



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO BIOANALÍTICO PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE VALSARTÁN PARA SU APLICACIÓN EN
ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA**

(TRABAJO ESCRITO VIA CURSOS DE EDUCACIÓN CONTINUA)

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

CECILIA GUADALUPE DE NOVA CARBAJAL



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: INES FUENTES NORIEGA
VOCAL: MARIA DE LOURDES BEATRIZ MAYET CRUZ
SECRETARIO: KENNETH RUBIO CARRASCO
1er. SUPLENTE: GUADALUPE CLARA ESPINOSA MARTINEZ
2° SUPLENTE: JORGE RAFAEL MARTINEZ PENICHE

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

QUALLY CORPORACIÓN S.A DE C.V.

ASESOR DEL TEMA:

DOCTORA INES FUENTES NORIEGA

SUSTENTANTE:

CECILIA GUADALUPE DE NOVA CARBAJAL

AGRADECIMIENTOS

A Dios: por la vida, la felicidad y el amor que me ha brindado.

A mis padres por su amor incondicional.

A mis hermanitas por todos los momentos hermosos que hemos compartido.

A mis amigos inseparables Selene y Ernesto, por todo lo vivido, por compartir mis alegrías y disminuir mis penas.

A todos los que me alentaron para concluir este ciclo en mi vida, Manolo (mi migo del alma) Maribel, Marcos, Armando, Alejandro, Rosy Vane, Rafa y Toña.

A mis amigos de la facultad: Carlos, Hayde, Memo, Abe y a todos aquellos que me regalaron un solo minuto de su valioso tiempo.

A mi querida Facultad, por el orgullo que siento de ser parte de ella

A mis Jefes: Amparo y Lauro por su comprensión y apoyo, por permitirme concluir este trabajo.

A la Doctora Inés, por su apoyo, paciencia y comprensión.

A los profesores del Jurado: Lourdes Mayet, Kenneth Carrasco, Guadalupe Espinosa y Jorge Martínez.

A mi Guidiquita y a Elvis, las extraño.

A Natalia

A mis chaparros: jose, napo, galy, full y chucha.

Y a todos esas personitas que me apoyaron y me escucharon cuando lo necesite.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. GENERALIDADES	4
2.1 ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA	4
2.2 HIPERTENSIÓN	6
2.3 VALSARTÁN	10
2.4 MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN	16
2.5 VALIDACIÓN	21
3. PARTE EXPERIMENTAL	27
3.1 SUSTANCIA DE REFERENCIA Y REACTIVOS	27
3.2 EQUIPOS	27
3.3 INSTRUMENTOS	28
3.4 MATERIAL	28
3.5 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	29
3.6 PREPARACIÓN DE CURVA DE CALIBRACIÓN Y PUNTOS CONTROL	31
3.7 ESQUEMA DE EXTRACCIÓN	33
3.8 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	34
3.9 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	35
3.9.1 Linealidad del método	35
3.9.2 Precisión y exactitud	35
3.9.3 Selectividad	37
3.9.4 Límite de Cuantificación	37
3.9.5 Límite de detección	38
3.9.6 Recobro	38
3.9.7 Estabilidad	39
3.9.8 Tolerancia	40
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	42
4.1 LINEALIDAD DEL MÉTODO	42
4.2 PRECISIÓN Y EXACTITUD	43
4.3 SELECTIVIDAD	48
4.5 LÍMITE DE DETECCIÓN	50
4.6 RECOBRO	51
4.7 ESTABILIDAD	52
4.8 TOLERANCIA	57
5. CONCLUSIONES	58
6. BIBLIOGRAFÍA	59
ABREVIATURAS.....	61

1. INTRODUCCIÓN

En relación a los nuevos fármacos, se sabe que deben pasar por una serie de etapas para llegar como medicamentos al consumidor, durante estas etapas el laboratorio responsable de la investigación debe realizar síntesis química, formulación y clínica bajo una patente; concluido el plazo, la fórmula original es de dominio público y puede ser producida por cualquier laboratorio, es en este momento en el que se llevan a cabo estudios de intercambiabilidad (perfiles de disolución o bioequivalencia), con el fin de proporcionar a la población medicamentos genéricos.

En la actualidad el tema de salud pública, nos introduce a un campo en el que los estudios de Bioequivalencia, han sido sin lugar a dudas una herramienta clave en el mejoramiento de ésta, proporcionando la información necesaria, para la evaluación de medicamentos genéricos, que al ya no requerir demostrar su eficacia ni seguridad son de menor costo que los innovadores y así pueden llegar a más sectores de la población.

Para que un medicamento pueda registrarse como genérico debe cumplir con las pruebas reglamentarias requeridas, y comprobar que sus perfiles de disolución y/o su biodisponibilidad, son equivalentes a las del medicamento innovador

En los estudios de Bioequivalencia, se evalúa el curso temporal de las concentraciones ya sea plasmáticas, urinarias, séricas o sanguíneas del fármaco y/o sus metabolitos por un periodo de tiempo, el cual estará en función del tiempo de vida media $t_{1/2}$ del fármaco.

Un estudio de Bioequivalencia consiste en la administración de un medicamento de Referencia, que es asignado por la COFEPRIS y un medicamento de prueba, que

desea ser considerado genérico. Los medicamentos son administrados a un grupo de voluntarios sanos de ambos géneros bajo condiciones de ayuno de al menos 10 horas, en la mayoría de las ocasiones aplicando un diseño cruzado 2x2 (para fármacos de $t_{1/2}$ corta); simple ciego. Después de la administración se toman muestras en el fluido biológico de elección en periodos de tiempo definidos, con estos tiempos se construyen los perfiles de concentración vs tiempo.

Dos productos serán bioequivalentes, si presentan perfiles farmacocinéticos similares del fármaco, metabolito o ambos.

Para construir las gráficas de concentración vs tiempo es necesario cuantificar el analito de interés, en las muestras provenientes de los voluntarios en el fluido biológico de nuestro interés (plasma, suero, orina, etc.) para ello se necesita un método analítico validado que permita la cuantificación adecuada de las concentraciones del fármaco en el fluido biológico.

Actualmente se cuentan con diversas técnicas que permiten realizar dicha cuantificación, la cromatografía de líquidos de alta resolución es una de las técnicas más selectivas, y mayormente empleadas en este campo y esto se debe en parte a las ventajas que ofrece sobre otros métodos de separación; como son tiempo de muestreo corto, separación de muestras complejas, separación de muestras termolábiles.

Una de las enfermedades crónicas de mayor prevalencia en México es la hipertensión arterial. Como consecuencia, alrededor del 26.6% de la población entre 20-69 años la padece. La hipertensión arterial es un importante factor de riesgo de las enfermedades cardiovasculares. La mortalidad por estas complicaciones ha mostrado un incremento

sostenido durante las últimas décadas. Así pues las enfermedades del corazón se encuentran entre las primeras causas de muerte.

Los costos económicos asociados al tratamiento crónico de esta enfermedad y sus complicaciones representan una inconveniente para los pacientes y los servicios de salud. Es así que surge la necesidad de tener en el mercado medicamentos genéricos.

El Valsartán es un fármaco indicado en el tratamiento de la hipertensión arterial, es un antagonista del receptor de la angiotensina II, un medicamento de clase III de acuerdo al Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, por lo que para establecer su intercambiabilidad se requiere de un estudio de bioequivalencia.

OBJETIVO

Validar un método analítico por Cromatografía de líquidos de alta resolución o HPLC con detección por fluorescencia para la cuantificación de Valsartán en plasma humano, de acuerdo a lo que marca la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable.

2. GENERALIDADES

2.1 ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA ^{8, 13, 14,15}

Para que un medicamento puede registrarse como genérico Intercambiable debe cumplir con las pruebas reglamentarias requeridas en México, y comprobar que sus perfiles de disolución o y/o su biodisponibilidad, son equivalentes a las del medicamento de referencia.

La Biodisponibilidad se puede definir como la medida de la cantidad relativa del fármaco que llega a la circulación general y la velocidad a lo cual esto ocurre.

La bioequivalencia comprende un estudio de biodisponibilidad comparativa en la que se evalúa la eficiencia de absorción de dos productos (el de prueba y referencia) que son equivalentes farmacéuticos. Los medicamentos son administrados a un grupo de voluntarios y se toman muestras sanguíneas por periodos de tiempo que dependen del tiempo de vida media del fármaco $t_{1/2}$ (7.5 h), con estos tiempos se construyen los perfiles plasmáticos de concentración vs tiempo, de los que se obtienen los parámetros farmacocinéticos como son concentración plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) y el área bajo la curva de la concentración plasmática contra tiempo (ABC).

Dos productos serán bioequivalentes, si presentan perfiles farmacocinéticos similares del fármaco, metabolito o ambos, el grado de similitud de éstos perfiles se establece estadísticamente usando como parámetros el $C_{m\acute{a}x}$ y el ABC.

Generalmente los estudios de bioequivalencia involucran la comparación del medicamento de referencia y de prueba mediante un diseño cruzado 2x2 (los voluntarios se dividen en dos grupos, a cada voluntario se le administra tanto el medicamento de

referencia como el de prueba, con un periodo de lavado entre cada dosificación. Este diseño es la primera elección para los estudios de bioequivalencia, sin embargo en circunstancias específicas un estudio alternativo bien establecido y estadísticamente apropiado debe ser adoptado.

En los estudios de bioequivalencia se pueden llevar a cabo los siguientes diseños de estudios:

- Diseños cruzados 2x2
- Diseño en paralelo
- Diseño cruzado replicado 2x 4
- Diseño cruzado replicado 4x 4

Medicamento de referencia, es aquel medicamento indicado por la Secretaria de Salud, que cuenta con el registro de dicha dependencia y que se encuentra disponible comercialmente, y este puede ser:

Medicamento innovador (aquel que cuenta con la patente original a nivel mundial), de no existir en México, podría seleccionarse en el siguiente orden: producto cuya bioequivalencia este determinada, producto con el registro más antiguo y que haya demostrado eficacia y seguridad, o aquel producto con una correlación in vitro- in vivo establecida.

Productos Genéricos

- Son equivalentes Farmacéuticos: contienen la misma dosis del principio activo, misma forma farmacéutica, misma sal y cumplen con las especificaciones farmacopeicas.
- Cumplen con las pruebas de control de calidad.
- Son Bioequivalentes.
- Cumplen con las Buenas prácticas de manufactura.
- Contienen el mismo principio activo, aunque los excipientes y sus procesos de fabricación pueden ser diferentes.

2.2 HIPERTENSIÓN ^{1,17}

La hipertensión se define como un aumento anormal de la presión arterial de forma persistente. La presión arterial es controlada por el sistema renina-angiotensina del organismo, que regula la presión ejercida en el interior de las arterias a medida que el corazón bombea la sangre a todo el organismo.

Por lo general, la hipertensión sólo provoca síntomas tras un largo período de tiempo, en algunos casos, los primeros síntomas de hipertensión pueden ser un accidente vascular cerebral o un ataque cardíaco. Como resultado directo de la hipertensión crónica, se puede producir insuficiencia cardíaca con edema de las piernas y en algunos casos insuficiencia renal si no se establece el diagnóstico.

SISTEMA RENINA-ANGITENSINA^{1,2}

El sistema renina-angiotensina desempeña un papel central en la regulación de la presión arterial.

La renina es una glucoproteína, con actividad proteasa, se sintetiza en células musculares especializadas, las células yuxtglomerulares. Su secreción está controlada por distintos factores, entre los cuales resulta prioritaria la disminución de la presión de perfusión renal al bajar la presión arterial sistémica y también la reducción de la carga renal de sodio.

Si bien la renina no es una sustancia que pueda ejercer presión por sí misma, es capaz de iniciar la formación de un péptido activo a partir de un sustrato proteico denominado angiotensinógeno, el cual está constituido de glucoproteínas que contienen un residuo peptídico de 14 aminoácidos de los cuales los 10 primeros corresponden a la secuencia de angiotensina.

Esta secuencia se libera cuando la renina actúa sobre el angiotensinógeno a nivel de la unión Leucina-Leucina, pero el decapeptido que así se libera, denominado angiotensina I carece de actividad. La ECA (enzima convertidora de angiotensina) cataliza la conversión de angiotensina I en angiotensina II, un octapéptido con potente actividad vasoconstrictora.

La angiotensina II es uno de los vasoconstrictores endógenos más potentes y es una sustancia importante para el mantenimiento y aumento de la presión arterial, ejerce sus acciones a través de la unión a receptores específicos los AT₁ y los AT₂. Las acciones características de la angiotensina II están mediadas por los receptores AT₁.

Moderados cambios en las concentraciones en plasma de angiotensina II incrementan extremadamente la presión sanguínea; en base molar la angiotensina es aproximadamente 40 veces más potente que la noepinefrina en la regulación de la presión sanguínea.

La mayor parte de estos efectos dan lugar a un aumento de la resistencia vascular y el volumen circulante, que provoca una elevación de la presión arterial.

Los efectos diversos de la angiotensina II, se producen en gran parte por estimulación directa de receptores específicos AT, situados en la membrana plasmática de las células blanco, fundamentalmente en el miocardio, las paredes vasculares y el riñón. Se conocen dos diferentes subtipos de receptores de la angiotensina: los receptores AT₁ y AT₂ de acciones contrapuestas. La estimulación de los receptores AT₁ ejerce un efecto vasoconstrictor y proliferativo, mientras que la respuesta a la estimulación de los receptores AT₂ es vasodilatadora y antiproliferativa. En la insuficiencia cardiaca predominan los efectos derivados de la estimulación de los receptores AT₁.

El receptor AT₁ de la angiotensina II está localizado predominantemente en el tejido vascular, el miocardio, cerebro, riñones y en las células adrenales del glomérulo. El AT₂ se encuentra en la médula adrenal, riñones y en el Sistema Nervioso Central. La mayoría de las acciones de la angiotensina II son mediadas por el subtipo AT₁ que pertenece a la familia de receptores asociados a la proteína G.

La participación del sistema renina-angiotensina y su contribución al desarrollo de las enfermedades cardiovasculares han sido objeto de estudio durante varias décadas.

De hecho el bloqueo del sistema ha sido uno de los objetivos prioritarios del tratamiento de diversas afecciones cardiacas y renales, como la hipertensión arterial, la insuficiencia cardiaca y la insuficiencia renal.

En la actualidad se utilizan en clínica dos grupos de fármacos que actúan sobre este sistema:

- Antagonistas no peptídicos de los receptores de la angiotensina II (**valsartán**, losartán, etc.)
- Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (enalapril, ramipril, etc.)

2.3 VALSARTÁN ^{3,9}

El Valsartán es un derivado bifenílmético, un receptor antagonista específico de la angiotensina II, usado para el tratamiento de la hipertensión, actúa selectivamente en el receptor subtipo AT₁, que es responsable de las acciones conocidas de la angiotensina II.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas ^{11, 12}

Nombre químico:	Ácido (2S)-3-metil-2-[N-({4-[2-(2H-1,2,3,4-tetrazol-5'il)fenil]fenil}metil)pentamido]butanoico
Fórmula Condensada:	C ₂₄ H ₂₉ N ₅ O ₃
Peso molecular :	435.5 g/mol
Propiedades físicas:	Es un polvo fino de color blanco
Solubilidad :	Es soluble en etanol y metanol, ligeramente soluble en agua
pKa:	3.9-4.7
Punto de fusión :	116-117 °C

Estructura química:

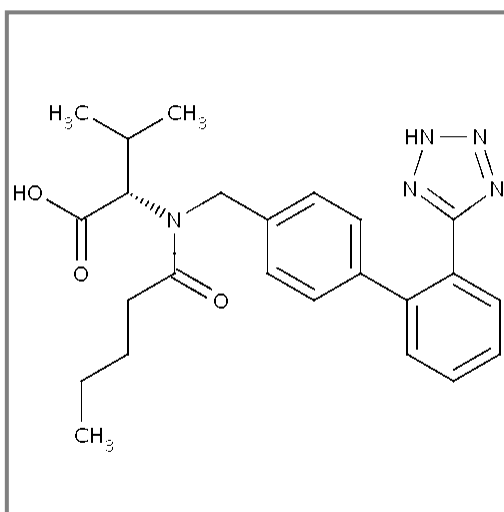


Figura 1. Estructura química de Valsartán ^{11, 18}

Desde principios de la década de los 70's se hicieron diversos intentos para desarrollar antagonistas de los receptores de la angiotensina II que pudieran tener aplicación en la clínica. Inicialmente los primeros antagonistas de estos receptores eran análogos de naturaleza peptídica como la saralasin, 1-sarcosina, 8- isoleucina y otras angiotensinas 8 sustituidas. Sin embargo estos compuestos no tuvieron importancia clínica, debido a la falta de biodisponibilidad oral y porque a pesar de ser antagonistas de los receptores de la angiotensina II, expresaban una actividad parcial inaceptable (manifestaban importantes efectos agonistas).

Con la identificación de los receptores de la angiotensina II, en la década de los ochenta empezaron a desarrollarse antagonistas no peptídicos de la angiotensina II, con el objetivo de evitar la actividad agonista de los anteriores. Después de numerosos cambios en la estructura y el diseño de estos compuestos, se desarrolló el primer receptor antagonista no peptídico de la angiotensina II, selectivo y activo por vía oral, el Losartán que fue aprobado para su uso terapéutico en 1995. A partir de entonces se han desarrollado más antagonistas pertenecientes a la familia de los derivados bifenilmetílicos, entre los que se encuentra el Valsartán.

El Valsartán es un antagonista no heterociclíco en el que el imidazol del losartán ha sido remplazado con un aminoácido acetilado, es un antagonista AT₁ muy potente, presenta un metabolito el 4-hidroxi valeril valsartán inactivo. Posee una selectividad para el receptor AT₁ superior a la de losartán.

Mediante la prevención de los efectos de la angiotensina II, los antagonistas no peptídicos de los receptores de la angiotensina II, relajan el músculo liso, y así

promueven la vasodilatación, incrementan la excreción renal de sales y agua, reducen el volumen de plasma, y decrementan la hipertrofia celular.

El Valsartán al igual que los otros receptores antagonistas no peptídicos, supera algunas desventajas de los inhibidores de la ECA, los cuales no solo previenen la conversión de la angiotensina I a la II sino también previenen la degradación de la ECA mediada por la bradicinina y sustancia P. Los efectos adversos de los inhibidores de la ECA no han sido asociados con los antagonistas de los receptores de la angiotensina II.

Farmacocinética^{4,11, 12}

La biodisponibilidad del Valsartán es de 23%, presenta una farmacocinética lineal. Se une en gran proporción a las proteínas plasmáticas (94-97%) principalmente a la albúmina. El volumen de distribución es de 17L.

Después de una dosis oral el 83% es eliminado en heces y 13% en orina principalmente como fármaco inalterado.

Cuando el Valsartán se administra con alimentos, el ABC de Valsartán en plasma se reduce en un 40% y el $C_{m\acute{a}x}$ alrededor de 50%, aunque después de 8 horas de la toma de la dosis, la concentración de Valsartán en plasma es similar en los grupos con alimento y en ayuno. Sin embargo, esta reducción en el ABC, no se acompaña por una reducción clínicamente significativa del efecto terapéutico por lo que Valsartán se puede administrar con o sin alimentos. El ABC y el $C_{m\acute{a}x}$ de Valsartán aumentan de forma lineal al incrementar la dosis en el rango terapéutico.

Farmacodinamia ^{4, 11, 12}

Valsartán es oralmente activo y potente, actúa selectivamente en el receptor subtipo A1, que es responsable de las acciones conocidas de la angiotensina II. Valsartán no exhibe ninguna actividad antagonista parcial en el receptor AT₂, y tiene mayor afinidad (cerca de 20, 000 veces) al receptor AT₁ que al AT₂.

Después de la administración de una dosis oral de Valsartán, en la mayoría de los pacientes se presenta una actividad antihipertensiva dentro de las 2h siguientes y se logra el máximo de la reducción de la presión sanguínea de 4-6 horas.

El efecto antihipertensivo persiste por más de 24 horas después de la dosis y después de dosis repetidas la máxima reducción de presión sanguínea con cualquier dosis se obtiene entre 2-4 semanas y se mantiene durante el tratamiento a largo plazo.

Mecanismo de acción ^{4,12}

De los receptores de la angiotensina II: AT₁ y AT₂. El receptor del tipo AT₁ es el responsable de la mayor parte de los efectos conocidos de la angiotensina II. Dicho receptor se encuentra en los vasos sanguíneos, el corazón, los riñones, el cerebro, los pulmones y la corteza suprarrenal. El receptor AT₂ se encuentra principalmente en el tejido fetal, en el cerebro, la médula suprarrenal, el útero y los ovarios de la persona adulta. Valsartán bloquea la vasoconstricción y los efectos de la angiotensina II por bloqueo selectivo de la unión de la angiotensina II a los receptores AT₁, produciendo dilatación de los vasos sanguíneos y el consiguiente descenso de la presión arterial.

Metabolismo^{4,3}

Valsartán es eliminado ampliamente como fármaco inalterado (80%), su metabolismo en humanos es mínimo, su principal metabolito es el Valeril-4hidroxi-Valsartán, farmacológicamente inactivo y producido por el CYP2C9 y que representa aproximadamente el 9% de la dosis del Valsartán.

Indicaciones terapéuticas⁴

- Indicado en el tratamiento de la hipertensión arterial
- Insuficiencia cardiaca
- Tratamiento de infarto post-cardiaco

Contraindicaciones⁴

- Insuficiencia hepática grave, cirrosis biliar y colestasis
- Segundo y tercer trimestre de embarazo

Reacciones adversas⁴

En algunos pacientes pueden presentarse mareos, cefalea, cansancio excesivo, diarrea, dolor de estómago, dolor de espalda y dolor de articulaciones.

Tabla 2. Farmacocinética y Farmacodinamia ^{11,12}

Efecto terapéutico :	24 h
Tiempo de Cmax:	2-4 h
Biodisponibilidad :	23%
Efecto de los alimentos:	El ABC disminuye en un 40%, el C _{máx} disminuye en un 50%
Unión a proteínas :	94-97 %
Volumen de distribución:	17 L (dosis IV)
Metabolismo:	Metabolito primario es el valeril 4-hidroxi valsartan, inactivo
Eliminación:	13% se recupera en orina 83% en heces
Tiempo de vida media de eliminación:	7.5 h

Dosis ^{11, 12}

Usualmente de 80 a 160 mg y máximo 320 mg.

2.4 MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN ^{11,16}

CROMATOGRAFÍA

Como ya se ha mencionado; para realizar los estudios de bioequivalencia/Biodisponibilidad, es necesario contar con métodos analíticos y técnicas, que permitan la cuantificación apropiada del fármaco de interés en los fluidos biológicos (plasma, suero, sangre total orina, etc.)

En la actualidad la cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC o CLAR ha llegado a ser una de las técnicas del laboratorio moderno más importantes como herramienta analítica para separar y detectar compuestos químicos, tanto en el área de investigación básica o aplicada, como en el ámbito industrial y biológico.

La cromatografía es un conjunto de técnicas que permiten separar, identificar y cuantificar compuestos químicos en mezclas complejas, usada principalmente para la separación de los componentes en una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una fase estacionaria y una fase móvil.

Las técnicas cromatográficas constan de dos fases la **Fase móvil** y la **Fase estacionaria** en cromatografía de líquidos la fase móvil es un líquido que pasa a través de una fase estacionaria. La separación cromatográfica se da como resultado de la interacción de los componentes de la muestra con las dos fases, el tiempo en que aparezca la señal cromatográfica dependerá de la interacción con cada una de las fases.

En la cromatografía líquida de alta resolución HPLC o CLAR la separación de los componentes en una muestra se lleva a cabo por el paso de estos a través de una columna y del flujo de una fase móvil (líquido), a alta presión.

El análisis cualitativo está basado en los tiempos y volúmenes de retención y el cuantitativo está basado en la medida de las áreas o alturas de los picos del cromatograma con respecto a las áreas o alturas de estándares de concentración conocida.

A continuación se describen los tipos de cromatografía líquida:

Cromatografía de Reparto⁵

Esta tipo de cromatografía puede clasificarse en **fase normal o fase reversa**, dependiendo si la fase móvil es polar o no polar.

En la de fase reversa la fase estacionaria es apolar y la móvil, polar. La técnica de fase reversa se basa en la separación de sus componentes por su polaridad. La fase estacionaria está construida por ligandos de cadenas carbonadas de entre 4 y 18 carbonos que retienen moléculas con características hidrofóbicas. La elución de los componentes de una muestra se obtiene al hacer pasar como fase móvil disolventes orgánicos (Acetonitrilo o metanol), que al lograr un equilibrio determinado logran eluir los compuestos retenidos en la fase estacionaria.

En la Fase normal la fase estacionaria es polar y la móvil apolar.

Cromatografía de Adsorción:

La fase estacionaria es un material sólido altamente polar sobre el cual se adsorben los componentes de la muestra, la fase móvil puede ser:

Líquido - cromatografía líquido sólido

Gas - cromatografía gas-sólido

En este tipo de cromatografía los componentes se distribuyen entre las dos fases por procesos de adsorción y desorción.

Cromatografía Intercambio iónico

En este tipo de cromatografía la fase estacionaria es un polímero del tipo poliestireno y la fase móvil es un líquido acuoso y salino en mezcla con un disolvente como el acetonitrilo o metanol. Existen separaciones aniónica y catiónicas dependiendo de la fase estacionaria.

Cromatografía de Exclusión

Se conoce también como cromatografía de permeación en gel. La fase estacionaria está formada por compuestos de sílice o polímeros en forma de gel que tienen poros uniformes, la retención se basa en el tamaño de la partícula y el del poro. La fase estacionaria controla la velocidad de elución, ya sea que se use un solvente orgánico o acuoso. En este caso no existe interacción entre la fase estacionaria y la móvil.

DETECCIÓN ¹¹

La eficiencia de un detector cromatográfico depende de la relación entre la cantidad física medida y la composición del efluente, así como también de las características de la señal de transferencia.

Los tipos de detectores en HPLC se clasifican en:

- Detectores basados en una propiedad de la fase móvil. *Ejemplo: Detector de Índice de refracción, densidad, entre otros.*
- Detectores basados en una propiedad de la sustancia a separar. *Ejemplo: absorbancia en el UV, la fluorescencia, entre otros.*

Los detectores más utilizados en HPLC son:

- **Detector UV:** Se basa en capacidad que tienen los compuestos de absorber la luz (180- 350 nm).
- **Detector de Fluorescencia:** Detecta compuestos que tengan fluorescencia nativa o inducida por derivatización.
- **Detectores Electroquímicos:** Existen diferentes tipos de estos detectores que se basan en cuatro métodos; amperometría, voltamperometría, Coulombimetría y conductimetría.
- **Índice de refracción:** Es un detector universal, en el que los cambios (positivos o negativos), que se derivan de la presencia de un compuesto en el eluyente se registran; es menos sensible que el UV y se tiene que controlar la temperatura.

- **Espectrometría de masas:** Se determina la masa molecular de compuestos eléctricamente cargados, o iones previamente formados.

Fluorescencia ^{6,11, 12}

Una de las características más atractivas de los métodos de fluorescencia es su sensibilidad inherente, la cual, es con frecuencia de uno a tres órdenes de magnitud mejor que las de espectroscopia de absorción.

Otra ventaja de los métodos de fluorescencia son sus grandes intervalos lineales, que son generalmente más significativos que los de espectroscopia de absorción.

La fluorescencia es un proceso de emisión en cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética. Las especies excitadas se relajan al estado basal, liberando su exceso de energía como fotones. La fluorescencia puede ser natural o conferida por derivatización con un reactivo fluorogénico.

La fluorescencia es una técnica de alta sensibilidad y selectividad. Su selectividad se debe principalmente a dos factores:

- Existen pocas sustancias de fluorescencia nativa y las reacciones de derivatización implican la presencia de un grupo funcional derivatizable en una molécula del analito.
- Se utilizan dos longitudes de onda, una de excitación y una de emisión, de tal manera que al excitar la muestra a una longitud de onda dada, varios

componentes de la muestra podrían absorber energía, pero muy pocas emitirían además a la longitud de onda elegida.

La fluorescencia más intensa y más útil es la que presentan los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos. Los compuestos que contienen estructuras alifáticas y alicíclicas de carbonilo o estructuras con dobles enlaces muy conjugados pueden presentar fluorescencia.

La mayoría de los hidrocarburos aromáticos no sustituidos son fluorescentes en disolución, la eficacia cuántica aumenta con el número de anillos y con su grado de conjugación; la sustitución afecta frecuentemente la eficacia de la fluorescencia, debido desplazamientos en la longitud de onda de absorción máxima.

El número de aplicaciones del análisis fluorométrico a especies orgánicas es muy elevado. Sin lugar a dudas las aplicaciones más importantes de la fluorimetría están en el campo del análisis de productos farmacéuticos, alimentarios, muestras clínicas y productos naturales. La sensibilidad y selectividad del método lo hace una herramienta particularmente valiosa en estos campos.

2.5 VALIDACIÓN ^{7,8,10}

La validación de métodos analíticos es parte fundamental del desarrollo de nuevas formulaciones así como de técnicas de análisis, de acuerdo a las buenas prácticas de fabricación como de laboratorio, es necesario que todos los métodos de cuantificación empleados estén validados.

La selectividad y sensibilidad de los métodos analíticos, para la evaluación cuantitativa de los fármacos y sus metabolitos, son críticos para el éxito y conducción de estudios farmacocinéticos, como son los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia.

La validación de métodos bioanalíticos incluyen todos los procedimientos que demuestran que un método en particular, usado para cuantificar analito en matrices biológicas, tales como sangre, plasma, suero u orina, es seguro y reproducible para el propósito para el que fue diseñado. Está involucra la documentación a través de la cual se demuestra, que el método es adecuado y confiable para lo que fue diseñado.

La validación previa a un estudio de bioequivalencia/biodisponibilidad comprende la evaluación de al menos los siguientes parámetros:

- Selectividad
- Intervalo de calibración y linealidad
- Precisión (repetibilidad y reproducibilidad)
- Exactitud
- Estabilidad
- Recobro
- Limite de cuantificación y Limite de detección
- Tolerancia

Selectividad

La selectividad es la capacidad del método analítico para diferenciar y cuantificar el analito de interés en presencia de otros componentes en la muestra.

Intervalo de calibración

El rango de la curva de calibración se establece en función de las concentraciones esperadas del compuesto por analizar, debe construirse con al menos cinco concentraciones distintas cada una, cubriendo el rango esperado, e incluyendo el límite de cuantificación, concentraciones para las cuales el método analítico debe ser lineal, preciso y exacto.

Linealidad

Se define como la relación matemática que existe entre la concentración con respecto a la respuesta observada. Esta respuesta puede ser la absorción de la luz ultravioleta, la emisión de la fluorescencia, la generación de la corriente eléctrica, etc.

Los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática deben ser proporcionales a la concentración del analito dentro del intervalo evaluado. Esta relación matemática debe ser continua y reproducible, en la mayoría de los casos la relación de concentración y respuesta puede ser expresada a través de la ecuación de la recta.

Límite de cuantificación

El límite de cuantificación se describe como aquella concentración que puede ser cuantificada con precisión y exactitud.

El punto inferior de la curva puede aceptarse como límite de cuantificación, si cumple con:

- La respuesta del analito debe ser por lo menos 5 veces la respuesta comparada a la respuesta del blanco.
- El pico del analito (respuesta) debe ser cuantificable y debe cumplir con los criterios de precisión y exactitud.

Límite de detección

Se establece como la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica puede distinguirse de los niveles de ruido.

Exactitud

La exactitud se describe como la correlación de los resultados obtenidos por el método analítico, contra el valor verdadero (concentración) del analito. Es determinada por análisis replicados de muestra de concentración conocida.

Precisión

La precisión del método analítico, describe la cercanía de las medidas individuales del analito cuando el procedimiento es aplicado repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea de la matriz biológica, se evalúa como *repetibilidad y reproducibilidad*

Repetibilidad: Se define como la precisión de un método analítico, que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes, pero bajo las mismas condiciones.

Reproducibilidad: Este parámetro se define como la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes en el mismo laboratorio, pero bajo diferentes condiciones de análisis.

Recobro

El recobro representa la eficacia de la extracción del método analítico, no debe ser necesariamente del 100% pero debe ser consistente, preciso y reproducible en cada nivel evaluado. Este parámetro se puede determinar comparando los resultados analíticos de muestras extraídas a tres concentraciones: (baja, media y alta) respecto a solución estándar no extraída que representan el 100.0% del recobro.

Estabilidad

La estabilidad del fármaco en el fluido biológico está en función de las condiciones de almacenamiento, las propiedades químicas del fármaco, la matriz y el sistema que las contiene. La prueba de estabilidad tiene como función determinar las condiciones de temperatura y tiempo, en las que el analito permanece estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, evaluando la respuesta (concentración) del compuesto por analizar en la matriz biológica.

Tolerancia

La tolerancia evalúa la capacidad del método analítico de soportar, pequeñas pero deliberadas modificaciones como (pH de la fase móvil, disolventes, porcentaje de la fase móvil, temperatura, etc.)

3. PARTE EXPERIMENTAL

El método analítico se optimizó a partir de lo reportado por Milena Pérez, William Cárdenas, Gloria Ramírez, Mauricio Pérez y Piedad Restrepo en el que se reporta un método de extracción líquido-sólido con detección UV arreglo de diodos¹⁹.

3.1 Sustancia de referencia y reactivos

La calidad analítica y la procedencia de la sustancia de referencia y reactivos empleados fue la siguiente:

- Sustancia de referencia de Valsartán, lote KO1386, pureza 98.4%, USP
- Fosfato monobásico de potasio, grado reactivo: Fermont.
- Acetonitrilo, grado cromatográfico: J. T. Baker.
- Metanol, grado cromatográfico: J. T. Baker.
- Sulfato de Zinc, grado reactivo: J. T. Baker.
- Acido fosfórico, grado reactivo: J. T. Baker.
- Agua purificada, grado cromatográfico.

3.2 Equipos

- Cromatógrafo de líquidos

El análisis cromatográfico se realizó en un equipo Waters®. Este equipo consta de un módulo de separación 2695, acoplado a un detector de fluorescencia marca Jasco, modelo FP-2020. Los datos fueron procesados en el programa informático: Waters Millennium.

- Centrifuga refrigerada, Hettich.

- Ultracongelador vertical, Revco.
- Sistema de purificación de agua, Millipore.
- Baño de ultrasonido, Branson.
- Bomba de presión al vacío, Millipore.
- Agitador tipo vórtex, Thermolyne.
- Campana de extracción.
- Refrigerador, Whirpool.
- Parrilla agitadora, IKA Works

3.3 Instrumentos

- Balanza analítica, Sartorius.
- Potenciómetro, Beckman.
- Columna Zorbax SB – C18, 150 x 3.0mm, 5 μ m (Agilent Technologies).
- Pipeta de repetición, Eppendorf.
- Micropipetas de volumen variable, Biohit.
- Cronómetro, VWR

3.4 Material

- Matraces volumétricos de volumen variable.
 - Combitips para pipeta de repetición, multipette plus.
 - Puntas para micropipetas de volumen variable.
 - Frascos de polipropileno con tapa rosca de volumen variable.
 - Probetas graduadas de volumen variable.
 - Microtubos de 2 mL, eppendorf.
 - Pipetas Pasteur.
-

- Papel filtro del No. 40, Whatman.
- Membranas de filtración de nylon, de 0.20 μm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro.
- Viales de alta recuperación para cromatógrafo.

3.5 Preparación de soluciones

Solución Agua:Metanol (50:50 v/v)

Medir por separado en una probeta 100 mL de metanol y 100 mL de agua transferir a un reservorio y mezclar.

Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 15mM pH 2.5

Pesar con exactitud 2.0414 g de fosfato monobásico de potasio, transferir a matraz volumétrico de 1000 mL disolver con agua y llevar a volumen, mezclar. Ajustar el pH a 2.5 con ácido fosfórico concentrado, filtrar y desgasificar.

Solución de sulfato de zinc al 5%

Pesar con exactitud 2.5 g de sulfato de zinc, transferir a matraz volumétrico de 50 mL disolver y llevar a volumen con agua, mezclar.

Fase móvil: Solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 15mM pH 2.5: ACN (57:43 v/v)

Filtrar y desgasificar por separado 1000 mL de la solución de fosfato monobásico de potasio 15mM pH 2.5 y 1000 mL de acetonitrilo, colocar en el equipo cromatográfico, si este realiza la mezcla.

Solución de reconstitución (Solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 15mM pH 2.5: ACN 57:43 v/v)

Medir por separado en una probeta 57 mL de la solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 15mM pH 2.5 y 43 mL de acetonitrilo previamente filtrados, transferir a un reservorio y mezclar.

Solución patrón de Valsartán, 1000 µg/mL

Pesar con exactitud el equivalente a 10 mg de Valsartán sustancia de referencia, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y llevar a volumen con solución metanol:agua (50:50v/v) y mezclar.

Solución patrón de Valsartán, 100 µg/mL (Solución A)

De la solución patrón de Valsartán de 1000 µg/mL, tomar una alícuota de 2 mL y transferir a un matraz volumétrico de 20 mL, llevar a volumen con solución metanol:agua (50:50 v/v) y mezclar.

Solución de patrón de Valsartán, 10 µg/mL (Solución B)

De la solución patrón de Valsartán de 100 µg/mL, tomar una alícuota de 2 mL y transferir a un matraz volumétrico de 20 mL, llevar a volumen con solución metanol:agua (50:50 v/v) y mezclar.

Solución de Adecuabilidad del sistema (Valsartán 1.6 µg/mL)

De la solución patrón de Valsartán de 100 µg/mL, tomar una alícuota de 0.8 mL y transferir a un matraz volumétrico de 50 mL, llevar a volumen con solución de reconstitución y mezclar.

3.6 Preparación de curva de calibración y puntos control

- Para validar el método analítico se prepararon curvas de calibración y puntos control en plasma humano, como se muestra en las tablas 3, 4 y 5.
 - ⇒ Blanco de reactivos: Colocar 500 μL de agua
 - ⇒ Blanco de plasma: Colocar 500 μL de plasma (sin analito)
- Las muestras se prepararon en microtubos de plástico de 2 mL, y después se agitaron en vórtex por 10 segundos, para seguir con el método de extracción que se describe en el punto 3.7.
- En el caso de los puntos control en solución para evaluar el recobro, estos se prepararon como se describe en la tabla 6 en microtubos de plástico y después se agitaron por 10 segundos.

Tabla 3. Preparación de la curva de calibración de Valsartán en plasma

Nivel	Conc. nominal ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	μL de las Soluciones		MeOH:Agua 50:50 v/v μL	Plasma μL
		Solución A	Solución B		
1	*0.100	-	5	45	450
2	0.200	-	10	40	450
3	1.000	-	50	-	450
4	3.000	15	-	35	450
5	6.000	30	-	20	450
6	7.000	35	-	15	450
7	10.000	50	-	-	450

*Límite de cuantificación

Tabla 4. Preparación de los puntos control de Valsartán en plasma

Puntos control	Conc. nominal (µg/mL)	µL de las soluciones		MeOH:Agua (50:50 v/v) µL	Plasma µL
		Solución A	Solución B		
CB	0.300	-	15	35	450
CM	5.000	25	-	25	450
CA	8.000	40	-	10	450

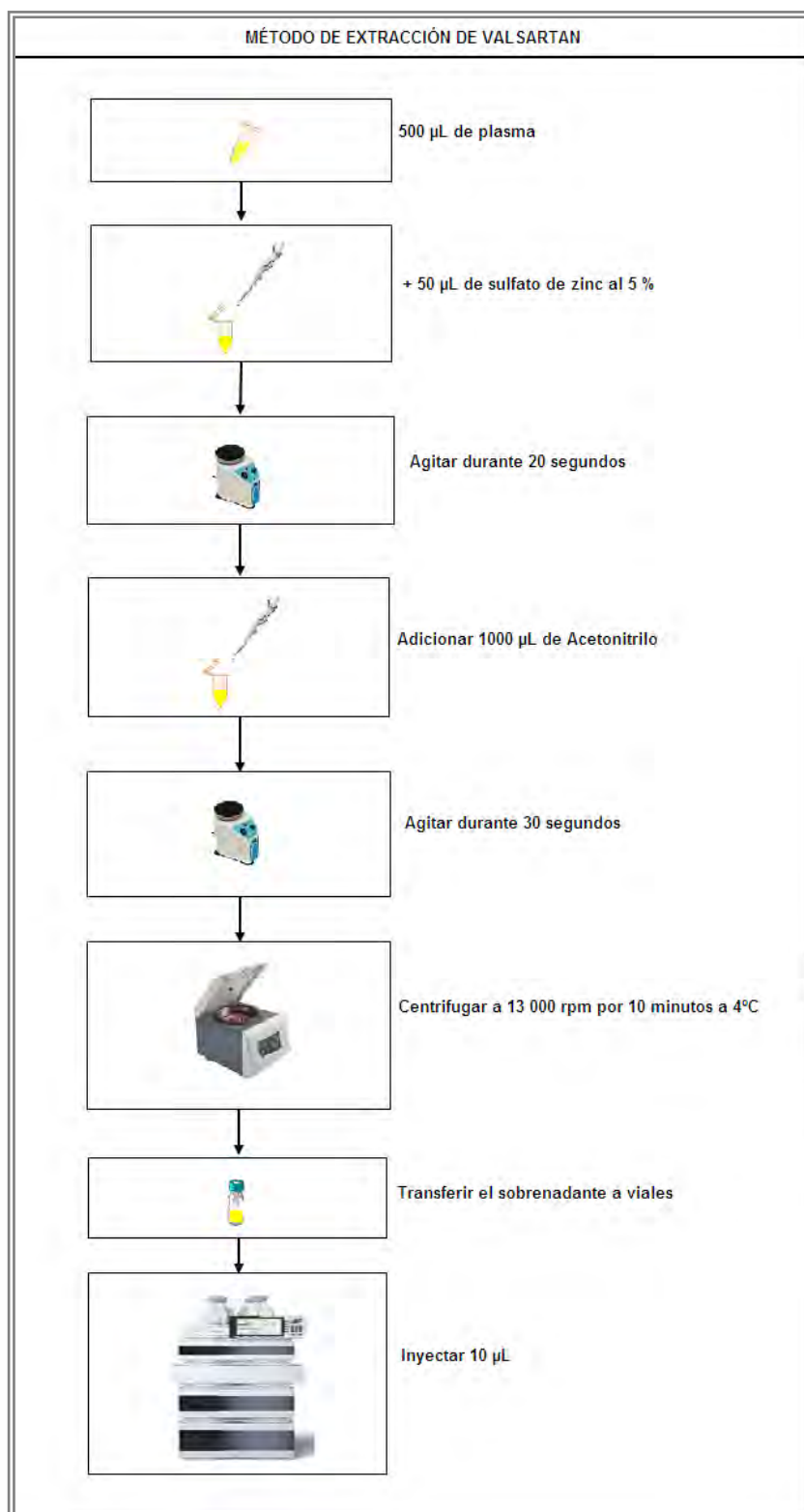
Tabla 5. Preparación del límite de detección

Límite de detección	Conc. nominal (µg/mL)	Solución B µL	MeOH:Agua 50:50 v/v µL	Plasma µL
	0.050	5	95	900

Tabla 6. Preparación de los puntos control de Valsartán en solución

Puntos control	Conc. nominal (µg/mL)	µL de las soluciones		MeOH:Agua (50:50 v/v) µL	Agua µL	Acetonitrilo µL
		Solución A	Solución B			
CB	0.300	-	15	35	450	1000
CM	5.000	25	-	25	450	1000
CA	8.000	40	-	10	450	1000

3.7 Esquema de extracción



3.8 Condiciones cromatográficas

En la Tabla 7 se muestran las condiciones que permitieron obtener los mejores parámetros cromatográficos, como son simetría del pico cromatográfico, eficiencia de la columna y tiempo de retención corto. En la validación del método se utilizó un detector de fluorescencia.

Tabla 7. Condiciones cromatográficas

Columna:	Zorbax SB-C18, 150 x 3.0 mm, 5 μ m
Detector:	Fluorescencia
Longitud de onda:	λ excitación 265 nm λ emisión 378 nm
Fase móvil:	Solución amortiguadora de fosfato de potasio 15 mM pH= 2.5: Acetonitrilo (57: 43 % v/v)
Velocidad de flujo:	1 mL/ min
Temperatura de la columna:	35°C
Temperatura del automuestreador:	10° C
Volumen de inyección:	10 μ L
Tiempo de corrida:	5 minutos

3.9 Validación del método analítico

La validación del método analítico se apegó a lo estipulado en la NOM-177-SSA1-1998 y el fluido biológico utilizado en la validación fue plasma humano.

3.9.1 Linealidad del método

Se prepararon tres curvas de calibración en plasma, de acuerdo a la Tabla 3, en el rango de concentraciones de 0.100 a 10.000 $\mu\text{g/mL}$, y se procesaron de acuerdo al método de extracción descrito. La relación entre la respuesta cromatográfica y la concentración se ajustó por medio de un análisis de regresión lineal a la ecuación $y = mx + b$ donde, “y” corresponde a el área de valsartán, “b” es la ordenada al origen y “m” es la pendiente de la curva de calibración.

Criterio de aceptación: Coeficiente de correlación $r \geq 0.99$, además la concentración recuperada respecto a la concentración nominal en cada nivel de la curva, no deberá variar en más del $\pm 15.0\%$, excepto para el límite de cuantificación que podrá variar hasta el $\pm 20.0\%$.

3.9.2 Precisión y exactitud

Repetibilidad (precisión intradía)

Este parámetro se evaluó en un día de trabajo, se prepararon por quintuplicado, los puntos control a los tres niveles de concentración, como se indica en la Tabla 4, se cálculo la precisión con el coeficiente de variación de las concentraciones recuperadas, respecto a las adicionadas.

Reproducibilidad (precisión interdía)

Para la evaluación de este parámetro, los analistas 1, 2 y 3 prepararon durante tres días, por triplicado puntos control a los tres niveles de concentración, se calculó la precisión con el coeficiente de variación (CV) de las concentraciones recuperadas. Además se evaluó la reproducibilidad entre los analistas.

Exactitud

Se evaluó a partir de los datos de repetibilidad y reproducibilidad, se calculó con la desviación estándar absoluta (DEA) del valor promedio de las determinaciones a cada nivel de concentración, respecto al valor nominal (concentración adicionada), haciendo uso de la siguiente ecuación:

$$DEA = \frac{(\text{Concentración nominal} - \text{Concentración recuperada}) \times 100}{\text{Concentración nominal}}$$

Criterio de aceptación: La precisión evaluada como coeficiente de variación y la exactitud como desviación estándar absoluta deben ser \leq al 15.0%.

3.9.3 Selectividad

La selectividad del método se determinó analizando, las siguientes condiciones:

- Blanco de reactivos
- Blanco de plasma (mezcla del plasma de al menos seis voluntarios)
- Condiciones del plasma: Lipémico y Hemolisado
- Fármacos de uso común (Ácido acetilsalicílico 25.440 µg/mL, Ácido salicílico 19.900 µg/mL, Paracetamol 21.253 µg/mL y Cafeína 4.192 µg/mL)
- Anticoagulantes (Heparina de litio, Heparina sódica 95 unidades USP y EDTA 1800 µg/mL)

Criterio de aceptación: No se deben presentar interferencias en el tiempo de retención de Valsartán, respecto a las condiciones evaluadas.

3.9.4 Límite de Cuantificación

Este parámetro se evaluó, preparando por quintuplicado el nivel inferior de la curva de calibración en plasma.

Criterio de aceptación: El valor promedio obtenido, deberá estar dentro del $\pm 20.0\%$ del valor nominal (concentración adicionada), con un $CV \leq 20.0\%$.

3.9.5 Límite de detección

Este parámetro se evaluó, preparando por quintuplicado, muestras en plasma a concentración de 0.050 µg/mL, como se describe en la tabla 5.

Criterio de aceptación: El valor considerado como límite de detección, se determinara como aquel valor de concentración a la cual la señal (altura) de analito de interés en plasma humano es al menos tres veces mayor que el nivel de ruido.

3.9.6 Recobro

El recobro se determinó, comparando las áreas de Valsartán en plasma, respecto a las áreas de las muestras en solución. Para ello se prepararon y procesaron cinco series independientes de puntos control en plasma y cinco series de puntos control en solución, como se describe en las tablas 4 y 6.

Criterio de aceptación: El recobro, deberá ser preciso y reproducible en los tres niveles de concentración evaluados con un $CV \leq 15.0\%$.

3.9.7 Estabilidad

Se determinaron las condiciones de temperatura y tiempo en las que el Valsartán permanece estable en la matriz biológica, durante su manejo, proceso y almacenamiento, evaluando la respuesta (concentración) del Valsartán en la matriz biológica. Para evaluar este parámetro se preparo una mezcla de cada punto control (0.300, 5.000 y 8.000 µg/mL), y cada mezcla se dosifico en tubos eppendorf de plástico de 2 mL, posteriormente tres puntos control de cada nivel se procesaron e inyectaron de manera inmediata (tiempo cero) las series restantes de puntos control (cada nivel por triplicado) se sometieron a las siguientes condiciones:

- **Temperatura ambiente de la muestra no procesada**

Las muestras, permanecieron a temperatura ambiente, por 24 horas, después de transcurrido este tiempo, las muestras se procesaron e inyectaron.

- **Temperatura en refrigeración de la muestra no procesada**

Las muestras, permanecieron en refrigeración por 24 horas, después de transcurrido este tiempo, las muestras se procesaron e inyectaron.

- **Ciclos de congelación – Descongelación**

Las muestras se almacenaron a una temperatura no mayor a -60°C, y se sometieron a 3 ciclos de congelación descongelación a las 24, 48 y 120 horas.

- **Estabilidad de la muestra procesada en el automuestreador a 10°C**

La serie de puntos control que se procesó e inyectó de manera inmediata (t_0), permaneció en el automuestreador por 25.3 horas a 10°C, y después de este tiempo se inyectó nuevamente.

- **Estabilidad de la muestra en congelación**

La serie de muestras control que se procesó e inyectó de manera inmediata se determinó como el t_0 , a los 106 días otra serie de puntos que permaneció en congelación a una temperatura no mayor a -60°C se procesó e inyectó.

Criterio de aceptación: El valor promedio obtenido de la concentración recuperada, deberá cumplir con un valor $\leq 15.0\%$ para la precisión (CV) y exactitud (DEA), respecto a la concentración al tiempo cero.

3.9.8 Tolerancia

La tolerancia del método, se determinó preparando muestras control a las concentraciones de (0.300, 5.000 y 8.000 $\mu\text{g/mL}$), las cuales se procesaron y analizaron por triplicado, modificando la proporción de fase móvil:

Condición inicial: Solución amortiguadora de fosfatos pH 2.5: Acetonitrilo (57:43 v/v)

Condición final: Solución amortiguadora de fosfatos pH 2.5: Acetonitrilo (55:45 v/v).

Criterio de aceptación: El valor promedio obtenido de la concentración recuperada, deberá cumplir con un valor \leq al 15.0% para la precisión (CV) y exactitud (DEA), respecto a la concentración de la condición inicial.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 LINEALIDAD DEL MÉTODO

En la Tabla 8 se muestran los resultados para la linealidad del método analítico, en los que se aprecia que el método analítico es lineal en el rango de concentraciones de 0.103 a 10.332 $\mu\text{g/mL}$, ya que presenta un r (coeficiente de correlación) mayor de 0.99. Los valores de concentración se ajustaron a una ecuación lineal (con una ponderación $1/x^2$). Además se cumple con una desviación $\leq 15.0\%$ para todas las concentraciones de la curva y una desviación $\leq 20.0\%$ para el límite de cuantificación. En la Figura 2 se muestra la linealidad del método.

Tabla 8. Linealidad promedio del método para cuantificar Valsartán en plasma

LINEALIDAD PROMEDIO DEL MÉTODO			
Concentración Nominal de Valsartán ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración Calculada de Valsartán ($\mu\text{g/mL}$)	Área	DEA (%)
0.103	0.104	6652	1.0
0.207	0.203	13906	2.1
1.033	1.017	73864	1.6
3.100	3.115	228398	0.5
6.199	6.203	455819	0.1
7.232	7.321	538160	1.2
10.332	10.407	765364	0.7
Pendiente	73642.6085		
Intercepto	-1004.1013		
r	1.0000		

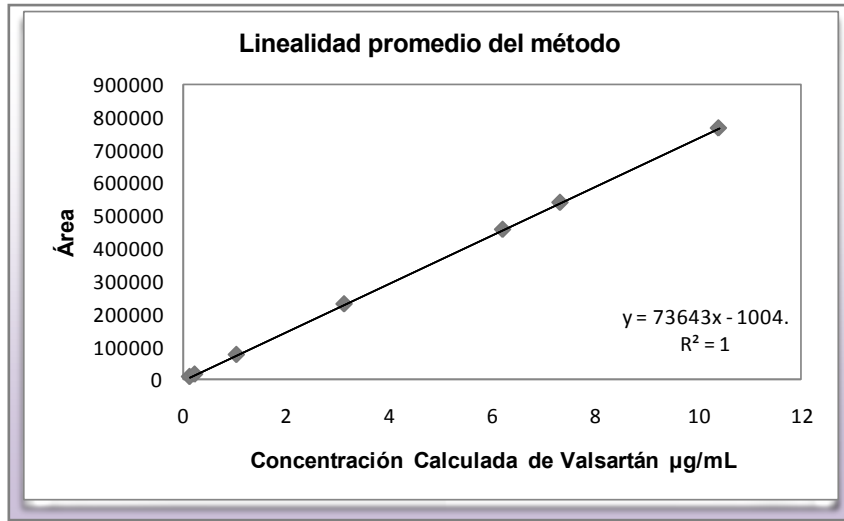


Figura 2. Curva promedio de la linealidad del método

4.2 PRECISIÓN Y EXACTITUD

La precisión del método se determinó por medio de:

Repetibilidad (precisión intradía)

En los resultados para la repetibilidad que se muestran en la Tabla 9 se puede observar que el método es repetible y exacto, ya que la precisión (CV) y la exactitud (DEA) son menores del 15.0%, en cada nivel evaluado.

Tabla 9. Repetibilidad y exactitud del método analítico para la cuantificación de Valsartán en plasma

Concentración adicionada µg/mL	Control bajo	Control Medio	Control Alto
	0.310	5.166	8.266
Réplica	Concentración recuperada µg/mL		
1	0.297	5.315	8.426
2	0.292	5.326	8.629
3	0.299	5.369	8.381
4	0.299	5.376	8.378
5	0.299	5.367	8.382
Promedio	0.297	5.351	8.439
DE	0.0	0.0	0.1
CV (%)	1.0	0.5	1.3
DEA (%)	4.1	3.6	2.1

Réplica

1
2
3
4
5

Promedio
DE
CV (%)
DEA (%)

Concentración adicionada µg/mL

Réplica

1
2
3
4
5

Promedio
DE
CV (%)
DEA (%)

Reproducibilidad (precisión interdía)

En las Tablas 10,11 y 12 se muestran los resultados de la reproducibilidad para el analista 1, 2 y 3; mientras que en la tabla 13 se muestra la reproducibilidad entre analistas. El método es preciso y exacto para cada analista, y también entre ellos, ya que los valores de CV y la DEA son menores al 15.0%.

Tiempo	Control bajo	Control Medio	Control Alto
	0.308	5.170	8.303
5n	0.264	4.954	8.002
/mL)	0.280	4.983	8.071
	0.282	5.020	8.041
	0.275	4.986	8.038
	0.0	0.0	0.0
	3.6	0.7	0.4
	10.7	3.6	3.2

Tabla 10. Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de Valsartán en plasma (analista 1)

Día	Concentración recuperada		
	Control bajo (0.310 µg/mL)	Control Medio (5.166 µg/mL)	Control Alto (8.266 µg/mL)
1	0.303	5.144	8.298
	0.319	5.167	8.295
	0.303	5.200	8.315
2	0.297	5.315	8.426
	0.292	5.326	8.629
	0.299	5.369	8.381
3	0.313	5.180	8.383
	0.310	5.195	8.303
	0.309	5.201	8.169
Promedio	0.305	5.233	8.355
DE	0.0	0.1	0.1
CV (%)	2.8	1.5	1.5
DEA (%)	1.6	1.3	1.1

Día	Número de Réplica	Control 0.310 (µg/mL)
1	1	0.303
	2	0.319
	3	0.303
2	1	0.297
	2	0.292
	3	0.299
3	1	0.313
	2	0.310
	3	0.309
Promedio		0.305
DE		0.0
CV (%)		2.8
DEA (%)		1.6

Tabla 11. Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de Valsartán en plasma (analista 2)

Día	Concentración recuperada		
	Control bajo (0.310 µg/mL)	Control Medio (5.166 µg/mL)	Control Alto (8.266 µg/mL)
1	0.295	5.276	8.501
	0.289	5.367	8.740
	0.309	5.416	8.478
2	0.319	5.238	8.496
	0.339	5.268	8.168
	0.327	5.249	8.481
3	0.306	5.182	8.496
	0.315	5.199	8.422
	0.303	5.280	8.444
Promedio	0.311	5.275	8.470
DE	0.0	0.1	0.1
CV (%)	5.0	1.4	1.7
DEA (%)	0.4	2.1	2.5

Día	Número de Réplica	Control 0.310 (µg/mL)
1	1	0.295
	2	0.289
	3	0.309
2	1	0.319
	2	0.339
	3	0.327
3	1	0.306
	2	0.315
	3	0.303
Promedio		0.311
DE		0.0
CV (%)		5.0
DEA (%)		0.4

Día	Número de Réplica	Control Medio (5.166 µg/mL)
1	1	5.276
	2	5.367
	3	5.416
2	1	5.238
	2	5.268
	3	5.249
3	1	5.182
	2	5.199
	3	5.280
Promedio		5.275
DE		0.1
CV (%)		1.4
DEA (%)		2.1

Día	Número de Réplica	Control Alto (8.266 µg/mL)
1	1	8.501
	2	8.740
	3	8.478
2	1	8.496
	2	8.168
	3	8.481
3	1	8.496
	2	8.422
	3	8.444
Promedio		8.470
DE		0.1
CV (%)		1.7
DEA (%)		2.5

Tabla 12. Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de Valsartán en plasma (analista 3)

Día	Concentración recuperada		
	Control bajo (0.310 µg/mL)	Control Medio (5.166 µg/mL)	Control Alto (8.266 µg/mL)
1	0.320	5.386	9.154
	0.327	5.239	8.732
	0.304	5.383	8.504
2	0.331	5.507	8.334
	0.336	5.221	8.372
	0.356	5.391	8.545
3	0.313	5.626	8.299
	0.307	5.334	8.482
	0.317	5.280	8.964
Promedio	0.323	5.374	8.598
DE	0.0	0.1	0.3
CV (%)	5.0	2.4	3.4
DEA (%)	4.3	4.0	4.0

Tabla 13. Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de Valsartán en plasma (Entre analistas)

Analista	Concentración recuperada		
	Control bajo (0.310 µg/mL)	Control Medio (5.166 µg/mL)	Control Alto (8.266 µg/mL)
1	0.303	5.144	8.298
	0.319	5.167	8.295
	0.303	5.200	8.315
	0.297	5.315	8.426
	0.292	5.326	8.629
	0.299	5.369	8.381
	0.313	5.180	8.383
	0.310	5.195	8.303
2	0.309	5.201	8.169
	0.295	5.276	8.501
	0.289	5.367	8.740
	0.309	5.416	8.478
	0.319	5.238	8.496
	0.339	5.268	8.168
	0.327	5.249	8.481
	0.306	5.182	8.496
3	0.315	5.199	8.422
	0.303	5.280	8.444
	0.320	5.386	9.154
	0.327	5.239	8.732
	0.304	5.383	8.504
	0.331	5.507	8.334
	0.336	5.221	8.372
	0.356	5.391	8.545
Promedio	0.313	5.294	8.474
	0.313	5.294	8.474
	0.313	5.294	8.474
	0.313	5.294	8.474
DE	0.0	0.1	0.2
CV (%)	4.9	2.1	2.6
DEA (%)	1.1	2.5	2.5

4.3 SELECTIVIDAD

En la Figura 3 se muestra un cromatograma tipo para evaluar la selectividad a cada inicio de la corrida analítica, en la Figura 4 se muestran los resultados de la selectividad del método, analizando muestras blanco de la matriz biológica, blanco de reactivos, muestras de plasma conteniendo fármacos de uso común, anticoagulantes y condiciones de lipemia y hemólisis. En ambas figuras se puede observar que no existen interferencias en el tiempo de retención de Valsartán, por lo que el método es selectivo a estas condiciones.

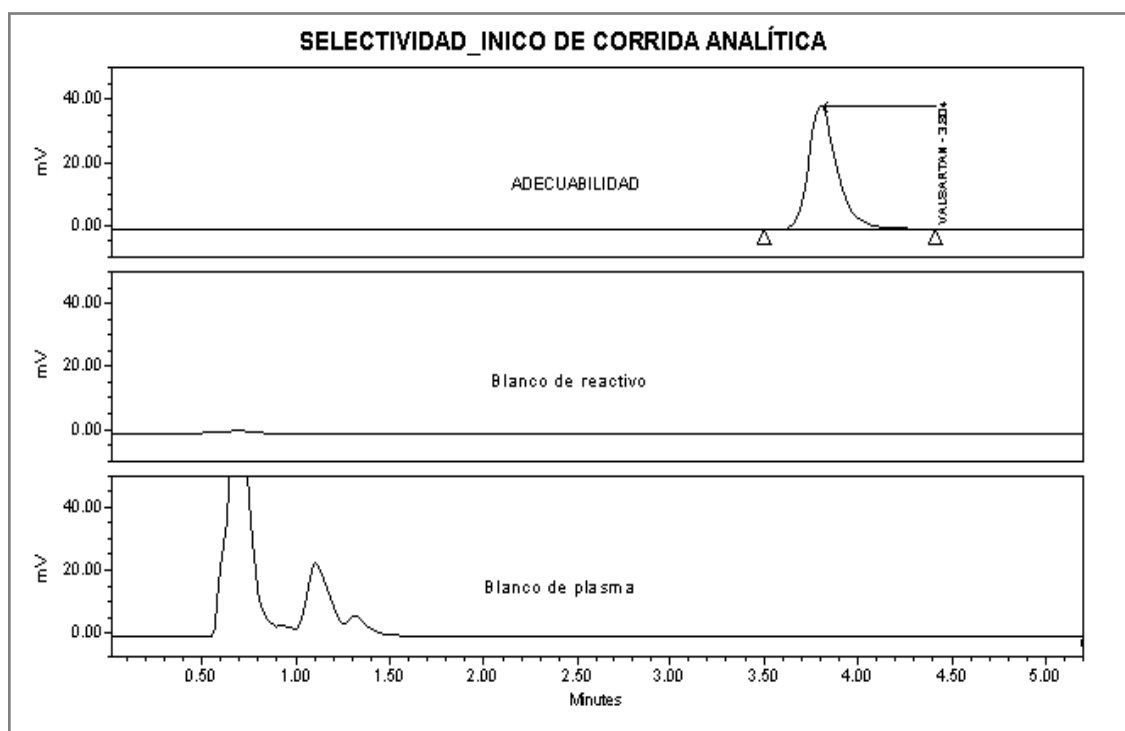


Figura 3. Selectividad del método analítico

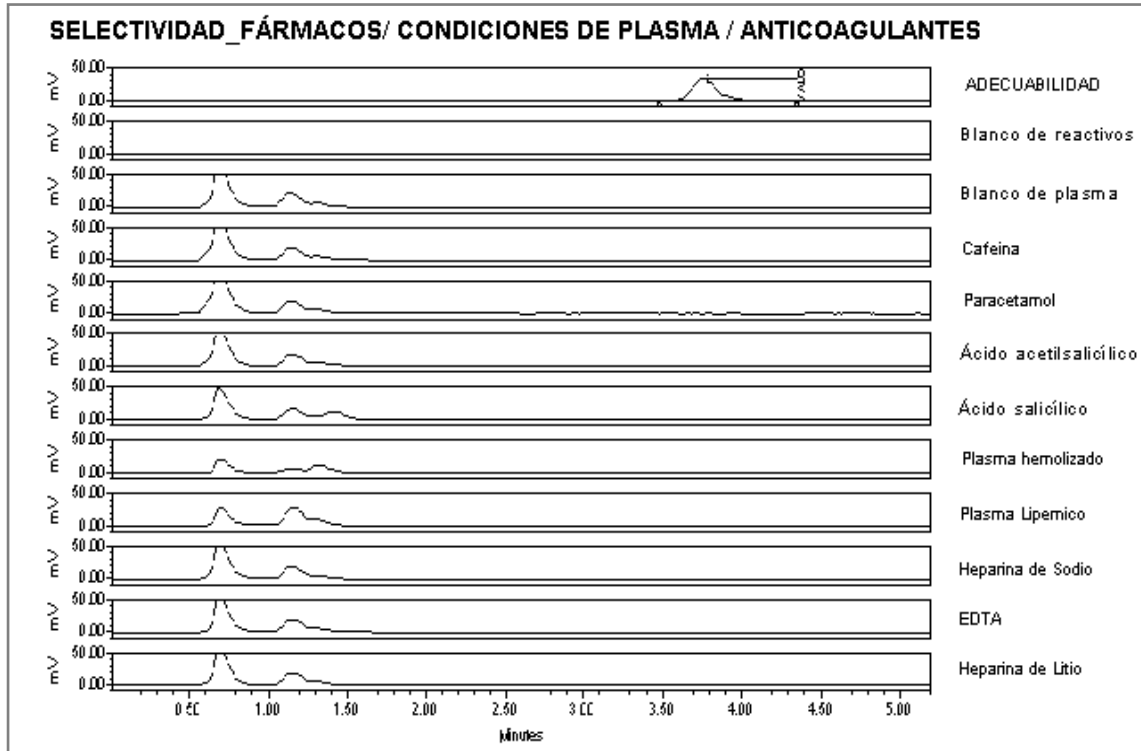


Figura 4. Selectividad del método analítico

4.4 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

En la Tabla 14 se muestran los resultados correspondientes al límite de cuantificación. El valor obtenido para Valsartán fue de 0.103 $\mu\text{g/mL}$, ya que presento valores de CV y DEA menores al 20.0%.

Tabla 14. Límite de cuantificación

Replica	Límite de Cuantificación
	Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)
1	0.105
2	0.113
3	0.105
4	0.105
5	0.101
Promedio	0.106
DE	0.0
CV (%)	4.1
Concentración adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	0.103
DEA (%)	2.7

4.5 LÍMITE DE DETECCIÓN

En la Tabla 15, se presentan los resultados para el límite de detección, cuyo valor fue de $0.052 \mu\text{g/mL}$ ya que se obtuvo una relación señal ruido mayor a 3 respecto a esta concentración. Así mismo se presenta en la Figura 5 el límite de detección y límite de cuantificación.

Tabla 15. Límite de Detección

Concentración adicionada ($\mu\text{g/mL}$)	Replica	Relación Señal/Ruido
0.052	1	4.0
	2	4.3
	3	3.1
	4	4.8
	5	4.1
	Promedio	4.1
	DE	0.6
	CV (%)	15.1

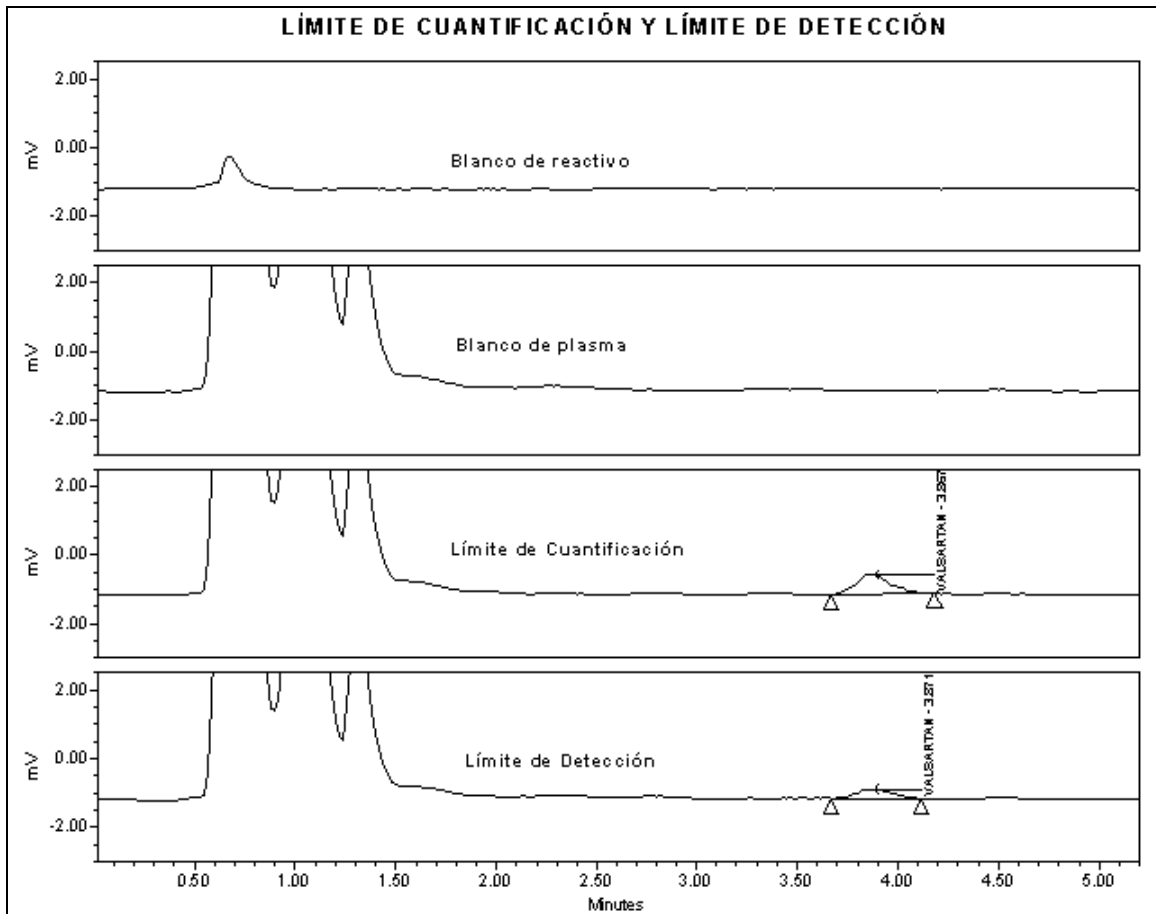


Figura 5. Límite de Cuantificación y Límite de Detección

4.6 RECOBRO

En la Tabla 16 se muestran los resultados para el recobro, que presento un valor global del 88.2%, con una exactitud (DEA) menor al 15.0% para cada nivel evaluado, así como un valor menor al 15.0% para el CV del valor global.

Tabla 16. Recobro del método analítico para cuantificar Valsartán en plasma

Número de Réplica	Control Bajo 0.310 (µg/mL)		Control Medio 5.166 (µg/mL)		Control Alto 8.266 (µg/mL)	
	Área Procesada	Área Sistema	Área Procesada	Área Sistema	Área Procesada	Área Sistema
1	21440	24649	388774	438819	616545	686393
2	21044	24593	389640	435092	631437	689824
3	21560	25693	392748	435146	613301	688981
4	21557	24866	393286	438596	613066	697858
5	21556	25196	392601	438351	613345	690859
Promedio	21431	24999	391410	437201	617539	690783
Recobro (%)	85.7		89.5		89.4	
DEA (%)	2.8		1.5		1.3	
Recobro Global (%)				88.2		
CV Recobro Global (%)				2.4		

4.7 ESTABILIDAD

En las Tablas 17-21 se presentan los resultados obtenidos para determinar la estabilidad del método a las siguientes condiciones:

- Temperatura ambiente de la muestra no procesada
- Temperatura en refrigeración de la muestra no procesada
- Ciclos de congelación – descongelación
- Estabilidad de la muestra procesada en el automuestreador a 10°C.
- Estabilidad de la muestra en congelación a temperatura inferior a -60°C

- **Temperatura ambiente de la muestra no procesada**, los resultados que se presentan en la Tabla 17 indican que Valsartán es estable en la muestra no procesada almacenada a temperatura ambiente, al menos por 24 h, ya que la concentración recuperada, respecto al tiempo cero presenta una DEA y un CV menor al 15.0%.

Tabla 17. Estabilidad de la muestra no procesada a temperatura ambiente, 24 h

Concentración en Tiempo Cero (t0) (µg/mL)	Control bajo	Control Medio	Control Alto
	0.308	5.170	8.303
Concentración recuperada (µg/mL) 24 h	0.264	4.954	8.002
	0.280	4.983	8.071
	0.282	5.020	8.041
Promedio	0.275	4.986	8.038
DE	0.0	0.0	0.0
CV (%)	3.6	0.7	0.4
DEA (%)	10.6	3.6	3.2

- **Temperatura en refrigeración de la muestra no procesada**, los resultados que se presentan en la Tabla 18 indican que Valsartán es estable en la muestra no procesada almacenada a temperatura de refrigeración, por al menos 24 h, ya que la concentración recuperada, respecto al tiempo cero presenta una DEA y un CV menor al 15.0%.

Tabla 18. Estabilidad de la muestra no procesada a temperatura de refrigeración, 24 h

Concentración en Tiempo	Control bajo	Control Medio	Control Alto
Cero (t0) (µg/mL)	0.308	5.170	8.303
Concentración recuperada (µg/mL) 24 h	0.280	5.166	8.079
	0.285	5.072	8.216
	0.296	5.101	8.200
Promedio	0.287	5.113	8.165
DE	0.0	0.0	0.1
CV (%)	2.9	0.9	0.9
DEA (%)	6.8	1.1	1.7

- **Ciclos de congelación – descongelación**, los resultados que se presentan en la Tabla 19 indican que Valsartán es estable en la muestra no procesada al menos a tres ciclos de congelación - descongelación, ya que la concentración recuperada, respecto al tiempo cero presenta una DEA y un CV menor al 15.0%, en los tres ciclos.

Tabla 19. Estabilidad de la muestra a Ciclos de congelación- descongelación

Concentración en Tiempo Cero (t0) (µg/mL)	Control Bajo 0.308	Control Medio 5.170	Control Alto 8.303
1 er Ciclo Concentración (µg/mL)	0.301	5.111	8.163
	0.295	5.129	8.162
	0.291	5.067	8.199
Promedio	0.296	5.102	8.175
DE	0.0	0.0	0.0
CV (%)	1.7	0.6	0.3
DEA (%)	4.1	1.3	1.5
2° Ciclo Concentración (µg/mL)	0.287	4.850	8.181
	0.289	5.047	8.162
	0.295	5.075	8.066
Promedio	0.290	4.991	8.136
DE	0.0	0.1	0.1
CV (%)	1.4	2.5	0.8
DEA (%)	5.8	3.5	2.0
3 er Ciclo Concentración (µg/mL)	0.293	4.977	8.013
	0.289	4.800	8.129
	0.301	5.044	8.028
Promedio	0.294	4.940	8.057
DE	0.0	0.1	0.1
CV (%)	2.1	2.6	0.8
DEA (%)	4.5	4.4	3.0

- **Estabilidad de la muestra procesada en el automuestreador a 10°C**, los resultados que se presentan en la Tabla 20 indican que Valsartán es estable en la muestra procesada almacenada en el automuestreador a 10°C al menos por 25.3 h, ya que la concentración recuperada, respecto al tiempo cero presenta una DEA y un CV menor al 15.0%.

Tabla 20. Estabilidad de la procesada en automuestreador a 10°C

Concentración en Tiempo Cero (t0) (µg/mL)	Control bajo	Control Medio	Control Alto
	0.308	5.170	8.303
Concentración recuperada (µg/mL) a 25.3 h a 10°C	0.324	5.098	7.826
	0.307	5.452	8.292
	0.304	5.044	8.375
Promedio	0.312	5.198	8.164
DE	0.0	0.2	0.3
CV (%)	3.5	4.3	3.6
DEA (%)	1.1	0.5	1.7

- Estabilidad de la muestra almacenada en congelación, a temperatura inferior a -60°C** los resultados que se presentan en la Tabla 21 muestran que Valsartán es estable en la muestra almacenada en congelación a una temperatura menor a -60° C al menos por 106 días, ya que la concentración recuperada respecto al tiempo cero presenta una DEA y un CV menor al 15.0%.

Tabla 21. Estabilidad en congelación

Concentración en Tiempo Cero (t0) (µg/mL)	Control bajo	Control Medio	Control Alto
	0.308	5.170	8.303
Concentración recuperada (µg/mL) a 106 días	0.306	5.693	9.334
	0.303	5.890	9.295
	0.306	5.887	*
Promedio	0.305	5.823	9.315
DE	0.0	0.1	0.0
CV (%)	0.6	1.9	0.3
DEA (%)	1.1	12.6	12.2

*Dato con DEA > 15.0%, no se considera en cálculos

4.8 TOLERANCIA

En la Tabla 22 se muestran los resultados obtenidos para la evaluación de la tolerancia a la proporción de la fase móvil, el método es tolerante a este cambio, ya que los resultados respecto a la condición inicial, muestran un valor menor al 15.0% para el CV y la DEA.

Tabla 22. Tolerancia a la proporción de fase móvil

CONDICIÓN INICIAL			
Proporción de fase móvil Fosfatos:ACN (57:43) v/v			
Concentración (µg/mL)	Control Bajo 0.294	Control Medio 5.257	Control Alto 8.287
CONDICIÓN FINAL			
Proporción de fase móvil Fosfatos:ACN (55:45) v/v			
	Control Bajo	Control Medio	Control Alto
Concentración recuperada (µg/mL)	0.302	5.115	8.190
	0.308	5.184	8.066
	0.301	5.237	8.146
Promedio	0.304	5.179	8.134
DE	0.0	0.1	0.1
CV (%)	1.2	1.2	0.8
DEA (%)	3.2	1.5	1.8

5. CONCLUSIONES

- La validación del método analítico correspondiente a este trabajo, cumple con los criterios establecidos en la NOM-177.
- Por los resultados presentados en este trabajo, se puede concluir que el método es adecuado para su implementación en estudios de Biodisponibilidad/Bioequivalencia.
- Con las condiciones planteadas en el presente trabajo, se logró la validación de un método analítico sensible, sencillo, práctico y rápido para la cuantificación de Valsartán en plasma humano.

6. BIBLIOGRAFÍA

- 6.1 Joel G. Hardman, Lee E. Limbird; Goodman and Gilman's The Pharmacological basis of Therapeutics; Tenth Edition, Editorial Mc Graw- Hill. (809-817,829-833, 2019) (1)
- 6.2 Antoni Bayés de Luna; José López Sendón Cardiología Clínica; Masson Doyma; México; (274-276) (2)
- 6.3 Douglas Scott Johnson; Jie Jack Li; The art of drug synthesis; Wiley Interscience; 2007;(129-134) (3)
- 6.4 Thomson PLM; Diccionario de especialidades farmacéuticas, Edición 53; Tomo I; México 2007; (1356-1359) (4)
- 6.5 Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas; Volumen 42, Número 2, abr- jun 2011; México D.F; (20-23) (5)
- 6.6 Douglas A. Skoog; F. James Holler; Stanley R. Croch; Principios de análisis instrumental; Sexta edición; Cengage Learning Editores; México 2008 (399-408) (6)
- 6.7 Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER); 2001 (4-6) (7)
- 6.8 Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable (8)
- 6.9 Lorenzo Velázquez; Farmacología Básica y Clínica; Edición 18; Editorial Medica Panamericana; 2008; (390-402)(9)
- 6.10 Guía de Validación de Métodos analíticos; Editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A.C; Edición 2002. (10)
- 6.11 Anthony C. Moffat; M. David Osselton; Brian Widdop; Clarke's Analysis of Drugs and Poisons; Third edition; Published by the Pharmaceutical Press; 2004; Volume I y 2; (313-317, 320-321, 500-506, 59-512, 1692-1693) (11)
- 6.12 <http://drugbank.ca/drugs/DB00177> (12)

- 6.13** Flores F.J., Castañeda G.2002. Biodisponibilidad y Bioequivalencia en los medicamentos genéricos. México, pp8, (39-51) **(13)**
- 6.14** Gordon Amidon; Lawrence Lesko; Kamal Midha; Vinod Shah; John Hilfinger; International Bioequivalence Standars: A new era; TSRL Press, Ann Arbor; 2006; (201). **(14)**
- 6.15** Shein –Chung Chow; Jen-Pei Liu; Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies; Third edition; Chapman and Hall/ CRC Biostatistics Series; CRC press. (3-10). **(15)**
- 6.16** Yuri Kazakevich; Rosario Lobrutto; HPLC for Pharmaceutical Scientists; Wiley Interscience, Jhon Wiley and suns, inc., publication copyright 2007. (3-6,11-14).**(16)**
- 6.17** Norma Oficial Mexicana NOM-030-SSA2-1999, Para la prevención, tratamiento y control de la hipertensión arterial. **(17)**
- 6.18** Maryadele J. O' Neil; The Merck Index an enciclopedia of Chemicals, Drugs, and biological; fourteenth edition; Published by Merck Research Laboratories Division of Merck and CO., Inc.Whitehouse Station, NJ, USA 2006 (1705). **(18)**
- 6.19** Estudio comparativo, cruzado, doble ciego, al azar para determinar la bioequivalencia entre dos formulaciones de valsartán en tabletas y cápsulas;Volumen 37, Número 2; 2006; Colombia Médica. **(19)**

ABREVIATURAS

- **C_{máx}**: Concentración plasmática máxima.
- **T_{máx}**: Tiempo en alcanzar la concentración plasmática máxima
- **ABC**: Área bajo la curva.
- **DEA**: Desviación estándar absoluta.
- **CV**: Coeficiente de variación.
- **t_{1/2}**: tiempo de vida media