

## **METFORMINA SIERICA in UV/VIS - FAST – Codice Z88110**

### **INTRODUZIONE**

La Metformina, principio attivo con azione euglicemizzante, è il farmaco di prima scelta nel trattamento del diabete mellito di tipo 2 in monoterapia o in combinazione con sulfaniluree o insulina; inoltre, negli adulti, soprattutto in sovrappeso, viene utilizzato come terapia di prima linea dopo il fallimento della dieta, in monoterapia o in combinazione con altri agenti euglicemizzanti orali o con insulina; nei bambini dai 10 anni di età e negli adolescenti, in monoterapia o in combinazione con insulina (Nathan et al., 2009; AIFA, 2011)

È una molecola biguanide, il cui effetto principale è espresso nel fegato attraverso l'inibizione della gluconeogenesi. La riduzione della produzione epatica di glucosio da parte di Metformina è mediata dall'inibizione del complesso 1 della catena respiratoria mitocondriale, con conseguente diminuzione di ATP cellulare. Poiché il processo anabolico di gluconeogenesi è energeticamente costoso, il trattamento con Metformina riduce la produzione di glucosio con concomitante diminuzione dello stato energetico epatico (Viollet e Foretz, 2013).

La Metformina non subisce metabolismo epatico e la secrezione tubulare a livello renale è il principale meccanismo responsabile della sua eliminazione. La *clearance* renale media stimata è  $507 \pm 129$  ml / min in soggetti con funzione renale preservata (circa 3,5 volte maggiore della *clearance* della creatinina). Tale *clearance* è ridotta in maniera proporzionale ad una eventuale alterazione o compromissione della funzionalità renale (Graham et al., 2011).

In caso di overdose o accumulo durante terapia cronica, trattamenti extracorporei, quali HD (emodialisi standard), HF (emofiltrazione), emodiafiltrazione (HDF), e CVVH (Continuous venovenous hemofiltration), sono considerati efficaci per la rimozione di Metformina e pertanto routinariamente utilizzati in ambito ospedaliero. Tale approccio si basa su caratteristiche chimico-fisiche della molecola quali ad esempio le piccole dimensioni e l'assenza di legami con le proteine plasmatiche (Seidowsky et al., 2009).

Gli effetti collaterali più comuni, riferiti circa nel 20% dei pazienti all'inizio del trattamento, consistono in disturbi gastrointestinali, quali nausea, perdita di appetito, sapore metallico e diarrea (Chan et al., 1999). L'acidosi lattica è un effetto collaterale raro ma potenzialmente *life-threatening*, con una incidenza di 2-9 casi per 100.000 pazienti/anno (Biradar et al, 2010; Lalau, 2010) ed una mortalità complessiva del 50% circa (Chan et al, 1999; Seidowsky et al, 2009; Lalau et al, 1995; Lalau et al, 1999). In particolare, la tossicità associata ad accumulo di Metformina è caratterizzata tipicamente da una triade di insufficienza renale acuta, alte concentrazioni plasmatiche di Metformina e grave acidosi lattica.

Un recente studio clinico (Vecchio et al., 2014) ha dimostrato che l'acidosi lattica associata ad accumulo di Metformina si può verificare (i) a dosaggi inferiori alla dose massima giornaliera raccomandata di 3000 mg, (ii) con un esordio tardivo dopo l'inizio della terapia ( $60,62 \pm 45,74$  mesi) e (iii) in pazienti (53%) senza preesistenti controindicazioni alla terapia con Metformina.

Pertanto, sebbene il ruolo dell'accumulo di Metformina nello sviluppo di acidosi lattica sia ancora dibattuto, il monitoraggio farmacologico dovrebbe diventare buona pratica clinica durante la terapia con questa molecola, al fine di prevenire gli effetti collaterali sopra riportati, pur non essendo questa procedura ancora mandatoria da parte degli organi regolatori del farmaco.

#### *Riferimenti bibliografici*

Biradar V, Moran JL, Peake SL, Peter JV. 2010. Metformin-associated lactic acidosis (MALA): clinical profile and outcomes in patients admitted to the intensive care unit . Crit Care Resusc 12: 191-195.

Chan NN , Brain HP , Feher MD 1999. Metformin-associated lactic acidosis: a rare or very rare clinical entity? Diabet Med; 16: 273-281 .

Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, et al. 2011. Clinical pharmacokinetics of metformin . Clin Pharmacokinet 50: 81-98 .

Lalau JD, Lacroix C , Compagnon P, de Cagny B, Rigaud JP, Bleichner G , et al. 1995. Role of metformin accumulation in metformin-associated lactic acidosis . Diabetes Care 18: 779-784 .

Lalau JD, Race JM . Lactic acidosis in metformin-treated patients. 1999. Prognostic value of arterial lactate levels and plasma metformin concentrations. Drug Saf 20: 377-384 .

Lalau JD. 2010. Lactic acidosis induced by metformin: incidence, management and prevention. Drug Saf 33: 727-740.

Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, et al. 2009. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes . Diabetes Care 32: 193-203.

Seidowsky A, Nseir S , Houdret N , Fourrier F. 2009. Metformin-associated lactic acidosis: a prognostic and therapeutic study . Crit Care Med 37: 2191-2196 .

Vecchio S, Giampreti A, Petrolini VM, Lonati D, Protti A, Papa P, Rognoni C, Valli A, Rocchi L, Rolandi L, Manzo L, Locatelli CA. 2014. Metformin accumulation: Lactic acidosis and high plasmatic metformin levels in a retrospective case series of 66 patients on chronic therapy. Clinical Toxicology 52, 129–135.

Viollet B, Foretz M. 2013. Revisiting the mechanisms of metformin action in the liver. Ann Endocrinol 74: 123-129.

EUREKA srl – LAB DIVISION  
VAT N° 01547310423  
E-mail: info@eurekaone.com  
www.eurekaone.com



Head Quarter:  
Via Enrico Fermi 25  
60033 Chiaravalle (AN) ITALY  
Tel. +39 071 7450790  
Fax + 39 071 7496579



Questo prodotto adempie a tutte le esigenze della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD). La dichiarazione di conformità CE è disponibile su richiesta.

Release N° 001

Metformina sierica in UV/VIS - FAST

Settembre 2015

## CARATTERISTICHE DEL METODO

**Principio del Metodo:**

I campioni sierici vengono purificati mediante ultrafiltrazione, e sono quindi pronti per essere iniettati in HPLC.

**Recupero del Metodo :** >98%

**Sensibilità del Metodo (LLOD):** 0.1 mg/l

**Minima concentrazione analizzabile (LLOQ):** 0.2 mg/l

**Linearità del metodo :** 100 mg/l

**Accuratezza intra serie (errore relativo %) :**

Ci	Cs
3 mg/l	10 mg/l
5,0%	3,5%

**Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) :**

C LLOQ	Cm	Cs
0,2 mg/l	2 mg/l	20 mg/l
4,8%	3,7%	3,2%

**Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) :**

C LLOQ	Cm	Cs
0,2 mg/l	2 mg/l	20 mg/l
7,9%	7,2%	3,6%

**Coefficiente di Correlazione + DS:** 0,9968 ± 0,0002

**Range di normalità nel siero :** < 2 mg/l

*Vedi riferimenti bibliografici riportati a Pagina 2*

**Contenuto della confezione :**

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a Temperatura 2-8 C°.

**Reagente A – Soluzione Test, 1 x 1 ml**

**Vedi Avvertenze**

**Calibratore sierico, 1 x 2 ml**

**Codice Z88116**

**Reagente B – Fase mobile di condizionamento e lavaggio colonna, 1 x 500 ml**

**Confezionato a parte - vedi scheda tecnica**

**Reagente M – Fase Mobile, 4 x 500 ml**

**FILTRO 10.000MWCO 1 x 100pz**

**Dotazione strumentale minima richiesta:**

Strumento HPLC isocratico con loop da 10 µl  
Detector UV/VIS λ =232 nm

**Dotazione opzionale:**

Autocampionatore

**Modalità di prelievo ematico:**

Prelevare 3 ml di sangue venoso in una provetta senza anticoagulante. Centrifugare a 3000 rpm per 10 minuti. Separare il siero e stoccarlo a – 20 °C. Stabile 1 anno.

## **PROCEDURA PREANALITICA**

In una provetta dispensare :

- 900 µl di H<sub>2</sub>O di grado HPLC
- 100 µl di **Reagente A - Soluzione Test**

**Al vortex per 10 secondi**

**NOTA** : Prima di iniziare la seduta analitica è consigliabile iniettare 2-10 µl di questa soluzione in HPLC per identificare il tempo di ritenzione della Metformina che deve essere simile a quello riportato nella figura sotto riportata. Se il Test ha dato esito positivo si può procedere alla seduta analitica. Se così non fosse verificare la funzionalità del sistema analitico.

## **PROCEDURA ANALITICA**

**FASE 1** : Preparazione dei campioni

Aggiungere 300 µl di Campione, Calibratore e Controlli nella parte superiore del Vivaspin (quella con la membrana bianca) e chiudere il tappo.

**FASE 2** : Centrifugare a 3.500 rpm per 30 minuti.

**FASE 3** : Prelevare il siero filtrato che si trova nel cono di raccolta ed inserire in vial a calicetto.

**N.B.: il campione così preparato è stabile 3 giorni a 2-8 °C**

**INIEZIONE** :

- Iniettare 2-10 µl della soluzione nel Cromatografo e attendere la stampa del cromatogramma.  
(Suggerimento: nel caso in cui il picco non risulti simmetrico o non sia perfettamente riproducibile nel tempo di ritenzione diluire il siero filtrato 1:5 o 1:10 con la Fase Mobile)

Release N° 001	Metformina sierica in UV/VIS - FAST	Settembre 2015
----------------	-------------------------------------	----------------

## METFORMINA - Avvertenze

### REAGENTE A: SOLUZIONE TEST

<b>METFORMINA</b>	Circa 100 mg/l
Stoccare a 2-8 C°	

### PARAMETRI DEL DETECTOR UV/VIS

$\lambda$	232 nm
Sensibilità	Medium

### PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare la colonna Bio SCX è tassativo l'uso del Prefiltri Bio SCX, NP10 (1 x 4 pz), cod. 5190-2434.

### CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica nuova Bio SCX, NP10 (250 x 4,6 mm, 10  $\mu$ ), **termostata a 35°C**.  
CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA NUOVA:  
Disconnettere il detector e far fluire la fase mobile **Reagente B - Fase mobile di condizionamento e lavaggio colonna** a 0,2 ml/min aumentando fino a 1,2 ml/min in 30 minuti. Fluire ulteriori 30 minuti ad un flusso di 1,2 ml/min. **Non riciclare i liquidi di lavaggio**.  
Condizionare la colonna con la fase mobile - **Reagente M** al flusso di 1,2 ml/minuto per 30 minuti. Al termine, iniettare il test chimico e verificare la congruità della separazione. **Non è possibile effettuare analisi a ricircolo di fase**.  
Se la T Amb del Laboratorio è > 20 °C si consiglia di conservare a 2-8 °C la Fase Mobile fra una seduta analitica e l'altra.

### PULIZIA DELLA COLONNA

Disconnettere il detector. Fluire con la colonna montata nel verso contrario ad un flusso di 1,2 ml/min il **Reagente B - Fase mobile di condizionamento e lavaggio colonna** per 30 e scaricare. **Si raccomanda di eseguire il lavaggio della Colonna Analitica alla fine di ogni seduta analitica**. La colonna va stoccata in una soluzione di lavaggio.

### LAVAGGIO AGO INIEZIONE

Lavare con una soluzione di Acqua.

### PARAMETRI HPLC

<b>LOOP</b>	10 $\mu$ l
<b>Flusso di lavoro consigliato</b>	1,2 ml/minuto
<b>Pressione corrispondente</b>	Circa 50 bar

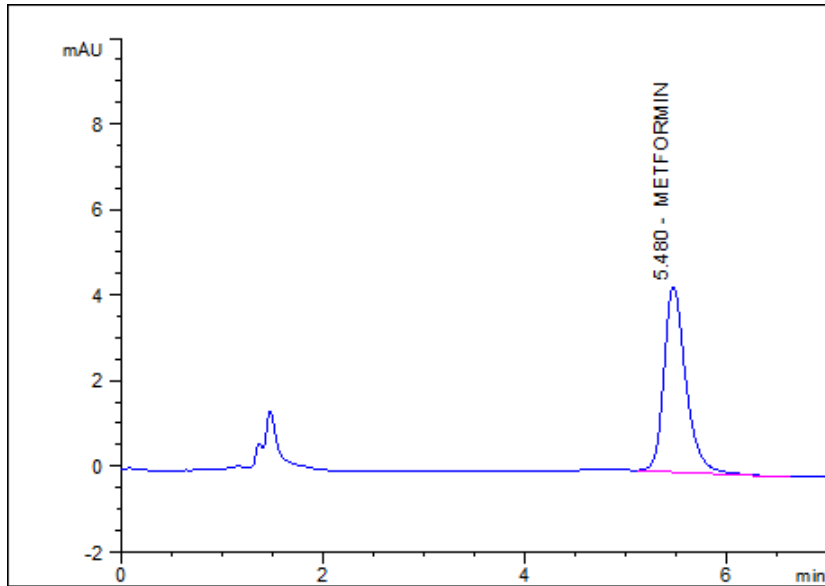
### ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
<b>Z88116</b>	Calibratore sierico per Metformina	4 x 2 ml
<b>Z88119</b>	Controllo sierico per Metformina – Livelli 1 e 2	2 x 5 x 2 ml
<b>Z51902433</b>	Colonna Analitica Bio SCX, NP10 (250 x 4,6mm –10 $\mu$ m)	1 PZ
<b>Z51902434</b>	Prefiltri Bio SCX, NP10 (4 x 10 mm)	1 PZ
<b>S51843550</b>	Vial a volume ridotto (forma a calicetto)	1 x 100 PZ
<b>S51820717</b>	Tappi per Vial a volume ridotto (forma a calicetto)	1 x 100 PZ

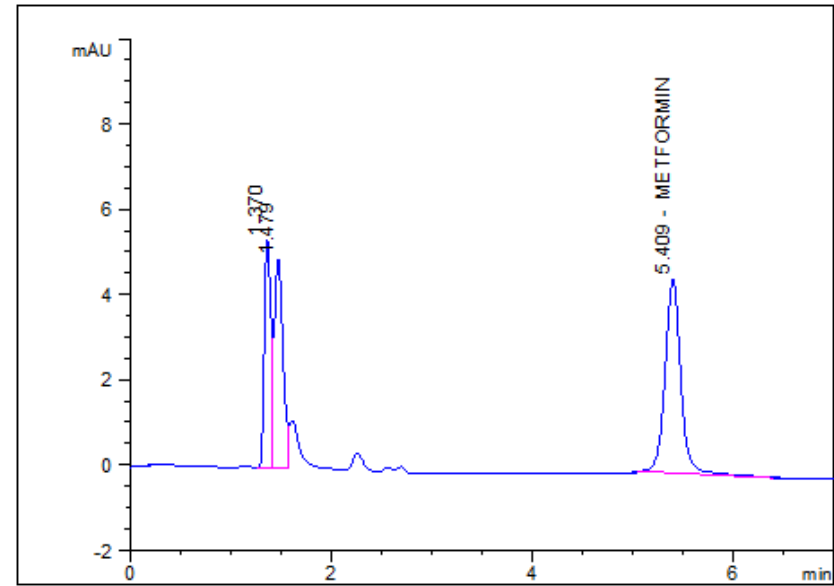


# METFORMINA SIERICA

( Cromatogrammi di riferimento )

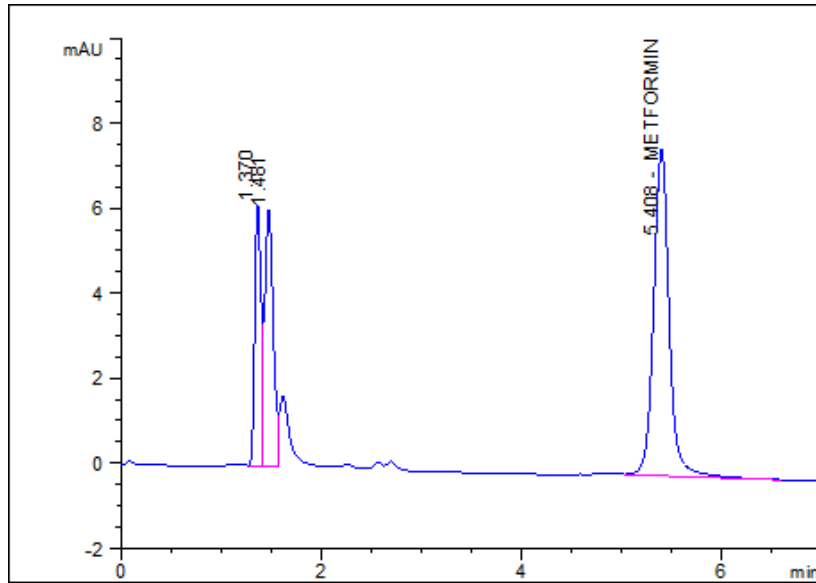


<b>Fig. 1</b>	<b>Soluzione Test</b>
	R.T. 5.48 Metformina

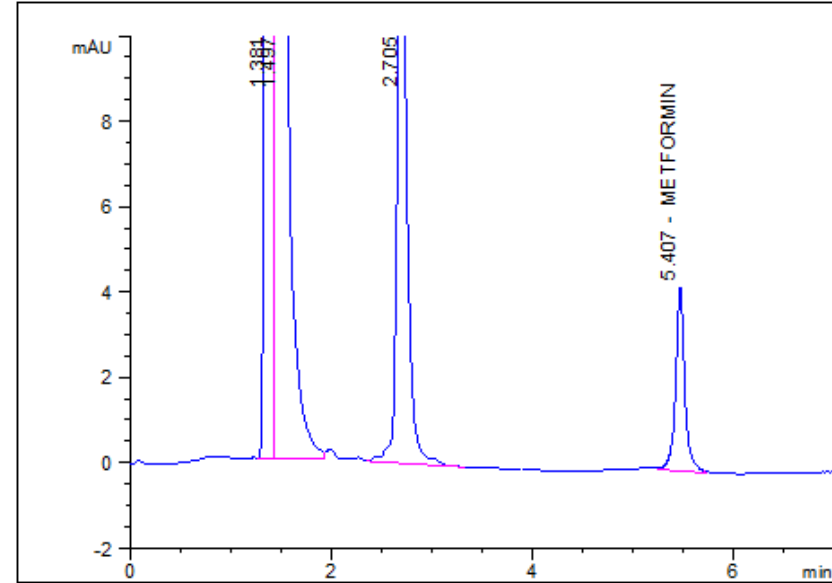


<b>Fig. 2</b>	<b>Calibratore liofilo</b>
	R.T. 5.40 Metformina 6,80 mg/l

**METFORMINA SIERICA**  
(Cromatogrammi di riferimento)



<b>Fig. 3</b>	<b>Controllo Livello Alto</b>
	R.T. 5.40 Metformina 11,40 mg/l



<b>Fig. 4</b>	<b>Campione sierico</b>
	R.T. 5.40 Metformina 6,10 mg/l