	1.645

### 5.1.6.2 Reproducibilidad

Los resultados correspondientes a la prueba de precisión y exactitud interdía se reportan en la tabla 18, donde se puede observar que el coeficiente de variación (%C.V.) y desviación absoluta (Desv. Abs. %) en cada uno de los niveles de concentración evaluados cumplen al presentar valores menores al 15% y menor al 20% para el LIC.

**Tabla 18.** Reproducibilidad del método bioanalítico para cuantificar metformina en plasma.

Concentración recuperada de MTF en plasma (ng/mL)						
Muestra	LIC	CCB	CCBB	CCM	CCA	CCD
<b>Concentración nominal de MTF (ng/mL)</b>	2.995	8.984	199.650	1497.373	2345.884	3992.994
<b>Día 1</b>	3.560	9.066	206.924	1505.496	2475.608	3955.818
	3.418	9.374	199.293	1556.558	2435.878	4044.837
	3.620	8.162	206.964	1541.103	2602.923	4082.165
	2.857	8.399	204.522	1551.431	2444.936	4097.833
	2.924	8.893	201.451	1562.338	2431.061	4112.781
<b>Día 2</b>	3.149	9.039	201.778	1438.458	2372.675	3943.422
	2.878	8.811	204.166	1457.955	2303.792	3843.727
	3.239	9.771	195.465	1468.124	2388.597	4027.422
	3.376	8.595	211.102	1491.329	2270.647	3761.969
	3.332	8.338	201.904	1500.298	2346.089	3758.133
<b>Día 3</b>	3.213	8.656	196.279	1472.376	2324.414	3830.765
	2.881	8.402	199.266	1471.238	2334.375	4077.909
	2.782	8.872	198.756	1488.780	2344.512	3930.194
	2.682	8.271	206.382	1491.285	2353.859	4020.490
	2.845	9.086	201.287	1481.903	2360.545	3796.499
<b>Promedio</b>	3.117	8.782	202.369	1498.578	2385.994	3952.264
<b>D. E.</b>	0.301	0.445	4.322	37.971	82.280	126.427
<b>C. V. (%)</b>	9.668	5.068	2.136	2.534	3.448	3.199
<b>Desv. Abs. (%)</b>	4.076	2.245	1.362	0.080	1.710	1.020

### 5.1.7 Efecto matriz

En las tablas 19 y 20 se puede observar que la prueba cumplió con especificaciones, ya que metformina y metformina-d6 HCl (E. I.) presentaron un C.V. % del FMN menor al 15%. Ello sugiere que la matriz biológica no interfiere con el proceso de ionización del analito de interés, tal que la precisión del método no se vea afectada.

**Tabla 19.** Evaluación del efecto matriz para la muestra muestras equivalentes al Control de Calidad Bajo (CCB) a una concentración de 8.984 ng/mL.

Evaluación del efecto matriz CCB (8.984 ng/mL)					
Muestras en matriz biológica	Respuesta analítica en la matriz biológica		Respuesta analítica en sistema		
	Respuesta analítica metformina	Respuesta analítica metformina-d6 HCl (E. I.)	Respuesta analítica metformina	Respuesta analítica metformina-d6 HCl (E. I.)	FMN
<b>F-1770</b>	5460.803	806188.267	6597.107	1078211.298	1.107
<b>F-1777</b>	5346.473	790796.382	6247.949	1075025.147	1.163
<b>F-1778</b>	6261.818	944359.228	6264.799	1074771.108	1.138
<b>F-1779</b>	6384.733	957206.676	6504.336	1067272.606	1.094
<b>F-1780</b>	5183.060	748267.851	6368.872	1066071.712	1.159
<b>F-1781</b>	6363.784	889028.063	6847.431	1099286.202	1.149
<b>H-1687</b>	5041.647	781498.269	7060.866	1099057.850	1.004
<b>H-1757</b>	5627.177	875363.363	6912.410	1100160.277	1.023
<b>L-1708</b>	5477.713	844636.350	7000.983	1094765.691	1.014
<b>L-1709</b>	7130.970	883184.243	6805.711	1092580.634	1.296
<b>Promedio</b>					1.115
<b>Desv. Est.</b>					0.088
<b>C. V.%</b>					7.922

**Tabla 20.** Evaluación del efecto matriz para la muestra muestras equivalentes al Control de Calidad Alto (CCA) a una concentración de 2345.884 ng/mL.

Evaluación del efecto matriz CCA (2345.884 ng/mL)					
Muestras en matriz biológica	Respuesta analítica en la matriz biológica		Respuesta analítica en sistema		FMN
	Respuesta analítica metformina	Respuesta analítica metformina-d6 HCl (E. I.)	Respuesta analítica metformina	Respuesta analítica metformina-d6 HCl (E. I.)	
F-1770	1277800.904	727889.591	1320591.686	773503.617	1.028
F-1777	1120531.580	630346.478	1306707.286	768820.403	1.046
F-1778	1294381.927	743958.287	1314981.389	771796.291	1.021
F-1779	1138772.795	645244.818	1309594.509	765281.432	1.031
F-1780	1105679.908	621625.495	1301673.899	765325.253	1.046
F-1781	1224275.633	695442.786	1240156.334	723038.508	1.026
H-1687	1124877.316	645029.365	1241775.501	724837.551	1.018
H-1757	1205756.335	693924.767	1231326.660	719730.149	1.016
L-1708	1103083.758	659755.051	1228770.209	720146.607	0.980
L-1709	1156315.523	694185.270	1230990.079	717127.832	0.970
<b>Promedio</b>					1.018
<b>Desv. Est.</b>					0.025
<b>C. V.%</b>					2.458

## 5.1.8 Estabilidad del analito

### 5.1.8.1 Estabilidad del analito en la matriz biológica

#### 5.1.8.1.1 Estabilidad a corto plazo

En las tablas 21 a 23, se puede observar que las muestras control de calidad almacenadas a temperatura ambiente, en refrigeración y congelación son estables durante al menos 16.0, 15.8 y 99.0 horas, respectivamente, al presentar una desviación absoluta menor a 15% con respecto al valor nominal.

**Tabla 21.** Estabilidad de metformina en plasma a temperatura ambiente (15 – 30°C)  
16.0 horas

Muestra	Concentración recuperada de MTF en plasma (ng/mL)	
	Control de Calidad Bajo (CCB)	Control de Calidad Alto (CCA)
<b>Concentración nominal de MTF (ng/mL)</b>	8.984	2345.884
<b>1</b>	9.853	2402.300
<b>2</b>	8.720	2380.031
<b>3</b>	8.831	2350.626
<b>Promedio</b>	9.135	2377.652
<b>D. E.</b>	0.625	25.919
<b>C. V. (%)</b>	6.837	1.090
<b>Desv. Abs. (%)</b>	1.677	1.354

**Tabla 22.** Estabilidad de metformina en plasma en refrigeración (2-8°C) 15.8 horas

Muestra	Concentración recuperada de MTF en plasma (ng/mL)	
	Control de Calidad Bajo (CCB)	Control de Calidad Alto (CCA)
<b>Concentración esperada de MTF (ng/mL)</b>	8.984	2345.884
<b>1</b>	9.326	2399.063
<b>2</b>	9.059	2407.847
<b>3</b>	9.083	2435.975
<b>Promedio</b>	9.156	2414.295
<b>D. E.</b>	0.148	19.282
<b>C. V. (%)</b>	1.613	0.799
<b>Desv. Abs. (%)</b>	1.915	2.916

**Tabla 23.** Estabilidad de metformina en plasma en congelación (temperatura no mayor a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) 99.0 horas (4.1 días)

Muestra	Concentración recuperada de MTF en plasma (ng/mL)	
	Control de Calidad Bajo (8.984 ng/mL)	Control de Calidad Alto (2345.884 ng/mL)
<b>Concentración esperada de MTF (ng/mL)</b>	8.984	2345.884
<b>1</b>	8.418	2384.209
<b>2</b>	8.306	2394.919
<b>3</b>	10.055	2388.425
<b>Promedio</b>	8.926	2389.184
<b>D. E.</b>	0.979	5.395
<b>C. V. (%)</b>	10.968	0.226
<b>Desv. Abs. (%)</b>	0.642	1.846

#### 5.1.8.1.2 Estabilidad a largo plazo

Se demostró que la estabilidad a largo plazo de metformina en plasma a una temperatura de congelación de  $-70 \pm 10^{\circ}\text{C}$ , cumple con una desviación menor al 15% respecto a la concentración nominal para el promedio de muestras inyectadas a cada nivel de concentración (tabla 24); demostrando la estabilidad a largo plazo durante al menos 120 días.

**Tabla 24.** Estabilidad de metformina en plasma a largo plazo en congelación a  $-70 \pm 10^{\circ}\text{C}$  durante 120 días.

Muestra	Concentración recuperada de MTF en plasma (ng/mL)	
	Control de Calidad Bajo (8.984 ng/mL)	Control de Calidad Alto (2345.884 ng/mL)
<b>Concentración esperada de MTF (ng/mL)</b>	8.984	2345.884
<b>1</b>	8.782	2375.654
<b>2</b>	9.003	2380.006
<b>3</b>	8.830	2378.503
<b>Promedio</b>	8.872	2378.054
<b>D. E.</b>	0.116	2.210
<b>C. V. (%)</b>	1.310	0.093
<b>Desv. Abs. (%)</b>	1.250	1.371

## 5.1.8.2 Estabilidad de la muestra procesada

### 5.1.8.2.1 Estabilidad en el automuestreador

En la tabla 25 y 26 se puede observar que las muestras control de calidad procesadas y almacenadas en el automuestreador a 10 °C fueron estables durante 29.1 y 57.7 horas, al presentar una desviación absoluta menor a 15% con respecto al valor nominal.

**Tabla 25.** Estabilidad de metformina en muestra procesada en automuestreador a 10°C por 29.1 horas, 1.2 días.

Concentración recuperada de MTF en plasma (ng/mL)		
Muestra	Control de Calidad Bajo (CCB)	Control de Calidad Alto (CCA)
<b>Concentración esperada de MTF (ng/mL)</b>	8.984	2345.884
<b>1</b>	9.214	2333.307
<b>2</b>	9.105	2345.670
<b>3</b>	8.883	2352.505
<b>Promedio</b>	9.067	2343.827
<b>D. E.</b>	0.169	9.731
<b>C. V. (%)</b>	1.860	0.415
<b>Desv. Abs. (%)</b>	0.928	0.088

**Tabla 26.** Estabilidad de metformina en muestra procesada en automuestreador a 10°C por 57.7 horas, 2.4 días.

Concentración recuperada de MTF en plasma (ng/mL)		
Muestra	Control de Calidad Bajo (8.984 ng/mL)	Control de Calidad Alto (2345.884 ng/mL)
<b>Concentración esperada de MTF (ng/mL)</b>	8.984	2345.884
<b>1</b>	8.734	2370.879
<b>2</b>	8.928	2329.789
<b>3</b>	8.892	2312.853
<b>Promedio</b>	8.851	2337.840
<b>D. E.</b>	0.103	29.839
<b>C. V. (%)</b>	1.166	1.276
<b>Desv. Abs. (%)</b>	1.477	0.343

### 5.1.8.2.2 Estabilidad en refrigeración

En la tabla 26 se puede observar que las muestras control de calidad procesadas y almacenadas en el refrigerador (2-8°C) son estables durante al menos 23.6 horas, al presentar una desviación absoluta menor al 15% con respecto al valor nominal.

**Tabla 27.** Estabilidad de metformina en muestra procesada en refrigeración (2-8 °C) 23.6 horas (0.98 días).

Concentración recuperada de MTF en plasma (ng/mL)		
Muestra	Control de Calidad Bajo (CCB)	Control de Calidad Alto (CCA)
<b>Concentración esperada de MTF (ng/mL)</b>	8.984	2345.884
<b>1</b>	7.831	2315.707
<b>2</b>	7.843	2369.804
<b>3</b>	8.624	2351.457
<b>Promedio</b>	8.099	2345.656
<b>D. E.</b>	0.454	27.511
<b>C. V. (%)</b>	5.611	1.173
<b>Desv. Abs. (%)</b>	9.847	0.010

### 5.1.8.3 Estabilidad de ciclos de congelación-descongelación.

En la tabla 28 se muestran los resultados de la prueba en donde se puede observar que las muestras control de calidad conteniendo metformina son estables después de haber sido sometidas a cuatro ciclos de congelación-descongelación al presentar una desviación absoluta menor al 15% con respecto al valor nominal.

**Tabla 28.** Estabilidad de metformina a cuatro ciclos de congelación-descongelación (-70°C)

Concentración recuperada de MTF en plasma (ng/mL)		
Muestra	Control de Calidad Bajo (CCB)	Control de Calidad Alto (CCA)
<b>Concentración esperada de MTF (ng/mL)</b>	8.984	2345.884
<b>1</b>	8.930	2387.509
<b>2</b>	9.103	2411.494
<b>3</b>	8.745	2368.062
<b>Promedio</b>	8.926	2389.022
<b>D. E.</b>	0.179	21.755
<b>C. V. (%)</b>	2.006	0.911
<b>Desv. Abs. (%)</b>	0.646	1.839



#### 5.1.8.4 Estabilidad del analito en solución

En las tablas: 29 a 32 se puede observar que la solución de mayor concentración de metformina (100 µg/mL) fue estable a temperatura ambiente (15-30°C) durante 4.9 días, refrigeración (2-8°C) durante 4.9 y 10.9 días, congelación (-70°C) durante 10.9 días al obtenerse una desviación absoluta menor al 10% entre las soluciones para evaluar la estabilidad y las de reciente preparación.

**Tabla 29.** Estabilidad de la solución estándar principal A de metformina (99.825 µg/mL) a temperatura ambiente (15-30 °C) 4.9 días (116.5 horas).

Muestra	Inyección	Área	T. R. (min)
<b>Solución estándar principal de metformina A (99.825 µg/mL) t0</b>	1	1850990.513	3.579
	2	1870677.631	3.577
	3	1871746.306	3.581
<b>Promedio</b>		1864471.483	3.579
<b>D. E.</b>		11687.084	0.002
<b>C. V%</b>		0.627	0.056
Muestra	Inyección	Área	T. R. (min)
<b>Solución estándar principal de metformina A (99.825 µg/mL) 4.9 días (116.5 horas)</b>	1	1841903.353	3.577
	2	1849250.334	3.581
	3	1858915.907	3.579
<b>Promedio</b>		1850023.198	3.579
<b>D. E.</b>		8532.569	0.002
<b>C. V%</b>		0.461	0.056
<b>Desv. Abs. (%)</b>		0.775	0.000

**Tabla 30.** Estabilidad de la solución estándar principal A de metformina (99.825 µg/mL) en refrigeración (2-8°C) 4.9 días (116.5 horas).

Muestra	Inyección	Área	T. R. (min)
Solución estándar principal de metformina A (99.825 µg/mL) t0	1	1987352.192	3.581
	2	1986928.212	3.579
	3	1981986.131	3.578
<b>Promedio</b>		1985422.178	3.579
<b>D. E.</b>		2983.246	0.002
<b>C. V%</b>		0.150	0.043
Muestra	Inyección	Área	T. R. (min)
Solución estándar principal de metformina A (99.825 µg/mL) 4.9 días (116.5 horas)	1	1792917.909	3.581
	2	1796690.926	3.583
	3	1801437.799	3.583
<b>Promedio</b>		1797015.545	3.582
<b>D. E.</b>		4269.211	0.001
<b>C. V%</b>		0.238	0.032
<b>Desv. Abs. (%)</b>		9.489	0.084

**Tabla 31.** Estabilidad de la solución estándar principal A de metformina (99.825 µg/mL) en refrigeración (2-8°C) 10.9 días (262.4 horas).

Muestra	Inyección	Área	T. R. (min)
Solución estándar principal de metformina A (99.825 µg/mL) t0	1	1364807.863	3.605
	2	1359883.990	3.607
	3	1362896.740	3.606
<b>Promedio</b>		1362529.531	3.606
<b>D. E.</b>		2482.391	0.001
<b>C. V%</b>		0.182	0.028
Muestra	Inyección	Área	T. R. (min)
Solución estándar principal de metformina A (99.825 µg/mL) 10.9 días (262.4 horas)	1	1461942.448	3.598
	2	1447868.856	3.596
	3	1459442.011	3.596
<b>Promedio</b>		1456417.772	3.597
<b>D. E.</b>		7508.396	0.001
<b>C. V%</b>		0.516	0.032
<b>Desv. Abs. (%)</b>		6.891	0.259

**Tabla 32.** Estabilidad de la solución estándar principal A de metformina (99.825 µg/mL) en refrigeración (2-8°C) 10.9 días (261.5 horas).

Muestra	Inyección	Área	T. R. (min)
Solución estándar principal de metformina A (99.825 µg/mL) t0	1	1361900.588	3.606
	2	1353109.750	3.608
	3	1352835.080	3.607
<b>Promedio</b>		1355948.473	3.607
<b>D. E.</b>		5156.512	0.001
<b>C. V%</b>		0.380	0.028
Muestra	Inyección	Área	T. R. (min)
Solución estándar principal de metformina A (99.825 µg/mL) 10.9 días (261.5 horas)	1	1399675.674	3.600
	2	1397374.108	3.600
	3	1393987.074	3.600
<b>Promedio</b>		1397012.285	3.600
<b>D. E.</b>		2861.508	0.000
<b>C. V%</b>		0.205	0.000
<b>Desv. Abs. (%)</b>		3.028	0.194

De las tablas 33, 34 y 35 se puede observar que la solución de menor concentración de metformina (0.250 µg/mL) fue estable a temperatura ambiente (15-30°C) durante 4.9 días, refrigeración (2-8°C) por 10.9 días y congelación (-70°C) durante 4.9 días al obtenerse una desviación absoluta menor al 10% entre las soluciones para evaluar la estabilidad y las de reciente preparación.

**Tabla 33.** Estabilidad de la solución estándar de trabajo C de metformina (0.250 µg/mL) a temperatura ambiente (15-30°C) 4.9 días (116.5 horas).

Muestra	Inyección	Área	T. R. (min)
Solución estándar de trabajo de metformina C (0.250 µg/mL) t0	1	1632946.124	3.581
	2	1644017.998	3.581
	3	1638263.041	3.580
<b>Promedio</b>		1638409.054	3.581
<b>D. E.</b>		5537.381	0.001
<b>C. V%</b>		0.338	0.016
Muestra	Inyección	Área	T. R. (min)
Solución estándar de trabajo de metformina C (0.250 µg/mL) 4.9 días (116.5 horas)	1	1589770.993	3.578
	2	1599689.220	3.578
	3	1620984.089	3.576
<b>Promedio</b>		1603481.434	3.577
<b>D. E.</b>		15948.354	0.001
<b>C. V%</b>		0.995	0.032
<b>Desv. Abs. (%)</b>		2.132	0.093

**Tabla 34.** Estabilidad de la solución estándar de trabajo C de metformina (0.250 µg/mL) en refrigeración (2-8°C) 10.9 días (262.4 horas).

	Inyección	Área	T. R. (min)
Solución estándar de trabajo de metformina C (0.250 µg/mL) t0	1	1432461.128	3.598
	2	1425165.079	3.596
	3	1416910.954	3.596
<b>Promedio</b>		1424845.720	3.597
<b>D. E.</b>		7780.005	0.001
<b>C. V%</b>		0.546	0.032
Solución estándar de trabajo de metformina C (0.250 µg/mL) 10.9 días (262.4 horas)	1	1367212.908	3.593
	2	1353779.013	3.593
	3	1350066.997	3.595
<b>Promedio</b>		1357019.639	3.594
<b>D. E.</b>		9020.632	0.001
<b>C. V%</b>		0.665	0.032
<b>Desv. Abs. (%)</b>		4.760	0.083

**Tabla 35.** Estabilidad de la solución estándar de trabajo C de metformina (0.250 µg/mL) en congelación (-70°C) 4.9 días (116.9 horas).

	Inyección	Área	T. R. (min)
<b>Solución estándar de trabajo de metformina C (0.250 µg/mL) t0</b>	1	1648567.313	3.580
	2	1647137.120	3.582
	3	1653582.990	3.583
<b>Promedio</b>		1649762.474	3.582
<b>D. E.</b>		3385.058	0.002
<b>C. V%</b>		0.205	0.043
<b>Solución estándar de trabajo de metformina C (0.250 µg/mL) 4.9 días (116.9 horas)</b>	1	1587080.260	3.577
	2	1588326.058	3.577
	3	1612753.207	3.579
<b>Promedio</b>		1596053.175	3.578
<b>D. E.</b>		14476.060	0.001
<b>C. V%</b>		0.907	0.032
<b>Desv. Abs. (%)</b>		3.256	0.112

## 6 Conclusiones

La optimización del método bioanalítico consistió en la determinación de las condiciones experimentales de análisis por espectrometría de masas aunado a la disminución del LIC del método analítico previamente validado por el Tercero Autorizado. Se adicionó un estándar interno deuteriado a la metodología bajo los requerimientos de la regulación brasileña.

La validación fue realizada en plasma con heparina como anticoagulante, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución, empleando una columna cromatográfica Polaris 5 C18-A 4.6 x 150 mm 5  $\mu\text{m}$  y acoplado a un detector de espectrometría de masas-masas.

A partir de la optimización, se validó el método bioanalítico conforme a los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013 y la RESOLUÇÃO RDC No. 27, de la ANVISA, de manera conjunta. La validación del método incluyó pruebas de selectividad, efecto matriz y acarreamiento; determinación del modelo de regresión con base a la respuesta analítica obtenida evaluado a través del parámetro de curva de calibración en un intervalo de trabajo 3 a 3000 ng/mL, precisión y exactitud, en función de la repetibilidad y la reproducibilidad para cuatro concentraciones de control de calidad; integridad de la dilución y límite inferior de cuantificación. Se realizaron pruebas de estabilidad a corto y largo plazo bajo condiciones de proceso y de análisis, y a 4 ciclos de congelación y descongelación del analito en la matriz biológica, así como la determinación de la estabilidad de las soluciones estándar y de trabajo del analito de interés y su estándar interno.

## 7 Bibliografía

ADA. (2010). *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus* (Vol. 33).

Altagracia-Martínez, M. y cols. (2007). *Diabetes mellitus type 2: Sales of oral hypoglycemic agents and costs of the pharmacological treatments in Mexico*. (Vol. 38). México: Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.

ANVISA. (2012). *RESOLUÇÃO RDC No. 27*. Brasil: Diário Oficial de la Nación.

Arayane M. S. y cols. (2010). *Simultaneous determination of metformin, cimetidine, famotidine, and ranitidine in human serum and dosage formulations using HPLC with UV detection* (9 ed., Vol. 48). Journal Chromatography Sci.

Attimarad, M. y cols. (2014). *Development of a rapid reversed phase-high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of metformin and vildagliptin in formulation and human plasma* (4 ed., Vol. 6). Reino de Arabia Saudi: Journal of Young Pharmacists.

Bonde S. L. y cols. (2013). *A simple and sensitive method for determination of metformin and sitagliptin in human plasma using liquid chromatography and tandem mass spectrometry* (3 ed., Vol. 5). India: International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.

Cañada, P. (2011). *scai Unidad de Espectrometría de Masas*. Recuperado el junio de 2017, de [www.scai.uma.es](http://www.scai.uma.es)

Cheng y cols. (2001). *Determination of metformin in human plasma by high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection* (Vol. 762).

Cocho de Juan, J. A. (2008). Desarrollo de un método por espectrometría de masas en tándem para la determinación de acilcarnitinas y la detección neonatal de alteraciones del metabolismo de ácidos orgánicos y ácidos grasos. Santiago de Compostela, La Coruña, España.

COFEPRIS. (17 de Enero de 2011). Acuerdo por el que se adiciona y modifica la relación de especialidades farmacéuticas susceptibles de incorporarse al Catálogo de Medicamentos Genéricos. *DOF (Diario Oficial de la Federación)* .

De Hoffman, E. (2005). Mass Spectrometry. En *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*.

De Oliveira, D. (2004). *Protocol Assay and Method Validation Report*. Clínica de investigación y Desarrollo Cartesius, Unidad analítica Cartesius. Sao Paulo: Ciudad Universitaria.

Depto de Química Analítica. (Diciembre de 2007). *Administración de Manuales y Documentos de la Facultad de Química*. Recuperado el 21 de marzo de 2016, de [depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos\\_6700.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf)

DRUGBANK. (21 de Septiembre de 2015). *Metformin*. Recuperado el 28 de Enero de 2016, de DrugBank: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00331>

Genaro, A. (2003). *Remington Farmacia* (20a ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.

Graham G. y cols. (2011). *Clinical Pharmacokinetics of Metformin* (Vol. 50).

Grahame-Smith D. G. y Aronson J. K. (2002). *Oxford textbook of clinical pharmacology and drug therapy* (3ra. ed.). Oxford University Press.

Hernández, J. M. (2005). *Cromatografía líquida de alta eficacia* (Vol. 8). Badalona, España.

*Instituto de Salud Pública Chile*. (2010). Recuperado el junio de 2017, de [http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento\\_tecnico/2010/12/Guia%20T%C3%A9cnica%20de%20validaci%C3%B3n%20de%20M%C3%A9todos%20de%20determinaci%C3%B3n%20de%20la%20incertidumbre%20de%20la%20medici%C3%B3n\\_1.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia%20T%C3%A9cnica%20de%20validaci%C3%B3n%20de%20M%C3%A9todos%20de%20determinaci%C3%B3n%20de%20la%20incertidumbre%20de%20la%20medici%C3%B3n_1.pdf)

Jiménez, P, A. (septiembre de 2012). Desarrollo y validación de un método analítico de cromatografía líquida de alta eficacia con detección por espectrometría de masas para



la determinación de antiinflamatorios no esteroideos en leche y tejido muscular de origen animal. *Tesis de máster*. Valencia, España.

Jun Li, y cols. (2007). *Relative Bioavailability and Bioequivalence of Metformin hydrochloride extended-released and immediate-released tablets in healthy Chinese volunteers*. (Vol. 32).

Matuszewski, B. K. (2003). Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 75 (13), 3019-3030.

Mistri, H. Jangid, A. y Shrivastav, P. (2007). *Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of antidiabetic drugs metformin and glyburide in human plasma* (Vol. 45).

OMET. (2016). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición*. Recuperado el 10 de Julio de 2017, de Observatorio Nacional de Enfermedades No transmisibles: <http://oment.uanl.mx/ultimas-cifras-diabetes-en-ensanut-mc-2016/>

OMS. (2002). Régimen alimentario, actividad física y salud. *Resolución WHA55. 23. I*, págs. 30-32. Ginebra: OMS.

OMS. (1998). *Informe sobre la salud en el mundo 1998. La vida en el siglo XXI. Una perspectiva para todos*. Resumen de orientación, Organización Mundial de la Salud, Ginebra.

OMS. (1990). *Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. Informe de un grupo de estudio de la OMS*. Organización Mundial de la Salud. Ginebra: OMS.

Plascencia Villa, G. (junio de 2003). *Instituto de Biotecnología*. Recuperado el 02 de abril de 2016, de [www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Spec\\_Masas.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Spec_Masas.pdf)

Paudel Chhetri, H. y. (2014). Simple HPLC-UV method for the quantification of metformin in human plasma with one step protein precipitation. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 22 (5), 483-487.

Polagani, Srinivasa Rao, y cols. (2013). *Simultaneous determination of atorvastatin, metformin and glimepiride in human plasma by LC-MS/MS and its application to a human pharmacokinetic study* (1 ed., Vol. 3). India: Journal of Pharmaceutical Analysis.

*Provisional BCS Classification*. (s.f.). Recuperado el junio de 2017, de <http://www.tsrlinc.net/results.cfm>

Rang Y Dale. (2012). *Farmacología* (séptima ed.). Barcelona, España: Elsevier.

Secretaría de Salud. (2010). *COFEPRIS*. Recuperado el 19 de mayo de 2016, de <http://www.cofepris.gob.mx/AS/Paginas/Registros%20Sanitarios/RegistroSanitarioMedicamentos.aspx>

Secretaría de Salud. (20 de Septiembre de 2013). NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos. México, Distrito Federal, México: Diario Oficial de la Federación.

Sengupta P. y cols. (2009). *LC-MS-MS Development and Validation for Simultaneous Quantitation of Metformin, Glimepiride and Pioglitazone in Human Plasma and its Application to a Bioequivalence Study*. India.

Setter S. M., y cols. (2003). *Metformin Hydrochloride in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus: A Clinical Review with a Focus on Dual Therapy* (Vol. 25). (I. Excerpta Media, Ed.)

Synder, L. R. (2012). *Practical HPLC Method Development* (2 ed.). Estados Unidos: John Wiley & Sons.

Velázquez B. y cols. (2008). *Farmacología básica y clínica*. Buenos Aires: Médica Panamericana.

Vesterqvist, O. y cols. (1998). *Determination of metformin in plasma by high-performance liquid chromatography after ultrafiltration* (Vol. 716).

WHO. (2016). *Global Report on Diabetes*. Recuperado el 19 de junio de 2017, de <http://www.who.int/diabetes/global-report/en/>.