



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

## FACULTAD DE QUÍMICA

Desarrollo y validación de un método bioanalítico para  
cuantificar un fármaco de moderada permeabilidad en  
estudios *in vitro*

### TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

**MARIANA YAMILET GUERRA MONTIEL**



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

ABRIL DEL 2018



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: **Blanca Estela Rivero Cruz**  
Vocal: **Pedo Salvador Valadez Eslava**  
Secretario: **Natividad García Escamilla**  
1er. Suplente: **Irma José Núñez**  
2° suplente: **José Mojica Reyes**

## **Sitio donde se desarrolló el proyecto:**

Laboratorio 113 Edificio E  
Facultad de química UNAM

## **Asesor**

---

Dra. Blanca Estela Rivero Cruz

## **Sustentante**

---

Mariana Yamilet Guerra Montiel



# ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	V
LISTA DE TABLAS .....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
<b>1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Ranitidina.....</b>	<b>7</b>
<b>3. METODOLOGÍA .....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Método bioanalítico.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1.1 Diseño experimental para el desarrollo del método cromatográfico .....</b>	<b>10</b>
<b>3.2 Evaluación del sistema .....</b>	<b>12</b>
<b>3.2.1 Adecuabilidad.....</b>	<b>12</b>
<b>3.2.2 Linealidad .....</b>	<b>12</b>
<b>3.2.3 Precisión.....</b>	<b>13</b>
<b>3.3 Validación del método bioanalítico.....</b>	<b>14</b>
<b>3.3.1 Solución salina balanceada de Hank .....</b>	<b>14</b>
<b>3.3.2 Linealidad.....</b>	<b>14</b>
<b>3.3.3 Exactitud, precisión y recobro.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3.4 Límite de cuantificación .....</b>	<b>16</b>
<b>3.3.5 Estabilidad de la muestra.....</b>	<b>16</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>18</b>
<b>4. 1 Desarrollo del método bioanalítico.....</b>	<b>18</b>
<b>4.2 Evaluación del sistema .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2.1 Adecuabilidad del sistema.....</b>	<b>28</b>
<b>4.2.2 Precisión del sistema .....</b>	<b>29</b>
<b>4.2.3 Linealidad del sistema .....</b>	<b>30</b>
<b>4.3 Validación del método.....</b>	<b>32</b>
<b>4. 3.1 Linealidad del método.....</b>	<b>32</b>
<b>4.3.2 Precisión y exactitud.....</b>	<b>34</b>

<b>4.3.3 Recobro</b> .....	37
<b>4.3.4 Límite de cuantificación</b> .....	38
<b>4.3.5 Estabilidad de la muestra</b> .....	39
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	40
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	41

## LISTA DE FIGURAS

Número	Nombre	Página
<b>Figura 2.1</b>	Estructura química de la ranitidina.	7
<b>Figura 4.1</b>	Espectro de absorción en el UV del clorhidrato de ranitidina en fase móvil.	18
<b>Figura 4.2</b>	Espectro de absorción en el UV del clorhidrato de ranitidina en HBSS.	19
<b>Figura 4.3</b>	Gráfica de efectos principales.	22
<b>Figura 4.4</b>	Gráfica de interacciones entre los factores del diseño experimental.	22
<b>Figura 4.5</b>	Diagrama de Pareto de los efectos evaluados.	23
<b>Figura 4.6</b>	Cubo de superficie de la respuesta estimada fijando la proporción de agua en la fase móvil (factor C) al 60%.	24
<b>Figura 4.7</b>	Gráfica de contorno de la superficie de respuesta estimada fijando la proporción de agua en la fase móvil (factor C) al 60%.	24
<b>Figura 4.8</b>	Gráfica de contorno de la superficie de respuesta estimada fijando el pH (factor A) a 2.92.	25
<b>Figura 4.9</b>	Gráfica de contorno de la superficie de respuesta estimada fijando el flujo (factor B) a 0.8 mL/min.	25
<b>Figura 4.10</b>	Cromatograma obtenido con una solución de clorhidrato de ranitidina, en fase móvil, a una concentración de 100 $\mu$ M.	27
<b>Figura 4.11</b>	Cromatograma obtenido de una solución de clorhidrato de ranitidina, en HBSS, a una concentración de 100 $\mu$ M.	27
<b>Figura 4.12</b>	Linealidad del sistema.	30
<b>Figura 4.13</b>	Linealidad del método.	33

## LISTA DE TABLAS

Número	Nombre	Página
<b>Tabla 1.1</b>	Clasificación de los fármacos de acuerdo con el SCB.	2
<b>Tabla 1.2</b>	Fármacos modelo sugeridos por la FDA para establecer la adecuabilidad de un método de permeabilidad; también se identifican los marcadores de permeabilidad cero y los sustratos de eflujo.	5
<b>Tabla 3.1</b>	Factores evaluados en el diseño experimental.	11
<b>Tabla 3.2</b>	Diseño experimental 2 <sup>3</sup> .	11
<b>Tabla 3.3</b>	Diluciones realizadas para preparar la curva de calibración para la linealidad del sistema.	13
<b>Tabla 3.4</b>	Diluciones realizadas para preparar los puntos control utilizados para evaluar la precisión del sistema.	13
<b>Tabla 3.5</b>	Diluciones realizadas para preparar las curvas de calibración para evaluar la linealidad del método.	15
<b>Tabla 3.6</b>	Diluciones realizadas para preparar los puntos control en la validación del método.	15
<b>Tabla 4.1</b>	Aleatorización del diseño factorial.	20
<b>Tabla 4.2</b>	Análisis de varianza para el modelo.	21
<b>Tabla 4.3</b>	Condiciones cromatográficas óptimas para cuantificar clorhidrato de ranitidina.	26
<b>Tabla 4.4</b>	Resultados de la adecuabilidad del sistema.	28
<b>Tabla 4.5</b>	Precisión del sistema.	29
<b>Tabla 4.6</b>	Coeficientes e intervalos de confianza del intercepto y la pendiente del modelo lineal.	31
<b>Tabla 4.7</b>	Análisis de varianza del modelo para evaluar la linealidad del sistema.	31
<b>Tabla 4.8</b>	Coeficientes e intervalos de confianza para el intercepto y la pendiente del modelo lineal.	33
<b>Tabla 4.9</b>	Análisis de varianza del modelo de linealidad del método.	34
<b>Tabla 4.10</b>	Resultados obtenidos para evaluar la repetibilidad y exactitud del método.	35



<b>Tabla 4.11</b>	Resultados obtenidos para evaluar la precisión intermedia del método.	36
<b>Tabla 4.12</b>	Resultados obtenidos para evaluar el recobro del método.	37
<b>Tabla 4.13</b>	Precisión y exactitud para el límite de cuantificación.	38
<b>Tabla 4.14</b>	Resultados de estabilidad.	39

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	NOMBRE
SCB	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos
IVIVC	Correlaciones <i>in vivo-in vitro</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
EC	Celulas Enterocromafines
GERD	Reflujo Gastroesofágico
SNC	Sistema Nervioso Central
CYP	Citocromo P450
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
mL	Mililitro
IS	Estándar Interno
ES	Sustratos de eflujo
UV	Ultravioleta
VIS	Visible
ICH	Conferencia Internacional de Armonización
LLOQ	Límite inferior de cuantificación
IC	Intervalo de Confianza
r	Coefficiente de correlación
r <sup>2</sup>	Coefficiente de determinación
CV	Coefficiente de Variación
QC	Puntos Control
h	Hora
g	Gramo
mg	Miligramo
°C	Grado Celsius
Log P	Coefficiente de Reparto
L	Litro
µL	Microlitro
kg	Kilogramo
pKa	Constante de Disociación Ácida
pH	Potencial de Hidrógeno
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
µm	Micrómetro

## CONTINUACIÓN. LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	NOMBRE
MeOH	Metanol
ACN	Acetonitrilo
H <sub>2</sub> O	Agua
min	Minuto
μM	Micromolar
HCl	Ácido clorhídrico
NaOH	Hidróxido de sodio
M	Molar
USP	Farmacopea de los Estados Unidos de América
TEA	Trietilamina
k'	Factor de capacidad
R	Resolución
T	Factor de coeio
N	Número de platos teóricos
β <sub>1</sub>	Pendiente
β <sub>0</sub>	Ordenada al origen
H <sub>0</sub>	Hipótesis nula
H <sub>1</sub>	Hipótesis alternativa
n	Número de observaciones
α	Nivel de significancia
NOM	Norma Oficial Mexicana
DE	Desviación estándar
X	Promedio
FM	Fase Móvil
HBSS	Solución salina balanceada de Hank
HEPES	Acido 4 - ( 2 – hidroxietil – 1 – piperazinaetanosulfónico)
VN	Valor Nominal
fa	Fracción absorbida

### 1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Actualmente, se estima que el 80% de la población mundial utiliza medicamentos derivados (directa o indirectamente) de plantas medicinales para la atención primaria de la salud. Medicina herbolaria, fitoterapia, fitomedicina, nutracéuticos, productos naturales medicinales, medicina complementaria y alternativa, etnomedicina, botánicos, suplementos dietéticos y fitofarmacéuticos son términos que se emplean, de manera indistinta, para denotar el uso de plantas medicinales en el cuidado de la salud.

En los países desarrollados existe un marcado interés por los organismos regulatorios para incluir formulaciones de medicina tradicional en sus programas de salud. La seguridad, la eficacia y la calidad de estos insumos dependen de factores como la formulación que afectan la biodisponibilidad del fármaco y el proceso de manufactura [1].

Agencias regulatorias como la FDA (Food and Drug Administration), la OMS (Organización Mundial de la Salud) y la EMA (European Medicines Agency) han adoptado el sistema de clasificación biofarmacéutica (SCB) como estándar para establecer la biodisponibilidad/bioequivalencia de formas farmacéuticas sólidas sujetas a un proceso de aprobación [3-5].

En 1995, Amidon y colaboradores publicaron los fundamentos para establecer la clasificación biofarmacéutica de fármacos con base en su solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal [2]. Este documento sustenta las bases científicas de lo que actualmente se conoce como el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB, **Tabla 1.1**).

**Tabla 1.1** Clasificación de los fármacos de acuerdo con el SCB.

CLASE	SOLUBILIDAD	PERMEABILIDAD
I	Alta	Alta
II	Baja	Alta
III	Alta	Baja
IV	Baja	Baja

El SCB contempla tres factores principales que presiden la velocidad y el grado de absorción del fármaco a partir de las formas farmacéuticas sólidas orales de liberación inmediata: la disolución, la solubilidad y la permeabilidad. Los límites para cada caso se encuentran documentados en las Guías emitidas por la FDA y en el Anexo 7, del informe 40, de la OMS [2, 3]. A continuación, se mencionan algunos aspectos relevantes:

- **Disolución:** Se considera que un fármaco es de rápida disolución cuando el 85 % o más de la cantidad etiquetada en el marbete se disuelve en 15 minutos.
- **Solubilidad:** un fármaco se considera de alta solubilidad cuando su dosis mayor es soluble en 250 mL o menos de medio acuoso en el rango de pH de 1.2-6.8.
- **Permeabilidad:** un fármaco se considera altamente permeable cuando la cantidad absorbida en humanos es 85 % o más de la dosis administrada.

La FDA sugiere las siguientes técnicas para determinar la permeabilidad de fármacos en el tracto gastrointestinal:

- Estudios de perfusión intestinal *in vivo* en humanos.
- Estudios de perfusión intestinal *in vivo* o *in situ* usando modelos animales adecuados.
- Estudios de permeación *in vitro* usando tejidos intestinales humanos o animales extirpados.
- Estudios de permeación *in vitro* a través de una monocapa de células epiteliales cultivadas.

Entre las técnicas descritas para evaluar la permeabilidad intestinal, la línea celular Caco-2, representa el modelo de barrera intestinal más empleado y mejor caracterizado para predecir la absorción de fármacos, debido a que los estudios de biodisponibilidad absoluta o de perfusión intestinal en humanos son costosos y difíciles de realizar [7]. Las células Caco-2 derivan del carcinoma del colon humano y durante su cultivo, van adquiriendo y/o expresando algunas características de las células intestinales como son las microvellosidades; los transportadores de proteínas; las proteínas de eflujo; la fase II de los sistemas enzimáticos de conjugación y los sistemas de transformación metabólico de fármacos. En otras palabras, la permeabilidad de los fármacos a través de la monocapa de células Caco-2 correlaciona con la absorción de la membrana intestinal *in vivo* haciendo posible los estudios de relación estructura-absorción [7].

Por otro lado, solubilidad acuosa se puede estimar con softwares especializados como el ACD/Labs. A pesar, de que la estimación de este parámetro *in silico* es confiable se ha demostrado que su valor puede modificarse en un 10 % dependiendo del pH fisiológico. Si bien, la estimación de la permeabilidad puede realizarse a través del coeficiente de partición *n*-octanol-agua (log P) la validez de

este modelo solo puede demostrarse correlacionando los valores de log P, reportados en la literatura, con los valores de permeabilidad aparente de los fármacos/marcadores obtenidos en modelos experimentales (monocapa celular Caco-2). Entre las desventajas que presenta este tipo de estimación destaca que los valores son reportados por diferentes laboratorios empleando diferentes metodologías; además, la concentración de los productos utilizada en la monocapa celular Caco-2 oscila entre 10 a 150  $\mu\text{M}$ . En consecuencia, para lograr una estimación más apropiada los experimentos deben conducirse bajo las mismas condiciones experimentales y empleando la misma concentración de ensayo. Con base en lo antes expuesto, una estimación de la SCB basado en datos *in silico* únicamente permite establecer una clasificación provisional de fármacos [8, 9].

Para demostrar la adecuabilidad de un método enfocado a determinar el SCB de fármacos se requiere establecer una relación orden-categoría entre los valores de permeabilidad y el grado de absorción del fármaco en humanos. Para establecer esta relación, la FDA recomienda utilizar veinte fármacos modelo en métodos de cultivo de células epiteliales (**Tabla 1.2**) [4].

**Tabla 1.2** Fármacos modelo sugeridos por la FDA para establecer la adecuabilidad de un método de permeabilidad; también se identifican los marcadores de permeabilidad cero y los sustratos de eflujo.

Grupo	Fármacos	Grupo	Fármacos
Sustratos de eflujo	Digoxina Paclitaxel Quinidina Vinblastina	Alta permeabilidad ( $f_a \geq 85\%$ )	Antipirina Cafeína Ketoprofeno Naproxeno Teofilina Metopropol Carbamazepina Fenitoína Disopiramida Minoxidilo
Moderada permeabilidad ( $f_a = 50-84\%$ )	Clorfeniramina Creatinina Terbutalina Hidroclorotiazida Enalapril Furosemida Metformina Amilorida Atenolol Ranitidina	Baja permeabilidad ( $f_a < 50\%$ )	Famotidina Nadolol Sulpirida Lisinopril Aciclovir Foscarnet Manitol Clorotiazida Polietilenglicol 400 Enalaprilato
Cero permeabilidad	FITC-Dextran Polietilenglicol 4000 Lucifer yellow Inulina Lactosa		

Una vez demostrada la aptitud del método se puede emplear para clasificar fármacos, utilizando como patrones internos un fármaco modelo de alta, baja o moderada permeabilidad.



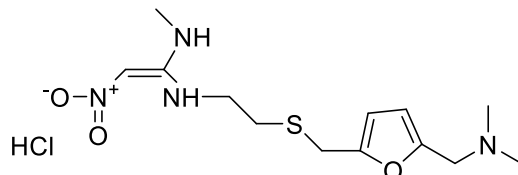
A pesar de que el SCB se ha utilizado con éxito en el ámbito de la medicina alópata su validez y aplicación, en la medicina herbolaria, ha recibido poca atención. Debido a que en numerosas regiones del mundo los insumos herbolarios no requieren de un estricto proceso de aprobación, los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia, para estos productos no se han realizado. Este vacío en el aspecto regulatorio ha propiciado inconsistencias en los procesos de manufactura y en la selección adecuada de los excipientes incluidos en las formulaciones de los productos herbolarios que se venden mundialmente. Aún más, la falta de aseguramiento de calidad ha ocasionado toxicidad, efectos adversos, interacciones planta-fármacos y falta de eficacia. Para establecer como las diferentes formulaciones afectan la biodisponibilidad de los fármacos de origen natural se necesita conocer la relación que guardan sus propiedades fisicoquímicas y farmacológicas con sus propiedades farmacocinéticas y el desempeño *in vitro* del producto farmacéutico [1].

Con base en estas consideraciones el presente proyecto tiene como objetivo primordial contribuir con el establecimiento de un método formal de clasificación biofarmacéutica para productos de origen natural.

Para ello, se pretende desarrollar y validar un método bioanalítico que permita la determinación de clorhidrato de ranitidina (uno de los 20 fármacos recomendados por la FDA para validar el modelo de permeabilidad) en una matriz biológica (HBSS) utilizando como técnica analítica la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un detector UV/Visible (HPLC-UV/VIS).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Ranitidina



**Figura 2.1** Estructura química de la ranitidina.

**Nombres químicos:** Clorhidrato de ranitidina

**Nombre IUPAC:** Clorhidrato de *N*-[2[[[-5-[(dimetilamino) metil]-2-furanil] metil] tio] etil]-*N*'-metil-2-nitro-1,1-etonodiamina.

**Formula molecular:** C<sub>13</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>S HCl.

**Peso molecular:** 350.87 g/mol.

**SCB:** Clase III (alta solubilidad, baja permeabilidad).

**Descripción.** Polvo cristalino blanco o amarillo claro. Es sensible a la luz y a la humedad. Presenta polimorfismo [10]. Es soluble en agua (0.0795 mg/mL), metanol y ácido clorhídrico diluido; poco soluble en etanol anhidro y muy poco soluble en cloruro de metilo. Tiene un punto de fusión de 133-134°C, un log P de 0.79 y un valor de pKa de 8.08 [11, 12].

**Historia.** A finales de la década de los setenta investigadores de la compañía Glaxo descubrieron que la ranitidina es un antagonista del receptor H<sub>2</sub> de histamina; es similar a la cimetidina pero en lugar de contener un anillo de imidazol tiene, en su estructura, un anillo furano. Este derivado amino-alkil-furano sustituido es un inhibidor de la secreción de ácido gástrico más potente que la cimetidina; carece, además, de los efectos inhibidores de la enzima microsomal hepática y

antiandrogénica de la cimetidina. La ranitidina fue comercializada, en 1981, con la denominación distintiva Zantac [13, 14].

**Indicaciones terapéuticas:** La ranitidina se utiliza para tratar el reflujo gastroesofágico (GERD) no complicado y para prevenir la ocurrencia de úlceras por estrés; una condición en la que el reflujo del ácido del estómago provoca pirosis (calor estomacal) y lesiones en el tubo alimenticio (esófago). También, se emplea en aquellas condiciones en las que el estómago produce demasiado ácido como en el síndrome de Zollinger-Ellison. La ranitidina se vende sin prescripción médica [15,16].

**Farmacocinética:** La ranitidina se absorbe rápidamente en el tubo digestivo y las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan en 1 a 3 horas después de su administración por vía oral. La absorción puede estimularse por alimento o disminuirse con antiácidos, pero probablemente estos efectos no tienen importancia clínica. Se obtienen con rapidez valores terapéuticos después de una administración intravenosa y se conservan durante 6 a 8 horas. La biodisponibilidad de la ranitidina, después de una administración oral, es de aproximadamente un 50 %. Por inyección intramuscular la concentración plasmática máxima se alcanza al cabo de 15 min. Se une débilmente a las proteínas plasmáticas (aproximadamente un 15 %). La vida media de eliminación es de 2-3 horas y aumenta en caso de insuficiencia renal. Una pequeña proporción de ranitidina es transformada en el hígado a N-óxido, S-óxido y desmetilranitidina; el N-óxido es el principal metabolito; pero solo representa un 4-6 % de la dosis. Aproximadamente, un 30 % de la dosis oral y un 70 % de una dosis intravenosa se excretan a través de los riñones por filtración y secreción tubular renal; es importante reducir la dosis en pacientes con disminución de la depuración de creatinina. La hemodiálisis y la diálisis peritoneal no depuran cantidades importantes de estos medicamentos; parte

del fármaco se excreta por las heces. La ranitidina atraviesa la barrera placentaria y se elimina por la leche materna [13, 16].

**Mecanismo de acción:** Los antagonistas del receptor H<sub>2</sub> inhiben la producción de ácido por competencia reversible de la unión de histamina a los receptores H<sub>2</sub> en la membrana basolateral de las células parietales. Inhiben la secreción normal de ácido por las células parietales y la secreción de ácido estimulada por las comidas. Los mecanismos para lograr este efecto involucran la liberación de histamina por las células enterocromafines (EC), en el estómago, y el bloqueo de la unión a los receptores parietales H<sub>2</sub>, que estimulan la secreción ácida y otras sustancias que la promueven (como la gastrina y la acetilcolina). El efecto sobre las células parietales es menor cuando los receptores H<sub>2</sub> están bloqueados. Se estima que inhibe alrededor del 70 % la secreción gástrica de ácido durante 24 h [12, 16].

**Efectos adversos:** es un fármaco que se tolera bien. Los efectos secundarios suelen ser menores e incluyen diarrea, mareos, dolor de cabeza, somnolencia, fatiga, dolor muscular, estreñimiento, alopecia, exantemas transitorios e hipergastrinemia. Las reacciones menos comunes afectan el SNC (confusión, delirio, alucinaciones, lenguaje farfullante y dolores de cabeza) y ocurren principalmente con la administración intravenosa o en personas de edad avanzada. La ranitidina atraviesa la placenta y se eliminan por la leche materna. Interactúa con los CYP hepáticas con baja afinidad (10 %); apenas interfiere con el metabolismo hepático de otros fármacos; también puede incrementar ligeramente la concentración sanguínea de alcohol, pero no es clínicamente importante [15,17].

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Método bioanalítico

La validación del método bioanalítico se realizó utilizando un cromatógrafo de líquidos marca SHIMADZU (Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japón) equipado con un detector UV-visible dual SPD-10A; un inyector automático SIL-10AD (VP); una bomba LC-10AT (VP); un horno para columna CTO-10A; un desgasificador DGU 14A y un sistema de control SCL-10A (VP) acoplado a un equipo de cómputo. El control del equipo, el procesamiento y la manipulación de los datos se realizó utilizando el software LabSolution/ LCsolution.

Para el análisis cromatográfico cuantitativo se utilizó una columna Spherisorb ODS2, 4.6 x 150 mm y 5 µm de tamaño de partícula (No. Part. PSS831913, Waters Cromatografía, S.A.). La fase móvil utilizada consistió en una mezcla ternaria constituida por Acetonitrilo (grado HPLC, Merck), Metanol (grado HPLC, JT Baker) y Trietilamina al 0.06 % en agua (Merk Milli Q, pH 2.92) en proporción 20:20:60 a un flujo de 0.8 mL/min. La longitud de onda empleada fue de 230 nm y el volumen de inyección de 20 µL.

Las diversas soluciones de clorhidrato de ranitidina fueron preparadas utilizando un estándar marca Sigma Aldrich al 99.0 % de pureza.

##### 3.1.1 Diseño experimental para el desarrollo del método cromatográfico

Para establecer las condiciones cromatográficas óptimas del método se realizó un diseño de experimentos factorial 2<sup>3</sup>. Los factores evaluados fueron el pH de la fase móvil, el flujo y la proporción del agua con trietilamina al 0.06 % en la fase móvil. Los niveles para cada factor se encuentran descritos en la **Tabla 3.1**.

**Tabla 3.1** Factores evaluados en el diseño experimental.

Factor	Nivel alto	Nivel bajo
<b>pH de la fase móvil</b>	3.11	2.73
<b>Flujo (mL/min)</b>	1.0	0.6
<b>Proporción de H<sub>2</sub>O (%)</b>	70	50

La aleatorización del diseño (**Tabla 3.2**) se realizó utilizando el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI. En todos los experimento se utilizó una solución de 100 µM de clorhidrato de ranitidina.

**Tabla 3.2** Diseño experimental 2<sup>3</sup>.

Número de corrida	pH de fase móvil	Flujo (mL/ min)	Proporción de H <sub>2</sub> O (%)
<b>1</b>	2.73	0.6	70
<b>2</b>	3.11	1.0	50
<b>3</b>	2.73	0.6	50
<b>4</b>	2.73	1.0	50
<b>5</b>	3.11	0.6	50
<b>6</b>	3.11	1.0	70
<b>7</b>	2.73	1.0	70
<b>8</b>	3.11	0.6	70
<b>9</b>	2.73	0.6	70
<b>10</b>	3.11	1.0	50
<b>11</b>	2.73	0.6	50
<b>12</b>	2.73	1.0	50
<b>13</b>	3.11	0.6	50
<b>14</b>	3.11	1.0	70
<b>15</b>	2.73	1.0	70
<b>16</b>	3.11	0.6	70

Las respuestas evaluadas para el diseño experimental fueron: tiempo de retención, factor de coeio y área del pico obtenido; asimismo se evaluó la influencia de cada uno de los factores sobre las respuestas mencionadas anteriormente.

## 3.2 Evaluación del sistema

Para este propósito se evaluaron la adecuabilidad, la linealidad y la precisión del sistema. Para ello se preparó una solución madre de clorhidrato de ranitidina a una concentración de 1 000  $\mu\text{M}$ . Esta solución se diluyó convenientemente para preparar todas las soluciones de trabajo. En todos los casos se utilizó agua como disolvente.

### 3.2.1 Adecuabilidad

La adecuabilidad del sistema se evaluó mediante el análisis por quintuplicado de una solución 100  $\mu\text{M}$ . Con los datos derivados del análisis cromatográfico se determinó el coeficiente de variación (CV). El criterio de aceptación establece que el CV no debe ser mayor al 2.0 % para considerar que el sistema de medición funciona apropiadamente.

### 3.2.2 Linealidad

La linealidad del sistema se evaluó por medio de tres curvas de calibración con ocho niveles de concentraciones (12.5, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175  $\mu\text{M}$ ). Cada curva se preparó realizando diluciones independientes a partir de la solución madre (**Tabla 3.3**). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante una regresión lineal entre las variables concentración (x) y área bajo la curva (y). Con la respuesta analítica obtenida se calculó la ordenada al origen ( $\beta_0$ ), la pendiente de la recta ( $\beta_1$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el coeficiente de correlación (r). Los criterios de aceptación para determinar que el sistema es lineal establecen:  $r^2 > 0.98$ ,  $r \geq 0.99$ , el intervalo de confianza para la pendiente  $IC(\beta_1)$  no debe incluir el cero y el intervalo de confianza de la ordenada al origen  $IC(\beta_0)$  debe incluir el cero.

**Tabla 3.3** Diluciones realizadas para preparar la curva de calibración para la linealidad del sistema.

Nivel de concentración	Volumen de la solución madre (µL)	Aforo con FM (mL)	Concentración final (µM)
1	125	10.0	12.5
2	250	10.0	25
3	500	10.0	50
4	750	10.0	75
5	1000	10.0	100
6	625	5.0	125
7	750	5.0	150
8	875	5.0	175

### 3.2.3 Precisión

La precisión del sistema se evaluó mediante el análisis de 5 soluciones preparadas en tres niveles de concentración (40, 90, 140 µM) denominados puntos control; dichos puntos se encuentran dentro del rango de concentraciones de trabajo pero no son parte de la curva de calibración. Cada nivel se preparó realizando diluciones convenientes de la solución madre (**Tabla 3.4**). Una vez obtenidos los datos analíticos se determinó el coeficiente de variación (CV) de la respuesta. El criterio de aceptación establece que el CV no debe ser mayor al 2.0 % para considerar como preciso el sistema.

**Tabla 3.4** Diluciones realizadas para preparar los puntos control utilizados para evaluar la precisión del sistema.

Punto control	Volumen de la solución madre (µL)	Aforo con FM (mL)	Concentración final (µM)
<b>Bajo</b>	400	10.0	40
<b>Medio</b>	900	10.0	90
<b>Alto</b>	140	5.0	140



### 3.3 Validación del método bioanalítico

La validación del método se realizó de acuerdo con los criterios establecidos en la revisión 1, de la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos, emitida por a FDA en el 2013. De acuerdo con esta Guía, los parámetros de desempeño que se deben evaluar para validar los métodos bioanalíticos cromatográficos son la selectividad, la linealidad, la precisión, la exactitud, el recobro, el límite de cuantificación y la estabilidad de la muestra [14].

Todas las soluciones empleadas para validar el método se realizaron diluyendo la solución madre (1 000  $\mu\text{M}$ ) con la solución salina balanceada de Hank pH 7.4.

#### 3.3.1 Solución salina balanceada de Hank

La solución salina balanceada de Hank (HBSS) se preparó disolviendo la premezcla de sales de Hank (MP Biomedicals, 1710120); 0.35g de bicarbonato de sodio (JT Baker) y 5.96 g de HEPES (Sigma Aldrich) en aproximadamente 980 mL de agua desionizada (Merck Milli Q). Se ajustó el pH a 7.4 con HCl 1 M y se aforó a 1 L con agua desionizada.

#### 3.3.2 Linealidad

La linealidad del método se evaluó preparando, en dos diferentes días, seis curvas de calibración en intervalos de 3.1  $\mu\text{M}$  (límite de cuantificación) a 175  $\mu\text{M}$ . Los niveles de concentración empleados fueron: 3.1, 6.2, 12.5, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175  $\mu\text{M}$  (**Tabla 3.5**). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante una regresión lineal entre las variables concentración y área bajo la curva; los parámetros calculados fueron  $\beta_0$ ,  $\beta_1$ ,  $r^2$  y  $r$ . Los criterios de aceptación establecen que un método es lineal cuando  $r^2 > 0.98$ ,  $r \geq 0.99$ ,  $\text{IC}(\beta_1)$  no incluye el cero y  $\text{IC}(\beta_0)$  incluye el cero.

**Tabla 3.5** Diluciones realizadas para preparar las curvas de calibración para evaluar la linealidad del método.

Nivel de concentración	Volumen de la solución madre (µL)	Aforo con HBSS (mL)	Concentración final (µM)
<b>LLOQ</b>	31	10.0	3.1
<b>1</b>	62	10.0	6.2
<b>2</b>	125	10.0	12.5
<b>3</b>	250	10.0	25
<b>4</b>	500	10.0	50
<b>5</b>	750	10.0	75
<b>6</b>	1000	10.0	100
<b>7</b>	625	5.0	125
<b>8</b>	750	5.0	150
<b>9</b>	875	5.0	175

### 3.3.3 Exactitud, precisión y recobro

Para evaluar estos parámetros de desempeño se preparó, por quintuplicado, los puntos control en concentraciones de 40 µM (bajo), 90 µM (medio) y 140 µM (alto) como lo indica la **Tabla 3.6**.

**Tabla 3.6** Diluciones realizadas para preparar los puntos control en la validación del método.

Punto control	Volumen de la solución madre (µL)	Aforo con HBSS (mL)	Concentración final (µM)
<b>Bajo</b>	400	10.0	40
<b>Medio</b>	900	10.0	90
<b>Alto</b>	140	5.0	140

Con los datos obtenidos se determinó la exactitud del método mediante el cálculo de la concentración recuperada; con el promedio de dicha concentración se estimó la desviación absoluta respecto al valor nominal de las concentraciones evaluadas.

La precisión del método se determinó a través de la repetibilidad y la precisión intermedia. La repetibilidad del método se estimó calculando el coeficiente de variación, entre las réplicas, de la concentración recuperada en cada punto control; la precisión intermedia se determinó evaluando la variación de la concentración recuperada, en cada punto, a partir de muestras preparadas por dos diferentes analistas, en dos diferentes días.

Para evaluar el recobro se preparó una segunda serie de puntos control utilizando agua como disolvente. Los resultados se analizan comparando las respuestas analíticas entre las muestras preparadas con agua y con solución de HBSS.

### **3.3.4 Límite de cuantificación**

Para estimar el límite de cuantificación se realizaron diluciones del fármaco hasta encontrar la concentración mínima que presentara una respuesta identificable de por lo menos cinco veces la señal de ruido (comparada con el blanco); un coeficiente de variación no mayor del 20 % y una exactitud del 20 % en las concentraciones recuperadas. Las muestras se prepararon por quintuplicado.

### **3.3.5 Estabilidad de la muestra**

La estabilidad del fármaco en HBSS pH 7.4 se evaluó a corto y largo plazo y en tres ciclos de congelación-descongelación, comparándolas con soluciones preparadas el día del análisis.

- **Estabilidad de las muestras a corto plazo**

La estabilidad de la muestra se evaluó preparando los puntos control, por triplicado, en viales para HPLC. Al término de 24 h, a temperatura ambiente, se analizaron las soluciones. Con los resultados obtenidos se calculó la concentración recuperada, su desviación absoluta respecto al valor nominal y la desviación estándar.

- **Estabilidad de las muestras a largo plazo**

La estabilidad de las muestras a largo plazo se evaluó empleando de nueva cuenta, los puntos control. Previo a su análisis cromatográfico, las muestras (contenidas en viales para HPLC) se congelaron a  $-47^{\circ}\text{C}$  por 30 días. Con los resultados obtenidos se calcularon los mismos parámetros que para la estabilidad a corto plazo.

- **Estabilidad en ciclos de congelación-descongelación**

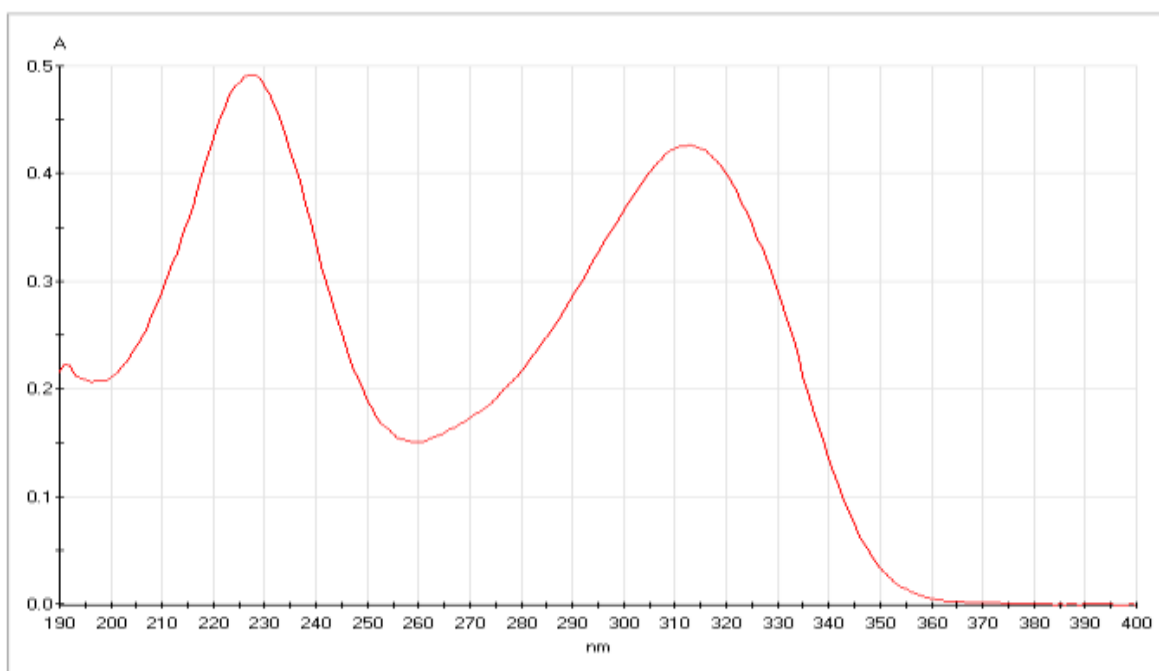
Para este propósito, los puntos control almacenados en los viales para HPLC, se evaluaron en 3 ciclos de congelación y descongelación. El primer ciclo se evaluó congelando las muestras a  $-47^{\circ}\text{C}$  durante 24 h, concluido este periodo las muestras se descongelaron a temperatura ambiente. Para el análisis cromatográfico una alícuota de cada punto se analiza; el resto de la solución se almacena nuevamente a  $-47^{\circ}\text{C}$  para iniciar el segundo ciclo. Este procedimiento se repitió hasta completar los tres ciclos. Con los resultados obtenidos se calculó la concentración recuperada, su desviación absoluta respecto al valor nominal y la desviación estándar.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

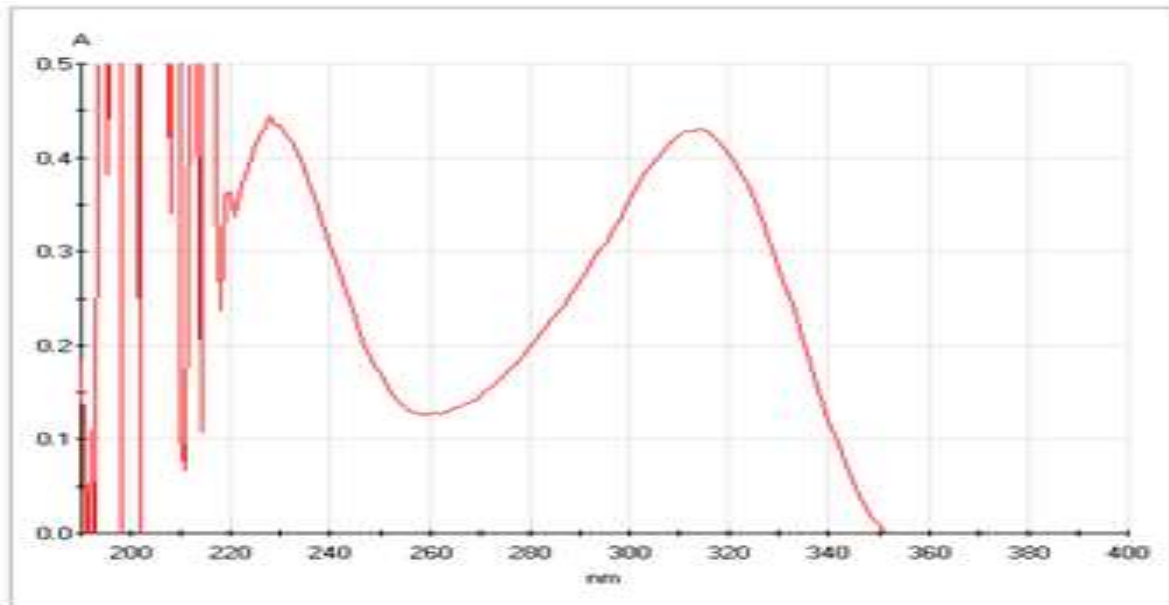
### 4.1 Desarrollo del método bioanalítico

Para el desarrollo del método bioanalítico se tomaron como base los métodos cromatográficos descritos en la literatura y previamente desarrollados en el laboratorio [18-23]. Con base en las condiciones cromatográficas reportadas se evaluaron distintas columnas, diferentes proporciones de los sistemas de elución y distintos valores de pH hasta obtener las condiciones cromatográficas que permitieron observar un pico con características similares a un comportamiento gaussiano.

Para establecer la longitud de onda de máxima absorción para el clorhidrato de ranitidina en fase móvil y en HBSS, se realizó un barrido de absorción en el espectrofotómetro UV en un intervalo de longitud de onda de 190-400nm (**Figuras 4.1-2**). De acuerdo con los resultados obtenidos se observan máximos de absorción a 230 y 314 nm.



**Figura 4.1** Espectro de absorción en el UV del clorhidrato de ranitidina en fase móvil.



**Figura 4.2** Espectro de absorción en el UV del clorhidrato de ranitidina en HBSS.

Posteriormente, para establecer las condiciones cromatográficas óptimas del método de cuantificación se realizó un diseño de experimentos factorial  $2^3$ .

Los factores evaluados fueron: el pH de la fase móvil, el flujo y la proporción de  $H_2O$ . Los niveles alto y bajo de cada factor se seleccionaron con base en las recomendaciones descritas en la USP 37 para métodos cromatográficos [24-25].

**Tabla 4.1** Aleatorización del diseño factorial.

Número de corrida	pH de fase móvil	Flujo (mL/ min)	Proporción de H <sub>2</sub> O (%)	Factor de coleo
1	2.73	0.6	70	1.693
2	3.11	1.0	50	1.353
3	2.73	0.6	50	1.336
4	2.73	1.0	50	1.332
5	3.11	0.6	50	1.352
6	3.11	1.0	70	1.630
7	2.73	1.0	70	1.688
8	3.11	0.6	70	1.635
9	2.73	0.6	70	1.730
10	3.11	1.0	50	1.350
11	2.73	0.6	50	1.334
12	2.73	1.0	50	1.339
13	3.11	0.6	50	1.350
14	3.11	1.0	70	1.600
15	2.73	1.0	70	1.662
16	3.11	0.6	70	1.680

En la **Tabla 4.1** se resumen la aleatorización del diseño y los resultados obtenidos en las diferentes condiciones analizadas.

Los coeficientes calculados mediante el análisis estadístico permitieron estimar el siguiente modelo factorial:

**Factor de coleo** = -1.23292 + 0.538158\*pH + 0.308882\*Flujo + 0.0481224\*Proporción de agua en la fase móvil - 0.0197368\*pH\*Flujo - 0.00960526\*pH\* Proporción de agua en la fase móvil - 0.005\*Flujo\* Proporción de agua en la fase móvil.

**Tabla 4** Análisis de varianza para el modelo.

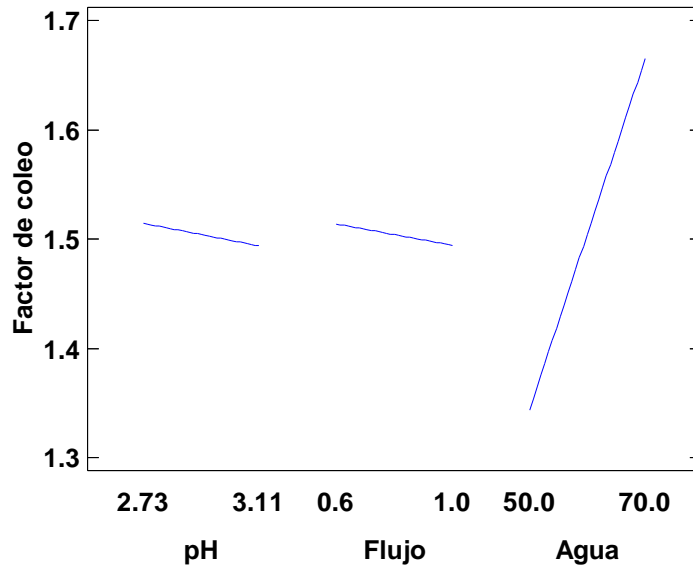
Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>A: pH</b>	0.001681	1	0.001681	5.41	0.0484
<b>B: Flujo</b>	0.001521	1	0.001521	4.90	0.0578
<b>C: Agua</b>	0.413449	1	0.413449	1331.16	0.0000
<b>AB</b>	0.000009	1	0.000009	0.03	0.8691
<b>AC</b>	0.005329	1	0.005329	17.16	0.0032
<b>BC</b>	0.0016	1	0.0016	5.15	0.0529
<b>Bloques</b>	0.00004225	1	0.00004225	0.14	0.7218
<b>Error total</b>	0.00248475	8	0.000310594		
<b>Total (corr.)</b>	0.426116	15			

Criterio de aceptación	
<b>Valor-P</b>	Si el valor P es menor o igual a 0.05 la diferencia entre los valores es estadísticamente significativa.

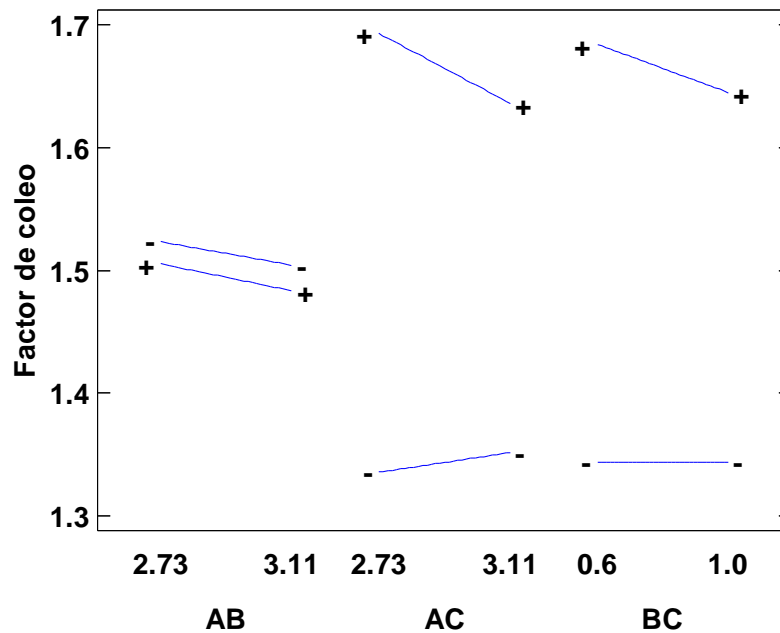
En la **Tabla 4.2** se resumen los valores obtenidos del análisis de varianza del modelo. Como se observa en la información presentada, el valor obtenido en la prueba F para el significado de la regresión de cada factor se encuentra entre 4.90 y 1331.16; cabe mencionar que el valor más alto de F corresponde a la proporción de agua en la fase móvil (%). Por otro lado, el valor P, estimado para los factores es menor a 0.05, excepto para el flujo. Asimismo, en las interacciones entre los factores, se observa que el valor de F para la interacción de AC es mayor que el de las interacciones AB y BC, además, el valor P, estimado para las interacciones AB y BC es mayor a 0.05. Estos resultados permiten concluir, con el 95% de confianza, que tanto el flujo como las interacciones AB y BC no afectan de manera significativa la simetría del pico.



En la **Figura 4.3** se puede observar que el principal factor que afecta la simetría del pico es la proporción de agua en la fase móvil. En contraste, la **Figura 4.4** ilustra que, ninguno de los factores presenta una interacción significativa.

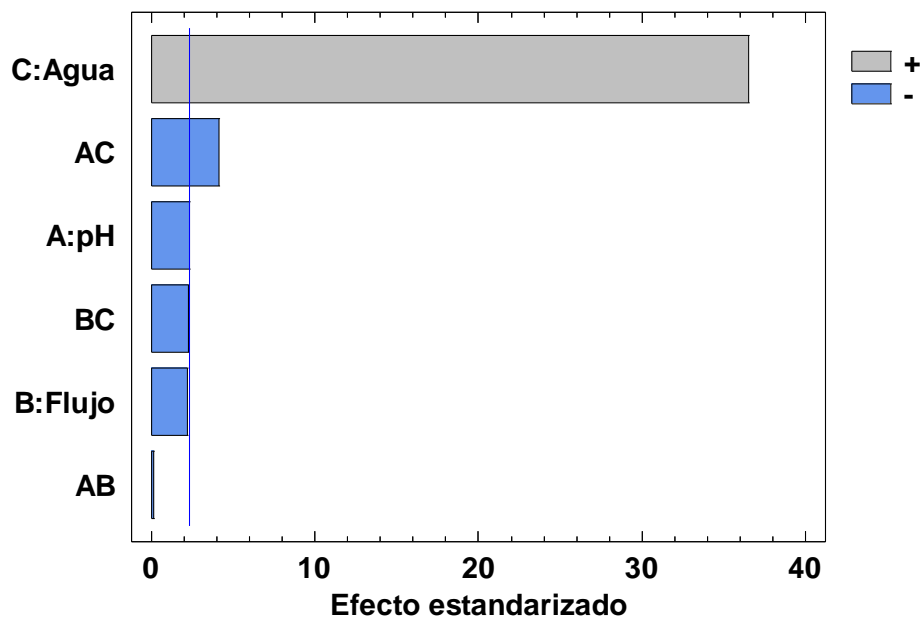


**Figura 2.3** Gráfica de efectos principales.



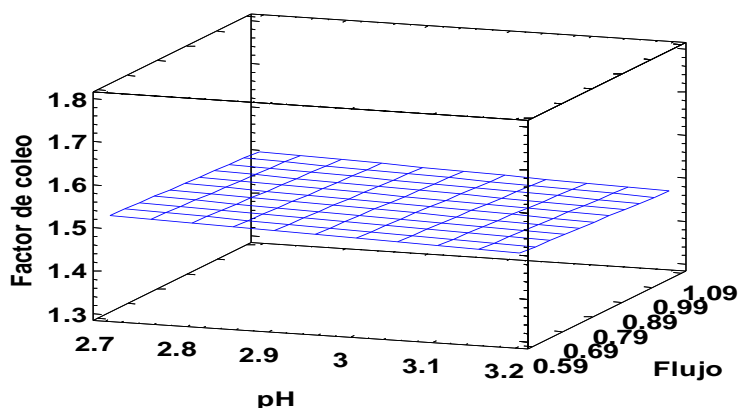
**Figura 4.4** Gráfica de interacciones entre los factores del diseño experimental.

Finalmente, la **Figura 4.5** representa el diagrama de Pareto de los factores evaluados en el diseño; de manera general el diagrama concuerda con las conclusiones mencionadas anteriormente, es decir, la simetría del pico es afectada por la proporción de agua en la fase móvil y la interacción entre el pH y la proporción de agua en la fase móvil.

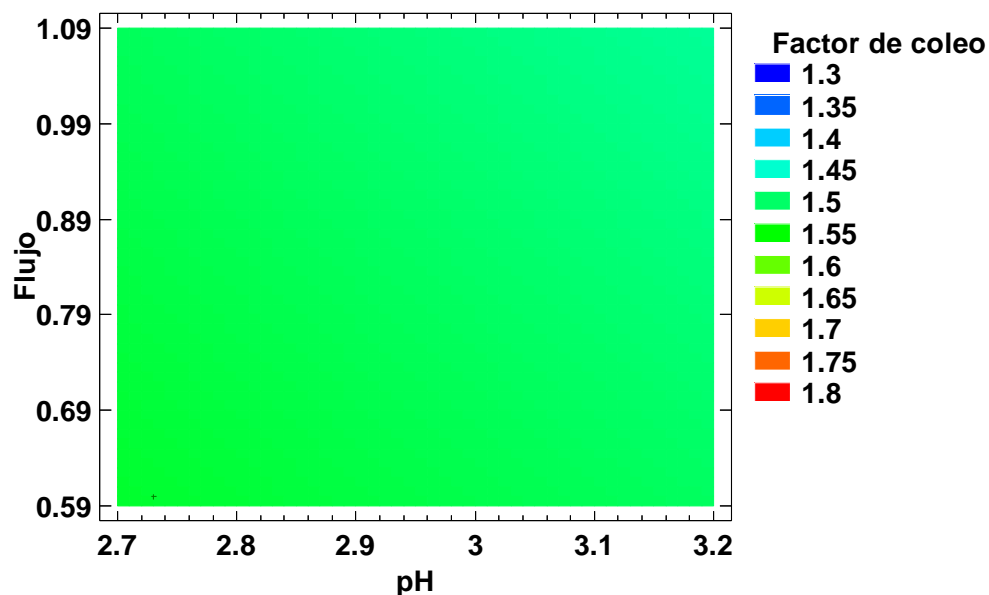


**Figura 4.5** Diagrama de Pareto de los efectos evaluados.

Con respecto a las figuras de superficie y de contornos de la superficie de la respuesta estimada (**Figuras 4.6 y 4.7**, respectivamente) es importante mencionar que de acuerdo con el modelo establecido la simetría óptima del pico se obtiene con una proporción del 60% de agua en la fase móvil, un rango de pH entre 2.7 – 3.2 y un flujo de 0.59 – 1.09 mL/min.

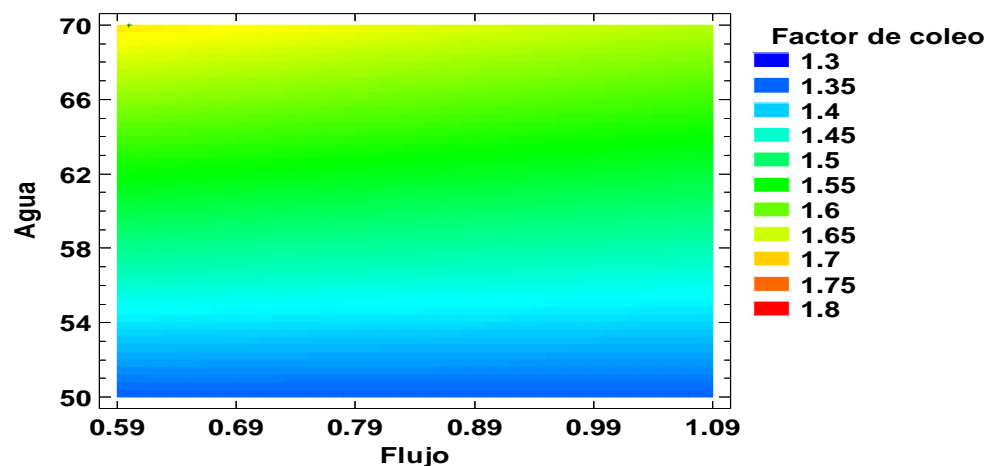


**Figura 4.6** Cubo de superficie de la respuesta estimada fijando la proporción de agua en la fase móvil (factor A) al 60 %.

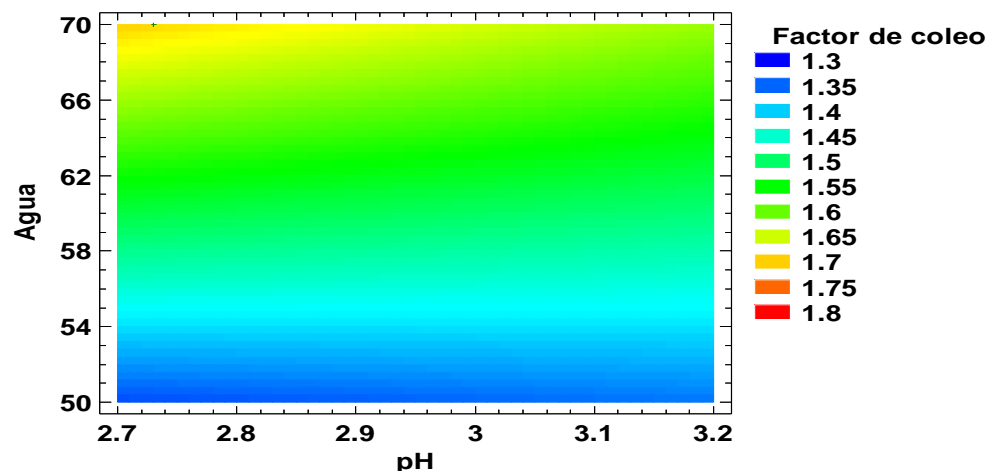


**Figura 4.7** Gráfica de contorno de la superficie de respuesta estimada fijando la proporción de agua en la fase móvil (factor C) al 60 %.

Por otro lado, empleando la gráfica de contornos de superficie de la respuesta estimada cuando el pH tiene un valor de 2.92 (**Figura 4.8**) la mejor respuesta se obtiene en un rango del 50 a 66% de la proporción de agua en la fase móvil y un flujo de 0.59 a 1.09 mL/min. En este contexto, cuando el flujo se fija a 0.8 mL/min (**Figura 4.9**), el pH es de 2.92 y la proporción de agua en la fase móvil corresponde al 60 % la simetría del pico es aproximadamente de 1.5.



**Figura 4.8** Gráfica de contorno de la superficie de respuesta estimada fijando el pH (factor A) a 2.92.



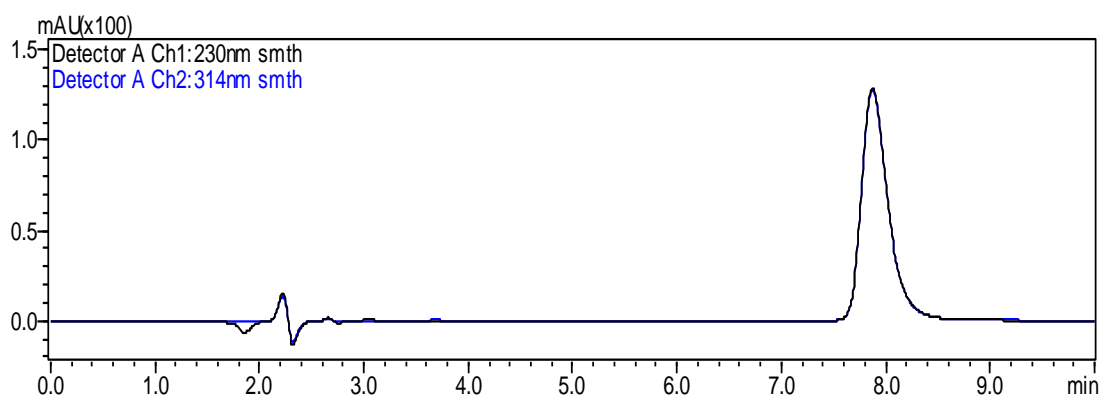
**Figura 4.9** Gráfica de contorno de la superficie de la respuesta estimada fijando el flujo (factor B) a 0.8 mL/min.

Este tipo de diseño también permite maximizar la respuesta (el factor de coeio) por medio de la combinación de los tres factores. En este caso, las condiciones de trabajo para obtener el máximo coeio del pico son: un pH de 2.73, un flujo de 0.6 mL/min y una proporción de agua en la fase móvil de 70%.

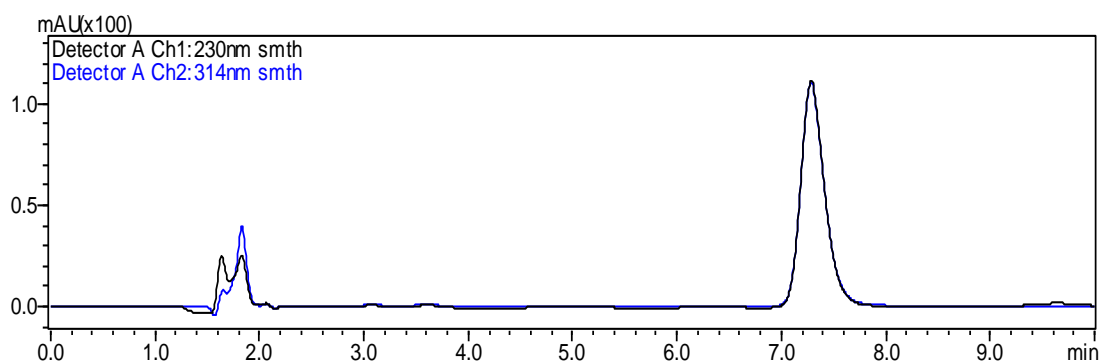
Finalmente, con base en esas consideraciones, las condiciones cromatográficas seleccionadas para validar el método bioanalítico se resumen en la **Tabla 4.3**. En las **Figuras 4.10 y 4.11** se muestran los cromatogramas obtenidos del clorhidrato de ranitidina en fase móvil y solución HBSS respectivamente, empleando el método cromatográfico desarrollado.

**Tabla 4.3** Condiciones cromatográficas óptimas para cuantificar clorhidrato de ranitidina.

Fase móvil	ACN: MeOH: TEA 0.06% (20:20:60)
Columna	Spherisorb ODS2 (C18) 5µm, 4.6 x 250 mm
pH de la fase móvil	2.92
Flujo	0.8 mL/min
Vol. de inyección	20 µL
Longitud de onda	230 y 314 nm
Temperatura	Ambiente



**Figura 30** Cromatograma obtenido con una solución de clorhidrato de ranitidina, en fase móvil, a una concentración de 100  $\mu$ M.



**Figura 4** Cromatograma obtenido con una solución de clorhidrato de ranitidina, en HBSS, a una concentración de 100  $\mu$ M.

## 4.2 Evaluación del sistema

### 4.2.1 Adecuabilidad del sistema

La adecuabilidad del sistema es una parte integral de muchos procedimientos analíticos, incluyendo los cromatográficos. Este parámetro permite establecer que el equipo e instrumentos de medición, las operaciones analíticas y las muestras a analizar constituyen un sistema adecuado para la ejecución del análisis [24, 26].

Este parámetro se llevó a cabo mediante la inyección por quintuplicado de una misma muestra, con los resultados obtenidos se calculó el coeficiente de variación.

De acuerdo con la **Tabla 4.4** el coeficiente de variación fue menor a 2.0 % por lo tanto, el sistema cromatográfico es adecuado para realizar los análisis.

**Tabla 5** Resultados de la adecuabilidad del sistema.

Muestra	Área en fase móvil (mUA)	Área en HBSS (mUA)
1	2320057	2234297
2	2331698	2241585
3	2337740	2236327
4	2328156	2249385
5	2316435	2222604
<b>Promedio</b>	2326817.2	2236839.6
<b>DE</b>	8637.3106	9865.1630
<b>%CV</b>	0.37	0.44
<b>Criterio de aceptación</b>		
<b>%CV</b>	No debe ser mayor al 2.0 %.	

**4.2.2 Precisión del sistema**

La precisión del sistema se evaluó a través del coeficiente de variación obtenido con la respuesta de cinco muestras (puntos control). Este análisis estadístico representa la variabilidad inherente asociada con la respuesta analítica y puede originarse por el analista, el equipo y los instrumentos de medición, entre otros [27, 28]. En la **Tabla 4.5** se observa que el coeficiente de variación obtenido fue menor al 1.6 % en cada punto control. Por lo tanto, el sistema es preciso.

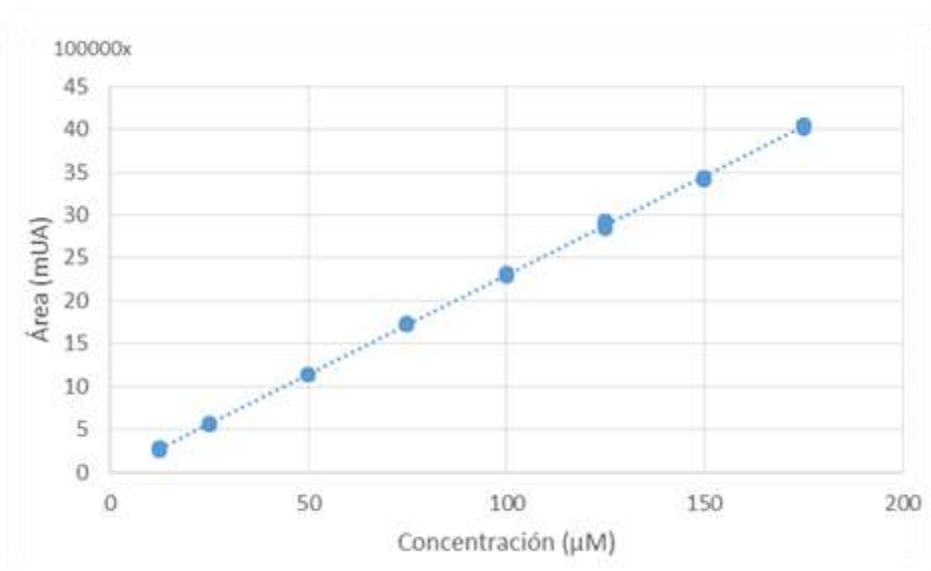
**Tabla 4.5** Precisión del sistema.

No. muestra	Área (mUA)		
	Punto control bajo 40 µM	Punto control medio 90 µM	Punto control alto 140 µM
<b>1</b>	915320	2051791	3236608
<b>2</b>	885946	2073750	3246034
<b>3</b>	897328	2081941	3261270
<b>4</b>	899244	2083452	3271119
<b>5</b>	920423	2089114	3275018
<b>Promedio</b>	903652.2	2076009.6	3258009.8
<b>DE</b>	14056.45	14611.15	16379.99
<b>CV (%)</b>	1.56	0.70	0.50
<b>Criterio de aceptación</b>			
<b>CV (%)</b>	No debe ser mayor al 2.0 %.		



### 4.2.3 Linealidad del sistema

El ajuste de la respuesta obtenida del analito en función de cada concentración se realizó mediante una regresión lineal. El comportamiento observado al relacionar la concentración con la respuesta obtenida se ilustra en la **Figura 4.12**. El coeficiente de correlación calculado fue de 0.9998 indicando, con ello, que existe una correlación entre las variables. En la **Tabla 4.6** se resumen los valores estimados del intercepto y la pendiente, así como, sus intervalos de confianza.



**Figura 4.12** Linealidad del sistema.

Criterio de aceptación	
$r^2 > 0.98$	IC( $\beta_1$ ) no debe incluir el cero
$r \geq 0.99$	IC( $\beta_0$ ) debe incluir el cero

Ecuación del modelo: Área= -9141.2 + 23114\*Concentración

Coficiente de correlación (r)= 0.9998

Coficiente de determinación (r<sup>2</sup>)= 0.9997

**Tabla 4.6** Coeficientes e intervalos de confianza del intercepto y la pendiente del modelo lineal.

Parámetro	Estimado	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Inferior	Superior
<b>Intercepto</b>	-9141.25	9416.91	-28670.72	10388.22
<b>Pendiente</b>	23114.45	89.96	22927.8768	23301.0186

**Tabla 4.7** Análisis de varianza del modelo para evaluar la linealidad del sistema.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculada	Valor P
<b>Modelo</b>	3.8787E+13	1	3.8787E+13	66015.1231	< 0.05
<b>Residual</b>	1.2926E+10	22	587551858		
<b>Total (Corr.)</b>	3.88E+13	23			

Por otra parte, el análisis de varianza, para este modelo, permitió estimar a través de un valor-P menor a 0.05 (**Tabla 4.7**), que existe una relación lineal estadísticamente significativa entre el área del pico cromatográfico y la concentración con 95.0 % de confianza. Además, se observa que de acuerdo con el valor del coeficiente de determinación ( $r^2$ ), la ecuación del modelo lineal describe más del 99.9% de la variabilidad en la respuesta (área).

Con base en los resultados obtenidos se concluye que el sistema es lineal en el intervalo de concentraciones de 12.5-175  $\mu\text{M}$ .

### 4.3 Validación del método

La validación del método se realizó de acuerdo con la revisión número 1 de la Guía para la Industria, emitida por la FDA, sobre Validación de Métodos Bioanalíticos. Las recomendaciones que se proporcionan en este documento son útiles para procedimientos bioanalíticos donde se aplique, entre otras, la técnica de HPLC para la determinación cuantitativa de fármacos y/o metabolitos en matrices biológicas. El empleo de métodos analíticos selectivos, sensibles y validados para evaluar cuantitativamente los fármacos y sus metabolitos es crítico para conducir exitosamente los estudios preclínicos, biofarmacéuticos y clínicos. La validación de métodos bioanalíticos incluye la demostración de que todos los procedimientos de un método en particular, usado para la medición cuantitativa de analitos en una matriz biológica dada, son confiables y reproducibles para el uso que se pretende [29].

A continuación se describen los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros de desempeño evaluados:

#### 4.3.1 Linealidad del método

El intervalo de concentraciones en el que se evaluó la linealidad se estableció con base en la concentración máxima evaluada y la concentración mínima cuantificable en el equipo cromatográfico de manera exacta y precisa. En la **Figura 4.13** se ilustra la relación existente entre el área y la concentración del clorhidrato de ranitidina. Como se observa, la respuesta obtenida es directamente proporcional a su concentración. En la **Tabla 4.8** se muestran los valores estimados del intercepto y la pendiente junto con sus intervalos de confianza.

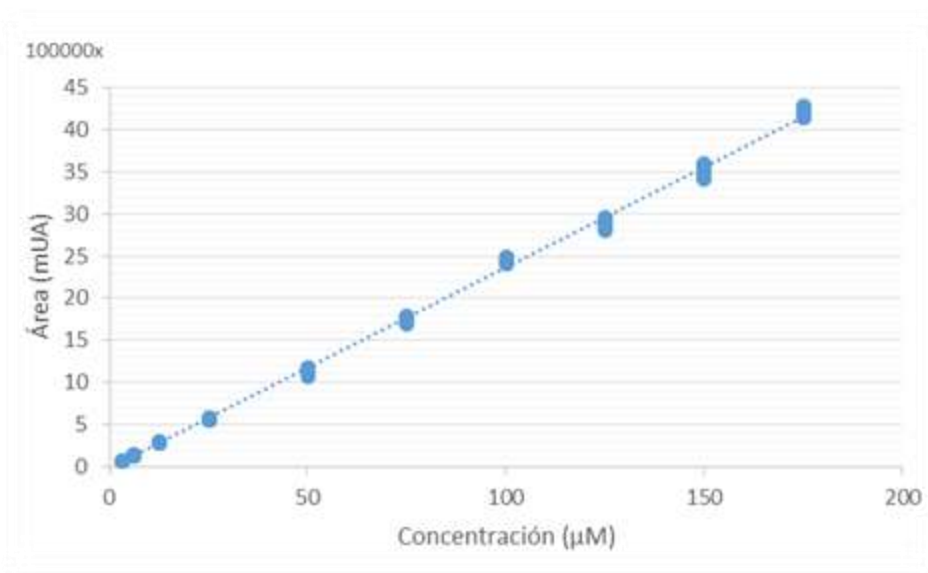


Figura 4.13 Linealidad del método.

Criterio de aceptación	
$r^2 > 0.98$	IC( $\beta_1$ ) no debe incluir el cero
$r \geq 0.99$	IC( $\beta_0$ ) debe incluir el cero

Ecuación que describe el modelo: Área= -22835 + 23835\*Concentración

Coefficiente de correlación (r)= 0.9992

Coefficiente de determinación ( $r^2$ )= 0.9984

Tabla 4.8 Coeficientes e intervalos de confianza para el intercepto y la pendiente del modelo lineal.

Parámetro	Estimado	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Inferior	Superior
<b>Intercepto</b>	-22670.75	11757.40275	-46205.75	864.24894
<b>Pendiente</b>	23834.954	125.5454425	23583.65	24086.261

**Tabla 4.9** Análisis de varianza del modelo de linealidad del método.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculada	Valor P
<b>Modelo</b>	1.214E+14	1	1.21364E+14	36043.482	< 0.05
<b>Residual</b>	1.953E+11	58	3367141844		
<b>Total (Corr.)</b>	1.216E+14	59			

El análisis de los datos mediante una regresión lineal permitió estimar un coeficiente de correlación de 0.999; este valor indica una relación fuerte entre las variables. Asimismo, el análisis de varianza (**Tabla 4.9**), permitió calcular un valor P menor a 0.05 corroborando, con ello, que existe una relación lineal estadísticamente significativa entre el área y la concentración. Finalmente, el coeficiente de determinación resultante del análisis estadístico indicó que más del 99.9% de la variabilidad obtenida en la respuesta está explicada por el modelo de linealidad ajustada.

#### 4.3.2 Precisión y exactitud

La precisión del método fue evaluada a través de la repetibilidad y la precisión intermedia. En la **Tabla 4.10** se resumen los valores de los coeficientes de variación calculados para el análisis de los puntos control. En todos los casos, el coeficiente de variación obtenido fue menor al 3.0 %. Por consiguiente, la variación obtenida está dentro del límite establecido por la Guía de Validación (menor o igual al 15.0 %). Asimismo, la variación obtenida en diferentes días y con diferentes analistas (precisión intermedia), en cada nivel de concentración, se encuentra dentro del límite especificado (**Tabla 4.11**).

En la **Tabla 4.10** se resumen los resultados para evaluar la exactitud del método. La diferencia absoluta entre el promedio del porcentaje recuperado y el valor nominal es menor de 3.0 %, en los tres puntos control evaluados. De esta manera los resultados obtenidos cumplen satisfactoriamente con la especificación establecida en la guía (la diferencia absoluta debe ser menor al 15 %).

**Tabla 6** Resultados obtenidos para evaluar la repetibilidad y exactitud del método.

No. muestra	Concentración recuperada ( $\mu\text{M}$ )		
	Punto control bajo 40 $\mu\text{M}$	Punto control medio 90 $\mu\text{M}$	Punto control alto 140 $\mu\text{M}$
<b>1</b>	39.21	89.30	140.82
<b>2</b>	39.67	89.59	136.64
<b>3</b>	40.08	90.30	139.96
<b>4</b>	39.65	90.57	140.31
<b>5</b>	39.92	93.17	140.80
<b>Promedio</b>	39.71	90.59	139.70
<b>DE</b>	0.33	1.53	1.75
<b>CV (%)</b>	0.83	1.69	1.25
<b>Exactitud (%)</b>	99.26	100.65	99.79
<b>Diferencia absoluta respecto al VN (%)</b>	0.74	0.65	0.21
Criterio de aceptación			
<b>Repetibilidad</b>	El CV% no debe ser mayor al 15 %.		
<b>Exactitud</b>	La diferencia absoluta respecto al VN (%) no debe ser mayor al 15 %.		

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 7** Resultados obtenidos para evaluar la precisión intermedia del método.

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Concentración recuperada ( $\mu\text{M}$ )				Promedio	DE	CV (%)
	Día 1		Día 2				
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2			
<b>40</b>	40.21	39.59	40.11	41.23	40.48	0.78	1.93
	40.47	40.09	40.06	41.29			
	40.37	39.43	40.14	41.64			
	40.82	39.18	40.12	41.90			
	41.04	40.01	40.13	41.82			
<b>90</b>	90.21	91.06	90.35	90.20	90.61	0.58	0.64
	90.81	91.25	90.44	90.33			
	90.71	91.63	90.12	90.34			
	90.14	92.20	90.57	90.13			
	90.38	91.00	89.77	90.64			
<b>140</b>	139.36	140.19	141.72	140.64	140.64	0.72	0.51
	140.41	140.09	140.06	140.30			
	140.77	140.81	142.02	140.19			
	140.07	140.30	141.61	140.36			
	140.52	140.08	141.94	141.29			
<b>Criterio de aceptación</b>							
<b>Precisión intermedia</b>		El CV % no debe ser mayor al 15 %.					

Con los resultados obtenidos, se demuestra que el método es preciso y exacto para cuantificar ranitidina en los estudios de transporte *in vitro*.

### 4.3.3 Recobro

En la **Tabla 4.12** se presentan los resultados obtenidos para evaluar el recobro del clorhidrato de ranitidina en la matriz biológica. De acuerdo con la información presentada, el promedio obtenido con la respuesta del analito en la matriz biológica y en la fase móvil son similares; por consiguiente, los porcentajes de recobro calculados son alrededor del 100% en cada punto control. De acuerdo con el valor de coeficiente de variación calculado, se observa que el recobro es preciso. Por lo tanto, los resultados obtenidos cumplen con lo establecido en la guía emitida por la FDA.

**Tabla 4.12** Resultados obtenidos para evaluar el recobro del método.

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	$\bar{X}$ Área del analito en fase móvil (mUA)	$\bar{X}$ Área del analito en HBSS (mUA)	$\bar{X}$ Recobro Absoluto (%)
<b>40</b>	912149	925450.4	101.46
<b>90</b>	2159446	2170209.4	100.50
<b>140</b>	3362733.8	3368190	100.16
		<b>Promedio</b>	100.71
		<b>DE</b>	0.67
		<b>CV</b>	0.67
Criterio de aceptación			
<b>Recobro</b>	Los resultados tiene que ser homogéneos y el CV % no debe de ser mayor al 15 %.		



#### 4.3.4 Límite de cuantificación

La concentración mínima a la cual fue posible cuantificar el clorhidrato de ranitidina de manera exacta y preciso (repetible) fue de 3.1  $\mu\text{M}$ . En la **Tabla 4.13** se muestran los resultados obtenidos para evaluar la precisión y la exactitud de las soluciones preparadas a esta concentración. La variación obtenida fue menor al 20.0 % y la desviación de la media de la concentración recuperada respecto a su valor nominal también fue menos del 20.0 %. Por lo tanto, los resultados cumplen con los requerimientos de la guía de validación para establecer esta concentración como límite de cuantificación.

**Tabla 4.138** Precisión y exactitud para el límite de cuantificación.

No. muestra	Concentración recuperada ( $\mu\text{M}$ )
	3.1 $\mu\text{M}$
1	3.39
2	3.42
3	3.44
4	3.47
5	3.59
<b>Promedio</b>	3.46
<b>DE</b>	0.08
<b>CV (%)</b>	2.25
<b>Exactitud (%)</b>	111.67
<b>Diferencia absoluta respecto al VN (%)</b>	11.67
<b>Criterio de aceptación</b>	
<b>Precisión</b>	El CV % no debe ser mayor al 20 %.
<b>Exactitud</b>	La diferencia absoluta con respecto al VN no debe ser mayor al 20 %.

**4.3.5 Estabilidad de la muestra**

En la **Tabla 4.14** se presentan los resultados obtenidos para evaluar la estabilidad del clorhidrato de ranitidina en las diferentes condiciones. La media de la diferencia absoluta respecto al valor nominal se encuentra entre 2.03% y 0.8%. Con base en la guía de validación de métodos bioanalíticos las muestras se consideran estables si su porcentaje de variación es menor al 15.0 %. Consiguientemente, se concluye, que las muestras son estables durante 24 h a temperatura ambiente, después de ciclos de congelación-descongelación y en congelación durante 30 días.

**Tabla 4.14** Resultados de estabilidad.

	Punto control bajo 40 µM		Punto control medio 90 µM		Punto control alto 140 µM	
	X Conc. recuperada ± DE	Diferencia absoluta respecto al VN (%)	X Conc. recuperada ± DE	Diferencia absoluta respecto al VN (%)	X Conc. recuperada ± DE	Diferencia absoluta respecto al VN (%)
<b>Estabilidad a corto plazo</b>	40.26 ± 0.16	0.66	89.30 ± 0.44	0.78	137.16 ± 1.43	2.03
<b>Ciclo 1 Congelación- Descongelación</b>	40.18 ± 0.37	0.46	90.44 ± 1.33	0.49	137.60 ± 1.28	1.71
<b>Ciclo 1 Congelación- Descongelación</b>	39.88 ± 0.36	0.29	90.67 ± 1.39	0.74	138.88 ± 1.19	0.8
<b>Ciclo 1 Congelación- Descongelación</b>	40.73 ± 0.09	1.83	90.24 ± 0.27	0.2	138.84 ± 1.14	0.83
<b>Estabilidad a largo plazo</b>	43.12 ± 1.46	7.79	92.52 ± 1.27	2.8	141.59 ± 0.86	1.13
<b>Criterio de aceptación</b>						
<b>Estabilidad</b>	La diferencia absoluta respecto al VN (%) no debe ser mayor al 15 %.					

### 5. CONCLUSIONES

Durante este trabajo se desarrolló y validó un método bioanalítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para cuantificar clorhidrato ranitidina.

Este método demostró ser lineal, exacto y preciso para cuantificar el fármaco en un intervalo de concentraciones de 3.1 a 175  $\mu\text{M}$ .

El recobro obtenido de las muestras en la matriz biológica fue consistente en las concentraciones evaluadas.

Finalmente, las muestras demostraron ser estables a corto y largo plazo, y en tres ciclos de congelación – descongelación.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Martínez Chavéz Diana Alejandra (2015) Estudios de permeabilidad de los flavonoides Acacetina y Pinocembrina a través de la monocapa celular Caco-2: un modelo in vitro de absorción intestinal, Tesis de Maestría, Facultad de Química UNAM, México, D.F. 104 pp.
2. Baena, Y., Ponce D'Leon, L. F. (2008) Importancia y fundamentación del sistema de clasificación biofarmacéutico, como base de la exención de estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia *in vivo*, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* **37**(1), pp. 18-32
3. World Health Organization (2006) Who Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations, Who Technical Report Series, fortieth report, Geneva, Annex 7, pp. 358-413.
4. Food and Drug Administration (2015) Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System.Center for Drug Evaluation and Research (CDER)
5. Macheras, P., Karalis, V. (2014) A non- binary biopharmaceutical classification of drugs: The AB $\Gamma$  system, *Int. J. Pharmaceut.*, **464**(1-2), pp.85-90.
6. Thiel-Demby, V. (2008) Biopharmaceutics classification system: validation and learnings of an in vitro permeability assay. *Mol. Pharmaceut.*, **6**(1), pp. 11-18.
7. Hubatsch, I., Ragnarsson, E.G., Artursson, P. (2007) Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers, *Nat. Protoc.*, **2**(9), pp.2111-2119.
8. Fong, Y.K., Li, C.R., Wo, S.K., Wang, S., Zhou, L., Zhang, L., Lin, G., Zuo, Z. (2012) *In vitro* and in situ evaluation of herb-drug interactions during intestinal metabolism and absorption of Baicalein, *J.Etnopharm.*, **141**(2), pp. 742-753.
9. Yu-Tse, W., *et al.*, (2012) Pharmacokinetic studies of chinese medicinal herbs using automated blood sampling system and liquid chromatography-mass spectrometry. *J Tradit. Complement. Med.*, **2**, pp. 33-40.

10. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (2014) Tomo I. 11ª Edición, Secretaría de Salud, México, Ranitidina. pp.1298.
11. Drugbank, Ranitidine. Citado el día 15 de noviembre de 2017 <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00863>
12. Hohnjec, M., Kufinec, J., Malnar, M., Skreblin, M., Kajfez, F., Nagl, A., Blazevic, N. (1986) Ranitidine, *Anal. Prof. D. Subs.*, **15**, pp. 533-561.
13. Louise Hill Curth (2006) From physick to pharmacology: five hundred years of British drug retailing. Editorial Aldershot/ Ashgate. pp 160-163.
14. U.S National Library of Medicine, Ranitidine. Citado el 15 de noviembre de 2017 <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a601106.html>
15. Goodman & Gilman (2006) Las bases Farmacológicas de la Terapéutica. Editorial Mc Graw-Hill/Interamericana de México, 12a. Edición, México. pp. 971-973.
16. Rang & Dale (2008) Farmacología. Editorial Elsevier Limited 6ª Edición/ Barcelona, España, pp. 288-289
17. Martindale (2008) Guía Completa de Consulta Farmacoterapéutica. Editorial Pharma Editores, 3ª Edición, Barcelona España, pp.1001-1004.
18. Roberts, C. J .C., (1984) Clinical Pharmacokinetics of Ranitidine, *Clin. Pharmacokinetics*, **9**, pp. 211-221.
19. Rama-Rao, K., Prakash, D. R. K., Prasad, C. V. N. (2011) Bioanalytical method development and validation of ranitidine from plasma using high performance liquid chromatography, *Int. J. Pharm. Sci*, **3** (2), pp. 219-223.
20. Bakshi, M., Singh, S. (2002) Development of validated stability- incating assay methods-critical review, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **28**, pp. 1011-1040.
21. Tasnuva, H., Mesbah, U. T., Susmita, L., Kanij, F. (2010) Development and a validation of a RP- HPLC method for simultaneous estimation of naproxen and ranitidine hydrochloride, *Pak. J. Pharm. Sci.*, **23** (4), pp. 379-383.
22. Ashiru, D. A. I., Patel, R., Basit, A. W. (2007) Simple and universal HPLC- UV method to determine cimetidine, ranitidine, famotidine and nizatidine in urine:

- Application to the analysis of ranitidine and its metabolites in human volunteers, *J. Chromatogr. B.*, **860**, pp. 235-240.
23. Villanueva Pérez Maritza (2017) Desarrollo y validación de métodos bioanalíticos para cuantificar metformina y famotidina: dos fármacos modelo de permeabilidad *in vitro*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química UNAM, México, D.F. 104 pp.
  24. United States Pharmacopeia (2014) USP 37 NF 32<sup>a</sup>, Volumen 1, Cromatografía, pp.377-387.
  25. United States Pharmacopeia (2014) USP 37 NF 32<sup>a</sup>, Volumen.1, Validacion de procedimientos farmacopeicos, pp. 1440-1445.
  26. Snyder, L. R., Kirkland, J.J., Dolan, J.W. (2010) Introduction to modern liquid chromatography. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, pp. 542.
  27. García, M. A., Soberón, E., Cortes, M., Rodríguez, R., Herrera, J. L., Alcántara, A. (2002) Guía de Validación de Métodos Analíticos, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C.
  28. Text on Validation Of Analytical Procedures Q2A, (1994) International Conference on Harmonisation of Technical requirements for registration of Pharmaceuticals For Human Use (ICH).
  29. Bioanalytical Method Validation (2013) Guidance for Industry, Department of Health and Human Service, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER).