



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS**

DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Desarrollo, Optimización y Validación de un Método
Bioanalítico por HPLC/PDA para la determinación de
Metformina en Plasma”**

Tesis que presenta

QFB Tania Alexandra Smith Márquez

Para obtener el Grado de Maestra en Ciencias

En la Especialidad de

Farmacología

Director de Tesis:

Dr. Carlos Hoyo Vadillo

Ciudad de México

Diciembre, 2019

El presente trabajo de investigación se desarrolló bajo la tutoría del Dr. Carlos Hoyo Vadillo en las instalaciones del laboratorio de Farmacogenómica (laboratorio 10) del departamento de Farmacología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), en el periodo comprendido de septiembre de 2018 a diciembre de 2019 con el apoyo de la beca CONACyT No. 893243.

Dedicatoria

A Carolina, Juan Eduardo y Consuelo,
los motores de mi vida.

Agradecimientos

Este trabajo no hubiera podido llevarse a cabo sin la valiosa colaboración de:

El Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por la oportunidad de incorporarme a su programa de Maestría en Ciencias con Especialidad en Farmacología.

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme otorgado la beca 893243 que me permitió dedicarme exclusivamente a este proyecto.

La Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación del gobierno de la Ciudad de México por el financiamiento del proyecto: Farmacocinética de Metformina y Pioglitazona en Voluntarios Sanos, SECITI 098/2017.

Mi director de tesis, el Dr. Carlos Hoyo Vadillo por su guía e inspiración.

Mi compañera de laboratorio, la QFBT Alejandra Sánchez Solares, por su talento, flexibilidad, compromiso y aptitud para trabajar en equipo.

Nuestra auxiliar de laboratorio: la Lic. Flor María Galván Rodríguez, por su asistencia técnica, tenacidad, paciencia, compromiso y aptitud para trabajar en equipo.

Mis asesores de tesis: la Dra. Liliana Favari Perozzi y el Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo, por todo su apoyo, aportación de conocimiento y generosidad.

Los doctores del Cinvestav:

El Dr. Jaime García Mena, por su disposición a compartir su conocimiento además de su apoyo en menesteres económicos, tecnológicos y administrativos.

El Dr. Pablo Muriel de la Torre, el Dr. Carlos Cerda García-Rojas, el Dr. Gilberto Castañeda Hernández, por su orientación durante el desarrollo de este trabajo.

Los auxiliares de investigación:

La Hidrob. Ma. Teresa García Camacho por su asistencia técnica y su buena disposición para apoyarnos en el manejo de equipo de laboratorio.

El Biol. Alberto Piña Escobedo, por su asistencia técnica durante el desarrollo de este trabajo.

La técnica Lic. Rosa Elena Flores Beltrán, por haber proporcionado la capacitación en el manejo de equipo de laboratorio.

El QFI Gregorio Martínez Serrano, Ingeniero de Servicio de Instrumentación y Servicio en Analítica, por haber resuelto los problemas técnicos a los que nos enfrentamos en el día a día durante el desarrollo de este trabajo.

Mi esposo Eduardo Romero y mis hijas Carolina y Consuelo por su amoroso apoyo y paciencia.

Mis papás, Roberto y Consuelo que siempre han apoyado todos los proyectos en los que me he embarcado

De Dios por darme la fortaleza para levantarme y la luz que ilumina el camino que me queda por andar.

Índice

Abreviaturas	4
Índice de figuras.....	7
Índice de tablas	9
Resumen.	10
Abstract.....	11
1. Introducción	2
1.1 ¿Qué es la diabetes y por qué es importante estudiarla?	2
1.2 Fármacos disponibles para el tratamiento de la diabetes.	3
1.3 ¿Por qué seleccionar metformina para este estudio?.....	5
1.4 Propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y farmacodinámicas de la metformina.	7
1.5 Análisis de metformina en plasma.	9
1.6 Validación del Método Analítico.....	14
1.7 Justificación.....	19
1.8 Objetivo General	19
1.9 Objetivos Específicos	20
2. Materiales y Métodos.....	21
2.1 Equipo, Materiales, Consumibles, Sustancias de Referencia, Reactivos y Material Biológico.....	21
2.1.1 Equipo	21
2.1.2 Materiales	21
2.1.3 Consumibles	22
2.1.4 Materiales de Referencia.....	22
2.1.5 Reactivos	23
2.1.6 Material Biológico.....	23
2.2 Desarrollo Analítico.....	24

2.2.1	Definición de condiciones cromatográficas.....	25
2.2.2	Desarrollo del método de tratamiento de muestra.	28
2.2.3	Evaluación y dictaminación preliminar del sistema cromatográfico, del método de extracción y del intervalo de cuantificación.	32
2.2.4	Descripción del método desarrollado.	38
2.3	Validación del Método Analítico.....	42
2.3.1	Definición de los Parámetros de Validación y los Criterios de Aceptación de las pruebas a realizar (Protocolo de Validación)	42
3.	Resultados.....	53
3.1	Adecuabilidad del Sistema.....	53
3.2	Linealidad.....	53
3.3	Selectividad.....	59
3.4	Estabilidad de la muestra	61
3.4	Precisión (RyR) y exactitud del método.	65
3.6	Sensibilidad.....	74
3.7	Integridad de la Dilución.	75
3.8	Recobro Absoluto.	77
4.	Discusión.	79
5.	Conclusiones	83
6.	Perspectivas.....	84
7.	Anexos	85
8.	Bibliografía.....	97

Abreviaturas

%R	Porcentaje de recobro.
CAN	Acetonitrilo.
ADP	Difosfato de adenosina
AM	Automuestreador
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPK	Protein-cinasa adenosina monofosfato
ANOVA	Análisis de varianza.
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, Brasil
B0	Blanco cero
BM	Blanco muestra
C18	Octadecilsilano
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
Cmax	Concentración plasmática máxima
CN	Columna con empaque cianosilano
Conc	Concentración
CV	Coefficiente de varianza
DGHS	Directorate General of Health Services, India
DT1	Diabetes tipo 1
DT2	Diabetes tipo 2
EE	Error estándar
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EMA	European Medicines Agency, Comunidad Europea
FDA	Food and Drug Administration
FM	Fase móvil
GIP	Péptido insulínico dependiente de glucosa
GLP-1	Péptido similar al glucagón-1

GLUT-4	Transportador de glucosa 4
HILIC	Hidrophilic interaction chromatography (Cromatografía de interacción hidrofílica)
HLB	Hidrophilic-lipohilic balance (Balance hidrofílico-lipofílico)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía de líquidos de alta resolución)
IC	Intercambio catiónico
ICH	International Council of Harmonisation (Consejo internacional de armonización)
IDPP-IV	Inhibidores de la dipeptidil-peptidasa IV
IPC	Ion Pair Chromatography (Cromatografía de par iónico)
LIC	Límite inferior de cuantificación
LSC	Límite superior de cuantificación
M1	Solución estándar de metformina 1
M2	Solución estándar de metformina 2
MATE1	Transportador multidrogas y extrusión de toxinas 1
MCA	Muestra cargada de concentración alta
MCB	Muestra cargada de concentración baja
MCM	Muestra cargada de concentración media
Met	Metformina
MG	Meglitinidas
NIHS	National Institute of Health Sciences, (Instituto Nacional de Ciencias de la Salud), Japón
NPLC	Normal Phase Liquid Chromatography (Cromatografía de líquidos de fase normal)
OCT-1	Transportador de cationes orgánicos 1
PDA	Photodiode arrange detector (Detector de arreglo de diodos)
pH	Logaritmo inverso de la concentración del ión hidronio
pKa	Logaritmo inverso de la constante de ionización de ácidos débiles

PM	Peso molecular
PMAT	Transportador para monoaminas
PPAR- γ	Receptor activado por los proliferadores de peroxisomas gamma
R	Coefficiente de correlación
R1	Solución estándar de ranitidina 1
R2	Solución estándar de ranitidina 2
R ²	Coefficiente de determinación
R3	Solución estándar de ranitidina 3
Rani	Ranitidina
RPLC	Reverse Phase Liquid Chromatography (Cromatografía de líquidos de fase reversa)
RSS	Residuales
S	Desviación estándar
SGLT2	Cotransportador dependiente de sodio y glucosa tipo 2
SPE	Solid phase extraction (Extracción de fase sólida)
SU	Sulfonilureas
TR	Tiempo de retención
TZD	Tiazolidinedionas

Índice de figuras

Figura 1 Estructura, nombre químico, fórmula condensada, peso molecular de la metformina (Drugban, 2019).....	9
Figura 2 Interacción entre el par iónico y el analito en una columna C18. (García - Álvarez-Coque, 2015).....	11
Figura 3 Proyección tridimensional de un análisis de metformina con fenformina como estándar interno utilizando (PDA).	12
Figura 4 Homogeneidad o pureza del pico de metformina.....	13
Figura 5 Homogeneidad o pureza del pico de metformina que muestra impurezas .	13
Figura 6 Cromatograma de metformina (233 nm, 6.1 min) y ranitidina (320 nm, 9.8 min) en solución.....	27
Figura 7 Cromatograma de metformina (233 nm, 6.1 min) y ranitidina (320 nm, 9.8 min) en plasma.....	28
Figura 8 Protocolos de tratamiento de muestra probados durante el Desarrollo Analítico.	31
Figura 9 BM (cromatograma color rojo), vs B0:(cromatograma azul).	34
Figura 10 Linealidad día 1.....	35
Figura 11 Linealidad día 2.....	36
Figura 12 Inyección de plasma cargado con 2 345 ng/ ml de metformina y 1 440 ng/ml de Ranitidina, con tres inyecciones consecutivas de fase móvil.....	37
Figura 13 Adecuabilidad del Sistema.	53
Figura 14 Cálculos al preparar la curva de calibración.....	54
Figura 15 Gráfica de análisis de residuales de las 5 curvas de calibración preparadas.. ..	56
Figura 16 Resultados promedio de la prueba de linealidad.	56
Figura 17 Curva A.	57
Figura 18 Curva B.	57

Figura 19 Curva C.	58
Figura 20 Curva D.	58
Figura 21 Curva E.	58
Figura 22 Imagen a, plasma lipémico cargado con metformina y ranitidina vs BM del plasma lipémico. Imágenes b a la g, plasmas de 6 fuentes diferentes cargados con metformina y ranitidina.....	60
Figura 23 Muestras cargadas de concentración media preparadas de manera independiente a las que se les añadieron aproximadamente 800 ng/ml de glibenclamida, ibuprofeno, omeprazol y pioglitazona respectivamente	61
Figura 24 Análisis de Varianza de los resultados del analista 1..	69
Figura 25 Preparación de la curva de calibración del día 17 de septiembre.	70
Figura 26 Análisis de varianza de la prueba interdía-interanalista..	73
Figura 27 Cromatograma Azul: primer nivel de la curva de calibración correspondiente a 72 ng/ml de metformina. Cromatograma Rojo: BM.	74
Figura 28 Imagen donde se muestra que la pureza del nivel 1 de la curva de calibración tiene una pureza del 99.54%.	75
Figura 29 Comparación de la curva de calibración vs curva de calibración en plasma.	77

Índice de tablas

Tabla 1: Soluciones de Calibración durante el Desarrollo Analítico	32
Tabla 2: Curva de Calibración utilizada durante el Desarrollo Analítico	33
Tabla 3: Niveles de la Curva de Calibración.....	35
Tabla 4: Soluciones de Calibración	40
Tabla 5: Curva de Calibración en Plasma.....	40
Tabla 6: Curva de Calibración en Solución	52
Tabla 7: Tabla de comparación de las curvas de calibración	59
Tabla 8: Pruebas de Estabilidad.....	64
Tabla 9: Resultados día 1, analista 1.	66
Tabla 10: Resultados día 2, analista 1.	66
Tabla 11: Resultados día 3, analista 1.	67
Tabla 12: Resumen de los Resultados de la prueba de Repetibilidad.	68
Tabla 13: Cálculo del Sesgo para la prueba de Repetibilidad.....	69
Tabla 14: Resultados individuales de la prueba de Reproducibilidad (Robustez)	71
Tabla 15: Resumen de la prueba de Reproducibilidad (Robustez)	71
Tabla 16: Resumen de la prueba de Reproducibilidad (Robustez) incluyendo desviación estándar	72
Tabla 17: Cálculo de Sesgo para la prueba de Reproducibilidad.....	72
Tabla 18: Resultados de la prueba de Integridad de Dilución.....	76

Resumen

Existe gran variabilidad en los parámetros farmacocinéticos de los pacientes tratados con metformina y es importante estudiar las causas que puedan llevar a esta variación. El primer paso para estudiar este fenómeno consiste en obtener dichos parámetros farmacocinéticos y para eso se requiere de un método bioanalítico sensible, lineal, exacto, selectivo y reproducible. El propósito de esta tesis fue desarrollar y validar un método bioanalítico apto para el estudio de la farmacocinética de la metformina en pacientes y/o voluntarios sanos. Las muestras de plasma se precipitaron con HClO_4 con posterior neutralización con KOH , el sobrenadante acuoso se inyectó al cromatógrafo. Se utilizó un HPLC-PDA Shimadzu Prominence LC2030C3DPlus, equipado con una columna RP-C18 de Agilent, fase móvil KH_2PO_4 12.5 mM/SDS 0.002mM: ACN (73:27), flujo de 1.0 ml/min, detección con PDA a 233 nm para metformina (tiempo de retención 6 min) y 320 nm para ranitidina (tiempo de retención 12 min). El método desarrollado demostró ser sensible (LIC 71 ng/ml), lineal ($R^2 \geq 0.99$ y un intervalo de cuantificación que va de 71 a 2391 ng/ml), exacto ($94 < \%R < 112$), selectivo (no se encontraron interferencias endógenas ni exógenas) y reproducible ($\text{CV} \leq 9.41\%$). El método bioanalítico desarrollado y validado para la determinación de metformina en plasma, demostró ser adecuado para su utilización en estudios de farmacocinética y biodisponibilidad.

Abstract

A great variability in the pharmacokinetic parameters of patients treated with metformin has been widely reported. The first step to study this phenomenon is to have a reliable bioanalytic method to acquire such pharmacokinetic parameters. The desired method should be sensitive, linear, accurate, selective and precise. The purpose of this thesis was to develop and validate a bioanalytical method for the determination of metformin in plasma suitable for the study of the pharmacokinetics of metformin in patients and / or healthy volunteers. Plasma samples were precipitated with HClO_4 with subsequent neutralization with KOH , the aqueous supernatant was injected into the chromatograph. A Shimadzu Prominence LC2030C3DPlus HPLC-PDA was used, equipped with an Agilent RP-C18 column, KH_2PO_4 12.5 mM / SDS 0.002mM: ACN (73:27) as mobile phase with a 1.0 ml / min flow, and, UV detection at 233 nm for metformin (retention time 6 min) as well as 320 nm for ranitidine (retention time 12 min). The developed method proved to be sensitive (LLOQ 71 ng / ml), linear ($R^2 > 0.99$) and a quantification range going from 71 to 2391 ng / ml), accurate ($94 < \% R < 112$), selective (no endogenous or exogenous interferences found) and precise ($\text{CV} \leq 9.41\%$). The developed bioanalytical method for the determination of metformin in plasma, proved suitable for use in pharmacokinetic and bioavailability studies

1. Introducción

1.1 ¿Qué es la diabetes y por qué es importante estudiarla?

México está en la lista de los 10 países con mayor número de personas que viven con diabetes. En el 2012 había un poco más de 6.4 millones de personas que se sabían afectadas por la enfermedad. Se estima que para 2030, la prevalencia será del 12-18% y para el 2050 del 14 al 22% [1].

La Diabetes se encuentra entre las primeras causas de muerte en México, representa un gasto de 3,430 millones de dólares al año en atención y complicaciones. El total de personas con diabetes podría ser el doble. (Federación Mexicana de Diabetes, A.C.).

Existen dos tipos de diabetes:

La diabetes tipo 1 (DT1) es una enfermedad autoinmune que lleva a la destrucción de las células β del páncreas. El páncreas de estos pacientes no secreta insulina, por lo tanto, solo son candidatos a terapias a base de insulina e inhibidores del cotransportador dependiente de sodio y glucosa tipo 2 (SGLT2). Es decir, fármacos cuya acción no tiene relación con la capacidad del paciente para producir o responder a la acción de la hormona [2].

La diabetes tipo 2 (DT2) es una enfermedad crónico-degenerativa de etiología multifactorial [3]. Existen factores genéticos y epigenéticos involucrados, pero en los últimos años, se ha demostrado que la obesidad y el sedentarismo juegan un papel muy importante en su aparición y posterior desarrollo [4] [5]. La dieta rica en grasas y carbohidratos, el sedentarismo, aunado a la historia familiar del paciente, da lugar a la

aparición de depósitos ectópicos de grasa, de particular importancia son aquéllos que se dan en hígado y músculo. Estos adipocitos ectópicos, suelen ser hipertróficos y resistentes a la insulina [4]. Los miocitos y hepatocitos también desarrollan resistencia a la insulina. El primer signo de alarma es la hiperinsulinemia [3] [4]. Después de la ingesta de alimentos, los hepatocitos deberían relevar el proceso de gluconeogénesis por el proceso de glucogénesis, sin embargo, los hepatocitos no responden a la insulina, y como consecuencia, continúan produciendo glucosa y liberándola al torrente circulatorio, contribuyendo así a la hiperglicemia sensada por las células β , que, en respuesta, producirán más insulina [3] [4]. Además de la glucosa, estos hepatocitos también liberan triglicéridos provocando dislipidemia que se suma a la hiperinsulinemia [4]. La glucosa elevada, eventualmente daña las células pancreáticas, y es en este momento, cuando el organismo es incapaz de mantener sus niveles séricos de glucosa y se establece la diabetes [1].

1.2 Fármacos disponibles para el tratamiento de la diabetes.

Se han desarrollado varios grupos de fármacos con capacidad hipoglicémica, que buscan reestablecer la homeostasis de la glucosa por diversos mecanismos:

1. Fármacos que promueven la secreción de insulina, también conocidos como secretagogos [6]:
 - a. Independientes de glucosa:
 - i. Sulfonilureas (SU), como la glibenclámda, cuya acción principal es bloquear los canales de potasio dependientes de ATP, lo que provoca despolarización, entrada de calcio y liberación de insulina. Su principal efecto secundario es que puede provocar hipoglucemia.
 - ii. Meglitinidas (MG), como la repaglinida que, al igual que las SU, bloquean los canales de potasio dependientes de ATP, pero en un sitio de unión distinto al de las SU, estimulando la secreción de

insulina en el periodo postprandial sin originar una liberación de insulina sostenida entre las comidas, reduciendo así el riesgo de hipoglicemia.

b. Dependientes de glucosa:

- i. Miméticos de incretinas, como exenatida y liraglutida, pertenecen a un grupo de fármacos de imitan efectos endógenos de hormonas incretínicas como el péptido similar al glucagón-1, GLP-1, por sus siglas en inglés, incluyendo la mayor secreción de insulina glucosa-dependiente.
 - ii. Inhibidores de la dipeptidil-peptidasa IV (IDPP-IV). Inhiben la acción de esta enzima y bloquean la degradación de hormonas incretínicas, como el GLP-1 y el péptido insulínico glucosa-dependiente (GIP). Estas hormonas gastrointestinales causan un incremento en la secreción de insulina, aumentando tanto su concentración en el plasma como su tiempo de acción.
2. Antihiperoglucemiantes [6]. Inhibidores de las α -glucosídicas, como la acarbosa y el miglitol. Estos fármacos inhiben las α -glucosidasas intestinales retrasando la digestión de carbohidratos lo que lleva a una disminución de la hiperoglucemia postprandial.
 3. Inhibidores del cotransportador dependiente de sodio y glucosa tipo 2 (SGLT-2), como la vidagliptina, sitagliptina y saxagliptina [6]. Impiden la reabsorción de hasta el 90% de la glucosa en el túbulo contorneado proximal de la nefrona. Producen glucosuria y disminuyen los niveles plasmáticos de glucosa.
 4. Sensibilizadores a la insulina [6].
 - a. Tiazolidinedionas (TZD). La de mayor aplicación es la pioglitazona. Este grupo de fármacos son los únicos verdaderos sensibilizadores a la insulina, ya que su mecanismo de acción involucra el remodelado de lípidos, disminuyendo la presencia de adipocitos hipertróficos que son resistentes a la insulina y promoviendo la formación de nuevos adipocitos

sensibles a la hormona. El mecanismo de acción mejor estudiado y comprendido involucra la activación del receptor activado por los proliferadores de peroxisomas gamma, PPAR- γ , que se encuentra mayormente expresado en el tejido muscular, tejido graso e hígado. También aumentan la captación de la glucosa por el transportador GLUT-4 del músculo esquelético, disminuyen la gluconeogénesis y reducen la concentración de ácidos grasos en plasma y la síntesis de triglicéridos.

- b. Biguanidas. La única biguanida que se usa en la clínica en nuestros días es la metformina. Existen dos mecanismos de acción descritos en la bibliografía, el primero involucra el bloqueo del complejo I de la cadena respiratoria, el segundo, que se cree responsable de los efectos pleiotrópicos de este fármaco, consiste en la unión de la metformina con la subunidad α de la Adenosina Monofosfato Protein-cinasa, o AMPK por sus siglas en inglés. El bloqueo de esta enzima pone a la célula en modo catabólico inhibiendo tanto la lipogénesis como la gluconeogénesis y activando la β -oxidación de lípidos.

1.3 ¿Por qué seleccionar metformina para este estudio?

La metformina es el fármaco de primera línea cuando hay pérdida de la homeostasis del metabolismo de la glucosa [3] [7] [8] [9] [10]. Es un medicamento que se utiliza en Europa desde hace 40 años y en México desde 1993 [5]. Tiene efectos pleiotrópicos que aún en nuestros días no están completamente dilucidados. Sin embargo, se ha demostrado que [5] [7];

- Es un antihiper glucémico porque no estimula la secreción de insulina.
- Disminuye la absorción de glucosa a nivel intestinal.
- Disminuye la gluconeogénesis.
- Disminuye la glucogenólisis.

- Aumenta la captación y utilización de glucosa por los tejidos músculo-esquelético y adiposo.
- Aumenta la síntesis de glucógeno del tejido músculo-esquelético, sin modificar la síntesis de glucógeno hepático.
- Aumenta la oxidación de glucosa en el tejido músculo-esquelético.
- Disminuye la hiperinsulinemia y mejora la resistencia a la insulina.
- Disminuye el colesterol total, colesterol de baja densidad y triglicéridos.
- Favorece la reducción y mantenimiento del peso corporal.
- Disminuye la adhesividad plaquetaria.
- Mejora la función endotelial.
- Útil en prevención o retardo para el desarrollo de la DT2.
- La baja de niveles de glicemia con metformina, solo se observa en personas diabéticas y con resistencia a la insulina, no tiene efecto sobre las personas sanas.

La suma de los factores enlistados anteriormente, aunado a la alta disponibilidad del fármaco (las patentes han caducado y existen medicamentos seguros, eficaces y baratos), explican que la metformina sea el fármaco de primera elección.

Sin embargo, hay condiciones en las que no debe utilizarse [5] [7]:

- Hipersensibilidad a la metformina.
- Disfunción renal.
- Insuficiencia cardiaca congestiva
- Acidosis metabólica aguda o crónica, cetosis diabética.
- Alcoholismo.
- DT1.
- Hipoxia.
- Hepatopatías con elevación de transaminasas.

Además de las situaciones enlistadas, existe evidencia de que alrededor del 30% de los pacientes mexicanos no responden al tratamiento [9]. Una posible explicación es la presencia de polimorfismos en los transportadores involucrados en la absorción y secreción tubular de la metformina.

Para saber si el paciente es susceptible a la terapia con metformina puede evaluarse la concentración en plasma del medicamento después de la administración oral. Esta concentración puede determinarse utilizando técnicas cromatográficas.

A pesar de que existen varios métodos publicados para la determinación de metformina en plasma humano [11] [12] [13] [14] [15], la mayoría de ellos se diseñaron para monitorear la concentración de metformina en estado estacionario, y por lo tanto, los requisitos que debe reunir son diferentes a los que aplican para un método analítico para evaluar farmacocinética. Durante el desarrollo analítico, se evaluará la adecuación de los métodos documentados a los requerimientos de las normas vigentes [16] [17] [18] [19] [20] [21] [22] y, de ser necesario, se diseñarán modificaciones que permitan alcanzar los criterios de aceptación establecidos. Los métodos publicados se examinarán a profundidad en la discusión de esta tesis.

1.4 Propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y farmacodinámicas de la metformina.

La metformina es una molécula pequeña, su fórmula molecular es $C_4H_{11}N_5$, su peso molecular es 129.16 g/mol, con pKa de 12.4 [23] que a pH fisiológico se encuentra completamente ionizada.

La metformina se absorbe parcialmente ($\approx 55\% \pm 16\%$) [24] del intestino delgado a través del transportador para monoaminas (PMAT) de la cara luminal y el transportador de cationes orgánicos OCT1 que se encuentra en la cara basolateral de

los enterocitos [9] [25] [26] [27]. La Cmax se alcanza aproximadamente a las 3 horas y va de 0.6 a 3.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de sangre [25] [28] [29] [30]. El principal mediador para la entrada de metformina a los hepatocitos es el OCT1. Una vez en el hepatocito, la principal acción de la metformina es bloquear el complejo I de la cadena respiratoria, lo que lleva al aumento de concentración de AMP/ADP y bloquea el proceso de gluconeogénesis del hepatocito. Además, se ha demostrado la capacidad de este fármaco para unirse a la subunidad α de AMPK lo que inhibe la lipogénesis y favorece la oxidación de ácidos grasos [7] [31]. Derivado de su naturaleza polar, la metformina no se une a las proteínas del plasma ni es sustrato para las enzimas del Citocromo P450. Se excreta sin modificar en orina a través del transportador multidrogas y de extrusión de toxinas 1 (MATE1) [7].

1.5 Análisis de metformina en plasma.

Las propiedades fisicoquímicas de la metformina hacen que su análisis cromatográfico sea un verdadero reto.



Figura 1 Estructura, nombre químico, fórmula condensada, peso molecular de la metformina (Drugban, 2019)

Es una molécula básica, muy soluble en agua y solventes polares, insoluble en solventes no polares, con un pKa de 12.4 (fig. 1) [23].

La cromatografía de líquidos en fase reversa, RPLC por sus siglas en inglés, es el modo de cromatografía más popular en nuestros días porque permite el análisis de una gran variedad de compuestos [24]. En la RPLC los analitos se distribuyen entre una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar. La fase estacionaria está fabricada sobre una base de sílice a la que se unen químicamente cadenas alifáticas que modifican su selectividad y capacidad de retención¹ [32]. La fase móvil está constituida por agua a la que se le añaden diferentes modificadores, principalmente sales que permitan

¹ Las fases estacionarias más comunes son: octadecilsilano (C18), octilsilano (C8), butilsilano (C4), cianosilano (CN), fenilsilano (PH) y aminosilano (NH).

controlar el pH y la fuerza iónica² y solventes³ que modifiquen la fuerza de la fase móvil [32]. La fuerza de la fase móvil representa la capacidad de la mezcla de remover los analitos de la fase estacionaria. A mayor fuerza de la fase móvil menor retención de los analitos en la fase estacionaria [32]. El propósito de la técnica es lograr una buena separación de los analitos en el menor tiempo posible [32].

La selección de la combinación de fase estacionaria y fase móvil dependerá de las características del analito y la naturaleza de la matriz. En términos generales, se trabaja con los analitos en estado no ionizado para favorecer su interacción con la fase estacionaria que es no polar. Cuando se trabaja con compuestos básicos, se recomienda trabajar alrededor de dos unidades de pH arriba del pKa del analito de interés [24] [33]. Sin embargo, la base de sílice de la que están fabricadas las columnas es de naturaleza ácida, razón por la cual no pueden utilizarse a un pH arriba de 8, ya que a potenciales de hidrógeno más altos la cama de sílice se hidroliza y se pierde la fase estacionaria. Al trabajar a pH bajo, la metformina se ioniza completamente, no tiene afinidad por la fase estacionaria y no se retiene en la columna, haciendo prácticamente imposible su separación y posterior cuantificación [24] [33].

La cromatografía de líquidos en fase normal, NPLC, tampoco es una opción, debido a que en este tipo de cromatografía se requiere que el analito sea soluble en solventes no polares [32].

Entre las opciones disponibles para resolver este problema, se encuentra la cromatografía de par iónico o IPC por sus siglas en inglés. La IPC es una modificación de RPLC desarrollada por varios autores liderados por Schill en la década de los 70 [24]. Estos investigadores, descubrieron que el añadir un anión o catión orgánico a la fase móvil podría resolver el problema de los analitos que se encuentran totalmente

² Sales de fosfatos, ácido fórmico, ácido acético, citratos, tris (Separation Fundamentals, Agilent Technologies, December 11, 2007)

³ Tetrahidrofurano (THF), acetonitrilo (ACN), metanol (MetOH). Siendo el THF el de mayor fuerza y el MetOH el de menor fuerza. (Torres-Lapasíó, 2019)

ionizados. La técnica consiste en agregar a la fase acuosa un modificador, típicamente moléculas anfipáticas con una cola hidrófoba y una cabeza hidrofílica con carga. La cola hidrofóbica interactúa fuertemente con la fase estacionaria, mientras que la cabeza hidrofílica interactúa con el analito ionizado (figura 2). En este caso, como la metformina es una molécula básica, es conveniente agregar un par iónico de carga negativa. Existen varias opciones entre las que se encuentran los sulfonatos (cadenas de 5 a 12 carbonos) con Na^+ o K^+ como contraión, ácido trifluoroacético, ácido α -hidroxibutírico, ácido heptafluorobutanoico, entre otros. La retención y selectividad de la fase móvil puede ajustarse modificando la longitud de la cadena alifática, el contraión y la concentración del par iónico [24].

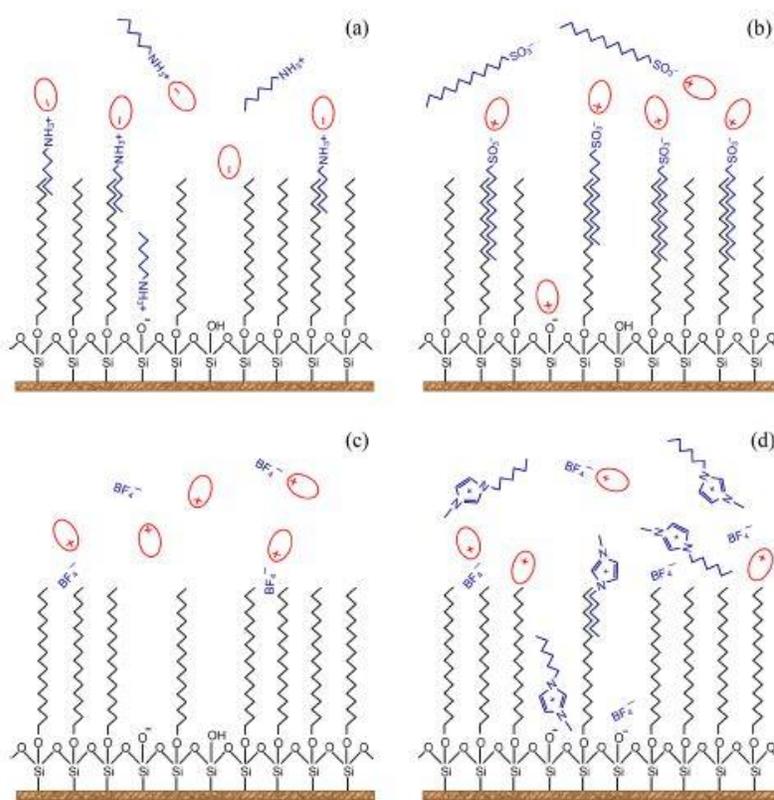


Figura 2: Interacción entre el par iónico y el analito en una columna C18. Aditivos: a) hexilamina, b) 1-dodecilsulfonato, c) tetrafluoroborato y d) tetrafluoroborato de 1-hexil-3-metil-imidazolío. (García -Álvarez-Coque, 2015)

Además de la dificultad inherente a la naturaleza fisicoquímica de la metformina, también hay problemas relacionados con la concentración. Se espera una Cmax de alrededor de 3.0 µg/ml [25] [28] [29] [30], lo que implica que se requiere un límite de cuantificación de al menos 0.15 µg/ml para cumplir los requerimientos de la normatividad nacional [21].

La metformina absorbe la luz ultravioleta, presenta un solo máximo de absorción a 233 nm [23], lo que hace posible su análisis utilizando un detector de arreglo de diodos, o PDA por sus siglas en inglés [34]. El uso de este detector permite hacer un análisis que es tanto cualitativo como cuantitativo. La corrida cromatográfica puede monitorearse en un amplio intervalo de longitudes de onda, lo que permite obtener un espectro de absorción UV-Vis completo. El espectro aunado al tiempo de retención del analito puede considerarse una prueba de identidad [34]. Los cromatogramas pueden presentarse como proyecciones tridimensionales (fig.3) o mapas de contorno, y puede evaluarse la homogeneidad de pico (figs.4 y 5), lo que ayuda a evaluar la calidad de la separación cromatográfica.

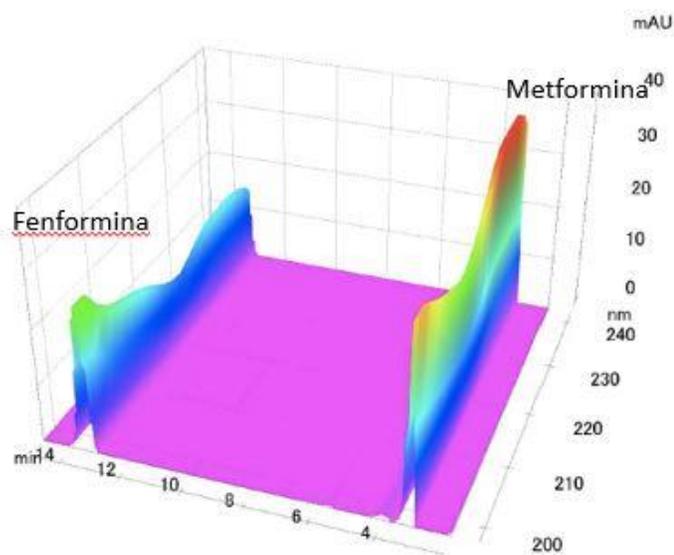


Figura 3: Proyección tridimensional de un análisis de metformina con fenformina como estándar interno utilizando un detector de arreglo de diodos (PDA).

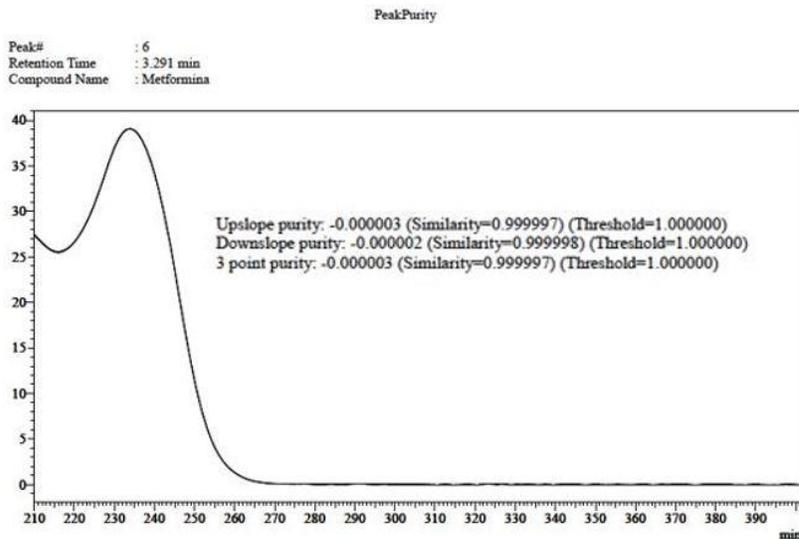


Figura 4: Homogeneidad o pureza del pico de metformina que muestra un máximo de absorción a 233 nm y un nivel de impurezas del 0.0003%.

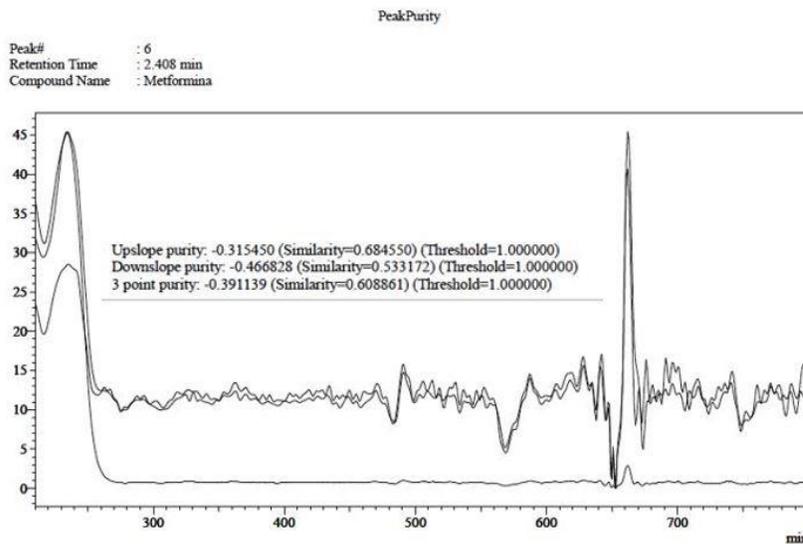


Figura 5: Homogeneidad o pureza del pico de metformina que muestra un nivel de impurezas del 39.11%. Se observan dos máximos de absorción, a 233 y 670 nm. El máximo que se presenta a 670 nm es clara muestra de baja resolución o pobre relación señal / ruido del detector.

En los métodos bioanalíticos es recomendable añadir un estándar interno, con el propósito de normalizar la metodología y corregir posibles errores sistemáticos que ocurren en los análisis. De acuerdo con la IUPAC un estándar interno es: “*un compuesto añadido a una muestra de concentración conocida para facilitar la identificación y/o cuantificación de los componentes de la muestra*” [10].

Antes de elegir un estándar interno, es necesario considerar lo siguiente [10]:

- Debe ser cuantificable y tener buena resolución.
- No debe estar presente en la muestra, por lo que no puede ser un metabolito o producto de descomposición del analito.
- Sus propiedades fisicoquímicas deben ser parecidas a las del analito de interés.
- Debe ser estable.
- Debe ser fácil de conseguir.

En la bibliografía se encuentra que se han utilizado diferentes sustancias como estándar interno para el análisis de metformina en plasma, como fenformina [11] [12], salbutamol [12], ranitidina [13], y atenolol [15].

1.6 Validación del Método Analítico.

Finalmente, dado que los resultados obtenidos de los análisis cromatográficos sirven de base para la toma de decisiones relacionadas con la terapia a base de metformina, es un requisito indispensable asegurar la calidad de la información obtenida de los análisis. Es por esta razón que es de primordial importancia validar el método analítico cumpliendo estrictos requisitos de calidad.

La validación del método analítico es un paso obligatorio para evaluar la habilidad del método desarrollado de proveer resultados exactos en el uso rutinario [35].

Revisamos en primer lugar la **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. Esta norma define los criterios que deben reunirse para que un método bioanalítico sea apto para establecer farmacocinética y biodisponibilidad, y es de observancia obligatoria en nuestro País. Además de la NOM-177, se revisaron:

1. Guidelines for Bioavailability & Bioequivalence Studies. Central Drug Standard Control Organization, Directorate General of Health Services, Ministry of Health & Family Welfare, Gobierno de la India, Nueva Delhi, Marzo 2005.
2. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, FDA, Estados Unidos de América, 2018.
3. Guideline on bioanalytical method validation, EMA, Comunidad Europea, 2012.
4. Japanese Guidance on Bioavailability and Bioequivalence, NIHS, Japón, 2000.
5. Bioequivalencia y Biodisponibilidad, Anvisa, Brasil, 2016.
6. Bioanalytical Method Validation. ICH M10 Guideline 2019.

Y diversos artículos de divulgación científica en el tema:

7. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. Mohammad Mahdi Moein, Aziza El Beqqali, Mohamed Abdel-Rehim. Journal of Chromatography B, 1043 (2017) 3-11.
8. Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. E. Rozet, R.D. Marini, E. Ziemons, kB. Boulanger. Ph. Hubert. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 55 (2011) 848-858.
9. Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well-defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. Oskar González, María Encarnación Blanco, Gorka Iriarte, Luis Bartolomé, Miren Itxaso Maguregui, Rosa M. Alonso. Journal of Chromatography A. 1353 (2014) 10-27.
10. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. Roger Causon. Journal of Chromatography B, 689 (1997) 175-180.

La comparación de la bibliografía analizada puede verse en extenso en el Anexo 1. A continuación se definirán los parámetros incluidos en el citado Anexo y en el diseño de nuestra validación, haciendo énfasis en lo incluido en la NOM-177-SSA1-2013, dado que es la normatividad vigente y de observancia obligatoria en nuestro País.

Linealidad. “*Es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener una respuesta proporcional a la concentración del compuesto en la muestra.*” (NOM-177-SSA1-2013). Este parámetro se incluye en toda la bibliografía revisada, algunos autores/editores lo manejan como calibración, sin embargo, la esencia de la prueba es la misma por lo que, para fines de este trabajo, las consideramos equivalentes.

Selectividad. “*Es la capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos en la muestra*”. (NOM-177-SSA1-2013). Existe discrepancia entre los diversos autores/editores analizados, algunos de ellos hacen distinción entre Selectividad y Especificidad, incluyendo en Selectividad compuestos endógenos relacionados con la matriz biológica utilizada, mientras que en Especificidad se incluyen compuestos exógenos como metabolitos, productos de degradación y fármacos concomitantes. La NOM-177-SSA1-2013, no hace distinción entre Selectividad y Especificidad. En nuestro proyecto evaluamos en el rubro de Selectividad compuestos endógenos y exógenos.

Precisión (RyR). En la NOM-177-SSA1-2013 este parámetro se divide en dos pruebas: **Repetibilidad**, que corresponde a la primera R, que se define como: *La precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo*” y **Reproducibilidad intralaboratorio**, la segunda R: *“La precisión bajo las variaciones que comúnmente pueden ocurrir dentro del laboratorio: diferentes días, diferentes analistas”*. En estas pruebas existe considerable discrepancia entre los diferentes autores/editores revisados. Este parámetro también se conoce como **Robustez** y ha tomado gran importancia en la actualidad, siendo el rubro que mayor polémica levanta entre los expertos. Los criterios de aceptación de las entidades normativas [16] [17] [18] [19] [20] [21] [22] se limitan al

cálculo del coeficiente de varianza de los resultados, sin embargo, los artículos revisados dan especial importancia a este parámetro de validación, sugiriendo que se incluyan otras técnicas de análisis de datos, como por ejemplo, el uso de Análisis de Varianza (ANOVA) de un solo factor [35] [36], o multifactorial [35] [37]; considerar diferentes niveles o fases de Robustez incluyendo cambios en las condiciones de análisis (composición de la fase móvil, modificaciones de pH), cambios de columna, de equipo, de laboratorio [35] [37] además del cambio de analista y día considerado en la normatividad.

Exactitud. *“Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia”* (NOM-177-SSA1-2013). Se usan los mismos datos que se obtienen de las pruebas de Precisión. También es fuente de controversia en cuanto al análisis de datos. Las fuentes normativas se limitan al cálculo de los porcentajes de recobro, mientras que los artículos estudiados incluyen el cálculo del sesgo [35] [36] y análisis de residuales [36].

Estabilidad. *“Propiedad del compuesto por analizar en una matriz biológica, de conservar sus características, desde el momento de muestreo hasta el análisis de todas las muestras, así como su reanálisis (en caso de realizarse este último)”* (NOM-177-SSA1-2013). Esta prueba también es considerada por todos los autores/editores consultados, y aunque existen ligeras discrepancias en el número de réplicas a analizar y las concentraciones que deben incluirse en el estudio, se encontró que hay un consenso en cuanto a las pruebas que deben incluirse: la estabilidad de las soluciones stock, la estabilidad de la muestra procesada, la estabilidad de la muestra en el automuestreador, los ciclos de congelación/descongelación y la estabilidad de la muestra a largo plazo [16] [17] [18] [19] [20] [21] [22] [35] [36] [37] [38].

Acarreo. *“Efecto generado por la aparición o aumento de la señal del analito o estándar interno causado por la contaminación de muestras anteriores”* (NOM-177-SSA1-2013). La NOM-177, solo incluye este parámetro para los métodos por espectrometría de masas, la mayoría de los autores/editores revisados recomiendan inyectar entre uno y tres

blancos de fase móvil después de la inyección del límite superior de la curva de calibración para verificar la elución completa de la matriz [18] [20] [22] [37] [38].

Integridad de la dilución. Este parámetro no se incluye como tal en la NOM-177-SSA1-2013, aunque sí es parte de las muestras que se incluyen en las pruebas de Precisión y Exactitud. La ICH la define como: *“La evaluación del proceso de dilución de una muestra que así lo requiera para asegurar que se conserva la precisión y la exactitud en la determinación del analito”*. Todos los autores/editores que la incluyen [17] [18] [20] [22] [35] [37], coinciden en que no es válido extrapolar muestras. Si alguna muestra tuviera una concentración mayor que la incluida en el intervalo de calibración, deberá prepararse una dilución con la misma matriz de la muestra.

Sensibilidad. En la NOM-177-SSA1-2013 se incluye como Límite Inferior de Cuantificación (LIC) y se define como *“La concentración más baja del analito que puede medirse cumpliendo con la precisión y exactitud, determinada en función de las necesidades de cuantificación del estudio”*. En términos generales, las diferentes normas revisadas consideran que la sensibilidad del método bioanalítico está dada por este LIC, sin embargo, en los artículos se incluyen otros criterios además del LIC, como el cálculo de la pendiente de la curva de calibración [36], o la determinación de la señal del blanco en el tiempo de retención del analito [37].

Recobro Absoluto. Esta prueba no se incluye en la NOM-177-SSA1-2013, sin embargo, se decidió incluirla porque la información que aporta para la evaluación del método analítico desarrollado suma a la robustez y no presenta mayor dificultad ni aumento significativo en el costo del proceso. La NIHS define al Recobro como: *“Una medida de la eficiencia a la que un método analítico es capaz de recuperar al analito a través del procesamiento de la muestra”*. Se compara la respuesta obtenida de la muestra preparada en la matriz biológica comparada con una solución del analito [19] [36] [20].

1.7 Justificación

La metformina es el fármaco de elección cuando se presenta pérdida de la homeostasis del metabolismo de la glucosa [3] [4] [5] [7] [8] [25] . Es una molécula de bajo peso molecular, de naturaleza básica y muy polar [23]. Sus propiedades fisicoquímicas hacen difícil su análisis por técnicas cromatográficas. Derivado de la baja reproducibilidad que se ha encontrado en las técnicas cromatográficas publicadas [11] [12] [13] [14] [15], nos hemos dado a la tarea de desarrollar un método analítico que cumpla con los parámetros que requerimos. Dado que la calidad de los datos de un análisis biofarmacéutico es de primordial importancia para la toma de decisiones, es indispensable que el método analítico utilizado para la obtención de los datos cumpla con los más estrictos criterios de calidad.

El método analítico debe demostrar, al menos, lo incluido en la NOM-177-SSA1-2013:

- Linealidad
- Exactitud
- Robustez
- Estabilidad
- Precisión
- Sensibilidad
- Selectividad

1.8 Objetivo General

Desarrollar y validar un método bioanalítico para la cuantificación de metformina en plasma humano utilizando un sistema HPLC/PDA.

1.9 Objetivos Específicos

Revisar Bibliografía.

Desarrollar el Método Analítico:

Desarrollar el Sistema Cromatográfico.

Desarrollar el Método de Extracción de Muestra.

Validar el Método Analítico:

Definición de los Parámetros de Validación y los Criterios de Aceptación de las pruebas a realizar (Protocolo de Validación)

Realizar las Pruebas de Validación del método analítico.

Evaluar y dictaminar los resultados.

2. Materiales y Métodos.

2.1 Equipo, Materiales, Consumibles, Sustancias de Referencia, Reactivos y Material Biológico.

2.1.1 Equipo

- Cromatógrafo de líquidos Shimadzu Prominence LC2030C3DPlus. Equipado con detector de arreglo de diodos (PDA), automuestreador con control de temperatura, horno para columna, bomba cuaternaria para gradiente de baja presión, software y equipo de cómputo para el procesamiento de datos, Ups
- Colector para placas de extracción de 96 pozos Waters
- Bomba de vacío para colector para placas de extracción
- Microcentrífuga criogénica Eppendorf 5415R
- Centrífuga clínica DLAB DM014
- Ultracongelador Revco (-70°C)
- Congelador Frigidaire (-20°C)
- Refrigerador Nieto (5°C)
- Balanza analítica Ohaus Voyager
- Potenciómetro Oakton
- Sistema de purificación de agua Milli-Q
- Sistema de Ultrafiltración para Fase Móvil Supelco

2.1.2 Materiales

- Micropipeta Eppendorf de 500-2500 µl
- Micropipeta Transferpette Brand de 100-1000 µl

- Micropipeta Biopette Labnet 100-1000 μ l
- Micropipeta Pipetman Gilson 50-200 μ l
- Micropipeta Axygen 2-20 μ l
- Micropipeta Axygen 10-100 μ l

2.1.3 Consumibles

- Placa de extracción de 96 pozos con 30 mg de empaque HLB por pozo
- Columna HPLC y precolumna Zorbax Extend C-18 4.6 x 150 mm, 5 μ m
- Columna HPLC y precolumna Restek Ultra C-18 4.6 x 150 mm, 5 μ m
- Columna HPLC Zorbax Eclipse XDB-Phenyl 4.6 x 150 mm, 5 μ m
- Columna HPLC Zorbax Sb-Aq 4.6 x 150 mm, 5 μ m
- Columna HPLC Zorbax RP 4.6 x 150 mm, 5 μ m
- Viales para HPLC de 1.5 ml
- Insertos de vidrio 250 μ l pie polimérico
- Septas PTFE/Silic. Roja, 8.7 mm
- Tubos Eppendorf de 1.5 ml
- Jeringas para insulina
- Membranas de filtración Nylon Syr Filter, 4mm
- Tubos para centrifuga de 15 ml Santa Cruz
- Membranas de filtración Durapore PVDF 0.45 μ m
- Puntas para micropipeta 1000 μ l Axygen
- Puntas para micropipeta 100 μ l Axygen
- Tiras de pH 0.0-14.0

2.1.4 Materiales de Referencia

- Pioglitazona. Sigma. LRAB3624
- Metformina. Sigma. LRAB3694
- Rosiglitazona. USP. F0J407

- Fenformina. Sigma. MKCD3844
- Ranitidina. Sigma. LRAB9973
- Salbutamol. Ventolin solución, 5 mg/ml. GSK. Lote: 4TM4M
- Omeprazol, cápsulas de 20 mg. Synthón México, S.A. de C.V. No. Lote: Z18076A
- Ibuprofeno, Advil Max 400 mg, Pfizer de México, S.A. de C.V. No. Lote: XJ20190128
- Glibenclamida, pastillas de 5 mg. Novag Infancia S.A. de C.V. No. Lote: 710449

2.1.5 Reactivos

- Fosfato monobásico de potasio. KH_2PO_4 . J.T. Baker. Lote: M02C08
- Duodecil sulfato de sodio. SDS. Sigma Life Science. Lote: SLBT5968
- Ácido fosfórico. H_3PO_4 . LT Baker. Lote: K28C57
- Ácido perclórico. HClO_4 , Sigma. Lote: SHBJ0892
- Hidróxido de potasio. KOH. JT Baker. Lote: 512964
- Acetonitrilo grado HPLC. JT Baker. Lote: V49C57
- Diclorometano. CH_2Cl_2 . Sigma. Lote: SHBK8159
- Agua MilliQ

2.1.6 Material Biológico

- Plasma humano donado por la Unidad de Medicina Transfusional del Hospital Civil de Guadalajara

2.2 Desarrollo Analítico.

El método desarrollado, será utilizado para determinar la concentración de metformina en plasma de voluntarios sanos durante un estudio de farmacocinética.

En la bibliografía consultada se encontró que la concentración máxima en plasma (C_{max}) va de 600 ng/ml a 3 500 ng/ml. [25] [28] [29] [30] . Se encontró una referencia de C_{max} en mexicanos de $2\ 352.3 \pm 736.3$ ng/ml [28].

Con base en esta información y en el requerimiento de la NOM-177-SSA1-2013 que indica que se requiere un límite inferior de cuantificación (LIC) equivalente a un 5% de C_{max}, y considerando una C_{max} teórica de 3 000 ng/ml, se propuso un intervalo de cuantificación que vaya de 150 – 3 000 ng/ml de plasma.

De acuerdo con lo incluido en la NOM-177-SSA1-2013 y demás bibliografía consultada (Anexo 1), el método analítico desarrollado deberá:

- Ser validado en el sitio de análisis y alcanzar el propósito para el que ha sido desarrollado.
- Las curvas de calibración y las muestras de control se deberán preparar en la misma matriz biológica que las muestras a analizar.
- La corrida no deberá exceder los 20 minutos.
- La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención deberá ser menor al 20% para el LIC y del 5% para el estándar interno.
- En cada corrida analítica deberá incluirse una prueba de Adecuabilidad del Sistema. El Coeficiente de Varianza (CV) de la respuesta del analito y del estándar interno deberá ser máximo 3%.
- En cada corrida analítica deberá incluirse una curva de calibración de 6 niveles más un Blanco Muestra (BM) y un Blanco Cero (B0). El intervalo de

cuantificación del método analítico deberá cubrir de los 150 a los 3000 ng/ml. En caso de que el intervalo de cuantificación planteado sea demasiado amplio y no se logren cumplir los criterios de aceptación, podrá disminuirse el Límite Superior de Cuantificación (LSC) para satisfacer los criterios establecidos. De darse esta situación, deberá evaluarse la Integridad de la Dilución. Los resultados de la curva de calibración deberán cumplir los criterios establecidos en la prueba de Linealidad del Método Analítico.

- El Recobro calculado de las Muestras Control deberá ser de $\pm 15\%$ para todos los niveles, a excepción del LIC que podrá ser de $\pm 20\%$.
- El Coeficiente de Varianza de las Muestras Control deberá ser $\leq 15\%$ para todos los niveles, a excepción del LIC que podrá ser $\leq 20\%$.

2.2.1 Definición de condiciones cromatográficas.

Para definir las condiciones cromatográficas, primero procuramos buenos resultados con el analito y el estándar interno en solución. Una vez alcanzados los criterios de aceptación con los analitos en solución, procedimos a probar métodos de extracción de muestra. Nos enfrentamos a dos problemas fundamentales:

- La naturaleza básica y muy polar de la metformina, hacía difícil su retención en la columna. Fue necesario aumentar la retención para poder obtener buena resolución entre la metformina y los demás componentes no retenidos del plasma.
- Al aumentar la retención de la metformina en la columna, la retención del estándar interno podía ser demasiada y requerir de corridas muy largas (más de 20 minutos).

En todos los casos se utilizó un buffer de KH_2PO_4 : SDS y ACN como componente orgánico [11] [12] [13] [14] [25] (Ver punto 2.2.4.1 Preparación de la Fase Móvil).

Se probaron varias Fases Estacionarias, modificando la proporción de los solventes, la temperatura de la columna y el flujo.

- Columna HPLC y precolumna Zorbax Extend C-18 4.6 x 150 mm, 5 μm .
- Columna HPLC y precolumna Restek Ultra C-18 4.6 x 150 mm, 5 μm .
- Columna HPLC y precolumna Zorbax Eclipse XDB-Phenyl 4.6 x 150 mm, 5 μm .
- Columna HPLC y precolumna Zorbax Sb-Aq 4.6 x 150 mm, 5 μm .
- Columna HPLC y precolumna Zorbax RP 4.6 x 150 mm, 5 μm .

Los mejores resultados se obtuvieron con la columna HPLC Zorbax RP 4.6 x 150 mm, 5 μm .

Se probaron tres concentraciones de SDS para tratar de mejorar la retención de los analitos en la columna: 0.001 M, 0.002 M, 0.003 M. La que dio mejores resultados fue: 0.002 M. La concentración de KH_2PO_4 que se utilizó fue de 0.006 M.

También fue necesario cambiar de Estándar Interno más de una vez.

- La Fenformina [11] se retiene demasiado en la columna y la corrida resulta demasiado larga.
- El Salbutamol [12] funciona bien en la Columna Zorbax Extend C-18 y la Restek Ultra C-18, pero se fracciona en las columnas para compuestos básicos como la Zorbax Sb-Aq y la Zorbax RP.
- Finalmente, la ranitidina [13] cumplió con los requisitos de tiempo de retención, resolución y forma de pico requeridos (figs 6 y 7).

Las condiciones cromatográficas definitivas fueron:

- Cromatógrafo de líquidos Shimadzu Prominence LC2030C3DPlus. Equipado con detector de arreglo de diodos (PDA), automuestreador con control de temperatura, horno para columna, bomba cuaternaria para

gradiente de baja presión, software y equipo de cómputo para el procesamiento de datos.

- Detector: PDA: a 233 nm para la metformina y 320 nm para la ranitidina.
- Fase Móvil: KH_2PO_4 0.006 M/SDS 0.002 M: ACN, 73:27., Flujo: 1.0 ml/min.
- Columna y precolumna: HPLC Zorbax RP 4.6 x 150 mm, 5 μm .
- Temperatura de la Columna: 30°C.
- Temperatura del Automuestreador: 20°C
- Volumen de Inyección: 10 μl
- Tiempo de corrida: 13 min.

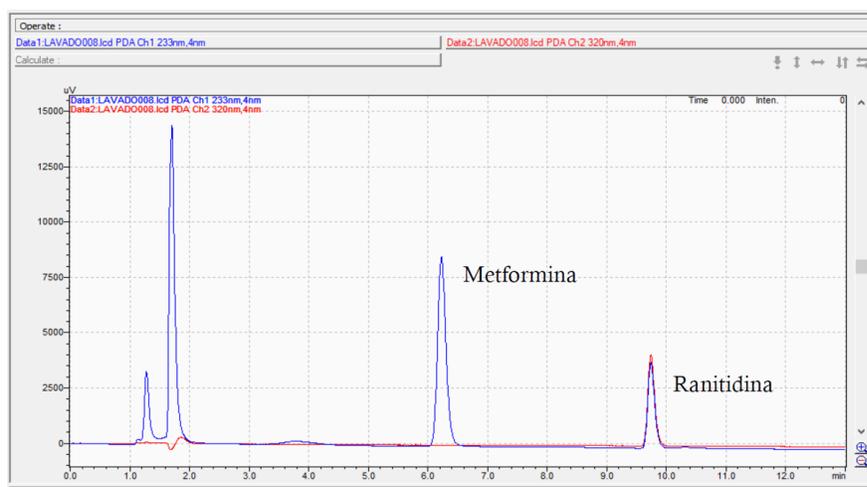


Figura 6 Cromatograma de metformina (233 nm, 6.1 min) y ranitidina (320 nm, 9.8 min) en solución

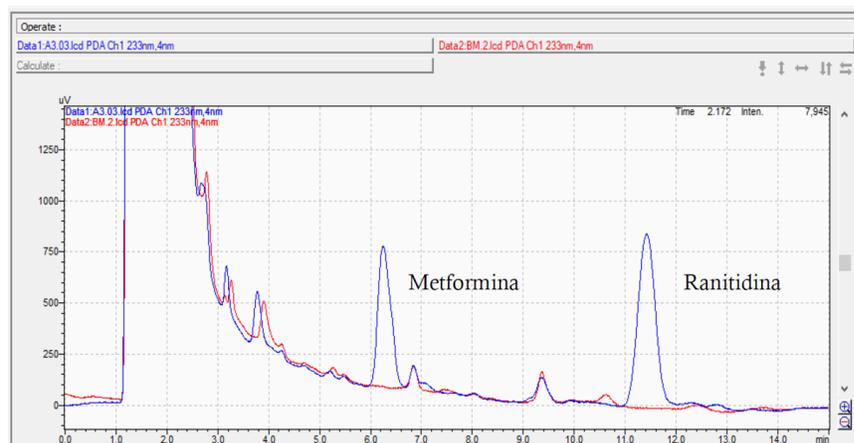


Figura 7 Cromatograma de metformina (233 nm, 6.1 min) y ranitidina (320 nm, 9.8 min) en plasma

2.2.2 Desarrollo del método de tratamiento de muestra.

Se probaron diferentes protocolos de tratamiento de muestra (Fig. 8). En todos los casos, se tomaron 500 μl de plasma + 50 μl de solución de referencia E (ver tabla 4). Todas las muestras fueron filtradas a través de una membrana de PVDF de 0.45 μm antes de su inyección al HPLC. Vea la sección 2.2.4.2 Preparación de soluciones reactivo para ver cómo se preparan las soluciones que se utilizaron durante el tratamiento de las muestras.

Por un lado, se probó la acidificación con H_3PO_4 al 5% y posterior extracción en cartuchos de fase sólida. Se probaron los empaques enlistados a continuación:

- C18: La metformina no se retiene en el cartucho.
- CN: La metformina no se retiene en el cartucho.
- HLB [1]: La metformina se retiene irreversiblemente en el cartucho. Con este empaque se intentó tanto acidificar con H_3PO_4 al 5% como alcalinizar con hidróxido de amonio al 5% (de acuerdo con el inserto del proveedor). En ninguno de los dos casos se logró eluir la metformina del cartucho. Creemos que esto se debe al elevado pK_a de la metformina (12.4) [23]. que es bastante más alto que el pK_a del hidróxido de amonio (9.8) [23].

- IC: También se intentó con cartuchos de intercambio catiónico. El pH que se alcanzó con el hidróxido de amonio no fue suficiente para desionizar a la metformina y tampoco se logró eluir la metformina del cartucho.

Por otro lado, se probó la precipitación de proteínas con dos estrategias fundamentales: precipitación con ACN, y precipitación con HClO_4 4 M.

Para precipitar con ACN, se utilizó una proporción 2:1 ACN: Plasma cargado [11].

- Se centrifugó a 15,000 rpm por 10 minutos; se tomó el sobrenadante; y se repitieron los protocolos de extracción para los cartuchos HLB e IC. Se filtró el eluido e inyectamos al HPLC. La metformina no se retuvo en el cartucho.
- Se centrifugó a 15,000 rpm por 10 minutos; se tomó el sobrenadante; se evaporó a sequedad en un baño maría a 40°C bajo corriente de aire; se reconstituyó en 500 μl de fase móvil; y se inyectó al HPLC. Este método parecía funcionar bien, resultó selectivo y lineal, sin embargo, al efectuar la prueba de acarreo, había un componente del plasma con un tiempo de retención de 27 minutos.
- Con el propósito de eliminar la interferencia de los 27 minutos, se lavaron las muestras con diclorometano y se reconstituyeron en ACN. La muestra estaba muy diluida y no se logró la sensibilidad definida en el alcance del método.
- Para tratar de mejorar la sensibilidad, se evaporó la muestra a sequedad en un baño maría a 40°C bajo una corriente de aire y se reconstituyó en FM. El método no resultó reproducible.

Para precipitar con HClO_4 [14] [39]

- A la muestra cargada se le añadieron 100 μl de una solución de HClO_4 4 M; se dejó reposar por 10 min; se centrifugó a 15,000 rpm por 10 min; se decantó el sobrenadante; y se neutralizó con 100 μl de KOH 4M; se dejó reposar por 10 min más; se centrifugó nuevamente a 15,000 rpm por 10 minutos; se decantó el

sobrenadante y se sometió a extracción en los cartuchos de HLB e IC. La metformina no se retuvo.

- A la muestra cargada se le añadieron 100 μl de una solución de HClO_4 4 M [14]; se dejó reposar por 10 min; centrifugamos a 15,000 rpm por 10 min; se decantó el sobrenadante; se neutralizó con 100 μl de KOH 4M [39]; se dejó reposar por 10 min más; se centrifugó nuevamente a 15,000 rpm por 10 minutos; se decantó el sobrenadante y, utilizando tiras de pH, se midió el pH de las muestras para intentar una inyección directa en el HPLC. Había una enorme variación en el pH de las muestras procesadas, el pH cambiaba en un intervalo entre 2 y 10 u-pH. Para resolver este problema se preparó un blanco de plasma y se le agregaron 100 μl de KOH 4 M, se dejó reposar 10 minutos y se midió el pH; se agregaron 5 μl más de KOH 4 M y se dejó reposar nuevamente; se repitió esta operación hasta que el pH de la muestra fue 4. Finalmente, se logró estandarizar un volumen de 120 μl de KOH 4 M: 100 μl de HClO_4 4 M. Añadiendo estos volúmenes de solución a los 550 μl de plasma cargado, se obtuvieron muestras con un pH que iba en un intervalo de 2 a 4, que resulta apropiado para una inyección directa al HPLC. Este tratamiento de muestra cumplió los requerimientos establecidos en el alcance del método.

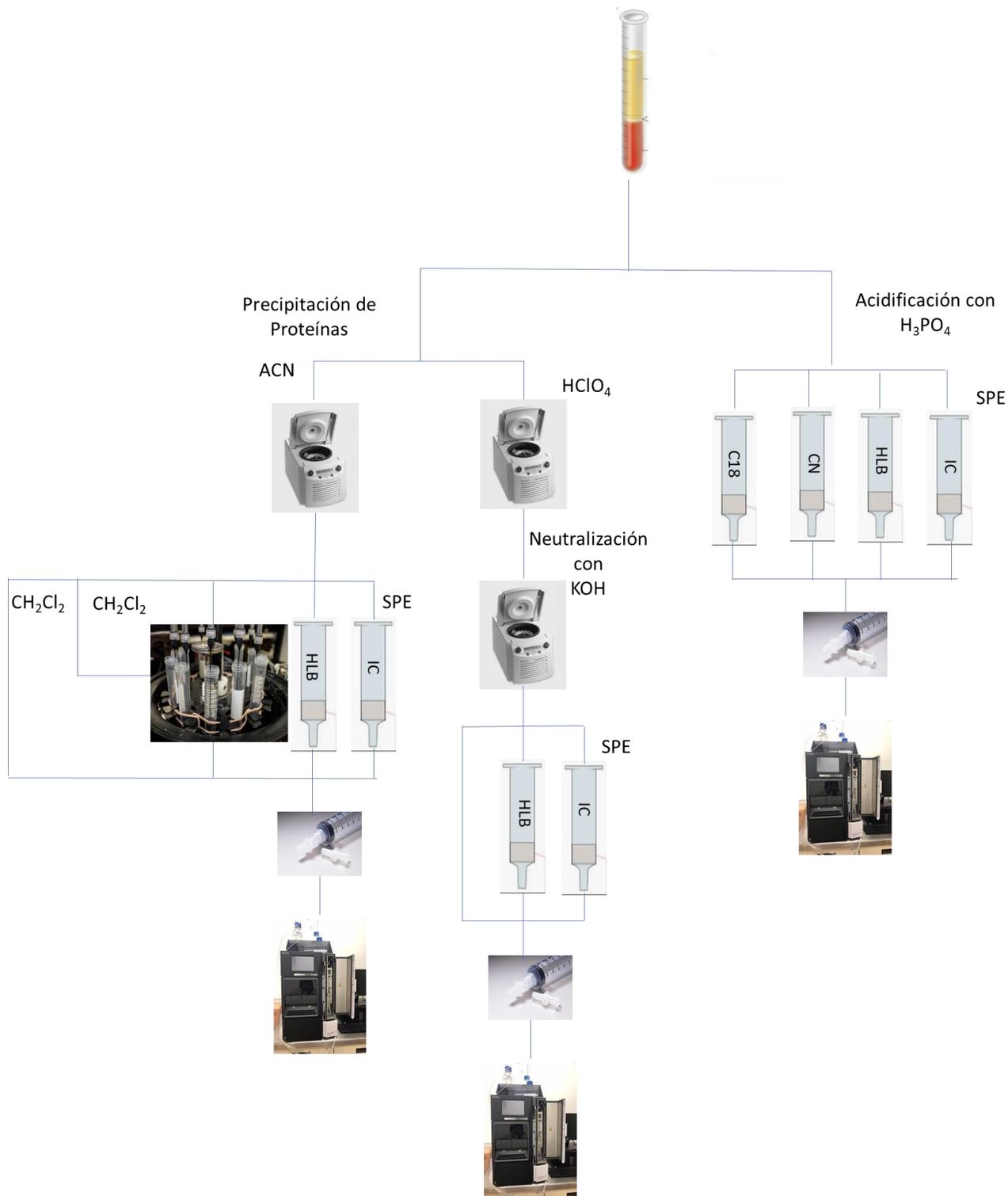


Figura 8: Protocolos de tratamiento de muestra probados durante el Desarrollo Analítico.

2.2.3 Evaluación y dictaminación preliminar del sistema cromatográfico, del método de extracción y del intervalo de cuantificación.

Durante el Desarrollo de este Método Analítico se definieron tres pruebas críticas: Linealidad, Reproducibilidad y Acarreo.

2.2.3.1 Linealidad y Reproducibilidad Preliminares.

Para establecer el intervalo en el que el método es lineal, se prepararon soluciones de referencia (ver 2.2.4.3 Preparación de las Soluciones de Referencia) y una curva de calibración de nueve niveles como se indica en las tablas 1 y 2.

Tabla 1: Soluciones de Calibración durante el Desarrollo Analítico

Solución	M2 (μl)	R2 (μl)	ACN (μl)	Metformina (ng/mL)	Ranitidina (ng/mL)
A	5	160	835	389	12 825
B	10	160	830	778	12 825
C	20	160	820	1 556	12 825
D	40	160	800	3 112	12 825
E	80	160	760	6 224	12 825
F	120	160	720	9 336	12 825
G	200	160	640	15 560	12 825
H	250	160	590	19 450	12 825
I	320	160	520	24 899	12 825

Tabla 2: Curva de Calibración utilizada durante el Desarrollo Analítico

Nivel		Plasma	Metformina (ng/ml)	Ranitidina (ng/ml)
BM*	50 µl de ACN	500 µl	0	0
B0*	50 µl de solución R3	500 µl	0	1 283
1	50 µl de solución A	500 µl	37	1 283
2	50 µl de solución B	500 µl	75	1 283
3	50 µl de solución C	500 µl	149	1 283
4	50 µl de solución D	500 µl	215	1 283
5	50 µl de solución E	500 µl	598	1 283
6	50 µl de solución F	500 µl	896	1 283
7	50 µl de solución G	500 µl	1 494	1 283
8	50 µl de solución H	500 µl	1 868	1 283
9	50 µl de solución I	500 µl	2 391	1 283

Las respuestas obtenidas del blanco muestra (BM) y blanco cero (B0) pueden verse en la figura 9. Puede observarse que no hay respuesta en el tiempo de retención de la metformina ni tampoco en el tiempo de retención de la ranitidina.

Se inyectó la curva por duplicado en dos días diferentes, obteniendo los siguientes resultados (figs. 10 y 11):

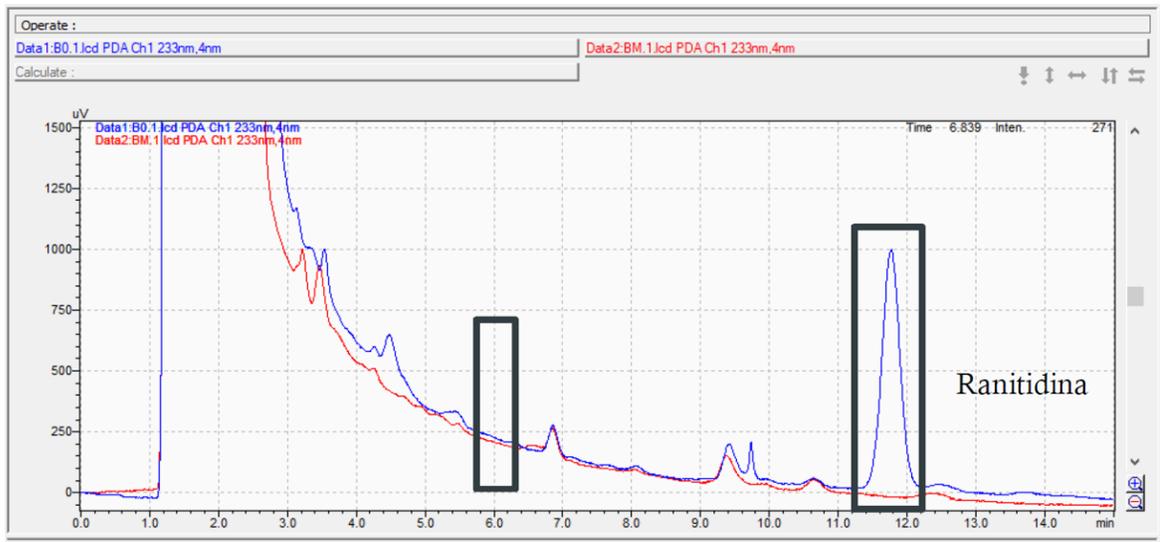


Figura 9 BM: muestra de plasma sin analito ni estándar interno (cromatograma color rojo), vs B0: muestra de plasma más estándar interno (cromatograma azul). Puede observarse que no hay respuesta para el analito ni el estándar interno en el BM.

- El nivel 1 de la curva (37 ng/ ml) no se detectó en el día 1, solo se detectó en el día 2, al estar muy por debajo del límite de cuantificación requerido, se decidió iniciar la curva de calibración en el nivel 2, es decir, 70 ng/ ml que sigue estando muy por debajo de los 150 ng/ ml requeridos.
- El nivel 9 de la curva de calibración tiene buena reproducibilidad, repetibilidad y exactitud, pero está por debajo de la Cmax de 3,000 ng/ ml requerida. Para resolver este problema, se incluirá en la validación una prueba de Integridad de la Dilución.
- Solo se requieren 6 puntos en la curva de calibración. Para procurar que los niveles sean equidistantes, en lo sucesivo, se incluyeron los siguientes niveles de concentración en las curvas de calibración (tabla 3):

Tabla 3: Niveles de la Curva de Calibración

Nivel	Metformina (ng/ml)
1	71
2	106
3	284
4	851
5	1 418
6	2 269

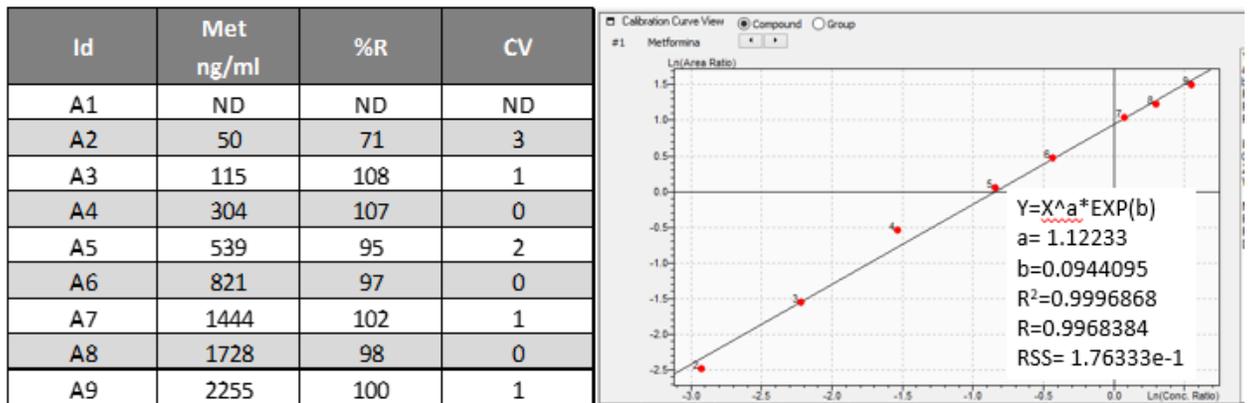


Figura 10: Linealidad día 1. Factor de Respuesta: Área, Ajuste: Exponencial. Concentración de metformina (ng/ml), Porcentaje de Recobro (%R) y Coeficiente de Varianza (CV) de cada punto de la Curva de Calibración. ND: No detectado

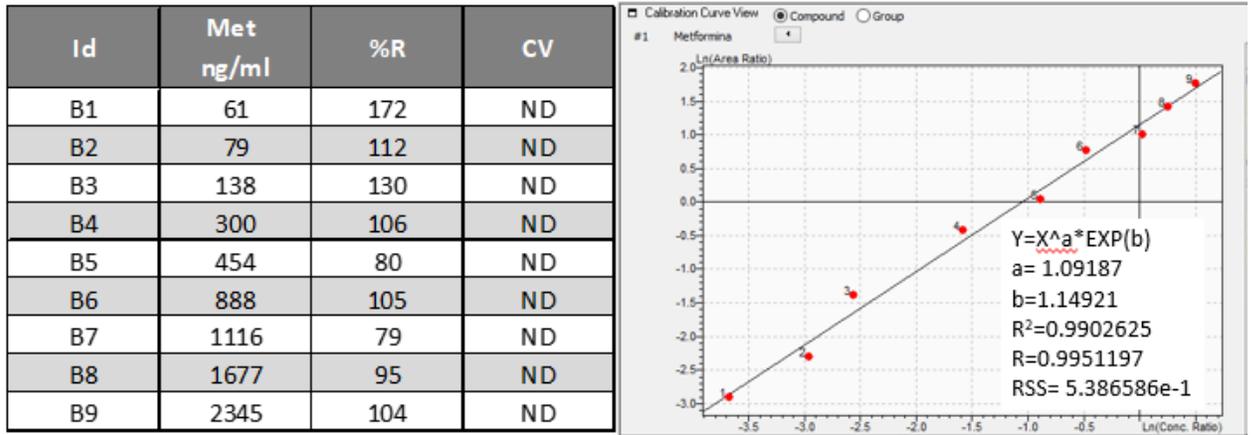


Figura 11: Linealidad día 2. Factor de Respuesta: Área, Ajuste: Exponencial Concentración de metformina (ng/ml), porcentaje de recobro (%R) y coeficiente de varianza (CV) de cada punto de la curva de calibración. ND: No detectado

2.2.3.2 Acarreo.

Para evaluar el acarreo, se inyectó el nivel 9 de la curva de calibración (2 391 ng/ ml) de metformina, seguida de 3 inyecciones de la fase móvil. En la figura 12 puede apreciarse que no hay señal en las inyecciones de fase móvil a lo largo del tiempo de corrida, por lo tanto, se puede concluir que no hay acarreo detectable.

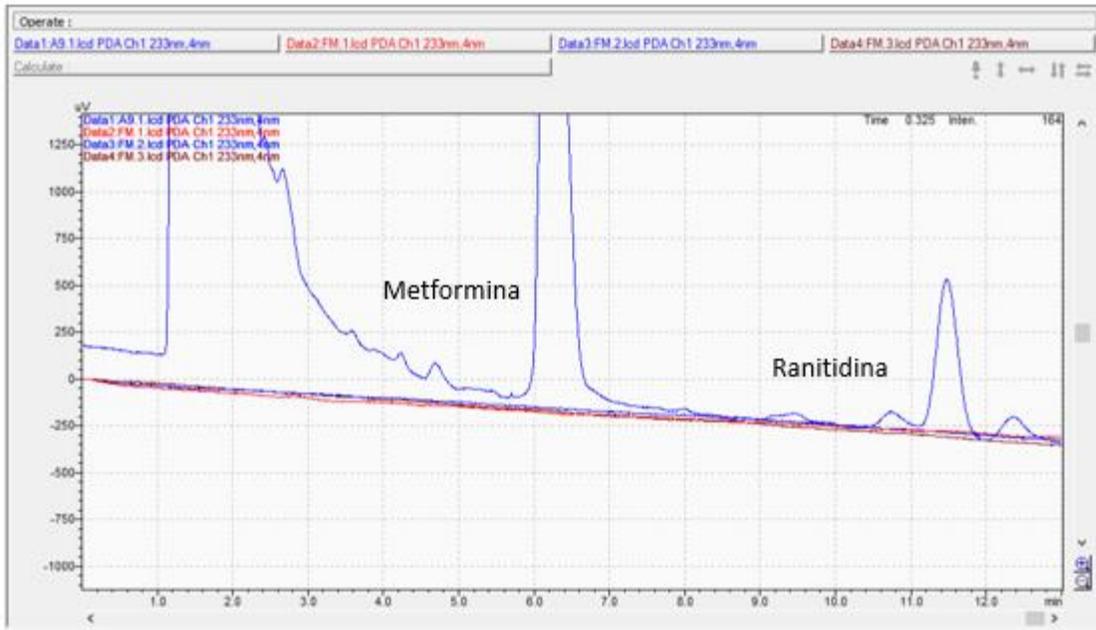


Figura 12: Inyección de plasma cargado con 2 345 ng/ ml de metformina y 1 440 ng/ml de Ranitidina, con tres inyecciones consecutivas de fase móvil. Puede verse claramente que no se detecta acarreo.

2.2.4 Descripción del método desarrollado.

2.2.4.1. Preparación de la Fase Móvil.

ACN

- Se filtró ACN grado HPLC con membrana de PVDF 0.45 μm y se aplicó vacío hasta que ya no se apreciaban burbujas.

Agua Milli-Q.

- Se filtró agua Milli-Q con membrana de PVDF 0.45 μm y se aplicó vacío hasta que ya no se apreciaban burbujas.

Buffer de KH_2PO_4 : SDS

- Se pesaron 577 mg de SDS que se disolvieron en 800 ml de agua Milli-Q.
- Se pesaron 850 mg de KH_2PO_4 que se disolvieron en 200 ml de agua Mili-Q.
- Ambas soluciones se mezclaron lentamente para evitar la formación de burbujas.
- Se ajustó el pH a 5.2 con H_3PO_4 al 10%.
- Se filtró con membrana de PVDF 0.45 μm y se aplicó vacío por 5 minutos hasta que ya no se apreciaban burbujas.

Composición de la Fase Móvil: 73:27 Buffer: ACN. Al terminar la corrida cromatográfica se lavó el equipo con Agua: ACN 50/50 a un flujo de 1.0 ml/min durante 60 minutos. *Nota: Si la columna se va a almacenar, se pasa ACN al 100% a un flujo de 1.0 ml/min durante 30 minutos más.*

2.2.4.2 Preparación de Soluciones Reactivo.

Ácido perclórico 4 M (HClO₄). Se disolvieron 60 ml de HClO₄ concentrado en 30 ml de agua destilada y se llevaron a 100 ml con agua destilada.

Hidróxido de Potasio 4 M (KOH). Se pesaron 22.4 g de KOH, se disolvieron en 60 ml de agua destilada y se llevaron a 100 ml con agua destilada.

Ácido fosfórico al 5% (H₃PO₄). Se tomaron 5 ml de H₃PO₄ concentrado, se disolvieron en 80 ml de agua destilada y se llevaron a 100 ml con agua destilada.

Ácido fosfórico al 10% (H₃PO₄). Se tomaron 10 ml de H₃PO₄ concentrado, se disolvieron en 80 ml de agua destilada y se llevaron a 100 ml con agua destilada.

2.2.4.3 Preparación de las Soluciones de Referencia.

Preparación de las soluciones de metformina (M). Se pesaron 10 mg de metformina clorhidrato, equivalentes a 7.8 mg de metformina base, se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 ml, se disolvieron en 5 ml de ACN, y se llevaron a volumen con ACN, esta solución tenía una concentración final de 0.78 mg/ml (**Solución M1**). De esta solución se tomó 1 ml y se llevó a 10 ml con ACN (**Solución M2**), esta solución tenía una concentración final de 0.078 mg/ml de metformina base.

Preparación de las soluciones de ranitidina (R). Se pesaron 10 mg de ranitidina clorhidrato (estándar interno), equivalentes a 9.0 mg de ranitidina base, se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 ml, se disolvieron en 5 ml de agua Milli-Q, y se llevaron a volumen con agua Milli-Q, esta solución tenía una concentración final de 0.9 mg/ml (**Solución R1**). Se tomó 1 ml de Solución R1 y se llevó a 10 ml con ACN, esta solución tenía una concentración final de 0.09 mg/ml (**Solución R2**). Se tomaron 160 µl de la solución R2 y se llevaron a 1 ml con ACN, esta solución tenía una concentración final de 1.44×10^{-3} mg/ml que equivalen a 1440 ng/ml (**Solución R3**)

2.2.4.4 Preparación de las Soluciones de Calibración.

Se tomaron los volúmenes indicados en la tabla 4 para preparar las soluciones de calibración, y de ahí se tomaron los volúmenes indicados en la tabla 5 para preparar la curva de calibración en plasma.

Tabla 4: Soluciones de Calibración

Solución	M2 (μ l)	R2 (μ l)	ACN (μ l)	Metformina (ng/mL)	Ranitidina (ng/mL)
A	10	160	830	780	14 400
B	15	160	825	1 170	14 400
C	40	160	800	3 120	14 400
D	120	160	720	9 360	14 400
E	200	160	640	15 600	14 400
F	320	160	520	24 960	14 400

Preparación de la curva de calibración

Tabla 5: Curva de Calibración en Plasma

Nivel		Plasma	Metformina ng/ml	Ranitidina ng/ml
BM*	50 μ l de ACN	500 μ l	0	0
B0*	50 μ l de solución EI3	500 μ l	0	1 440
1	50 μ l de solución A	500 μ l	71	1 440
2	50 μ l de solución B	500 μ l	106	1 440
3	50 μ l de solución C	500 μ l	284	1 440
4	50 μ l de solución D	500 μ l	851	1 440
5	50 μ l de solución E	500 μ l	1 418	1 440
6	50 μ l de solución F	500 μ l	2 269	1 440

2.2.4.5 Condiciones cromatográficas.

- Columna y precolumna: Zorbax RP 4.6 x 150 mm, 5 μ m

- Fase Móvil: KH_2PO_4 0.006 M/SDS 0.002M: ACN, 73:27
- Flujo: 1.0 ml/min
- Temperatura de la columna: 30°C
- Temperatura del automuestreador: 15°C
- Detector: PDA: metformina a 233 nm, ranitidina 320 nm
- Volumen de inyección: 10 μl
- Tiempo de corrida: 13 min

2.2.4.6 *Tratamiento de muestra:*

- Se tomaron 500 μl de plasma y se agregó el volumen de solución indicado en la tabla 5 que correspondiera con la concentración nominal de la muestra que se estaba preparando
- Se agregaron 100 μl de HClO_4 4 M y se agitó
- Se dejó reposar la muestra durante 10 min
- Se centrifugó a 15,000 rpm a 15°C por 10 min
- Se tomó el sobrenadante
- Se agregaron 120 μl de KOH 4 M y se agitó.
- Se dejó reposar por 10 min
- Se centrifugó a 15,000 rpm a 15°C por 10 min
- Se tomó el sobrenadante
- Se midió el pH con tiras de papel para verificar que se encontrar en el intervalo de 2 a 4
- Se acondicionó el filtro de membrana de PVDF de 0.45 μm con agua Milli-Q
- Se filtró la muestra
- Se inyectaron 10 μl

2.3 Validación del Método Analítico.

2.3.1 Definición de los Parámetros de Validación y los Criterios de Aceptación de las pruebas a realizar (Protocolo de Validación)

2.3.1.1 *Adecuabilidad del sistema*

Se inyectó por quintuplicado una solución preparada con 50 µl de solución E de la tabla 5 y 500 µl de ACN. Se filtró por membrana de PVDF de 0.45 µm. Esta prueba se llevó a cabo al principio de cada corrida analítica.

De las respuestas producidas por metformina/ranitidina se obtuvo:

- CV entre las respuestas producidas por metformina y ranitidina.

Criterios de aceptación:

- $CV \leq 3\%$.

2.3.1.2 *Linealidad.*

Se evaluó la linealidad inyectando por duplicado la curva de calibración preparada como se incluye en las tablas 4 y 5. Esta curva se preparó por quintuplicado. Blanco Matriz (BM) y Blanco Cero (B0) no se incluyeron en los cálculos.

De las respuestas producidas por metformina / ranitidina, se obtuvo:

- Relación del Área de metformina/ranitidina.
- Relación de la Altura de metformina/ranitidina.
- Análisis de residuales. Se analizó la diferencia entre los valores observados de y y los valores y ajustados o residuales utilizando los datos de las 5 curvas de calibración preparadas. Se construyó una gráfica de residuales estudentizados (residual crudo/error estándar) vs el número de desviaciones estándar para evaluar la bondad de ajuste del modelo [35] [36].

- Se buscó el modelo matemático más sencillo que se ajustara a nuestros datos, considerando que podía ser lineal, logarítmico o ponderado [16] [17] [18] [19] [20] [21] [22] [35] [36] [40].
- Se construyó la gráfica concentración vs función de respuesta (Área), de acuerdo con los resultados del análisis de residuales. [12].
- Se obtuvo la ecuación de la recta [16] [18] [19] [20] [21] [22] [36] [37] [38].
- Se calculó el Coeficiente de Determinación (R^2) [16] [18] [19] [20] [21] [22] [36] [37] [38].
- Se calculó el porcentaje de recobro (%R) [16] [17] [18] [19] [20] [21] [22] [37] [38].

Criterios de aceptación para Linealidad:

- $R^2 \geq 0.98$. [16] [18] [19] [20] [21] [22] [36] [37] [38]
- Se especificó que para que el método fuera apto para su uso en un estudio de farmacocinética, la variación debía ser $\pm 15\%$ de la concentración, exceptuando el primer punto que podía ser $\pm 20\%$ de la concentración nominal. 50% de los puntos de la curva debían cumplir ese criterio en cada corrida de validación [16] [17] [18] [19] [20] [21] [22] [37] [38].
- Los residuales debían presentar valores aleatorios, el 95% de estos valores debían caer en el intervalo que va de -2 a 2 desviaciones estándar. Si se observaba heterocedasticidad conforme aumentaba la concentración, sería necesario utilizar un modelo de regresión ponderado [21] [22] [36] [37] [40].

2.3.1.3 Selectividad.

Se analizaron 6 plasmas de distinta fuente + plasma lipémico + fármacos concomitantes [18] [19] [21] [22] [36] [37].

Para los 6 plasmas de distinta fuente + plasma lipémico:

- Se preparó un BM con cada una de las fuentes y el plasma lipémico.
- Se preparó el nivel 3 (MCM) de la curva de calibración incluida en la tabla 5 con cada uno de los plasmas a analizar.

Para los fármacos concomitantes:

- Muestra Cargada de Concentración Media (MCM). Se preparó por cuadruplicado el nivel 3 (MCM) de la curva de calibración incluida en la tabla 5.
- Glibenclamida. Se molieron dos pastillas de glibenclamida en un mortero. Se añadieron 20 ml de acetonitrilo y se agitó, se filtró con un papel Whatman del número 1 y se recuperó el filtrado. Se colocó en un matraz volumétrico de 25 ml y se aforó con agua. Se tomaron 100 μ l de esta solución y se llevaron a 5 ml con acetonitrilo. Se tomaron 50 μ l y se cargó una muestra MCM. Se filtró por membrana de 0.45 μ m y se inyectó al cromatógrafo [41].
- Ibuprofeno. Se tomó una cápsula de ibuprofeno y se disolvió su contenido en 20 ml de acetona. Se aforó a 25 ml con acetona. Se tomaron 100 μ l y se llevaron a 5 ml con acetonitrilo. Se tomaron 100 μ l y se llevaron a 1 ml con acetonitrilo. Se tomaron 50 μ l y se cargó una muestra MCM. Se filtró por membrana de 0.45 μ m y se inyectó al cromatógrafo [41].
- Omeprazol. Se tomó una cápsula de omeprazol y se disolvió su contenido en 15 ml de etanol. Se filtró con un papel Whatman del número 1 y se recuperó el filtrado. Se colocó en un matraz volumétrico de 25 ml y se aforó con etanol. Se tomaron 50 μ l de esta solución y se llevaron a 5 ml con acetonitrilo. Se tomaron 50 μ l y se cargó una muestra MCM. Se filtró por membrana de 0.45 μ m y se inyectó al cromatógrafo [41].
- Pioglitazona. Se preparó una solución de referencia pesando 10 mg de pioglitazona, se llevó a 10 ml con metanol. Se tomaron 500 μ l y se llevaron a 5 ml con

acetonitrilo. Se tomaron 105 µl y se llevaron a 1 ml con acetonitrilo. Se tomaron 50 µl y se cargó una muestra MCM. Se filtró por membrana de 0.45 µm y se inyectó al cromatógrafo [42].

Nota: La NOM-177-SSA1-2013 incluye un plasma hemolizado, sin embargo, se sabe que la metformina se introduce a los eritrocitos [7], por lo que no deben analizarse muestras hemolizadas.

Criterios de aceptación para Selectividad:

- Si había respuesta en el TR del analito, debía ser menor al 20% para el analito y del 5% para el EI. [18] [19] [21] [22] [36] [37].

2.3.1.4 Estabilidad de la muestra [18] [19] [21] [22] [37] [38].

Estabilidad de las soluciones.

Solución de comparación. Se prepararon las soluciones de metformina y ranitidina se indica en 2.2.4.4 Preparación de las Soluciones de Calibración. Las soluciones de referencia se prepararon el mismo día de su uso.

- Solución de referencia. Se tomaron 50 µl de solución **D** recién preparada, y 500 µl de ACN. Se filtró con membrana de PVDF de 0.45 µm y se inyectó por duplicado.
- Solución de prueba. Se tomaron 220 µl de solución **M2** y 160 µl de solución **R2** ambas almacenadas a -20°C, y se llevaron a 1000 µl con ACN. Se tomaron 50 µl de esta solución y se llevaron a 500 µl con ACN. Se filtró con membrana de PVDF 0.45 µm y se inyectó por duplicado.

De las respuestas producidas por metformina y ranitidina, se obtuvieron:

Se obtuvieron las respuestas de metformina y ranitidina. Se calculó el porcentaje de concentración de las soluciones de acuerdo con la siguiente fórmula [41]:

$$\frac{A_{MP}/A_{RP}}{A_{MR}/A_{RR}} \times \frac{C_{MR}}{C_{MP}} \times 100$$

Donde:

A_{MP}: Área de metformina de prueba

A_{RP}: Área de ranitidina de prueba

A_{MR}: Área de metformina de referencia

A_{RR}: Área de ranitidina de referencia

C_{MR}: Concentración de metformina de referencia

C_{MP}: Concentración de metformina de prueba

Criterios de aceptación:

- Las soluciones fueron consideradas estables si la desviación del porcentaje de concentración con respecto a la solución de referencia no era mayor al 15%.

Estabilidad de muestras en el automuestreador.

- Preparación de MCB y MCA. Se preparó, por duplicado, el nivel 2 (MCB) y 5 (MCA) de la curva de calibración incluida en la tabla 5. Se inyectó cada muestra por duplicado a intervalos definidos. las muestras se conservaron en el automuestreador durante toda la prueba.

De las respuestas producidas por metformina y ranitidina, se obtuvo:

- La concentración de metformina en las muestras interpolando en la curva de calibración y se calculó el porcentaje de recobro (%R).

Criterios de aceptación:

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

Ciclos de congelación/descongelación.

- Preparación de MCB. Se tomaron 20 µl de solución M2 + 980 µl de ACN. Se tomaron 50 µl de esta solución + 450 µl de plasma. Se preparó por duplicado. Las muestras se almacenaron a -70°C, por lo menos 12 horas antes de su análisis. Se evaluaron 3 ciclos de congelación/descongelación con periodos de congelación/descongelación de al menos 12 horas entre cada uno.
- Preparación de MCA. Se tomaron 160 µl de solución M2 + 740 µl de ACN. Se tomaron 50 µl de esta solución + 450 µl de plasma. Se preparó por duplicado. Las muestras se almacenaron a -70°C, por lo menos 12 horas antes de su análisis. Se evaluaron 3 ciclos de congelación/descongelación con periodos de congelación/descongelación de al menos 12 horas entre cada uno.
- Las muestras se atemperaron y se les añadieron 50 µl de solución R3. Las muestras se sometieron al tratamiento de muestra y se inyectaron al cromatógrafo.

De las respuestas producidas por metformina y ranitidina, se obtuvo:

- La concentración de metformina en las muestras interpolando en la curva de calibración y se calculó el %R.

Criterios de aceptación:

- Las muestras fueron consideradas estables si %R está dentro del intervalo del $\pm 15\%$.

Muestra procesada.

- Se analizó por duplicado el nivel 5 (MCA) de la curva de calibración incluida en la tabla 5 previamente procesados y almacenados a temperatura ambiente. Se analizaron periódicamente inyectando cada una por triplicado.

De las respuestas producidas por metformina y ranitidina, se obtuvo:

- La concentración de metformina en las muestras interpolando en la curva de calibración y se calculó el porcentaje de recobro (%R).

Criterios de aceptación:

- Las muestras fueron consideradas estables si %R está dentro del intervalo del $\pm 15\%$.

Muestras sin procesar.

Se prepararon 6 MCB y 6 MCA como se indica a continuación:

- Preparación de MCB. Se tomaron 20 μl de solución M2 + 980 μl de ACN. Se tomaron 50 μl de esta solución + 450 μl de plasma. Se preparó por duplicado. Las muestras se almacenaron en las mismas condiciones que las muestras de estudio durante 13 semanas.
- Preparación de MCA. Se tomaron 160 μl de solución M2 + 740 μl de ACN. Se tomaron 50 μl de esta solución + 450 μl de plasma. Se preparó por duplicado. Las muestras se almacenaron en las mismas condiciones que las muestras de estudio durante 13 semanas.
- Se atemperaron las muestras y se añadieron 50 μl de solución EI3. Las muestras se sometieron al tratamiento de muestra y se inyectaron al cromatógrafo.

De las respuestas producidas por metformina y ranitidina, se obtuvo:

- La concentración de metformina en el plasma interpolando en la curva de calibración y se calculó el porcentaje de recobro (%R).

Criterios de aceptación:

- Las muestras fueron consideradas estables si %R está dentro del intervalo del $\pm 15\%$.

2.3.1.5 Precisión (RyR) y exactitud del método.

Repetibilidad y Exactitud (Pruebas Interdía e Intranalista).

Se prepararon las curvas incluidas en las Tablas 4 y 5 en 3 días diferentes. Se prepararon los puntos 1,3 4 y 5 por triplicado [16] [17] [18] [19] [21] [22] [36].

De las respuestas producidas por metformina / ranitidina, se obtuvieron:

- Los porcentajes de recobro (%R) de las concentraciones obtenidas interpolando en la curva de calibración [16] [17] [18] [19] [21] [36] [37].
- Se calculó el CV de las concentraciones calculadas [16] [18] [19] [20] [21] [22].
- Se hizo un análisis de varianza de una sola vía [35] [36] [37].
- Se calculó el porcentaje de sesgo (%Sesgo= ((concentración experimental- concentración real) / concentración real) *100) [35] [36].

Criterios de aceptación para Precisión:

- El CV debía ser menor o igual al 15% de la concentración, exceptuando el primer punto que debía ser menor o igual al 20% de la concentración nominal, [16] [18] [19] [20] [21] [22].
- El ANOVA no debía arrojar diferencias significativas entre los datos. [35] [36].

Criterios de precisión para Exactitud:

- El %Sesgo debía ser $\pm 15\%$ en todas las concentraciones, exceptuando el primer punto que debía ser de $\pm 20\%$. [35] [36].

- El porcentaje de recobro (%R) debía ser $\pm 15\%$ de la concentración nominal, exceptuando el primer punto que debía ser $\pm 20\%$ de la concentración nominal [16] [17] [18] [19] [21] [36] [37].

Reproducibilidad y Exactitud. (Pruebas Interdía e Interanalista).

Reproducibilidad internalista. Se utilizaron los datos obtenidos en los dos últimos días de la prueba de precisión. Otro analista analizó 4 concentraciones de la curva, 3 réplicas 2 días.

De las respuestas producidas por metformina / ranitidina, se obtuvieron:

- Los porcentajes de recobro (%R) de las concentraciones obtenidas interpolando en la curva de calibración [16] [17] [18] [19] [21] [36] [37].
- Se calculó el CV de las concentraciones obtenidas interpolando en la curva de calibración [16] [18] [19] [20] [21] [22].
- Se hizo un análisis de varianza de dos factores. [35] [37].
- Se calculó el porcentaje de sesgo (%Sesgo= ((concentración experimental- concentración real) / concentración real) *100) [35] [36].

Criterios de aceptación para Precisión:

- El CV debía ser menor o igual al 15% de la concentración, exceptuando el primer punto que debía ser menor o igual al 20% de la concentración nominal, [16] [18] [19] [20] [21] [22].
- El ANOVA no debía arrojar diferencias significativas entre los datos [35] [37].

Criterios de precisión para Exactitud:

- El %Sesgo $\pm 15\%$ en todas las concentraciones, exceptuando el primer punto que debía ser de $\pm 20\%$. [35] [36].
- El porcentaje de recobro (%R) debía ser $\pm 15\%$ de la concentración nominal, exceptuando el primer punto que debía ser $\pm 20\%$ de la concentración nominal [16] [17] [18] [19] [21] [36] [37].

2.3.1.6 *Acarreo*

Se inyectaron 3 corridas de Fase Móvil después de una inyección del Límite Superior de Cuantificación.

Criterios de aceptación:

- La respuesta de la Fase Móvil no debía ser mayor al 20% del LIC y 5% del EI. [17] [19] [20] [22] [37] [38].

2.3.1.7 *Integridad de la Dilución.*

Se preparó una dilución de una muestra cargada por encima del LSC. La dilución fue tal que la respuesta obtenida del análisis se pudo interpolar en la curva de calibración. Se preparó por quintuplicado [17] [18] [20] [22] [37].

De las respuestas producidas por metformina y ranitidina, se obtuvo:

- La concentración de metformina en las muestras interpolando en la curva de calibración y se calculó el porcentaje de recobro (%R).

Criterios de aceptación:

- La dilución fue considerada íntegra si %R está dentro del intervalo del $\pm 15\%$.

2.3.1.7 *Sensibilidad.*

Se determinó por el LIC de la prueba de Linealidad.

De las respuestas producidas por metformina y ranitidina, se obtuvo:

- La concentración de metformina en las muestras interpolando en la curva de calibración y se calculó el porcentaje de recobro (%R).

- Se calculó el coeficiente de varianza (CV).

Criterios de aceptación:

- El %R del LIC debía ser $\pm 20\%$ de la concentración nominal.
- El CV del LIC debía ser $\leq 20\%$.

2.3.1.8 Recobro Absoluto.

Se compararon los recobros de la curva de calibración en plasma (tabla 5), vs curva de calibración en solución (tabla 6) [35] [36].

Tabla 6: Curva de Calibración en Solución

Nivel		ACN	Concentración metformina	Concentración ranitidina
1	50 μ l de solución A	500 μ l	71 ng/ml	1600 ng/ml
2	50 μ l de solución B	500 μ l	142 ng/ml	1600 ng/ml
3	50 μ l de solución C	500 μ l	284 ng/ml	1600 ng/ml
4	50 μ l de solución D	500 μ l	586 ng/ml	1600 ng/ml
5	50 μ l de solución E	500 μ l	1172 ng/ml	1600 ng/ml
6	50 μ l de solución F	500 μ l	1500 ng/ml	1600 ng/ml

De las respuestas producidas por metformina / ranitidina, se calculó:

El recobro absoluto.

$$\% \text{ Recobro absoluto} = (\text{Recobro Plasma} / \text{Recobro solución}) \times 100$$

Criterios de aceptación para recobro:

El recobro absoluto de la muestra tratada debía ser de al menos el 50%.

3. Resultados.

3.1 Adecuabilidad del Sistema.

Durante la validación, se evaluó la Adecuabilidad del Sistema al principio de cada corrida analítica (fig. 13). Se inyectó por quintuplicado una solución preparada con 50 µl de solución E de la tabla 5 y 500 µl de ACN.

Resultados (fig. 13):

- El CV entre las respuestas producidas por metformina y ranitidina va de 0.131 a 1.948 y cumple los criterios de aceptación:

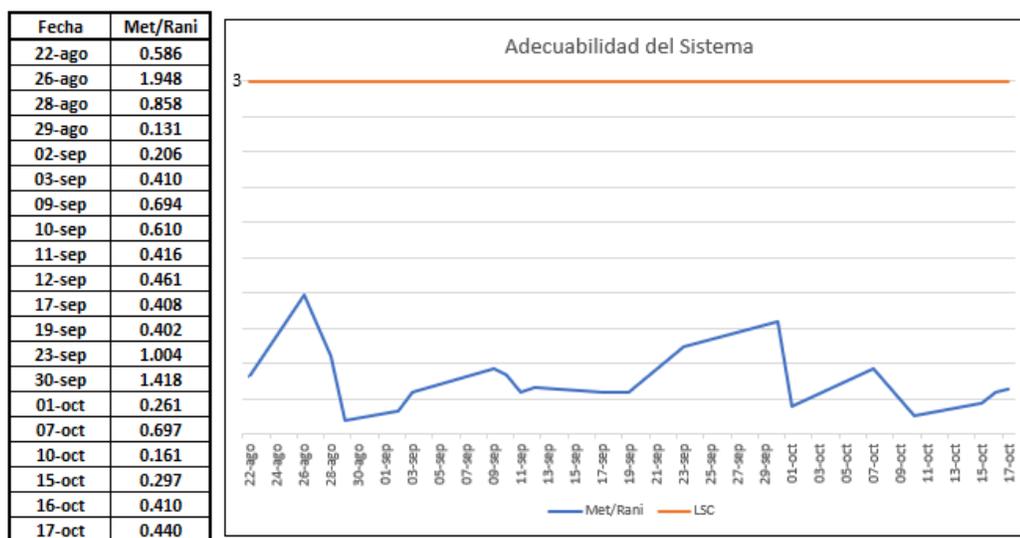


Figura 13: Adecuabilidad del Sistema. Se muestra que la adecuabilidad de todos los días de análisis cumple con los criterios de aceptación

3.2 Linealidad

Se evaluó la linealidad inyectando por duplicado la curva de calibración preparada como se incluye en las tablas 4 y 5. Esta curva se preparó por quintuplicado. Blanco

Matriz (BM) y Blanco Cero (B0) no se incluyeron en los cálculos. Las pesadas exactas y correcciones por peso molecular y pureza del estándar pueden verse en la figura 14.

Día 1 26/08/2019					
Peso Met (mg)	10.2	Corr PM Met	0.7798	Pureza Met	0.9980
Peso Rani (mg)	11.0	Corr PM Rani	0.8961	Pureza Rani	0.9940
Peso corr Met (mg)	7.9	FD Met	10000.0	M2 (ng/ml)	79381.6
Peso corr Rani (mg)	9.8	FD Rani	10000.0	R2 (ng/ml)	97977.8

Ranitidina		
Alic. R2=	0.1600	ml
Vol Final=	1.0000	ml
Alic. =	0.0500	ml
Vol Final=	0.5500	ml
Conc Final=	1425.1	ng/ml

Alicuota (ml)	Vol Final (ml)	Conc (ng/ml)	Alicuota (ml)	Vol Final (ml)	Conc Final (ng/ml)	Nivel
0.01	1	794	0.05	0.55	72	1
0.02	1	1588	0.05	0.55	144	2
0.04	1	3175	0.05	0.55	289	3
0.12	1	9526	0.05	0.55	866	4
0.2	1	15876	0.05	0.55	1443	5
0.32	1	25402	0.05	0.55	2309	6

Figura 14 Cálculos al preparar la curva de calibración

Resultados:

- La función de respuesta que resultó más reproducible fue el Área.
- El modelo que mejor se ajustó a los datos obtenidos durante el experimento, requirió la transformación a logaritmo natural tanto de la concentración como del área [16] [17] [18] [19] [20] [22] [21] [37] [38]. En la figura 16, se muestran los resultados promedio de la prueba de linealidad, se muestra la concentración promedio de cada nivel de la curva, el %R promedio de cada nivel de la curva, la gráfica $\text{Ln}(\text{Conc ng/ml})$ vs $\text{Ln}(\text{área de la metformina/área de la ranitidina})$, la ecuación de la recta, la pendiente (a), el intercepto (b), el coeficiente de determinación (R^2), el coeficiente de correlación (R), y el análisis de residuales (RSS), y puede observarse que se cumplen los criterios de aceptación incluidos en el protocolo de validación. En las figuras 17-21 se muestran los resultados

individuales de cada una de las curvas de calibración. Puede comprobarse que todas ellas cumplen los criterios de aceptación previamente establecidos.

- En las figuras 16 a la 21, puede observarse que la variación estuvo en un intervalo comprendido entre el 0.98 y el 6.34%. El 83.3% de los puntos de la curva cumplieron ese criterio en cada corrida de validación [16] [17] [18] [19] [20] [21] [22] [37] [40].
- En la tabla 7, se presenta un cuadro comparativo de distintos criterios que permiten evaluar la calidad de la curva de calibración. Puede observarse que el valor de la pendiente es muy cercano a 1, lo que puede interpretarse como que los cambios que suceden en x varían en relación 1:1 con los cambios que suceden en y . Los valores de R^2 son todos mayores a 0.99 lo que puede traducirse como que los valores experimentales son muy cercanos a los valores calculados [40].
- Análisis de residuales. En la figura 15 puede observarse que no hay heterocedasticidad; que el 50% de los datos tuvieron valores positivos y el 50% restante tuvieron residuales negativos; que los residuales se distribuyeron aleatoriamente y que ninguno cayó fuera del intervalo de -2 a 2 desviaciones estándar [36] [37] [38] [40].

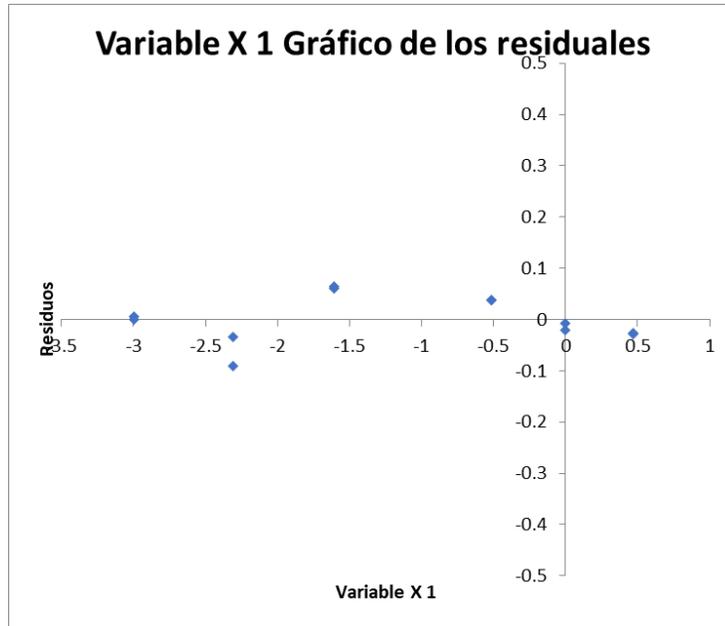


Figura 15: Gráfica de análisis de residuales de las 5 curvas de calibración preparadas. Puede observarse que no hay heterocedasticidad, que los valores son aleatorios y en el intervalo comprendido entre -2 y 2 desviaciones estándar.

Nivel	Met ng/ml	%R	CV
1	74	103	4.98
2	140	97	6.34
3	314	109	3.71
4	914	106	3.17
5	1448	100	1.80
6	2292	99	0.96

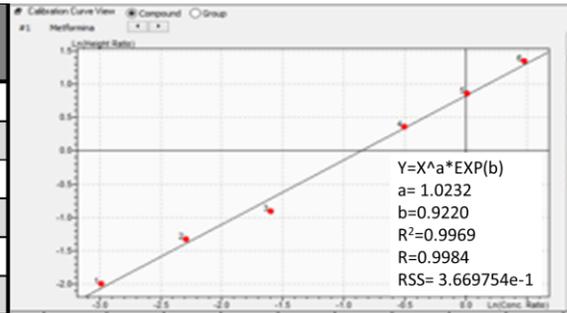


Figura 16: Resultados promedio de la prueba de linealidad.

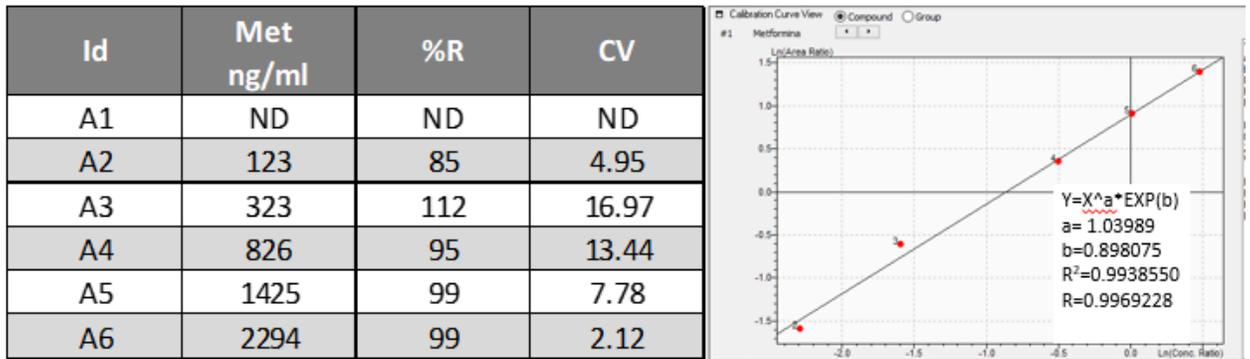


Figura 17: Curva A. Se muestra la concentración promedio de cada nivel de la curva, el %R promedio de cada nivel de la curva, el CV promedio de cada nivel de la curva, La gráfica Ln (Conc ng/ml) vs Ln (Área del analito/Área del SI), la ecuación de la recta, la pendiente (a), el intercepto (b), el coeficiente de determinación (R^2), el coeficiente de correlación (R).

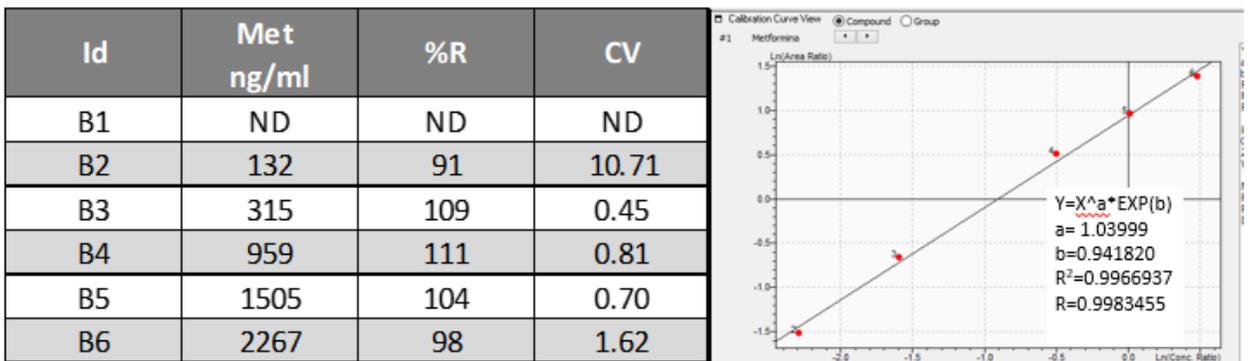


Figura 18: Curva B. Se muestra la concentración promedio de cada nivel de la curva, el %R promedio de cada nivel de la curva, el CV promedio de cada nivel de la curva, La gráfica Ln (Conc ng/ml) vs Ln (Área del analito/Área del SI), la ecuación de la recta, la pendiente (a), el intercepto (b), el coeficiente de determinación (R^2), el coeficiente de correlación (R).

Id	Met ng/ml	%R	CV
C1	68	94	3.14
C2	155	107	0.00
C3	308	107	0.69
C4	922	106	0.15
C5	1422	99	0.20
C6	2219	96	0.38

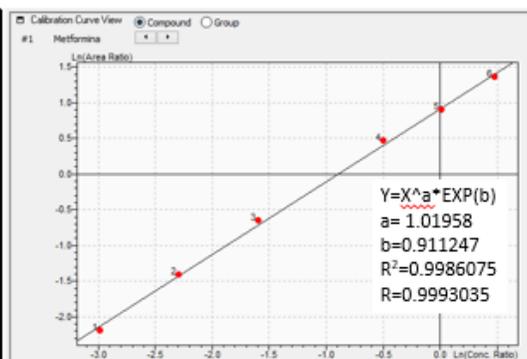


Figura 19: Curva C. Se muestra la concentración promedio de cada nivel de la curva, el %R promedio de cada nivel de la curva, el CV promedio de cada nivel de la curva, La gráfica Ln (Conc ng/ml) vs Ln (Área del analito/ Área del SI), la ecuación de la recta, la pendiente (a), el intercepto (b), el coeficiente de determinación (R^2), y el coeficiente de correlación (R)

Id	Met ng/ml	%R	CV
D1	83	115	ND
D2	161	111	6.61
D3	291	101	0.00
D4	939	108	0.53
D5	1405	97	0.00
D6	2329	101	0.00

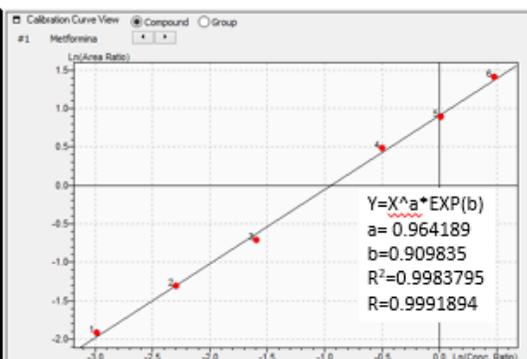


Figura 20: Curva D. Se muestra la concentración promedio de cada nivel de la curva, el %R promedio de cada nivel de la curva, el CV promedio de cada nivel de la curva, La gráfica Ln (Conc ng/ml) vs Ln (Área del analito/ Área del SI), la ecuación de la recta, la pendiente (a), el intercepto (b), el coeficiente de determinación (R^2), y el coeficiente de correlación (R)

Id	Met ng/ml	%R	CV
E1	73	100	6.83
E2	128	88	9.43
E3	332	115	0.43
E4	926	107	0.92
E5	1485	103	0.33
E6	2352	102	0.69

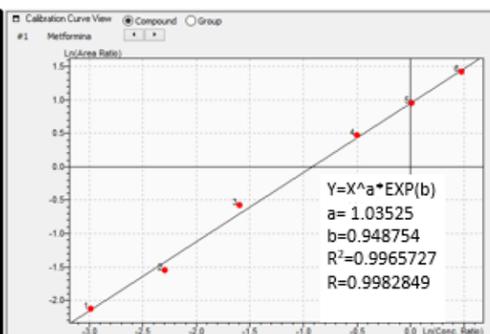


Figura 21 Curva E. Se muestra la concentración promedio de cada nivel de la curva, el %R promedio de cada nivel de la curva, el CV promedio de cada nivel de la curva, La gráfica Ln (Conc ng/ml) vs Ln (Área del analito/ Área del SI), la ecuación de la recta, la pendiente (a), el intercepto (b), el coeficiente de determinación (R^2), y el coeficiente de correlación (R)

Tabla 7: Tabla de comparación de criterios de evaluación de las curvas de calibración

ID	m	b	R ²
A	1.0399	0.8981	0.9938
B	1.0400	0.9418	0.9970
C	1.0196	0.9114	0.9986
D	0.9642	0.9098	0.9984
E	1.0525	0.9488	0.9966
Promedio	1.0232	0.9220	0.9969
S	0.0351	0.0220	0.0019
EE	0.0143	0.0177	0.0009
CV	3.4255	2.3892	0.1930

3.3 Selectividad.

Se analizaron 6 plasmas de distinta fuente + plasma lipémico + fármacos concomitantes [18] [19] [21] [22] [36] [37].

Resultados:

- En ninguna de las 6 fuentes de plasma analizadas se presentaron interferencias al tiempo de retención de la metformina y tampoco al tiempo de retención de la ranitidina. El plasma lipémico se corrió dos veces y se confirmó que existe interferencia al tiempo de retención de la metformina, pero no en el de la ranitidina. Es de primordial importancia asegurarse que el voluntario cumpla

con el ayuno requerido en el protocolo de investigación clínica (fig. 22) [18] [19] [21] [22] [36] [37].

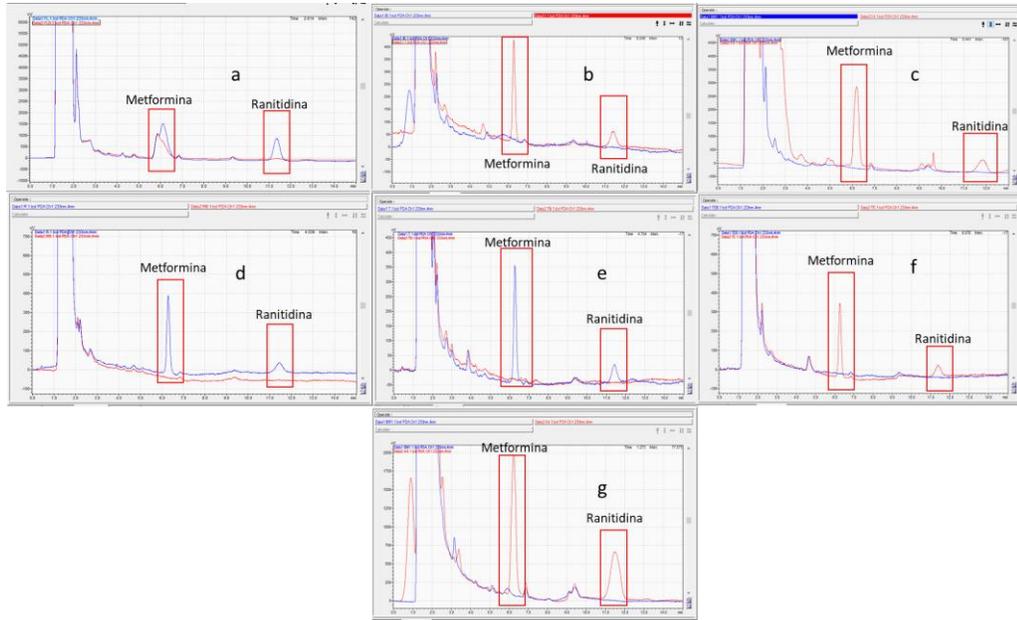


Figura 22: Imagen a, plasma lipémico cargado con metformina y ranitidina vs BM del plasma lipémico, puede observarse una interferencia al tiempo de retención de la metformina. Imágenes b a la g, plasmas de 6 fuentes diferentes cargados con metformina y ranitidina, puede observarse que no hay ninguna interferencia a los tiempos de retención ni de la metformina ni de la ranitidina.

- Se prepararon de manera independiente 4 muestras cargadas de concentración media a las que se añadieron alrededor de 800 ng/ ml de glibenclamida, ibuprofeno, omeprazol y pioglitazona respectivamente. Ninguno de los medicamentos concomitantes probados dio respuesta en el tiempo de retención de la metformina ni tampoco en el de la ranitidina (fig.23).

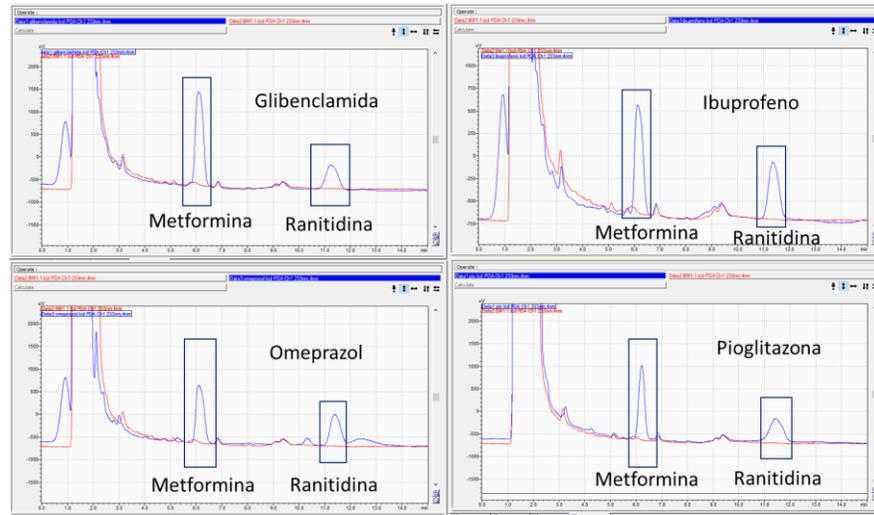


Figura 23: Muestras cargadas de concentración media preparadas de manera independiente a las que se les añadieron aproximadamente 800 ng/ml de glibenclamida, ibuprofeno, omeprazol y pioglitazona respectivamente. Se puede observar que no hay interferencia en los tiempos de retención ni de la metformina ni de la ranitidina

3.4 Estabilidad de la muestra [16] [17] [18] [19] [20] [21] [22] [37] [38].

Estabilidad de las soluciones:

Solución de comparación. El día 17 de septiembre, se prepararon las soluciones de metformina y ranitidina como se indica en 2.2.4.4 Preparación de las Soluciones de Calibración. Las soluciones de referencia se prepararon en el momento.

- Solución de referencia. Se tomaron 50 µl de solución **D** recién preparada, y 500 µl de ACN. Se filtró con membrana de PVDF de 0.45 µm e inyectamos por duplicado.
- Soluciones de prueba. Se tomaron 220 µl de solución **M2** y 160 µl de solución **R2** almacenadas a -20°C que fueron preparadas el 9 de septiembre, 17 de septiembre y 7 de octubre respectivamente, y se llevó a 1000 µl con ACN. Se

tomaron 50 µl de esta solución y se llevó a 500 µl con ACN. Se filtró con membrana de PVDF 0.45 µm y se inyectó por duplicado.

Resultados:

- Como puede observarse en la tabla 8, después de 4 semanas se obtuvo un %R para la metformina del 94% y para la ranitidina del 113%, con lo que se puede concluir que las soluciones fueron estables al menos un mes.

Estabilidad de muestras en el automuestreador:

- Se preparó por duplicado el nivel 2 (MCB) y 5 (MCA) de la curva de calibración incluida en la tabla 5. Se inyectó cada muestra por duplicado cada 6 horas aproximadamente. Se conservaron las muestras en el automuestreador durante toda la prueba.

Resultados:

- Después de 28 horas, se obtuvo un %R del 108% para la solución baja de metformina, del 98% para la solución alta de metformina y del 95% para la ranitidina. Las muestras fueron estables en el automuestreador al menos 28 horas como se muestra en la tabla 8.

Ciclos de congelación/descongelación:

- Se preparó 6 veces el nivel 2 de la curva de calibración (MCB). Se tomaron 20 µl de solución M2 + 980 µl de ACN. Se tomaron 50 µl de esta solución + 450 µl de plasma. Las muestras se almacenaron a -70°C por lo menos 24 horas antes del análisis y entre cada ciclo de congelación/descongelación. Se evaluaron 3 ciclos de congelación/descongelación.
- Se preparó 6 veces el nivel 5 de la curva de calibración (MCA). Se tomaron 160 µl de solución M2 + 740 µl de ACN. Se tomaron 50 µl de esta solución + 450 µl de plasma. Las muestras se almacenaron a -70°C por lo menos 24 horas antes del

análisis y entre cada ciclo de congelación/descongelación. Se evaluaron 3 ciclos de congelación/descongelación.

- Se atemperaron las muestras y se les añadieron 50 µl de solución R3. Las muestras se sometieron al tratamiento de muestra, Se filtraron e inyectaron al cromatógrafo.

Resultados:

- El %R a los tres ciclos de congelación/descongelación fue del 105% para la concentración baja y del 100% para la concentración alta como se muestra en la tabla 8. De estos resultados se pudo concluir que la muestra resultó estable después de 3 ciclos de congelación/descongelación.

Muestras procesadas:

- MCM. Se analizó por duplicado el nivel 4 (MCM) de la curva de calibración durante 8 días.

Resultados:

- En la tabla 8 puede observarse que las muestras procesadas son estables a temperatura ambiente y protegidas de la luz hasta por 8 días. Las muestras no se deben refrigerar ni congelar porque se forma un precipitado cristalino.

Muestras sin procesar:

- Se prepararon 6 MCB y 6 MCA como se indica a continuación:
- Preparación de MCB. Se tomaron 20 µl de solución M2 + 980 µl de ACN, se mezclaron. Se tomaron 50 µl de esta solución + 450 µl de plasma. Se prepararon por duplicado. Se almacenaron en las mismas condiciones que las muestras de estudio durante 3 meses.
- Preparación de MCA. Se tomaron 160 µl de solución M2 + 740 µl de ACN, se mezclaron. Se tomaron 50 µl de esta solución + 450 µl de plasma. Se prepararon por duplicado. Se almacenaron en las mismas condiciones que las muestras de estudio durante 3 meses.

- Se atemperaron las muestras y añadimos 50 µl de solución R3. Se sometieron las muestras al tratamiento de muestra e inyectamos.

Resultados:

- En la tabla 8 puede observarse que las muestras resultaron estables hasta por 13 semanas con un %R del 110%.

Tabla 8: Pruebas de Estabilidad.

Pruebas de Estabilidad				
Estabilidad de soluciones (4 semanas)				
Identificación		Concentración	%R	CV
Metformina	Inicial	1429 \pm 7.14 ng/ml	100	0.50
	Final	1343 \pm 1.13 ng/ml	94	0.08
Ranitidina	Inicial	1464 \pm 0.07 ng/ml	100	0.00
	Final	1654 \pm 4.10 ng/ml	113	0.22
Estabilidad de la muestra en el automuestreador (28 horas)				
Identificación		Concentración	%R	CV
Metformina Baja	Inicial	144 \pm 3.56 ng/ ml	100	2.47
	Final	156.16 \pm 3.54 ng/ml	108	2.27
Metformina Alta	Inicial	1443 \pm 10.27 ng/ml	100	0.71
	Final	1415 \pm 10.27 ng/ml	98	0.73
Ranitidina	Inicial	1425 \pm 24.73 ng/ml	100	1.73
	Final	1342 \pm 24.73 ng/ml	95	2.59
Ciclos/descongelación (3 ciclos)				
Identificación		Concentración	%R	CV
Metformina Baja	Inicial	130 \pm 10.00 ng/ ml	91	7.58
	Final	150 \pm 4.93 ng/ml	105	3.23
Metformina Alta	Inicial	1495 \pm 7.51 ng/ml	104	7.51
	Final	1412 \pm 47.84 ng/ml	100	3.40
Estabilidad de la muestra procesada (8 días)				
Identificación		Concentración	%R	CV
Metformina	Inicial	890 \pm 5.56 ng/ ml	102	0.02
	Final	975 \pm 41.00 ng/ml	110	4.21

3.4 Precisión (RyR) y exactitud del método.

3.5.1 Repetibilidad y Exactitud (Pruebas Interdía e Intranalista).

La Analista 1, QFBT Alejandra Sánchez Solares preparó la curva incluida en las Tablas 2 y 3 en 3 días diferentes. Se incluyeron los puntos 1 (LIC) ,3 (MCB), 4 (MCM) y 5 (MCA) por triplicado. [16] [17] [18] [19] [20] [21] [22] [35] [36] [37] [38].

Resultados:

- En las tablas 9, 10, 11 y 12 puede apreciarse que se cumplen los criterios de aceptación. En el punto A1 se obtuvo un %R=80, el criterio de aceptación para el primer nivel de la curva de calibración va del 80-120%, por lo que se cumplió el requerimiento. El %R de todos los demás puntos se encontraron dentro del intervalo del 85-115% que está dentro del intervalo definido [22] [16] [17] [18] [20] [21] [37] [38].
- En las tablas 9, 10, 11 y 12 puede verse que se cumplen los criterios de aceptación ya que el CV se encuentra entre los valores de 0 - 20% en todos los casos, con excepción del punto A1 del día 2 que no pudo calcularse porque el cromatograma no cumplió con los estándares de calidad de la corrida cromatográfica, sin embargo, la normatividad dicta que el 50% de los puntos debe cumplir con los criterios de aceptación y en nuestro caso el 92% de las muestras cumplió dichos criterios [16] [17] [18] [20] [21] [22] [37] [38].
- El análisis de varianza no arrojó diferencia significativa entre los datos (fig. 24) [36] [35].
- En la tabla 13 puede apreciarse que el % Sesgo va del 2 al 4% y cumplió con los criterios establecidos [36] [35].

Tabla 9: Resultados día 1, analista 1.

Día 1. Función de Respuesta: Área. Modelo de ajuste: Logaritmo natural.							
	Conc Teórica (ng/ml)	1	2	Promedio	%R	S	CV
A1	72	81	80	81	112	0.7071	0.88
A3	289	282	282	282	98	0.0000	0.00
A4	866	765	763	764	88	1.4142	0.19
A5	1443	1367	1359	1363	94	5.6569	0.42
B1	72	80	82	81	112	1.4142	1.75
B3	289	292	292	292	101	0.0000	0.00
B4	866	826	836	831	96	7.0711	0.85
B5	1443	1428	1396	1412	98	22.6274	1.60
C1	72	59	70	65	89	7.7782	12.06
C3	289	318	292	305	106	18.3848	6.03
C4	866	883	904	894	103	14.8492	1.66
C5	1443	1411	1416	1414	98	3.5355	0.25

Tabla 10: Resultados día 2, analista 1.

Día 2. Función de Respuesta: Área. Modelo de ajuste: Logaritmo natural.							
	Conc Teórica (ng/ml)	1	2	Promedio	%R	S	CV
A1	72	58	ND	58	80	NA	NA
A3	289	283	286	285	99	2.1213	0.75
A4	866	860	876	868	100	11.3137	1.30
A5	1443	1226	1242	1234	85	11.3137	0.92
B1	72	92	71	82	113	14.8492	18.22
B3	289	280	318	299	104	26.8701	8.99
B4	866	975	961	968	112	9.8995	1.02
B5	1443	1488	1537	1513	105	34.6482	2.29
C1	72	78	78	78	108	0.0000	0.00
C3	289	310	323	317	110	9.1924	2.90
C4	866	844	851	848	98	4.9497	0.58
C5	1443	1332	1316	1324	92	11.3137	0.85

Tabla 11: Resultados día 3, analista 1.

Día 3. Función de Respuesta: Área. Modelo de ajuste: Logaritmo natural.							
	Conc Teórica (ng/ml)	1	2	Promedio	%R	S	CV
A1	72	70	66	68	94	2.83	4.16
A3	289	308	311	282	98	2.12	0.75
A4	866	866	880	764	88	9.90	1.30
A5	1443	1204	1359	1363	94	109.60	8.04
B1	72	85	82	81	112	2.12	2.62
B3	289	305	343	292	101	26.87	9.20
B4	866	973	959	831	96	9.90	1.19
B5	1443	1441	1485	1412	98	31.11	2.20
C1	72	93	93	65	89	0.00	0.00
C3	289	348	342	305	106	4.24	1.39
C4	866	850	857	894	103	4.95	0.55
C5	1443	1300	1285	1414	98	10.61	0.75

Tabla 12: Resumen de los Resultados de la prueba de Repetibilidad.

ANALISTA 1			
Día 1			
Concentración Conocida	Concentración Experimental (ng/ml)	Exactitud (%R)	Precisión (%CV)
72	75 \pm 3.2998	104	4.89
289	293 \pm 6.1283	102	2.01
866	830 \pm 7.7782	96	0.90
1443	1396 \pm 10.6066	97	0.76
Día 2			
Concentración Conocida (ng/ml)	Concentración Experimental (ng/ml)	Exactitud (%R)	Precisión (%CV)
72	73 \pm 7.4246	100	9.11
289	300 \pm 15.7921	104	4.21
866	895 \pm 8.7210	103	0.97
1443	1357 \pm 20.2704	94	1.35
Día 3			
Concentración Conocida (ng/ml)	Concentración Experimental (ng/ml)	Exactitud (%R)	Precisión (%CV)
72	71 \pm 1.6499	99	2.26
289	293 \pm 11.0780	102	3.78
866	830 \pm 8.2496	96	1.01
1443	1396 \pm 50.4403	97	3.67
Interdía/Intranalista			
Concentración Conocida	Concentración Experimental (ng/ml)	Exactitud (%R)	Precisión (%CV)
72	73 \pm 4.1248	101	5.42
289	295 \pm 10.9994	102	3.33
866	851 \pm 8.2496	98	0.96
1443	1383 \pm 27.1058	96	1.92

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
A	15	1473.47637	98.2317578	71.0573745
B	15	1554.33243	103.622162	44.5406928
C	15	1546.57427	103.104951	58.9074103

$$H_0: \mu_1 \neq \mu_2$$

$$H_A: \mu_1 = \mu_2$$

$$\alpha = 0.05$$

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
				Entre grupos	265.359879	2
Dentro de los grupos	2443.07669	42	58.1684925			
Total	2708.43657	44				

Figura 24: Análisis de Varianza de los resultados del analista 1. Puede observarse que la probabilidad es mucho mayor de 0.05 y puede concluirse que no hay diferencia significativa de los datos analizados.

Tabla 13: Cálculo del Sesgo para la prueba de Repetibilidad.

Nivel	Conc Real ng/ml	Conc Calculada ng/ml	%Sesgo
1	72	74	2
3	289	295	2
4	866	851	2
5	1443	1383	4

3.5.2 Reproducibilidad y Exactitud. (Pruebas Interdía e Interanalista).

Reproducibilidad internalista. Se utilizaron los datos obtenidos en los dos últimos días de la prueba de precisión. La Analista 2, QFB Tania Smith Márquez preparó la curva incluida en las Tablas 4 y 5, en 2 días diferentes. Se incluyeron los puntos 1 (LIC), 3

(MCB), 4 (MCM) y 5 (MCA) por triplicado. Las pesadas exactas y correcciones por peso molecular y pureza del estándar pueden verse en la figura 25.

Día 1	17/09/2019				
Peso Met (mg)	10.1	Corr PM Rani	0.8961	Pureza Rani	0.9940
Peso Rani (mg)	10.5	Corr PM Met	0.7900	Pureza Met	0.9980
Peso corr Met (mg)	7.9	FD Met	10000.0	M2 (ng/ml)	78603.3
Peso corr Rani (mg)	9.4	FD Rani	10000.0	R2 (ng/ml)	93524.3

Ranitidina		
Alic. R2=	0.1600	ml
Vol Final=	1.0000	ml
Alic. =	0.0500	ml
Vol Final=	0.5500	ml
Conc Final=	1360.4	ng/ml

Alicuota	Vol Final (ml)	Conc (ng/ml)	Alicuota (ml)	Vol Final (ml)	Conc Final (ng/ml)	Nivel
0.01	1	786	0.05	0.55	71	1
0.02	1	1572	0.05	0.55	143	2
0.04	1	3144	0.05	0.55	286	3
0.12	1	9432	0.05	0.55	857	4
0.2	1	15721	0.05	0.55	1429	5
0.32	1	25153	0.05	0.55	2287	6

Figura 25: Preparación de la curva de calibración del día 17 de septiembre.

Resultados:

- El %R fue del 89 al 114% cumpliendo los criterios de aceptación. (tablas 14, 15 y 16) [18] [22] [36] [37] [21].
- Los CV fue del 0 al 12% cumpliendo los criterios de aceptación. (tablas 14, 15 y 16) [18] [22] [36] [37] [21].
- El análisis de varianza realizado arrojó que no hay diferencia significativa entre los datos. (Fig. 26) [36].
- Se calculó el porcentaje de sesgo de cada uno de los niveles de concentración analizados, los valores obtenidos van del 1 al 3% y se cumplen los criterios de aceptación establecidos. [35] [36]] (tabla 17).

Tabla 14: Resultados individuales de la prueba de Reproducibilidad (Robustez)

		Día 1								
		A			B			C		
		Muestra	%R	CV	Muestra	%R	CV	Muestra	%R	CV
Químico 1	A1	112	0.88		B1	112	1.75	C1	89	12.06
	A3	98	0.00		B3	101	0.00	C3	106	6.03
	A4	88	0.19		B4	96	0.85	C4	103	1.66
	A5	94	0.42		B5	98	1.60	C5	98	0.25
Químico 2	A1	85	9.27		B1	96	3.10	C1	114	0.87
	A3	91	0.81		B3	100	0.49	C3	97	8.68
	A4	108	1.37		B4	109	0.76	C4	104	0.79
	A5	111	0.44		B5	113	0.35	C5	111	1.56
		Día 2								
		A			B			C		
		Muestra	%R	CV	Muestra	%R	CV	Muestra	%R	CV
Químico 1	A1	112	0.88		B1	112	1.75	C1	89	12.06
	A3	98	0.00		B3	101	0.00	C3	106	6.03
	A4	88	0.19		B4	96	0.85	C4	103	1.66
	A5	94	0.42		B5	98	1.60	C5	98	0.25
Químico 2	A1	97	3.05		B1	104	1.91	C1	106	0.00
	A3	107	1.61		B3	113	1.09	C3	114	0.86
	A4	99	0.92		B4	106	0.23	C4	107	1.31
	A5	101	1.03		B5	107	1.66	C5	109	2.13

Tabla 15: Resumen de la prueba de Reproducibilidad (Robustez)

ANALISTA 1				ANALISTA 2			
Día 1				Día 1			
Concentración Conocida (ng/ml)	Concentración Experimental (ng/ml)	Exactitud (%R)	Precisión (%CV)	Concentración Conocida (ng/ml)	Concentración Experimental (ng/ml)	Exactitud (%R)	Precisión (%CV)
72	75 ± 3.2998	104	4.89	71	73 ± 1.1785	102	1.65
289	293 ± 6.1283	102	2.01	286	319 ± 3.7712	112	1.19
866	830 ± 7.7782	96	0.90	857	892 ± 7.3068	104	0.82
1443	1396 ± 10.6066	97	0.76	1429	1513 ± 24.5130	106	1.61
Día 2				Día 2			
Concentración Conocida (ng/ml)	Concentración Experimental (ng/ml)	Exactitud (%R)	Precisión (%CV)	Concentración Conocida (ng/ml)	Concentración Experimental (ng/ml)	Exactitud (%R)	Precisión (%CV)
72	73 ± 7.4246	100	9.11	71	70 ± 2.8284	98	4.41
289	293 ± 15.7921	104	4.21	286	275 ± 9.1924	96	3.33
866	830 ± 8.7210	103	0.97	857	919 ± 8.9567	107	0.97
1443	1396 ± 20.2704	94	1.35	1429	1598 ± 12.4922	112	0.78

Tabla 16: Resumen de la prueba de Reproducibilidad (Robustez) incluyendo desviación estándar

Interdía/Interanalista			
Concentración Conocida (ng/ml)	Concentración Experimental (ng/ml)	Exactitud (%R)	Precisión (%CV)
72	73 ± 3.6828	101	5.02
287	295 ± 8.7210	103	2.69
862	867 ± 8.1907	103	0.92
1436	1476 ± 16.9706	102	1.12

Tabla 17: Cálculo de Sesgo para la prueba de Reproducibilidad

Nivel	Concentración Teórica (ng/ml)	Concentración Experimental (ng/ml)	%Sesgo
1	72	74	2
3	287	295	3
4	862	867	1
5	1526	1476	3

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo

$$H_0: \mu_1 \neq \mu_2$$

$$H_A: \mu_1 = \mu_2$$

$$\alpha = 0.05$$

RESUMEN	Dia 1		Dia 2				Total
<i>Q1</i>							
Cuenta	4	4	4	4	4	4	24
Suma	394.5	434	408	374.581014	407.1914334	396.151929	2414.42438
Promedio	98.625	108.5	102	93.6452535	101.7978584	99.0379822	100.601016
Varianza	109.5625	21.6666667	72	15.5804016	53.10425897	51.8398623	63.1876781
<i>Q2</i>							
Cuenta	4	4	4	4	4	4	24
Suma	396.424041	417.497151	402.838103	404.797307	429.4389689	437.252463	2488.24803
Promedio	99.1060102	104.374288	100.709526	101.199327	107.3597422	109.313116	103.677001
Varianza	164.151729	60.1122866	79.7660463	18.9925246	17.05366531	12.996086	60.2534905
<i>Total</i>							
Cuenta	8	8	8	8	8	8	
Suma	790.924041	851.497151	810.838103	779.378322	836.6304024	833.404392	
Promedio	98.8655051	106.437144	101.354763	97.4222902	104.5788003	104.175549	
Varianza	117.372204	39.911409	65.5183981	31.1209753	38.90612533	57.9520835	

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	113.540259	1	113.540259	2.01304775	0.164551992	7.39559666
Columnas	497.218771	5	99.4437542	1.76311933	0.145407748	3.57439907
Interacción	311.450025	5	62.2900051	1.10439024	0.375185057	3.57439907
Dentro del grupo	2030.47808	36	56.4021689			
Total	2952.68714	47				

Figura 26: Análisis de varianza de la prueba interdía-interanalista. Puede observarse que no hay diferencia significativa entre los datos analizados.

3.6 Sensibilidad.

Se determinó por el LIC de la prueba de Linealidad. En la figura 27 puede observarse que no hay interferencias en el tiempo de retención ni de metformina ni de ranitidina. También se observa una forma de pico y resolución apropiada para realizar la determinación.

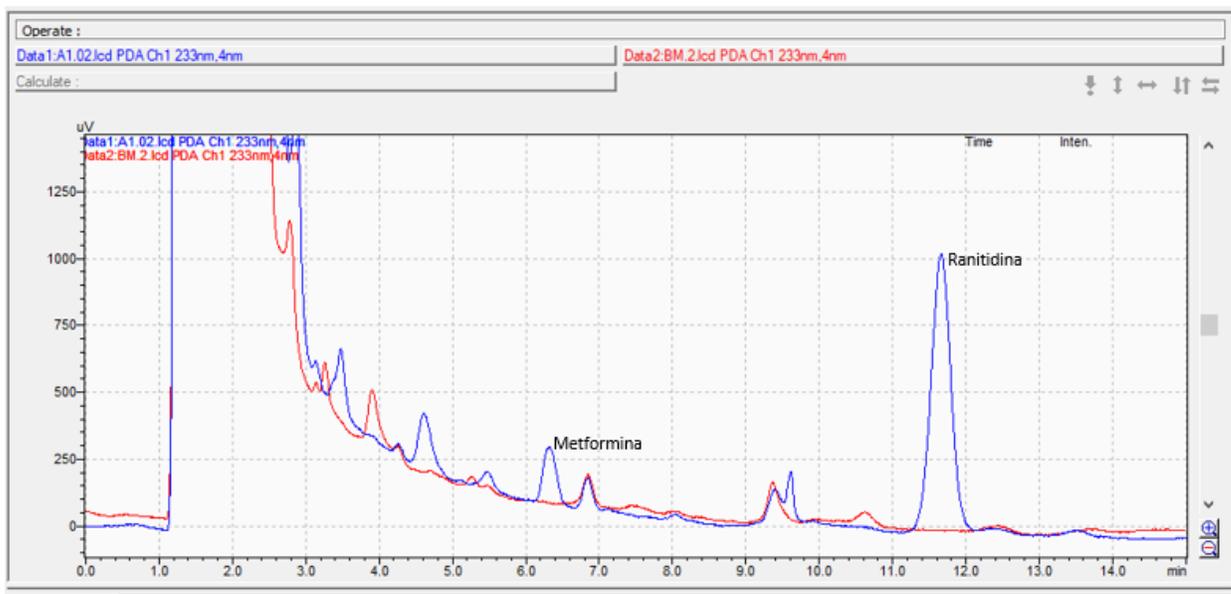


Figura 27: Cromatograma Azul: primer nivel de la curva de calibración correspondiente a 72 ng/ml de metformina. Cromatograma Rojo: BM. Puede observarse que no hay interferencia en los tiempos de retención de la metformina ni la ranitidina, además de que tanto la forma como el tamaño de los picos son adecuados.

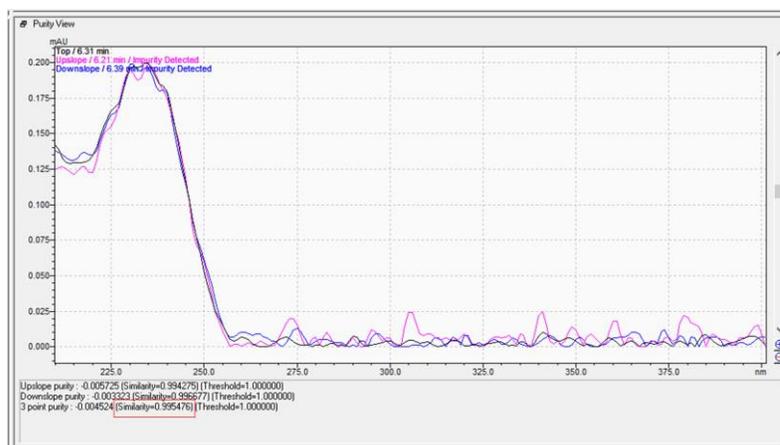


Figura 28: Imagen donde se muestra que la pureza del nivel 1 de la curva de calibración tiene una pureza del 99.54%.

En la figura 28 puede observarse que la pureza del nivel 1 de la curva de calibración es del 99.54% lo que confirma que el método desarrollado tiene la sensibilidad suficiente para la aplicación del método a un estudio de farmacocinética de metformina.

Resultados:

- La concentración calculada del primer nivel de la curva de calibración de la prueba de linealidad fue de 74 ± 3.5355 ng/ml, el %R=103% y el CV=4.98. Se cumplieron los criterios de aceptación establecidos (fig. 16).

3.7 Integridad de la Dilución.

Se preparó por quintuplicado una muestra cargada con 3226 ng/ml de metformina. Se tomaron 275 μ l de la muestra y se llevaron a 550 μ l con plasma blanco. Las muestras se sometieron al tratamiento de muestra. Cada muestra se inyectó por triplicado [17] [18] [20] [22] [37].

Resultados:

- En la tabla 18 puede verse que las muestras tuvieron un recobro que va entre el 99 y el 114% y cumplieron con los criterios de aceptación establecidos.

Tabla 18: Resultados de la prueba de Integridad de Dilución

Réplicas	Conc Teórica (ng/ml)	Conc Experimental (ng/ml)				%R	CV
		1	2	3	Promedio		
1	3226	3567	3816	ND	3692 \pm 176.07	114	5
2	3226	3503	3473	3727	3568 \pm 138.80	111	4
3	3226	3073	3716	3570	3453 \pm 337.09	107	10
4	3226	2994	3452	3594	3347 \pm 313.56	104	9
5	3226	2969	3249	3361	3193 \pm 201.91	99	6

3.8 Recobro Absoluto.

Se compararon las respuestas de la curva de calibración en plasma (tabla 5), vs la curva de calibración en solución (tabla 6).

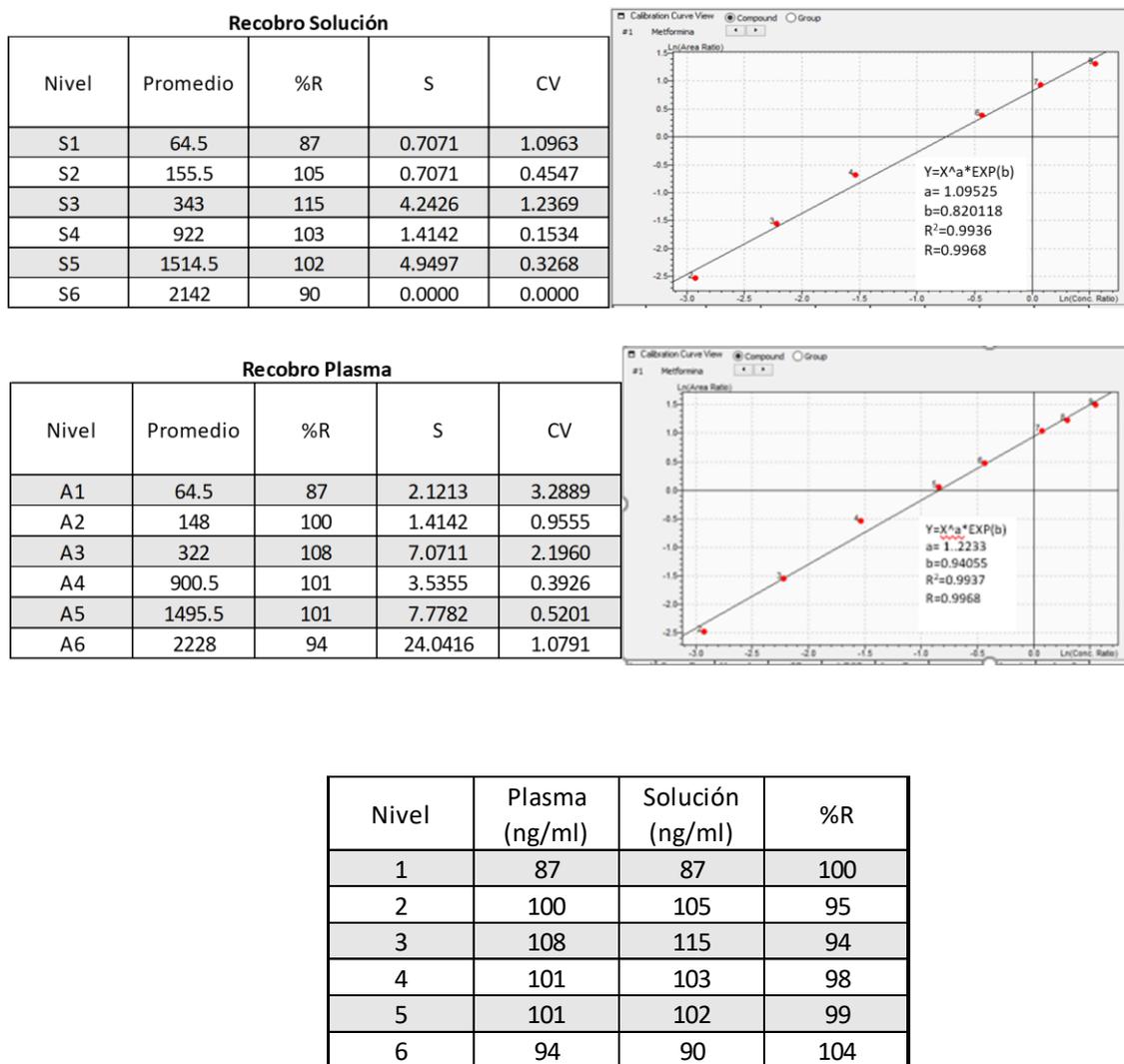


Figura 29: Comparación de la curva de calibración vs curva de calibración en plasma.

Resultados:

- En las figuras 29 y 30 puede apreciarse que el %R al comparar la curva de calibración en solución vs la curva de calibración en plasma fue del 94 al 104% cumpliendo los criterios de aceptación establecidos.

4. Discusión.

Existen varios métodos publicados para la determinación de metformina en plasma [11] [12] [13] [14] [15] Durante el desarrollo analítico de nuestro método intentamos, sin éxito, reproducir los resultados publicados por los autores de estos métodos.

Los dos métodos publicados por AbuRuz [11] [12] fueron diseñados para el monitoreo de la metformina en estado estacionario. Ambos métodos involucran la utilización de una columna C-18 para la fase estacionaria, una mezcla de buffer de fosfatos 12.5 mM/SDS 2 mM: ACN (62.5:37.5) como fase móvil y la utilización del sistema de extracción en fase sólida con empaque HLB de Waters para el tratamiento de muestra. El primer método desarrollado por este grupo de investigación [11] requiere la obtención de sangre por punción venosa con la ayuda de un sistema vacutainer con EDTA como anticoagulante, la sangre así obtenida se centrifuga para separar el plasma que se somete al proceso de extracción [11], utilizan fenformina como estándar interno, un sistema HPLC con detector ultravioleta-visible a 225 nm, y la fase móvil se ajusta a un pH de 5.3. En el segundo método [12] la muestra se obtiene con una lanceta, una gota de sangre se colecta en un papel filtro que se somete al proceso de extracción, usan salbutamol como estándar interno, un sistema HPLC con detector de arreglo de diodos a 233 nm, y la fase móvil se ajusta a un pH de 7.3. Al tratar de reproducir el análisis como se describe en ambos artículos, nos enfrentamos con que la unión de la metformina al empaque era tan fuerte que no podíamos eluirla, además de que los cartuchos se tapaban y en muchas ocasiones no era posible cargar la muestra completa. Logramos buenos resultados con los analitos en solución a pH 5.3 y también con el pH de 7.3, como el pH de 5.3 es mucho más suave con la columna, decidimos trabajar a ese pH. Analizando los pKa de los analitos, metformina 12.4 [23], fenformina 12 [23] y salbutamol 10.12 [23], podemos apreciar que tanto a pH de 5.3 como a pH de 7.3 los

tres analitos estarán completamente ionizados y, por lo tanto, la diferencia de pH no tendrá efecto en el cromatograma. Lo que puede modificar la calidad del cromatograma es la concentración del par iónico y la proporción de buffer y solvente en la fase móvil.

Probamos tres concentraciones diferentes de SDS, 0.001 mM, 0.002 mM y 0.003 mM, la forma y altura de pico fue considerablemente mejor a la concentración sugerida por AbuRuz y su grupo (0.002mM), razón por la cual elegimos esa concentración para el resto de los experimentos. Fue necesario ajustar varias veces la proporción buffer: solvente durante el desarrollo del método analítico, la que resultó mejor fue 73% buffer, 27% ACN. Intentamos trabajar con los dos estándares internos incluidos en estos artículos, pero la fenformina se retenía demasiado en la columna y el salbutamol solo produjo buenos resultados en la columna C-18. Al modificar la fase estacionaria, se perdió la forma de pico del salbutamol y nos vimos en la necesidad de probar con ranitidina como estándar interno [13]. Elegimos la ranitidina sobre otros compuestos reportados, porque, además de cumplir con las características fisicoquímicas requeridas, era fácil de conseguir y podíamos probarla rápidamente.

Es importante reconocer que la fase móvil propuesta por el grupo de investigación de AbuRuz es la utilizada en este trabajo y todos los demás artículos y tesis que revisamos, con excepción de Cheng y Chou [15] que usaron cromatografía HILIC en lugar de RPLC y por lo tanto, prescindieron del par iónico.

Dado que las condiciones de tratamiento propuestas por AbuRuz no cumplieron nuestros requerimientos, probamos las condiciones propuestas por Cheng y Chou [15] en las que la precipitación de proteínas se hacía con ACN acidulado en proporción 2:1, se centrifugaba y decantaba la porción acuosa que se lavaba con diclorometano e inyectaba al sistema cromatográfico. Este método no dio la sensibilidad que requeríamos (al menos 150 ng/ml). Para tratar de resolver este problema, evaporamos la muestra a sequedad en un baño maría a 40°C bajo corriente de aire y reconstituimos en 500 µl de fase móvil. Este método demostró ser selectivo y lineal pero no reproducible.

Decidimos intentar la extracción en fase sólida con otros empaques comercialmente disponibles (intercambio catiónico, C-18 y CN) sin éxito.

Finalmente, intentamos el método propuesto por Chhetri [14] precipitando las proteínas con HClO_4 , centrifugamos, decantamos el sobrenadante e inyectamos al cromatógrafo, obteniendo baja reproducibilidad. Incluimos entonces una modificación sugerida por Daykin [39] que consistía en neutralizar el HClO_4 con KOH. Este paso resultó crucial, ya que para obtener buena reproducibilidad requerimos que el pH de la muestra esté en un intervalo de 2-4, fuera de este intervalo, se pierde la forma de pico y la resolución, además de que se corre el riesgo de dañar la columna.

Habiendo obtenido buenos resultados en el proceso de tratamiento de muestra, buscamos optimizar el sistema cromatográfico, ya que el sistema que estábamos usando funcionaba muy bien para la solución pero no teníamos buena resolución de la metformina vs los componentes no retenidos del plasma.

Para cumplir los requerimientos del método, fue necesario cambiar varias veces de fase estacionaria, utilizando modificaciones de la tradicional C-18. Las fases estacionarias que probamos fueron: C-18 extendida, fenilo, Sb-Aq y finalmente, C-18 RP. En esta última logramos separar la metformina de los compuestos no retenidos del plasma, pero la fenformina se retenía 27 minutos en la columna, y entre los requerimientos del método, estaba incluido que la corrida cromatográfica no podía durar más de 20 minutos. Nos vimos obligados a buscar otro estándar interno. Como hemos mencionado y justificado anteriormente, decidimos intentar con ranitidina [13].

En suma, el tratamiento de precipitación de proteínas con HClO_4 , neutralización con KOH, usando ranitidina como estándar interno, una columna RP-C-18 y la fase móvil propuesta por AbuRuz ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{SDS}$: ACN) cumplieron todos los requisitos establecidos en el protocolo de validación.

En nuestro caso, encontramos varios factores críticos que es muy importante incluir en el uso rutinario del método: de las fases estacionarias probadas, solo la RP-C18 cumplió

los requerimientos incluidos en el protocolo de validación, el pH de la fase móvil no afecta la calidad del cromatograma siempre y cuando se mantenga dentro del intervalo especificado por el proveedor de la columna, deben respetarse los tiempos de reposo entre la adición de reactivos para asegurar la completa precipitación de proteínas y KClO_4 respectivamente, el pH de la muestra debe ajustarse en un intervalo de 2-4 para mantener la forma de pico y la resolución, las muestras procesadas son estables a temperatura ambiente hasta por 8 días.

A pesar de que existen varios métodos publicados para el análisis de metformina en plasma, encontramos serios problemas para reproducir los resultados reportados en dichos artículos en nuestro laboratorio. Después de leer la tesis de Barranco-Garduño [25] nos dimos cuenta de que ese grupo de investigación se enfrentó exactamente con el mismo problema. Suponemos que es por estas diferencias entre laboratorios que la normatividad nacional e internacional [16] [17] [18] [19] [20] [21] [22] exige que los métodos bioanalíticos utilizados para evaluar farmacocinética y biodisponibilidad sean validados *in situ*.

5. Conclusiones

Después de revisar y probar diferentes métodos publicados por diversos autores para la cuantificación de metformina en plasma, nuestro grupo de investigación logró desarrollar y validar un método bioanalítico para la determinación de metformina en plasma humano usando un sistema HPLC-PDA.

El método de tratamiento de muestra incluyó la precipitación de proteínas con HClO_4 , posterior neutralización con KOH y ajuste de pH de la fase acuosa decantada en un intervalo de 2-4.

La determinación cromatográfica se hizo en una columna RP-C18 de 150 mm x 4.6 mm x 5 μm , una fase móvil compuesta de KH_2PO_4 12.5 mM/SDS 0.002mM: ACN (73:27), flujo de 1.0 ml/min, temperatura de la columna: 25°C, detección con PDA a 233 nm para metformina (tiempo de retención 6 min) y 320 nm para ranitidina (tiempo de retención 12 min).

El intervalo de cuantificación fue de 71 ng/ml a 2391 ng/ml. Para asegurar que todas las muestras obtenidas del estudio pudieran interpolarse en este intervalo de cuantificación, se validó la integridad de la dilución al 50% en plasma blanco.

El porcentaje de recobro de la prueba de reproducibilidad fue del 94-112% con un coeficiente de varianza máximo del 9.11%.

El método bioanalítico desarrollado y validado para la determinación de metformina en plasma utilizando un sistema HPLC/PDA resultó apto para su utilización en estudios de farmacocinética y biodisponibilidad. El método desarrollado cumplió con la normatividad nacional e internacional vigente [18] [22] [19] [16] [17] [20] [21] además de incluir parámetros que evalúan su reproducibilidad y linealidad más allá de lo requerido por la legislación (ANOVA, %Sesgo, Análisis de Residuales) [35]G [36] [37] [38].

6. Perspectivas

Este método fue desarrollado y validado para la posterior realización de un estudio farmacocinético en voluntarios sanos, para comparar el perfil farmacocinético contra las deficiencias en la absorción y posterior eliminación del fármaco derivadas de posibles mutaciones en los transportadores.

7. Anexos

Anexo 1: Comparación de Parámetros de Validación

Parámetro	Editor	Descripción	Criterio
Linealidad	SSA	3 curvas de calibración 6 niveles cada una, BM, B0, preparado en la matriz.	Al menos el 50% de cada nivel debe cumplir $\pm 15\%$ de concentración nominal y $\pm 20\%$ para el LIC.
	FDA, NIHS,	BM, B0 y al menos 6 niveles incluyendo LIC en cada corrida, todos preparados en la matriz. La relación concentración-respuesta debe ajustarse al modelo de regresión más sencillo.	Al menos el 75% de cada nivel debe cumplir $\pm 15\%$ de concentración nominal y $\pm 20\%$ para el LIC.
	EMA	6 estándares equitativamente repartidos en escala logarítmica, BM, B0, preparados en la matriz, analizados al menos por duplicado. Mínimo 6 corridas	Al menos 75% de los estándares deben presentar un recobro $\pm 20\%$ excepto LIC y LSC recobro $\pm 25\%$ de la concentración nominal.
	DGHS	Al menos 5 concentraciones.	No especificados.
	ANVISA	3 curvas de calibración. BM, B0 6 niveles de calibración. 8 niveles si el modelo no es lineal. Si hay homocedasticidad ponderar.	Al menos 75% de los estándares R $\pm 20\%$ excepto LIC y LSC recobro $\pm 25\%$ de la concentración nominal.
	ICH	BM, B0 y al menos 6 niveles incluyendo LIC en cada corrida, todos preparados en la matriz. La relación concentración-respuesta debe ajustarse al modelo de regresión más sencillo. Mínimo 3 corridas independientes preparadas en diferentes días. Pueden o no incluirse réplicas. La curva de calibración debe prepararse a partir de diferentes soluciones stock.	Al menos el 50% de las muestras de cada nivel debe cumplir $\pm 15\%$ de concentración nominal y $\pm 20\%$ para el LIC.
	Rozet	El intervalo se define entre el LIC y el LSC. Es deseable que las concentraciones de los estándares sean equidistantes.	El modelo estadístico de la curva de calibración debe proveer los mejores resultados en el cálculo retroactivo.

Anexo 1: Comparación de Parámetros de Validación			
Parámetro	Editor	Descripción	Criterio
	Moein	Una curva de al menos 5 niveles usando o no réplicas. Si el ajuste no es lineal, puede usarse regresión cuadrática o modelos ponderados.	Al menos el 75% de cada nivel debe cumplir $\pm 15\%$ de concentración nominal y $\pm 20\%$ para el LIC.
	González	BM, B0, 6 niveles de calibración. Pueden o no incluirse réplicas, depende de la naturaleza y estabilidad del analito. Usar el modelo matemático más sencillo, puede ser ponderado, cuadrático o logarítmico. No forzar el intercepto a 0. En caso de heterocedasticidad, utilizar un modelo ponderado.	Al menos el 75% de cada nivel debe cumplir $\pm 15\%$ de concentración nominal y $\pm 20\%$ para el LIC.
	Causon	6 curvas de calibración de 6 niveles cada una. Evaluar Función de respuesta más adecuada por medio de una gráfica de residuales estudentizados. Evaluar modelo matemático y si es necesario ponderar.	De acuerdo al análisis de residuales.
Selectividad	SSA, ICH	Analizar 6 plasmas de distinta fuente, plasma lipémico, hemolizado y fármacos concomitantes.	Si hay respuesta en el TR del analito debe ser menor al 20% para el analito y del 5% para el EI.
	FDA	BM de al menos 6 fuentes de plasma diferentes.	Los BM deben estar libres de interferencias al TR del analito y el EI.
	EMA	Solo aplica para métodos de unión a ligando.	NA
	DGHS	Demostrar que no hay interferencias por compuestos endógenos, productos de degradación, tratamientos concomitantes y metabolitos del analito.	No especificado
	NIHS	BM de al menos 6 fuentes de plasma diferentes.	La señal de interferentes no mayor al 20% para el analito y del 5% para el EI.

Anexo 1: Comparación de Parámetros de Validación			
Parámetro	Editor	Descripción	Criterio
	ANVISA, Gonzalez	Evaluación de 6 matrices independientes + 1 lipémica + 1 hemolizada.	La señal de interferentes no mayor al 20% para el analito y del 5% para el EI.
	Moein	BM de 6-10 fuentes de plasma diferentes.	No especificado
	Rozet	Demostrar la ausencia de respuesta en MB. Cargar MB con los interferentes esperados (metabolitos, tratamientos concomitantes). Usar PDA para evaluar la pureza de pico. Pruebas de recobro comparando MB/MC ó MC/Solución	Mismos que en las normas que los incluyen.
	Causon	6 matrices de origen diferente, medicamentos concomitantes y sus metabolitos, sustancias adicionadas a la muestra (EDTA, Heparina, etc)	Cualquier interferencia debe tener una respuesta $\leq 20\%$ del LIC.
Precisión: RyR	SSA	Repetibilidad: El mismo día por quintuplicado LIC, MCB, MCM, MCA y MCD. Reproducibilidad: Igual que Repetibilidad en 3 corridas y 2 días	$CV \leq 15\%$ excepto LIC $CV \leq 20\%$.
	FDA	3 corridas independientes por quintuplicado: LIC, MCB, MCA y LSC	$CV \leq 15\%$ excepto LIC $CV \leq 20\%$.
	EMA	Las muestras cargadas deben congelarse antes de analizarse. 5 muestras cargadas: 1/3 LIC, LIC, MCB, MCM, LSC. 6 corridas independientes en diferentes días.	La suma del %de error relativo + %CV no debe exceder 30% (40% en LIC y LSC). Deben evaluarse muestras intradía e interdía.
	DGHS	Evaluar MCB, MCM y MCA, la MCA debe ser cercana a la Cmax.	$CV \leq 15\%$ excepto LIC $CV \leq 20\%$. Deben hacerse pruebas intradía e interdía.

Anexo 1: Comparación de Parámetros de Validación

Parámetro	Editor	Descripción	Criterio
	NIHS	Evaluar LIC, MCB, MCM, MCA. 5 réplicas en una sola corrida analítica. Al menos 3 corridas analíticas.	$CV \leq 15\%$ excepto LIC $CV \leq 20\%$.
	ANVISA	Evaluar LIC, MCB, MCM, MCA y LSC. Evaluar 5 réplicas.	$CV \leq 15\%$ excepto LIC $CV \leq 20\%$.
	ICH	Preparar LIC, 3 veces LIC, MCM y 75% del LSC a partir de soluciones stock diferentes. Evaluar 5 réplicas. Evaluar prueba interdía, y al menos 3 corridas analíticas en dos días.	$CV \leq 15\%$ excepto LIC $CV \leq 20\%$.
	Moein	Preparar a partir de 6 fuentes de plasma diferentes. Hacer 3 réplicas de LIC, MCB (3 veces el LIC), MCM, MCA (80% del LSC) y el LSC. Un día para repetibilidad, diferentes días para robustez. Las muestras control y la curva de calibración deberán prepararse de diferentes soluciones stock.	$CV \leq 15\%$ excepto LIC $CV \leq 20\%$.
	Rozet	Llevar a cabo un ANOVA para cada nivel de la curva. Cuidar el número de factores incluidos en la estimación de la varianza. (días, analistas, equipos, laboratorios, columnas, etc).	NA
	González	5 réplicas de LIC, MCA y 80% de LSC. Hacer estas pruebas intradía, interdía (al menos 3 corridas en al menos 2 días diferentes), interanalista.	$CV \leq 15\%$ excepto LIC $CV \leq 20\%$.
	Causon	LIC, MCB, MCA y LSC, 6 réplicas, 4 días. Analizar ANOVA	$CV \leq 15\%$ a todas las concentraciones
Exactitud	SSA, NIHS, ANVISA, ICH, Mahdi, González	Calcular recobro de los datos de Precisión.	$R \pm 15\%$ excepto LIC $R \pm 20\%$ de la concentración nominal.

Anexo 1: Comparación de Parámetros de Validación			
Parámetro	Editor	Descripción	Criterio
	FDA	3 corridas independientes por quintuplicado: LIC, MCB, MCA y LSC	Al menos el 75% de cada nivel debe cumplir $R_{+15\%}$ de concentración nominal y $R_{+20\%}$ para el LIC
	EMA	Calcular recobro de los datos de Precisión.	$R_{\pm 20\%}$ excepto LIC y LSC $R_{\pm 25\%}$ de la concentración nominal.
	Rozet	Calcular %sesgo además del %R.	No especificados.
	Causon	Calcular recobro de los datos de Precisión.	$R_{+15\%}$ a todas las concentraciones
Estabilidad	SSA, ICH, González	En el automuestreador, ciclos congelación/descongelación, de la muestra y soluciones, corto y largo plazo	$R_{\pm 15\%}$ de la concentración nominal.
	FDA	Cuatro muestras en el automuestreador, mesa de trabajo, muestras extraídas, congelación descongelación, solución madre y largo plazo. Tres réplicas MCB y MCA.	$CV \leq 15\%$
	EMA	Se evalúa con MCB, MCA. Debe evaluar corto plazo, temperatura de trabajo, ciclos congelación/descongelación.	$R_{\pm 20\%}$ de la concentración nominal
	DGHS	Al menos 3 Ciclos congelación/descongelación. Condiciones de trabajo, Almacenamiento, absorción del contenedor y del tapón. Estabilidad del sistema analítico intercalando muestras control durante la corrida.	No especificado
	NIHS	Ciclos congelación/descongelación, corto plazo a temperatura ambiente, refrigerados y a largo plazo, muestras preparadas y soluciones. Analizar 3 réplicas de cada nivel.	$R_{\pm 15\%}$ de la concentración nominal.

Anexo 1: Comparación de Parámetros de Validación			
Parámetro	Editor	Descripción	Criterio
	ANVISA	Estabilidad de ciclos congelación/descongelación, estabilidad de corto plazo, estabilidad de largo plazo, estabilidad de muestras procesadas. Tres muestras MCB y MCA. Estabilidad en solución.	Recobro \pm 15% de la concentración nominal.
	Moein	Evaluar la estabilidad de las soluciones, la muestra procesada, la muestra en el automuestreador, corto plazo, largo plazo y ciclos de congelación/descongelación. Evaluar a concentración alta y baja.	No especificado.
	Rozet	Mínimo MCB y MCA. 6 réplicas. Mesa de trabajo, ciclos congelación/descongelación, soluciones, muestra procesada.	2/3 de las muestras analizadas tiene R+20%.
	Causon	Corto plazo, largo plazo, incluyendo condiciones rutinarias de luz y temperatura, 3 ciclos congelación/descongelación, estabilidad en el automuestreador en dos concentraciones, estabilidad de soluciones, estabilidad de la muestra preparada. Réplicas de 6.	Variación del 10 al 20% con respecto al valor original.
Especificidad	SSA	Está incluido en Selectividad	Los BM deben estar libres de interferencias al TR del analito y el EI.
	FDA	Deben probarse moléculas relacionadas, fármacos concomitantes, metabolitos etc.	No especificado
	EMA	Evaluar tratamientos concomitantes, metabolitos o isoformas en LIC y MCA	El Recobro del analito del interés debe ser \pm 25% de la concentración nominal.
	DGHS, NIHS, ANVISA, Mahdi,	NA	NA

Anexo 1: Comparación de Parámetros de Validación			
Parámetro	Editor	Descripción	Criterio
	Rozet, Causon,		
	ICH	Probar fármacos concomitantes y sustancias relacionadas.	La señal de interferentes no mayor al 20% para el analito y del 5% para el EI.
	González	Evaluación de fármacos concomitantes, metabolitos y otros compuestos exógenos que puedan interferir.	La señal de interferentes no mayor al 20% para el analito y del 5% para el EI.
Acarreo	SSA	Solo se indica para métodos por espectrometría de masas	NA
	FDA	Debe evaluarse el efecto del acarreo en la exactitud.	El acarreo no debe exceder el 20% del LIC.
	EMA	En el caso de sistemas robóticos, hay que asegurar que no haya acarreo entre muestras	Inyectar un blanco después de una MCD para verificar acarreo
	DGHS, Rozet, Causon	NA	NA
	NIHS, ICH, Mahdi, González	Analizar un blanco después del LSC.	La respuesta del banco no debe ser mayor al 20% del LIC y 5% del EI.
	ANVISA	No menos de 3 inyecciones de una muestra blanco después de una inyección del LSC.	La respuesta del banco no debe ser mayor al 20% del LIC y 5% del EI.

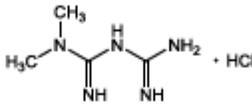
Anexo 1: Comparación de Parámetros de Validación

Parámetro	Editor	Descripción	Criterio
Integridad de la Dilución	SSA	Preparar una MCD haciendo la dilución con plasma como parte de la prueba de exactitud	Recobro $\pm 15\%$ de la concentración nominal y un $CV \leq 15\%$.
	FDA, NIHS, ICH	Muestras cargadas para diluciones planeadas, 5 réplicas por dilución.	Recobro $\pm 15\%$ de la concentración nominal.
	EMA	Hacer una dilución con plasma.	Recobro $\pm 20\%$ de la concentración nominal.
	DGHS, ANVISA, Mahdi, Causon	NA	NA
	Rozet	Utilizar una muestra cargada de concentración mayor al LSC y diluir con matriz.	Mismos criterios que para exactitud y precisión.
	González	Llevar a cabo antes del tratamiento de la muestra con la matriz libre del analito. 5 réplicas de concentración mayor al LSC diluidas apropiadamente.	Recobro $\pm 15\%$ de la concentración nominal y un $CV \leq 15\%$.
Sensibilidad	SSA, ICH, EMA, ANVISA	NA	NA
	FDA	Se establece con el LIC.	La respuesta de LIC debe ser ≥ 5 veces la del BM. $R \pm 20\%$ de 5 réplicas en 3 corridas y $CV \pm 20\%$.
	DGHS	El LIC debe determinarse a partir de las pruebas RYR.	$CV \leq 20\%$

Anexo 1: Comparación de Parámetros de Validación

Parámetro	Editor	Descripción	Criterio
	NIHS	Determinar el LIC.	La respuesta del analito del LIC > 5 veces la respuesta de un blanco. CV ≤ 20%, R ± 20%.
	Rozet	El intervalo se define entre el LIC y el LSC	Calcular %Error relativo. Debe estar dentro de los intervalos aceptables para exactitud.
	González	Determinar la señal del banco en el TR del analito.	Señal ≤ 20% de la señal de LIC.
	Causon	Determinar a partir de la pendiente de las curvas de linealidad.	No especificado
Recobro Absoluto	SSA, EMA, DGHS ICH, Moein, Rozet, FDA, NIHS, ANIVISA	NA	NA
	Causon	Recobro absoluto. MCB/Sol B, MCM/Sol M, MCA/Sol A, 6 réplicas.	R ≥ 50%

Anexo 2: Certificado de Análisis de Clorhidrato de Metformina

<h3>Certificate of Analysis</h3>	
ISO GUIDE 34 ANAB Cert# AR-1470	METFORMIN HYDROCHLORIDE CERTIFIED REFERENCE MATERIAL
ISO/IEC 17025 ANAB Cert# AT-1467	
	
CERTIFIED PURITY: 99.8% , $U_{\text{cm}} = \pm 0.1\%$ $k = 2.2$ (Mass Balance/as is basis)	
NOMINAL PACKAGE SIZE: 500 mg	
CATALOG #: PHR1084	LOT #: LRAB3694
CERTIFICATE VERSION: LRAB3694.2 ISSUE DATE: 30 June 2018 <i>Note: Certificates may be updated due to Pharmacopetal Lot changes or the availability of new data. Check our website at: www.sigma-aldrich.com for the most current version.</i>	
CRM EXPIRATION: 31 December 2021 (Proper Storage and Handling Required).	
RECEIPT DATE: _____ Note: this space is provided for convenience only and its use is not required.	
STORAGE: Store in a Refrigerator, keep away from alkali, keep container tightly closed. Attachment of a 20 mm aluminum crimp seal recommended for unused portions.	
CHEMICAL FORMULA: C ₄ H ₁₂ ClN ₅	MW: 165.6
PHYSICAL DESCRIPTION: White powder in amber vial CAS #: 1115-70-4	
HAZARDS: Read Safety Data Sheet before using. All chemical reference materials should be considered potentially hazardous and should be used only by qualified laboratory personnel.	
SIGMA-ALDRICH	
Page 1 of 8	

Anexo 3: Certificado de análisis de Clorhidrato de Ranitidina

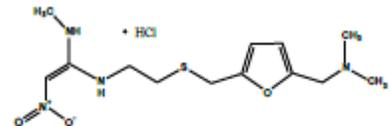
Certificate of Analysis

ISO GUIDE 34
ANAB Cert# AR-1470

ISO/IEC 17025
ANAB Cert# AT-1407

RANITIDINE HYDROCHLORIDE

CERTIFIED REFERENCE MATERIAL



CERTIFIED PURITY: 99.4%, $U_{\text{CRM}} = \pm 0.1\%$ $k = 2$
(Mass Balance) basis

NOMINAL PACKAGE SIZE: 500mg

CATALOG #: PHR1026 **LOT #: LRAB9973**

CERTIFICATE VERSION: LRAB9973.1 **ISSUE DATE: 07 August 2018**
*Note: Certificates may be updated due to Pharmacopetal Lot changes or the availability of new data.
Check our website at: www.sigma-aldrich.com for the most current version.*

CRM EXPIRATION: 31 December 2023 (Proper Storage and Handling Required).

RECEIPT DATE: _____
Note: this space is provided for convenience only and its use is not required.

STORAGE: Store at Room Temperature/Protect from Light, keep container tightly closed. Attachment of a 20 mm aluminum crimp seal recommended for unused portions.

CHEMICAL FORMULA: $C_{13}H_{22}N_4O_3 \cdot HCl$ **MW: 350.86**

PHYSICAL DESCRIPTION: White powder in amber vial **CAS #: 66357-59-3**

HAZARDS: Read Safety Data Sheet before using. All chemical reference materials should be considered potentially hazardous and should be used only by qualified laboratory personnel.

SIGMA-ALDRICH

Page 1 of 8

8. Bibliografía

- [1] R. Rojas-Martínez, A. Basto-Abreau and Y. Aguilar-Salinas, "Prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo en México," *Salud Pública de México*. 60(5):1-9, 2018
 - [2] P. Robertson, "B-Cell Deterioration during Diabetes: What's in the Gun?," *Trends in endocrinology and metabolism*. 20(8):388-393, 2009
 - [3] S. M. Setter, J. L. Iltz, J. Thams and et.al., "Metformin Hydrochloride in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus: A Clinical Review with a Focus on Dual Therapy.," *Clyncial Therapeutics*. 25(12):2991-3026, 2003
 - [4] T. Varman and G. Schulman, "Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links.," *Cell*. 148(6):852-871, 2012
 - [5] O. Velázquez, A. Lara and R. Tapia, "Metformina y Síndrome Metabólico: Manual de Uso.," *Secretaria de Salud*. 1:21-25, 2002
 - [6] A. González-Sánchez and R. Ortiz-Andrade, "¿Qué sabe usted acerca de los antidiabéticos orales (ADO's)?," *Revisa Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 43(1):79-84, 2012
 - [7] M. Foretz, B. Guigas and et.al., "Metformin: From Mechanisms of Action to Therapies.," *Cell metabolism*. 20(6):953-966, 2014
 - [8] S. Pillarseti, "Potential Drug combinations to Reduce Cardiovascular Disease Burden in Diabetes," *Cell*, 37(3):207-219, 2016
-

- [9] C. Reséndiz-Abarca, E. Flores-Alfaro and F. Suárez-Sánchez, "Altered Glycemic Control Associated with Polymorphisms in the SLC22A1 (OCT1) Gene in a Mexican Population with Type 2 Diabetes Mellitus treated with Metformin: A Cohort Study.," *The Journal of Clinical Pharmacology*. 20(8):388-393, 2019
- [10] R. Whelpton, "Quality Assurance: Internal Standards," in *Encyclopaedia of Analytical Science*, 2da ed., Estados Unidos de América, Elsevier, 2018:1-7.
- [11] S. Abu Ruz, J. Millership and j. Mc Elnay, "The development and validation of a liquid chromatography method for the simultaneous determination of metformin and glipizide, glicazide, glibenclamide or glimperide in plasma.," *Journal of Chromatography B*, 817(2): 277-286, 2004
- [12] S. AbuRuz, J. Millership and J. McElnay, "Dried blood spot liquid chromatography assay for therapeutic drug monitoring of metformin.," *Journal of Chromatography B*. 832, (2):202-207, 2006
- [13] D. Brocks, R. Gabr and R. Padwal, "Determination of metformin in human plasma and urine by High-Performance Liquid Chromatography using small sample volume and conventional octadecyl silane column.," *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 13(4):486-494, 2010
- [14] H. P. Chhetri, P. Thapa and A. Van Schepdael, "Simple HPLC-UV method for the quantification of metformin in human plasma with one step protein precipitation," *Saudi Pharmaceutical Journal*. 22,(1):483-487, 2013
- [15] C. Cheng and C. Chou, "Determination of metformin in human plasma by high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection.," *Journal of Chromatography*. 762(1):51-58, 2001

- [16] DGHS, "Guidelines for Bioavailability & Bioequivalence Studies," Central Drug Standard Control Organization, Directorate General of Health Services, Ministry of Health & Family Welfare, Gobierno de la India, Nueva Delhi, 2005.
- [17] EMA, "Guideline on bioanalytical method validation," Comunidad Europea, 2012.
- [18] FDA, "Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry.," Estados Unidos de América., 2018.
- [19] ANVISA, "Bioequivalencia y Biodisponibilidad," Brasil, 2016.
- [20] NIHS, "Japanese Guidance on Bioavailability and Bioequivalence," National Institute of Health Sciences, Japón, 2000.
- [21] SSA, "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 Tercero Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad.," México, 2013.
- [22] ICH, "Bioanalytical Method Validation ICH M 10 Guideline," The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, 2019.
- [23] "Drug Bank," 2019. [Online]. Available: <https://www.drugbank.ca/drugs>.
- [24] M. García-Álvarez-Coque, G. Ramis-Ramos and M. Ruiz-Angel, "Elsevier. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering," 2019. [Online]. Available: <https://www.elsevier.com/solutions/sciencedirect/content/reference-modules/chemical-modules>.

- [25] L. Barranco-Garduño, "Farmacocinética poblacional de metformina en mexicanos.," Escuela Superior de Medicina. Instituto Politécnico Nacional., Ciudad de México, 2009.
- [26] P. Chan , L. Shao, B. Tomlinson and et.al., "Metformin transporter pharmacogenomics: insights into drug disposition-where are we now?," *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 14(1):1-11, 2018
- [27] E. Mato, M. Guewo-Fokeng, E. Faadiel and et.al., "Genetic polymorphisms of organic cation transporters 1 (OCT1) and responses to metformin therapy in individuals with type 2 diabetes mellitus: a systematic review protocol.," *Systematic Reviews*. 1043(1): 2-10, 2018
- [28] I. Conde-Carmona, S. García-Medina, J. Jiménez-Vargas and et.al., "Pharmacokinetic Interactions Between Gemigliptin and Metformin, and Potential Differences in the Pharmacokinetic Profile of Gemigliptin Between the Mexican and Korean Populations: A Randomized, Open-label Study in Healthy Mexican Volunteers.," *Clinical Therapeutics*. 40(10):1729-1734, 2018
- [29] G. Graham, Jeroen P, M. Aurora and et.al., "Clinical Pharmacokinetics of Metformin," *Clinical Pharmacokinetics*. 508(2):81-98, 2011
- [30] I. Homsec, J. Parojcic, M. Dacevic and et.al., "Justification of metformin hydrochloride biowaiver criteria based on bioequivalence study," *Arzneimittelforschung*. 60(09):553-558, 2011
- [31] F. Duca, C. Côte , B. Rasmussen and et.al., "Metformin activates a duodenal Ampk-dependent pathway to lower hepatic glucose production in rats.," *Nature Medicine*. 21(5):506-511, 2015.

- [32] L. R. Snyder and J. W. Dolan, "Milestones in the Development of Liquid Chromatography," in *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation.*, Estados Unidos de America, Elsevier, 2013: 1-14.
- [33] J. R. Torres-Lapasió and M. C. García-Álvarez-Coque, "Liquid Chromatography. Strategies for Optimization.," in *Encyclopedia of Analytical Science*, Estados Unidos de América, Elsevier, 2019:252-261.
- [34] H. Chan and G. Carr, "Evaluation of a photodiode array detector for the verification of peak homogeneity in high-performance liquid chromatography," *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*. 8(3):271-277, 1990
- [35] E. Rozet, R. D. Martini and E. Ziemons, "Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods.," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 55(1):848-858, 2001
- [36] R. Causon, "Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion.," *Journal of Chromatography B*, 689(1):175-180, 1997
- [37] O. González, M. Blanco and G. Iriarte, "Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect.," *Journal of Chromatography A*, 1353(1):10-27, 2014
- [38] M. Moein, A. Beqqali and M. Abdel-Rehim, "Bioanalytical method development and validation: Critical concepts.," *Journal of Chromatography B*. 1043(1):3-11, 2017
- [39] C. A. Daykin, J. D. Peta, S. Foxall and et.al., "The Comparison of Plasma Deproteinization Methods for the Detection of Low-Molecular-Weight Metabolites By

- 1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.," *Analytical Biochemistry*, 304(1): 220-230, 2002.
- [40] J. Martin, D. Adana and A. Asuero, "Fitting Models to Data: Residual Analysis, a Primer.," *Uncertainty Quantification and Model Calibration.*, 1:133-137, 2017.
- [41] Secretaria de Salud, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, XI ed., vol. 1, México, 2013.
- [42] A. Sánchez-Solares, "Desarrollo, optimización y validación de un método analítico para la determinación de pioglitazona en plasma.," Departamento de Farmacología. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional., México, 2019.