Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Departamento de Sistemas Biológicos

Informe de Servicio Social

Validación de un método analítico para la cuantificación de impurezas de Metformina HCl en un sistema cromatográfico hidrofílico (HILIC).

Presenta

Suárez Miranda Kaled Abisaí

Matrícula

2213018932

Firma de los asesores



Dra. Marcela Hurtado de la Peña
No. Eco: 15677
Asesora interna



QFB. Kathia Gómez Flores
No. Cédula: 4547160
Asesora Externa

Departamento de sistemas biológicos, N-102, Bioanalítica, UAM-X

Fecha de inicio: 11/diciembre/2024 – Fecha de término: 21/junio/2025

Introducción:

La diabetes es una de las enfermedades crónicas de mayor prevalencia a nivel mundial, afectando aproximadamente al 3% de la población. México ocupa el séptimo lugar en incidencia de esta enfermedad [*Bello-Chavolla, et.al,2022*]. Para su tratamiento, uno de los fármacos más utilizados es la metformina HCl, un medicamento de uso prolongado que ayuda a controlar los niveles de glucosa en sangre. No obstante, bajo ciertas condiciones de almacenamiento, como variaciones en temperatura, exposición a la humedad o cambios en el pH, la metformina HCl puede degradarse y formar impurezas como la 1-cianoguanidina (compuesto relacionado A de metformina HCl) y la melamina [*Basto-Abreu, et.al,2023*]. Estas impurezas representan un riesgo potencial para los pacientes, especialmente debido a la necesidad de un tratamiento a largo plazo. Esto resalta la importancia de controlar estrictamente su presencia en el fármaco.

Para la detección de Metformina HCl y las impurezas mencionadas, las técnicas convencionales como la cromatografía líquida en fase reversa (RPLC, por sus siglas en inglés) presentan limitaciones en la retención de compuestos muy polares. Por ello, en este estudio se propone la validación de un método cromatográfico de interacción hidrofílica (HILIC, por sus siglas en inglés), el cual ha demostrado un mejor desempeño en la retención de compuestos polares, como es el caso de las impurezas de interés. El método HILIC presenta ventajas significativas, ya que ofrece una alta capacidad de separación de picos, selectividad y rapidez en el análisis, características que lo hacen ideal para el desarrollo de métodos analíticos eficientes.

Para el desarrollo del método se evaluó y optimizó la fase móvil descrita por Douša, M., & Jireš, J. (2020) en HILIC-MS determination of dimethylamine in the active pharmaceutical ingredients and in the dosage forms of metformin. El método optimizado se validará conforme a los lineamientos establecidos por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) y la United States Pharmacopeia (USP). Los parámetros de validación considerados para este método incluirán: linealidad del sistema, precisión del sistema, precisión intermedia, límite de cuantificación, límite de detección, especificidad y adecuabilidad del sistema, para demostrar que el método propuesto cumple con los criterios de calidad y precisión necesarios para la detección de las impurezas específicas de la metformina HCl.

Planteamiento del problema

La cromatografía líquida en fase reversa (RPLC, por sus siglas en inglés), que usualmente es la técnica de elección en la mayoría de las determinaciones farmacéuticas, presenta limitaciones importantes para compuestos con alta polaridad como es el caso de la metformina HCl y sus impurezas. En estos sistemas estas moléculas presentan una retención mínima y presentan una menor resolución en los resultados. La cromatografía de interacción hidrofílica representa la alternativa viable y con ventajas significativas ya que no sólo es aplicable para moléculas de polaridad alta, sino que utiliza fases móviles compatibles con los sistemas de fase reversa, (acetonitrilo: agua). No obstante, es necesario realizar un desarrollo cuidadoso de las condiciones cromatográficas y, al igual que en los sistemas en fase reversa, llevar a cabo la validación del método analítico. En este caso, se busca la cuantificación de impurezas específicas, como 1-cianoguanidina y melamina, las cuales pueden encontrarse en la materia prima del clorhidrato de metformina. Estas impurezas corresponden a moléculas de bajo peso molecular y alta polaridad.

Objetivo: Validar un método analítico para la identificación y cuantificación de impurezas de Clorhidrato de metformina, utilizando estándares de referencia del proveedor Sigma Aldrich y demostrar que el método es preciso, reproducible, rápido y confiable.

Objetivos específicos

- Capacitación del equipo de cromatografía Knauer.
- Evaluación de la linealidad del sistema.
- Evaluación de la precisión del sistema y precisión intermedia.
- Evaluación del límite de cuantificación y detección.
- Evaluación de los parámetros de adecuabilidad.

Antecedentes:

Para la creación o evaluación de un nuevo fármaco, el sector farmacéutico requiere emplear técnicas analíticas capaces de medir, de manera eficiente y precisa, el compuesto activo. Los ingredientes farmacéuticos activos (API, por sus siglas en inglés) son analizados mediante estos procedimientos para verificar que poseen las propiedades necesarias que aseguren su funcionalidad y efectividad. De esta manera, se garantiza que cumplan con los

estándares de calidad establecidos antes de su comercialización, contribuyendo así a la seguridad y bienestar de los pacientes.

Prevalencia y mortalidad de la diabetes

En 2021, la diabetes fue la causa directa de 1,6 millones de muertes a nivel global y el 47% de todas las muertes por diabetes se produjeron antes de los 70 años. Otras 530,000 muertes por enfermedad renal fueron causadas por la diabetes, y el 11% de las muertes cardiovasculares por hiperglucemia. En 2022, el 14% de los adultos de 18 años o más vivían con diabetes, un aumento respecto del 7% en 1990. Más de la mitad (59%) de los adultos de 30 años o más que vivían con diabetes no se medicaban [*Basto-Abreu, et.al,2023*].

De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes (FID), México ocupa el 7º lugar en el mundo en cuanto al número de personas que viven con diabetes. Adicionalmente, datos del Instituto Nacional de Salud Pública indican que la prevalencia de diabetes en México es de 18.3% (12.8 millones de adultos). Asimismo, es la segunda causa de muerte en el país, debido a que, durante las últimas tres décadas, la mortalidad atribuible a la diabetes aumentó a 77%. En 2020, durante la pandemia por COVID-19, México experimentó una de las tasas más altas de mortalidad (un aumento del 46.5% con respecto a años anteriores). Los informes del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) sugirieron que el exceso de muertes en México durante 2020 fue atribuible a causas no relacionadas con COVID-19, incluidas las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. (INEGI, Estadística de defunciones registradas, 2020)

Metformina

El clorhidrato de metformina, un derivado de la biguanida se utiliza para controlar la hiperglucemia asociada con la diabetes tipo II (diabetes mellitus no insulina-dependiente) [SALAZAR ALVAREZ, Yohana, 2011]. Este compuesto reduce la concentración de glucosa en sangre sin incrementar la secreción de insulina. Una de las impurezas potenciales presentes en el clorhidrato de metformina es la melamina, la cual está considerada por la USP como posible contaminante. Aunque no se establece un límite específico para esta sustancia, como ocurre en el caso de la cianoguanidina, su inclusión en el sistema de control de impurezas refleja la necesidad de monitorear su presencia. La exposición a altas dosis de melamina puede favorecer la formación de cálculos renales [Magdy, et.al, 2020]

Las primeras aplicaciones de cromatografía HILIC, se realizaron usando materiales para fases estacionarias de fase normal, como amino, diol y sílice. Hoy en día, la mayoría de las fases estacionarias para HILIC están hechas a base de sílice o polímeros. Estas se fabrican añadiendo grupos químicos llamados grupos funcionales a la sílice o a los polímeros. Estos grupos funcionales permiten que el agua se adhiera a la superficie de la fase estacionaria, formando una capa delgada que es clave para este tipo de cromatografía [5].

En la cromatografía HILIC, el mecanismo de retención, donde los analitos se adhieren temporalmente a la fase estacionaria, es más complejo que en la cromatografía RPLC, ya que los analitos se retienen e interactúan a través de mecanismos como la partición hidrofílica, enlaces de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo y electrostáticas [*Isabelle Kohler y C, Michel Verhoeven, 2021*]. Por ello, no siempre resulta sencillo predecir el comportamiento de los analitos durante el análisis.

La cromatografía HILIC utiliza una fase estacionaria hidrofílica y una fase móvil compuesta principalmente de un solvente orgánico, como el acetonitrilo, combinado con una pequeña cantidad de agua o solución amortiguadora. Entre sus principales ventajas se encuentra la capacidad de separar de manera eficiente compuestos polares que no se retienen bien en otros métodos. Sin embargo, presenta desafíos como una forma de picos menos predecible, tiempos más largos para reequilibrar las columnas y mecanismos de retención complejos, lo que puede dificultar su implementación en algunos casos.

La elección del solvente de inyección y su volumen es muy importante porque puede afectar la forma de los picos, la intensidad de la señal y la eficiencia general del análisis. Si el solvente no es adecuado, puede empeorar la forma de los picos y reducir la calidad de los resultados. Los mejores resultados se obtienen cuando el solvente de inyección contiene puro acetonitrilo o acetonitrilo con hasta un 10% de agua. Si el solvente contiene más agua, los picos se deforman, especialmente para los compuestos que eluyen al inicio del gradiente (donde hay más acetonitrilo, alrededor del 95%) [*Isabelle Kohler y C, Michel Verhoeven, 2021*]. El solvente de inyección debe elegirse cuidadosamente para minimizar las diferencias con la fase móvil y adaptarse a las propiedades de los analitos. Esto es especialmente complicado para compuestos polares que requieren un balance entre solubilidad y forma de los picos [*Buszewski, B. y Noga, S. (2011)*.].

La composición de la fase móvil afecta la separación en cromatografía HILIC. El solvente orgánico más común es el acetonitrilo, porque es miscible con agua y polar, pero no forma

enlaces de hidrógeno fuertes y facilita la formación de una capa de agua en la fase estacionaria, clave para las interacciones con los analitos. En HILIC, más porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil aumenta la retención de los analitos, lo opuesto a lo que ocurre en fase reversa. El contenido de agua generalmente varía entre 3% y 40%, utilizando como mínimo 2% de agua (necesario para formar la capa de agua en la fase estacionaria).

Las sales más comunes son formiato de amonio (AF) y acetato de amonio (AmAc). Las sales afectan la retención influyendo en el grosor y la hidrofobicidad de la capa de agua, aumentando la concentración de sales se puede reducir la retención de aniones en columnas con cargas positivas y aumentar la retención de aniones en columnas con cargas negativas al reducir las repulsiones electrostáticas. La concentración de sales suele variar entre 0 y 50 mM. Usar demasiada sal puede causar precipitación en solventes con poca agua, lo que afecta la reproducibilidad de los tiempos de retención. El pH de la fase móvil y el pKa de los analitos son clave. Al añadir un solvente orgánico, el pH de la mezcla puede cambiar la forma química de los analitos y la vida útil de la columna, lo que dificultara la separación y la reproducibilidad del método [*Buszewski, B. y Noga, S. (2011).*].

Para controlar las interacciones electrostáticas entre los analitos cargados y la fase estacionaria, se añaden sales a la fase móvil, como el formiato de amonio, que se disuelve bien en fases móviles con alto contenido de disolvente orgánico. Sin embargo, una concentración demasiado alta de sal puede generar salinización y afectar la interacción con la fase estacionaria, lo que comprometería la reproducibilidad y la forma del pico. En el caso de una fase móvil compuesta por 95% de acetonitrilo, la concentración de sal no debe exceder los 15 mM, debido a su limitada solubilidad. Además, la sal debe disolverse en agua antes de añadir el disolvente orgánico.

En cuanto al pH, es importante seleccionar uno que favorezca la forma más cargada del analito, ya que esta forma es más hidrófila y evita que el analito se quede retenido en la columna. En separaciones HILIC se realizan con fases móviles en un rango de pH de 3 a 8, y el ácido fórmico es comúnmente utilizado por compatibilidad.

La validación de un procedimiento analítico es el proceso mediante el cual se verifica que un método de análisis sea confiable, preciso y adecuado para el propósito previsto. Para ello, se evalúan distintas características de desempeño del método, se establecen con claridad los procedimientos para la obtención de resultados y estos se comparan con criterios previamente definidos. Este proceso es fundamental para asegurar la calidad, exactitud y reproducibilidad de los análisis realizados en los laboratorios. [FEUM, 13.0 México; 2022].

Materiales y métodos:

Equipo

El análisis se realizó utilizando un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de la marca Knauer, utilizando el software Clarity Chrom para la adquisición y análisis de los datos cromatográficos. Este sistema fue equipado con un Detector de Fotodiodos (PDA) a 230 nm para la detección de metformina HCl y 210 nm para impurezas y un automuestreador que incluye el equipo.

Reactivos y muestras de referencia

Agua grado HPLC suministrada se obtiene de un equipo Simplicity Waters, Acetonitrilo grado HPLC, Cianoguanidina grado Estándar, Metformina HCl grado Estándar y Melamina grado Estándar suministrado por Sigma Aldrich ®. Acido fórmico y Ácido Clorhídrico grado Reactivo suministrado por Reactivos Química Meyer ®. Hidroxido de amonio grado Reactivo suministrado por J.T.Baker ®. Hidroxido de sodio grado Reactivo suministrado por High Purity Reactivos Analíticos.

Condiciones cromatográficas

El análisis cromatográfico se con una columna Poroshell 120 HILIC-Z (4.6 x 150 mm, 4 µm; Agilent Technologies®). Se empleó una elución isocrática con una fase móvil de formiato de amonio 4 mM (pH 3.6) y acetonitrilo en una proporción 10:90 (v/v). Las condiciones operacionales fueron: flujo de 1.0 mL/min, temperatura ambiente y un volumen de inyección de 50 µL.

Tabla 2. Condiciones cromatográficas

Tipo	HILIC
Longitud de onda	210 nm (impurezas) y 230 nm (Clorhidrato de Metformina)
Columna	Agilent Poroshell 120 HILIC-Z (zwitteriónica) 4 micras, 4.6 x 150 mm
Fase móvil	Acetonitrilo: solución amortiguadora 4mM pH 3.6 (90:10)
Velocidad de flujo	1.0 mL/min
Volumen de inyección	50 µL
Temperatura de la columna	Temperatura ambiente: 25°C
Temperatura automuestreador	Temperatura ambiente: 25°C

Fase hidrofílica

Preparación de soluciones

Preparación de ácido fórmico 1 M: Transferir a un matraz de 50 mL, 2.1 mL de Acido fórmico con una pureza del 88.0%, y llevar a volumen con agua grado HPLC.

Preparación de hidróxido de amonio 1 M: Transferir a un matraz de 50 mL, 6.7 mL de hidróxido de amonio con una pureza del 28.80% y llevar a volumen con agua grado HPLC.

Preparación de ácido fórmico 0.4 M: Transferir en un matraz de 100 mL 40 mL de ácido fórmico 1 M y llevar a volumen con agua grado HPLC, para obtener una concentración de 0.4 M

Preparación de hidróxido de amonio 0.4 M: Transferir en un matraz de 100 mL 40 mL de hidróxido de amonio 1 M y llevar a volumen con agua grado HPLC, para obtener una concentración de 0.*4 M*

Preparación de formiato de amonio 0.04 M: Transferir 10.0 mL de ácido fórmico 0.4 M y 10.0 mL de hidróxido de amonio 0.4 M a un matraz volumétrico de 100.0 mL y llevar a volumen de agua grado HPLC, para obtener una concentración de 0.04 M

Preparación de ácido fórmico 0.056 M: Transferir en un matraz de 100 mL 5.6 mL de ácido fórmico 1 M y llevar a volumen con agua grado HPLC, para obtener una concentración de 0.056 M

Preparación de la solución amortiguadora 4 mM pH 3.6: Transferir 10 mL de formiato de amonio 0.04 M y 10 mL de ácido fórmico 0.056 M a un vaso de precipitado de 200 mL, adicionar 75 mL de agua grado HPLC y medir el pH. Ajustar el pH a 3.6 ± 0.5 con ácido fórmico o hidróxido de amonio diluido, de ser necesario. Transferir la solución amortiguadora ajustada a un matraz volumétrico de 100.0 mL y llevar a volumen de agua grado HPLC, para obtener una concentración de 4 mM.

Preparación de la fase móvil: Transferir a un matraz Erlenmeyer de 500 mL 360 mL de acetonitrilo y 40 mL de la solución amortiguadora 4mM a un pH de 3.6, agitar con ayuda de una barra magnética por 2 minutos, filtrar a vació a través de una membrana de NYLON de 0.45 micras, transferir a un reservorio de fase móvil y sonicar durante 10 minutos.

Preparación de soluciones estandar

Preparación de la solución estándar stock de Cianoguanidina: Pesar aproximadamente 20.0 mg de cianoguanidina, transferir a un matraz volumétrico de 50.0 mL, disolver con 30 mL de agua grado HPLC sonicando por 10 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con agua grado HPLC. Concentración de la solución estándar stock de Cianoguanidina = 0.4 mg/mL

Preparación de la solución estándar stock de Melamina: Pesar aproximadamente 20.0 mg de Melamina, transferir a un matraz volumétrico de 10.0 mL, disolver con 5 mL de agua grado HPLC sonicando por 10 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con agua grado HPLC. Concentración de la solución estándar stock de Melamina = 2.0 mg/mL.

Preparación de la solución estándar stock de Metformina HCl: Pesar aproximadamente 20.0 mg de estándar de referencia de Metformina HCl Sigma-Aldrich, transferir a un matraz volumétrico de 10.0 mL, disolver con 5 mL de agua grado HPLC sonicando por 10 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con agua grado HPLC. Concentración de la solución estándar stock Metformina HCl = 2.0 mg/mL.

Validación del método analítico

Linealidad del sistema.

La linealidad del sistema se determinó en un rango de concentración de 0.012 – 0.022 µg/mL para cianoguanidina y 0.020 – 0.120 µg/mL para melamina y metformina HCl, preparando cada curva por triplicado.

Preparación de la solución de 0.4 µg/mL de Cianoguanidina: Transferir 0.5 mL de la solución estándar stock de Cianoguanidina a un matraz volumétrico de 50.0 mL y llevar a volumen con agua grado HPLC. Transferir 1.0 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen con agua grado HPLC. Concentración de la solución stock de Cianoguanidina = 0.4 µg/mL.

Preparación de la solución de 2.0 µg/mL de Melamina y Metformina HCl: 0.5 mL de la solución estándar stock de Melamina y 0.5 mL solución estándar stock de Metformina HCl a un matraz volumétrico de 50.0 mL y llevar a volumen con agua grado HPLC. Transferir 1.0 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen con agua grado HPLC. Concentración de la solución stock de Melamina = 2.0 µg/mL y metformina HCl = 2.0 µg/mL.

Preparación de la solución de 4.0 µg/mL de Melamina y Metformina HCl: 1.0 mg/mL de la solución estándar stock de Melamina y 1.0 mL solución estándar stock de Metformina HCl a un matraz volumétrico de 50.0 mL y llevar a volumen con agua grado HPLC. Transferir 1.0 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen con agua grado HPLC. Concentración de la solución stock de Melamina = 4.0 µg/mL y metformina HCl = 4.0 µg/mL.

Preparación de la linealidad del sistema de Metformina HCl e impurezas Cianoguanidina y Melamina: Transferir las alícuotas indicadas en la tabla 1 de la solución de impurezas y metformina HCl a un matraz volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen con Acetonitrilo. Pasar una porción de cada solución a través de un filtro de jeringa de NYLON de 0.45 micras, descartando los 5 primeros mL y transferir a un vial. Repetir por triplicado.

Tabla 1. Linealidad del sistema

Alícuota de Agua grado HPLC (mL)	Alícuota de solución de cianoguanidina 0.4 µg/mL (mL)	Alícuota de solución de melamina y metformina HCl 2.0 µg/mL (mL)	Concentración		
			Cianoguanidina (µg/mL)	Melamina (µg/mL)	Metformina HCl (µg/mL)
0.60	0.30	0.1	0.012	0.02	0.02
0.45	0.35	0.2	0.014	0.04	0.04
0.30	0.40	0.3	0.016	0.06	0.06

Tabla 1. Linealidad del sistema					
Alícuota de Agua grado HPLC (mL)	Alícuota de solución de cianoguanidina 0.4 µg/mL (mL)	Alícuota de solución de melamina y metformina HCl 2.0 µg/mL (mL)	Concentración		
			Cianoguanidina (µg/mL)	Melamina (µg/mL)	Metformina HCl (µg/mL)
0.05	0.45	0.4	0.018	0.08	0.08
0.00	0.50	0.5	0.020	0.10	0.10
0.15	0.55	0.3*	0.022	0.12	0.12

* Utilizar la solución de 4.0 µg/mL de Melamina y Metformina HCl

Criterio de aceptación

El coeficiente de determinación debe ser mayor o igual a 0.98 y el intervalo de confianza de la pendiente no debe incluir el cero.

Precisión del sistema

Preparación de la solución de 0.4 µg/mL de Cianoguanidina: Transferir 0.5 mL de la solución estándar stock de Cianoguanidina a un matraz volumétrico de 50.0 mL y llevar a volumen con agua grado HPLC. Transferir 1.0 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen con agua grado HPLC. Concentración de la solución stock de Cianoguanidina = 0.4 µg/mL.

Preparación de la solución de 2.0 µg/mL de Melamina y Metformina HCl: 0.5 mL de la solución estándar stock de Melamina y 0.5 mL solución estándar stock de Metformina HCl a un matraz volumétrico de 50.0 mL y llevar a volumen con agua grado HPLC. Transferir 1.0 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen con agua grado HPLC. Concentración de la solución stock de Melamina = 2.0 µg/mL y metformina HCl = 2.0 µg/mL.

Preparación de la precisión del sistema de Metformina HCl e impurezas Cianoguanidina y Melamina: Transferir una alícuota de 0.5 mL de la solución de 0.4 µg/mL de Cianoguanidina y una alícuota de 0.5 mL de la solución de 2.0 µg/mL de Melamina y metformina HCl a un matraz volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen con Acetonitrilo. Pasar una porción de cada solución a través de un filtro de jeringa de NYLON de 0.45 micras, descartando los 5

primeros mL y transferir a un vial. Concentración de Cianoguanidina = 0.020 µg/mL. de Melamina = 0.10 µg/mL y metformina HCl = 0.10 µg/mL. Repetir por sextuplicado.

Criterio de aceptación

El coeficiente de variación del área de los picos de interés no debe ser mayor del 5.0%

Límite de detección (LOD) y Límite de cuantificación (LOQ)

Para determinar el límite de cuantificación (LOQ) y el límite de detección (LOD), se empleó el enfoque basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente.

$$LD = \frac{3.3 * Sbo}{b1} \; LQ = \frac{10 * Sbo}{b1}$$

Criterio de aceptación

Para los ensayos de purezas, el límite de cuantificación del método analítico debe ser igual o inferior al umbral de reporte

Precisión Intermedia

La precisión intermedia del método se evaluó mediante la preparación y análisis de soluciones estándares con dos diferentes analistas dentro del mismo laboratorio en dos días diferentes. Se prepararon soluciones de Metformina HCl a una concentración de 100 µg/mL, a las cuales se añadieron estándares comerciales de cianoguanidina (a una concentración final de 0.02 µg/mL) y melamina (a una concentración final de 1.0 µg/mL). La solución estándar de trabajo se preparó como el estándar para evaluar la precisión del sistema. Estas soluciones fueron analizadas en el sistema de HPLC en días diferentes, manteniendo constantes todas las condiciones cromatográficas previamente establecidas. Los resultados obtenidos se compararon para evaluar la consistencia y reproducibilidad del método bajo condiciones de uso rutinario.

Preparación de la solución stock de Metformina HCl materia prima: Pesar aproximadamente 50.0 mg de Metformina HCl materia prima, transferir a un matraz volumétrico de 25.0 mL, disolver con 15 mL de agua grado HPLC sonicando por 10 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con agua grado HPLC. Concentración de la solución estándar stock Metformina HCl = 2.0 mg/mL.

Preparación de la solución de 0.8 µg/mL de Cianoguanidina y 4.0 µg/mL de Melamina: Transferir 0.5 mL de la solución estándar stock de Cianoguanidina y 0.5 mL de la solución

estándar stock de Melamina a un matraz volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen con agua grado HPLC. Transferir 1.0 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen con agua grado HPLC. Concentración de Cianoguanidina = 0.8 µg/mL y concentración de Melamina = 4.0 mg/mL

Preparación de la solución de 0.02 µg/mL de Cianoguanidina, 0.10 µg/mL de Melamina y 0.10 mg/mL Metformina HCl: Transferir 0.25 mL de la solución de 0.8 µg/mL de Cianoguanidina y 4.0 µg/mL de Melamina, 0.5 mL de la solución stock de Metformina HCl materia prima y 0.25 mL de agua grado HPLC a un matraz volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen con acetonitrilo grado HPLC. Pasar una porción de cada solución a través de un filtro de jeringa de NYLON de 0.45 micras, descartando los 5 primeros mL y transferir a un vial. Concentración de Cianoguanidina = 0.020 µg/mL. de Melamina = 0.10 µg/mL y metformina HCl = 0.10 mg/mL. Repetir por triplicado.

Criterio de aceptación

El coeficiente de variación del porciento de recobro de la impureza (cianoguanidina y melamina) no debe ser mayor del 5.0%

Especificidad del método:

El ensayo de especificidad se diseñó para demostrar la capacidad del método para cuantificar selectivamente las impurezas de interés en presencia de componentes potencialmente interferentes. Se verificó que el método es capaz de discriminar inequívocamente entre las impurezas (cianoguanidina y melamina), el Ingrediente Farmacéutico Activo (API) y los productos de degradación generados bajo condiciones de estrés. La adecuada resolución cromatográfica entre todos los picos confirma que el método es selectivo y garantiza que la cuantificación de las impurezas no se ve afectada por otros componentes en la matriz de la muestra

Se llevaron a cabo inyecciones del diluyente, estándar de Metformina HCl, estándar de 1-cianoguanidina y estándar de melamina, tanto de manera independiente como en combinación. Además, se inyectaron las muestras obtenidas tras las degradaciones del estándar por hidrólisis ácida, hidrólisis básica y la degradación oxidativa.

Preparación de la solución estándar de Diluyente (90 ACN:10 H_2O): Transferir 1.0 mL de agua grado HPLC a un matraz volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen con Acetonitrilo.

Pasar una porción de la solución a través de un filtro de jeringa de NYLON de 0.45 micras, descartando los 5 primeros mL y transferir a un vial.

Preparación de la solución estándar de Metformina HCl: Pesar aproximadamente 20.0 mg de metformina HCl, transferir a un matraz volumétrico de 10.0 mL, disolver con 5 mL de agua grado HPLC sonicando por 10 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con agua grado HPLC. Transferir 0.5 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 50.0 mL y llevar a volumen con agua grado HPLC. Transferir 1.0 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen con agua grado HPLC. Transferir una alícuota de 0.5 mL de esta solución y 0.5 mL a un matraz volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen con Acetonitrilo. Pasar una porción de la solución a través de un filtro de jeringa de NYLON de 0.45 micras, descartando los 5 primeros mL y transferir a un vial. Concentración de Metformina HCl= 0.1 µg/mL.

Preparación de la solución estándar de Cianoguanidina: Pesar aproximadamente 20.0 mg de cianoguanidina, transferir a un matraz volumétrico de 50.0 mL, disolver con 30 mL de agua grado HPLC sonicando por 10 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con agua grado HPLC. Transferir 0.5 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 50.0 mL y llevar a volumen con agua grado HPLC. Transferir 1.0 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen con agua grado HPLC. Transferir una alícuota de 0.5 mL de esta solución y 0.5 mL a un matraz volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen con Acetonitrilo. Pasar una porción de la solución a través de un filtro de jeringa de NYLON de 0.45 micras, descartando los 5 primeros mL y transferir a un vial. Concentración de Cianoguanidina = 0.020 µg/mL.

Preparación de la solución estándar de Melamina: Pesar aproximadamente 20.0 mg de melamina, transferir a un matraz volumétrico de 10.0 mL, disolver con 5 mL de agua grado HPLC sonicando por 10 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con agua grado HPLC. Transferir 0.5 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 50.0 mL y llevar a volumen con agua grado HPLC. Transferir 1.0 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen con agua grado HPLC. Transferir una alícuota de 0.5 mL de esta solución y 0.5 mL a un matraz volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen con Acetonitrilo. Pasar una porción de la solución a través de un filtro de jeringa de NYLON de 0.45 micras, descartando los 5 primeros mL y transferir a un vial. Concentración de Melamina = 0.10 µg/mL.

Preparación de la solución de la muestra control de Metformina HCl: Pesar aproximadamente 20.0 mg de metformina HCl, transferir a un matraz volumétrico de 10.0 mL, disolver con 5 mL de agua grado HPLC sonicando por 10 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con agua grado HPLC. Transferir 0.5 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 10.0 mL y 0.5 mL de agua grado HPLC y llevar a volumen con Acetonitrilo. Pasar una porción de la solución a través de un filtro de jeringa de NYLON de 0.45 micras, descartando los 5 primeros mL y transferir a un vial. Concentración de la muestra control metformina HCl = 100.0 µg/mL.

Estudio de degradación inducida por ácido

Preparación de la hidrólisis ácida. Transferir 5.0 mL de una solución de metformina HCl 50 mg/mL a un matraz bola de 50 mL, adicionar 1.0 mL de ácido clorhídrico 1 N y calentar a 80°C ± 5°C durante 120 minutos con agitación magnética. Dejar enfriar a temperatura ambiente, transferir el contenido a un vaso de precipitados de 25 mL y realizar 3 enjuagues del matraz bola con 4 mL de agua grado HPLC. Neutralizar utilizando un medidor de pH con hidróxido de sodio 1.0 N, transferir el contenido a un matraz volumétrico de 25.0 mL y realizar 3 enjuagues del matraz bola con 3 mL de agua grado HPLC, llevar a volumen con agua grado HPLC.

Transferir una alícuota de 1.0 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen con agua grado HPLC. Transferir una alícuota de 1.0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen con acetonitrilo. Pasar una porción de la solución a través de un filtro de jeringa NYLON de 0.45 micras, descartando los 5 primeros mL y transferir a un vial. Concentración de Metformina HCl < 0.10 mg/mL.

Estudio de degradación inducida por base

Preparación de la hidrólisis básica. Transferir 5.0 mL de una solución de metformina HCl 50 mg/mL a un matraz bola de 50 mL, adicionar 1.0 mL de hidróxido de sodio 1 N y calentar a 40°C ± 5°C durante 30 minutos con agitación magnética. Dejar enfriar a temperatura ambiente, transferir el contenido a un vaso de precipitados de 25 mL y realizar 3 enjuagues del matraz bola con 4 mL de agua grado HPLC. Neutralizar utilizando un medidor de pH con ácido clorhídrico 1.0 N, transferir el contenido a un matraz volumétrico de 25.0 mL llevar y realizar 3 enjuagues del matraz bola con 3 mL de agua grado HPLC, llevar a volumen con agua grado HPLC.

Transferir una alícuota de 1.0 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen grado HPLC con agua. Transferir una alícuota de 1.0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen con acetonitrilo. Pasar una porción de la solución a través de un filtro de jeringa NYLON de 0.45 micras, descartando los 5 primeros mL y transferir a un vial. Concentración de Metformina HCl < 0.10 mg/mL.

Estudio de degradación inducida por peróxido de hidrógeno

Preparación de degradación con peróxido de hidrógeno. Transferir 5.0 mL de una solución de metformina HCl 50 mg/mL a un matraz bola de 50 mL, adicionar 1.0 mL de peróxido de hidrógeno 3% y calentar a 80°C ± 5°C durante 60 minutos con agitación magnética. Dejar enfriar a temperatura ambiente, transferir el contenido a un matraz volumétrico de 25.0 mL y realizar 3 enjuagues del matraz bola con 3 mL de agua grado HPLC, llevar a volumen con agua grado HPLC.

Transferir una alícuota de 1.0 mL de la solución anterior a un matraz volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen grado HPLC con agua. Transferir una alícuota de 1.0 mL de esta solución a un matraz volumétrico de 10.0 mL y llevar a volumen con acetonitrilo. Pasar una porción de la solución a través de un filtro de jeringa NYLON de 0.45 micras, descartando los 5 primeros mL y transferir a un vial. Concentración de Metformina HCl < 0.10 mg/mL.

Criterio de aceptación

Deberán presentarse cromatogramas representativos para demostrar el grado de selectividad y los picos deberán identificarse adecuadamente.

Adecuabilidad del Sistema

La adecuabilidad del sistema se verificó mediante la inyección por sextuplicado de una preparación estándar preparada como en la precisión del sistema, de acuerdo con las pautas establecidas en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) para el desempeño de los sistemas cromatográficos.

Criterio de aceptación

Se evaluaron los siguientes parámetros en los cromatogramas resultantes: el tiempo de retención, la resolución entre picos, el factor de cóleo y la eficiencia de los platos teóricos.

Resultados y discusión

Linealidad

Se realizó un estudio de linealidad en un rango de concentración de 0.012 – 0.022 µg/mL para cianoguanidina y 0.020 – 0.120 µg/mL para melamina y metformina HCl, preparando cada curva por triplicado. Donde se obtuvo una relación lineal entre el área bajo el pico y la concentración propuesta. A partir de estos resultados, se obtuvieron las ecuaciones de regresión lineal, cuya validación se realizó a través de los coeficientes de correlación. Los parámetros analíticos correspondientes se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Datos analíticos de Cianoguanidina, Melamina y Metformina HCl

Parámetros	Cianoguanidina	Melamina	Metformina HCl
Rango de linealidad (µg/mL)	0.012-0.022	0.020-0.120	0.020-0.120
Ecuación de regresión	y = 7950.3x - 81.622	y = 8581.9x - 30.81	y = 2630.2x - 5.0858
Coeficiente de correlación (r)	0.9996	0.9993	0.9994

Precisión del sistema

Este estudio se realizó mediante 6 inyecciones de la concentración al 100 % a analizar cianoguanidina 0.0199 µg/mL, melamina 0.099 µg/mL, metformina HCl0 0.1 µg/mL, con esto la precisión del sistema se obtuvieron coeficientes de variación (≤ 1.5%) por lo que este procedimiento es cumple para su replicación. Los valores obtenidos durante la validación para la precisión se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados de la precisión del sistema

Inyeccion	Área bajo la curva		
	Cianoguanidina	Melamina	Metformina HCl
1	75.926	776.477	244.596
2	75.384	778.838	249.960
3	76.123	769.526	251.565
4	75.560	791.481	247.744
5	75.160	783.159	247.200
6	75.905	766.293	250.386
Promedio	75.676	777.629	248.575
DS	0.369	9.159	2.552
CV	0.488	1.178	1.027

Precisión Intermedia

Se evaluó la precisión intermedia del método analítico para la cuantificación de cianoguanidina y melamina, mediante un estudio ejecutado por dos analistas en dos días diferentes. El coeficiente de variación (%CV) obtenido cumplió con el criterio de aceptación establecido (≤5%) lo que demuestra que el método es preciso y reproducible. Adicionalmente, los porcentajes de recuperación confirmaron la exactitud de los resultados. La concentración de impurezas en la muestra se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Concentración de impurezas en la muestra de precisión intermedia

	Cianoguanidina (µg/mL)		Melamina (µg/mL)	
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
Día 1	0.0200	0.0200	0.0990	0.1030
	0.0200	0.0200	0.1010	0.1030
	0.0200	0.0200	0.1010	0.1030
Día 2	0.0200	0.0190	0.1000	0.0990
	0.0200	0.0190	0.1010	0.1010
	0.0200	0.0190	0.1010	0.1010
Promedio	0.0200	0.0200	0.101	0.1020
DS	0.0000	0.0010	0.001	0.002
CV	0.0000	2.8090	0.832	1.606
Promedio	0.0200		0.1010	
% Recobro	100%		101%	
DS	0.0000		0.0010	
CV	2.3		1.4	

Límite de detección (LD) y Limite de cuantificación (LQ)

El límite de detección para cianoguanidina, melamina y metformina HCl fue de 0.0003 µg/mL, 0.0031 µg/mL,0.0039 µg/mL y el límite de cuantificación fue de 0.001 µg/mL, 0.0095 µg/mL, 0.0117 µg/mL, respectivamente Tabla 6. Los resultados anteriores de la regresión lineal indican que el método fue lineal en el rango de concentración estudiado y puede utilizarse para la detección y cuantificación de cianoguanidina, melamina y metformina HCl en un amplio rango de concentración.

Tabla 6. Límite de cuantificación y detección			
Parámetros	Cianoguanidina	Melamina	Metformina HCl
LOD (µg/mL)	0.0010	0.0095	0.0117
LED (µg/mL)	0.0003	0.0031	0.0039

Especificidad

Se verificó la especificidad mediante la preparación de soluciones estándares de Cianoguanidina, Melamina y Metformina HCl Figura 1, donde se observan picos cromatográficos bien definidos, con un tiempo de retención de 2.733 para cianoguanidina, melamina 4.750 y metformina HCl 9.55, con la ausencia de interferencias.

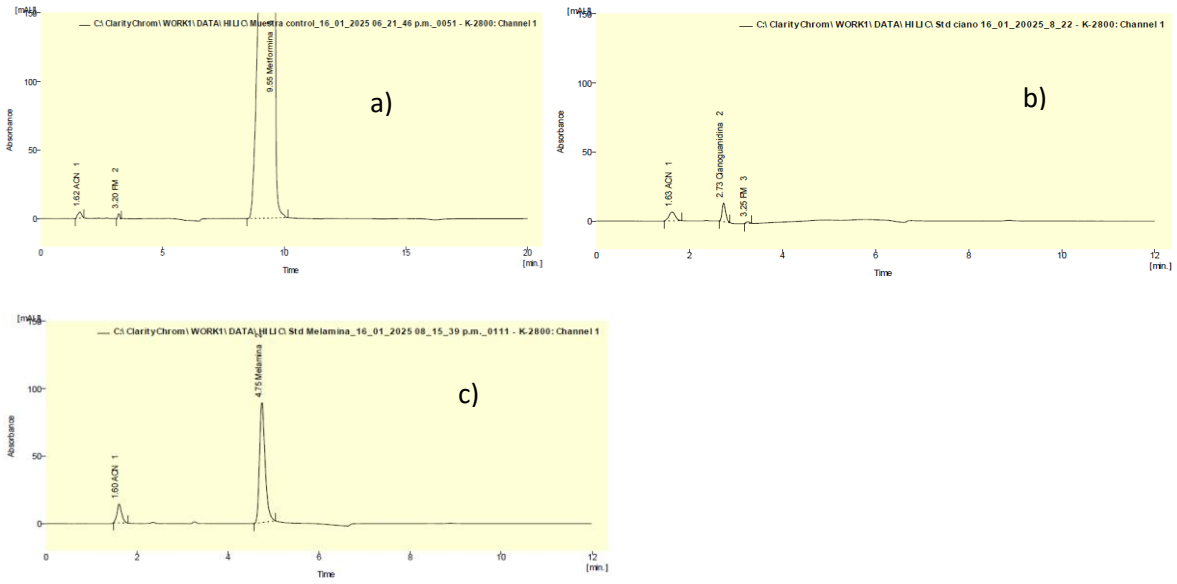


Figura 1. Cromatogramas de las soluciones estándares: a) Muestra control de Metformina HCl (TR: 9.55), b) Cianoguanidina (TR: 2.733), c) Melamina (TR: 4.750).

La selectividad del método fue confirmada bajo condiciones de degradación forzada (estrés oxidativo, ácido y básico). El análisis de los cromatogramas (Figura 2) confirmó la especificidad del método, ya que los picos de los productos de degradación (con TRR de 0.8, 0.9 y 1.8 en degradación ácida; 0.9 y 1.9 en básica; y 1.4 en oxidativa) no interfirieron con el pico de la metformina HCl. Esto demuestra la capacidad del método para cuantificar el analito principal de forma inequívoca en presencia de sus productos de degradación.

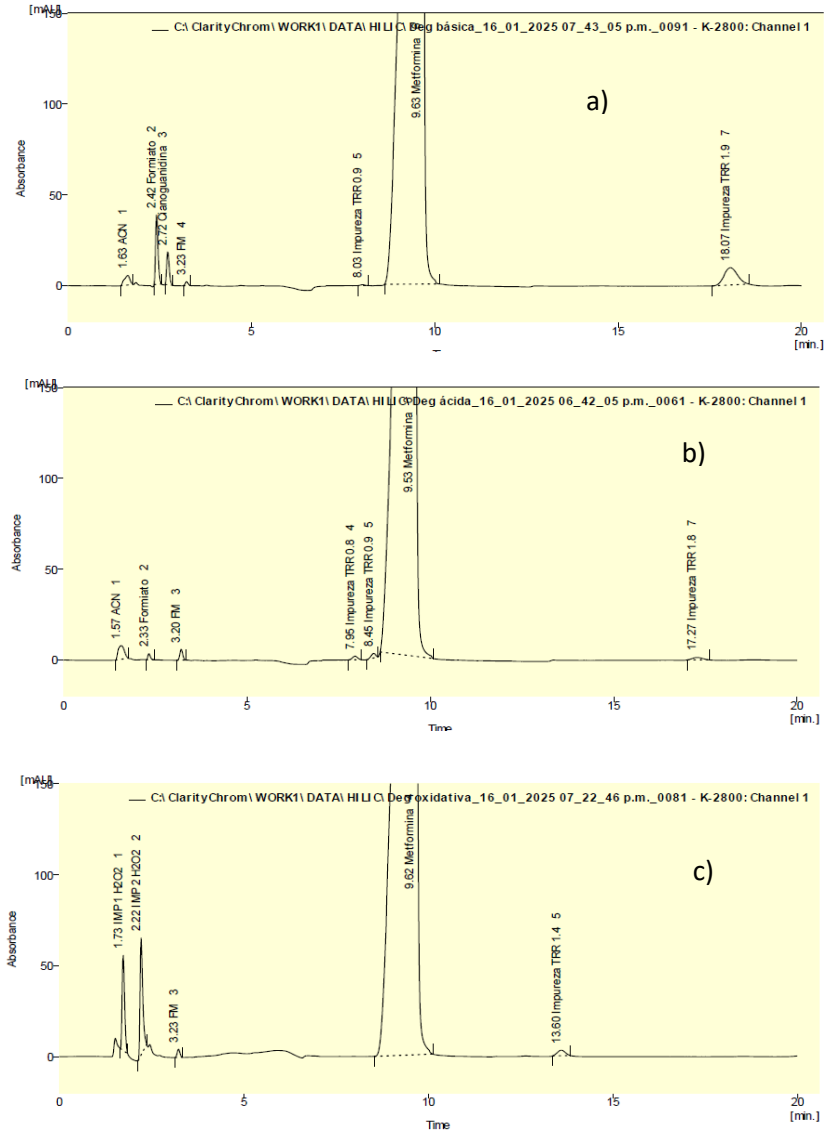


Figura 2. Cromatogramas de degradación forzada de la metformina HCl bajo condiciones: a) básicas, b) ácidas y c) oxidativas. Se indican los tiempos de retención relativos (TRR) de los productos de degradación observados.

Adecuabilidad del sistema

La verificación de estos parámetros antes de cada secuencia analítica aseguró que el sistema operaba de manera consistente y fiable, la verificación del sistema, por lo tanto, actuó como un control de calidad indispensable, asegurando que cualquier variabilidad observada en los resultados se debiera a las muestras mismas y no a un mal funcionamiento del sistema analítico.

Tabla 7. Adecuabilidad del sistema			
Parámetro	Cianoguanidina	Melamina	Metformina HCl
Tiempo de retención	2.7	4.6	9.4
Área	75.8	739.8	273.7
Coeficiente de variación	1.2	1.4	0.2
Platos teóricos (N)	4056	6248	11577
Factor de coleo	1.2	1.5	1.1
Resolución	5.4	7.5	16.7

Conclusión

Se validó un método por Cromatografía Líquida de Interacción Hidrofílica (HILIC) para la cuantificación de cianoguanidina y melamina, impurezas de la metformina HCl, conforme a las directrices de la FEUM, ICH y el CNQFB México. El método demostró ser lineal, específico, preciso y eficiente, con un tiempo de acondicionamiento de 30 minutos y un tiempo de análisis de 15 minutos, resultando adecuado para el control de calidad rutinario de la materia prima.

Bibliografía:

[1] Bello-Chavolla, O. Y., Antonio-Villa, N. E., Fermín-Martínez, C. A., Fernández-Chirino, L., Vargas-Vázquez, A., Ramírez-García, D., Basile-Alvarez, M. R., Hoyos-Lázaro, A. E., Carrillo-Larco, R. M., Wexler, D. J., Manne-Goehler, J., & Seiglie, J. A. (2022). Diabetes-Related Excess Mortality in Mexico: A Comparative Analysis of National Death Registries Between 2017–2019 and 2020. Diabetes Care, 45(12), 2957-2966. https://doi.org/10.2337/dc22-0616

[2] Basto-Abreu, A., López-Olmedo, N., Rojas-Martínez, R., Aguilar-Salinas, C. A., Moreno-Banda, G. L., Carnalla, M., Rivera, J. A., Romero-Martínez, M., Barquera, S., & Barrientos-Gutiérrez, T. (2023). Prevalence of prediabetes and diabetes in Mexico: Ensanut 2022. Salud Publica de Mexico, 65. https://doi. org/10.21149/14832

[3] SALAZAR ALVAREZ, Yohana. Uso de la metformina en la diabetes mellitus tipo II. Rev Cubana Farm [online]. 2011, vol.45, n.1, pp. 157-166. ISSN 1561-2988.

[4] Magdy, MA, Ali, NW, Taha, AA, Elgebaly, AM y Farid, NF (2020). Diferentes métodos cromatográficos para la determinación de benzoato de alogliptina, clorhidrato de metformina e impurezas de metformina en forma de dosificación farmacéutica y a granel. Journal of Separation Science

[5] Greco, G., y Letzel, T. (2013). Principales interacciones e influencias de los parámetros cromatográficos en las separaciones HILIC. Journal of Chromatographic Science, 51(7), 684–693. doi:10.1093/chromsci/bmt015

[6] Isabelle Kohler y C, Michel Verhoeven, Rob Haselberg, Andrea FG Gargano. (2021). Hydrophilic interaction chromatography – mass spectrometry for metabolomics and proteomics: state-of-the-art and current trends.

[7] Buszewski, B. y Noga, S. (2011). Cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC): una poderosa técnica de separación. Química analítica y bioanalítica, 402(1)

[8] Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 13 a ed. México; 2022

[9] Farmacopea de los Estados Unidos de América (2023). General Chapter, ⟨1225⟩ Validación de Procedimientos Farmacopeicos. USP-NF. Rockville, MD: Farmacopea de los Estados Unidos de América.

[10] Michal Dousaa, Jakub Jires. (2020) HILIC-MS determination of dimethylamine in the active pharmaceutical ingredients and in the dosage forms of metformin.