



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO
PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES
PLASMÁTICOS DE METFORMINA**

T E S I S

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

PRESENTA

PAULA ZELTZIN CARRILLO ROMERO



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 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: M.V.Z. Atonatiu Edmundo Gómez Martínez

Vocal: M. en C. Lauro Misael del Rivero Ramírez

Secretario: Dra. Miriam del Carmen Carrasco Portugal

1er suplente: Luis Alejandro Díaz Flores

2do suplente: Ma. Rosa González Tepale

Sitio donde se desarrolló el tema

Unidad de Investigación en Farmacología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas"

Asesor del tema

Dra. Miriam del Carmen Carrasco Portugal

Supervisor técnico

M. en C. Ariadna Natalia Cervantes Nevárez

Sustentante

Paula Zeltzin Carrillo Romero

Índice

Anexos.....	1
Índice de Tablas.....	1
Índice de Figuras.....	3
Abreviaturas.....	4
1. Resumen.....	6
2. Objetivos.....	7
3. Introducción.....	8
4. Marco Teórico.....	9
4.1 Desarrollo y validación de métodos analíticos.....	9
4.2 Validación de métodos analíticos de acuerdo a diferentes organizaciones.....	11
4.3 Validación del método analítico para la determinación de metformina en plasma.....	12
4.4 Metformina.....	15
4.4.1 Descubrimiento y desarrollo de la Metformina.....	16
4.4.2 Características fisicoquímicas.....	18
4.4.3 Farmacocinética.....	19
4.4.4 Farmacodinamia.....	21
4.4.5 Contraindicaciones actuales para el uso de metformina.....	21
4.4.6 Reacciones adversas.....	22
4.4.1 Estudio de la Metformina.....	23
4.5 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).....	24
4.5.1 Tipos de HPLC.....	25
4.5.2 Instrumentación.....	27
4.5.3 Funcionamiento del cromatógrafo.....	30
4.6 Extracción de fármacos de una matriz biológica.....	32
4.7 Metodología reportada para la determinación de Metformina por HPLC-UV.....	35
5. Metodología.....	36
5.1 Preparación de las soluciones.....	38
5.2 Curva de calibración y muestras control de calidad.....	40

5.3 Proceso de extracción	42
5.4 Desarrollo del método analítico	43
5.5 Protocolo de validación del método analítico	44
6. Resultados	51
6.1 Método analítico.....	51
6.1.1. Condiciones Cromatográficas	51
6.2 Validación del método analítico	52
7. Discusión	71
8. Conclusión	77
9. Bibliografía.....	78

Índice de tablas

- Tabla 1. Desarrollo de la metformina a partir de la planta *Galega officinalis*.
- Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del clorhidrato de metformina.
- Tabla 3. Parámetros farmacocinéticos.
- Tabla 4. Concentraciones máximas reportadas.
- Tabla 5. Métodos reportados para la cuantificación de metformina por HPLC-UV.
- Tabla 6. Preparación de las soluciones.
- Tabla 7. Preparación de la curva de calibración y muestras control.
- Tabla 8. Condiciones cromatográficas del desarrollo del método analítico.
- Tabla 9. Condiciones cromatográficas finales del método analítico.
- Tabla 10. Adecuabilidad del sistema.
- Tabla 11. Límite inferior de cuantificación del método analítico.
- Tabla 12. Curva de calibración 1
- Tabla 13. Curva de calibración 2
- Tabla 14. Curva de Calibración 3
- Tabla 15. Curva de calibración promedio.
- Tabla 16. Identidad de la recta.
- Tabla 17. Prueba de repetibilidad del método analítico.
- Tabla 18. Prueba de reproducibilidad y exactitud del método analítico.
- Tabla 19. Estabilidad a corto plazo.
- Tabla 20. Estabilidad a largo plazo.
- Tabla 21. Estabilidad a 4°C.
- Tabla 22. Estabilidad a temperatura ambiente.
- Tabla 23. Estabilidad en el automuestreador.
- Tabla 24. Estabilidad a tres tiempos de congelación-descongelación.
- Tabla 25. Estabilidad en solución.
- Tabla 26. Prueba de recobro del método analítico.

Tabla 27. Prueba de efecto de dilución del método analítico.

Tabla 28. Prueba de tolerancia del método analítico a cambio de pH de 6.7.

Tabla 29. Prueba de tolerancia del método analítico a cambio de pH de 7.3.

Tabla 30. Condiciones de estabilidad experimental.

Tabla 31. Condiciones de estabilidad reportadas en la literatura.

Índice de Figuras

Figura 1. Desarrollo de un método analítico.

Figura 2. Estructura química de la guanidina.

Figura 3. Estructura química del clorhidrato de metformina.

Figura 4. Fundamento de la cromatografía líquida.

Figura 5. Instrumentación y operación del HPLC.

Figura 6. Instrumentación y detección de la respuesta del HPLC.

Figura 7. Fundamento de la extracción líquido-sólido.

Figura 8. Proceso de extracción.

Figura 9. Adecuabilidad del sistema.

Figura 10. Selectividad, blanco de plasma y de reactivo.

Figura 11. Selectividad, cafeína y acetaminofén.

Figura 12. Selectividad, plasma hemolizado y lipémico.

Figura 13. Selectividad, heparina y EDTA.

Figura 14. Cromatograma representativo de la curva de calibración del método analítico para la cuantificación de metformina.

Figura 15. Curva de calibración promedio.

Figura 16. Identidad de la recta.

Figura 17. Tolerancia del método analítico.

Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
ADQ	Adecuabilidad
BR	Blanco de reactivo
BP	Blanco de plasma
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
cm	Centímetro
C.V.	Coefficiente de Variación
C _{máx}	Concentración máxima
MCB	Muestra Control Bajo
MCM	Muestra Control Medio
MCA	Muestra Control Alto
D.E.	Desviación estándar
dL	Decilitro
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
E.U.A.	Estados Unidos de América
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
h	Horas
LC	Límite de cuantificación
λ	Longitud de onda
min	Minutos
mm	Milímetro
mL	Mililitro
M	Molaridad
ng	Nanogramo
NOM	Norma Oficial Mexicana
ppb	Partes por Billón
RPM	Revoluciones por minuto
SDS	Sodium Dodecil Sulfatum
T _{máx}	Tiempo de concentración máxima

$t_{1/2}$	Tiempo de vida media
UV	Ultravioleta
μg	Microgramos
μL	Microlítros
μm	Micrómetros
%v/v	Porcentaje volumen/volumen
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
FDA	Food and Drug Administration
ICH	International Conference on Harmonisation
EMA	European Medicines Agency

1. Resumen

Para la realización de los estudios de farmacocinética y biodisponibilidad es necesario contar con métodos validados para cuantificar adecuadamente los fármacos en fluidos biológicos. La validación, es la evidencia experimental documentada de que un método cumple con el propósito para el que fue diseñado.

Por esta razón, en el presente trabajo, se desarrolló y se validó un método analítico para la determinación de los niveles plasmáticos de metformina, el estudio se realizó en la Unidad de Investigación en Farmacología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas", basado en lo descrito en la Norma NOM-177-SSA1-2013.

Se utilizó la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), empleando una columna fase normal, Resolve Silica (5 μm , 150 mm x 3.9 mm) y un filtro en línea. La fase móvil estuvo compuesta por $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10 mM; pH 7.0: ACN, en proporción 80:20 (%v/v) con una velocidad de flujo de 1 mL/min, a una longitud de onda de 234 nm. El volumen de inyección de la muestra fue de 20 μL .

El método fue validado en el intervalo de 50 ng/mL–1500 ng/mL, cumplió con los criterios de evaluación de los parámetros de selectividad, límite de cuantificación, curva de calibración, precisión, exactitud, estabilidad y efecto de dilución. Así mismo se realizaron las pruebas para la determinación del recobro y tolerancia del método analítico.

El método cumple con los requerimientos de la NOM-177-SSA1-2013, y puede ser utilizado para estudios farmacocinéticos, de monitoreo terapéutico, de bioequivalencia o en cualquier estudio en el que se requiera determinar las concentraciones de metformina en plasma aplicado en adultos.

2. Objetivos

- Objetivo general

Desarrollar y validar un método analítico para determinar los niveles plasmáticos de metformina de muestras biológicas para su aplicación en estudios farmacocinéticos, de monitoreo terapéutico o de bioequivalencia en adultos como población de estudio.

- Objetivos particulares

Establecer las condiciones cromatográficas para la cuantificación de metformina en plasma.

Desarrollar un método de extracción de la metformina en plasma.

Validar el método analítico para la determinación de metformina en plasma.

3. Introducción

El desarrollo de métodos para analizar sustancias y productos farmacéuticos terminados es crucial para asegurar la calidad del producto o para la realización de estudios farmacológicos.

En estudios farmacocinéticos y de biodisponibilidad es necesario contar con métodos validados para cuantificar las concentraciones de fármacos o sus metabolitos, comúnmente denominados analitos en fluidos biológicos.

Los métodos utilizados en un laboratorio de análisis químico han de ser evaluados para asegurar que cumplen con el propósito para el que son diseñados.¹

Todos los métodos a desarrollar en un laboratorio deben estar documentados, y los analistas que los vayan a utilizar deben recibir la capacitación adecuada y demostrar la competencia en su utilización antes de empezar a actuar en casos concretos.¹

El funcionamiento de los instrumentos y del equipo de laboratorio, son parte fundamental de los métodos para determinar analitos en muestras, ya que estos con el tiempo pueden presentar defectos por fluctuaciones del entorno y por lo tanto pueden pasar desapercibidos e inducir errores en los resultados, por lo que es necesario que el equipo esté calibrado y calificado.¹

4.1 Desarrollo y validación de métodos analíticos

Un método analítico es la descripción de la secuencia de actividades y de los parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico (analito) de una muestra.²

En la Figura 1, se muestra la forma indicativa para el desarrollo de un método analítico de un analito de interés.³

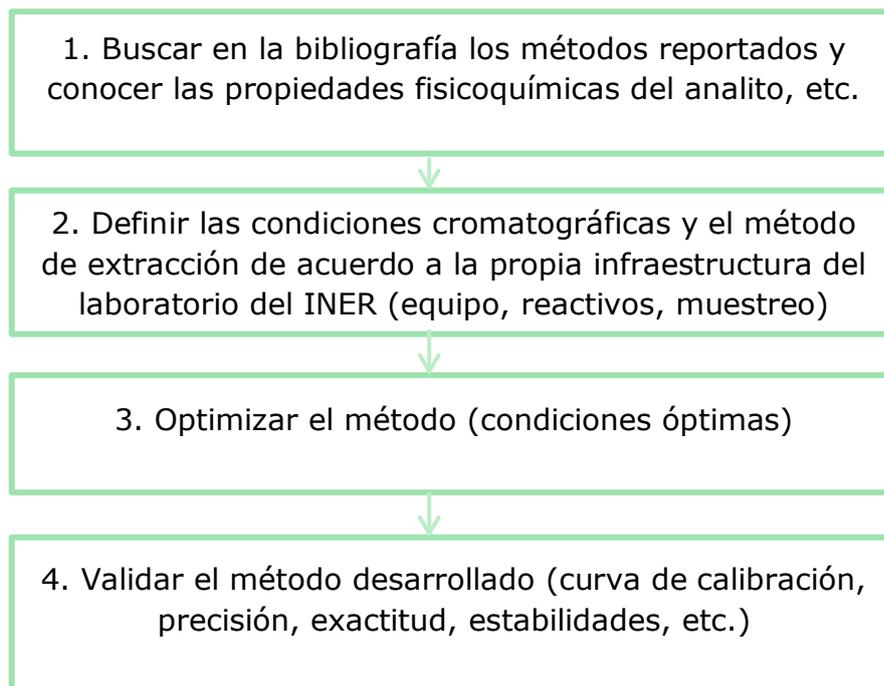


Figura 1. Desarrollo del Método

Una vez desarrollado el método analítico, este debe ser evaluado y sometido a pruebas para asegurar que produce resultados confiables y consistentes¹, por medio de un fundamento estadístico, a lo cual se le denomina validación.

La validación es el proceso con el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.² La validación de un método se debe realizar de acuerdo a un protocolo, que incluya las características de desempeño analítico a evaluar.⁴

Antes de iniciar la validación se debe tener claridad de cuáles son los requerimientos del método para establecer el alcance de la validación.

Se debe conocer, entonces, el método a validar y su aplicación, es decir, el analito, su concentración y la matriz (o matrices) que se van a utilizar y para que fines se utilizarán las mediciones.

La validación se debe realizar de acuerdo a un protocolo, que incluya las características de desempeño del analítico a evaluar.⁴

Al obtener métodos analíticos validados para cuantificar un analito en fluidos biológicos, estos pueden ser empleados para realizar estudios farmacocinéticos, de monitorización terapéutica y estudios de bioequivalencia, entre otros.⁵

Los responsables del desarrollo de la validación de un método analítico, deben de realizar las siguientes actividades:

a) Establecer un plan de validación, este debe ser un protocolo en el cual se definen las pruebas o parámetros de validación necesarios y el diseño experimental a desarrollar en base a los requerimientos del método.⁶

El protocolo debe contener:

- Alcance de la validación (método, analito, matrices y requerimientos del método, intervalo de concentración requeridos, entre otros.)⁶
- Diseño experimental:
 - Establecer las muestras a ser analizadas, los reactivos de referencia, el material, etc.
 - Los parámetros y pruebas a desarrollar.
- Materiales, instrumentación y equipos para desarrollar la validación.⁶

- Responsable de la validación, fecha o tiempo programado para realizar la validación y fecha de elaboración del plan.⁶

b) Desarrollar las pruebas de los parámetros de la validación:

Deben conocer el procedimiento del método de ensayo y el número de ensayos o mediciones a realizar de acuerdo a lo establecido en el plan de verificación.⁶

También deben de realizar los cálculos matemáticos, comparativos y/o estadísticos correspondientes a cada ensayo para lo cual se puede utilizar un software estadístico, calculadora o una planilla de cálculo.⁶

c) Evaluar resultados de la validación

Evaluar para cada parámetro de validación, si los resultados de las pruebas son satisfactorios, es decir, si cumplen con los criterios de aceptación establecidos en el plan, se considera que el método cumple con el fin para el que fue diseñado.⁶

d) Realizar el informe de validación

Realizar un informe en el cual se presenten los resultados obtenidos y conclusiones. El informe debe contener la declaración de la aplicabilidad del método.⁶

4.2 Validación de métodos analíticos de acuerdo a diferentes organizaciones.

Existen diferentes organizaciones que tienen distintos formatos para la elaboración de la validación de métodos analíticos, sin embargo, todos poseen un fin común, que es asegurar que los métodos cumplan con el propósito para el que son diseñados.

Entre estas guías para validar métodos se encuentran:

- Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1).⁷
- Guideline on Bioanalytical Method Validation. EMA.⁸
- Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. Guidance for industry. FDA.^{9, 10}
- Validation of compendial methods-verification of compendial methods (USP).¹¹
- 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 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.¹²

4.3 Validación del método analítico para la determinación de metformina en plasma.

La validación para la determinación de metformina en plasma que se describe en la presente tesis se realizó de acuerdo a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana, NOM-177-SSA1-2013.¹²

Para realizar la parte experimental correspondiente se deben conocer los siguientes conceptos.

- Corrida analítica

Conjunto de muestras analizadas en forma continua, bajo las mismas condiciones experimentales.¹²

- Intervalo de trabajo

Intervalo de un método analítico definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior del compuesto, en

el cual se ha demostrado que el método cumple con la curva de calibración, es preciso y exacto.¹²

- Muestras control

Muestras de matriz adicionada con el analito en concentración específica usada para validar y monitorear el desempeño de un método analítico.¹²

- Curva de calibración

Conjunto de concentraciones que describen el intervalo en el cual se cuantifica el compuesto por analizar.¹²

- Blanco de plasma

Muestra procesada sin la adición del analito.¹²

- Blanco de reactivo

Disolvente procesado sin la adición del analito.²

- Adecuabilidad

Verificación de que el sistema opera con base a criterios que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.²

Los parámetros de la validación que se deben evaluar a efecto de esta norma son:

- Selectividad
- Curva de calibración
- Precisión
 - Repetibilidad
 - Reproducibilidad
- Exactitud
- Límite de cuantificación
- Estabilidad

- Efecto de dilución

A continuación, se presentan las definiciones de estos parámetros.

- Selectividad

Capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos en la muestra.¹²

- Precisión

Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea; se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.¹²

- Repetibilidad

Precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo.¹²

- Reproducibilidad intralaboratorio

Precisión bajo las variaciones que comúnmente pueden ocurrir dentro del laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos.¹²

- Exactitud

Concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.¹²

- Límite inferior de cuantificación de la curva de calibración

Concentración más baja del analito que puede medirse cumpliendo con la precisión y exactitud, determinada en función de las necesidades de cuantificación del estudio.¹²

- Estabilidad

Es la característica de una muestra y/o solución de referencia, preparadas para su cuantificación, de mantener su integridad fisicoquímica y concentración del analito después de exponerla a ciertas condiciones durante un tiempo determinado.¹²

- Estabilidad a largo plazo

Propiedad del compuesto por analizar en una matriz biológica, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta el análisis de todas las muestras así como reanálisis (en caso de realizarse este último).¹²

- Efecto de dilución

Capacidad del método, para cuantificar una muestra a la que se le reduce su concentración.¹³

- Recobro

Es la comparación entre la respuesta obtenida después de la extracción del analito presente en la matriz biológica y la respuesta del analito en el disolvente empleado.¹⁰

4.4 Metformina

La metformina, es un fármaco que se utiliza para ayudar al control de los niveles de glucosa sanguínea en las personas con Diabetes Mellitus Tipo 2.¹⁴

No está relacionada químicamente o farmacológicamente con otras clases de agentes antihipoglucemiantes orales. En oposición a las sulfonilureas, la metformina no produce hipoglucemia en pacientes con DM2 o en sujetos normales.¹⁴

La metformina actúa mediante la inhibición de la producción de glucosa hepática, reduciendo la absorción de la glucosa intestinal. Sin afectar la secreción de insulina.^{14, 16}

Además de reducir el nivel de glucosa en la sangre, la metformina puede tener beneficios adicionales para la salud, incluyendo la reducción de peso, reducción de los niveles de lípidos en plasma, y la prevención de algunas complicaciones vasculares.¹⁴

4.4.1 Descubrimiento y desarrollo de la Metformina

La metformina tiene su origen en la planta *Galega officinalis* conocida desde hace siglos por reducir los efectos de la diabetes. Fue utilizada en Europa desde la Edad Media como un tratamiento popular para la poliuria del diabético.¹⁶

A fines del siglo XVIII se descubrió el componente químico responsable del efecto hipoglucemiante de la planta, denominado galegina, derivado de la guanidina^{16, 17}.

La guanidina es un compuesto orgánico que se encuentra en la orina y que en la actualidad se emplea en la fabricación de plásticos y explosivos, su estructura química se muestra en la Figura 2.¹⁸

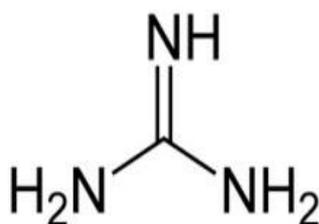


Figura 2. Estructura química de la guanidina

En el año 1917 se estudió el efecto de la guanidina en conejos y el científico C. K. Watanabe comprobó que esta era tóxica pero tenía actividad hipoglucémica. Posteriormente, E. Frank y colaboradores sintetizaron una serie de análogos de la guanidina y llegaron a la conclusión que las moléculas que contenía dos guanidinas en la misma estructura (conocidas como biguanidas) tenían mayor poder hipoglucémico y menor toxicidad en animales.¹⁸

En la Tabla 1, se presentan los sucesos históricos que permitieron el desarrollo de la metformina hasta su presentación farmacéutica en la actualidad.¹⁹

Tabla 1. Desarrollo de la metformina a partir de la planta *Galega officinalis*.

Año	Evento en el desarrollo del fármaco
A fines de 1800	<i>Galega officinalis</i> , rica en guanidina
1918	La guanidina disminuye la glucosa en sangre de animales
1920	Se descubre que la guanidina es tóxica, pero su isómero guanidina isoamileno es menos tóxica
1920-principios de 1930	Es sintetizada la Synthalin A (biguanida decametilendimetacrilato) y la Synthalin B (biguanida dodecametileno)
1929	El Flumamine (dimetilbiguanida) se usa para el tratamiento de la gripe en Filipinas. El farmacólogo clínico, Jean Sterne, en Francia investiga el efecto reductor de la glucosa
1957	Sterne publica un artículo sobre las propiedades reductoras de la dimetilbiguanida sobre la glucosa
1958	La metformina sale al mercado en Reino Unido
1957-1958	Se informa de los ensayos clínicos de las biguanidas fenformina y buformina

1970	La fenformina y buformina son retirados del mercado debido a su asociación con acidosis láctica
1972	La metformina sale al mercado en Canadá
1995	La metformina sale al mercado en E.U.A.
2004	Se fabrican tabletas de metformina de liberación prolongada
2016	Se fabrican tabletas de metformina de liberación retardada

4.4.2 Características fisicoquímicas

Químicamente, el clorhidrato de metformina es N,n-dimetilimidocarbonimidina hidrocloreuro. La estructura química se muestra en la Figura 3.¹⁵

La metformina es una molécula pequeña altamente polar, que posee una gran solubilidad en agua. Es una base hidrófila que existe a pH fisiológico como la especie catiónica (> 99,9%).^{15, 20}

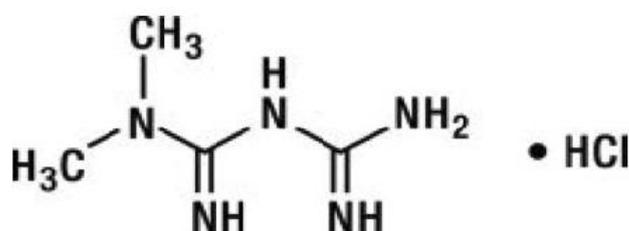


Figura 3. Estructura química del clorhidrato de metformina

Las propiedades fisicoquímicas que posee esta molécula se indican en la Tabla 2.²¹

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del clorhidrato de metformina.

Propiedad	Valor
Fórmula química condensada	C ₄ H ₁₁ N ₅
Peso molecular metformina (g/mol)	129.16
Peso molecular clorhidrato de metformina (g/mol)	165.63
Estado	Sólido
Punto de fusión (°C)	223-226
Solubilidad en agua (mg/mL)	1.38
logP	-0.5
pKa	12.4

4.4.3 Farmacocinética

La farmacocinética de la metformina muestra una gran variabilidad interindividual, misma que se observa por las diferencias en la concentración plasmática en el estado estacionario alcanzando concentraciones de 54 a 4133 ng/mL.¹⁶

La unión de la metformina a proteínas plasmáticas es prácticamente nula, y no se metaboliza.²¹

Estudios de dosis única por vía intravenosa en sujetos sanos demuestran que la metformina se excreta sin cambios en la orina y no sufre metabolismo hepático (no se han identificado metabolitos en los seres humanos), ni excreción biliar. Aproximadamente el 90% del fármaco se elimina de manera inalterada en 24 h en sujetos sanos.²¹

En la Tabla 3, se indican los parámetros farmacocinéticos correspondientes a este fármaco.²²

Tabla 3. Parámetros farmacocinéticos.

Parámetro	Valor
Absorción	1 a 3 h, pudiendo llegar hasta 6 h
Biodisponibilidad	50 – 60%
$C_{m\acute{a}x}$ con 500 mg (Dosis única. Liberación inmediata. En pacientes adultos sanos) ²³	(1030 ± 330)ng/mL*
$T_{m\acute{a}x}$	2.1 – 3 h
$t_{1/2}$ plasmática	1.5 a 6.2 h **
$t_{1/2}$ sanguínea	17 a 17.6 h
Volumen de distribución	9.9 L
Excreción	Renal 90%
Duración acción	3 a 4 semanas
$t_{1/2}$ Eliminación media	4 a 8 h

*La administración de dosis en el rango de 0.5 g y 1.5 g presenta relación inversa entre dosis ingerida y absorción, lo que supone la existencia de un proceso de absorción activo y saturable.

**La diferencia entre $t_{1/2}$ plasmática (1.5 a 6.2 h) y $t_{1/2}$ sanguínea (17.6 h), sugiere que la metformina se distribuye dentro de los eritrocitos.

Tabla 4. Concentración máxima reportada en la literatura.

Grupos de estudio, Tabletas de Clorhidrato de metformina	$C_{m\acute{a}x}$ (µg/mL)
Adultos sanos 500 mg dosis única	1.03 (±0.33)
850 mg dosis única	1.60 (±0.38)
850 mg tres veces diarias (19 dosis)	2.01 (±0.42)
Adultos con DM2 850 mg dosis única	1.48 (±0.50)
850 mg tres veces diarias (19 dosis)	1.90 (±0.62)

4.4.4 Farmacodinamia

La metformina puede actuar a través de tres mecanismos:

- Por medio de la reducción de la producción hepática de glucosa mediante la inhibición de la gluconeogénesis y la glucogenólisis.²⁴
- A nivel muscular, aumentando la sensibilidad a la insulina, favoreciendo la captación y la utilización periférica de la glucosa.²⁴
- Retraso de la absorción intestinal de la glucosa.²⁴

La metformina estimula la síntesis de glucógeno actuando sobre la glucógeno sintetasa. Aumenta la capacidad de transporte de todos los tipos de transportadores de glucosa de membrana (GLUT, por sus siglas en inglés) conocidos hasta el momento.²⁴

Efecto en el hígado

La metformina mejora la hiperglicemia sobre todo a través de la inhibición de la producción hepática de glucosa, es decir, la gluconeogénesis hepática. La metformina activa la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK, por sus siglas en inglés), una enzima hepática que desempeña un papel importante en la señalización de la vía de la insulina, el manejo energético del cuerpo entero y el metabolismo de la glucosa y las grasas. La activación de la AMP es necesaria para el efecto inhibitorio de la metformina sobre la producción de glucosa por las células hepáticas.²¹

4.4.5 Contraindicaciones actuales para el uso de metformina

- Hipersensibilidad a la metformina.²⁵
- Desestabilización severa de la Diabetes (cetoacidosis o pre-coma).²⁵
- Insuficiencia renal o disfunción renal (nivel de creatinina en suero ≥ 1.5 mg/dL en hombres y ≥ 1.4 mg/dL en mujeres).²⁵

- Después de un examen de rayos X que involucre el uso de contrastes ionizados.²⁵
- Enfermedades que puedan causar falta de oxígeno a tejidos (falla cardíaca, infarto reciente al miocardio, insuficiencia respiratoria).²⁵
- Insuficiencia hepática.²⁵
- Diarrea persistente o severa, vómitos recurrentes.²⁵
- Consumo excesivo de alcohol.²⁵
- Embarazo.²⁵
- Acidosis metabólica aguda o crónica.²⁵

4.4.6 Reacciones adversas

La metformina está relacionada con el desencadenamiento de acidosis láctica, aunque diversos estudios han revelado que la metformina tiene un muy bajo índice de desarrollo de este tipo de complicación (es de 0.24 por cada 10,000 pacientes tratados) en comparación con otras biguanidas.²⁶

En pacientes con insuficiencia hepática renal, se recomienda sin importar su grado de gravedad, efectuar pruebas funcionales con frecuencia.²⁶

Si el fármaco está siendo administrado a mujeres embarazadas o en época de lactancia, debe vigilarse estrechamente, para prevenir acidosis láctica.²⁶

En pacientes con mucosa gástrica sensible, se recomienda iniciar la terapia con dosis bajas (425 o 500 mg) e ir incrementándolas cada dos a tres semanas, administrando siempre la dosis con los alimentos o inmediatamente después de ellos.²⁶

Las biguanidas impiden a largo plazo la absorción de vitamina B12 y ácido fólico, por ello se recomienda emplear terapia complementaria de estas vitaminas y descartar anemias macrocíticas, por lo menos cada 12 meses.²⁶

En pacientes que están bajo tratamiento con metformina, que van a ser sometidos a estudios radiológicos en los que se empleen medios de contraste yodados, se aconseja discontinuar la metformina 48 horas antes del estudio y reanudarla 48 horas después de haber finalizado el estudio, a fin de prevenir una acidosis láctica.²⁶

4.4.7 Estudio de la metformina

En la actualidad la metformina es el fármaco que se usa en la terapia primaria en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II y es uno de los más recetados a nivel mundial por su eficacia y seguridad. El gran impacto de la metformina en la sociedad ha propiciado a desarrollar métodos para cuantificar este analito en plasma.

La cuantificación de metformina en muestras de plasma puede ser empleada en estudios de farmacocinética, de monitoreo terapéutico, y en estudios de bioequivalencia.⁵

La metformina presenta un espectro de absorción de luz UV, se han determinado máximos de absorción a la longitud de onda de 230 nm - 250 nm.

Y por medio de una reacción colorimétrica con reactivo de Biuret a la longitud de onda de 495 nm.^{14, 27}

Debido a que la metformina presenta un espectro de absorción en la región UV, se han desarrollado métodos de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), acoplado a detección UV (HPLC-UV)⁷, que a diferencia de los métodos colorimétricos, son más selectivos y sensibles para detectar un analito.

Así mismo, los métodos de pretratamiento o métodos de extracción de las muestras a analizar incluyen precipitación de proteínas, extracción en fase sólida, y la extracción líquido-líquido.

Al desarrollar un método para cuantificar metformina en plasma en un laboratorio, se deben de cumplir los siguientes criterios:

- Cuantificar la metformina a concentraciones equivalentes al 5% de la $C_{m\acute{a}x}$ con precisión y exactitud.
- Contar con un método de extracción relativamente sencillo, rápido y económico.
- Encontrar las condiciones adecuadas para obtener un tiempo de elución adecuado.

Estos criterios, son válidos ya que en algunos estudios que se realizan existen un gran número de muestras y el tiempo es un factor que influye en el análisis de resultados.

4.5 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)

El HPLC es una de las herramientas más utilizadas de la química analítica. Tiene la capacidad de separar, identificar y cuantificar los compuestos que están presentes en cualquier muestra que se puede disolver en un líquido. La ventaja con más significancia, es la capacidad de detectar fácilmente compuestos de concentraciones bajas, del orden ng/mL y de partes por billón [ppb].²⁸

El HPLC puede ser aplicado a casi cualquier muestra, tales como productos farmacéuticos, alimentos nutracéuticos, cosméticos, matrices ambientales, muestras forenses, y productos químicos industriales.²⁸

Fundamento

En el HPLC, el analito de interés pasa por una columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de un líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna.²⁹

La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades (Micrométodos, menos de 500 μL) y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que se adelantan por la columna, como se indica en la Figura 4.²

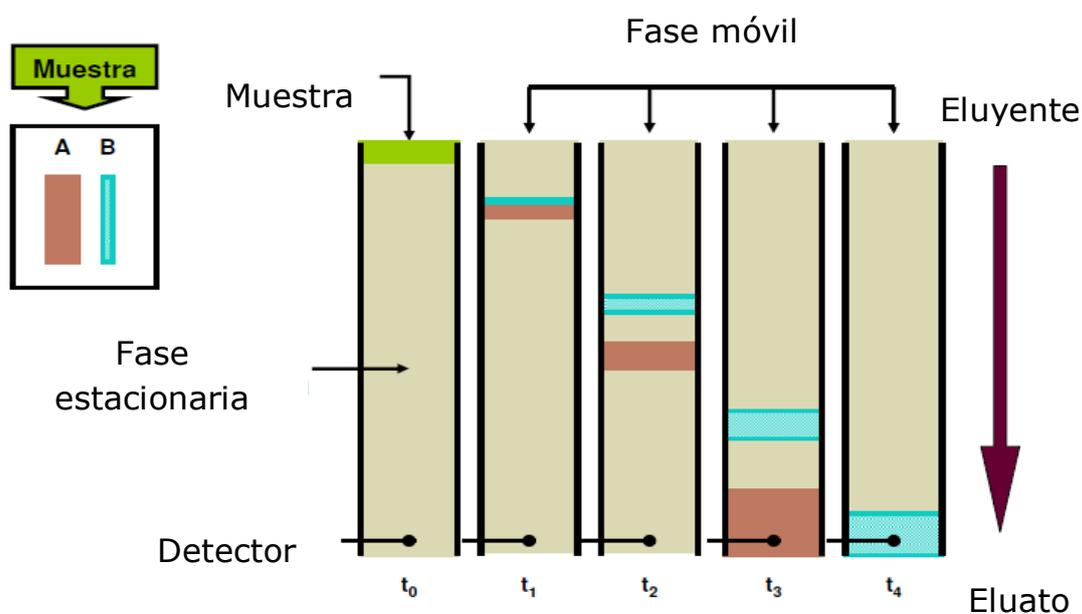


Figura 4. Fundamento de la cromatografía líquida.

El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria.²⁹

4.5.1 Tipos de HPLC

Los tipos de HPLC que a continuación se indican, se clasifican de acuerdo al mecanismo de separación o el tipo de fase estacionaria.

- Cromatografía de reparto o líquido-líquido: es el tipo de HPLC más empleado, consiste en una fase estacionaria que es un segundo líquido inmiscible con la fase móvil líquida. En esta

cromatografía líquido-líquido, la interacción se mantiene por adsorción física.²⁸

Existen dos tipos de cromatografía de reparto, la de fase normal, en la que la fase estacionaria es polar, y la móvil es no polar y la de fase reversa, en la que se invierte la polaridad de las fases.²⁸

- Cromatografía de adsorción o de líquido-sólido; la fase estacionaria es la superficie de un sólido polar finamente dividido. Con este empaquetamiento, el analito compite con la fase móvil por los sitios sobre la superficie del empaquetamiento y la retención se debe a fuerzas de adsorción.²⁸
- Cromatografía de intercambio de iones iónica; la resina que esta empaquetada en la columna se utiliza para separar especies cargadas. Los iones del analito se separan en el intercambiador iónico de baja capacidad por medio de un eluyente de baja fuerza iónica.²⁸
- Cromatografía de exclusión molecular: el fraccionamiento se basa en el tamaño molecular. El empaquetamiento de este tipo de columnas consisten en pequeñas partículas de sílice o polímeros que contienen una red de poros uniformes, en los cuales pueden difundirse las moléculas de soluto y disolvente.²⁷
- Cromatografía de afinidad, consiste en enlazar de manera covalente un reactivo, llamado ligando de afinidad, a un soporte sólido. Entre los ligandos de afinidad se encuentran anticuerpos, inhibidores enzimáticos u otras moléculas que se enlazan de manera reversible y selectiva a las moléculas del analito en la muestra.²⁸

4.5.2 Instrumentación

Recipientes de fase móvil y sistemas de tratamiento de disolventes

Los equipos de HPLC, deben utilizar recipientes, que contendrán los disolventes empleados.²⁸

Deben de incluir accesorios para eliminar los gases disueltos y partículas en suspensión de los líquidos, de esta forma se evita que haya burbujas en la columna y puedan causar ensanchamiento en las bandas del cromatograma.²⁸

Los desgasificadores pueden consistir en un sistema de bomba de vacío, uno de destilación, un dispositivo para calentamiento y agitación o, un sistema de burbujeo, en el que los gases disueltos se extraen de la disolución mediante burbujas finas de un gas inerte que es insoluble en la fase móvil.²⁸

Existen dos tipos de elución

- La elución isocrática es aquella con un único disolvente o una mezcla de disolventes de composición constante.²⁸
- La elución en gradiente es aquella en la que la composición del disolvente cambia de manera continua o escalonada.²⁸

Sistemas de bombeo

Los requisitos de las bombas para HPLC deben tener las siguientes características:

- Capacidad para generar presiones de hasta 6000 psi
- Salida libre de pulsos
- Velocidades de flujo de 0.1-10 mL/min
- Resistencia a la corrosión por diversos disolventes

Existen tres tipos de bombas:

- Las de tipo de jeringa impulsada con tornillo, producen una salida no pulsada cuya velocidad de flujo se controla fácilmente; pero tienen una baja capacidad (~250 mL) y no resultan apropiadas cuando se requieren cambios en los disolventes.²⁸
- Las bombas de vaivén u oscilantes, consisten en una pequeña cámara cilíndrica que se llena y se vacía con el movimiento oscilante de un pistón, el movimiento de la bomba produce un flujo pulsado que debe atenuarse después.²⁸
- Las bombas neumáticas o de presión constante, es un recipiente plegable que contiene un disolvente que puede presurizarse con un gas comprimido.²⁸

Sistemas de inyección de muestras

Los inyectores automáticos consisten básicamente en el empleo de una válvula de inyección controlada por un sistema robótico que permite la toma de un cierto volumen de muestras de un vial preseleccionado, la carga de la muestra en el bucle, la inyección de la muestra mediante acción automática de la válvula y el lavado de todo el sistema. Además, los sistemas más avanzados son programables y con ellos pueden realizarse operaciones como diluciones.³⁰

La principal ventaja de los inyectores automáticos es su elevada reproducibilidad y comodidad de uso, que tienen gran importancia cuando se debe analizar un gran número de muestras para analizar.³⁰

Columnas para HPLC

Las columnas de HPLC, se elaboran con tubos de acero inoxidable. La mayoría, tienen una longitud de 10 cm - 30 cm y un diámetro interno de 2 mm - 5 mm. Los empaquetamientos de las columnas suelen ser de un tamaño de partícula de 3 μm - 10 μm .²⁸

El empaquetamiento más común en el HPLC se prepara con partículas de sílice, que se sintetizan por aglomeración de partículas subatómicas de sílice en condiciones que producen partículas más grandes y de diámetro uniforme. Las partículas resultantes suelen cubrirse con películas orgánicas finas, que se enlazan química o físicamente con la superficie.²⁸

Otros materiales de empaquetamiento son las partículas de alúmina, partículas de polímeros porosos y resinas de intercambio iónico.²⁸

Precolumnas

Con frecuencia se coloca una precolumna pequeña delante de la columna analítica para extraer partículas y contaminantes de los disolventes y prolongar así la vida de la columna analítica. La composición del empaquetamiento de la precolumna suele ser similar a la de la columna analítica, aunque el tamaño de partícula tiende a ser mayor para minimizar la caída de presión.²⁸

Termostatos para columnas

Si bien en muchas aplicaciones no es necesario el control estricto de la temperatura de la columna y sólo se requiere de la temperatura ambiental, se ha revisado, y se obtienen mejores cromatogramas al mantener temperaturas de columna constantes a unas décimas de grado Celsius.²⁸

Existen equipos de HPLC que contienen calentadores que controlan la temperatura de la columna que van desde 20 hasta 150°C.²⁸

Detectores

No se cuenta con un sistema detector universal altamente sensible para HPLC. Así pues, el detector usado depende de la naturaleza de la muestra.³⁰

Los detectores más usados en cromatografía líquida se basan en la absorción de radiación ultravioleta o visible. Se fabrican

comercialmente fotómetros y espectrofotómetros diseñados específicamente para uso con columnas cromatográficas. Los primeros emplean frecuentemente las líneas de 254 a 280 nm de una fuente de mercurio, ya que muchos grupos funcionales orgánicos absorben en esta región.³⁰

Otros detectores que se les ha encontrado una considerable aplicación son:

- Espectrofotometría de masas
- Índice de refracción
- Electroquímicos
- Fluorescencia

4.5.3 Funcionamiento del cromatógrafo

En las Figuras 5 y 6, se muestra la instrumentación y la forma de operación del cromatógrafo (HPLC).³¹

- Un depósito contiene el disolvente (fase móvil)
- Una bomba de alta presión (sistema de suministro de disolvente), que se utiliza para generar y medir la velocidad de flujo de la fase móvil que se requiera.
- El inyector (director de muestra o automuestreador) es capaz de introducir la muestra en el flujo de fase móvil que fluye de forma continua para llevar la muestra a la columna de HPLC.
- La columna contiene un material de empaquetado cromatográfico necesario para efectuar la separación. Este material de embalaje se llama fase estacionaria, ya que se mantiene en su lugar.
- El detector a través de una señal eléctrica manda bandas del compuesto separadas, que eluyen de la columna de HPLC a un ordenador.

- La fase móvil sale del detector y puede ser enviado a los residuos.
- Las tuberías de alta presión y los accesorios se utilizan para interconectar la bomba, el inyector, la columna y los componentes del detector.

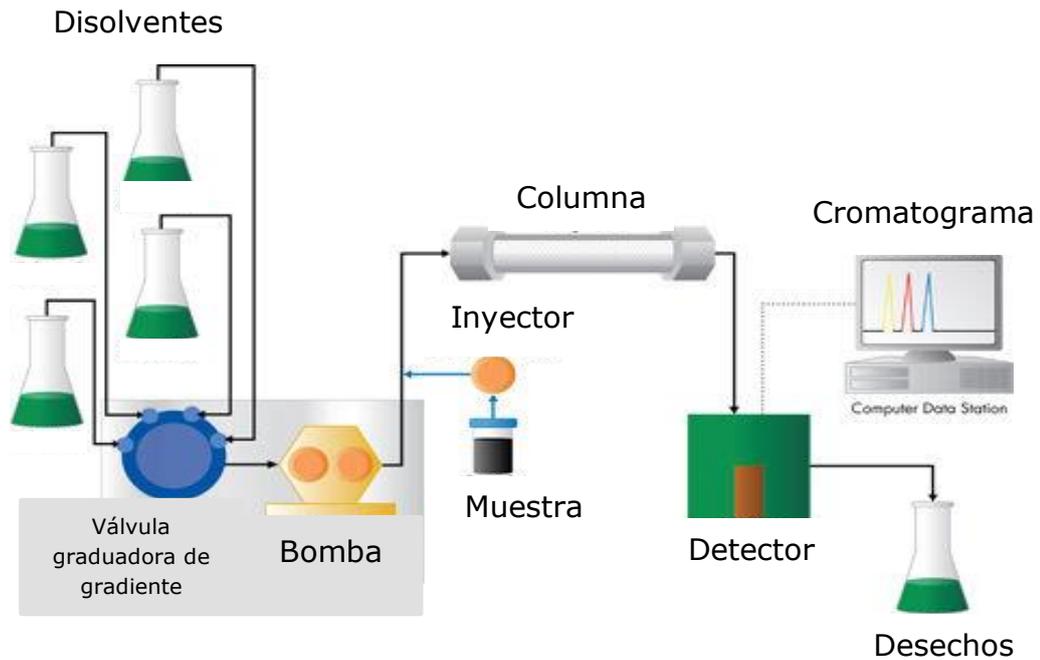


Figura 5. Instrumentación y operación del cromatógrafo. Tomada de Waters.com

El detector está conectado a la estación de datos de la computadora, este componente del sistema de HPLC registra una señal eléctrica necesaria para generar el cromatograma en la pantalla, de tal forma que se pueda identificar y cuantificar la concentración de los analitos de la muestra.³¹

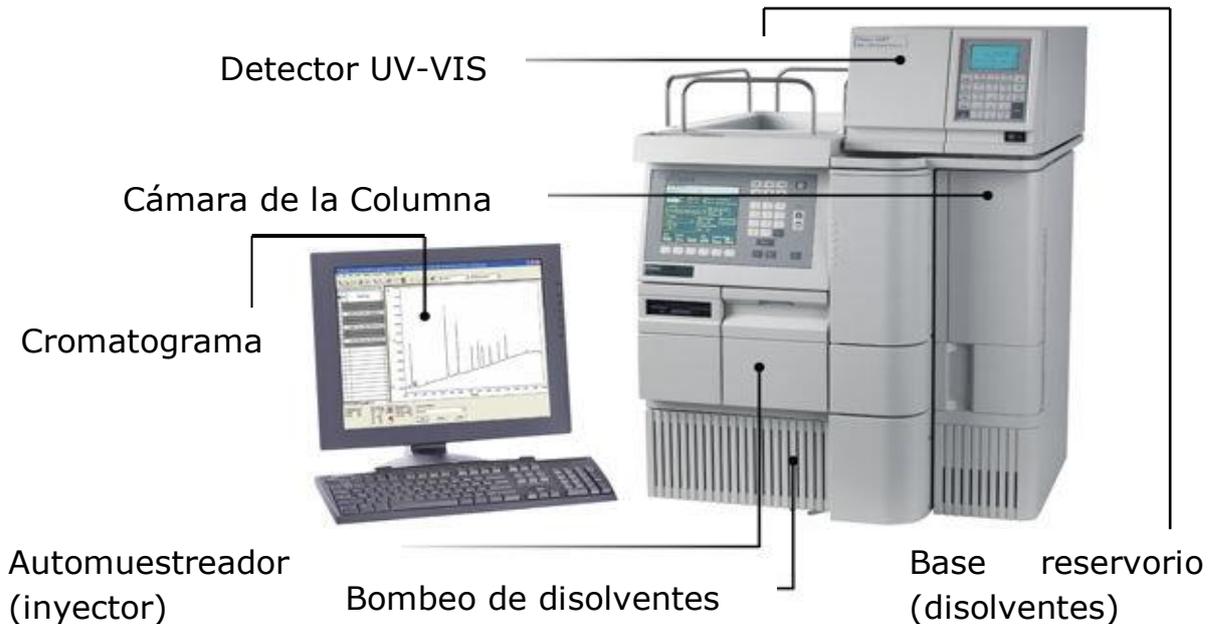


Figura 6. Instrumentación y detección de la respuesta del HPLC. Tomada de Waters.com

4.6 Extracción de fármacos de una matriz biológica.

El campo del análisis de los productos farmacéuticos y otros productos químicos en matrices biológicas ha sido objeto de renovación importante durante las últimas décadas.

Los objetivos de la preparación de las muestras son:

- Pre-purificación: eliminar interferencias y la matriz.
- Pre-separación: mejorar la separación de los compuestos de interés de forma selectiva.
- Pre-concentración: mejorar su detección.³²

Los métodos de preparación de las muestras utilizados tradicionalmente son:

- Extracción líquido-líquido
- Extracción en fase sólida
- Precipitación de proteínas

La extracción líquido-líquido, consiste en dos sustancias líquidas inmiscibles que se mezclan y forman dos capas denominadas fases. El líquido más denso se dirige hacia el fondo del recipiente, mientras el menos denso, se ubica en la parte superior. En este instante el sistema es de dos fases líquidas. Un analito puede mostrar mayor afinidad por uno de los dos líquidos, es decir, que el analito será más soluble en una fase que otra.³³

La extracción en fase sólida es una técnica de preparación de muestra que limpia y/o concentra muestras antes del análisis y, puede ser empleada de dos formas distintas:

- La muestra pasa a través de un lecho de fase sólida que retiene los interferentes mientras que los analitos eluyen;³⁴
- La muestra pasa a través de un lecho de fase sólida que retiene los analitos y, posiblemente, algunos interferentes. Estos se eliminan del lecho y después se eluyen los analitos.³⁴

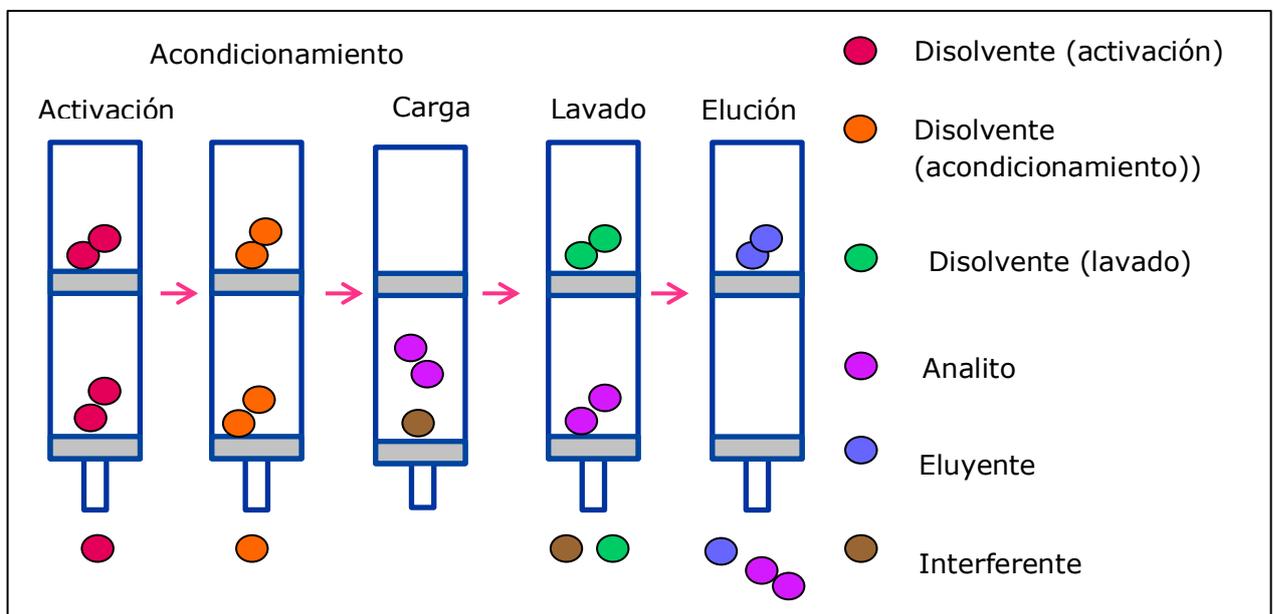


Figura 7. Fundamento de la extracción líquido-sólido.

Precipitación de proteínas

Precipitación con sales. La adición de sales elimina el agua de la proteína hidratada, dejando las regiones hidrofóbicas en libertad de combinarse intermolecularmente.³⁵

Precipitación isoeléctrica. Esta técnica se basa en la disminución de la solubilidad en el punto isoeléctrico.³⁵

Las proteínas por su naturaleza anfotérica presentan una carga neta negativa a pH altos y una carga neta positiva a pH bajos. Existe un pH llamado pH isoeléctrico al cual la carga neta de la proteína es cero. A este pH la molécula es incapaz de desplazarse en un campo eléctrico.³⁵

Precipitación con polímeros no iónicos. La precipitación de proteínas también puede realizarse utilizando polímeros neutros como el polietilenglicol (PEG) en lugar de sales o disolventes.³⁵

Precipitación con disolventes. Esta técnica se basa en la disminución de la solubilidad mediante la adición de un disolvente orgánico ligeramente polar.³⁵

La adición de un disolvente orgánico, produce agregados de moléculas proteicas que tienden a precipitar, esto se debe a que el disolvente presenta una constante dieléctrica menor que la del agua, lo cual produce un incremento en las fuerzas de atracción entre cargas opuestas y una disminución en el grado de ionización de los radicales de las proteínas, y en consecuencia una disminución en la solubilidad de esta.³⁵

4.7. Metodologías reportadas para la determinación de Metformina por HPLC-UV.

Tabla 5. Métodos reportados para la cuantificación de metformina por HPLC-UV.

Año	Columna y precolumna	Condiciones cromatográficas		Método de extracción
1998 Kah Hay Yuen ³⁷	Supercosil LC-CN (250 mm x 4.6 mm, 5 µm)	FM	K ₂ HPO ₄ 0.01M pH 3.5:ACN	Precipitación con ácido perclórico 60%v/v
		(%v/v)	60:40	
		λ	234 nm	
		Velocidad de flujo	1mL/min	
2001 Ching-Ling Cheng ³⁶	Hypersil HS Silica 5µm, 25 cm x 4.6 mm Precolumna (Hichrom Silica H5 10 mm x 3.2 mm)	FM	(NH ₄) ₂ HPO ₄ 0.03M pH 7.0:ACN	Precipitación con HCl 1 M y acetonitrilo; seguida de una extracción líquido-líquido con diclorometano
		(%v/v)	75:25	
		λ	240 nm	
		Velocidad de flujo	1mL/min	
2008 Porta ⁵	MetaSil-Phenyl 150 mm x 4.6mm, 4µm	FM	Buffer de fosfato 0.02M pH 7.0:ACN	Precipitación con acetonitrilo; seguido de una filtración y reconstitución con FM
		(%v/v)	50:50	
		λ	236 nm	
		Velocidad de flujo	1mL/min	
2009 García ³⁹	Lichrosorb RP-8 (5 µm, 250 mm x 4 mm)	FM	NH ₄ H ₂ PO ₄ al 1.7% pH 2.5	No aplica método de extracción
		λ	233 nm	
		Velocidad de flujo	1.5mL/min	
2013 Paudel ¹⁵	Discovery Reversed Phase C-18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm)	FM	KH ₂ PO ₄ 10 mM:SDS 10 mM:ACN	Precipitación con ácido perclórico 60 %v/v; seguido de una filtración
		(%v/v)	66:34	
		Velocidad de flujo	1.3mL/min	
2014 Alemón ³⁸	Varian Pursuit C8 150 mm x 3.9 mm	FM	KH ₂ PO ₄ 0.1M pH 6.5:SDS 4.6mM:ACN	Precipitación de sangre total con ACN y metanol, seguido de una evaporación de los solventes y reconstitución con la FM
		(%v/v)	63:7:30	
		λ	236 nm	
		Velocidad de flujo	0.8mL/min	
2015 Muñoz ⁴⁰	Agilent Zorbax SB-Aq (5 µm, 150 mm x 4.6 mm)	FM	NaH ₂ PO ₄ pH 5.0	No aplica método de extracción
		λ	234 nm	
		Velocidad de flujo	1mL/min	

5. Metodología

Materiales

- Agitador magnético
- Combitips de 1 = 10 μ L, 50 μ L, 100 μ L
- Espátula de acero
- Frascos de vidrio para contener disolventes o fase móvil con tapa de rosca de 250 mL, 500 mL y 1000 mL marca KIMAX
- Frascos de plástico con tapa de rosca de 25 mL y 125 mL
- Gradillas
- Guantes de nitrilo
- Matraces volumétricos de 10 mL, 50 mL, 100 mL y de 1000 mL
- Membrana de Nylon de 0.45 μ m marca Waters
- Nave para pesar
- Pipetas Pasteur
- Probeta de 500 mL y de 1000 mL
- Puntas para micropipeta de capacidad de 200 μ L y 1000 μ L
- Tubos Eppendorf de capacidad de 1.5 mL y 2 mL
- Vaso de precipitado de plástico de 100 mL y 1000 mL
- Viales de 1.5 mL

Equipos e instrumentos

- Agitador vórtex Genie 2
- Balanza analítica marca SCIENTECH SA 80
- Campana de extracción
- Centrífuga, modelo Centrifuge 5415D, marca Eppendorf
- Micropipetas marca Eppendorf de capacidad 20 μ L - 200 μ L y de 100 μ L - 1000 μ L
- Milli-Q
- Equipo de filtración al vacío
- Ultra congelador REVCO
Temperatura de operación -80 °C

- Congelador marca TORREY
Temperatura de operación -10 °C

Sistema cromatográfico

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución modelo Alliance 2695 marca Waters
- Detector (Dual λ Absorbance Detector) modelo 2487, marca Waters
- Software Empower – Pro Build 1154 Waters

Reactivos

- Agua (H₂O) desionizada
- Acetonitrilo (CH₃CN) grado HPLC (J.T. Baker, E.U.A.)
- Diclorometano (CH₂Cl₂) grado HPLC (J.T. Baker, E.U.A.)
- Metanol (CH₃OH) grado HPLC (MERCK, Darmstadt, Alemania)
- Fosfato monobásico de sodio monohidratado (NaH₂PO₄ · H₂O) (J.T. Baker, E.U.A.)
- Ácido clorhídrico fumante (HCl) (MERCK, Darmstadt, Alemania) Pureza 99.7%
- Hidróxido de sodio (NaOH) (J.T. Baker, E.U.A.) Bajo en carbonatos Pureza 98.2%
- Clorhidrato de metformina (Sigma Aldrich) Pureza >99% Lote 1B998AF
- Cafeína (Sigma Aldrich)
- Acetaminofén (Sigma Aldrich)
- Plasma humano proveniente del Banco de sangre del INER
- Tubo BD Vacutainer de plástico con Heparina de sodio 7.2 mg.
- Tubo BD Vacutainer de plástico con EDTA 7.2 mg.

5.1 Preparación de las soluciones

- Disolventes

Se filtraron al vacío con membrana de Nylon de 0.45 μm los siguientes disolventes:

Agua desionizada

Acetonitrilo (ACN) grado HPLC

Metanol grado HPLC.

- Solución amortiguadora de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10 mM, pH 7.0

Se pesó el equivalente a 1.3799 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, posteriormente se transfirieron a un vaso de precipitados de 1 L y se disolvieron con 800 mL de agua desionizada. Se ajustó el pH a 7.0 con la solución de NaOH 1 M.

Se transfirió la solución a un matraz aforado de 1 L y se llevó a volumen final. Se filtró al vacío con membrana de 0.45 μm .

- Fase móvil

Solución amortiguadora de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10 mM, pH 7.0: ACN (80:20 %v/v)

Se midieron en una probeta de 1 L, 800 mL de solución amortiguadora de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10 mM, pH 7.0 previamente filtrado y se adicionaron a un frasco de 1 L para disolventes de HPLC. Posteriormente se midieron con una probeta de 500 mL, 200 mL de ACN grado HPLC previamente filtrado y se transfirieron al frasco antes mencionado. Se agitó hasta lograr la homogenización de la mezcla y finalmente se filtró con membrana de 0.45 μm .

- Solución de HCl 0.05 M

A un matraz aforado de 50 mL se le adicionaron 30 mL de agua desionizada. Se midieron 207.2 μ L de HCl fumante y se transfirieron a este matraz. Se llevó a volumen final y se agitó.

- Solución de NaOH 1 M

Se pesó el equivalente a 4 g de NaOH y se transfirió a un vaso de precipitados de 100 mL. Se adicionaron 40 mL de agua y se disolvieron mediante agitación magnética.

Se transfirió cuantitativamente esta solución a un matraz aforado de 100 mL y se llevó al volumen final.

- Solución de cafeína de 100 μ g/mL

Se pesó el equivalente a 10 mg de cafeína, se transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL y se disolvieron con agua desionizada.

- Solución de acetaminofén de 100 μ g/mL

Se pesó el equivalente a 10 mg de acetaminofén, se transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL y se disolvieron con agua desionizada.

- Solución stock de clorhidrato de metformina 100 μ g/mL

Se pesó el equivalente a 10 mg de clorhidrato de metformina, se transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL y se disolvieron con agua desionizada.

A partir de la solución stock de 100 μ g/mL, se prepararon las soluciones correspondientes para obtener la curva de calibración.

Se midieron los volúmenes indicados en la Tabla 6 y se transfirieron a matraces aforados de 10 mL. Finalmente se llevó al volumen final con agua desionizada.

Tabla 6. Preparación de las soluciones de trabajo y muestras control

	Vol. solución stock de clorhidrato de metformina 100 µg/mL (µL)	Aforo (mL)	Concentración final de las soluciones [µg/mL]
C1(LC)	100	10	1.0
C2	200	10	2.0
CB	300	10	3.0
C3	400	10	4.0
C4	500	10	5.0
C5	1000	10	10
CM	1500	10	15
C6	2000	10	20
CA	2500	10	25
C7	3000	10	30

5.2 Curva de calibración y muestras control de calidad

Considerando una $C_{\text{máx}}$ de 1000 ng/mL reportada en la literatura²³, con las soluciones que se indican en la Tabla 6, se preparó la curva de calibración del método en el intervalo de 50 ng/mL-1500 ng/mL, considerando un volumen total de 200 µL.

En la Tabla 7, se describe la preparación para cada punto de la curva y de las muestras control.

Tabla 7. Preparación de la curva de calibración para el método analítico en el rango de 50 ng/mL – 1500 ng/mL y muestras control.

	Concentración de solución [µg/mL]	Alícuota de solución (µL)	Volumen de plasma (µL)	Concentración final [ng/mL]
C1(LC)	1.0	10	190	50
C2	2.0	10	190	100
CB	3.0	10	190	150
C3	4.0	10	190	200
C4	5.0	10	190	250
C5	10	10	190	500
CM	15	10	190	750
C6	20	10	190	1000
CA	25	10	190	1250
C7	30	10	190	1500

5.3 Proceso de extracción

El proceso de extracción empleado, se describe en la Figura 8. Previo a la realización de cualquier prueba se realizó el ensayo de adecuabilidad (solución de 750 ng/mL) y se analizó un BR y un BP.

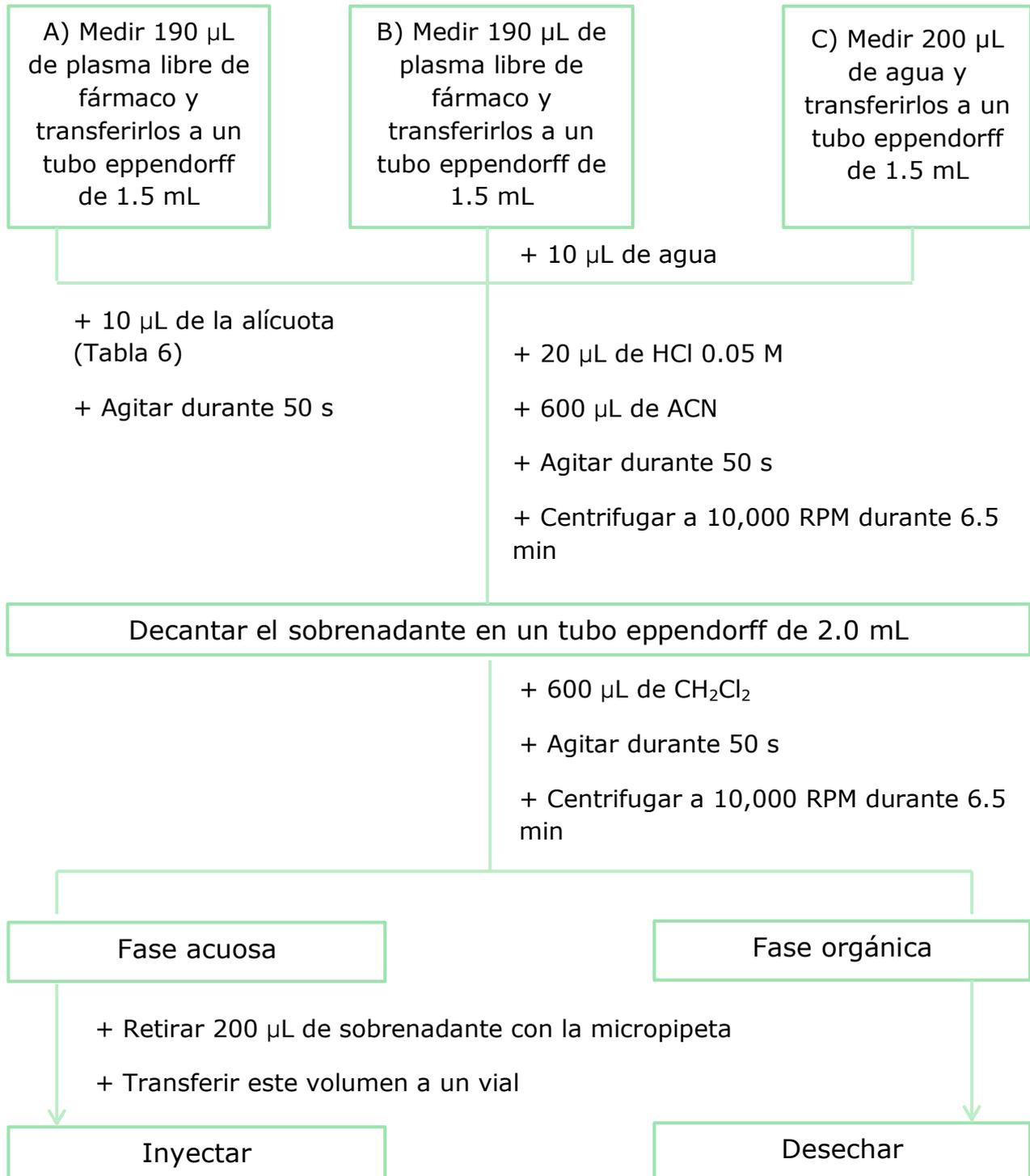


Figura 8. Proceso de extracción. A) Preparación de la curva de calibración y muestras control B) Blanco de plasma C) Blanco de reactivo

5.4 Desarrollo del método analítico

Durante el desarrollo del método analítico se realizó una búsqueda bibliográfica sobre las características fisicoquímicas y farmacocinéticas de la metformina, así como de los métodos reportados en la literatura sobre la cuantificación de este analito en plasma.

Las condiciones cromatográficas se basaron en el método de Ching-Ling Chen³⁶. Las pruebas del sistema se realizaron con una solución de clorhidrato de metformina de concentración de 750 ng/mL.

El método se desarrolló empleando una columna Resolve Silica 5 μm , 150 mm x 3.9 mm y un filtro en línea. La FM propuesta fue solución amortiguadora de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: ACN.

Se probaron diferentes concentraciones de la solución amortiguadora de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, la proporción de los componentes de la FM y la realización manual de la mezcla de la FM.

La detección se probó en la región UV a una $\lambda=234$ nm, y se registró una adecuada señal correspondiente a la metformina.

La velocidad de flujo fue la indicada para presentar una respuesta con un tiempo de elución del analito aceptable.

En la determinación del volumen de inyección y la temperatura, se realizaron pruebas para establecer las condiciones en la que la señal era detectable y adecuada, sin presentar problemas en el cromatograma registrado.

En la Tabla 8, se muestran las condiciones cromatográficas originales y modificadas del método reportado por Ching-Ling Chen³⁶ para el desarrollo de este método analítico.

Tabla 8. Condiciones cromatográficas del desarrollo del método analítico.

Parámetros	Condiciones Método de Ching-Ling Chen ³⁶	Condiciones modificadas
Columna	Hypersil HS Silica 5 µm, 25 cm x 4.6 mm	Resolve Silica 5 µm, 150 mm x 3.9 mm
Precolumna	Hichrom Silica H5 10 x 3.2 mm	-
FM	(NH ₄) ₂ HPO ₄ 0.03 M pH 7.0	NaH ₂ PO ₄ 0.01 M pH 7.0
Proporción FM	75:25 %v/v	80:20 %v/v
Velocidad de flujo	1 mL/min	1 mL/min
Volumen de inyección	50 µL	20 µL
λ	240 nm	234 nm
Temperatura de la columna	40°C	30°C

5.5 Protocolo de validación del método analítico

- Adecuabilidad del sistema

Para realizar esta prueba se inyectó por sextuplicado la solución de adecuabilidad, se reportó la respuesta de la altura de la señal que presentó el analito en los cromatogramas y se calculó el coeficiente de variación.

Criterio de aceptación

El C.V. de las respuestas analíticas obtenidas debe ser menor a 2%.

- Selectividad del método

Se analizó la no interferencia de compuestos endógenos de la matriz biológica, mediante la evaluación de al menos 6 unidades de ésta individualmente.

Se analizaron, también, la matriz biológica normal, lipémica, hemolizada, con heparina y con EDTA.

También se consideraron las interferencias de fármacos de uso común. Se evaluó la influencia de la cafeína y acetaminofén, preparando soluciones de concentración de 100 µg/mL de cada uno. Considerando la $C_{máx}$ de la cafeína de 20 µg/mL y el acetaminofén de 20 µg/mL⁴² se analizó la matriz biológica libre de metformina por duplicado, adicionando estas soluciones.

Criterio de aceptación

No se debe presentar ninguna interferencia en el mismo tiempo de retención del analito de interés. Si existiera alguna respuesta analítica correspondiente a interferencias próximas al tiempo de retención, estas deben ser menores al 20% para el límite de cuantificación del analito.

- Límite de cuantificación

El límite de cuantificación se determinó con base en el 5% de la $C_{máx}$ de 1000 ng/mL²⁴ reportado en la literatura. Se analizaron por sextuplicado el LC.

Criterio de aceptación

El LC debe ser el 5% de la $C_{máx}$. Se obtuvo el C.V y el %Desviación.

- Curva de calibración

Se estableció el intervalo de la curva de calibración en función a las concentraciones esperadas del analito a cuantificar durante el análisis de muestras. Además se caracterizaron por lo menos seis concentraciones distintas sin incluir las muestras blanco.

Una vez que se estableció el intervalo de la curva de calibración se eligió un modelo matemático que describiera adecuadamente la relación entre la concentración y la respuesta, la cual fue continua y reproducible en el intervalo de trabajo.

Se evaluaron 3 curvas de calibración y se incluyeron los resultados de la concentración recuperada y el por ciento de desviación.

Criterios de aceptación

Los datos de la concentración recuperada de la curva de calibración deben estar dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, excepto para el límite inferior de cuantificación que puede ser menor o igual al 20%. Al menos el 75% de las concentraciones de la curva de calibración con un mínimo de seis puntos deben cumplir con este criterio.

Del total de las curvas que se evaluaron, al menos 50% de cada nivel de concentración debe cumplir con el criterio del 15% de la concentración nominal y 20% para el límite de cuantificación.

Así mismo se calculó el error estándar para cada nivel de concentración con la siguiente formula:

$$SE = \frac{D.E.}{\sqrt{n}}$$

- Precisión

Repetibilidad

Se analizaron en un mismo día por quintuplicado las muestras control (MCB, MCM y MCA) y se calculó la concentración obtenida para cada nivel interpolando su respuesta analítica con la curva de calibración preparada.

Criterio de aceptación

El C.V. del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.

- Reproducibilidad

Se analizaron por quintuplicado en tres corridas analíticas diferentes y en tres días, las muestras control (MCB, MCM y MCA). Para cada muestra control se calculó la concentración recuperada interpolando la respuesta analítica en la curva de calibración.

Criterio de aceptación

La adición de otro analista o el uso de otro equipo, debe cumplir con los criterios de reproducibilidad. El C.V. del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20% para métodos cromatográficos.

- Exactitud

Con los datos de repetibilidad y reproducibilidad se calculó la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal (%Desviación) empleando la siguiente ecuación.

$$\%Desviación = \left(\frac{\text{concentración nominal} - \text{concentración experimental}}{\text{concentración nominal}} \right) * 100$$

Criterio de aceptación

El valor promedio del %Desviación no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.

- Estabilidad a corto plazo

Se determinaron las condiciones de temperatura y tiempo entre otros, en las que el fármaco permaneció estable en la matriz biológica, durante su manejo, toma de muestra, almacenamiento y procesamiento analítico.

Se evaluó por triplicado la respuesta del analito en las muestras control (MCB, MCM y MCA), las cuales se analizaron inmediatamente después de su preparación y después de ser sometidas a las condiciones del ensayo evaluadas.

Las muestras control se interpolaron con la curva de calibración recién preparada y las concentraciones obtenidas se compararon contra la concentración nominal.

Criterio de aceptación

La concentración promedio de cada nivel debe estar dentro del 15% de la concentración nominal.

- Estabilidad a largo plazo

Se evaluó la estabilidad del analito en las muestras control (MCB, MCM y MCA), bajo las condiciones de almacenamiento en un tiempo equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis.

- Estabilidad en refrigeración

Se evaluó la estabilidad del analito en las muestras control (MCB, MCM y MCA), después de exponerlas a 4°C durante 24 horas.

- Estabilidad temperatura ambiente (24 horas)

Se evaluó la estabilidad del analito en las muestras control (MCB, MCM y MCA), después de exponerlas a temperatura ambiente durante 24 horas.

- Estabilidad en el automuestreador

Se evaluó la estabilidad del analito en las muestras control procesadas (MCB, MCM y MCA) a la temperatura del automuestreador.

- Estabilidad ciclos de congelación-descongelación (3 ciclos)

Se evaluó la estabilidad del analito en las muestras control (MCB, MCM y MCA), almacenadas a la temperatura de congelación en que estuvieron las muestras reales por al menos 12 h, se descongelaron completamente a temperatura ambiente y nuevamente se congelaron por al menos 12 h bajo las mismas condiciones. El número de ciclos de congelación-descongelación fueron al menos de 3 ciclos.

Criterios de aceptación

El %Desviación de la concentración promedio de cada nivel debe ser menor al 15%.

- Estabilidad en solución

Se evaluó la estabilidad del analito en las muestras control (MCB, MCM y MCA) en solución almacenadas en refrigeración a 4°C. El valor promedio de la respuesta analítica de las soluciones en estudio se comparó con el valor promedio obtenido por el análisis por triplicado de las soluciones recién preparadas.

Criterio de aceptación

Las soluciones serán consideradas estables si el %Desviación de la respuesta analítica promedio con respecto a la obtenida con muestras recién preparadas, no es mayor que 10%.

- Efecto de dilución

La muestra control de dilución se realizó para el factor de dilución aplicado a las muestras durante el estudio. La dilución se realizó con la matriz biológica exenta del fármaco.

Criterio de aceptación

El C.V. y el %Desviación obtenido de las tres muestras no deben ser mayores al 15% de desviación con respecto al valor original.

- Recobro

Se analizaron por sextuplicado las muestras control del compuesto por analizar en la matriz biológica. Se compararon estos resultados con las respuestas de soluciones del mismo compuesto en las mismas concentraciones y en los mismos disolventes.

El recobro absoluto se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recobro absoluto} = \left(\frac{\text{respuesta del analito en plasma}}{\text{respuesta del analito en solución}} \right) * 100$$

Criterio de aceptación

El recobro promedio no debe ser necesariamente del 100%, aunque el valor obtenido debe ser constante, preciso y reproducible en los niveles de concentración para el analito.

- Tolerancia

Se evaluó la tolerancia del método a pequeñas pero deliberadas modificaciones en el pH de la solución buffer de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y se analizaron las muestras control (MCB, MCM y MCA). Las modificaciones consistieron en cambiar el pH del buffer en magnitud de 3%. Se realizó esta prueba a pesar de que no está considerada en la NOM-177-SSA1-2013.

Criterios de aceptación

Las modificaciones que se consideren, deben ser las que cumplan con los criterios de exactitud y precisión con un C.V. y %Desviación menores al 15%.

6. Resultados

6.1 Método analítico

6.1.1 Condiciones cromatográficas

En la Tabla 9 se muestran las condiciones cromatográficas finales con las que se realizó la validación del método analítico para la determinación de metformina en plasma.

Tabla 9. Condiciones cromatográficas finales del método analítico.

Parámetro	Condición
Columna	Resolve Silica 5 μm , 150 mm x 3.9 mm Filtro en línea
Fase móvil	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10 mM; pH 7.0 : ACN
Proporción FM	80:20%v/v
Velocidad de flujo	1 mL/min
Volumen de inyección	20 μL
λ	234 nm
Temperatura de la columna	30°C
Temperatura de la muestra	10°C
Tiempo de retención	7.5 min
Tiempo de corrida	10 min

La matriz biológica empleada en este método analítico fue plasma sanguíneo. Se evaluaron diferentes unidades de plasma libre de metformina, y se realizó una mezcla para ser utilizado en la validación.

La señal de ruido generada de la mezcla de plasmas fue prácticamente nula y no afectó el tiempo de retención de la metformina. Por esta razón, la señal ruido no influyó en la resolución

de las señales cromatográficas (picos) correspondientes a este analito.

6.2 Validación del método analítico

- **Adecuabilidad del sistema**

Para dar inicio a las pruebas de la validación del método analítico, se realizó la prueba de adecuabilidad del sistema para cada corrida analítica.

En la Figura 9, se muestra un ejemplo de los cromatogramas de la evaluación de la solución de adecuabilidad del sistema para una corrida analítica. La cual se preparó adicionando en un vial 190 μL de agua + 10 μL de la solución de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para obtener una concentración de 750 ng/mL .

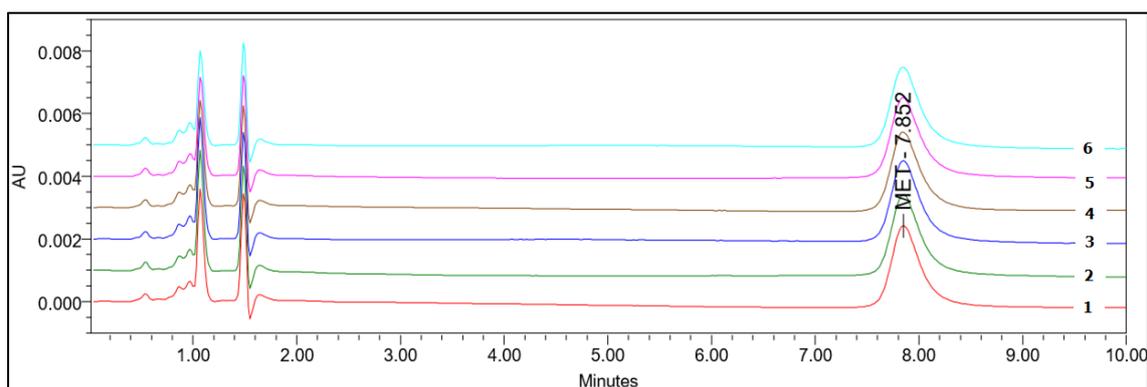


Figura 9. Adecuabilidad del sistema. Cromatograma representativo de las seis inyecciones correspondientes al tiempo de retención de la metformina en solución de 750 ng/mL .

Los datos que se obtuvieron de estos cromatogramas se indican en la Tabla 10. El C.V. de la respuesta analítica evaluada (Altura) fue de 1.19%, por lo tanto cumple con el criterio de aceptación, ya que este valor fue menor al 2%.

Tabla 10. Adecuabilidad del sistema. Datos obtenidos de las seis inyecciones de la muestra de ADQ

Inyección	Concentración nominal (ng/mL)	Vol. De inyección (μL)	Tiempo de retención (min)	Altura (μV)
1	750	20	7.852	2578
2	750	20	7.850	2558
3	750	20	7.849	2567
4	750	20	7.847	2501
5	750	20	7.847	2516
6	750	20	7.846	2533
Promedio			7.849	2542.1
D.E.			0.002	30.3
C.V. (%)			0.027	1.194

- **Selectividad del método**

En la Figura 10, se muestran los cromatogramas correspondientes al blanco de reactivo, el blanco de plasma, el MCM en solución de 750 ng/mL con una altura de 2501 μV y el LC en plasma de 50 ng/mL con un valor experimental de 50.89 ng/mL. Como se puede observar, no se presentaron interferencias cercanas al tiempo de retención.

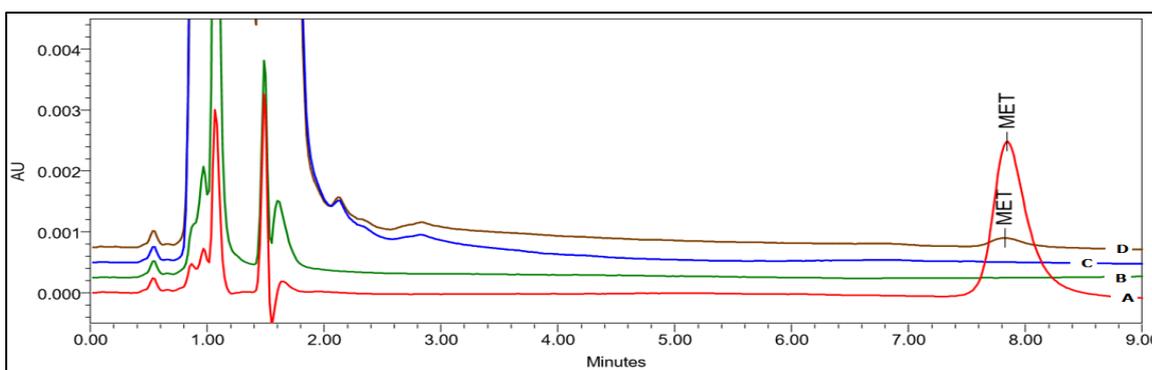


Figura 10. Selectividad de método. A) CM en solución de 750 ng/mL B) Blanco de reactivo C) Blanco de plasma D) LC en plasma de 50 ng/mL.

Se seleccionaron dos fármacos de uso común para evaluar posibles interferencias. Esto se realizó preparando una muestra de 160 μL de plasma + 40 μL de solución de cafeína y acetaminofén de 100 μg/mL respectivamente. En la Figura 11, se muestran los cromatogramas correspondientes, se puede observar que no hay interferencia

causada por estos fármacos. El valor experimental del LC fue de 52.48 ng/mL.

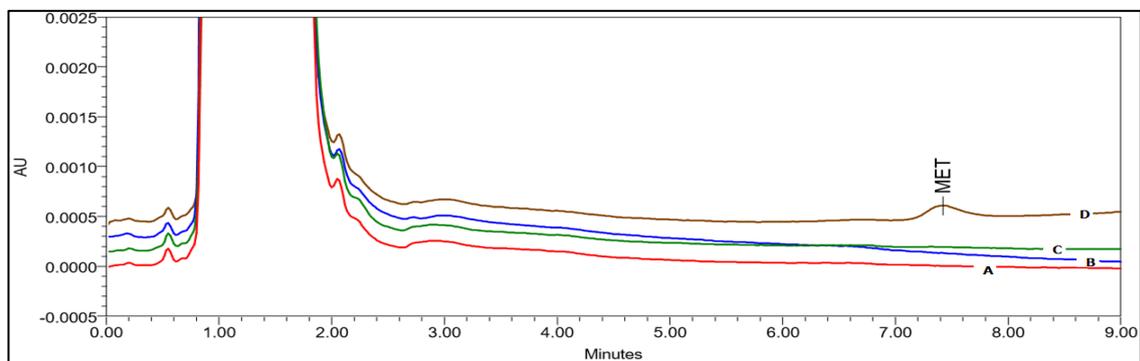


Figura 11. Selectividad del método. A) Cafeína en plasma $C_{m\acute{a}x}$ 20 ng/mL B) Blanco de plasma C) Acetaminofén en plasma $C_{m\acute{a}x}$ 20 ng/mL C) LC en plasma de 50 ng/mL.

Se procesó un plasma lipémico, uno hemolizado y otro en estado normal sin la adición de la metformina, de acuerdo al método de extracción desarrollado. En la figura 12 se observan los cromatogramas correspondientes. Se muestra que no hubo ninguna interferencia posterior a la extracción del plasma lipémico y hemolizado. El valor experimental del LC fue de 51.32 ng/mL.

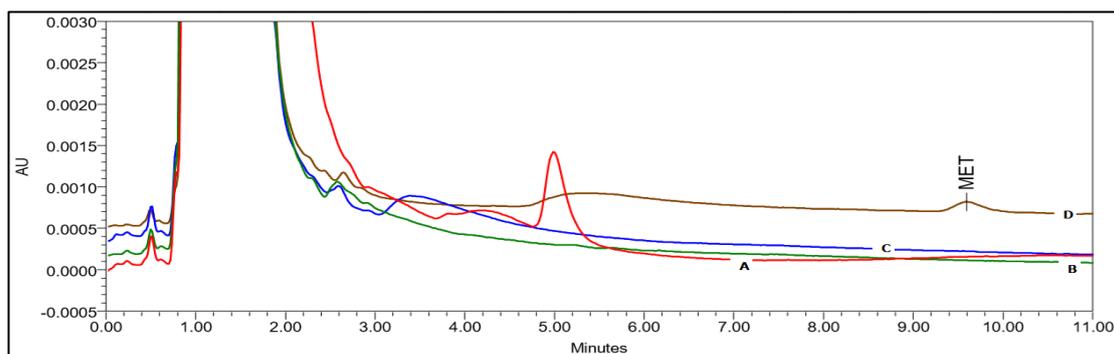


Figura 12. Selectividad del método A) Blanco de plasma hemolizado B) Blanco de plasma lipémico C) Blanco de plasma D) LC en plasma de 50 ng/mL.

Finalmente, se evaluaron dos anticoagulantes para determinar la selectividad. Esta prueba se llevó a cabo adicionando 1 mL de plasma a un tubo vacutainer con heparina y otro con EDTA, posteriormente se tomaron 200 μ L de cada uno de los plasma y se realizó el proceso

de extracción. Los cromatogramas correspondientes se indican en la Figura 13, y se observa que no hubo interferencia causada por estos compuestos. El valor experimental del LC fue de 48.14 ng/mL.

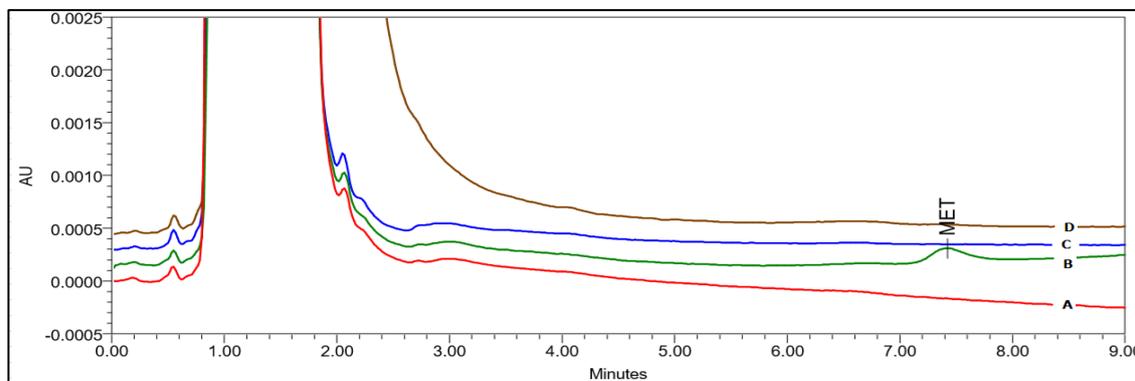


Figura 13. Selectividad del método. A) Blanco de plasma B) LC en plasma 50 ng/mL C) Plasma + heparina D) Plasma + EDTA.

Por lo tanto, el método analítico fue selectivo, ya que no presentó interferencias cercanas al tiempo de retención que fueran mayores al 20% del LC.

- **Límite de cuantificación**

Para evaluar el LC de 50 ng/mL, se preparó por sextuplicado de manera independiente la muestra correspondiente a la concentración del límite de cuantificación, se analizaron y la respuesta analítica fue interpolada en la curva de calibración preparada en el mismo día de análisis. En la Tabla 11, se muestran los valores obtenidos, el C.V. y el %Desviación son menores al 20% por lo tanto se cumplió con el criterio de aceptación.

Tabla 11. Límite inferior de cuantificación. Datos obtenidos del sextuplicado de muestras del LC.

Concentración nominal (ng/mL)	50
Concentración experimental (ng/mL)	50.83
	51.71
	50.89
	52.43
	48.14
	55.15
Promedio	51.52
D.E.	2.30
C.V. (%)	4.46
%Desviación	3.05

- **Curva de calibración**

El intervalo de la curva de calibración establecido fue de 50 ng/mL - 1500 ng/mL. En la Figura 14, se muestra un cromatograma representativo de la curva de calibración.

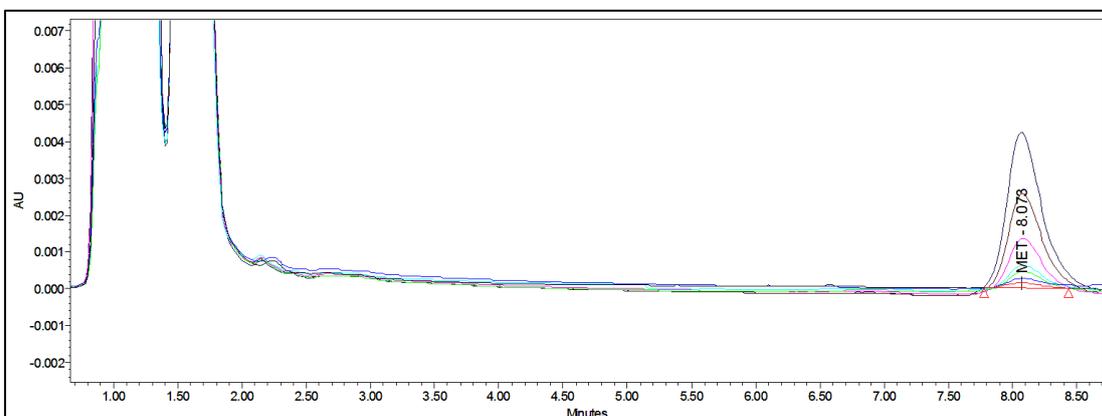


Figura 14. Cromatogramas representativos de la curva de calibración de metformina en el intervalo de 50 ng/mL - 1500 ng/mL.

Se probaron diferentes ponderaciones matemáticas hasta encontrar la que dio un mejor ajuste, esto se realizó con el empleo del Software Empower Pro. Se graficó la concentración de la metformina contra la respuesta analítica (Altura), mediante la regresión lineal y el empleo

de la ecuación de la recta $y=mx+b$, donde b es la ordenada al origen, m la pendiente. La ponderación que se empleó fue $1/X^2$.

A continuación se muestran los datos experimentales correspondientes a las tres curvas de calibración del método analítico.

Curva de calibración 1

Tabla 12. Curva de calibración 1.

Conc. Nominal (ng/mL)	Altura (μ V)	Conc. Experimental (ng/mL)	% Desviación
50	144.496	50.889	1.78
100	274.244	96.547	3.45
200	557.327	196.165	1.92
250	723.738	254.725	1.89
500	1420.58	499.945	0.01
1000	2831.663	996.509	0.35
1500	4350.362	1530.942	2.06

$b=-14.35$ $m= 2.89$ $r=0.9998$ $r^2=0.9998$

Curva de calibración 2

Tabla 13. Curva de calibración 2.

Conc. Nominal (ng/mL)	Altura (μ V)	Conc. Experimental (ng/mL)	% Desviación
50	136.268	52.426	4.85
100	230.621	89.436	10.56
200	493.482	192.544	3.73
250	682.67	266.753	6.7
500	1264.903	495.135	0.97
1000	2543.353	996.609	0.34
1500	3981.556	1560.745	4.05

$b=-22.06$ $m=2.63$ $r=0.9995$ $r^2=0.9991$

Curva de calibración 3

Tabla 14. Curva de calibración 3.

Conc. Nominal (ng/mL)	Altura (μV)	Conc. Experimental (ng/mL)	% Desviación
50	110.79	48.136	3.73
100	254.122	107.851	7.85
200	466.639	196.389	1.81
250	605.418	254.206	1.68
500	1186.382	496.246	0.75
1000	2540.669	1060.465	6.05
1500	3261.006	1360.569	9.3

$$b=46.40 \quad m=2.25 \quad r=0.9950 \quad r^2=0.9901$$

En la Tabla 15 se muestran los valores promedio de tres curvas de calibración. El C.V. es menor al 15% para cada uno de los niveles, por lo tanto cumple con el criterio de aceptación.

Tabla 15. Curva de Calibración. Datos obtenidos del promedio de las tres curvas de calibración.

Concentración nominal (ng/mL)	Promedio de alturas (μV)	D.E.	C.V. (%)	Error estándar
50	130.52	17.57	13.46	10.15
100	253.00	21.83	8.63	12.61
200	505.82	46.59	9.21	26.90
250	670.61	60.08	8.96	34.68
500	1290.62	119.20	9.24	68.82
1000	2638.56	167.24	6.34	96.55
1500	3864.31	554.06	14.34	319.89

La curva de calibración promedio de la concentración nominal (ng/mL) contra Altura (μV), se muestra en la Figura 15, en la cual se obtuvo una pendiente (m)=2.5917, una ordenada al origen (b)=3.3323, coeficiente de determinación (R^2)=0.9997 y un coeficiente de correlación (R)=0.9998.

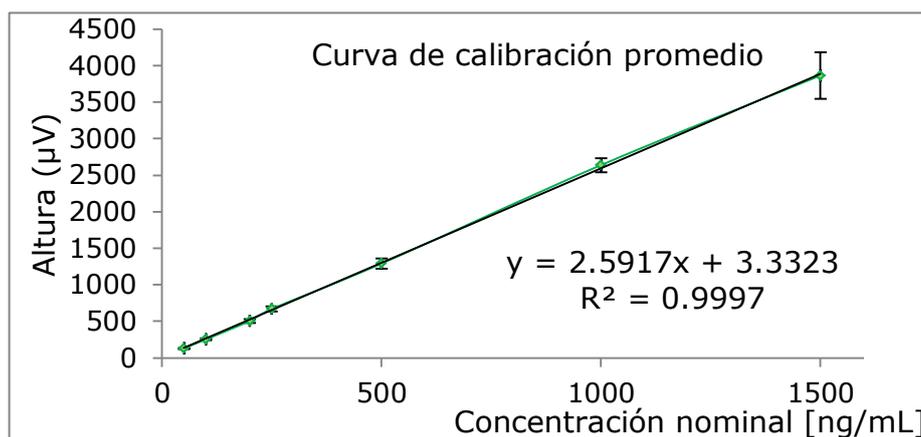


Figura 15. Curva de calibración promedio. Concentración nominal (ng/mL) vs Altura (μV) promedio de las tres curvas. $b=3.3323$; $m=2.5917$; $R^2=0.9997$

Identidad de la recta

La concentración recuperada promedio de las tres curvas de calibración se indica en la Tabla 16. El C.V. y el %Desviación en todos los niveles de la curva de calibración fue menor al 15%, por lo tanto cumple con el criterio de aceptación.

Tabla 16. Identidad de la recta. Datos obtenidos del promedio de las tres curvas de calibración.

Concentración nominal (ng/mL)	Concentración experimental (ng/mL)	D.E.	C.V. (%)	%Desviación	Error estándar
50	50.48	2.17	4.31	0.96	1.25
100	97.94	9.29	9.48	2.06	5.36
200	195.03	2.16	1.11	2.48	1.25
250	258.56	7.10	2.75	3.42	4.10
500	497.11	2.52	0.51	0.57	1.45
1000	1017.86	36.90	3.62	1.79	21.30
1500	1484.09	108.00	7.28	0.01	62.35

La curva de calibración promedio de concentración nominal (ng/mL) contra concentración recuperada (ng/mL), se muestra en la Figura 16, en la que se obtuvo una pendiente (m)=0.996, una ordenada al origen (b)=2.2084, coeficiente de determinación (R^2)=0.9996 y un coeficiente de correlación (R)=0.9997.

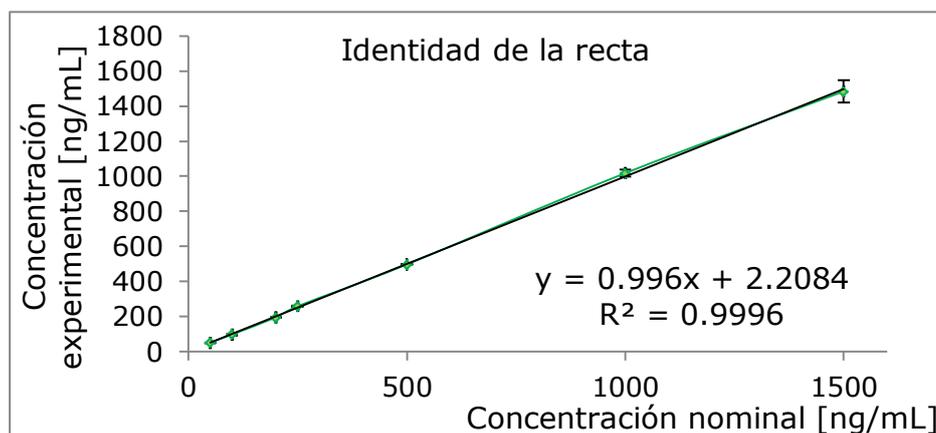


Figura 16. Identidad de la recta. Concentración nominal (ng/mL) vs Concentración recuperada promedio (ng/mL). $b = 2.2084$; $m = 0.996$; $R^2 = 0.9996$

Por lo tanto la curva de calibración promedio cumplió con los criterios de aceptación y es adecuada para la cuantificación en este método analítico en el intervalo de 50 ng/mL–1500 ng/mL.

- **Precisión y exactitud**

Repetibilidad

En la Tabla 17, se muestran los datos obtenidos de la cuantificación del quintuplicado de muestras control para determinar la repetibilidad. El C.V. de los tres niveles de concentración fue menor al 15%, por lo tanto el método analítico cumple con este parámetro, ya que proporcionó resultados sucesivos que no tienen grandes cambios bajo las mismas condiciones de trabajo en un mismo día de análisis.

Tabla 17. Repetibilidad. Datos obtenidos del quintuplicado de las muestras control para la determinación de la repetibilidad.

Concentración nominal (ng/mL)	150	750	1250
Concentración experimental (ng/mL)	171.47	743.35	1307.22
	150.02	758.38	1169.57
	169.42	665.70	1189.61
	146.33	759.39	1194.11
	156.44	705.69	1278.25
Promedio	158.74	726.50	1227.75
D.E.	11.31	40.35	60.90
C.V. (%)	7.12	5.55	4.96
%Desviación	5.83	3.13	1.84

Reproducibilidad

En la Tabla 18, se muestran los datos obtenidos de la cuantificación del quintuplicado de muestras control en tres días diferentes para determinar la reproducibilidad. El coeficiente de variación obtenido en los tres niveles de concentración fue menor al 15%, esto indica, que el método fue reproducible ya que proporcionó resultados que no tienen grandes cambios en diferentes condiciones de trabajo y en días diferentes de análisis.

El %Desviación en las muestras control fueron menores al 15%, lo que indica que el método es exacto ya que existe un alto grado de concordancia entre el valor nominal y el valor experimental.

Tabla 18. Reproducibilidad y exactitud. Datos obtenidos del quintuplicado de las muestras control en tres días diferentes.

Concentración nominal (ng/mL)	150	750	1250
Día 1 Concentración experimental (ng/mL)	154.89	709.84	1414.48
	157.93	805.19	1236.05
	159.31	840.92	1222.10
	166.37	792.86	1275.26
	164.62	833.47	1255.72
Día 2 Concentración experimental (ng/mL)	149.91	748.69	1179.51
	149.27	803.20	1259.60
	148.85	697.53	1212.35
	152.13	715.64	1079.67
	144.54	725.54	1162.49
Día 3 Concentración experimental (ng/mL)	171.47	743.35	1307.22
	150.02	758.38	1169.57
	169.42	665.70	1189.61
	146.33	759.39	1194.11
	156.44	705.69	1278.25
Promedio	156.10	753.69	1229.07
D.E.	8.56	52.21	76.81
C.V. (%)	5.48	6.93	6.25
%Desviación	4.07	0.49	1.67

Por lo tanto el método analítico fue preciso y exacto en el intervalo de 50 ng/mL–1500 ng/mL.

- **Estabilidad**

Estabilidad a corto plazo

Se determinó la estabilidad a corto plazo del método analítico. En la Tabla 19, se muestran los datos obtenidos después de procesar y cuantificar los tres niveles de concentraciones correspondientes a las muestras control en las condiciones de trabajo normales.

El C.V. y el %Desviación son menores al 15% para los tres niveles de concentración, lo que indica que las muestras fueron estables en el periodo normal de procesamiento, desde la preparación de la curva de calibración hasta la preparación de las muestras control ya que los valores experimentales tienen un alto grado de concordancia con los valores nominales.

Tabla 19. Datos obtenidos en la prueba de estabilidad a corto plazo.

Concentración nominal (ng/mL)	150	750	1250
Tiempo Cero			
Promedio	144.22	726.40	1240.33
D.E.	9.94	16.30	37.01
C.V.%	6.89	2.24	2.98
%Desviación	3.85	3.15	0.77

Estabilidad a largo plazo

En la Tabla 20, se indican los valores respectivos a la evaluación de la estabilidad a largo plazo. Obteniendo C.V. y un %Desviación menores al 15%, por lo tanto se determinó que la metformina en plasma es estable hasta 49 días que estuvieron las muestras en congelación.

Tabla 20. Datos obtenidos en la prueba de estabilidad a largo plazo.

Concentración nominal (ng/mL)	150	750	1250
Tiempo cero			
Promedio	143.81	724.16	1157.93
D.E.	3.49	16.04	47.95
C.V. (%)	2.43	2.22	4.14
49 días			
Promedio	130.93	729.00	1245.84
D.E.	15.40	23.87	108.53
C.V. (%)	11.76	3.27	8.71
%Desviación	8.95	0.67	7.59

Estabilidad a 4°C durante 24 h.

En la Tabla 21 se muestran los datos para la determinación de la estabilidad de la metformina en plasma a 4°C durante 24 horas. Como se puede observar, el C.V. y el %Desviación fueron menores al 15%, por lo tanto las muestras control bajo estas condiciones son estables.

Tabla 21. Datos obtenidos en la prueba de estabilidad a 4°C durante 24 h.

Concentración nominal (ng/mL)	150	750	1250
Tiempo Cero			
Promedio	144.22	726.40	1240.33
D.E.	9.94	16.30	37.01
C.V. (%)	6.89	2.24	2.98
24 h			
Promedio	142.56	767.96	1303.26
D.E.	1.88	29.15	38.07
C.V. (%)	1.32	3.80	2.92
%Desviación	1.15	5.72	5.07

Estabilidad a temperatura ambiente

Se determinó la estabilidad de la metformina en plasma a temperatura ambiente durante 24 horas, en la Tabla 22, se muestran los valores obtenidos y se indica que el C.V. y el %Desviación fueron menores al 15%. Estos valores demostraron que hay un alto grado de concordancia entre los valores de las muestras recién preparadas y las sometidas a temperatura ambiente durante veinticuatro horas.

Tabla 22. Datos obtenidos en la prueba de estabilidad a temperatura ambiente.

Concentración nominal (ng/mL)	150	750	1250
Tiempo Cero			
Promedio	144.22	726.40	1240.32
D.E.	9.94	16.30	37.01
C.V. (%)	6.89	2.24	2.98
24 horas			
Promedio	150.36	749.87	1279.41
D.E.	16.19	28.83	29.43
C.V. (%)	10.77	3.84	2.30
%Desviación	4.26	3.23	3.15

Estabilidad en el automuestreador

Los valores de concentración de la metformina de las muestras control posterior al procesamiento de extracción del plasma en el automuestreador, se indican en la Tabla 23. Se obtuvo un C.V. y un %Desviación menores al 15%. Por lo tanto, las muestras control procesadas fueron estables dentro del automuestreador hasta por 48 horas.

Tabla 23. Datos obtenidos en la prueba de estabilidad en el automuestreador.

Concentración nominal (ng/mL)	150	750	1250
Tiempo Cero			
Promedio	149.05	739.46	1261.09
D.E.	7.21	12.71	40.63
C.V. (%)	4.84	1.72	3.22
48 horas			
Promedio	157.74	805.84	1327.76
D.E.	12.55	45.72	25.73
C.V. (%)	7.96	5.67	1.94
%Desviación	5.83	8.977	5.27

Ciclos de congelación-descongelación

Por último, dentro de la evaluación de la estabilidad de la metformina en plasma se evaluaron tres ciclos de congelación-descongelación. En la Tabla 24, se observa que el C.V. y el %Desviación fueron menores al 15%. Las muestras soportan los tres ciclos continuos de congelación-descongelación de 12 horas.

Tabla 24. Datos obtenidos en la prueba de estabilidad a tres ciclos de congelación-descongelación.

Concentración nominal (ng/mL)	150	750	1250
Tiempo Cero			
Promedio	149.05	739.46	1261.09
D.E.	7.21	12.71	40.63
C.V. (%)	4.84	1.72	3.22
Tercer Ciclo			
Promedio	143.28	784.68	1285.45
D.E.	3.77	2.11	32.45
C.V. (%)	2.63	0.27	2.52
%Desviación	3.87	6.11	1.93

Estabilidad en solución

En la Tabla 25, se indican los valores de las respuestas analíticas que se obtuvieron en la determinación de la metformina en solución. Se concluyó que es estable hasta 15 días a 4°C, ya que el C.V. y el %Desviación fueron menores al 10%.

Tabla 25. Datos obtenidos en la prueba de estabilidad en solución.

Concentración nominal (ng/mL)	150	750	1250
Tiempo cero			
Promedio	334.17	1681.17	2781.00
D.E.	17.70	131.23	88.04
C.V. (%)	5.30	7.81	3.167
15 días			
Promedio	366.83	1846.00	2936.00
D.E.	10.78	109.79	211.75
C.V. (%)	2.94	5.95	7.21
%Desviación	9.78	9.80	5.57

- **Recobro**

En la Tabla 26 se muestran los datos que se obtuvieron de la comparación de una muestra extraída y una muestra en solución de la misma concentración, en este caso se utilizaron los puntos control, la muestra en solución se considera el 100% con respecto a la extraída.

Tabla 26. Datos obtenidos en la prueba de recobro del método analítico.

Concentración nominal (ng/mL)	Altura Plasma (μ V)	Altura Sistema (μ V)	Recobro	%Desviación
150	419	373	112.33	-12.33
	435	409	106.36	-6.36
	420	392	107.14	-7.14
	508	476	106.72	-6.72
	422	439	96.13	3.87
	445	417	106.71	-6.71
750	2316	2293	101.00	-1.00
	2399	2096	114.46	-14.46
	2394	2252	106.31	-6.31
	2377	2255	105.41	-5.41
	2231	2304	96.83	3.17
	2439	2234	109.18	-9.18
1250	4031	4249	94.87	5.13
	4166	4303	96.82	3.18
	3966	4118	96.31	3.69
	3852	4158	92.64	7.36
	3775	3619	104.31	-4.31
	4069	3959	102.78	-2.78
Promedio			103.13	-3.13

Se obtuvo un promedio de 103.13%, para este parámetro no existe un criterio establecido, sin embargo, el recobro fue constante, preciso y reproducible en los valores de análisis.

- **Efecto de dilución**

El efecto de dilución se evaluó, para aquellas muestras que no se encontraran dentro del intervalo de la curva de calibración de 50 ng/mL-1500 ng/mL. Por lo tanto se preparó una muestra de concentración de 2000 ng/mL y se realizó una dilución 2:1 con plasma libre de fármaco para obtener una concentración final de 1000 ng/mL.

Para preparar la muestra de 2000 ng/mL, se midieron 640 μ L de plasma libre de fármaco y se le adicionaron 160 μ L de solución de 10 μ g/mL, en un tubo eppendorf de 1.5 mL, de esta mezcla se midieron 100 μ L, se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se le agregaron 100 μ L de plasma libre de fármaco, se procesaron las muestras y se analizaron.

En la Tabla 27, se muestran los datos obtenidos del triplicado de diluciones de concentración de 2000 ng/mL, el C.V. y el %Desviación fueron menores al 15% respectivamente. Por lo tanto el método analítico es capaz de cuantificar muestras que no están dentro del intervalo de trabajo en proporción 2:1.

Tabla 27. Datos obtenidos en la prueba de efecto de dilución del método analítico.

Muestra	Concentración experimental (ng/mL)	%Desviación
Dilución 1	1817.07	9.15
Dilución 2	1832.60	8.37
Dilución 3	1989.65	0.52
Promedio	1879.77	
D.E.	95.47	
C.V. (%)	5.08	

- **Tolerancia**

Se probó la tolerancia del método analítico a cambios en el pH de 7.0 \pm 0.3 de la solución amortiguadora de NaH₂PO₄ · H₂O. Para tal efecto se prepararon 500 mL de solución amortiguadora de NaH₂PO₄ · H₂O a una concentración 10 mM y se ajustó el pH a 6.7 y 7.3. Finalmente se preparó la FM en proporción 80:20 (%v/v). Se procesó una curva de calibración y las muestras control por triplicado y se inyectaron las condiciones normales y posteriormente con la FM con cambios de pH.

En la Tabla 28 y Tabla 29, se observan que el C.V. en los niveles de concentración de las muestras control es menor al 15% y que existe

un alto grado de concordancia entre los valores en condiciones normales (pH 7.0) y los valores con cambio de pH, ya que el %Desviación es menor al 15%.

Tabla 28. Datos obtenidos en la prueba de tolerancia del método analítico a un cambio de pH de 6.7 de la solución amortiguadora de NaH_2PO_4 .

Concentración nominal (ng/mL)	150	750	1250
Condiciones normales: FM, pH 7			
Concentración experimental (ng/mL)	159.94	757.00	1241.84
	152.71	735.87	1228.02
	146.89	754.43	1249.17
Promedio	153.18	749.10	1239.67
D.E.	6.54	11.53	10.74
C.V. (%)	4.27	1.54	0.87
Cambio de pH 6.7			
Concentración experimental (ng/mL)	162.83	746.29	1233.69
	159.11	738.52	1242.57
	152.06	748.75	1243.84
Promedio	158.00	744.52	1240.03
D.E.	5.47	5.34	5.53
C.V. (%)	3.46	0.72	0.45
%Desviación	3.14	0.61	0.03

Tabla 29. Datos obtenidos en la prueba de tolerancia del método analítico a un cambio de pH de 7.3 de la solución amortiguadora de NaH₂PO₄.

Concentración nominal (ng/mL)	150	750	1250
Condiciones normales: FM, pH 7			
Concentración experimental (ng/mL)	159.94	757.00	1241.84
	152.71	735.87	1228.02
	146.89	754.43	1249.117
Promedio	153.18	749.10	1239.67
D.E.	6.54	11.53	10.74
C.V. (%)	4.27	1.54	0.87
Cambio de pH 7.3			
Concentración experimental (ng/mL)	158.31	783.58	1278.63
	159.21	761.82	1273.95
	152.39	783.30	1305.05
Promedio	156.63	776.23	1285.88
D.E.	3.70	12.49	16.77
C.V. (%)	2.37	1.61	1.30
%Desviación	2.25	3.62	3.73

Esto indica que el método tolera cambios de pH de la solución amortiguadora de NaH₂PO₄ · H₂O, y que dicho cambio solo afecta en el tiempo de retención de la metformina, como se muestra en la Figura 17, en la que a pH 6.7 el tiempo de retención es menor y a pH de 7.3 es mayor.

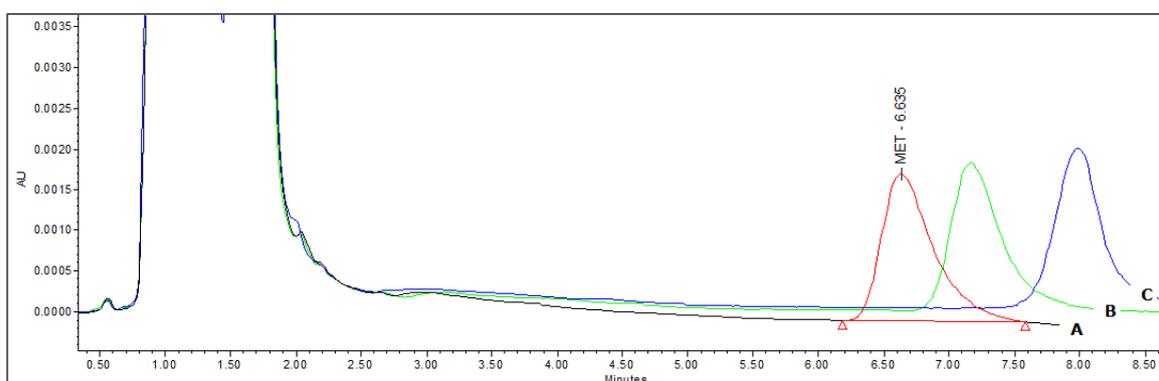


Figura 17. Tolerancia del método analítico A) pH 6.3 B) pH 7 C) 7.3

7. Discusión

Los métodos desarrollados para cuantificar analitos deben arrojar resultados confiables y adecuados para su finalidad ya que muchas de las decisiones que se toman están basadas en la información que estos datos proporcionan. Para tal efecto, se hace uso de la validación.

En la presente tesis, se desarrolló y validó un método analítico para la determinación de los niveles plasmáticos de metformina de acuerdo a lo indicado en la norma NOM-177-SSA1-2013. Aunque existen diversos métodos descritos en la literatura para la cuantificación de este analito, estos difieren de acuerdo al propósito del estudio para el que fueron desarrollados y a las herramientas que posee cada laboratorio.

El método analítico que se expone, se basó en el método de Ching-Ling Cheng³⁶, con las modificaciones correspondientes de acuerdo a la infraestructura del laboratorio de la Unidad de Investigación en Farmacología del INER.

En primer lugar se desarrolló un método de extracción para obtener la metformina del plasma. Debido a la alta polaridad que presenta esta molécula, no permitió que fuera sencilla su extracción utilizando únicamente disolventes orgánicos. En consecuencia, el procedimiento de extracción desarrollado partió de dos procesos, el primero de una precipitación de proteínas con acetonitrilo, seguido de una extracción líquido-líquido con diclorometano.

La gran ventaja que presentó la precipitación de proteínas con acetonitrilo fue que removió la mayor parte de sustancias endógenas del plasma, esto debido a que el acetonitrilo presenta menor constante dieléctrica que el agua lo que provocó un incremento de las fuerzas de atracción entre las cargas opuestas disminuyendo la solubilidad, lo que permitió que se formaran agregados proteicos que

precipitaron; y con la extracción líquido-líquido, el cloroformo separó el acetonitrilo de la fase acuosa para poder cuantificar la metformina. Realizar estos procesos permitió que el tiempo de retención de este analito fuera relativamente corto (7.5 min), y que además no presentara interferencias cercanas que se atribuyeran a componentes del plasma.

Se empleó una columna de fase normal, en la literatura se encontró que la mayoría emplea columnas de fase reversa, tales como las columnas C-18^{17,38,39} y también hacen uso de pre-columnas.³⁶ La diferencia en el tipo de columnas hace que las condiciones cromatográficas sean variables, desde la composición de la fase móvil, la solución amortiguadora y la temperatura de esta.

A pH de 7, la metformina se encuentra en su especie catiónica e interacciona con los grupos silanol que conforman el material de empaquetamiento de la columna Resolve Silica. Como es una columna de fase normal, las moléculas de metformina tienen mayor afinidad por interactuar con la fase estacionaria, sin embargo, al hacer que la fase móvil fuera más polar el tiempo de elución fue menor.

Otra de las condiciones primordiales fue la longitud de onda, en este método, se eligió una $\lambda = 234$ nm. Con respecto a otros métodos este parámetro difiere de los 230-256 nm.

Este método no cuenta con estándar interno, pero en la literatura está reportado que se puede emplear fenitoína¹⁷, propanolol⁷ y atenolol³⁶. A pesar de que la norma no pide que el método deba contener un estándar interno como prueba determinante, la función de este, era compensar los errores sistemáticos al colocarlo en una concentración constante en la curva de calibración y muestras control para representar la razón entre la señal del analito y la del E.I. como función de la concentración del analito.

Una vez que se encontraron las condiciones cromatográficas apropiadas, se probaron diferentes unidades de plasma, y se realizó una mezcla de estas para comenzar con la validación.

Se aseguró el adecuado funcionamiento del sistema cromatográfico constituido por el cromatógrafo, el detector UV, la columna, el filtro en línea y la fase móvil. Para este fin, el parámetro de adecuabilidad que se realizó al inicio de cada corrida analítica, permitió establecer el criterio para proceder a cada una de las pruebas de validación del método analítico.

Se comprobó que el método propuesto fue apto para la determinación de metformina en muestras de plasma, ya que no se observaron señales de interferencia de componentes endógenos debidos al plasma normal, hemolizado y lipémico. También se demostró que la cafeína, el acetaminofén, la heparina y el EDTA no interfieren en el tiempo de retención de la metformina.

Se realizó una validación parcial ya que hubo un cambio en el método analítico por el procesamiento de las muestras, ya que las condiciones de la curva de calibración se tuvieron que modificar para cumplir con el criterio que establece la norma NOM-177-SSA1-2013 sobre el porcentaje de disolvente, que no debe ser mayor al 5% del volumen final preparado, por lo tanto se evaluó la curva de calibración, precisión, exactitud, límite de cuantificación y efecto de dilución.

El intervalo de la curva de calibración establecido fue de (50–1500) ng/mL y por tanto el límite de cuantificación fue de 50 ng/mL. En comparación con otros métodos reportados, se encontraron intervalos de (1250–2500) ng/mL¹⁷, (10-2000) ng/mL³⁶ y (62.5–4000) ng/mL³⁷. La diferencia se atribuye a la $C_{m\acute{a}x}$ reportada de la metformina que está determinada por las dosis administradas.

Las pruebas de precisión y exactitud son indispensables en la validación de un método analítico, en esta norma se estableció que el C.V. y el %Desviación tienen que ser menores al 15% para aceptar los parámetros.

En la Tabla 30 se muestra las condiciones de almacenamiento en las que se evaluó la estabilidad de la metformina en plasma.

Tabla 30. Condiciones De estabilidad experimentales

	Muestra procesada	Contenedor	Tiempo	Temperatura
Condiciones normales**	Si	Viales para HPLC Waters	1 h	25 °C
En refrigeración*	No	Tubos-Eppendorff de 1.5 mL	24 h	4 °C
Automuestreador**	Si	Viales para HPLC Waters	48 h	25 °C
Temperatura ambiente*	No	Tubos-Eppendorff de 1.5 mL	24 h	25 °C
Ciclos de congelación-descongelación*	No	Tubos-Eppendorff de 1.5 mL	3 ciclos de C/D de 12 h cada uno	-80 °C
Congelación*	No	Tubos-Eppendorff de 1.5 mL	49 días	-80 °C

*Las muestras control de calidad se procesaron posterior a almacenarlas en estas condiciones para determinar la estabilidad.

**Las muestras control de calidad se procesaron y se almacenaron en estas condiciones para determinar la estabilidad.

En la Tabla 31 se indican las condiciones de almacenamiento reportadas en la literatura a las cuales la metformina es estable.³⁶

Tabla 31. Condiciones de estabilidad reportadas en la literatura.

	Muestra procesada	Contenedor	Tiempo	Temperatura
Ciclos de congelación-descongelación	No	Tubos-Eppendorff de 1.5 mL	2 ciclos de C/D	-10 °C
Temperatura ambiente	No	Tubos-Eppendorff de 1.5 mL	48 h	25 °C
Automuestreador	Si	Viales para HPLC	72 h	25 °C
Temperatura ambiente	Si	Viales para HPLC	72 h	25 °C
Congelación	No	Tubos-Eppendorff de 1.5 mL	5 meses	-10 °C
			8 meses	-20 °C
			8 meses	-30 °C
			2 años	-80 °C

No se indica la estabilidad en solución, pero en este estudio se demostró que la metformina es estable durante 15 días en agua como disolvente.

El recobro determinado en este método fue de 103.13%. En otros métodos, están reportados valores de 76%³⁶, 97%³⁷ y 93.7%⁷. Como supone, existe gran variabilidad entre los resultados de este parámetro, esto es consecuencia principalmente del proceso de extracción de la metformina en plasma, ya que de este depende cuanto se recupere del analito y también, de las condiciones cromatográficas en cada uno de estos métodos.

No obstante, la norma NOM-177-SSA1-2013, no solicita determinar el recobro, aunque es un parámetro que permite evaluar que durante la validación y el análisis de muestras los resultados sean constantes, precisos y exactos, independientemente que no sea del 100%.⁴¹

De acuerdo al intervalo de la curva de calibración, se propuso la concentración para realizar el efecto de dilución, en este caso, se empleó una dilución 2:1 considerando una muestra de concentración de 2000 ng/mL. El C.V. y el %Desviación fueron menores al 15%, por

lo tanto fue adecuado. Con respecto a lo indicado en la literatura, los valores son variables porque cada uno presenta un intervalo en la curva de calibración diferente.

Finalmente se evaluó la tolerancia del método analítico, y se concluyó que el método tolera cambios en el pH de la solución amortiguadora de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ de 6.3 y 7.3. Es importante indicar que la tolerancia no es un parámetro que se deba evaluar a efecto de la norma NOM-177-SSA1-2013, sin embargo, indica la capacidad del método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas en las condiciones de trabajo que van a indicar la confiabilidad en condiciones normales.⁴¹

8. Conclusión

Se desarrolló y se optimizó un método analítico para la determinación de los niveles plasmáticos de metformina por HPLC-UV, mediante la extracción por precipitación de proteínas y una extracción líquido-líquido.

La validación se llevó a cabo, de acuerdo a lo descrito en la norma NOM-177-SSA1-2013, complementando con las pruebas de tolerancia y recobro indicadas en la NOM-177-SSA1-1998.

El método analítico es selectivo para la metformina ya que no presentó interferencias para su determinación en su interacción con algunos fármacos de uso común y en estado hemolizado y/o lipémico.

El método analítico validado cumple con la curva de calibración, es exacto y preciso en el intervalo de 50 ng/mL-1500 ng/mL para la metformina. Con un límite de cuantificación de 50 ng/mL y un recobro promedio de 103.13%.

Así mismo, satisface las condiciones de estabilidad en plasma y en solución.

El método validado cumple con los criterios de la NOM-177-SSA1-2013, por lo que es un método confiable que puede ser utilizado para estudios farmacocinéticos, de monitoreo terapéutico, de bioequivalencia o en cualquier estudio en el que se requiera determinar las concentraciones de metformina en plasma.

9. Bibliografía

1. Naidis I., y Turpeinen S. Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. 2010. Páginas 5-10
2. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. Guía de validación de métodos analíticos. 2002. Páginas 1-10
3. Validación de métodos analíticos. Buenas prácticas para Laboratorios Nacionales de Control Farmacéutico. 2002. Páginas 12-15
[http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13 Modulo VALIDACION de Metodos Fisicoqcos.pdf](http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13_Modulo_VALIDACION_de_Metodos_Fisicoqcos.pdf)
4. Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos. Organización Mundial de la Salud. Serie de Informes Técnicos de la OMS, 2010. Número 957. Páginas 32-34
5. Porta V., Grigoletto S. S., Kazue K. E., Emiko K. E., Popst A. Y., Fakuda K., Dos Reis S. C. HPLC-UV determination of metformin in human plasma for application in pharmacokinetics and bioequivalence studies. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2008; 46(1):143-147
6. Duffau. B., Rojas. F., Guerrero. I., Roa. L., Rodríguez. L., Soto. M., Aguilera. M., y Sandoval. S. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos". Instituto de Salud Pública de Chile. 2010. Páginas 21-26
7. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. FDA. USA. November 2005.
8. Guideline on Bioanalytical Method Validation. European Medicines Agency (EMA/EMA). July 2011
9. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. Guidance for industry. FDA. February 2014.
10. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. FDA. September 2013.
11. Validation of compendial procedures. Chapter 1225. USP. 2014
12. 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 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. Páginas 14-17

13. Vega R. G. Criterios para la Validación de Métodos Físicoquímicos. Comisión de control analítico y ampliación de cobertura. Secretaría de Salud. 2011. Páginas 1-3

14. Sarno M. del C., Delfino M. R., Chahin C. L. Desarrollo de un método de control de calidad para comprimidos de metformina. Universidad Nacional del Nordeste. Secretaría General de Ciencia y Técnica. 2008. Páginas 1

15. Paudel C. H., Thapa P., Van Schepdael A. Simple HPLC-UV method for the quantification of metformin in human plasma with one step protein precipitation. Saudi Pharmaceutical Journal. 2014; 22(5):483-487

16. Gong L., Goswami S., Giacomini K. M., Altman R. B., and Klein T. E. Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. Pharmacogenet Genomics. 2012; 22(11):820-27

17. Salazar Á. Y. Uso de la metformina en la diabetes mellitus tipo 2. Rev. Cubana de Farmacia. 2011; 45(1):157-166

18. En búsqueda de la longevidad: la historia de la metformina <https://eduardosetti.wordpress.com/2016/08/31/en-busqueda-de-la-longevidad-la-historia-de-la-metformina/>

19. Meng H. T., Hussain A., Mizokami S. K., and MacEachern M. Metformin: From Research to Clinical Practice. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. 2016; 45(4):819-43

20. Graham G. G., Punt J., Arora M., Day R. O., Doogue M.P., Duong J.K., Furlong T.J., Greenfield J.R., Greenup L.C., Kirkpatrick C.M., Ray J.E., Timmins P., Williams K. M. Clinical pharmacokinetics of metformin. Clin Pharmacokinet. 2011; 50(2):81-98

21. Monografía del Clorhidrato de Metformina <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00331>

22. Velázquez M. O., Lara E. A., y Tapia C. R. Metformina y Síndrome Metabólico. Secretaría de Salud. 2002. Páginas 13-37

23. Monografía del Clorhidrato de Metformina <https://www.drugs.com/pro/metformin.html>

24. Monografía del Clorhidrato de metformina. Glucophage 500 mg-850 mg-1000 mg. Comprimidos Recubiertos.
<http://www.elea.com/files/prospectos/ae423ac50fae3701f9131e2ca0cc34e7.pdf>
25. Monografía del Clorhidrato de metformina comprimidos de 500 mg y 850 mg.
<http://www.ispch.cl/encabezado/folletos/doc/METFORMINA2.pdf>
26. Tahrani, A. A., Varughese, G. I., Scarpello, J. H., and Hanna F. W. F. Metformin, heart failure, and lactic acidosis: is metformin absolutely contraindicated? *British Medical Journal*. 2007; 335(7618):508-512
27. Díaz N. A., Bárcena R. A., Fernández R. E., Galván C. A., Jorrín N. J., Peinado P. J., Meléndez-Valdés T. F., y Túnez F. I. Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Campus Universitario de Rabanales. Páginas 1-8
28. Skoog D., West D., Holler J., y Crouch S. Fundamentos de química analítica. Novena Edición. Cengage Learning Editores, S.A. de C.V. 2005. Páginas 912-932
29. Moldoveanu S. C., David V. Essentials in Modern HPLC Separations. Editorial Elsevier, 2012. Pages 1-14.
30. Gissera G. M. de J., Quintana M., Silva de C. M. del P. Introducción a la cromatografía líquida en alta resolución. Ediciones UAM. 2009. Páginas 11-22.
31. Waters. HPLC-High Performance Liquid Chromatography
http://www.waters.com/waters/es_MX/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography-Explained/nav.htm?cid=10048919&locale=es_MX
32. Agilent Technologies. Nuevas tendencias en Preparación de Muestras.
[http://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/Public/1-Nuevas%20tendencias%20en%20Extraccion%20en%20Fase%20Soli da%20\(SPE\)-8%20Marzo%20Almiral%20version%202.pdf](http://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/Public/1-Nuevas%20tendencias%20en%20Extraccion%20en%20Fase%20Soli da%20(SPE)-8%20Marzo%20Almiral%20version%202.pdf)
33. Guarnizo F., y Anderson M. Y. Experimentos de Química Orgánica. Con enfoque en ciencias de la vida. Ediciones Elizcom. 2009. Páginas 77-80
34. Jiménez D. I. Tesis Doctoral "Desarrollo de Metodología Analítica para la Determinación de Tensoactivos y sus productos de Degradación mediante diferentes técnicas separativas" Universidad

de Granada, Facultad de Ciencias, Departamento de Química Analítica. Granada. 2009. Páginas 135-139

35. Universidad Autónoma de Metropolitana. Precipitación. Planta piloto de fermentaciones. Departamento de Biotecnología. <http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/sho/Precipitacion.pdf>

36. Ching-Ling C., Chen-Hsi C. Determination of metformin in human plasma by high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2001; 762(1):51-58.

37. Kah Hay Yuen, Kok Khiang Peh. Simple high-performance liquid chromatography method for the determination of metformin in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 1998; 710(1):243-246

38. Alemón M., Chávez P., Ramírez M., Rivera E. y García Á. Estabilidad fisicoquímica de tres marcas genérica de metformina en solución. *Acta Pediátr Mex*. 2014; 35:104-110

39. García P., León R., y Martínez E. Métodos analíticos necesarios para el desarrollo de tabletas de metformina 500 mg. *Rev. Cubana de Farmacia*. 2009; 43(3):1-9

40. Muñoz C. E., Ocampo O. D. H., Espinal L. E. E., Sanín J., Yepes J. N., y Lopera M. E. A. Estudio de biodisponibilidad de metformina 850 mg tabletas de liberación inmediata. *Rev CES Med*. 2015; 29(2):199-210.

41. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.

42. Sevilla-Tirado F.J., González-Vallejo E.B., Leary A.C., Breedt H.J., Hyde V.J., Fernández-Hernando N. Bioavailability of two new formulations of paracetamol, compared with three marketed formulations, in healthy volunteers. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2003; 25(7):531-5.