

Desarrollo y validación de procedimientos para determinar losartán potásico en estudios de  
equivalencia terapéutica

Development and validation of procedures for determining losartán potassium in therapeutic  
equivalence studies

Dra. Olga Baudrit Carrillo <sup>I</sup>, Lic. Ana Lorena Berrocal Barrantes <sup>II</sup>, MSc. Lidiette Fonseca  
González <sup>II</sup>

<sup>I</sup> Facultad de Farmacia, Universidad de Costa Rica. Teléfono (506)25113559. Dirección  
electrónica: olga.baudrit@ucr.ac.cr

<sup>II</sup> Laboratorio de Biofarmacia y Farmacocinética, Instituto de Investigaciones Farmacéuticas,  
Facultad de Farmacia. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Teléfono  
(506)25118316.

## Resumen

### Objetivos:

Desarrollar y validar dos procedimientos analíticos para una aplicación en estudios de equivalencia terapéutica de tabletas de losartán potásico.

### Métodos:

Se desarrolló un procedimiento por cromatografía líquida de alta resolución para cuantificar losartán potásico en estudios *in vitro* (perfiles de disolución y uniformidad de contenido) y otro procedimiento bioanalítico.

Las condiciones cromatográficas fueron: inyección de 100  $\mu\text{L}$ , fase estacionaria de octadecilsilano, fase móvil de buffer fosfatos (pH 3,0)/acetonitrilo (50:50, v/v) a 0,8 mL/min y detección a 225 nm.

Los protocolos de validación se basaron en los lineamientos de la Conferencia Internacional de Armonización, la Organización Mundial de la Salud, la Administración de Drogas y Alimentos y la Agencia de Medicinas Europea.

### Resultados: Objectives:

Two analytical procedures were developed and validated for use in therapeutic equivalence studies of losartan potassium tablets.

### Methods:

A procedure for the *in vitro* studies (dissolution profiles and content uniformity of tablets) proposed the development of a method for high resolution liquid chromatography whose conditions were: injection of 100  $\mu\text{L}$ , an octadecylsilane stationary phase, phosphate buffer (pH 3.0), acetonitrile (50:50, v/v) as mobile phase with a flow rate of 0.8 mL/min and a detection wavelength of 225 nm. The setting of bioanalytical procedure involved the solid phase extraction to 1 mL of human plasma.

Validation protocols were based on the guidelines of the International Conferences of Harmonization, the World Health Organization, the Food and Drug Administration and the European Medicines Agency.

### Results:

The two procedures were determined in detail. The validation of the methodology *in vitro* showed to be specific, precise and accurate with a linear calibration curve between 50 and 300 ng / mL.

For bioassay's procedure the solid phase extraction with divinylbenzene-N-vinylpyrrolidone and an eluent of methanol/acidified water to pH 2 (90:10, v/v), evaporation to dryness and the residue recovery mobile phase provided the best separation of the plasma proteins with respect to acetonitrile precipitation and liquid-liquid extraction.

This validation complied with the recommendations of international guidelines in terms of selectivity, stability of losartan potassium in spiked plasma (to 3 freeze-thaw cycles), precision, accuracy, calibration curve (50-300 ng/mL) and limit of quantification. This latter was  $50.0 \pm 3.5$  ng/mL in spiked plasma with a confidence level of 95 % in uncertainty.

### Conclusion:

Both procedures were appropriate characteristics for implementation thereof in therapeutic equivalence studies of losartan potassium tablets.

### Keywords:

## Losartán, human plasma, high performance liquid chromatography, validation

Se estableció un procedimiento *in vitro* en cuya validación se demostró: especificidad, precisión, exactitud y una curva de calibración lineal entre 50 y 300 ng/mL.

Para establecer el procedimiento bioanalítico, se comparó la precipitación de proteínas de 1 mL de plasma humano con acetonitrilo y las extracciones líquido-líquido y en fase sólida. Los mejores resultados se obtuvieron con la última técnica usando divinilbenceno-N-vinilpirrolidona y una mezcla de metanol/agua a pH 2 (90:10, v/v) como eluyente del sustrato, evaporación a sequedad y recuperación del residuo con fase móvil.

La validación de este procedimiento cumplió con las recomendaciones de las guías internacionales en términos de selectividad, estabilidad de losartán potásico en plasma enriquecido (3 ciclos de congelación-descongelación), precisión, exactitud, curva de calibración (50 - 300 ng/mL), límite de cuantificación de 50,0 de losartán potásico en plasma y una incertidumbre de  $\pm 3,5$  ng/mL con un nivel de confianza de 95% para ese último valor.

### Conclusión:

Ambos procedimientos tuvieron características apropiadas para la implementación de los mismos en estudios de equivalencia terapéutica de losartán potásico en tabletas.

### Palabras clave:

Losartán, plasma humano, cromatografía líquida de alta resolución, validación

## **Abstract**

### **Objectives:**

Two analytical procedures were developed and validated for use in therapeutic equivalence studies of losartan potassium tablets.

### **Methods:**

A procedure for the *in vitro* studies (dissolution profiles and content uniformity of tablets) proposed the development of a method for high resolution liquid chromatography whose conditions were: injection of 100  $\mu$ L, an octadecylsilane stationary phase, phosphate buffer (pH 3.0), acetonitrile (50:50, v/v) as mobile phase with a flow rate of 0.8 mL/min and a detection wavelength of 225 nm. The setting of bioanalytical procedure involved the solid phase extraction to 1 mL of human plasma.

Validation protocols were based on the guidelines of the International Conferences of Harmonization, the World Health Organization, the Food and Drug Administration and the European Medicines Agency.

### **Results:**

The two procedures were determined in detail. The validation of the methodology *in vitro* showed to be specific, precise and accurate with a linear calibration curve between 50 and 300 ng/mL.

For bioassay's procedure the solid phase extraction with divinylbenzene-N-vinylpyrrolidone and an eluent of methanol/acidified water to pH 2 (90:10, v/v), evaporation to dryness and the residue recovery mobile phase provided the best separation of the plasma proteins with respect to acetonitrile precipitation and liquid-liquid extraction.

This validation complied with the recommendations of international guidelines in terms of selectivity, stability of losartan potassium in spiked plasma (to 3 freeze-thaw cycles), precision, accuracy, calibration curve (50-300 ng/mL) and limit of quantification. This latter was  $50.0 \pm 3.5$  ng/mL in spiked plasma with a confidence level of 95 % in uncertainty.

### **Conclusion:**

Both procedures were appropriate characteristics for implementation thereof in therapeutic equivalence studies of losartan potassium tablets.

### **Keywords:**

Losartán, human plasma, high performance liquid chromatography, validation

## INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial es un importante factor de riesgo asociado a enfermedades cardiovasculares severas <sup>1</sup>. El losartán potásico es un antihipertensivo de primera línea que pertenece a los antagonistas de los receptores de angiotensina II <sup>2</sup>, el cual presenta baja permeabilidad, alta solubilidad y es reportado como de clase III por el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico <sup>3</sup>. Al presentar polimorfismo <sup>4,5</sup> y ser de alto riesgo sanitario, los productos multiorigen de losartán potásico requieren la verificación de la equivalencia farmacéutica y demostración clínica, de seguridad y eficacia, similar a la del producto original.

Para lograr los resultados confirmatorios de intercambiabilidad, se necesita la aplicación de ensayos que cuantifiquen el fármaco y reporten resultados confiables con una incertidumbre conocida de manera que, antes de su uso, los procedimientos analíticos deben estar validados, tal como lo recomiendan varios organismos internacionales <sup>6-9</sup>.

En el estudio de equivalencia terapéutica se verifica la calidad de los productos multiorigen y el producto de referencia; primero mediante los ensayos de uniformidad de contenido, disolución y potencia <sup>10</sup>; y si existe conformidad con la normativa, se continúa con otros estudios *in vitro* (perfiles de disolución) y posteriormente el ensayo farmacocinético en voluntarios sanos (o estudio *in vivo*).

Dentro de los aspectos específicos de los ensayos *in vitro*, es necesario considerar las condiciones de disolución para las tabletas de losartán potásico, dentro de las cuales se citan: un volumen de 900 mL de medio de disolución, aparato de disolución tipo II y una velocidad de agitación de 50 rpm, disposiciones dadas por la Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP por sus siglas en inglés) y la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) en 2007 <sup>11</sup>.

Previo al año 2008, la USP indicó al agua desaireada como el medio de disolución recomendado <sup>12</sup> para la evaluación *in vitro* de formas farmacéuticas de liberación inmediata, aunque en años más recientes la OMS refirió la utilización de tres medios de disolución a diferente pH en vez de agua <sup>1</sup>.

Una particularidad de los perfiles de disolución es el establecimiento de los tiempos de muestreo a los 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos <sup>7</sup> para fármacos de alta solubilidad, como es el caso del losartán potásico, lo cual lleva a trabajar con un amplio margen concentraciones y por tanto se podrían alcanzar valores de hasta 130 % de la cantidad de losartán potásico declarada por el fabricante en la formulación farmacéutica <sup>6, 8, 9</sup>.

Al haberse determinado el procedimiento analítico en forma detallada, se validará el mismo respecto a: 1) Especificidad, 2) Exactitud y precisión (repetibilidad y precisión intermedia), 4) Linealidad y rango <sup>6, 13</sup>.

Por otra parte, la determinación del fármaco en la matriz biológica escogida podría servir para valorar etapas farmacocinéticas que van desde la ingestión del medicamento y hasta la evaluación de la toxicidad en el organismo y por lo tanto se comprende la necesidad de contar, en la metodología analítica, con una amplia gama de concentraciones del losartán potásico <sup>7, 14</sup>. Así es que se recomienda incluir a la matriz del caso y validar en términos de: 1) Especificidad <sup>13</sup>/Selectividad <sup>7</sup>, 2) Estabilidad del analito (presente en las disoluciones patrón y en la matriz biológica) en las condiciones de uso y almacenamiento del ensayo, 3) Exactitud y precisión, 4) Función de respuesta (o curva de calibración o curva estándar) y 5) Límites de cuantificación y detección <sup>7</sup>.

Es recomendable el uso del procedimiento ya validado para realizar estudios piloto con unos pocos voluntarios sanos y posteriormente utilizarlo en los estudios de bioequivalencia propiamente dichos <sup>15</sup>.

Ahora bien, respecto a las etapas del ensayo cuali-cuantitativo, diversos autores incluyen para las tabletas el muestreo de las tabletas, la disolución con metanol o agua, la filtración y finalmente una determinación ya sea por espectrofotometría UV-Vis <sup>16, 17</sup> o por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) <sup>18</sup>.

En cuanto al bioensayo en plasma, se enuncia la separación de los compuestos endógenos de esa matriz biológica mediante las modalidades de precipitación con acetonitrilo <sup>19</sup>, extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida con diversos sustratos (C-2 <sup>20</sup> y C-8 <sup>21, 22</sup>), además de la microextracción en fase sólida con el co-polimérico de ácido metacrílico –

dimetacrilatoglicoletileno <sup>19</sup>. Se reportan detecciones en HPLC en espectrometría de masas <sup>23, 24</sup>, espectrofotometría de fluorescencia <sup>21, 25-27</sup> y de absorción en el ultravioleta <sup>20, 22, 28</sup>.

Las condiciones de separación cromatográfica en fase inversa presenta fases estacionarias de octadecilsilano (C-18 <sup>20,21, 29</sup>) y Ciano <sup>30-32</sup>.

Como una condición particular de los estudio de equivalencia terapéutica se tiene la posibilidad de cuantificar el fármaco y los metabolitos de importancia clínica significativa. Sin embargo en el caso del losartán potásico y su principal metabolito, existen opiniones divergentes. Para evidenciar el resultado terapéutico, la FDA sugiere la evaluación simultánea de losartán y del metabolito activo 5-ácido carboxílico de losartán (E-3174) <sup>32</sup>. Empero, se conoce que este metabolito activo se forma a través de un producto intermedio y no directamente a partir del losartán. Los datos del E-3174 no siempre son representativos de la velocidad de absorción del fármaco propiamente dicho y desde el punto de vista farmacocinético los estudios de equivalencia terapéutica pueden realizarse sin tomar en cuenta a este metabolito <sup>33, 34</sup>.

Sustentado en esta última consideración y debido a la falta de acceso a este compuesto químico, el presente estudio no incluyó al E-3174.

El trabajo realizado estimó el desarrollo de un procedimiento de ensayo para demostrar la calidad de las formulaciones farmacéuticas *in vitro* (uniformidad de contenido, potencia y perfiles de disolución) y otro para determinar la concentración de losartán potásico en muestras plasmáticas. Ambos procedimientos fueron validados con el fin de poder aplicarlos en futuros estudios de equivalencia terapéutica.

## MÉTODOS

Se plantearon cuatro etapas:

1. Desarrollo del procedimiento de análisis de losartán potásico para los ensayos de uniformidad de contenido, potencia y perfiles de disolución
2. Desarrollo del procedimiento bioanalítico para la determinación de losartán potásico en plasma humano

3. Validación del procedimiento de análisis de losartán potásico para los ensayos de uniformidad de contenido, potencia y perfiles de disolución
4. Validación del procedimiento bioanalítico para la determinación de losartán potásico en plasma humano

*1. Desarrollo del procedimiento de análisis de losartán potásico para los ensayos de uniformidad de contenido, potencia y perfiles de disolución*

Dado que el laboratorio de análisis cuenta con algunas limitaciones y con el fin de verificar la viabilidad de los objetivos del estudio, se prefirió valorar las condiciones experimentales de algunos autores como Nagavalli y colaboradores <sup>16</sup>, Hassan y colaboradores <sup>17</sup> y Vijayalakshmi y colaboradores <sup>18</sup>.

Para ello se contó con los siguientes equipos: balanza analítica marca Explorer Pro modelo EP 214C, cromatógrafo líquido de alta resolución Agilent serie 1100 con detector de longitud de onda variable en la región UV-Vis, agitador vortezado y entre otros materiales se citaron: matraces aforados, pipetas, micropipetas y demás de menor relevancia.

El patrón de referencia de losartán potásico se adquirió de calidad USP, código de lote FOD287 (con pureza certificada de 99,8 mg/mg como losartán).

Los principales reactivos fueron: agua, metanol y acetonitrilo, todos de calidad HPLC.

Los demás productos químicos empleados fueron de calidad analítica.

Las condiciones experimentales a estudiar, para el establecimiento del procedimiento de ensayo por HPLC fueron: la comparación de fases estacionarias ciano y de octadecilsilano (C18) y la composición adecuada de los componentes de la fase móvil (metanol, acetonitrilo, soluciones amortiguadoras con fosfatos, trietanolamina, a distintos valores de pH, distintas proporciones de solventes, etc.) y la longitud de onda de máxima absorción para la detección.

Luego de establecer las condiciones cromatográficas para la cuantificación se estimaron las concentraciones para establecer la curva de calibración a usar en los ensayos *in vitro*. También, previo a la validación de la metodología, se realizó el estudio de la estabilidad de las soluciones de losartán potásico disueltas en distintos solventes y diferentes condiciones de almacenamiento.

Las soluciones de losartán potásico se prepararon de la siguiente manera:



Solución madre del patrón: Se pesó analíticamente 25 mg de losartán potásico patrón de referencia en un matraz aforado de 25 mL, se disolvió en metanol y se aforó con el mismo solvente para obtener una concentración de 1000 µg/mL. Se mantuvo en refrigeración durante un mes.

Solución patrón de trabajo: De la solución madre del patrón se midió una alícuota de 1 mL y se llevó con agua hasta un volumen exacto de 10 mL. Se conservó entre 2 y 8 °C durante una semana.

Soluciones hijas en fase móvil: Se midió alícuotas de 12,5; 18,75; 25; 37,5 y 50 microlitros de la solución patrón de trabajo. Esos volúmenes se colocaron en matraces aforados con capacidad de 25 mL, respectivamente, para obtener concentraciones de losartán potásico en fase móvil de 50, 75, 100, 150, 200 y 300 ng/mL. Cada vez se llevó a aforo y en todos los casos se preparó la gama de soluciones una vez a la semana y la conservación fue en refrigeración, entre 2 y 8 °C.

Las soluciones hijas se analizaron una vez por día durante 8 días. La concentración que se reportó luego de las diluciones correspondientes se denominó concentración nominal o teórica.

Con las concentraciones nominales y las señales analíticas de los picos cromatográficos se estableció la curva de calibración de cada día del estudio. Se calculó la ecuación matemática. Al terminar el estudio se calculó la precisión de las pendientes correspondientes a días consecutivos. A la señal analítica obtenida en cada inyección se le aplicó la ecuación matemática de la curva de calibración de ese día, con el fin de obtener la concentración encontrada. Con esos últimos resultados se calculó la precisión intermedia en términos de porcentaje de desviación estándar relativa (DSR, por sus siglas en inglés).

## 2. *Desarrollo del procedimiento bioanalítico para la determinación de losartán potásico en plasma humano*

Se utilizó los equipos, materiales y reactivos descritos en el desarrollo del procedimiento de análisis de losartán potásico para ensayos *in vitro*. Sin embargo, se incorporó el equipo para operar bajo presión la extracción en fase sólida y cartuchos de tres sustratos: ciano, C18 y divinilbenceno-N-vinilpirrolidona.

Por su parte, el plasma humano se obtuvo siguiendo la normativa ético-científica correspondiente, según los protocolos del Banco de Sangre de la Caja Costarricense del Seguro Social (sita en Zapote, San José, Costa Rica) y las autorizaciones respectivas del Comité Ético Científico de la Universidad de Costa Rica.

Para el desarrollo del procedimiento bioanalítico se compararon algunas técnicas descritas por varios autores científicos <sup>19, 35 - 38</sup> y siguiendo los criterios de la normativa planteada por varios organismos internacionales. <sup>39,40</sup>.

Se enfatizó en las técnicas de separación de las proteínas plasmáticas, se planteó un procedimiento bioanalítico y estimaron algunos ajustes metodológicos a realizar previos a la validación.

Las técnicas de separación se examinaron en base a la factibilidad de la técnica en sí, el tiempo de ejecución, el porcentaje de recuperación del analito y la separación de los compuestos endógenos del plasma. Se probó la precipitación con acetonitrilo, la extracción líquido - líquido (con acetato de etilo y con cloroformo) y la extracción en fase sólida con 3 sustratos diferentes.

Luego de obtenidas las mejores condiciones, se señalaron las etapas del procedimiento.

Con la aplicación del procedimiento a plasmas adicionados con el patrón de referencia de losartán potásico se probó la señal analítica del medicamento respecto a los compuestos endógenos del plasma; la relación señal/ruido; la eficiencia de la columna analítica; la simetría de pico cromatográfico; la precisión de concentraciones plasmáticas con relación señal/ruido superior a 3 con el cálculo del porcentaje de la DSR. Además de esos resultados, por tratarse de concentraciones con unidades de ng/mL, consideradas como concentraciones de trazas, de partes por billón, en forma adicional, se evidenció la precisión con el coeficiente de variación (CV) calculado con la ecuación de Horwitz <sup>38</sup>, donde  $CV = 2^{(1-0,5\log C)}$  y C significó la concentración en g/mL expresada en notación exponencial.

Finalmente la estabilidad del losartán potásico (presente en la matriz biológica) a dos concentraciones (50 y 200 ng/mL) con 3 réplicas por grupo midiendo el error relativo % respecto a la concentración nominal o teórica.

En cada grupo se probó el efecto de cinco condiciones distintas de temperatura y tiempo de espera teniendo como variables el análisis inmediato; conservación a temperatura ambiente por

24 horas; plasmas que sufrieron un ciclo de congelación por 24 horas y posterior descongelación; dos ciclos de congelación/descongelación y tres ciclos de congelación/descongelación. Se calculó el porcentaje de la diferencia entre el valor promedio de concentración encontrada y la concentración nominal o teórica del promedio obtenido por grupo.

### 3. Validación del procedimiento de análisis de losartán potásico para los ensayos de uniformidad de contenido, potencia y perfiles de disolución

El procedimiento se validó respecto a los siguientes parámetros: 1) Especificidad, 2) Exactitud y precisión (repetibilidad y precisión intermedia), 4) Linealidad y rango <sup>6.13</sup>.

Para la especificidad se realizaron 6 réplicas del solvente y las señales cromatográficas se compararon con la del losartán potásico en ese solvente. En los cromatogramas del solvente se estudió la inexistencia de una señal analítica al tiempo de retención de este medicamento y la ausencia de interferencias.

Para estimar la precisión, se evaluó la repetibilidad y la precisión intermedia usando 3 concentraciones hijas de 50, 150 y 300 ng/mL. Se analizó la repetibilidad con seis inyecciones por concentración analizadas en un mismo día. Para precisión intermedia, cada concentración se analizó una vez por día hasta completar 6 días. Se determinó la DSR del área de pico cromatográfico.

La exactitud se infirió de los resultados de los cromatogramas obtenidos en los estudios de precisión y de linealidad <sup>6</sup>. La exactitud se expresó como porcentaje de la diferencia entre el valor promedio obtenido y la concentración nominal o teórica de las concentraciones patrón en fase móvil <sup>6</sup>, (conocido también como porcentaje de error relativo). Las guías internacionales no han establecido criterios absolutos sobre los valores de aceptación de los resultados de validación de los procedimientos *in vitro*. A pesar de ello, se contó con pautas orientadoras como las presentadas por Joachim Ermer <sup>41</sup> que resultaron ser, en muchos casos, dependientes del número de muestras analizadas, de las concentraciones y de los límites máximos de las especificaciones de los ensayos (en este estudio, los de uniformidad de contenido, potencia y perfiles de disolución).

Para demostrar la linealidad y el rango de la misma, se utilizaron 3 series de concentraciones de losartán potásico en fase móvil con valores de 50, 75, 100, 150, 200 y 300 ng/mL. Se verificó la uniformidad de varianzas mediante el test de Hartley ( $p < 0,05$ ), se aplicó el método de mínimos cuadrados, verificando el ajuste lineal mediante el test de Fisher. También se estableció la igualdad estadística del intercepto de la recta respecto al valor cero aplicando el test bilateral de  $t$ .

#### 4. Validación del procedimiento bioanalítico para la determinación de losartán potásico en plasma humano

Durante la validación se verificaron las características de: 1) Selectividad [1], 2) Exactitud y precisión, 3) Curva de calibración (o función de respuesta o curva estándar) y 4) Límites de cuantificación según lo recomendado por normativas europeas [15].

También se estimó la incertidumbre [43] asociada al resultado del análisis de la concentración plasmática más baja, de 50 ng/mL.

A pesar de tener gran importancia para la validación, la estabilidad del analito en la matriz biológica no formó parte de esta validación, pues se examinó durante el desarrollo del procedimiento bioanalítico.

Para la demostración de la selectividad, se aplicó el procedimiento bioanalítico a seis plasmas sin adición de medicamento y al plasma adicionado de concentración de 50 ng/mL. Este proceder lo especificó la FDA en el 2001 [1].

En los cromatogramas de los plasmas sin adición se buscó verificar la inexistencia de señal analítica al tiempo de retención del analito A [7].

En forma adicional, se estableció la ausencia del efecto matriz al demostrar estadísticamente, con una prueba  $t$  [43], el paralelismo de las pendientes de las curvas de calibración de muestras plasmáticas y de soluciones estándar en fase móvil [42]. Las curvas de calibración comparadas fueron las obtenidas en la validación de los dos procedimientos (*in vitro* e *in vivo*) que componen este estudio.

La exactitud, precisión, curva de calibración, su rango y el límite de cuantificación se estudiaron bajo las condiciones descritas anteriormente en la validación del procedimiento *in vitro*, pero con plasmas adicionados con el patrón de referencia.

Los resultados obtenidos en la validación se compararon con los valores recomendados por autores reconocidos <sup>44-46</sup> o por entes internacionales <sup>6, 39, 47</sup>, según cada caso.

Adicionalmente, se realizó la estimación de la incertidumbre tomando en consideración la determinación de losartán potásico en un plasma de 50 ng/mL (analizado el día de la evaluación de la curva de calibración en plasma), y que fuera la concentración más baja utilizada y con ello se pretendió involucrar las mayores magnitudes de error asociadas al resultado final. De manera adicional, se contempló la incorporación del porcentaje de recuperación <sup>48</sup>.

Se reportó la ecuación matemática:  $C \text{ (ng/mL)} = (\text{área de pico cromatográfico} - \text{intercepto de la ordenada en el origen}) / \text{pendiente}$ . La ordenada en el origen y la pendiente correspondieron a la curva de calibración en fase móvil utilizada el día de la evaluación de la curva de calibración en plasma, dado que las concentraciones fueron conocidas y confiables ya que fueron preparadas a partir de la pesada del patrón de referencia.

El cálculo de la incertidumbre tuvo una aproximación de validación intralaboratorial y se evaluaron seis etapas independientes ligadas al resultado del ensayo: establecimiento de la ecuación matemática para evaluar fuentes de incertidumbre del mesurando; determinación de las fuentes de incertidumbre de acuerdo a la ecuación; evaluación del aporte de los componentes asociados a cada fuente de incertidumbre; cálculo de la incertidumbre combinada; cálculo de la incertidumbre expandida (con un factor de cobertura de 2) y reporte de resultado de la concentración plasmática de adición de 50 ng/mL.

## RESULTADOS

### *1. Desarrollo del procedimiento de análisis de losartán potásico para los ensayos de uniformidad de contenido, potencia y perfiles de disolución*

En la selección de la fase estacionaria, la ciano proporcionó valores de menor calidad que la C-18 respecto a la simetría y la eficacia de pico cromatográfico del losartán potásico.

La mezcla de solventes de acetonitrilo – solución amortiguadora de fosfatos a pH 3,0 (50:50, v/v) mostró los mejores resultados cromatográficos que las otras mezclas estudiadas.

La longitud de onda de máxima absorción obtenida por el losartán potásico disuelto en la fase móvil mencionada es de 225 nm.

La señal analítica con mayor precisión se dio para el área de pico cromatográfico en comparación con la altura de la señal cromatográfica.

Con estas condiciones definidas, se establecen las condiciones cromatográficos para la determinación y cuantificación de losartán potásico en los ensayos *in vitro*. Ellas fueron:

Inyección de 100 microlitros con 15°C en la cabina del inyector

Fase móvil acetonitrilo – solución amortiguadora de fosfatos a pH 3,0 (50:50, v/v) a una velocidad de flujo de 0,8 mL/min

Fase estacionaria C-18 marca Merck, como relleno de la columna analítica (4 x 250 mm, 4 µm) y de la columna de guarda (4 x 4 mm, 4 µm) a una temperatura de 15 °C.

Longitud de onda de 225 nm

Temperatura ambiente de 15 °C

Los resultados cromatográficos de las inyecciones de las soluciones hijas obtenidas durante 8 días seguidos, en área de pico cromatográfico, fueron puntualizados en la tabla 1.

Tabla 1. Áreas de pico cromatográfico de las soluciones de losartán potásico en fase móvil por concentración evaluada

Concentración nominal o teórica (ng/mL)	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
51	21,6	21,3	22,4	23,5	20,4	20,7	22,3	23,4
76	29,5	30,5	30,4	32,6	29,3	28,7	28,4	28,7
102	42,4	42,5	43,0	42,9	40,9	43,1	40,5	37,9
153	65,1	64,8	64,9	67,2	63,5	63,6	62,0	58,5
204	89,1	90,8	91,3	91,1	80,2	81,1	83,6	84,1

Concentración nominal o teórica (ng/mL)	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
305	136,2	138,0	134,1	137,1	120,6	122,7	122,5	118,6

Fuente propia

La tabla 2 hizo referencia a la precisión inter día obtenida con las pendientes de la curva de calibración de cada día, durante una semana de trabajo

Tabla 2. Precisión de las pendientes de curvas de calibración de losartán potásico en fase móvil obtenidas durante cinco días consecutivos

Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Promedio	DSR
0,4406	0,4134	0,4122	0,4095	0,4190	0,4189	3,0

Fuente propia

Para cada señal analítica de la tabla 1 se aplicó la ecuación matemática de la curva de calibración respectiva, según su día de ensayo para obtener la concentración calculada. Dichos valores, presentados en la tabla 3, formaron parte del estudio de estabilidad.

Tabla 3. Concentraciones calculadas de losartán potásico en fase móvil del estudio de estabilidad

Concentración nominal o teórica (ng/mL)	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
51	55,6	55,0	54,8	55,2	46,0	50,6	55,3	58,3
76	72,9	74,8	72,7	75,3	70,5	70,5	70,4	71,9
102	101,2	100,7	100,8	98,0	102,3	106,4	100,4	95,5
153	150,9	148,8	149,7	151,7	164,4	157,5	153,7	148,4
204	203,5	204,8	208,6	204,5	210,3	201,0	207,2	214,0
305	306,6	306,6	304,2	306,1	321,2	304,7	303,7	302,5

Fuente propia

La tabla 4 contó con los insumos de la tabla 3 para expresar la precisión inter-día por promedio de concentración, del estudio de estabilidad.

Tabla 4. Precisión inter-día de soluciones de losartán potásico en fase móvil del estudio de estabilidad

Concentración nominal o teórica (ng/mL)	Promedio de las concentraciones calculadas (ng/mL)	Precisión (DSR %)
51	53,9	7,05
76	72,4	2,65
102	100,7	3,13
153	153,1	3,56
204	206,8	2,02
305	306,9	1,93

Fuente propia

La tabla 5 del estudio de estabilidad presentó un resumen con la siguiente información:

- Datos crudos de la respuesta cromatográfica obtenida por concentración en cada semana evaluada.
- Valores de concentración calculada respecto al área cromatográfica reportada.
- Porcentaje de error relativo de cada concentración calculada de losartán potásico tomando como referencia la concentración nominal o teórica.

Tabla 5. Resumen de los resultados de la estabilidad de soluciones hijas preparadas cada semana y evaluadas durante un mes



Concentración nominal o teórica (ng/mL)	Área pico cromatográfico (mUA*s)				Concentración calculada (ng/mL)				Porcentaje de error relativo			
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>
51,1	25,2	25,2	20,5	21,9	53,0	51,4	48,0	50,1	3,8	0,5	-6,0	-1,9
76,6	35,4	38,2	31,3	33,7	74,7	79,9	72,0	76,4	-2,6	4,2	-6,0	-0,4
102,2	50,1	48,1	44	44,2	105,9	101,6	100,2	99,8	3,6	-0,6	-1,9	-2,4
153,3	70,4	68,7	71,8	67,9	148,9	146,8	162,0	152,5	-2,8	-4,2	5,7	-0,5
204,4	96	96,3	94,9	95,3	203,2	207,4	213,3	213,5	-0,6	1,5	4,4	4,5
306,6	145,6	141,8	133,3	135	308,5	307,2	298,6	301,9	0,6	0,2	-2,6	-1,5
Número de semana	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>

Fuente propia

## 2. Desarrollo del procedimiento bioanalítico para la determinación de losartán potásico en plasma humano

Durante la exploración de la mejor técnica de separación de proteínas plasmáticas del losartán potásico, se obtuvo el mejor resultado con el sustrato de divinilbenceno-N-vinilpirrolidona en extracción en fase sólida. Esto en base a la facilidad en la aplicación de esta técnica, un corto tiempo de ejecución, un alto porcentaje de recuperación (plasma añadido con losartán potásico a 150 ng/mL obtuvo un valor de 85,95%) y una adecuada separación cromatográfica del losartán potásico respecto a los compuestos endógenos del plasma. En cuanto a la precipitación, con acetonitrilo se produjo muy baja recuperación del losartán potásico; el porcentaje de extracción probado en las extracciones líquido – líquido con acetato de etilo y con cloroformo fue en ambos casos inferior al 60% y con valores imprecisos de un 35 % de error relativo en una concentración de 150 ng/mL en plasma.

En la extracción en fase sólida se evidenció los menores rendimientos con los soportes ciano y C 18, por tanto se escogió el de divinilbenceno-N-vinilpirrolidona.

El plasma adicionado se preparó de la siguiente manera: a una alícuota de 950 microlitros de plasma se añadió 50 microlitros de la solución acuosa de patrón de adición correspondiente. Se agitó durante 30 segundos en un agitador vortezado. Las concentraciones que se prepararon en plasma fueron de valores iguales a 50, 75, 100, 150, 200 y 300 ng/mL.

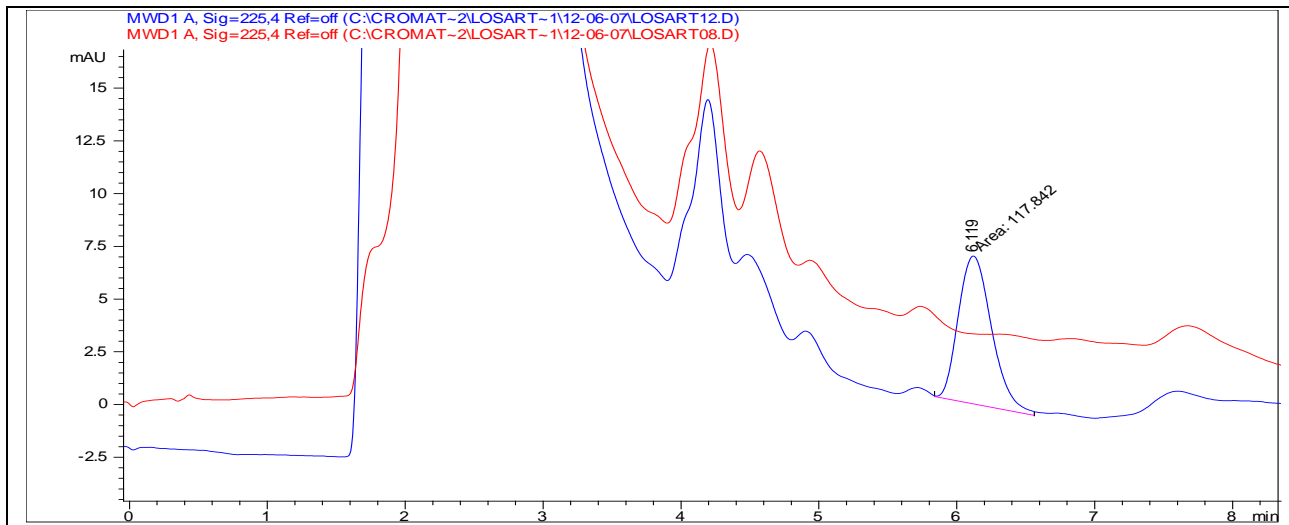
El procedimiento bioanalítico incluyó como etapas las enumeradas a continuación:

1. Acondicionamiento con 2 mL MeOH y luego con 1 mL de solución amortiguadora de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20 mM a pH 7,5.
2. Aplicación y succión de 1 mL de muestra plasmática.
3. Un enjuague con 3 mL  $\text{H}_2\text{O}$  y posterior secado con aire.
4. Elución del analito con 1 mL de la mezcla MeOH / agua acidificada a pH 2 (9:1)
5. Evaporación hasta sequedad con  $\text{N}_2$  a 40 °C.
6. Recuperación del residuo seco con 0,5 mL de fase móvil.
7. Agitación durante 1 minuto en agitador vortezado.
8. Condiciones cromatográficas similares a las del procedimiento para la determinación de losartán potásico en ensayos in vitro, con la salvedad del cambio de la columna de guarda cada 100 inyecciones.

Con la aplicación de esta metodología, la separación entre el pico cromatográfico de losartán potásico y la señal asignada a los compuestos endógenos del plasma se evidenció en la figura 1. En la superposición de cromatogramas se encontró que el de color azul fue del losartán potásico a 150 ng/mL en plasma y el de color rojo correspondió a un plasma sin adición. Se reconoce que la señal del analito no se encuentra presente en el plasma sin adición y que existe una separación respecto a los picos cromatográficos de los compuestos endógenos que son más polares que el analito. Cabe señalar que la escala de absorbancia osciló entre -2,5 y 15 mUA.

Figura 1. Superposición de cromatogramas de un plasma con adición de adicionado de losartán potásico de 150 ng/mL y otro sin adición.

<b>12-06-07</b> Plasma blanco y plasma 150 ng/mL
--



Fuente propia

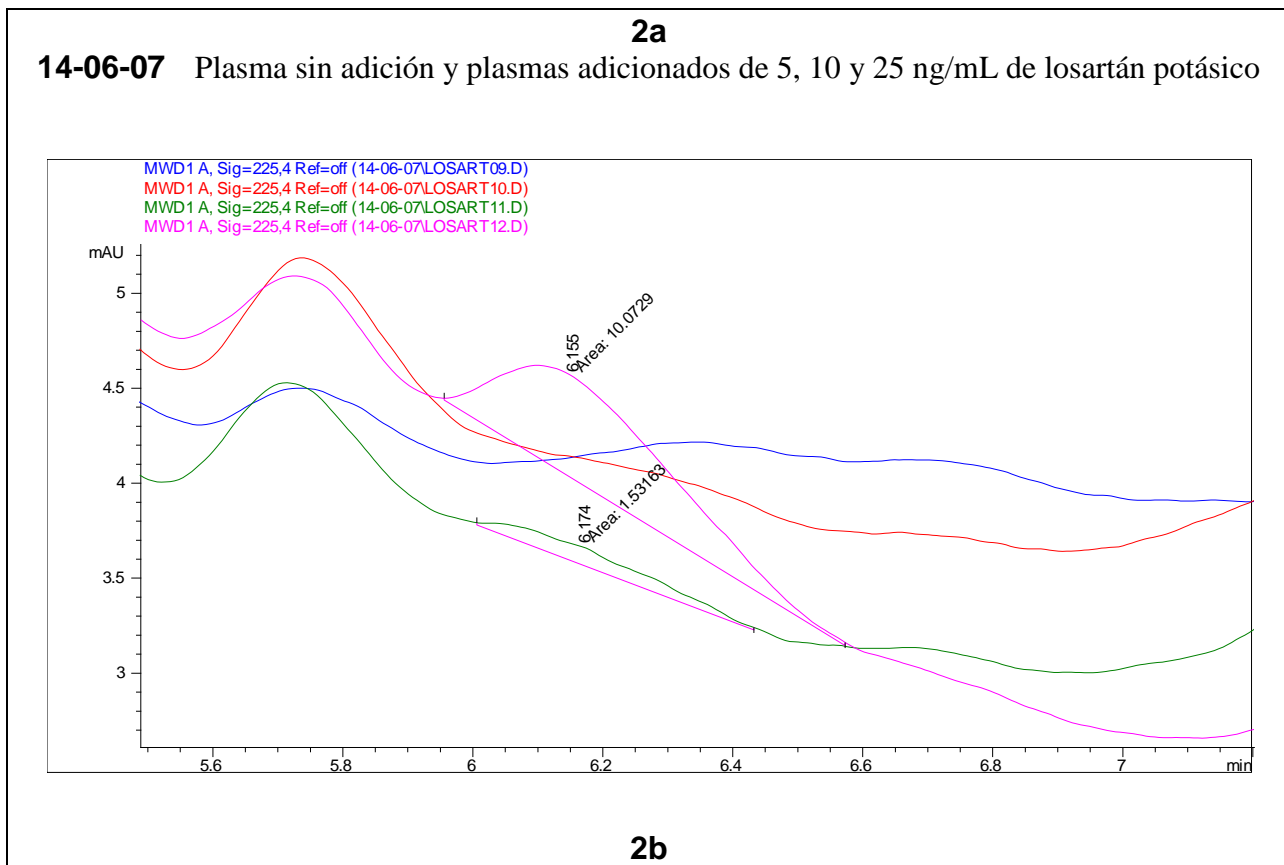
Otra prueba preliminar evaluó las señales analíticas de losartán potásico en plasmas adicionados a bajas concentraciones correspondientes a 5, 10, 25 ng/mL y las de un plasma sin adición. Todas ellas se reconocieron en la superposición de cromatogramas de la figura 2a) bajo la siguiente codificación: en azul el cromatograma de un plasma sin adición, en rojo el plasma adicionado a 5 ng/mL, en verde a 10 ng/mL (área de 1.53163 mUA\*s) y en rosado a 25 ng/mL (área de 10.0729 mUA\*s).

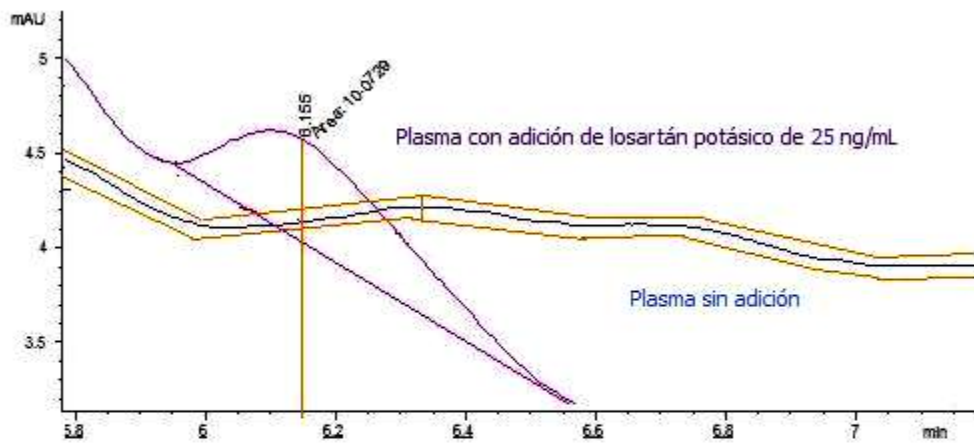
La figura 2b) presentó la valoración de la relación señal/ruido. Se midió 0,70 mUA de altura en el pico cromatográfico de plasma de 25 ng/mL y de 0,2 mV en el promedio de altura de los trazos del cromatograma de plasma sin adición. Dichas mediciones se perciben en la figura 2b). El cálculo de la relación señal sobre ruido aportó el valor de 3,5.

Figura 2.

2a) Superposición de cromatogramas de plasmas adicionados con losartán potásico a 5, 10 y 25 ng/mL y uno sin adición de losartán potásico.

2b) Medición del ruido cromatográfico en un plasma sin adición y de la señal de un plasma de 25 ng/mL en losartán potásico





Altura promedio del ruido = 0,2 mUA |

Altura del pico cromatográfico de losartán potásico en plasma de 25 ng/mL = 0,7 mUA

Relación de la señal/ruido = 0,7/0,2 = 3,5



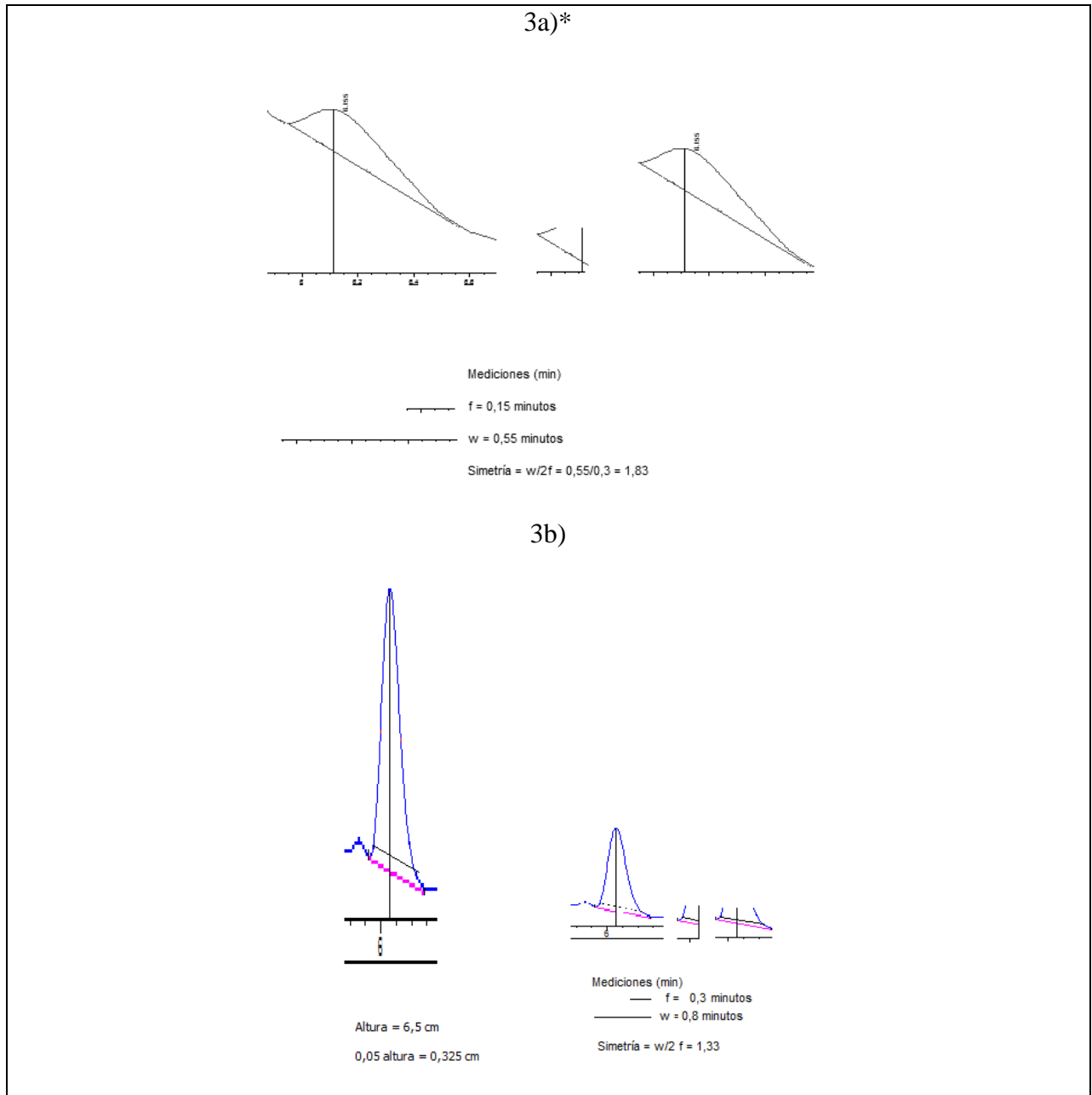
Fuente propia

La determinación de la simetría de pico cromatográfico de losartán potásico en plasma se evaluó a 50 y 150 ng/mL con los picos cromatográficos de las figuras 3a) y 3b). Hubo mediciones en escala de minutos, tanto del frente de pico como del ancho del mismo a 0,05 de la altura de pico y se contemplaron en la figura 3.

Figura 3. Medición de la simetría de pico cromatográfico de losartán potásico en plasma:

3a) a 50 ng/mL

3b) a 150 ng/mL



\* La altura de pico cromatográfico es tan baja que no se pudo trazar la base a 0,05 de la altura  
Fuente propia

Como se mostró en la figura 3 a), para la concentración de 50 ng/mL la simetría de pico fue de 1,83 y en la figura 3b) la simetría de 1,33 se presentó para la concentración plasmática de 150 ng/mL.

Con las mediciones de la figura 3b) se estimó la eficacia mediante el cálculo del número de platos teóricos con la ecuación  $N = 16 \cdot (6,198 \text{ min} / 0,8 \text{ min})^2$ . El resultado fue igual a 960,3801.

Los resultados de precisión en repetibilidad (n = 6) para la concentración de 50 ng/mL se expusieron en la tabla 6.

Tabla 6. Precisión de la repetibilidad en altura y área de pico cromatográfico para una concentración de losartán potásico en plasma de 51,4 ng/mL.

Número de muestra	Altura de pico cromatográfico (mUA)	Área de pico cromatográfico (mUA*s)
1	1,4	32,1
2	1,5	31,8
3	1,6	32,3
4	1,2	28,2
5	1,5	30,9
6	1,4	29,1
Promedio	1,4	30,7
DS	0,1	1,7
DSR%	9,5	5,6

Fuente propia

Con la aplicación de la ecuación de Horwitz para la concentración plasmática de 50 ng/mL el CV fue igual a 25,1 % y para 200 ng/mL fue de 20,4 %. Esos son los límites máximos permitidos de coeficiente de variación (o DSR) a esas concentraciones.

Por otra parte, el resumen de los resultados del estudio de estabilidad del losartán potásico en plasma bajo distintas condiciones se registró en la tabla 7:

Tabla 7. Resumen de los resultados de la estabilidad de losartán potásico en plasma

Concentración teórica (ng/mL)	Promedio de los valores de concentración encontrada (ng/mL)				
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
50,0	52,9	53,5	56,4	50,8	47,2
204,4	199,4	189,9	195,1	176,8	170,2

Concentración teórica (ng/mL)	Porcentaje de la diferencia entre el valor promedio de concentración encontrada y la concentración nominal o teórica				
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
50,0	5,7	7,1	12,7	1,6	-5,6
204,4	-2,4	-7,1	-4,6	-13,5	-16,7

Grupo 1: Análisis inmediato  
 Grupo 2: 24 horas a temperatura ambiente  
 Grupo 3: 1 ciclo de congelación-descongelación  
 Grupo 4: 2 ciclos de congelación-descongelación  
 Grupo 5: 3 ciclos de congelación-descongelación

Fuente propia

### 3. Validación del procedimiento de análisis de losartán potásico para los ensayos de uniformidad de contenido, potencia y perfiles de disolución

Los seis cromatogramas de la fase móvil usada como solvente no presentaron ninguna interferencia respecto a la señal analítica del losartán potásico inyectado a una concentración media de 150 ng/mL.

El resumen de la estimación de la precisión intra-día e inter-día se brindó en las tablas 8 y 9 para las tres concentraciones evaluadas.



Tabla 8. Repetibilidad (precisión y exactitud intra-día) del procedimiento de análisis de losartán potásico *in vitro*

Concentración nominal (ng/mL)		Área de pico cromatográfico (mUA*s)	Exactitud (Intervalo de % error relativo)
50,9	Promedio DSR %	21,7 0,86	-1,62 a 0,69
152,7	Promedio DSR %	65,2 0,64	-0,61 a 0,92
305,4	Promedio DSR %	137,2 1,27	-2,24 a 1,12

Fuente propia

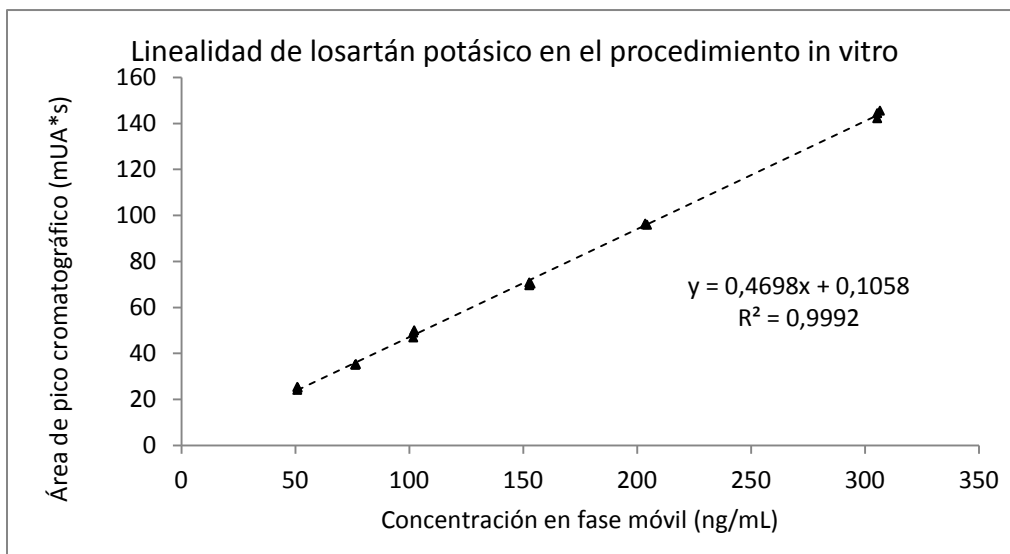
Tabla 9. Precisión y exactitud inter-día del procedimiento de análisis de losartán potásico para los ensayos *in vitro*

Concentración nominal (ng/mL)		Área de pico cromatográfico (mUA*s)	Exactitud (Intervalo del % error relativo)
50,9	Promedio DSR %	21,8 5,3	-6,11 a 6,26
152,7	Promedio DSR %	69,1 6,46	-7,92 a 10,47
305,4	Promedio DSR %	136,1 5,96	-9,87 a 7,25

Fuente propia

La linealidad de la concentración de losartán potásico en fase móvil (ng/mL) y el área de pico cromatográfico (mUA\*s) se apreció en la figura 4 y los datos crudos se mostraron en la tabla 10.

Figura 4. Linealidad de losartán potásico en el procedimiento *in vitro*.



Fuente propia

Tabla 10. Datos obtenidos en la verificación de la linealidad del procedimiento *in vitro*.

Concentración de losartán potásico en fase móvil (ng/mL)	Área de pico cromatográfico (mUA*s)
50,9	24,2
50,9	25,5
51,1	25,2
76,3	35,2
76,3	35,2
76,6	35,4
101,8	47,0
101,8	49,1
102,2	50,1
152,7	69,7
152,7	70,9
153,3	70,4

Concentración de losartán potásico en fase móvil (ng/mL)	Área de pico cromatográfico (mUA*s)
203,6	96,5
203,6	96,2
204,4	96,0
305,4	142,3
305,4	144,5
306,6	145,6

Fuente propia

Los resultados de las pruebas estadísticas acerca de la linealidad fueron las siguientes:

En la ecuación de la curva de calibración se encontró una pendiente de 0,4698, un intercepto de la ordenada en el origen de 0,1058 y un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) igual a 0,9992.

La prueba de Hartley ( $p$  0,05) presentó un  $r$  experimental de 211,75 y el de la tabla de 266.

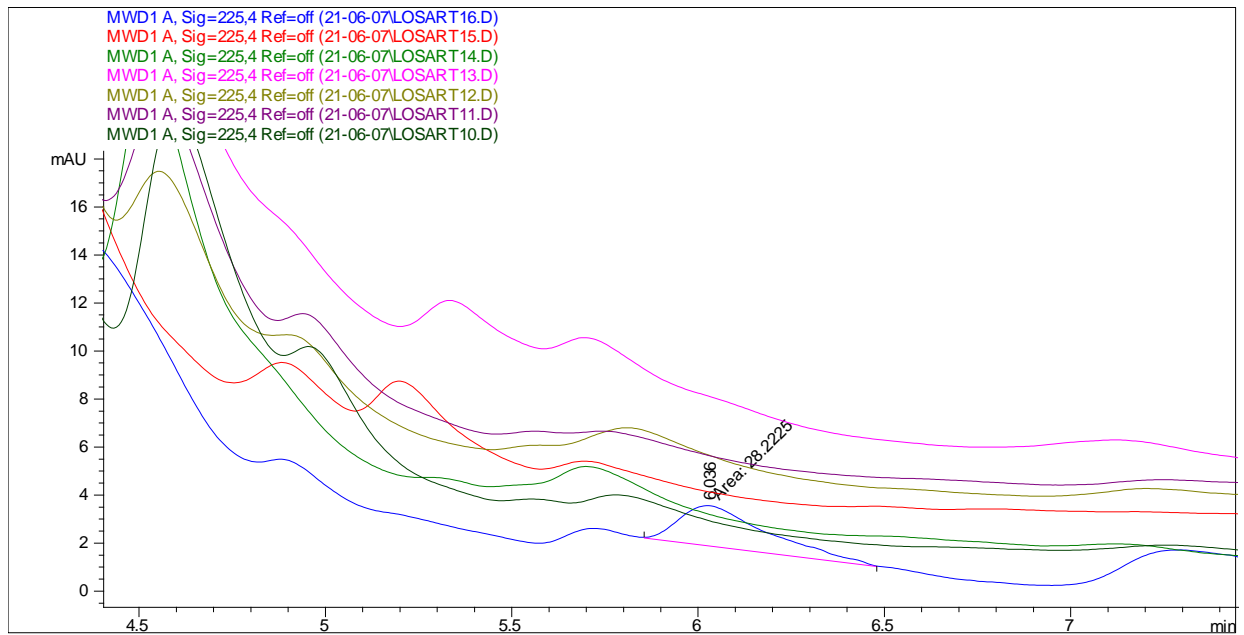
El ensayo de Fisher evidenció un valor  $F$  experimental de 18856 y un valor de la tabla igual a 19,43.

El test bilateral de  $t$  mostró una  $t$  experimental de 0,18 y en el valor de la tabla  $t$  fue de 2,12.

#### *4. Validación del procedimiento bioanalítico para la determinación de losartán potásico en plasma humano*

Los resultados obtenidos al analizar seis plasmas independientes y sin adición se presentaron en la figura 5 mostrando una superposición de cromatogramas, donde la línea azul correspondió al plasma de 50 ng/mL cuya señal, con un tiempo de retención de 6,036 minutos, tuvo una integración de 28,2225 mUA\*s. Las otras líneas correspondieron a cromatogramas de seis plasmas independientes y sin adición del medicamento.

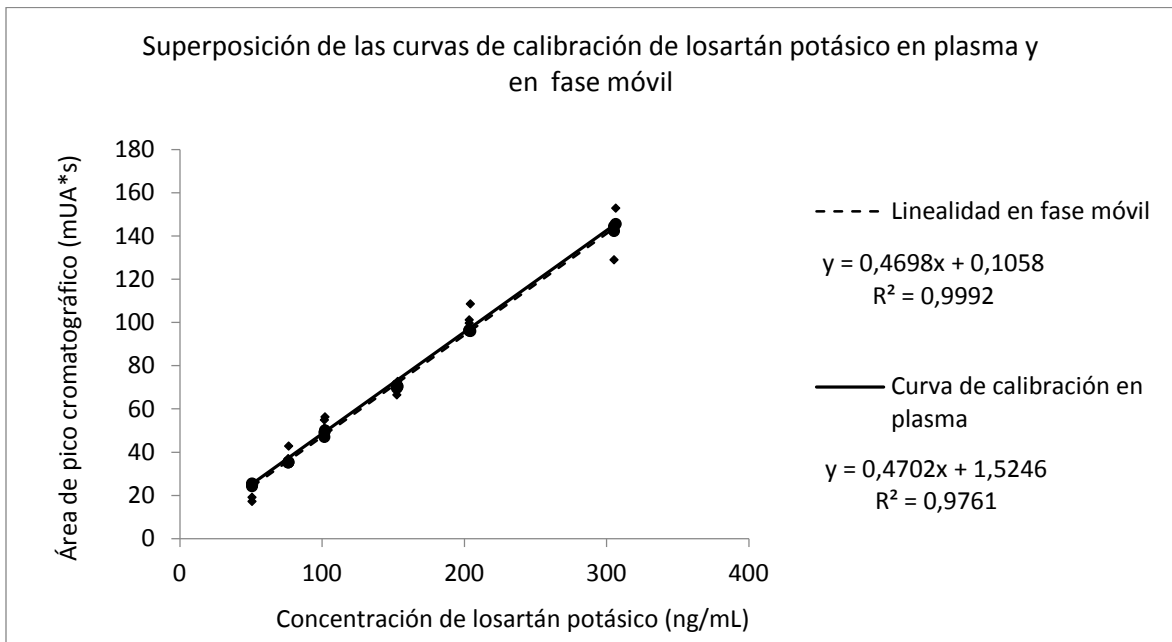
Figura 5. Superposición de cromatogramas de seis plasmas sin adición y uno adicionado con losartán potásico a 50 ng/mL



Fuente propia

La ausencia del efecto de la matriz, se observó gráficamente en la figura 6 con el paralelismo de las curvas de calibración de losartán potásico en plasma y en fase móvil.

Figura 6. Comparación de las curvas de calibración de losartán potásico en plasma y en fase móvil



Fuente propia

La tabulación de los datos correspondientes al estudio de la igualdad estadística de los valores de las pendientes de las curvas de calibración se encontró en la tabla 11. Como resultado se observó que el valor de probabilidad de  $t$  experimental es superior a 0,05 y la  $t$  crítica es superior a la  $t$  experimental.

Tabla 11. Valores estadísticos necesarios para evaluar la igualdad de pendientes de las curvas de calibración de losartán potásico (en fase móvil y en plasma)

Pendiente de linealidad en fase móvil (m FM)	0,4698302
Desviación estándar de la pendiente de linealidad en fase móvil (Sm FM)	0,00342153
Pendiente de la curva de calibración en plasma (m P)	0,47064646
Desviación estándar de la pendiente de la curva de calibración en plasma (Sm P)	0,01866247
Fórmula de cálculo de $t$ experimental*	$(m \text{ FM} - m \text{ P})/\sqrt{(Sm \text{ FM} + Sm \text{ P})^2}$
$t$ experimental	0,04302105
valor de probabilidad de $t$ experimental:	0,96595208
$t$ crítica (alfa: 0,05 y grados de libertad [18+18-4=32])	2,03693334

\*Charles Zaiontz <http://www.real-statistics.com/> <http://www.real-statistics.com/regression/hypothesis-testing-significance-regression-line-slope/comparing-slopes-two-independent-samples/2013>

Fuente propia

El resumen de los resultados de exactitud y precisión se presentaron en las tablas 12 y 13, correspondiendo la primera al estudio de repetibilidad y el segundo al estudio inter-día.

Tabla 12. Repetibilidad (precisión y exactitud intra-día) del procedimiento bioanalítico de losartán potásico en plasma

Concentración nominal (ng/mL)		Concentración encontrada (ng/mL)	Exactitud (% error relativo)
51,4	Promedio DSR %	52,9 8,15	± 2,9
152,4	Promedio DSR %	65,2 7,57	± 0,2
305,4	Promedio DSR %	155,8 4,15	± 12,1

Fuente propia

Tabla 13. Precisión intermedia y exactitud inter-día del procedimiento bioanalítico de losartán potásico en plasma

Concentración nominal (ng/mL)		Concentración encontrada (ng/mL)	Exactitud (% error relativo)
50,9	Promedio DSR %	63,5 20,0	± 14,7
152,7	Promedio DSR %	176,1 16,1	± 10,8
305,4	Promedio DSR %	379,9 14,7	± 16,8

Fuente propia

La curva de calibración (o función de respuesta o curva estándar), en un rango entre 50 y 300 ng/mL, presentó como resultados lo expuesto en la tabla 14.

Tabla 14. Resultados obtenidos en el estudio de la curva de calibración del procedimiento bioanalítico de losartán potásico en plasma

Concentración plasmática nominal (ng/mL)	Área de pico cromatográfico (mUA*s)
50,9	17,2
50,9	19,1
51,1	25,5
76,3	35,5

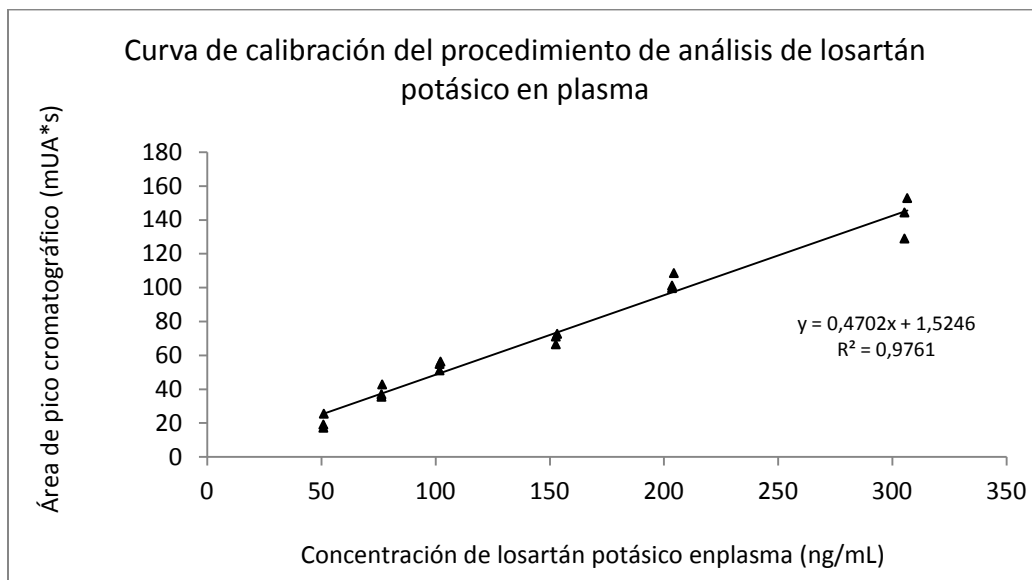
Concentración plasmática nominal (ng/mL)	Área de pico cromatográfico o (mUA*s)
76,3	37,0
76,6	42,8
101,8	51,1
101,8	54,9
102,2	56,3
152,7	66,5
152,7	71,1
153,3	72,7
203,6	99,7
203,6	101,2
204,4	108,6
305,4	129,0
305,4	144,4
306,6	152,9

Fuente propia

La figura 7 visualizó gráficamente la curva de calibración del procedimiento bioanalítico de losartán potásico en plasma.



Figura 7. Curva de calibración del procedimiento bioanalítico de losartán potásico en plasma



Fuente propia

La estadística aplicada a esta curva de calibración mostró los siguientes resultados:

La prueba de Hartley ( $p < 0,05$ ) presentó un  $r$  experimental de 7,15 y el de la tabla de 266.

El ensayo de Fisher evidenció un valor  $F$  experimental de 636 y un valor de la tabla igual a 19,43.

El test bilateral de  $t$  mostró  $t$  experimental de 0,48 y en el valor de la tabla  $t$  fue de 2,12.

Al averiguar la concentración plasmática del límite de cuantificación se valoraron datos del ruido reportado en mUA en la figura 2a), de la señal promedio de altura de pico cromatográfico en mUA de la tabla 6 y de la DSR % de la misma tabla. Se obtuvo una relación señal/ruido igual a 7 y una DSR igual a 9,5 %.

Respecto al límite de cuantificación se consideró necesario presentar y comparar los cromatogramas de la figura de un plasma adicionado a 25 mg/mL y el de 50 ng/mL de la figura 5. Aunado a ello, se requirió tomar en consideración los valores de exactitud y precisión de la concentración más baja que se evaluó.

Referente a la incertidumbre, se determinó las fuentes de incertidumbre y los principales componentes asociados a cada fuente, tal como se apreció en la tabla 15.

Tabla 15. Fuentes de incertidumbre y los principales componentes de cada fuente para el resultado del ensayo de 50 ng/mL en plasma

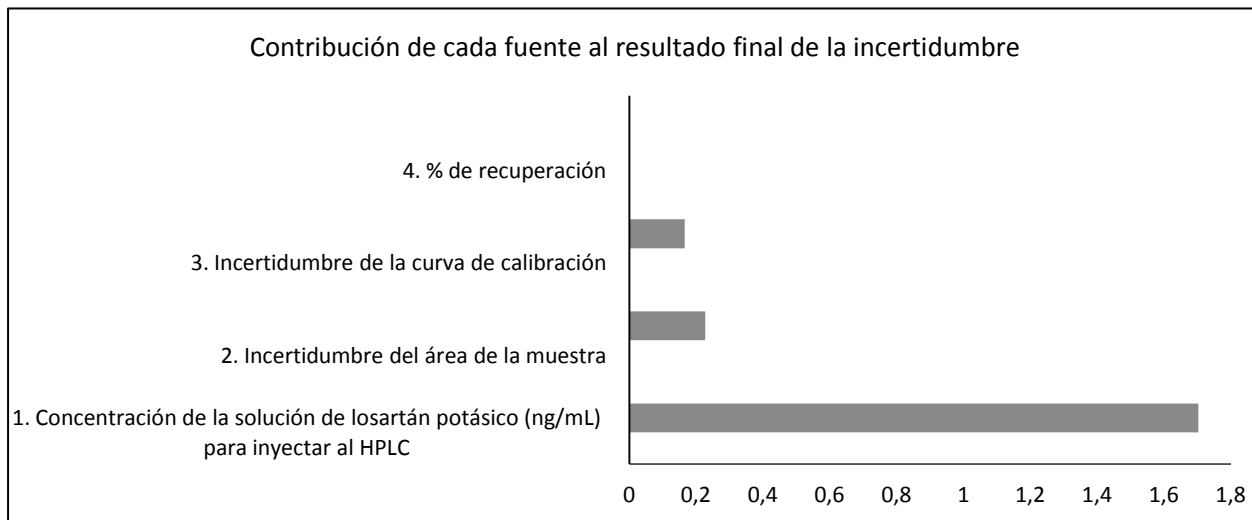
Fuente de incertidumbre	Componentes de cada fuente de incertidumbre asociada
Concentración del patrón de referencia del losartán potásico (ng/mL)	Masa:
	Pureza del patrón de referencia
	Exactitud de la balanza analítica
	Repetibilidad de la pesada
	Error de observación durante la pesada
	Volúmenes ligados a la obtención de:
Solución madre	
Solución de trabajo	
Soluciones hijas de la curva de calibración	
Preparación del plasma adicionado a 50 ng/mL	Volúmenes ligados a:
	Obtención de las soluciones de adición
	Volumen de la adición de patrón
	Volumen del plasma sin adición
	Volumen de recuperación del residuo
	Volumen inyectado en el cromatógrafo
Desviación estándar del % de extracción a la concentración plasmática de 50 ng/mL	Desviación estándar de las áreas de pico cromatográfico de plasma adicionado de 50 ng/mL

Fuente de incertidumbre	Componentes de cada fuente de incertidumbre asociada
Curva de calibración de losartán potásico en fase móvil	Análisis de varianza de la curva de calibración (C vs área de pico cromatográfico): Pendiente Ordenada en el origen Desviación estándar residual asociada al ajuste (SR) Desviación estándar de la curva de calibración (Sx0)
Porcentaje de extracción de losartán potásico en plasma	Desviación estándar del promedio del porcentaje de extracción global de la curva de calibración de losartán potásico en plasmas adicionados
Fuente propia	

Luego de calcular los componentes de cada fuente, se obtuvo cada incertidumbre parcial, se evaluó la contribución de cada fuente de incertidumbre involucrada en el resultado final del ensayo de losartán potásico en plasma de 50 ng/mL, tal como se reflejó en la figura 8.

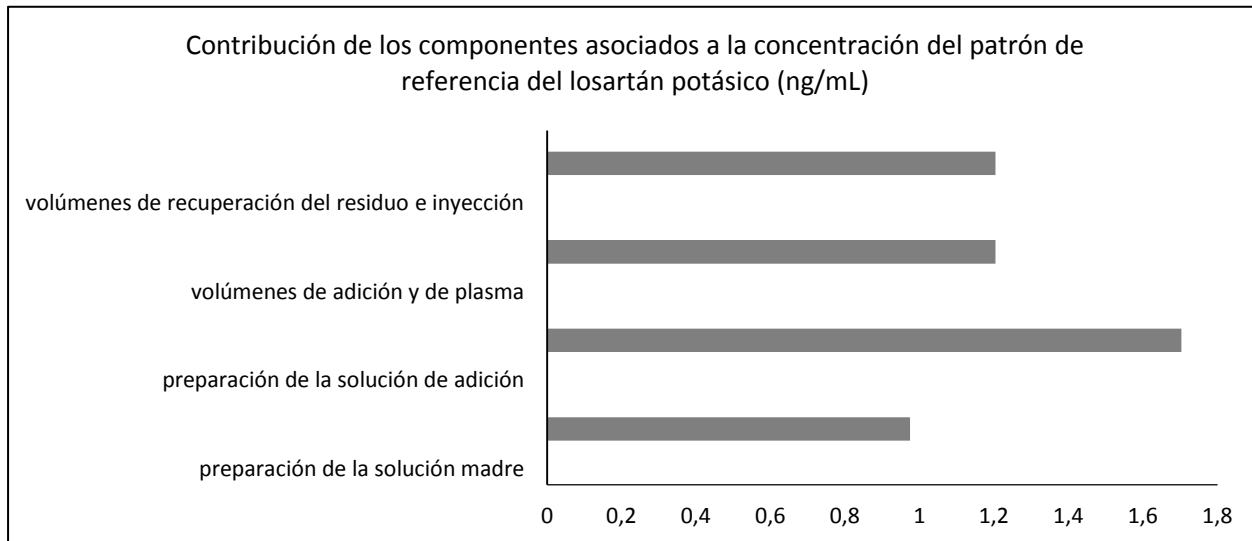
Por su parte, la figura 9 ilustró la influencia de los componentes de la fuente principal de incertidumbre asociada al resultado del límite de cuantificación en plasma.

Figura 8. Contribución de cada fuente asociada con el resultado final de la incertidumbre del resultado de plasma adicionado de 50 ng/mL.



Fuente propia

Figura 9. Contribución de los componentes asociados a la concentración del patrón de referencia del losartán potásico (ng/mL)



La incertidumbre combinada fue calculada dando un valor igual a 1,7 ng/mL y por tanto la incertidumbre expandida, con un factor de cobertura de dos, proporcionó un valor de 3,4 ng/mL.

Por lo tanto el resultado final se reportó así: Concentración =  $50,0 \pm 3,5$  ng/mL, con un factor de cobertura del 95 %.

## DISCUSIÓN

### *1. Desarrollo del procedimiento de análisis de losartán potásico para los ensayos de uniformidad de contenido, potencia y perfiles de disolución*

El detalle del procedimiento analítico para las pruebas de calidad de las formulaciones farmacéuticas de losartán potásico guarda similitud con elementos planteados por otros autores en términos de: solventes de las diluciones del patrón de referencia (primero metanol y luego agua <sup>16</sup>), separación cromatográfica y cuantificación por HPLC en fase inversa con fase estacionaria C18 <sup>18</sup>, fase móvil con mezcla de acetonitrilo y un componente acuoso acidificado <sup>19</sup> <sup>28</sup> e igual longitud de onda en 225 nm <sup>19</sup>.

Además, los valores de las concentraciones entre 50 y 300 ng/mL están dentro de los intervalos de las curvas de calibración reportados por Yeung y colaboradores <sup>28</sup>, Zarghi y colaboradores <sup>49</sup> y Polinko y colaboradores <sup>24</sup>. Y la precisión inter-día de las pendientes con un valor de 3% en DSR confirma la estabilidad de las soluciones hijas durante 5 días seguidos, para un uso cotidiano en curvas de calibración.

Los estudios de Emer <sup>41</sup> indican que los resultados de las tablas 4 y 5 (de precisión y exactitud inter-día, respectivamente) son adecuados para señalar la adecuada estabilidad de las soluciones de losartán potásico, tomando en consideración las concentraciones de 50 a 300 ng/mL.

Otros científicos como Nagavalli y colaboradores <sup>16</sup> y Vijayalakshmi y colaboradores <sup>18</sup> usaron losartán potásico en metanol a 1 mg/mL, concentración declarada como estable.

Por lo tanto la conservación en refrigeración de las soluciones madre e hijas resulta conveniente para establecerla como parte de los cuidados a tener en los ensayos *in vitro*.

## 2. *Desarrollo del procedimiento bioanalítico para la determinación de losartán potásico en plasma humano*

Con las técnicas de separación de precipitación con acetonitrilo, extracción líquido - líquido (con acetato de etilo y con cloroformo) y extracción en fase sólida (con sustratos ciano y C 18) se encuentran resultados ineficaces en términos de porcentajes de recuperación del losartán potásico de la matriz plasmática. La extracción en fase sólida con divinilbenceno-N-vinilpirrolidona muestra en la figura 1 una evidencia cromatográfica de la separación de los componentes endógenos del plasma. Esta técnica es similar a la usada por Hassan y colaboradores <sup>34</sup>.

El procedimiento analítico mide y diferencia al analito en presencia de los componentes del plasma y el cromatograma del plasma sin adición no muestra ninguna señal analítica al tiempo de retención del losartán potásico, según la figura 2a).

También se nota que el tiempo de ejecución y la sencillez en la aplicación de la extracción en fase sólida la hace una técnica de separación factible para su uso en el laboratorio.

La aplicación del procedimiento analítico desarrollado logra obtener concentraciones plasmáticas de 25 ng/mL con una relación señal sobre ruido superior a 3, según se aprecia en la figura 2a) y 2b) y por tanto se muestra la alta sensibilidad del procedimiento.

Los resultados del cálculo del número de platos teóricos y de la simetría de los picos cromatográficos que se observan en las figuras 3a) y 3b), evidencia una adecuada eficacia de la columna analítica y una separación apropiada del sistema analítico que logra simetrías inferiores a 2 en picos cromatográficos de losartán potásico a concentraciones plasmáticas de trazas (del orden de partes por billón).

Es necesario señalar que en los cromatogramas de las figuras 1 y 2a) el ancho de pico obtenido en ellos para el losartán potásico presenta valores, en minutos, muy cercanos a los obtenidos por Obando y colaboradores <sup>35</sup> y también por Chaudhary y colaboradores <sup>36</sup>.

La precisión de la concentración plasmática de 50 ng/mL reporta en la tabla 6 un valor máximo de 9,5 en porcentaje de la DSR que es inferior a 16 % enunciado por AOAC para concentraciones de 100 ppb <sup>40</sup> y a 25,1 % de CV que es el valor límite que resulta de la aplicación de la ecuación de Horwitz <sup>38</sup> para la concentración plasmática de 50 ng/mL.

Es conveniente tomar en consideración la escala numérica del eje de las ordenadas, de la respuesta del detector (absorbancia) que se presenta en la figura 1 posee una escala de -2,5 a 15 mUA, ya que existen artículos científicos que presentan evidencia de selectividad con escalas cuatro veces superiores a la de este estudio, tal es el caso de Shokraneh y colaboradores <sup>37</sup>. Este hecho hace que para establecer comparaciones visuales de los cromatogramas presentados por distintos autores convenga considerar las unidades y valores presentados en los cromatogramas.

Respecto al estudio de estabilidad, en la tabla 7 se encuentra un porcentaje de diferencia entre el valor promedio y la concentración nominal o teórica inferior a 20 % en todos los casos, lo cual indica que existe estabilidad a las distintas condiciones estudiadas guarda relación con las guías de validación de métodos bioanalíticos emitidas por EMEA en el 2001 <sup>15</sup> y permite establecer rasgos preliminares acordes con los criterios emanados por la AOAC <sup>40</sup> para el límite de cuantificación.

Otro hallazgo interesante es que el utilizar una curva de calibración en fase móvil para la cuantificación de medicamento en plasma, permite abaratar costos en la aplicación de este procedimiento, al no tener que usar un estándar interno, ni emplear una curva de calibración en plasma, aunque ambas condiciones son altamente recomendadas por las guías internacionales.

En resumen, los resultados preliminares de estabilidad y precisión, del procedimiento bioanalítico detallado, permiten evidenciar su viabilidad para estudios de equivalencia terapéutica

### *3. Validación del procedimiento de análisis de losartán potásico para los ensayos de uniformidad de contenido, potencia y perfiles de disolución*

La especificidad del procedimiento se confirma pues en los cromatogramas de los solventes no se encontraron señales interferentes con la respuesta de losartán potásico evidenciada en el cromatograma de la solución del patrón de referencia en fase móvil.

La tabla 8 muestra valores de precisión con resultados de DSR inferiores a 1,5 % en repetibilidad (ensayos intra-día) y en la tabla 9 los de precisión intermedia con valores inferiores a 7 % en DSR.

Y respecto a la exactitud evaluada intra-día, en la tabla 8, todos los porcentajes de error relativo están contenidos en el intervalo de -2,5 a 2,5 que según Ermer es considerado como adecuado, debido a las bajas concentraciones de las soluciones de este estudio <sup>41</sup>.

Los valores inter-día de la exactitud, que se presentan en la tabla 9, son más laxos que los de repetibilidad, hecho que es esperable dada la influencia de más variaciones debidas a cambios ocurridos en distintos días. A pesar de ello estos resultados se ajustan a lo esperado según lo enunciado por AOAC <sup>40</sup>.

Por otra parte, se logra establecer el intervalo o rango de linealidad entre 50 y 300 ng/mL de losartán potásico en fase móvil que se demuestra con el método de mínimos cuadrados (sin realizar transformaciones matemáticas a los datos crudos).

La homosedasticidad se confirma con el test de Hartley ( $p < 0,05$ ) al no existir una diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de las respuestas analíticas.

Se verifica la inexistencia de la desviación significativa respecto al modelo lineal mediante el test de Fisher, lo que corresponde a una probabilidad de  $5,3 \times 10^{-5}$ , valor muy inferior al de 0,05.

La ordenada en el origen es estadísticamente igual a cero según el test bilateral de  $t$ . También el coeficiente de correlación señala que el 99,92 % de los pares de datos cumple con el modelo matemático de la ecuación.

Estos resultados muestran un adecuado ajuste lineal, coincidiendo con lo sugerido por FDA <sup>59</sup>. Conviene considerar que la detección por absorción en el UV permite obtener una excelente linealidad.

#### *4. Validación del procedimiento bioanalítico para la determinación de losartán potásico en plasma humano*

Mediante la figura 5 se verifica la selectividad del procedimiento de losartán potásico en plasma ya que los cromatogramas de los plasmas sin adición no presentan ningún pico cromatográfico atribuible al losartán potásico y obedece a las guías de FDA <sup>1</sup>.

Un resultado relevante se observa con el paralelismo de las pendientes de las curvas de calibración de losartán potásico en plasma y en fase móvil de la figura 7 y la demostración



estadística de inexistencia significativa de diferencia entre las pendientes de las curvas analizadas presentada en la tabla 11 donde se verifica la ausencia del efecto de la matriz biológica. A partir de este hecho se hace evidente el ahorro que puede significar el usar como curva de calibración la proporcionada por las concentraciones en fase móvil en vez de las plasmáticas y pese a no contar con un estándar interno.

En otro ámbito, la disposición dada por FDA de que la precisión (en repetibilidad y precisión intermedia) sea inferior a 15% en todas las concentraciones a excepción de la concentración de límite de cuantificación cuyo valor puede alcanzar el 20 % <sup>7, 39</sup>, queda demostrada en los resultados de las tablas 12 y 13.

La misma guía señala para la exactitud que el valor promedio de cada concentración debe encontrarse en un intervalo de  $\pm 15$  % respecto a la desviación con el valor teórico, excepto para el LOQ cuya desviación puede ser de  $\pm 20$  %. En las tablas 12 y 13 se muestran datos que cumplen con estas características.

Referente al límite de cuantificación, Nie y colaboradores <sup>51</sup> presentan como concentración más baja de la curva de calibración la de 50 ng/mL, valor similar al obtenido en el presente trabajo.

En otro ámbito, la curva de calibración de la concentración plasmática (ng/mL) y el área de pico cromatográfico (mUA\*s) llena los requisitos declarados por la FDA <sup>39</sup> para procedimientos bioanalíticos. La prueba de Hartley demuestra homoscedasticidad, el ensayo de Fisher evidencia el adecuado ajuste lineal, el test bilateral de  $t$  muestra la igualdad del intercepto con el valor cero, estableciendo la ausencia de efecto de la matriz de plasma humano. Finalmente el coeficiente de determinación indica que el 97,61 % de los pares de datos se explican a través de la ecuación matemática encontrada.

El intervalo de las concentraciones plasmáticas es adecuado para estudios de bioequivalencia tal como lo señalan algunos Yeung <sup>28</sup> y colaboradores y Zarghi y colaboradores <sup>49</sup>, donde el rango de concentraciones de este estudio se incluye en el rango usado por ellos.

Además la concentración máxima de la curva de calibración en plasma del procedimiento bioanalítico es de 244 ng/mL, valor semejante al declarado por Munafo y colaboradores <sup>51</sup>.

En cuanto al límite de cuantificación, se consideró la medición de ruido de la figura 1b) y la altura de pico cromatográfico de la tabla 6. La relación señal/ruido igual a 7 correspondiente a la concentración plasmática de losartán potásico de 50 ng/mL que presenta una DSR inferior al 20 % y por tanto posee un valor con confianza estadística aceptable según lo recomiendan ICH <sup>6</sup> y FDA <sup>7,39</sup> para establecer el límite de cuantificación del procedimiento.

Por otra parte, el cromatograma del plasma a la concentración del límite de cuantificación, de la figura 5, presenta un pico bien integrado a un tiempo de retención de 6,036 minutos. El ancho de ese pico es cercano a 0,65 minutos (con una fase estacionaria C-18 y fase móvil de buffer fosfatos (pH 3,0)/acetonitrilo (50:50, v/v)), el cual resulta ser más estrecho que el reportado por Obando MA y otros <sup>35</sup>, pues su medición es de 70 segundos, o sea 1,2 minutos y la separación se llevó a cabo con una fase estacionaria C-18 y una fase móvil de buffer fosfatos (pH 3,0)/acetonitrilo/metanol (60:30:10 v/v/v); condiciones cercanas a las de este estudio.

Otro aspecto a subrayar es que las figura 1, 2 y 5 muestran la separación del pico cromatográfico del losartán potásico de las señales de los compuestos endógenos de plasma, cuyos tiempos de retención son inferiores a los 5 minutos.

Finalmente, el resultado de la incertidumbre combinada asociada con un nivel de confianza del 95 %, para la concentración del límite de cuantificación de 50 ng/mL representa menos del 10 % de error asociado a la ejecución y aplicación de este procedimiento bioanalítico.

Por lo tanto, los resultados de la validación de ambos procedimientos permiten vislumbrar un posible uso en futuros estudios de equivalencia terapéutica de productos multiorigen de losartán potásico en formulaciones sólidas.

#### Agradecimientos

Se agradece la colaboración económica brindada por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica y al personal del Instituto de Investigaciones Farmacéutica por su valioso apoyo durante la ejecución de proyecto.

## BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Imízcoz MA. La hipertensión arterial como factor de riesgo de enfermedad cardiovascular. Anales [Internet] 2000 [citado 23 marzo 2012]; 21(Supl 1):[aprox. 4 p.] Disponible en:<http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol21/suple1/suple3.html>.
2. Vines J, Escudero E, Zavala R, Hurtado A, Vivar A, Lozano R, et al. Disminución en los niveles séricos de ácido úrico, efecto benéfico del losartán en pacientes con disfunción renal e hipertensión arterial esencial, Revista Peruana de Cardiología [Internet] 2002 [citado 22 junio 2013]; 28(1):[aprox. 5 p.] Disponible en [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/cardiologia/v28\\_n1/dismi\\_niv.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/cardiologia/v28_n1/dismi_niv.htm),
3. Losartán in Biopharmaceutics Classification System (BCS). Michigan: Therapeutics Systems Research Laboratory (TSRL, Inc.). [Internet] 2013 [citado 22 junio 2013] Disponible en <http://166.78.14.201/tsrlinc.com/services/bcs/results.cfm>.
4. Raghavan K, Dwivedi A, Campbell GC, Johnston E, Hussain M et al. Spectroscopic investigation of losartán polymorphs. Pharm. Res.; 1993, 10: 900-904
5. Wu LS, Gerard C, Hussain MA. Thermal analysis and solution calorimetry studies on losartan polymorphs. Pharm. Res.; 1993, 10: 1793-1795)
6. International Conference on Harmonisation, Expert Working Group. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), ICH Harmonised Tripartite Guideline. International Conference on Harmonisation. 1994 Oct 27 [Updated 2005 Nov; cited 2012 Jan 4]. [13 p]. Available from: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>
7. Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 2001.
8. World Health Organization Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Quantification of active pharmaceutical ingredient in Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability. Annex 7. Fortieth Technical Report 2006; (937): 368-369.

9. European Medicines Agency (EMA). Guideline on the investigation of Bioequivalence 2010. Doc. Ref.: CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1/ Corr.
10. Guideline on the investigation of bioequivalence 2010, EMEA/CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1/ Corr \*\*
11. (FDA, Recommended Dissolution Methods, Dissolution Methods for Drug Products. At [www.fda.gov/cder/ogd/index.htm](http://www.fda.gov/cder/ogd/index.htm). 2007.
12. Farmacopea de los Estados Unidos de América, trigésima revisión, y Formulario Nacional, vigesimoquinta edición. 2007. The United States Pharmacopeial Convention 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852, Estados Unidos de América capítulo <1088> Evaluación in vivo e in vitro de formas farmacéuticas. pp 586
13. Official Medicines Control Laboratories Network of the Council of Europe, Quality Assurance Documents: PA/PH/OMCL (05) 47 DEF — Validation of analytical procedures 2010 ([http://www.edqm.eu/medias/fichiers/Validation\\_of\\_Analytical\\_Procedures.pdf](http://www.edqm.eu/medias/fichiers/Validation_of_Analytical_Procedures.pdf))
14. ANMAT, Boletín para profesionales, Número especial dedicado a biodisponibilidad y bioequivalencia, Vol. X, N° 3-4 unificados, Argentina, 2002. En [www.femeba.org.ar/fundacion](http://www.femeba.org.ar/fundacion)
15. EMEA, Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence, CPMP/EWP/QWP/1401/98, EMEA®, 2001
16. D. Nagavalli D, Vaidhyalingam V, Santha A, Sankar ASK and Divya O. Simultaneous spectrophotometric determination of losartan potassium, amlodipine besilate and hydrochlorothiazide in pharmaceuticals by chemometric methods. Acta Pharm.; 2010, 60: 141–152
17. Hassan SS, Zaidi SFA, Tariq I and Ansari MT. Development and Validation of Analytical Method for Losartan-Copper Complex Using UV-Vis Spectrophotometry. Trop J Pharm Res, 2013;12 (3): 407-411
18. Vijayalakshmi R, Kalyani P, Sandya P and Dhanaraju MD. RP-HPLC method for the simultaneous estimation of Atrovastatin and Losartan in pure and tablet formulations. IJRPC; 2012, 2(3): 885-888

19. Hassan J, Effat S, Hassan F and Mehdi A. A High-Performance Liquid Chromatographic Assay for the Determination of Losartan in Plasma. *IJPT* 2003; 2(1): 18-21
20. Pérez M, Ramírez G, Pérez M, Restrepo P. Validation of an analytical method for the determination of valsartan in human plasma by HPLC/UV with addition standard using losartan as an internal standard. *Colombia Medica* 2007; 38(1): 13-20
21. Ritter MA, Furtek CI, Lo MW. An improved method for the simultaneous determination of losartan and its major metabolite, EXP3174, in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Pharm Biomed Anal.* 1997; 15(7):1021-1029.
22. Bienert A, Brzeziński R, Szalek E, Dubai V, Grześkowiak E, Dyderski S, et al. Bioequivalence study of two losartan formulations administered orally in healthy male volunteers. *Arzneimittelforschung* 2006; 56(11): 723-728
23. Oliveira CH, Medeiros R, Santagada V, Caliendo G, Perissutti E, Prado M, et al. Comparative bioavailability of two losartán formulations in healthy human volunteers after a single dose administration. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2006; 44(3): 142-148.
24. Polinko M, Riffel K, Song H, Lo MW. Simultaneous determination of losartan and EXP3174 in human plasma and urine utilizing liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J Pharm Biomed Anal.* 2003; 33(1): 73-84.
25. Farthing D, Sica D, Fakhry I, Pedro A, Gehr TW., Simple high-performance liquid chromatographic method for determination of losartan and E-3174 metabolite in human plasma, urine and dialysate, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997; 704(1-2):374-8.
26. Gonzalez L, Lopez JA, Alonso RM, Jimenez RM. Fast screening method for the determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J Chromatogr A.* 2002; 949(1-2): 49-60.
27. Tamimi JJ, Salem II, Mahmood Alam S, Zaman Q, Dham R. Comparative pharmacokinetics of two tablet formulations of Losartan: bioequivalence assessment. *Biopharm Drug Dispos.* 2005; 26(5): 205-210

28. Yeung PK, Jamieson A, Smith GJ, Fice D, Pollak PT. Determination of plasma concentrations of losartan in patients by HPLC using solid phase extraction and UV detection. *Int J Pharm.* 2000; 204 (1-2): 17-22
29. Soldner A, Spahn-Langguth H, Mutschler E. HPLC assays to simultaneously determine the angiotensin-AT1 antagonist losartan as well as its main and active metabolite EXP 3174 in biological material of humans and rats. *J Pharm Biomed Anal.* 1998; 16(5): 863-873.
30. Furtek CI, Lo MW. Simultaneous determination of a novel angiotensin II receptor blocking agent, losartan, and its metabolite in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1992; 573(2): 295-301.
- 31 Nie J, Zhang M, Fan Y, Wen Y, Xiang B, Feng YQ. Biocompatible in-tube solid-phase microextraction coupled to HPLC for the determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma and urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005; 828(1-2): 62-69.
32. Guidance on Losartan Potassium. FDA [Internet] 2008 [citado 5 julio 2013] Disponible en <http://www.fda.gov/Downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm088645.pdf>).
33. Questions & Answers: Positions on specific questions addressed to the EWP therapeutic subgroup on Pharmacokinetics, EMA/618604/2008 Rev. 2, 22 July 2010 [Internet] 2010 [citado 2 junio 2013] Disponible en <http://www.rsihata.com/updateguidance/2010/WC500002963.pdf>.
34. Questions & Answers: Positions on specific questions addressed to the Pharmacokinetics Working Party, EMA/618604/2008 Rev. 3, February 16, 2012. In Verbeeck RK, Musuamba FT. The Revised 2010 EMA Guideline for the Investigation of Bioequivalence for Immediate Release Oral Formulations with Systemic Action, *J Pharm Pharmaceut Sci* 2012; 15(3) 376 - 388.
35. Obando MA, Estela MJ, Cerdà V. Multi-syringe chromatography (MSC) system for the on-line solid-phase extraction and determination of hydrochlorothiazide and losartan potassium in superficial water, groundwater and wastewater outlet samples. *J. Pharm. Biom.* 2008; 48:212–217

36. Chaudhary AB, Patel RK, Chaudhary SA. Determination of Losartan Potassium and Perindopril Erbumine in Tablet Formulations by Reversed-Phase HPLC. *Int.J. ChemTech Res.*2010;2(2): 1141-1146
37. Shokrane F, Dabirsiaghi A and Adib N. A new HPLC Method for Determination of Losartan in Human Plasma and its Application in Bioequivalence Studies. *Orient. J. Chem.*2012(28): 237-241
38. Horwitz W. Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs. *Analytical Chemistry.* 1982;(54): 67A-76A.
39. Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, 2001
40. AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on policies and procedures, Arlington, Va., USA, 1998. [www.aoac.org/vmeth/PVM.pdf](http://www.aoac.org/vmeth/PVM.pdf).
41. Ermer J. Analytical Validation within the Pharmaceutical Environment in Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice. Joachim Ermer, John H. Mc B. Miller (Eds.) 2005 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. ISBN: 3-527-31255-2. p. 15-19.
42. Thompson M, Ellison SLR and Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem.* 2002; 74 (5): 835–855
43. <http://www.real-statistics.com/regression/hypothesis-testing-significance-regression-line-slope/comparing-slopes-two-independent-samples/>
44. Shah VP. The History of Bioanalytical Method Validation and Regulation: Evolution of a Guidance Document on Bioanalytical Methods Validation. *AAPS J.* 2007; 9 (1): E43-E47.
45. Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, et al. Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. *AAPS J.* 2007; 9 (1): E30-E42.
46. Shah VP, Midha KK, Dighe SV, et al. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *Pharm Res.* 1992; 9: 588-592.

47. Food and Drug Administration, Guidance for Industry; Analytical Procedures and Methods Validation, Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, 2000.
48. Priel M. The approaches for measurement uncertainties evaluation. Uncertainty-noise, INCE / Europe - Symposium: Le Mans (France). Acoustique et Technique. 2005; 40: 5-9. Disponible en [www.infobruit.com/revues/78\\_11099.PDF](http://www.infobruit.com/revues/78_11099.PDF). Consultado el 12 de julio de 2013.
49. Zarghi A, Foroutan SM, Shafaati A, Khoddam A. A rapid HPLC method for the determination of losartán in human plasma using a monolithic column. *Arzneimittelforschung*.2005; 55 (10): 569-572.
50. Charles Zaiontz <http://www.real-statistics.com/> [yhttp://www.real-statistics.com/regression/hypothesis-testing-significance-regression-line-slope/comparing-slopes-two-independent-samples/](http://www.real-statistics.com/regression/hypothesis-testing-significance-regression-line-slope/comparing-slopes-two-independent-samples/) 2013.
51. Munafó A, Christen Y, Nussberger J, Shumm LY, Borland M, Lee RJ, Waeber B, Biollaz J and Brunner HR. Drug concentration response relationships in normal volunteers after oral administration of losartán an angiotensin II receptor antagonist. *Clin. Pharmacol. Ther.*; 1992 (51): 513-521.