

## Métodos analíticos necesarios para el desarrollo de tabletas de metformina 500 mg

### Analytical methods needed for Metformin 500mg tablets development

**Caridad M. García Peña<sup>I</sup>; Rafael León Rodríguez<sup>II</sup>; Vivian Martínez Espinosa<sup>III</sup>**

<sup>I</sup> Máster en Tecnología y Control de Medicamentos. Investigadora Agregada. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). La Habana, Cuba. de Investigación y Desarrollo de Medicamentos CIDEM. La Habana, Cuba.

<sup>II</sup> Licenciado en Química. Investigador Auxiliar. CIDEM. La Habana, Cuba.

<sup>III</sup> Técnica en Tecnología Farmacéutica. CIDEM. La Habana, Cuba.

---

#### RESUMEN

El clorhidrato de metformina es un derivado de la biguanida usado en la diabetes mellitus no insulina dependiente, reduce la concentración de glucosa sanguínea sin incrementar la secreción de insulina, se considera un agente antihiper glucemiante y no un fármaco hipoglucemiante. El desarrollo tecnológico requiere de métodos analíticos confiables que permitan la cuantificación del fármaco en diferentes etapas de la investigación. El objetivo de este trabajo fue la validación del método analítico, reportado en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP 31, 2008), por espectrofotometría ultravioleta y la adaptación del método analítico, reportado en la misma farmacopea, para el análisis de los compuestos relacionados en la determinación del principio activo en el producto terminado, por cromatografía líquida de alta resolución, validados para el control de la calidad y estudio de estabilidad de las tabletas de metformina 500 mg. A las técnicas validadas, por métodos cromatográficos y espectrofotométricos se le determinaron los parámetros de desempeño, especificidad, linealidad, exactitud y precisión. Las curvas de calibración para cada método, se realizaron en el intervalo de 60 al 140 %, donde fueron lineales con coeficientes de correlación igual a 0,9994 y 0,99903, respectivamente; la prueba estadística para el intercepto y la pendiente se consideró no significativa. Se obtuvieron recobrados de 100,01 y 99,1 %,

respectivamente, en el intervalo de concentraciones estudiados y las pruebas de Cochran (G) y Student (t) resultaron no significativas. Los coeficientes de variación en los estudios de la repetibilidad fueron iguales a 1,4 y 0,8 %, respectivamente, para las 6 réplicas ensayadas, mientras que en los análisis de la precisión intermedia las pruebas de Fischer y Student fueron no significativas. Los resultados permiten concluir que ambos métodos cumplen con los requisitos establecidos como aceptables para cada uno de los casos en el intervalo de concentraciones establecido.

**Palabras clave:** Metformina, espectrofotometría, cromatografía líquida de alta resolución, validación.

---

## ABSTRACT

Metformin hydrochloride is a biguanide-derivative used in non-dependent insulin diabetes mellitus reducing the blood glucose concentration without increases insulin secretion, and it is considered a anti-hyperglycemia agent and not a hypoglycemia one. Technological development requires of a reliable analytical methods allowing drug quantification in different stages of research. The aim of present paper was the analytical method validation, reported in USA Pharmacopeia (USP 31,2008) by UV-spectrophotometry and the adaptation of abovementioned method reported in the same pharmacopeia, for analysis of compound related in determination of active principle in end product, by high-performance liquid chromatography validated for quality control and study of Metformin (500-mg) tablets stability. In validated techniques by chromatographic spectrophotometric methods we determined performance parameter, specificity, linearity, accuracy, and precision. Calibration curves for each method was performed in intervals of 60 to 140%, where they were linear with correlation coefficients equal to 0.9994 and 0.99903, respectively. Statistical test for interceptor and slope was considered as non-significant. We achieved recoveries of 100.01 and 99.1, respectively during interval of study concentrations, and the Cochran (G) and Student's (t) tests were not significant. Variation coefficients in studies of repetition were equal to 1.4 and 0.8, respectively for the 6 assayed replica, whereas in average precision analysis, Fischer and Student tests were not significant. Results allow concluding that both methods fulfill the established requirements as acceptable for each of cases during the concentration interval established.

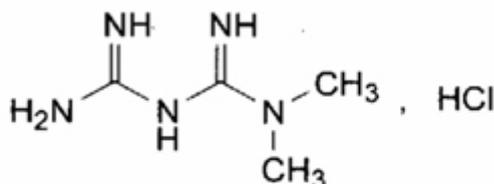
**Key words:** Metformin, spectrophotometry, high-performance liquid chromatography, validation.

---

## INTRODUCCIÓN

Las tabletas de metformina ([fig. 1](#)) se indican en el tratamiento de pacientes con diabetes mellitus tipo 2, especialmente en los pacientes obesos, en quienes la restricción calórica y la actividad física no son suficientes para controlar las concentraciones de glucosa. En los pacientes con diabetes mellitus tipo 1

(dependiente de insulina), puede desempeñar la función de coadyuvante, mejora de este modo el control metabólico.<sup>1-3</sup>



**Fig. 1.** Fórmula estructural de la metformina.

En la literatura aparecen reportados métodos espectrofotométricos,<sup>4,5</sup> para la cuantificación del principio activo en las tabletas de metformina. Los métodos espectrofotométricos resultan de gran utilidad para el control de la calidad, mientras que los métodos cromatográficos son más selectivos y específicos, para los estudios de estabilidad del producto terminado y permite el monitoreo del principio activo en el tiempo.<sup>6,7</sup>

El objetivo de este trabajo fue la validación de 2 métodos analíticos para el control de la calidad y el estudio de estabilidad de las tabletas de metformina 500 mg. Ambos métodos pertenecen a la categoría I, y se evaluaron para cada uno los parámetros de desempeño, especificidad, linealidad, rango, exactitud y precisión:

## MÉTODOS

La sustancia de referencia química de metformina fue suministrada por el grupo de sustancias de referencia del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM, La Habana, Cuba), la cual fue analizada por el método cromatográfico establecido para realizar el control de la calidad de la materia prima, con una pureza de 99,2 %. El producto terminado en forma de tabletas, fue elaborado en la UCTB Tecnologías Básicas del CIDEM, identificado como el lote 6001, fabricado en mayo del 2006, el cual cumplió con las especificaciones de calidad establecidas para el control de la calidad de las tabletas.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado HPLC, procedentes de la Riedel-de Haen.

Para el estudio se utilizó un cromatógrafo (KNAUER) con detector UV/VIS (KNAUER) ajustado a 232 nm, un inyector con un rulo de 20 µL e integrador (SHIMADZU CR 8 A). La separación se realizó isocráticamente con una columna Lichrosorb RP-8 (5 µm) (250 x 4 mm). La fase móvil óptima consistió en una mezcla de solución de dihidrógeno ortofosfato de amonio al 1,7 % ajustado a pH 2,5 con ácido ortofosfórico a un flujo de 1,5 mL/min.<sup>6,7</sup>

En el caso de la espectrofotometría se utilizó un espectrofotómetro SPECTRONIC GENESYS 2, seleccionándose 233 nm como la longitud de onda idónea para el trabajo por corresponderse con el máximo de absorción y no existir interferencias de los excipientes.

Los estudios de especificidad se diseñaron de forma diferente para cada método; en el método espectrofotométrico se estudiaron las posibles interferencias de las sustancias auxiliares y en el cromatográfico se sometieron muestras a condiciones drásticas de degradación: hidrólisis ácida HCL 3 N, hidrólisis básica NaOH 3 N, oxidación H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para evaluar las posibles interferencias de los productos de degradación.<sup>8</sup>

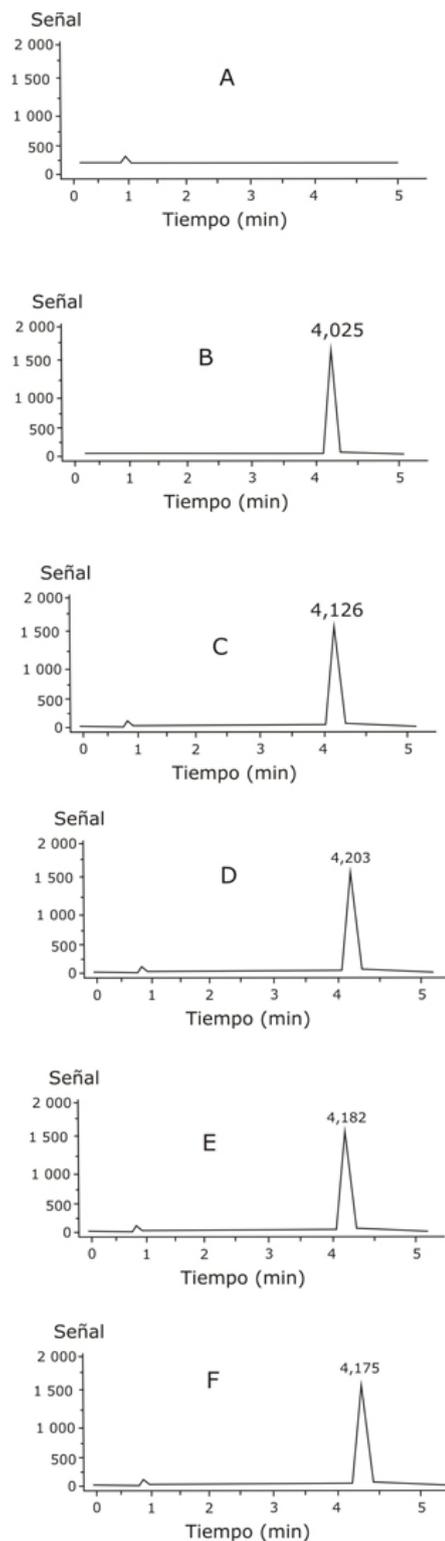
La linealidad y la exactitud se estudiaron de forma simultánea para ambos métodos, para esto se prepararon muestras con diferentes concentraciones de metformina, en el estudio de linealidad se trabajó en el intervalo de concentraciones comprendido entre el 50 al 150 % (50, 80, 100, 120 y 150 %) de la concentración teórica del principio activo, mientras que para el estudio de exactitud se emplearon 3 valores de concentración (80, 100 y 120 %); se realizaron los análisis por triplicado. El procesamiento estadístico de los datos se realizó por el programa Minitab 14.0, determinándose la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación, los coeficientes de variación de los factores de respuesta, ensayo de proporcionalidad. Mientras que para el estudio de exactitud, se realizó la prueba de Cochran con vistas a comprobar si la variación de la concentración producían diferencias significativas en los resultados y la prueba de de la t de Student para determinar si existían diferencias significativas entre la recuperación media y el 100 %.<sup>8</sup>

En el caso del ensayo de precisión se realizaron los estudios de repetibilidad y de precisión intermedia, trabajando a partir de una muestra homogénea común. Para el caso de la repetibilidad se trabajó sobre la base de 6 determinaciones y el estudio de precisión intermedia haciendo las valoraciones por dos analistas, en 3 días y a 3 concentraciones (80, 100, 120 %) diferentes. A los datos se le aplicaron la prueba de la t de Student y la prueba de Fischer con el objetivo de determinar si existían diferencias significativas entre las medias obtenidas y entre las precisiones alcanzadas por los analistas respectivamente, para un límite de confianza de un 95 % de la media.<sup>8</sup>

## RESULTADOS

Los valores de absorbancia determinados en el estudio de especificidad del método por espectrofotometría UV, realizado a 233 nm, empleando el placebo, la sustancia de referencia química, y las tabletas, fueron 0,001; 0,394 y 0,388, respectivamente. Se demuestra que los excipientes no absorben a la longitud de onda del máximo de absorción del principio activo.

La [figura 2](#) muestra los resultados del estudio de especificidad del método cromatográfico. Como se observa en el cromatograma correspondiente a la muestra placebo (A), no se obtuvo ninguna señal en la zona de interés, al ser comparado con la señal obtenida para la solución estándar de referencia (B) y de la muestra de metformina tabletas (C), lo cual indica que los excipientes no interfieren en la determinación del principio activo. En las muestras sometidas a condiciones drásticas (D, E, F), se evidenció una ligera disminución del pico correspondiente a la metformina, y no se observa aparición de picos secundarios, atribuibles a productos de degradación del principio activo.



**Fig. 2.** Resultados del estudio de especificidad del método. A: c romatograma de la muestra placebo; B: cromatograma de la solución de referencia química; C: cromatograma de la muestra de tabletas de metformina 500 mg; D: cromatograma de la muestra degradada en hidrólisis ácida HCl 3 N; E: c romatograma de la muestra degradada en hidrólisis básica NaOH 3 N; F: cromatograma de la muestra degradada por oxidación  $H_2O_2$

En la [tabla 1](#) se reportan los resultados de los estudios de la linealidad del sistema para el método cromatográfico y espectrofotométrico, el coeficiente de regresión lineal fue de 0,9994 y 0,9990, respectivamente, y los coeficiente de variación del factor de respuesta resultaron iguales a 1,38 y 1,56 %.

**Tabla 1.** Resultados del estudio de linealidad

Parámetros	CLAR	UV	Límites
Ecuación de la recta	$y = 2,74x - 0,37$	$Y = 3,85x - 0,01$	$y = bx + a$
Coefficiente de regresión lineal	0,9994	0,9990	$\geq 0,9990$
DE relativa de la pendiente	1,97	1,42	$\leq 2\%$
CV del factor de respuesta	1,38	1,56	$\leq 5\%$

En la [tabla 2](#) aparecen reportados los resultados de los estudios de exactitud para el método cromatográfico y espectrofotométrico. Las recuperaciones medias fueron de 100,01 y 99,10 %, respectivamente, y los valores de t calculada (0,247 y 2,13) y de G calculada (0,628 y 0,652) fueron menores que los valores tabulados, para un 95 % de confianza, t tabulada (2,306) y G tabulada (0,797).

**Tabla 2.** Resultados del estudio de exactitud

CLAR	UV	Límites
R media= 100,01 %	R media= 99,10 %	98,0-102,0 %
t <sub>calc</sub> = 0,247 t <sub>tab</sub> = 2,306	t <sub>calc</sub> = 2,13 t <sub>tab</sub> = 2,306	t <sub>exp</sub> ≤ t <sub>tab</sub>
G <sub>calc</sub> = 0,628 G <sub>tab</sub> = 0,7679	G <sub>calc</sub> = 0,652 G <sub>tab</sub> = 0,7679	G <sub>exp</sub> ≤ G <sub>tab</sub>

Los resultados de los estudio de precisión de los métodos desarrollados aparecen reportados en las [Tablas 3 y 4](#). En los estudios de repetibilidad realizados, para el método cromatográfico y espectrofotométrico, las medias obtenidas fueron de 99,7 y 98,2 %, y los coeficientes de variación fueron de 1,4 y 0,8 %, respectivamente, mientras que los valores de F calculadas y los valores de t calculadas fueron menores que los valores tabulados, para un 95 % de confianza, para cada uno de los niveles estudiados.

**Tabla 3.** Resultados del estudio de la precisión intermedia del método analítico (CLAR)

Niveles	Analista 1 (%)			Analista 2 (%)		
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3
80 %	79,86	80,89	80,23	80,15	80,53	79,23
	80,56	80,15	79,72	80,56	79,99	80,05
100 %	100,40	98,90	99,50	99,50	100,80	98,70
	100,90	100,20	100,40	98,40	99,90	100,50
120 %	120,45	119,85	119,86	120,89	120,43	119,85
	119,89	120,56	120,27	120,05	120,06	120,37
Análisis estadístico						
	Analista 1 (%)	Analista 2 (%)	Fcal (Ftab (5/5; 0,05) = 5,05)		tcal (ttab10; 0,05 = 2,23)	
80 %	X= 80,24 CV= 0,54 %	X= 79,77 CV= 0,75 %	2,09		1,49	
100 %	X= 100,05 CV= 0,72 %	X= 99,63 CV= 0,96 %	1,76		0,85	
120 %	X= 120,15 CV= 0,27 %	X= 120,28 CV= 0,31 %	1,34		0,87	

**Tabla 4.** Resultados del estudio de la precisión intermedia del método analítico (UV)

Niveles	Analista 1 (%)			Analista 2 (%)		
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3
80 %	79,86	79,85	80,16	80,52	80,16	79,86
	80,45	79,42	79,84	80,46	80,45	80,45
100 %	100,56	99,42	99,45	99,89	100,03	99,74
	100,23	99,85	100,56	99,82	99,87	100,56
120 %	119,85	119,43	120,46	120,12	120,08	119,87
	120,23	119,96	120,87	119,79	120,28	120,42
Análisis estadístico						
	Analista 1 (%)	Analista 2 (%)	Fcal (Ftab (5/5; 0,05) = 5,05)		tcal (ttab10; 0,05 = 2,23)	
80 %	X= 79,93 CV= 0,43 %	X= 79,77 CV= 0,55 %	3,23		1,49	
100 %	X= 100,01 CV= 0,52 %	X= 99,98 CV= 0,24 %	3,03		0,10	
120 %	X= 120,10 CV= 0,40 %	X= 120,09 CV= 0,21 %	3,80		0,87	

## DISCUSIÓN

Los valores obtenidos en el estudio de especificidad del método espectrofotométrico demostraron que las sustancias auxiliares a la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción del principio activo no interfieren, ya que los valores de absorbancia del placebo corresponden al 1 % en relación con los valores de metformina en las muestras, por tanto, es adecuado para el control de la calidad del producto terminado.<sup>4,5</sup>

No se observó interferencias de los productos de degradación en la determinación del principio activo. Se apreció una ligera disminución del pico de la metformina, en los medios de degradación utilizados, sin aparición de picos secundarios. No se evidenció interferencia de los excipientes utilizados en la formulación (celulosa microcristalina 101, glicolato sódico de almidón, polivinilpirrolidona K-90, dióxido de

silicio coloidal, estearato de magnesio), en el intervalo de elución del principio activo, lo que demuestra la especificidad del método cromatográfico tanto para el control de la calidad, como para realizar el estudio de estabilidad de las tabletas.<sup>6-8</sup>

Los resultados del estudio de linealidad (tabla 1) probaron que los métodos cumplen con los parámetros establecidos, el coeficiente de correlación de la recta de regresión es mayor que 0,999 para ambos métodos; los factores respuestas son semejantes entre sí, similares al valor de la pendiente de la recta de regresión y el coeficiente de variación de estos menores que 5 %. Al aplicarse la prueba de proporcionalidad este resultó no significativo ( $S_{\text{Brel}} < 2,0 \%$ ) y el intervalo de confianza del intercepto incluye el valor cero en cada método.

El estudio de la exactitud (tabla 2) demostró que los métodos cumplen con los requisitos establecidos para este estudio. Los valores de recuperación media se encuentran dentro de los límites establecidos (98-102 %), con un coeficiente de variación adecuado. El valor de t experimental fue menor que el tabulado para un 95 % de confianza y g.l.: 8, lo que señala que el método es exacto, con una certeza del 95 %, para la cuantificación del principio activo y que no existieron desviaciones por exceso o por defecto. Tampoco el factor concentración influyó en la variabilidad de los resultados pues los valores de Gexp fueron menores que el tabulado para una probabilidad de 0,05,  $k= 3$  y  $n= 3$ .<sup>8</sup>

Los ensayos de precisión (tablas 3 y 4) indicaron que no existían diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por ambos analistas, en días diferentes, ni en las medias obtenidas por ellos. Los valores que se obtienen en el estudio de precisión intermedia, de las pruebas de Fischer y de la t de Student, para el estudio de la precisión intermedia demuestran que no existen diferencias significativas entre las precisiones alcanzadas por los analistas en diferentes días para una probabilidad de 0,05, ya que el valor de F calculada es menor que la F tabulada. Al realizar la prueba de la t de Student el valor calculado resultó menor que el tabulado, para una probabilidad de 0,05, lo cual demostró que no existían diferencias significativas entre las medias alcanzadas, con un nivel de significación de un 5 %.<sup>8</sup>

Los métodos analíticos validados por espectrofotometría UV y cromatografía líquida de alta resolución, para el control de la calidad y estudio de estabilidad de las tabletas de metformina 500 mg, resultaron lineales, precisos, exactos y específicos.

El método por espectrofotometría ultravioleta puede emplearse en el control de calidad del producto terminado al igual que el método cromatográfico; resultó de elección por su sencillez y rapidez el espectrofotométrico y el método por cromatografía líquida de alta resolución para el estudio de estabilidad del producto por su elevada especificidad.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Martindale. The Complete Drug Referente. 32 ed. London: Pharmaceutical Press; 1999. p. 1234-5.
2. Goodman A, Gilman A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Tomo II. 3ra. ed. La Habana: Editorial Científico Técnica; 1994. p. 466-7.

3. PDR. Physicians´ Desk Reference. 57 ed. New York: Inc at Montuale; 2003. p. 332, 2193, 2905, 3270.
4. Farmacopea de los Estados Unidos. 30 ed. Rockville: Mack Printing; 2007. p. 2883-5.
5. Farmacopea Británica (BP 2007). Copyright. Inc. Versión Electrónica (CD). 2007.
6. Quattrocchi OA. & Laba RF. Introducción a la HPLC. En: Aplicación y práctica. Buenos Aires: Ed. Artes Gráficas Farro SA; 1992. p. 106-122, 284, 302-328.
7. Dierksneier G. Métodos cromatograficos. La Habana: Ed. Científico-Técnica; 2005. p. 1- 4, 256-412.
8. Validation of Analytical Procedures. Technical Requirements For The Registration of Pharmaceuticals For Human Use. In: International Conference on Harmonization, ICH-Q2A. Geneva, 1995.

Recibido: 2 de marzo de 2009.

Aprobado: 7 de abril de 2009.

M. C. *Caridad M. García Peña*. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Ave. 26 No. 1605 e/ Boyeros y Puentes Grandes, municipio Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba. Correo electrónico: [caridadgp@infomed.sld.cu](mailto:caridadgp@infomed.sld.cu)