UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Desarrollo y aplicación a estudios de biodisponibilidad, de un método analítico para cuantificar captopril en plasma humano por CLAR/EM/EM

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

LIDIA MARTÍNEZ PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JUAN CARLOS VÁZQUEZ LIRA

MÉXICO, D.F. JUNIO 2014

"El genio se hace con 1% de talento y un 99% de trabajo"

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

A la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM,** por ser mi segunda casa, por ser parte esencial de este logro y por enseñarme los fundamentos, junto con los valores necesarios para aportar mis conocimientos a la sociedad encaminados a la mejoría de la salud.

A **Bioanalit Laboratorios S.A de C.V.**, y sus colaboradores **Q.F.B. Manuel Calderón** e **I.Q. Aracely Fernández**, por apoyarme y facilitarme la realización de este grandioso proyecto.

Al **Dr. Juan Carlos Vázquez Lira**, porque su experiencia y consejos, me hicieron crecer en el ámbito profesional, por creer en mí y motivarme hacer las cosas de la mejor manera, llevando este proyecto a un buen término.

A mis sinodales y profesores **Irma Alejandre, Isabel Garduño, Griselda Fuentes y Leonardo Sánchez,** por darme la oportunidad y su tiempo para hacer de esta tesis un mejor trabajo, gracias por sus consejos y la sabiduría que me transmitieron en mí desarrollo profesional.

Mi primer pensamiento de agradecimiento es para ese ser supremo que es Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mi papá y mamá, **Félix Martínez y Anastacia Pérez**, con todo mi cariño y amor para ustedes que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, ustedes por siempre tendrán mi corazón y mi agradecimiento, son el mejor ejemplo que la vida me pudo dar, gracias especialmente a ti papá por todo tu esfuerzo y sobre todo por ser un gran padre.

A mis hermanos y sobrinos, **Nery, Miriam, David, Ezequiel, José…** por ser un estímulo más para que este proyecto se llevara a cabo. Por ser pacientes y apoyarme en todo momento, por preocuparse por mí y por qué con su amor me han enseñado a salir adelante.

A **Norberto Sánchez**, por su paciencia y comprensión, por sacrificar su tiempo para ayudarme a cumplir una meta más, por no soltarme de la mano, por hacerme reír y llorar, por estar siempre conmigo y enseñarme a luchar por lo que se quiere, demostrándome que no hay obstáculos en el camino más fuertes que nosotros mismos.

A mis amigos: **Sonia López, Blanca Torres, Zenaida Solís, Ivonne Torres, Alejandra Aranda, Carlos Cruz, Yesenia Martínez, José Velasco**… por qué me han acompañado a lo largo de este camino que es la vida, con sus consejos y alegría me hicieron crecer como persona, día con día.

A todas las personas que me apoyaron y que hicieron que este sueño se hiciera realidad.

Mi más sincero agradecimiento…

Con amor Lidia.

"Son tus decisiones y no tus condiciones las que determinan tu destino"

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN....6
2. MARCO TEÓRICO....7
2.1 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)....7
2.1.1 FUNDAMENTO....7
2.1.2 INSTRUMENTACIÓN GENERAL....7
2.1.3 ESPECTROMETRÍA DE MASAS....8
2.2 ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD....12
2.2.1 CONSIDERACIONES GENERALES DE METODOLOGÍA ANALÍTICA EN LOS ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD....13
2.3 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.....15
2.4 CAPTOPRIL....17
2.4.1 PROPIEDADES FÍSICAS....17
2.4.2 FARMACOLOGÍA Y APLICACIONES TERAPÉUTICAS.....17
2.4.3 FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA.....18
2.4.4 DEGRADACIÓN DE CAPTOPRIL....19
2.4.5 NIFEDIPINO (ESTÁNDAR INTERNO)....20
2.5 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS....22
2.5.1 VERIFICACIÓN DEL SISTEMA....23
2.5.2 DEFINICIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN....24
2.5.3 CRITERIOS DE VALIDACIÓN ESTABLECIDOS EN LA NOM-177-SSA1-1998.....25
2.5.4 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CUANTIFICAR CAPTOPRIL.....29
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA....31
4. OBJETIVOS....32
5. HIPÓTESIS....33
6. DIAGRAMA DE FLUJO....34
7. MATERIAL Y MÉTODO....35
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....43
8.1 DESARROLLO....43
8.1.1 BÚSQUEDA DE IÓNES....43
8.2 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA....45
8.3 SELECTIVIDAD.....45

8.3.1 SELECTIVIDAD A LA MATRIZ BIOLÓGICA 45
8.3.2 SELECTIVIDAD A POSIBLES INTERFERENCIAS 46
8.3.3 SELECTIVIDAD DEL SISTEMA Y PRUEBA DE ARRASTRE 47
8.3.4 EFECTO MATRIZ 47
8.4 LINEALIDAD/RANGO (CURVA DE CALIBRACIÓN) 48
8.5 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN 50
8.6 LÍMITE DE DETECCIÓN 50
8.7 PRECISIÓN 51
8.7.1 PRECISIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN 51
8.7.2 REPETIBILIDAD INTRA-DÍA 52
8.7.3 REPRODUCIBILIDAD INTER-DÍA 53
8.8 EXACTITUD 53
8.9 RECOBRO 54
8.10 TOLERANCIA A LA DILUCIÓN DE LA MUESTRA 55
8.11 APLICACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO A UN ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD DE UNA DOSIS ORAL DE 25 mg DE CAPTOPRIL, EN VOLUNTARIOS SANOS QUE CUMPLE CON LO ESTABLECIDO EN LA NOM-177-SSA1-1998. 56
9. CONCLUSIONES. 59
ANEXO 1. RESUMEN DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR CAPTOPRIL. 61
ANEXO 2. CROMATÓGRAMAS REPRESENTATIVOS DE LA SELECTIVIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO. 62
ANEXO 3. MODELOS MATEMÁTICOS. 68
ANEXO 4. CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS DE LA ADECUABILIDAD DEL SISTEMA Y CURVA DE CALIBRACIÓN (DIA 4) 70
ANEXO 5. CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS DE LA APLICACIÓN DEL ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD EN VOLUNTARIOS SANOS. 95
10. REFERENCIAS 99

GLOSARIO

SS-CAP	Solución stock captopril
%	Porcentaje
±	Más-menos
°C	Grados centígrados
µg	microgramos
ABC	Área bajo la curva
ADE	Adecuabilidad del sistema
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
API	Interfase a presión atmosférica
APPI	Atmospheric Pressure Photoionization
B	intercepto
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
CLAR/EM/EM	Cromatografía de líquidos de alta resolución masas-masas
CV	Coeficiente de variación
DEA	Desviación estándar
DTT	D-L Dithiothreitol
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EI	Estándar interno
EMV	Electromultiplicador
ESI	Electrospray
FDA	Food Droog Administration
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
G	Gramos
HPLC	High performance liquid chromatography
L	Litros
LIC	Límite inferior de cuantificación
m/z	Masa-carga
MC	Muestra control
MCA	Muestra control alto

MCB	Muestra control bajo
MCD	Muestra control diluida
MCM	Muestra control medio
Mg	Miligramos
mL	Mililitros
Mm	micrómetros
MS	Masas
Ng	Nanogramos
NOM-177-SSA1-1998	Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas
NOM-177-SSA1-2013	Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad.
PP	Precipitación
R	Coeficiente de determinación
r^2	Coeficiente de correlación
SS-NIF	Solución stock nifedipino
ST	Solución de trabajo
Tr	Tiempo de retención
v/v	volumen/volumen

1. INTRODUCCIÓN

El captopril es un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (**ECA**), que impide la conversión de la angiotensina I en la II. Disminuye la resistencia vascular periférica y reduce la retención de sodio y agua, utilizado principalmente para el tratamiento de la hipertensión e insuficiencia cardiaca.

El captopril es un compuesto inestable in vivo. La formación de dímeros de disulfuro y conjugados mixtos se produce rápidamente y complica la medición de los niveles del fármaco. En este método, el reactivo dithiothreitol (**DTT**) se añadió a las muestras de plasma, con el fin de recuperar el captopril que fue convertido a disulfuros. El método de análisis cuantificó Captopril total y se utilizó como estándar interno Nifedipino. Los cuales se extrajeron a partir de muestras de plasma humano acidificadas, utilizando como solución precipitante de proteínas acetonitrilo, posteriormente se realizó una dilución y una alícuota de esta solución se analizó mediante fase reversa por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de masas (**CLAR/EM/EM**) en modo positivo (ionización electrospray) usando monitorización de reacciones múltiples (MRM).

Esta técnica analítica **CLAR/EM/EM** ha sido ampliamente aceptada como la principal herramienta en la identificación, caracterización de la estructura y el análisis cuantitativo de los medicamentos y sus metabolitos debido a su mayor sensibilidad, especificidad y eficiencia. A pesar de la sensibilidad del detector CLAR/EM/EM, se necesita derivatización previa con el fin de prevenir formación de disulfuro de captopril durante el procesamiento de la muestra y almacenamiento.

En este trabajo se desarrolló un método analítico por **CLAR/EM/EM** rápido y capaz de cuantificar captopril total en plasma humano, validado satisfactoriamente en base a los parámetros establecidos en la **NOM-177-SSA1-1998** (Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable), el cual se aplicó a estudios de biodisponibilidad donde se recuperó el analito total mediante una reacción de derivatización, después de la administración oral.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)

2.1.1 FUNDAMENTO

La cromatografía es un procedimiento físico-químico de separación de constituyentes de una mezcla homogénea liquida o gaseosa. El principio básico se fundamenta en los equilibrios de concentración de los compuestos presentes entre dos fases no miscibles de la que una, llamada estacionaria, está inmovilizada en una columna o fijada sobre un soporte y la otra llamada móvil, se desplaza al contacto de la primera. La elución a velocidades diferentes de los compuestos presentes por la fase móvil conduce a su separación.

Una de las técnicas más usadas de separación es la cromatografía de líquidos de alta resolución que se fundamenta en la interacción de un soluto con una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. La separación se lleva a cabo por reparto, adsorción, exclusión molecular, filtración, permeación de gel, afinidad o procesos de intercambio iónico, dependiendo el tipo de fase estacionaria. Los compuestos a analizar son disueltos en un solvente y la mayor parte de las separaciones se llevan a temperatura ambiente.[1,3]

2.1.2 INSTRUMENTACIÓN GENERAL

Un equipo **CLAR** se compone de varios módulos con funciones definidas, integrados en serie para modelos estándar. La circulación de la fase móvil entre estos módulos se hace a través de conductos tubulares cortos de pequeño diámetro interno (0.1 mm).[3]

Los componentes básicos de un sistema **CLAR** son los siguientes:

- **Bomba**: Sirve para forzar el paso de la fase móvil a través de la columna, cuyo relleno, muy compacto, es responsable de una sobrepresión muy importante a nivel del inyector, por lo tanto las bombas son de alta presión diseñadas para mantener un caudal sin pulsos y estable, el material con el cual se construyen es inerte a la fase móvil.[1,3]
- **Inyector**: Es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el flujo de solvente a través del sistema.

- **Columna**: Es un tubo recto, calibrado de acero, con diferente longitud (3 a 30cm) y diámetro (0.5 a 5mm) según el uso, que contienen la fase estacionaria (partículas irregulares o esféricas, porosas y no porosas).
- **Detector**: Dispositivo que monitoriza el eluato de la columna. Genera una señal eléctrica, que se convierte en una señal gráfica (cromatograma), la cual es proporcional a alguna propiedad de los analitos y/o de la fase móvil. La siguiente figura indica los módulos del cromatógrafo de líquidos (**Fig. 1**).

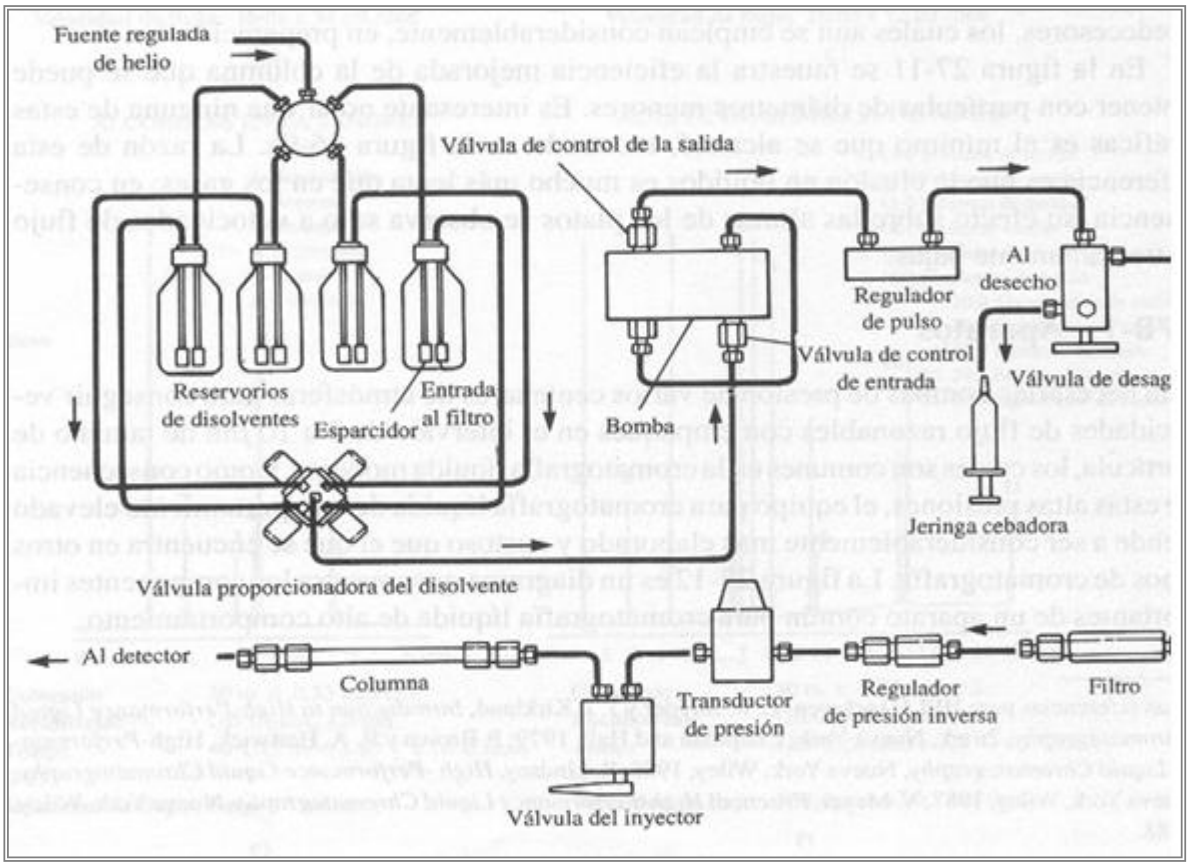


Fig. 1. Módulos de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.[1]

2.1.3 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Es una técnica de análisis que se basa en la determinación de masas de especies atómicas o moleculares individuales de la muestra analizada lo que permite recabar información sobre su naturaleza, su composición y de igual modo sobre su estructura.[1,3]

Fundamento: Una cantidad muy pequeña del compuesto a analizar, bajo la forma más conveniente (gaseosa o similar), se ioniza: las especies portadoras de carga eléctrica resultantes son sometidas a la acción de un campo eléctrico y/o magnético según el equipo. El estudio de las trayectorias seguidas, es un recipiente sometido al vacío, permiten determinar la relación masa-carga de los iones, así como, eventualmente, su naturaleza. Este método destruye el compuesto analizado, aunque sólo es necesaria una cantidad ínfima, pero muestra una gran sensibilidad. El resultado del análisis se representa por una gráfica denominada espectro de masas que demuestra la abundancia estadística de cada tipo de ión formado indicando, su relación masa/carga en orden creciente de masas. Para un compuesto, la fragmentación es reproducible y por lo tanto característica, operando en condiciones idénticas.[7]

En el espectrómetro de masas el compuesto pasa por las siguientes etapas:

1.- **Ionización**: la especie estudiada es vaporizada y ionizada en la fuente del equipo por alguno de los muy numerosos procedimientos existentes. En este estado, todo compuesto formado por moléculas produce una mezcla estadística de iones de fragmentación.[3]

2.- **Aceleración**: Posteriormente, los iones son extraídos de la fuente, focalizados y acelerados por las lentes electrónicas para incrementar su energía cinética.

3.- **Separació**n: los iones son filtrados siguiendo su relación masa/carga por el analizador. Algunos equipos combinan varios tipos de analizadores dispuestos en serie.

4.- **Detección**: después de la separación los iones terminan su recorrido chocando con un detector que amplifica la muy débil corriente eléctrica inicialmente originada.

5.- **Obtención del espectro de masas**: obtenido por la señal enviada por el detector (**Figura 2**).

El espectro de masas es una representación de la intensidad de corriente iónica en función de la relación m/z. También cabe presentar los datos de forma tabular. Por lo general, los datos brutos se normalizan convirtiendo todas las intensidades en intensidades relativas o basándose en un porcentaje: es decir, al pico más intenso en el espectro (el pico base) se le asigna el valor 100, y las intensidades de los demás picos se expresan en relación a este.[3]

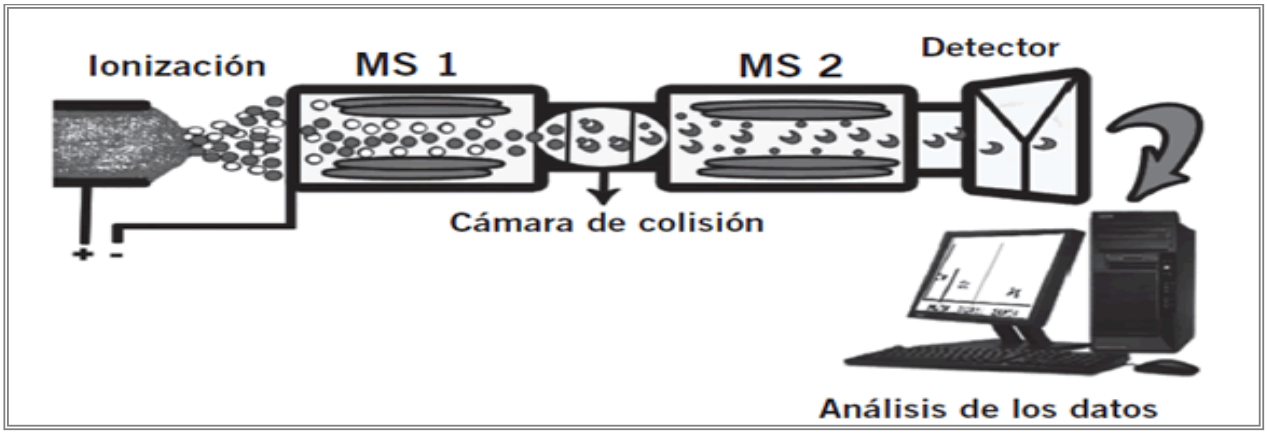


Fig. 2. Etapas de la muestra a través de un espectrómetro de masas.[3]

ESPECTRÓMETROS DE MASAS EN TÁNDEM (EM/EM)[1, 3]

Para facilitar el estudio de las fragmentaciones que siguen los compuestos moleculares se construyen espectrómetros de masas que incorporan dos o tres analizadores en serie situados en el trayecto de los iones entre la fuente y el detector. Se trata de la asociación en un equipo híbrido de un sector magnético seguido de uno, dos o tres cuadrupolos (**Fig. 3**). Entre estos analizadores se halla situada una cámara de colisión. Hay numerosas formas de utilización de tales equipos:

Un primer método consiste en seleccionar un ión del compuesto con el primer analizador, que haría el papel de filtro. Este ión atraviesa a continuación la cámara de colisión en la cual se ha incorporado un gas como el argón o el nitrógeno. Se producen nuevas fragmentaciones. Los iones hijos prosiguen su recorrido hacia el segundo analizador, utilizado en modo normal, lo que conduce a un espectro de fragmentación de este ion aislado, excluyendo otros producidos al nivel de la fuente (búsqueda de descendientes).

En otro método se regula el segundo analizador para que no deje pasar más que un ión (**m/z**) y se realiza un barrido de masas con el primer analizador. Se reconocen de este modo todos los iones que dan el mismo fragmento (búsqueda de ancestros).

Finalmente se puede hacer un doble barrido sincrónico de los dos analizadores con un desfase correspondiente a una masa dada.

Fig. 3. Sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un detector de masas.[5]

INTERFASES EN LÍQUIDOS MASAS.[3, 5]

Para el análisis de muestras complejas es frecuente separar previamente los constituyentes por medio de una técnica cromatográfica en interfase con el espectrómetro de masas. Se tienen hoy en día diferentes arreglos de interfases entre los cuales se encuentran:

Interfases a presión atmosférica **API-MS**.

- **Electrospray** (**ESI**): proceso de ionización que utiliza un campo eléctrico para generar gotas cargadas, posteriormente el analito ionizado por evaporación entra al MS para ser analizado. La nebulización es usualmente pneumáticamente asistida.
- **Atmospheric Pressure Chemical Ionization** (**APCI**): proceso de ionización química (CI) en fase gaseosa donde el disolvente actúa como el gas reactivo para ionizar la muestra.
- **Atmospheric Pressure Photoionization** (**APPI**): Una lámpara de Kriptón produce luz ultravioleta ioniza analitos en fase gaseosa.

Los componentes básicos de una interfase (fuente de ionización) (**API**), (**Figura 4**).

1. Dispositivo para la introducción de muestra.
2. Cámara de ionización, donde se generen los iones (**ESI** o **APCI**).
3. Cono de muestreo, orificio de entrada de iones.
4. Sistema de transferencia de iones, a la región de alto vacío de **MS**.

Fig. 4. Interfase por electrospray (ESI) de un detector de masas triple cuadrupolo. [5]

2.2 ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD

El objetivo de los estudios biofarmacéuticos es optimar la farmacoterapia, a modo de proporcionar el máximo beneficio y los menores efectos adversos, mediante la administración de medicamentos seguros, eficaces y una adecuada biodisponibilidad del fármaco que contienen; características que deben prevalecer durante todo su periodo útil.[6, 7, 8]

La actividad terapéutica observada en un organismo después de administrar un medicamento, es el resultado de una serie de etapas consecutivas, las cuales están en función de las propiedades tanto del fármaco como de las del medicamento y también de las características fisiopatológicas del organismo que las recibe.

La definición de Biodisponibilidad según la Food and Drug Administration (**FDA**) indica que "es la medida tanto de la velocidad como de la cantidad a las cuales, una molécula terapéuticamente activa es absorbida a partir de un medicamento y llega a ser disponible (o accesible) al sitio de acción. [4,5,6]

Cuando los estudios de biodisponibilidad se diseñan con fines comparativos, se habla de estudios de bioequivalencia. Por lo tanto, la bioequivalencia entre medicamentos genéricos es una condición necesaria, pero no suficiente para obtener la equivalencia terapéutica, ya que ésta última está en función básicamente, de los factores fisiopatológicos del organismo al que se administre el medicamento.

Los estudios de biodisponibilidad son un apoyo útil para propósitos de correlación de concentraciones plasmáticas de fármaco y perfil de la acción farmacológica, para diseño de regímenes de dosificación y para el monitoreo de concentraciones plasmáticas terapéuticas en el caso de fármacos con índice terapéutico estrecho.

De acuerdo con el concepto de Biodisponibilidad, el fluido sanguíneo es la primera opción para cuantificar el fármaco en el organismo, a partir del medicamento en que fue administrado.

Aplicando los principios de farmacocinética lineal clásica, una forma de cuantificar el fármaco en sangre es, por medio del área bajo la curva (**ABC**) del perfil de concentración plasmática del fármaco en función del tiempo, la cual es proporcional a la cantidad total de fármaco absorbida.

El cálculo correcto de un área bajo la curva (**ABC**), está en función de los siguientes factores:

El muestreo de concentración plasmática del fármaco que comprenda un periodo total de tiempo de cuando menos tres vidas medias de eliminación del principio activo.

Los intervalos de muestreo cortos, de modo que las fases de absorción y de distribución del fármaco puedan ser establecidas con la mayor precisión y exactitud posibles, al graficar los resultados en el perfil de concentración plasmática en función del tiempo.

El empleo de un método analítico cuantitativo exacto, preciso, específico y sensible, de modo que las cantidades cuantificadas correspondan a la realidad.

2.2.1 CONSIDERACIONES GENERALES DE METODOLOGÍA ANALÍTICA EN LOS ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD

Un aspecto importante que también ha contribuido a establecer un criterio correcto respecto a la bioequivalencia de medicamentos, es el gran desarrollo de las técnicas de cuantificación de fármacos en fluidos o en muestras biológicas.[4, 6, 7, 8]

La validación de un método analítico incluye la aplicación de todos los procedimientos requeridos para demostrar que un método particular empleado para la determinación cuantitativa de la concentración de un

analito o serie de analitos (moléculas de interés), en una matriz biológica dada, es seguro y confiable para la aplicación que se intenta. Se denomina matriz biológica, a un material único de origen biológico, que puede ser manipulado de modo reproducible.

Las técnicas para cuantificar fármacos o sus productos de biotransformación en muestras biológicas, se pueden clasificar en dos grandes grupos:

1) **Métodos biológicos**: procedimientos basados en inmunoensayos y análisis microbiológicos.
2) **Métodos químicos**: cromatografía, espectrofotometría, etc.

Respecto a los métodos químicos, (**CLAR**) ha evolucionado notablemente y permite la cuantificación de analitos en concentraciones muy pequeñas (**ng**). Sin embargo, aun esta poderosa técnica para separación de especies moleculares semejantes, puede resultar inespecífica, si los parámetros cromatográficos no son elegidos y controlados correctamente.

Toma y almacenamiento de muestras.

La toma de muestras para estudios de biodisponibilidad puede incluir tejido sanguíneo o fluido urinario, en general, entre otros. Las muestras sanguíneas contiene en mayor parte tejido, por lo que suelen centrifugarse, preferentemente se colectan con un anticoagulante para recuperar hasta un 50% del volumen inicial, en forma de plasma. Generalmente se prefiere trabajar con plasma, puesto que un mayor volumen de muestra evita problemas de cuantificación por falta de sensibilidad del método analítico.

Para prevenir degradación u otros cambios químicos potenciales en las moléculas por cuantificar, las muestras biológicas deben ser congeladas y permanecer en este estado hasta el día de su análisis, el cual debe realizarse en la fecha más próxima posible. Debe evitarse la contaminación por aditivos o envases de almacenamiento.

Tratamiento preliminar de las muestras.[6, 7]

El objetivo de un análisis cuantitativo es determinar con confianza estadística la molécula de interés (analito). Cuando dicho compuesto está mezclado con un sinnúmero de distintos tipos de moléculas presentes en gran cantidad, la manera de cuantificar correctamente el analito es extraerlo o separarlo de este complejo medio.

El tratamiento preliminar de la muestra biológica y su posterior limpieza o lavado, para extraer el analito de interés es necesario para:

1. Alcanzar la máxima especificidad y sensibilidad en relación con la cuantificación exacta o verdadera del analito.
2. Evitar altos valores de las muestras blanco, esto indicaría un alto contenido de sustancias endógenas que potencialmente pueden interferir en la cuantificación del analito de interés.
3. Evitar la contaminación del equipo: celdas ópticas, columnas y detectores cromatográficos, etc.

En general, el tratamiento previo para muestras biológicas con un alto contenido de proteínas como son plasma, heces y saliva, requieren de un proceso de desnaturalización o precipitación de las mismas.

Dentro de los estudios de biodisponibilidad, bioequivalencia y farmacocinéticos se considera también el tratamiento de la muestra o extracción del analito y la validación del método analítico; por lo que requieren del diseño de un protocolo amplio, detallado, riguroso y específico a fin de obtener resultados útiles y veraces.

2.3 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.

Para llevar a cabo un análisis químico con ayuda de un instrumento, la muestra que va hacer medida debe de estar bajo una forma adaptada al mismo. Dependiendo de los equipos y los métodos utilizados, la puesta a punto del proceso de acondicionamiento puede requerir diversas clases de pre tratamientos. La calidad de un análisis depende en gran parte de la forma en la que se haya realizado esta etapa preliminar. Su influencia sobre el resultado es incluso más importante que la medida en si misma o la precisión del instrumento utilizado.[1,2,3]

El proceso de extracción o aislamiento del analito de interés, continúa con una serie de extracciones generalmente líquido-líquido o sólido-líquido.

Para obtener la máxima eficiencia de extracción de la molécula de interés, se deben elegir cuidadosamente tanto el disolvente extractor, como el pH de extracción, verificando la estabilidad fisicoquímica del analito en el sistema finalmente elegido.

De esta manera se pueden aplicar al menos dos procedimientos de extracción:

- **Extracción en fase sólida**: Consiste en hacer pasar una cantidad conocida de la muestra en forma líquida (pura o en disolución) a través de un absorbente sólido; donde el analito es el único componente retenido por la columna mientras que los otros componentes son eliminados por lavado. El compuesto separado es, a continuación, extraído con un disolvente apropiado. Este modo de extracción tiene la doble ventaja de aislar la especie a medir y después concentrarla. Esta extracción se realiza en una pequeña columna que contiene de 100mg a 1g de adsorbente a base de gel de sílice modificada o de un copolímero. Este procedimiento poco costoso es más utilizado para compuestos hidrófobos o apolares que para sustancias iónicas, es rápido, reproducible y selectivo.
- **Extracción en líquido-líquido**: Se realiza al pasar soluciones acuosas por una columna que contiene un material poroso químicamente inerte que absorbe fuertemente el agua. En este estado el agua difunde en el material inerte y se comporta como una película de fase estacionaria polar de **CLAR**. A continuación se arrastran las sustancias lipofílicas presentes con dos o tres volúmenes de un disolvente orgánico no miscible con el agua. Este modo de extracción consume muy poco disolvente y no presenta nunca los problemas de las emulsiones.

2.4 CAPTOPRIL

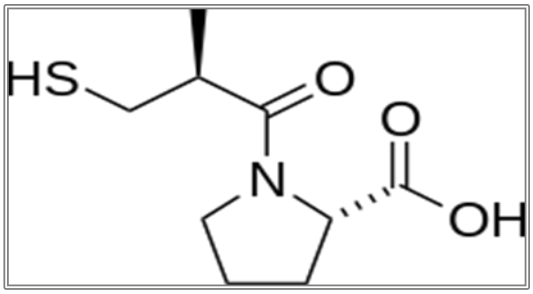


Fig. 5. Fórmula desarrollada.[9]

Nombre químico: 1-[(2S)-3-Mercapto-2-metilpropionil]-L-prolina

Fórmula condensada: $C_9H_{15}NO_3S$

Masa molecular: 217.29 g/mol[10, 11]

2.4.1 PROPIEDADES FÍSICAS

Polvo cristalino blanco o casi blanco. Fácilmente soluble en agua, etanol, metanol, diclorometano y cloroformo. Más estable a pH ácido (se degrada en soluciones acuosas en función del pH y por la presencia de iones metálicos).[9,10,11]

pka_1: 3.7 y **pka_2:**9.8.

Temperatura de fusión: 105°C-108° C.

2.4.2 FARMACOLOGÍA Y APLICACIONES TERAPÉUTICAS.

El captopril es un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, que impide la conversión de la angiotensina I a II. Disminuye la resistencia vascular periférica y reduce la retención de sodio y agua, utilizado principalmente para el tratamiento de la hipertensión e insuficiencia cardiaca.[9,10,14]

2.4.3 FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA.

Después de una administración oral, aproximadamente entre el 60 al 75% de la dosis de captopril se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal tanto en adultos sanos como en pacientes hipertensos. La concentración máxima de captopril se observa 1 h después de la administración. Se ha encontrado una relación dosis-respuesta proporcional en las áreas bajo la curva y concentración máxima de las dosis de 10mg a 100mg de captopril. Aproximadamente del 25 al 30% del captopril en circulación sistémica se encuentra unido a proteínas. La presencia de alimentos disminuye la biodisponibilidad entre un 30 a 40%. La vida media de eliminación es cerca de 2h. Se excreta por vía renal hasta un 95% de la dosis absorbida en 24h, presentándose como captopril inalterado entre el 40 y el 50%.[8,10,12]

DOSIS Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN: Oral.[13]

Hipertensión: Al inicio del tratamiento debe considerarse el tratamiento farmacológico previo, el grado de hipertensión, la restricción de sal y otras circunstancias clínicas. La dosis inicial de captopril deberá individualizarse. Se puede iniciar con 12.5 a 25mg, dos a tres veces al día.

La dosis más común es de 50mg en dos o tres tomas iguales. Si no se logra una disminución satisfactoria de la presión sanguínea después de una o dos semanas con esta dosis, incrementar la dosis en forma progresiva. Si el resultado es insatisfactorio se puede agregar un diurético de asa como la tiazida.

En los casos de hipertensión severa en los que se requiera una disminución adicional de la presión arterial, la dosis puede incrementarse progresivamente (continuando con el diurético) y puede administrarse tres veces al día. La dosis máxima diaria de Captopril no debe pasar de 450mg.

Para la mayoría de los pacientes, la dosis diaria inicial habitual es de 25mg dos o tres veces al día.

CONTRAINDICACIONES: Pacientes hipersensibles a captopril u otro inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (**ECA**). Embarazo todo su curso. Lactancia.[8,10,12]

2.4.4 DEGRADACIÓN DE CAPTOPRIL

El captopril es muy soluble en agua, pero la estabilidad en solución acuosa es muy limitada. El producto de degradación mayoritario es el disulfuro de captopril.[6,14,15,16]

El captopril como materia prima debe conservarse en recipientes herméticamente cerrados, protegidos de la luz, la humedad y a temperatura inferior a 30º C.

En solución presenta una degradación por oxidación del grupo sulfidrilo dando disulfuro de captopril. Los factores que aceleran la reacción de degradación son: la presencia de oxígeno, pH superior a 4, y la presencia de iones metálicos, hierro y cobre, que actúan como catalizadores de la reacción de oxidación; por lo tanto captopril en plasma se ve afectado por la misma reacción de oxidación debido a los componentes presentes. (**Fig. 6)**

El proceso de oxidación es menor cuando la solución se ajusta a pH ácidos y se le añaden agentes quelantes; la concentración de captopril es elevada si también se adicionan antioxidantes o se emplea nitrógeno para reducir la presencia de oxígeno.

La estabilidad es excelente cuando el pH se mantiene entre 1 y 2. Pero a pH 3 se empieza a observar una cierta degradación. También se observa el producto de degradación, disulfuro de captopril, en las preparaciones elaboradas con un pH entre 6-8.

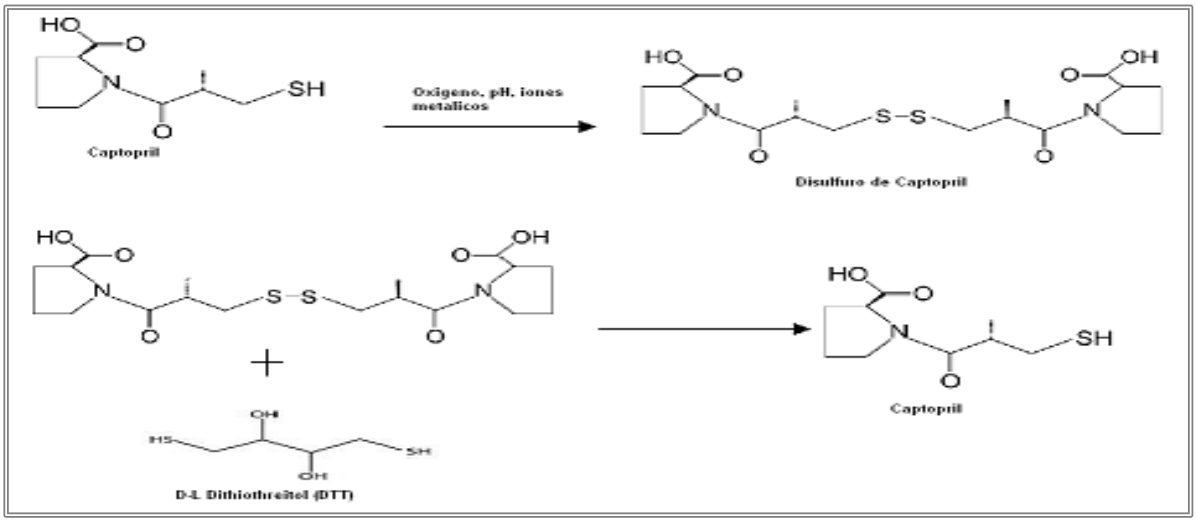


Fig. 6. Reacción de degradación de captopril en plasma humano.[14]

2.4.5 NIFEDIPINO (ESTÁNDAR INTERNO)

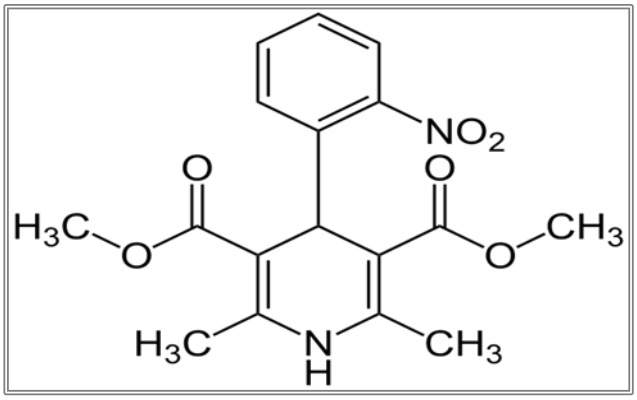


Fig. 7. Fórmula desarrollada.[9]

Nombre químico: 1,4-Dihidro-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-3,5-piridinodicarboxilato de dimetilo.

Fórmula condensada: $C_{17}H_{18}N_2O_6$

Masa molecular: 346.34 g/mol[10, 11]

Propiedades físicas: Polvo cristalino amarillo. Fácilmente soluble en acetona, poco soluble en etanol, casi insoluble en agua.[9,10,11]

Temperatura de fusión: 171°C-175° C.

El Nifedipino se utiliza como estándar interno para cuantificar Captopril por medio de un análisis cuantitativo denominado método del patrón interno el cual se basa en la utilización del factor de respuesta relativo de cada compuesto a medir con respecto a un marcador introducido como referencia. El método necesita dos cromatogramas, uno para calcular los factores de respuesta relativos y otro para el análisis de la muestra. Las áreas de los productos a cuantificar son comparadas con las de un compuesto de referencia, llamado patrón interno, introducido en una concentración conocida en la muestra.[3]

Este método es todavía más preciso si se realizan numerosas inyecciones del estándar de la muestra a determinar. Este método general y reproducible exige una buena elección del estándar interno o patrón interno, que debe reunir las siguientes características[2,3]

1. Debe ser puro y no encontrarse inicialmente en la muestra.
2. Su pico de elución debe estar bien resuelto en relación con todos aquellos que conforman el cromatograma de la muestra.
3. Sus tiempos de retención deben estar próximos a aquellos del soluto a medir.
4. Su concentración debe ser cercana o superior a la de los otros solutos para estar en las condiciones de una respuesta lineal del detector.
5. Debe ser inerte en relación con los compuestos de la muestra.

2.5 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

El término método analítico se refiere a la forma de ejecutar un análisis, éste debe describir en detalle los pasos necesarios para desarrollar cada prueba analítica.[17]

La validación es la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado.

La validación de un método analítico incluye todos los procedimientos requeridos para demostrar que un método en particular, cumple con la finalidad para la cual fue desarrollado, por lo tanto, todo nuevo método analítico debe validarse para demostrar su aplicación.

Un método analítico contiene dos tipos de error:

Error sistemático: es el que da lugar a medidas incorrectas y, en general, al incumplimiento de los valores establecidos como parámetros de validación, se origina por una falla en el experimento o falla en el equipo, la cual se reproduce siempre que se repite el experimento en las mismas condiciones.[18]

Error aleatorio: es aquel que da lugar a medidas imprecisas; se origina por efectos de variables incontroladas en cada medida, tiene igual de probabilidad de ser positivo o negativo, no puede ser eliminado pero puede ser reducido mejorando el trabajo experimental.[18]

Las fuentes de error sistemático pueden ser:

- ✓ Errores instrumentales
- ✓ Errores de método
- ✓ Errores operativos
- ✓ Errores personales

Existen varios procedimientos para determinar el error sistemático, uno de ellos es el recobro experimental a un porcentaje fijo que permite evaluar el error sistemático constante, por otro lado el recobro experimental a varias concentraciones permite evaluar el error sistemático proporcional.[17]

Se debe de establecer un método de medición, el cual consiste en cuantificar la sustancia de interés después de ser extraída cuantitativamente a partir de una muestra obtenida de una determinada matriz (es decir, de un tejido, un fluido o un medicamento). Por ende, el método de medición está sujeto a un error aleatorio o error sistemático.

Para validar un método analítico se requiere determinar en el sistema de medición: adecuabilidad, precisión y linealidad; además de determinados parámetros a partir del conocimiento de las necesidades que se requieren cubrir con el método analítico en cuestión.

2.5.1 VERIFICACIÓN DEL SISTEMA

La verificación del sistema son pruebas utilizadas para comprobar que el sistema funciona correctamente, con base en criterios establecidos previamente. Esta verificación permite establecer la confiabilidad del sistema, antes del procesamiento de las muestras durante el uso rutinario del método; también se le conoce como buen o correcto funcionamiento del sistema.[19]

En función del sistema de medición, se deben establecer las características relacionadas con su funcionamiento correcto, basadas en el tipo de equipo e instrumentación utilizado en el método. Éstas pueden ser definidas en función de una respuesta analítica, como pueden ser sus propiedades, su variabilidad, su forma, su tiempo de respuesta, indicadores de separación, indicadores de eficiencia, respuesta de blancos, entre otros.

En la fase de desarrollo del método, las características mencionadas anteriormente y sus criterios de aceptación deben ser establecidas; durante la validación, la reproducibilidad debe ser únicamente verificada.

La verificación del sistema o también llamada como adecuabilidad del sistema es ampliamente reconocida como un componente crítico de bioanálisis. Es una prueba de idoneidad del sistema que supervisa el funcionamiento del instrumento a lo largo de su uso, cuando se utiliza para la cromatografía líquida de espectrometría de masas en métodos de bioanálisis. Este proceso de idoneidad del sistema está diseñado para asegurar que el sistema **CLAR-EM-EM** se está realizando de una manera que conduce a la producción de datos precisos y reproducibles que pueden presentarse con confianza a cualquier dependencia. Este proceso incluye pruebas de estabilidad de la señal, así como la respuesta del instrumento.[19]

La adecuabilidad del sistema asegura la confiabilidad de los datos obtenidos por el equipo, es una prueba de rutina que sirve también como un control de calidad; ya que si los datos obtenidos indican un bajo rendimiento de un sistema **CLAR-EM-EM** esto podría afectar negativamente a las concentraciones calculadas de muestras a evaluar.

Los parámetros a evaluar en la adecuabilidad del sistema son:

- Repetibilidad de las áreas de los picos (precisión del sistema), (**CV≤6**)
- Resolución entre los dos compuestos. (**R≥2**)
- Asimetría del pico. (**AS≤2**)
- Factor de capacidad (Tiempos de retención), (**k´≥2**)
- Eficiencia (Platos teóricos) (**N≥2000**).

2.5.2 DEFINICIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

- Especificidad: Este término es aplicado al método que cual responde a solamente a un analito.[10,17]

- Selectividad: Capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.

- Linealidad: Es la capacidad de obtener resultados analíticos que sean directamente proporcionales a la concentración de la sustancia de interés dentro de un rango determinado.

- Exactitud: Es el nivel de concordancia entre los resultados obtenidos y el valor de referencia.

- Precisión: Es la medida de qué tan cerca están los datos unos de otros o grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.[10,17]

- Repetibilidad: Precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.

- Precisión intermedia: Consiste en analizar por triplicado una muestra homogénea del producto, en dos días diferentes y por dos analistas diferentes. Utilizando de preferencia la misma sustancia de referencia y los mismos instrumentos y/o equipos.

- Reproducibilidad: Es la precisión expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios.

- Límite de detección: Es la cantidad más baja del analito en la muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada. Se expresa en unidades de concentración por ejemplo: porcentaje, partes por billón etc. Se emplea para confirmar cualitativamente la ausencia o la presencia del analito en la muestra.

- Límite de cuantificación: Es la cantidad mínima del analito que puede ser cuantificada con precisión y exactitud.

- Robustez: La robustez es una medida de la capacidad que tiene el método para permanecer inafectado por pequeñas variaciones en los parámetros. Proporciona una indicación de la confiabilidad durante su uso normal.

- Tolerancia, a la capacidad del método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo y que proporciona una indicación de su confiabilidad durante el uso normal

La validación puede ser justificada por los siguientes aspectos regulatorios:

Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas, en sus numerales 6.1.14, 9.1.1 a 9.1.11 y 9.2., en los cuales se indica que los métodos de análisis para evaluar las pruebas de intercambiabilidad de medicamentos, deben ser adecuados para cumplir con el propósito del estudio y validarse de acuerdo a los criterios establecidos.[20]

2.5.3 CRITERIOS DE VALIDACIÓN ESTABLECIDOS EN LA NOM-177-SSA1-1998.

Rango: establecer el intervalo en función de las concentraciones esperadas del compuesto por analizar. Se puede caracterizar por uno o más intervalos constituidos al menos por cinco concentraciones distintas cada

uno sin incluir las muestras blanco, siempre y cuando contengan puntos intermedios en común e incluyan el límite de cuantificación y concentración máxima del rango.[20]

Recuperación absoluta: analizar al menos por triplicado un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta del o los compuestos por analizar en la matriz biológica, dentro del rango. Comparar estos resultados con las respuestas de soluciones del mismo compuesto en las mismas concentraciones y en los mismos disolventes. El porcentaje no necesariamente es del 100%, pero debe ser reproducible en cada nivel de concentración dentro del rango.

Linealidad: definir un modelo que describa la relación matemática entre concentración y respuesta. Esta relación debe ser continua y reproducible a lo largo del rango.

Precisión.

- **Repetibilidad:** analizar en un mismo día por quintuplicado, un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta del o los compuestos por analizar en la matriz biológica. Estas concentraciones deben ser diferentes a las de la curva de calibración, pero deben incluirse en el rango. El coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15%.[15]
- **Reproduciblidad intra-laboratorio:** analizar por duplicado durante tres días, un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta de los compuestos por analizar en la matriz biológica. Estas concentraciones deben ser diferentes a las de la curva de calibración, pero deben incluirse en el rango. El coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15%.

Exactitud: el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad deben estar dentro del ±15% del valor nominal de concentración.

Estabilidad: determinar las condiciones de temperatura y tiempo entre otros, en las que el compuesto permanezca estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, al evaluar la respuesta de la concentración del compuesto por analizar en la matriz biológica, en muestras preparadas al menos por duplicado, a tres niveles de concentración dentro del rango, considerando al menos lo siguiente:

Condiciones de almacenamiento: evaluar la estabilidad del o los compuestos en la matriz biológica, bajo las condiciones de almacenamiento en las que se mantendrán las muestras, por un periodo por lo menos equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis.

Ciclos de congelación-descongelación: evaluar la estabilidad del o los compuestos por analizar al congelar y descongelar a temperatura ambiente muestras de concentración conocida del o los compuestos en la matriz biológica; esto constituye un ciclo de congelación-descongelación. Se deben evaluar al menos dos ciclos de congelación-descongelación antes de analizar las muestras.

Otros: evaluar otros factores a los cuales pueden estar sometidas las muestras hasta su análisis.[20]

Para que el o los compuestos de interés se consideren estables en las diferentes condiciones evaluadas, los resultados obtenidos deben cumplir los criterios de exactitud y repetibilidad.

Límite de cuantificación: analizar por quintuplicado la concentración más baja del rango de trabajo. Se considera que el punto tiene validez como límite de cuantificación, si su valor promedio cae dentro del ± 20% del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor que 20%.

Límite de detección: determinar la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica puede distinguirse de los niveles de ruido o de una muestra libre del compuesto de interés. Se debe sustentar científicamente el criterio empleado para establecerlo.

Selectividad: establecer la selectividad del método al analizar muestras blanco de la matriz biológica proveniente de por lo menos seis voluntarios. Evaluar el método contra posibles interferencias (por ejemplo: metabolitos, productos de degradación del compuesto de interés y cualquier otro fármaco administrado de manera concomitante). No deben existir interferencias en la cuantificación del compuesto por analizar.

Tolerancia: evaluar la tolerancia del método analítico a pequeñas, pero deliberadas modificaciones (por ejemplo: pH, disolventes, fase móvil, longitud de onda, temperatura, tiempo de incubación), al analizar muestras adicionadas de concentración conocida en la matriz biológica. Las modificaciones que se consideren, deben ser las que cumplan con los criterios de exactitud y precisión. Debido a que la norma con la cual se evaluaron los parámetros de validación fue la **NOM-177-SSA1-1998** y ésta sufrió una actualización se realizó una tabla comparativa con la **NOM-177-SSA1-2013** donde se observan los cambios efectuados, como se describe a continuación:

NOM-177-SSA1-1998[20]	NOM-177-SSA1-2013[21]
1.- Rango: Establecer el intervalo en base a la **Cmáx** esperada. Debe incluir una muestra blanco y al menos 5 concentraciones diferentes. **2.- Recuperación absoluta:** Analizar al menos por triplicado un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta del o los compuestos por analizar en la matriz biológica y en solución. **3.- Linealidad:** Definir un modelo que describa la relación matemática entre concentración y respuesta. **4.- Precisión:** **4.1.- Repetibilidad:** Analizar en un mismo día por quintuplicado, tres concentraciones conocidas: baja, media y alta. **4.2.- Reproducibilidad intralaboratorio:** Analizar por duplicado durante tres días, un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta. 5.- **Exactitud:** El valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad deben estar dentro del ±15% del valor nominal de concentración **6.- Estabilidad:** Determinar las condiciones de temperatura y tiempo entre otros, en las que el compuesto permanezca estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, al evaluar la respuesta de la concentración del compuesto por analizar en la matriz biológica, en muestras preparadas al menos por duplicado, a tres niveles de concentración dentro del rango. - Condiciones de almacenamiento - Ciclos de congelación-descongelación. **7.- Límite de cuantificación:** Analizar por quintuplicado la concentración más baja del rango de trabajo. **8.-Límite de detección:** Determinar la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica puede distinguirse de los niveles de ruido. 9.- **Selectividad:** Analizar muestras blanco de la matriz biológica proveniente de por lo menos 6 voluntarios. - Matriz biológica - Posibles interferencias **10.- Tolerancia:** Evaluar la tolerancia del método analítico a pequeñas, pero deliberadas modificaciones (pH, disolventes, fase móvil, longitud de onda, temperatura, tiempo de incubación), al analizar muestras adicionadas de concentración conocida en la matriz biológica	**1.- Selectividad:** 6 unidades diferentes de matriz biológica. Analizar matriz biológica normal, con lipemia y hemolizada. - Matriz biológica. - Posibles interferencias. **2.- Efecto matriz:** 6 unidades diferentes de matriz biológica. Analizar en matriz biológica y en solución muestras control bajo y alto y determinar el factor matriz normalizado. Adicionalmente considerar matriz biológica lipémica y hemolizada. **3.- Efecto de acarreo:** Realizar un mínimo de 3 inyecciones de la misma muestra blanco siendo una antes y dos después de una inyección del límite superior de cuantificación. **4.- Límite inferior de cuantificación:** Determinar en base al 5% de **Cmáx**. Reportada en la bibliografía para el analito de interés. **5.- Curva de calibración:** Establecer un rango en base a la Cmáx esperada. Debe incluir una muestra blanco, muestra cero y al menos 6 concentraciones diferentes. Se debe definir un modelo matemático y evaluar un mínimo de 3 curvas de calibración. **6.- Precisión:** **6.1.- Repetibilidad:** Analizar en un día por quintuplicado las muestras control **LIC, MCB, MCM, MCA Y MCD**. La MCD debe ser en cada factor de dilución que será aplicado a las muestras durante el estudio. **6.2.- Reproducibilidad:** Analizar al menos por quintuplicado en tres corridas analíticas diferentes y en al menos 2 días, las muestras control **LIC, MCB, MCM y MCA.** **7.- Exactitud:** De los datos de repetibilidad y reproducibilidad calcular la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal (% de desviación). **8.- Estabilidad de la muestra:** Determinar las condiciones de temperatura y tiempo entre otros, en las que el fármaco permanezca estable en la matriz biológica, durante su manejo, toma de muestra, almacenamiento y procesamiento analítico. Evaluar por triplicado la respuesta del analito a las concentraciones de las **MCB** y **MCA**, en las siguientes pruebas: - Estabilidad a corto plazo - Estabilidad a largo plazo - Estabilidad de la muestra procesada - Estabilidad en el automuestreador - Estabilidad ciclos de congelación-descongelación. - Estabilidad en solución

Tabla 1. Comparación de los parámetros a evaluar en la validación de métodos analíticos en las normas NOM-177-SSA1-1998 vs NOM-177-SSA1-2013.[20, 21]

2.5.4 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CUANTIFICAR CAPTOPRIL.

Un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico en una muestra.[10,17]

Es conocido que las técnicas y métodos analíticos están en cambio y mejoramiento constante; y en muchos casos en la tecnología de vanguardia. Es importante enfatizar que cada técnica analítica tiene sus propias características que varían de fármaco a fármaco. Además, el diseño de la técnica puede ser también influenciado por el objetivo final del estudio. Se necesitan criterios específicos de validación para métodos enfocados a cada sustancia de interés (fármaco y/o metabolito). Una validación adecuada para el propósito anterior frecuentemente consiste en correr una curva estándar con nuevas muestras de estándar para mostrar que la respuesta, vínculo y características generales del método son similares a los resultados de validación previa.

Aunque son varias etapas en el desarrollo y validación de un procedimiento analítico, la validación de un método analítico puede concebirse como una consistencia de dos etapas: la primera es el desarrollo del método analítico en el cual se define el ensayo y la segunda es la aplicación del análisis actual a muestras de estudios de disolución, farmacocinética, biodisponibilidad y bioequivalencia.

La cuantificación de captopril en muestras plasmáticas se puede llevar a cabo utilizando un método analítico específico para el fármaco, que permita cuantificar captopril inalterado por ejemplo **CLAR**.

Debido a la presencia del grupo "tiol" (**S-OH**) del captopril que es fácilmente oxidable, se debe adicionar un agente antioxidante a las muestras sanguíneas, inmediatamente después de haber sido obtenidas. El método utilizado debería tener una sensibilidad suficiente para cuantificar por lo menos 25 ng/mL de captopril inalterado. El método debe estar completamente validado de acuerdo a los criterios indicados en la **NOM-177-SSAI** vigente.[10]

Algunos reactivos derivatizantes más utilizados para cuantificar Captopril son monobromobimano, tioglo M3, p-bromofenacilo, D-L Dithiothreitol, entre otros.[15,22,23,24,25,26,27,28]

La siguiente tabla muestra las condiciones de análisis de algunos métodos analíticos reportados en la bibliografía donde cabe destacar que el estándar interno más utilizado fue el Enalapril, a partir de esta

revisión se buscan las condiciones adecuadas para cuantificar Captopril por **CLAR-EM-EM** en plasma humano.

REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	Khalid Hamad Abu-Shandia, et al.,	R. Rezende Kennia, et al.,	Barrientos Rafael E.	Medvedovici Andrei, et al.,	Isam Ismail Salem, et al.,	Vancea Szende, et al.,
ANALITO (M/Z)	CAPTOPRIL 401.5→274.4, 229.3,172.2	CAPTOPRIL 415→216, 253,270	CAPTOPRIL 217.20 → 115.90	CAPTOPRIL 408 →362	CAPTOPRIL 218 →171.6	CAPTOPRIL 415→216
ESTÁNDAR INTERNO	ENALAPRIL 348.4→249.3,179.2	NR	ENALAPRIL 377.40 →234.00	5-metoxi-1H-bencimidazol-2-tiol 371→260	ENALAPRIL 377 →234	NR
TÉCNICA ANALÍTICA	CLAR EM-EM ESI(+)	CLAR EM-EM ESI(+)	CLAR EM-EM ESI(+)	CLAR EM-EM ESI(+)	CLAR EM-EM ESI(+)	CLAR EM-EM ESI(+)
FASE MÓVIL	NR	ACETONITRILO-ÁCIDO FÓRMICO 0.1% (60:40% v/v)	METANOL-AGUA (60:40% v/v) + THF 13 mM + ACETATO AMONIO 5 mM	ACETONITRILO-ÁCIDO FÓRMICO 0.2% (15:85% v/v)	ACETONITRILO-AGUA (70:30% v/v) THF 13 mM	ACETONITRILO-ÁCIDO FÓRMICO 0.1% (60:40% v/v)
COLUMNA	CHROMPACK (25 x 0.25 mm, 0.12 µm)	CROMOLITH PERFORMANCE RP-18, (100 x 4.6 mm, 3 µm)	C18 (150 x 4.6, 3 µm)	ZORBAX SB-C18	PHENOMENEX C18 (150 x 4.6 mm, 3 µm)	CHROMOLITH C18 (100 x 4.6 mm, 3 µm)
MATRIZ	PLASMA	PLASMA	PLASMA	PLASMA	PLASMA	PLASMA
TIPO DE EXTRACCIÓN	PRECIPITACIÓN ACETONITRILO	PRECIPITACIÓN METANOL	LÍQUIDO-LÍQUIDO (ETER ETÍLICO-DICLOROMETANO 70:30% v/v)	PRECIPITACIÓN ACETONITRILO	LÍQUIDO-LÍQUIDO (ETER ETÍLICO-DICLOROMETANO 70:30% v/v)	PRECIPITACIÓN METANOL
DERIVATIZACIÓN	N,N,N',N',tetrametil-2-butandiamina	Precolumna con p-bromo-fenacilo-bromuro	1,4-dithio-dl-threitol (DTT)	Monobromobimano	1,4-dithio-dl-threitol (DTT)	p-bromofenacilo (p-BPB)
RANGO CURVA CALIBRACIÓN	0.010 - 2µg/mL	10–3000ng/mL	0.010 - 4µg/mL	2.5–750ng/mL	25–3000ng/mL	10-3000ng/mL
DOSIS/$C_{MÁX}$	NR	50mg (1335.16±302.61ng/mL)	50mg (570.2ng/mL)	25mg (349.15ng/mL)	50mg	25mg (229.9ng/mL)
NR= NO REPORTADO						

Tabla 2. Revisión bibliográfica de condiciones analíticas para cuantificar Captopril en plasma humano. [15, 22, 23, 24, 26, 27]

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Captopril, es un medicamento contra la hipertensión. El captopril es un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (**ECA**) que actúa bloqueando la proteína peptidasa del centro activo de la misma. El captopril fue la primera molécula sintetizada por acoplamiento molecular a partir de la molécula original de angiotensina I y del receptor de la **ECA**. Está indicado en el tratamiento de la hipertensión arterial y de la insuficiencia cardiaca congestiva que no responde a la terapia convencional; debido a sus propiedades es importante su estudio ya que México es uno de los principales países donde la población sufre de hipertensión arterial. [10,12,29]

La precisión y exactitud de un método es determinado mediante el cumplimiento de los parámetros de validación (linealidad, exactitud, precisión intermedia, especificidad, etc.) y es un requisito indispensable para un medicamento genérico presentar estudios de Biodisponibilidad, según la **NOM-177-SSA1-1998** y vigente, es por ello que surge la necesidad de brindar una metodología rápida que pueda ser validada y aplicada para la cuantificación de Captopril en plasma humano, realizándose ésta por cromatografía líquida de alta resolución **CLAR/EM/EM** ya que esta técnica brinda una mejor sensibilidad.

Puesto que, las técnicas tradicionales son métodos complicados y consumen tiempo se opta por equipos sofisticados disponibles en los laboratorios de análisis, **CLAR**, al igual que un tratamiento de la muestra rápido y eficaz, por medio de una reacción de derivatización, con **DTT**, que ayuda a recuperar Captopril total en muestras plasmáticas por medio de una precipitación directa con acetonitrilo, usando como estándar interno Nifedipino.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar y validar un método analítico para cuantificar Captopril en plasma humano en un rango de concentración de 5 a 800 ng/mL, por **CLAR/EM//EM** para aplicarlo en el análisis de muestras biológicas (Plasma humano).

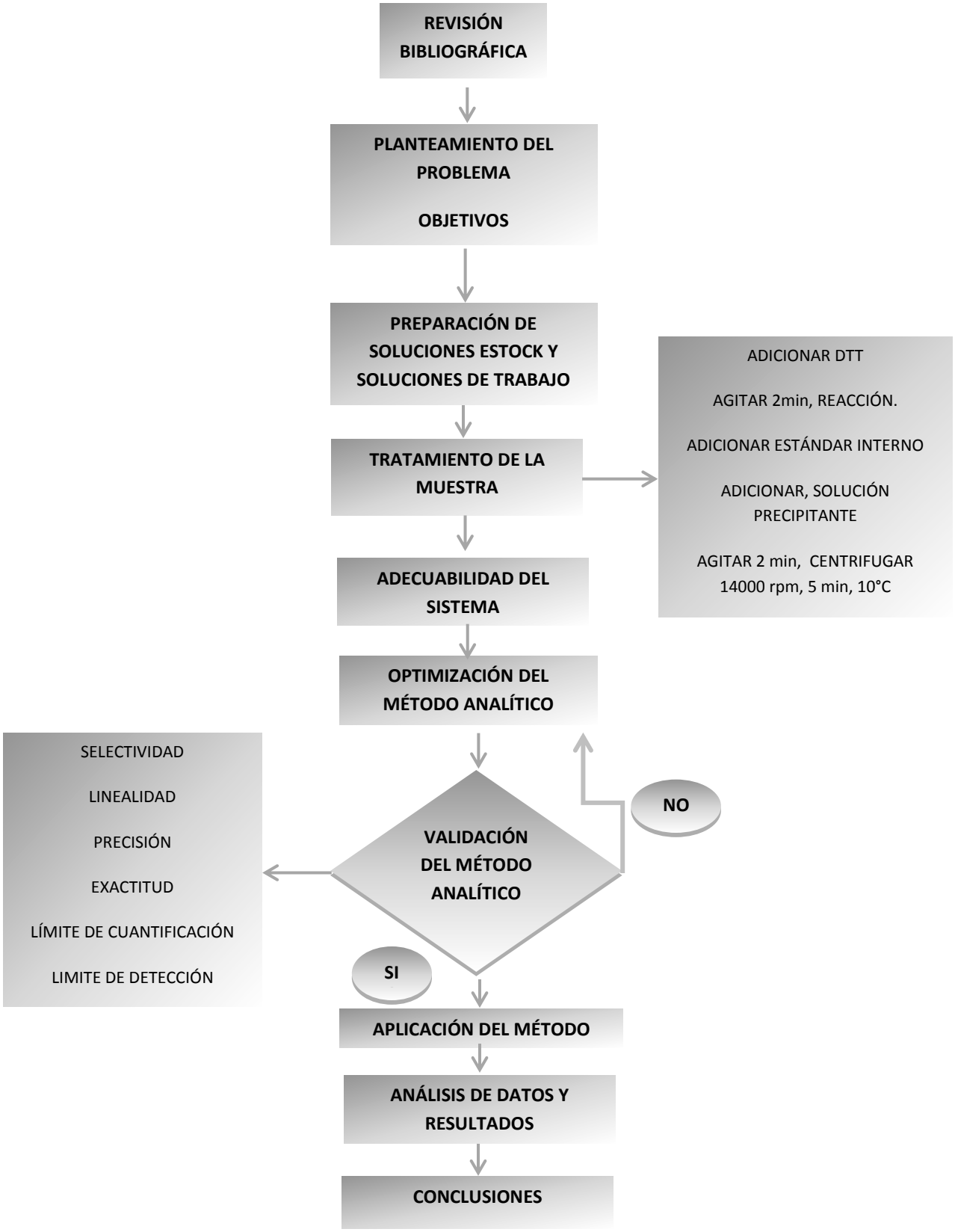
Objetivos específicos

- Establecer y optimizar un método analítico selectivo para la cuantificación de Captopril en plasma humano utilizando cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de espectrometría de masas.
- Aplicar un tratamiento de la muestra diferente a lo reportado en la bibliografía, por medio de la precipitación de proteínas por medio de acetonitrilo y utilizando como estándar interno nifedipino.
- Validar el método analítico de acuerdo a los parámetros de validación establecidos en la **NOM-177-SSA1-1998.**
- Aplicar el método analítico en voluntarios sanos para estudios de biodisponibilidad.

5. HIPÓTESIS

Al realizar una preparación de muestra con un reactivo especifico (D-L-Dithiothreitol) y empleando Nifedipino como estándar interno se espera obtener una muestra tratada más limpia y de recuperación más alta, la cual al cuantificarse por **CLAR/EM/EM** y validarse se logrará un método analítico confiable para aplicarse a estudios de biodisponibilidad.

6. DIAGRAMA DE FLUJO



7. MATERIAL Y MÉTODO

7.1.1 Reactivos y solventes.

- Agua desionizada, pureza **HPLC**, proveedor Milli-Q advance A10
- Ácido fórmico, pureza 99.5%, proveedor Merck
- Metanol HPLC, pureza 99.9%, proveedor **J.T. Baker**
- Acetonitrilo HPLC, pureza 99.9% , proveedor **J.T. Baker**
- D-L Dithiothreitol (**DTT**), pureza 99.5%, proveedor Sigma-Aldrich

7.1.2 Estándares de referencia

- Captopril Lote: 5103-11-167 Pureza: 100.57% Proveedor: **FEUM**
- Nifedipino Lote: 60116 Pureza: 99.46% Proveedor: **FEUM**

7.1.3 Material de laboratorio

- Columna analítica **ZORBAX ECLIPSE PLUS-C8**, (Longitud 100mm y diámetro 2.1mm, tamaño de partícula 3.5µm, empacada con partículas esféricas uniformes, con un tamaño de poro 95Å, zona de superficie 160m^2/g, límite de temperatura 60°C, rango de pH 2-8, carga de carbono 8% (>99.995% SiO_2), doble endcapped).
- Frascos de polipropileno de 30, 60, 250 y 500mL
- Frascos de vidrio para fase móvil de 250 y 500mL
- Guantes de nitrilo
- Matraces volumétricos de 10, 25, 50 y 200mL
- Membranas para filtración de Nylon de 0.45µm y 47mm de diámetro
- Microtubos de 2mL
- Placa de pocillos para inyector 1200 AT (Well Plate) de 96 pocillos con tapa de silicón
- Probeta de 250 y 500mL
- Puntas para pipetas automáticas de 100 y 1000µL
- Tubos de polipropileno de 15 y 50mL
- Vasos de precipitados de 50, 100 y 250mL
- Viales de 2mL

7.1.4 Fluido biológico

En la preparación de la curva de calibración y muestras control se utilizó una mezcla de plasma humano proveniente de seis fuentes individuales.

7.1.5 Equipos e instrumentos

- Ultracongelador a -40 ± 5°C, **ThermoElectron Co.** (Revco), modelo ULT-1740-9-A40.
- Balanza analítica **Mettler Toledo**, modelo XS105DU.
- Centrifuga **Eppendorf**, modelo 5804R.
- Ultrasonido, **Branson**, modelo 5510.
- Sistema de filtración **Millipore**.
- Sistema de purificación de agua, **Millipore**, modelo Elix-3 Milli-Q Advance A10.
- Vortex, **Barnstead International**, modelo M37615.
- Campana Extractora **Wold**.
- Multi vortex analógico **VWR**, modelo VX-2500.
- Micro Pipeta **Eppendorf** 10 – 100µL y 100 – 1000µL.
- Repetidora de volumen manual **HandyStep® S Brand**
- Sistema **HPLC**, **Agilent Technologies**, modelo 1200.
- LC/MS/MS Triple Cuadrupolo, **Agilent Technologies**, modelo G6460A
- Sistema de datos, Mass Hunter Data Adquisition, versión B.04.01

7.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

7.2.1 ÁCIDO FÓRMICO 0.2%: En un matraz volumétrico de 500mL, colocar aproximadamente 100mL de agua grado **HPLC**, añadir 1mL de ácido fórmico concentrado; mezclar y llevar al aforo con agua **HPLC**; agitar hasta homogenizar y transferir a un frasco de vidrio para fase móvil. Filtrar y desgasificar en el ultrasonido durante 5 minutos.

7.2.2 ACETONITRILO HPLC: En un reservorio de vidrio colocar 1L de acetonitrilo **HPLC**, filtrar y desgasificar en el ultrasonido durante 5 minutos.

7.2.3 FASE MÓVIL, ÁCIDO FÓRMICO 0.2% / ACETONITRILO HPLC (47/53% v/v): En una de las líneas del cromatógrafo colocar el frasco que contiene ácido fórmico 0.2%, purgar la línea. En una segunda

línea, colocar el frasco que contiene acetonitrilo **HPLC**, purgar la línea. Programar la bomba del sistema cromatográfico para que proporcione una mezcla 47:53% v/v.

7.2.4 SOLUCIÓN DILUYENTE (METANOL HPLC / AGUA HPLC 70:30% v/v): En un frasco de polipropileno de 250mL, colocar 175mL de metanol **HPLC** y 75mL de agua **HPLC**. Agitar hasta homogenizar, conservar esta solución a temperatura ambiente.

7.2.5 SOLUCIÓN PRECIPITANTE (ACETONITRILO HPLC 100%): En un frasco de vidrio de 250mL, colocar 250mL de acetonitrilo **HPLC**, conservar esta solución a -40ºC.

7.2.6 SOLUCIÓN D-L DITHIOTHREITOL 200mM (DTT): Pesar 0.7712 ± 0.05g de D-L Dithiothreitol (DTT), colocar en un matraz volumétrico de 25mL, adicionar 10mL de agua **HPLC**, agitar y llevar al ultrasonido 2-3 minutos. Aforar con agua **HPLC** y homogenizar la solución. Almacenar en tubos de 10mL a -40°C. Concentración final 200mM. Preparar diariamente.

7.2.7 SOLUCIÓN STOCK DE CAPTOPRIL (SS-CAP). Para preparar la solución stock, pesar 4.97 ± 0.05mg del estándar de Captopril, equivalentes a 5mg de Captopril y colocarlos en un matraz volumétrico de 25mL. Añadir 10mL de metanol agitar y llevar al ultrasonido 2-3 minutos. Esperar a que la solución esté a temperatura ambiente y aforar con metanol; homogenizar en vortex la solución durante 30 segundos. Identificar la solución como **SS-CAP**, conservar está solución a -40°C. Concentración final de Captopril 200, 000ng/mL.

7.2.8 DILUCIONES DE LA SOLUCIÓN STOCK DE CAPTOPRIL. Preparar las diluciones requeridas de la solución stock de Captopril (**SS-CAP**) como se describe en la siguiente tabla, utilizar solución diluyente, mezclar 30 segundos en vórtex. Estas soluciones deben almacenarse a - 40°C.

	Partir de la solución de Concentración (ng/mL)	Alícuota (mL)	Solución Diluyente (mL)	Volumen final (mL)	Concentración final (ng/mL)
Dilución 1.	200, 000	5	45	50	20, 000
Dilución 2.	20, 000	1.25	23.75	25	1, 000

Tabla 3. Diluciones de la solución stock de Captopril.

7.2.9 SOLUCIÓN STOCK DE NIFEDIPINO (EI) (SS-NIF). Para preparar la solución stock, pesar 4.02mg ± 0.05 del estándar de Nifedipino, equivalentes a 4mg de Nifedipino y colocarlos en un matraz volumétrico de 100mL. Añadir 10mL de metanol-agua (70:30% v/v), agitar y llevar al ultrasonido 2-3 minutos. Esperar a que la solución esté a temperatura ambiente y aforar con metanol-agua (70:30% v/v); homogenizar en vortex la solución durante 30 segundos, conservar esta solución a temperatura de -40°C protegida de la luz. Concentración final de Nifedipino 40, 000ng/mL (**SS-NIF**).

7.3 SOLUCIONES DE TRABAJO DE CAPTOPRIL.

Preparar las soluciones de trabajo descritas en la siguiente tabla, que serán necesarias para preparar los estándares de calibración y muestras control. Utilizar solución diluyente, mezclar durante 30 segundos. Estas soluciones se preparan diariamente.

Solución de trabajo	CAPTOPRIL Concentración (ng/mL)	Alícuota (µL)	Solución diluyente (µL)	Volumen Final (µL)	CAPTOPRIL Concentración final (ng/mL)
ST1	1, 000	100	900	1, 000	100
ST2	1, 000	200	800	1, 000	200
ST3	1, 000	500	500	1, 000	500
ST4	20, 000	100	900	1, 000	2, 000
ST5	20, 000	200	800	1, 000	4, 000
ST6	20, 000	300	700	1, 000	6, 000
ST7	20, 000	600	400	1, 000	12 , 000
ST8	20, 000	800	200	1, 000	16, 000
STCB	1, 000	300	700	1, 000	300
STCM	20, 000	400	600	1, 000	8, 000
STCA	20, 000	700	300	1, 000	14, 000

Tabla 4.Soluciones de trabajo de captopril.

7.4 SOLUCIÓN PARA EVALUAR ADECUABILIDAD.

Preparar la solución de adecuabilidad (**ADE**) a partir de la **STCM** y **SS-NIF** de Captopril y Nifedipino respectivamente, colocar las alícuotas correspondientes en un microtubo de 2mL y realizar la dilución en un vial de 2mL, como se indica en la siguiente tabla.

	Captopril	Alícuota (µL)	Plasma (µL)	Sol. DTT (µL)	Nifedipino	Alícuota (µL)	Ácido Fórmico (µL)	Sol. pp (µL)	Dilución	Concentración Final (ng/mL)
ADE	STCM 8,000 ng/mL	20	380	80	SS-NIF 40,000 ng/mL	30	20	1000	200 sobrenadante + 600 agua	Captopril = 26.1438 Nifedipino = 196.0784

Tabla 5. Solución para evaluar adecuabilidad.

7.5 CURVA DE CALIBRACIÓN Y MUESTRAS CONTROL

7.5.1 Preparación del Blanco de plasma. Medir y transferir 400µL de plasma a un microtubo de 2mL, continuar con el tratamiento de la muestra (punto 7.6). (Sin la adición del estándar interno).

7.5.2 Preparación del Blanco de plasma más estándar interno (EI). Medir y transferir 400µL de plasma a un microtubo de 2mL, adicionar 30µL de **SS-NIF** (**EI**). Continuar con el tratamiento de la muestra (punto 7.6).

7.5.3 Curva de calibración y muestras control. Preparar los estándares de calibración (**EC**) y muestras control (**MC**) de Captopril en plasma humano de acuerdo a lo descrito en la siguiente tabla. Colocar las alícuotas de solución y plasma en un microtubo de 2mL; continuar con el tratamiento de la muestra (punto 7.6).

EC/MC	Partir de la solución de trabajo	Captopril Concentración (ng/mL)	Alícuota (µL)	Volumen de Plasma (µL)	Volumen final (µL)	Captopril Concentración Final (ng/mL)
EC1	ST1	100	20	380	400	5.00
EC2	ST2	200	20	380	400	10.00
EC3	ST3	500	20	380	400	25.00
EC4	ST4	2, 000	20	380	400	100.00
EC5	ST5	4, 000	20	380	400	200.00
EC6	ST6	6, 000	20	380	400	300.00
EC7	ST7	12, 000	20	380	400	600.00
EC8	ST8	16, 000	20	380	400	800.00
MCB	STCB	300	20	380	400	15.00
MCM	STCM	8, 000	20	380	400	400.00
MCA	STCA	14, 000	20	380	400	700.00

Tabla 6. Curva de calibración y muestras control.

7.6 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.

Este procedimiento aplica para la preparación de estándares de calibración, muestras control y muestras de concentración desconocidas de un estudio.

- Descongelar las muestras plasmáticas y dejar que alcance la temperatura ambiente, agitar en **Multivórtex** durante 2 minutos.
- Para las muestras de concentración desconocida de un estudio, centrifugar a 5,000rpm, 10ºC por 5 minutos.
- Transferir una alícuota de 400µL de la muestra a un microtubo de 2mL.
- Adicionar 80µL de la solución **DTT** 200mM.
- Agitar en **Multivórtex** 2 minutos.
- Dejar reaccionar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Adicionar 30µL de la **SS-NIF** (40, 000ng/mL).
- Adicionar 20µL de ácido fórmico concentrado.
- Adicionar 1, 000µL de solución precipitante (acetonitrilo **HPLC** -40ºC).
- Agitar en Multivórtex 2 minutos y centrifugar a 14,000 rpm a 10 °C durante 5 minutos.
- Transferir 100µL del sobrenadante a otro microtubo de 2mL.
- Adicionar 300µL de agua **HPLC**, agitar en Multivórtex por 2 minutos.
- Colocar 200µL a las placas (well plate) e inyectar 5µL al sistema cromatográfico.

7.7 CONDICIONES DE ANÁLISIS.

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	CONDICIONES DEL DETECTOR MASAS-MASAS
Columna: Zorbax Eclipse Plus C8, (2.1 x 100 mm), 3.5 µm Volumen de Inyección: 5 µL Flujo: 0.25 mL / min. Temperatura de Columna: 35°C Temperatura de Inyector: 10°C Fase Móvil: Ácido fórmico 0.2%: Acetonitrilo HPLC (47/53% v/v) Presión aproximada : 60 bar	Equipo: Triple Cuadrupolo LC/MS/MS G 6460 , Agilent Technologies Fuente de ionización: ESI (+) Voltaje Capilar Positivo : 4500 **EMV**:200 Gas secado: N2, Flujo: 5 L/min. Temperatura: 350 °C Presión nebulizador: 45 Psi Temperatura del gas de secado: 300°C Flujo del gas de secado: 6 L/min

Compuesto	Ión Precursor	Ión Producto	Dwell Time	Fragmentador	Energía de Colisión	Tiempo de retención.
CAPTOPRIL	218.1	116.1	200	80	12	1.29 minutos
NIFEDIPINO	346.9	314.7	200	80	12	2.79 minutos

Tabla 7. Condiciones de análisis.

7.8 CÁLCULOS.

Obtener como respuesta las áreas de Captopril y Nifedipino (**EI**); calcular la relación área de Captopril / área de Nifedipino e interpolar esta relación en una curva de calibración, utilizar como modelo matemático una regresión lineal por mínimos cuadrados a la ecuación **y = mx + b**, con ponderación 1/x. Donde la variable "y" es la respuesta analítica (relación de áreas de Captopril y Nifedipino (**EI**)).

En hojas de cálculo preestablecidas se evalúa el modelo matemático, se agrupan 5 curvas de calibración por nivel de concentración y respuesta (área, relación de la respuesta del analito de interés entre la respuesta del estándar interno). Con los valores de concentración nominal contra respuesta se evalúan las curvas por mínimos cuadrados aplicando el modelo lineal tradicional, **y = mx + b**. y calcular los valores de "$\mathbf{r^2}$", "**m**", "**b**".

Calcular la concentración recuperada sustituyendo los valores de respuesta, pendiente e intercepto en la ecuación de la recta. Para definir cuál es el modelo que mejor describe la relación concentración respuesta se consideraron los siguientes factores:

- ✓ Tener el valor de $\mathbf{r^2}$ más alto o mayor a 0.98.
- ✓ Que la ∑**% DEA** sea la más baja.
- ✓ Que todas las curvas de calibración evaluadas cumplan con el modelo seleccionado.

Se utilizó el modelo lineal con ponderación 1/x ya que los datos de las variables "X" y "Y" no se ajustan al modelo lineal presentando una desviación estándar alta (∑**%DEA** 943.19), este modelo nos indica que la concentración es inversamente proporcional a la respuesta analítica (relación de áreas de Captopril y Nifedipino (EI)). (**Ver anexo 3**)[30,31].

La fase clínica del estudio se realizó en una unidad Clínica, que corresponde a un estudio de diseño prospectivo, longitudinal, de dos periodos, cruzado, dos tratamientos, dosis única, en estado de ayuno con un periodo de lavado de 7 días entre periodos; de dos productos conteniendo 25mg de Captopril. El estudio se planteó para un total de 26 voluntarios de ambos géneros, de los cuales 26 voluntarios finalizaron el estudio. A cada voluntario se le tomaron 32 tiempos de muestreo; se recibieron un total de 832 muestras para análisis. El tratamiento de referencia (formula A) fue Captopril tabletas de 25mg (Capotena®) y el tratamiento de prueba (formula B) fue Captopril tabletas de 25mg.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

8.1 DESARROLLO

8.1.1 BÚSQUEDA DE IONES:

Con una solución de Captopril 500ng/mL, se realizó un MS2 SCAN para encontrar el precursor iónico.

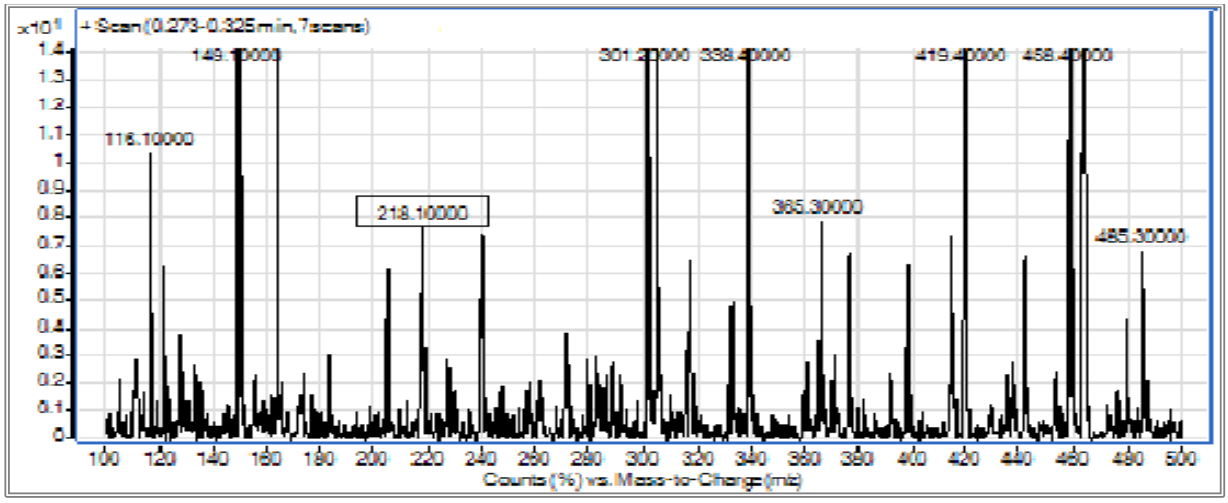


Fig. 8. Cromatograma iónico total donde se observa el producto iónico de Captopril en modo positivo 218.1.

Se buscaron las condiciones óptimas del fragmentador, así como la energía de colisión para encontrar el producto iónico del ion precursor 218.1 equivalente a la masa molecular de captopril ($C_9H_{15}NO_3S$) más 1, que es el electrón que se le adiciona.

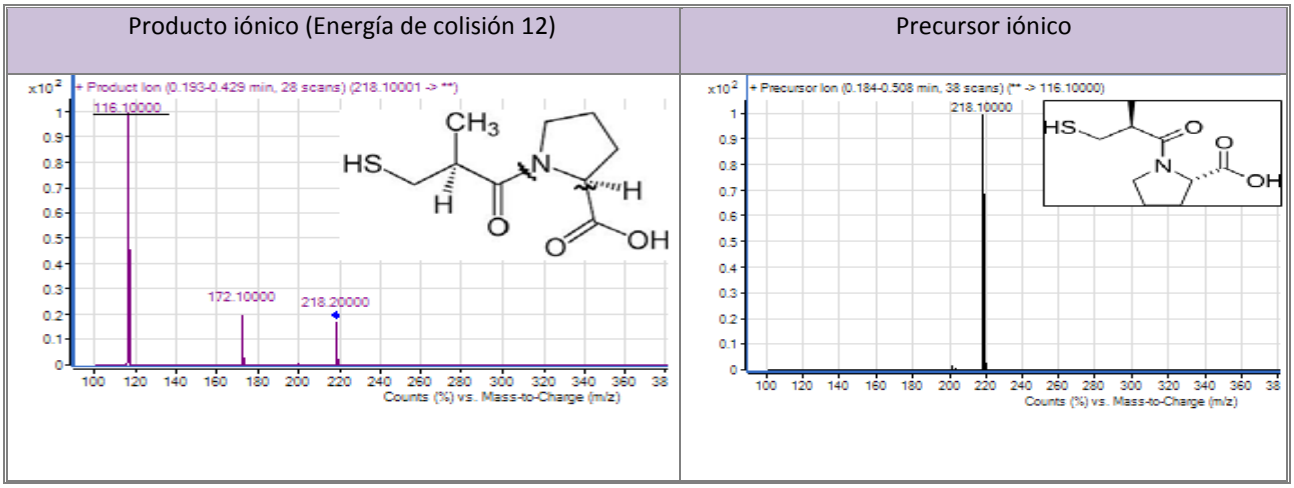


Fig. 9. Se obtiene el producto iónico 116.1 ($C_5H_8NO_2$) que es el más abundante proveniente de la ruptura del precursor iónico 218.1 obteniéndose una transición 218.1→116.1.

Adecuabilidad del sistema. Se realizó un ajuste de concentración de Nifedipino (EI) para una solución de Captopril de 26.1438ng/mL.

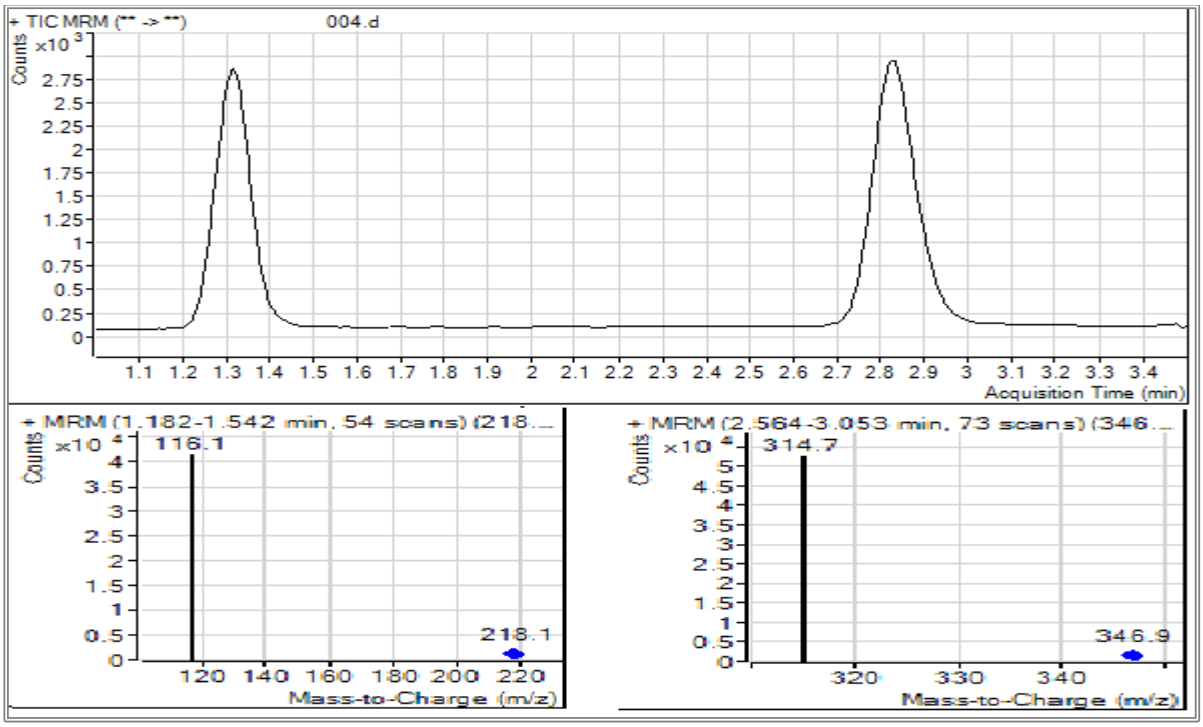


Fig. 10. Cromatograma donde se igualan alturas de Captopril y Nifedipino (EI) a una concentración de 26.1438ng/mL, (tr=1.29 min) y 196.0784ng/mL, (tr=2.79 min), respectivamente.

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Fig. 11. Solución de la adecuabilidad del sistema: precipitación con acetonitrilo frío.

8.2 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA:

La Adecuabilidad del sistema se evaluó todos los días durante el proceso de validación, cada día de análisis se realizaron inyecciones consecutivas de una solución que contenía, Captopril 26.1438ng/mL, y Nifedipino (**EI**) 196.0784ng/mL.

En la siguiente tabla; se muestran los resultados promedio obtenidos de la evaluación del funcionamiento adecuado del sistema. En ella se puede observar que los CV en cada día de análisis fueron ≤ 6.0% para el área promedio y la relación de áreas (Captopril/Nifedipino) no variaron más del 20% con respecto al valor promedio obtenido en el primer día.

Días	Área Promedio Captopril	Área Promedio Nifedipino (EI)	Área CV	Tr	Tr % C.V.	W	N	Presión (bar)	Relación**
DÍA 1	15224	20273	3.01	1.32	0.00	0.36	2170.36	65.57	0.7511
DÍA 2	11088	14568	2.43	1.29	0.08	0.35	2302.75	66.02	0.7615
DÍA 3	14139	19364	1.46	1.29	0.00	0.37	1935.54	65.05	0.7303
DÍA 4	16456	19566	3.50	1.29	0.00	0.36	2054.25	64.85	0.8414
DÍA 5	15879	18934	3.61	1.29	0.15	0.37	1937.12	63.96	0.8386

Tabla 8. Adecuabilidad del sistema. (Tr = tiempo de retención, W = ancho del pico, N = platos teóricos.). ** Relación área de Captopril / área de Nifedipino. Criterio de Aceptación: 0.6008 a 0.9012.

8.3 SELECTIVIDAD.

8.3.1 SELECTIVIDAD A LA MATRIZ BIOLÓGICA:

Para evaluar la selectividad del método a la matriz biológica, plasma humano, se analizaron blancos de una mezcla de plasma humano. Además, se analizaron blancos de muestra preparados con plasma lipémico y hemolizado. **Ver anexo 2**, Cromatogramas representativos del método analítico.

MUESTRA	RESULTADO
BLANCO DE REACTIVOS	NO HAY INTERFERENCIA SIGNIFICATIVA
BLANCO DE MEZCLA PLASMA	NO HAY INTERFERENCIA SIGNIFICATIVA
MEZCLA DE PLASMA + Captopril	NO HAY INTERFERENCIA SIGNIFICATIVA
MEZCLA DE PLASMA + Nifedipino (EI)	NO HAY INTERFERENCIA SIGNIFICATIVA
MEZCLA DE PLASMA + Captopril + Nifedipino (EI)	NO HAY INTERFERENCIA SIGNIFICATIVA
BLANCO DE PLASMA LIPEMICO (BCO PL LIP)	NO HAY INTERFERENCIA SIGNIFICATIVA
BLANCO DE PLASMA HEMOLIZADO (BCO PL HEM)	NO HAY INTERFERENCIA SIGNIFICATIVA

Tabla 9. Selectividad a la matriz biológica.

8.3.2 SELECTIVIDAD A POSIBLES INTERFERENCIAS:

Para evaluar la selectividad del método analítico a posibles fuentes de interferencia, se analizaron blancos de muestra conteniendo fármacos de uso común y los anticoagulantes Heparina Sódica y **EDTA.**

MUESTRA	RESULTADO
MEZCLA DE PLASMA + HEPARINA	NO HAY INTERFERENCIA SIGNIFICATIVA
MEZCLA DE PLASMA + EDTA	NO HAY INTERFERENCIA SIGNIFICATIVA
MEZCLA DE PLASMA + NAPROXENO	NO HAY INTERFERENCIA SIGNIFICATIVA
MEZCLA DE PLASMA + IBUPROFENO	NO HAY INTERFERENCIA SIGNIFICATIVA
MEZCLA DE PLASMA + ACETAMINOFEN	NO HAY INTERFERENCIA SIGNIFICATIVA
MEZCLA DE PLASMA + ÁCIDO SALICÍLICO	NO HAY INTERFERENCIA SIGNIFICATIVA
MEZCLA DE PLASMA + CAFEÍNA	NO HAY INTERFERENCIA SIGNIFICATIVA

Tabla 10. Selectividad a posibles interferencias.

No se presentaron interferencias significativas, la respuesta de los componentes endógenos del plasma no generan una respuesta mayor al 20% del valor de la respuesta de Captopril en el límite de cuantificación y tampoco mayor al 5% del valor de la respuesta del estándar interno. **En el anexo 2**, se muestran cromatógramas representativos de los resultados de esta prueba. De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluye que el método es selectivo para cuantificar Captopril en plasma.

Para el resto de la validación se utilizó la mezcla de plasma humano. Los resultados encontrados fueron los siguientes:

8.3.3 SELECTIVIDAD DEL SISTEMA Y PRUEBA DE ARRASTRE:

También se evaluó que en el inyector automático no se estuviese dando un fenómeno de acarreo de la muestra, para ello se inyectó un blanco de plasma, después de la inyección de una muestra control de concentración alta. Los resultados confirman que no se generan una respuesta mayor al 20% del valor de la respuesta de Captopril en el límite de cuantificación y tampoco mayor al 5% del valor de la respuesta del estándar interno.

8.3.4 EFECTO MATRIZ:

Se determinó la influencia que los compuestos endógenos provenientes del plasma tienen sobre la respuesta del instrumento, efecto matriz (supresión iónica o incremento en la respuesta); comparando la respuesta analítica de muestras en presencia y ausencia de iones provenientes del plasma. Para ello, se determinó el factor matriz (**FM**) en términos porcentuales para Captopril, con la siguiente ecuación:

$$\text{Factor Matriz} = \frac{\text{Respuesta analítica en presencia de iones de la matriz}}{\text{Respuesta analítica en ausencia de iones de la matriz}} \times 100$$

Los resultados encontrados se muestran en la siguiente tabla; en ellos se puede observar que la variabilidad originada por las diferentes fuentes de plasma es baja (**%CV < a 15%**). Adicionalmente se calculó el efecto matriz real (supresión iónica o enriquecimiento). Efecto Matriz = 100 – Factor Matriz; encontrándose para Captopril una supresión del 0.61%.

	MUESTRAS EN AUSENCIA DE IONES	**MUESTRAS EN PRESENCIA DE IONES**	**FACTOR MATRIZ %**
FLUIDO BIOLÓGICO	**Captopril Área**	**Captopril Área**	
PLASMA HUMANO	15580	16087	103.25
	16320	15836	97.03
	16310	15888	97.41
	15935	16018	100.52
	16274	16365	100.56
	15628	15248	97.57
		PROMEDIO	**99.39**
		DE	2.4639
		%CV	2.48
		EFECTO MATRIZ	**0.61**

Tabla 11.Efecto Matriz.

8.4 LINEALIDAD/RANGO (CURVA DE CALIBRACIÓN):

Para determinar la relación entre la concentración de Captopril en plasma contra respuesta del instrumento, se prepararon curvas de calibración en un rango de 5 a 800ng/mL de Captopril. Las curvas fueron preparadas y analizadas como se describe en el método analítico; cinco curvas de calibración preparadas independientemente durante la validación del método, fueron evaluadas por regresión lineal con mínimos cuadrados. Se encontró que el modelo que mejor describe la relación concentración contra respuesta, es un modelo lineal **y = m x + b** con ponderación **1/x**. El método es lineal en el rango de concentración evaluado, todos los valores del coeficiente de correlación "**r**" fueron > a 0.99 y del coeficiente de determinación "**r^2**" > a 0.98. Además, todos los niveles de concentración cumplen con los criterios de precisión y exactitud; **%CV y %DEA ≤ 15%**, y para el nivel de concentración más bajo de la curva de calibración, el límite cuantificación, **%CV y %DEA fue ≤ 20%**. A continuación se muestran los resultados obtenidos. Por lo tanto, el método es lineal en el rango evaluado.

	CONCENTRACIÓN ADICIONADA ng/mL							
	5.00	**10.00**	**25.00**	**100.00**	**200.00**	**300.00**	**600.00**	**800.00**
	CONCENTRACIÓN RECUPERADA ng/mL							
CURVA 1	5.6294	9.8278	24.6350	96.8451	181.8845	295.4047	626.8040	798.9695
CURVA 2	5.4012	10.4835	24.3964	96.4819	187.1748	283.3858	622.5492	810.1272
CURVA 3	5.3898	9.0077	26.8419	95.8546	194.9022	296.2376	629.6835	782.0827
CURVA 4	5.5396	10.5091	24.3994	94.6947	178.3210	295.3271	607.6701	823.5391
CURVA 5	5.3708	9.8770	24.6541	101.0415	193.2056	287.2938	587.2489	831.3083
Promedio	5.4662	9.9410	24.9854	96.9836	187.0976	291.5298	614.7911	809.2054
DE	0.1131	0.6134	1.0452	2.4110	7.1139	5.8281	17.5753	19.5912
%CV	**2.07**	**6.17**	**4.18**	**2.49**	**3.80**	**2.00**	**2.86**	**2.42**
%DEA	**9.32**	**0.59**	**0.06**	**3.02**	**6.45**	**2.82**	**2.47**	**1.15**
Límite Superior	6.0000	11.5000	28.7500	115.0000	230.0000	345.0000	690.0000	920.0000
Límite Inferior	4.0000	8.5000	21.2500	85.0000	170.0000	255.0000	510.0000	680.0000

PARÁMETROS DE LAS CURVAS CONCENTRACIÓN vs. RESPUESTA				
	m	**b**	**r**	**r^2**
CURVA 1	0.0017	0.0007	0.9992	0.9983
CURVA 2	0.0020	-0.0012	0.9992	0.9984
CURVA 3	0.0018	-0.0028	0.9993	0.9987
CURVA 4	0.0021	-0.0045	0.9990	0.9981
CURVA 5	0.0020	-0.0003	0.9999	0.9999
promedio	0.0019			
DE	0.0002			
%CV	**8.44**			

m = pendiente, b = intercepto, r= coeficiente de correlación, r^2 =coeficiente de determinación

Tabla 12. Linealidad/Rango (Curva de Calibración).

A continuación se presenta la gráfica de linealidad del método obtenida al graficar Concentración Adicionada contra Concentración Recuperada de las cinco curvas evaluadas durante el proceso de validación.

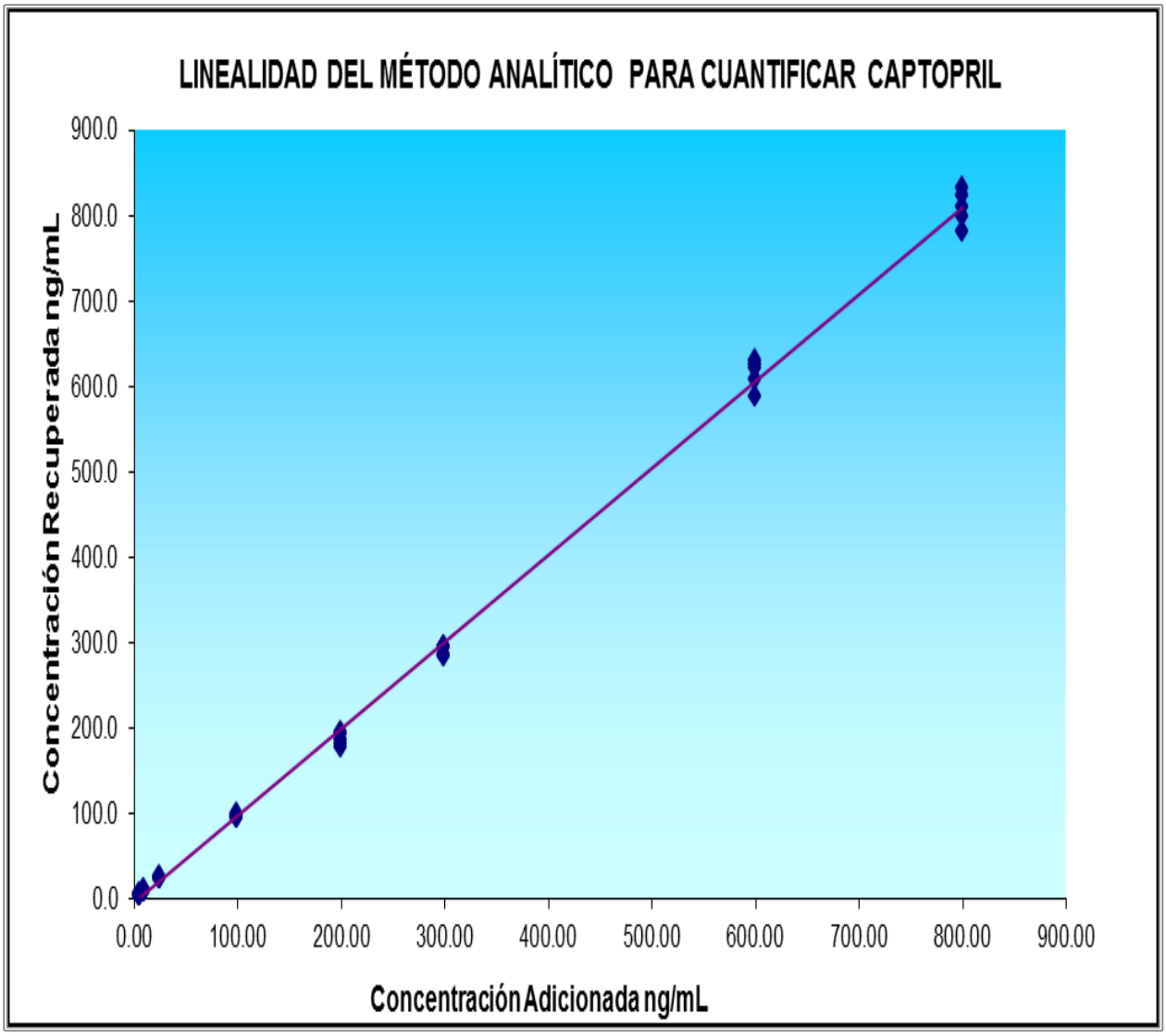


Fig. 12. Gráfica de linealidad del método analítico para cuantificar Captopril.

8.5 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN:

La capacidad del método para cuantificar Captopril en el nivel más bajo de la curva de calibración, el límite de cuantificación, se evaluó en muestras con un nivel de concentración de 5ng/mL. Los resultados se muestran a continuación. En ellos podemos ver, que el valor promedio de la concentración recuperada cae en el rango ± 20% del valor de la concentración adicionada y **%CV es ≤ al 20%**. Por lo tanto, el método es capaz de cuantificar muestras con niveles de concentración de 5ng/mL de Captopril, con precisión y exactitud.

Concentración Adicionada ng/mL	Concentración Recuperada ng/mL	PROMEDIO	DE	%CV	%DEA
5.00	5.6299 5.6123 5.4007 5.6786 5.8468	5.6337	0.1598	**2.84**	**12.67**

Tabla 13. Límite de cuantificación.

8.6 LÍMITE DE DETECCIÓN:

La concentración que el método analítico es capaz de detectar pero no necesariamente cuantificar con precisión y exactitud fue de 2.50ng/mL de Captopril.

Concentración adicionada ng/mL	Relación Señal/ruido	ÁREA	PROMEDIO	DE	%CV
2.50	7.7 7.8 6.9	33 37 36	35.3333	2.0817	**5.89**

Tabla 14. Límite de detección.

8.7 PRECISIÓN:

8.7.1 PRECISIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN:

La precisión en la preparación de la curva de calibración fue evaluada preparando en el mismo día, 3 curvas de calibración como se describe en el método analítico, partiendo de las mismas soluciones de trabajo de Captopril y Nifedipino. Las 3 curvas de calibración cumplen con los criterios establecidos en el ensayo para la curva de calibración y el **%CV** de las pendientes fue **≤15%**. Los resultados de estas 3 curvas fueron los siguientes.

	CONCENTRACIÓN ADICIONADA ng/mL							
	5.00	**10.00**	**25.00**	**100.00**	**200.00**	**300.00**	**600.00**	**800.00**
	CONCENTRACIÓN RECUPERADA ng/mL							
CURVA 1	5.3708	9.8770	24.6541	101.0415	193.2056	287.2938	587.2489	831.3083
CURVA 2	5.3549	9.3211	25.4278	101.4792	195.5958	290.0102	610.3242	802.4867
CURVA 3	5.5799	9.9798	23.7202	96.4244	195.6247	294.6246	588.5428	825.5036
Promedio	5.4352	9.7260	24.6007	99.6484	194.8087	290.6429	595.3720	819.7662
DE	0.1256	0.3544	0.8551	2.8006	1.3884	3.7061	12.9652	15.2433
%CV	**2.31**	**3.64**	**3.48**	**2.81**	**0.71**	**1.28**	**2.18**	**1.86**
%DEA	**8.70**	**2.74**	**1.60**	**0.35**	**2.60**	**3.12**	**0.77**	**2.47**
Límite Superior	6.0000	11.5000	28.7500	115.0000	230.0000	345.0000	690.0000	920.0000
Límite Inferior	4.0000	8.5000	21.2500	85.0000	170.0000	255.0000	510.0000	680.0000

PARÁMETROS DE LAS CURVAS CONCENTRACIÓN vs. RESPUESTA				
	m	**b**	**r**	**r^2**
CURVA 1	0.0020	-0.0003	0.9999	0.9999
CURVA 2	0.0019	0.0001	0.9998	0.9996
CURVA 3	0.0021	0.0015	0.9996	0.9992
promedio	0.0020			
DE	0.0001			
% CV	**3.20**			

m = pendiente, b = intercepto, r= coeficiente de correlación, r^2 =coeficiente de determinación

Tabla 15. Precisión de las curvas de calibración.

8.7.2 REPETIBILIDAD INTRA-DÍA:

La repetibilidad del método analítico fue evaluada con muestras de Captopril a 3 niveles de concentración, los resultados se muestran en la siguiente tabla. Como puede observarse, los **%CV** y los **%DEA** en los 3 niveles de concentración evaluados fueron ≤ a **15%**; por lo tanto el método es preciso y repetible.

	Concentración adicionada ng/mL	Concentración recuperada ng/mL	% DEA	PROMEDIO	DE	%CV	%DEA
MUESTRA CONTROL BAJO	**15.00**	14.0925	6.05	14.0618	0.9227	**6.56**	**6.25**
		12.8448	14.37				
		13.9070	7.29				
		15.4395	2.93				
		14.0250	6.50				
MUESTRA CONTROL MEDIO	**400.00**	394.4818	1.38	392.5286	4.4148	**1.12**	**1.87**
		393.3054	1.67				
		391.1442	2.21				
		397.8022	0.55				
		385.9093	3.52				
MUESTRA CONTROL ALTO	**700.00**	701.9019	0.27	722.8784	20.7879	**2.88**	**3.27**
		717.8951	2.56				
		709.5974	1.37				
		755.0962	7.87				
		729.9015	4.27				

Tabla 16. Repetibilidad intra-día.

8.7.3 REPRODUCIBILIDAD INTER-DÍA:

La reproducibilidad del método analítico fue evaluada por un analista durante 3 días diferentes, analizando muestras a 3 niveles de concentración; los resultados se muestran en las siguientes tablas. Se advierte que los **%CV** y los **%DEA** en los 3 niveles de concentración analizados fueron ≤ a **15%** en la evaluación analista-día; por lo tanto el método es preciso y reproducible.

	Concentración adicionada ng/mL	DÍA 1 Concentración recuperada ng/mL	DÍA 2 Concentración recuperada ng/mL	DÍA 3 Concentración recuperada ng/mL	PROMEDIO	DE	%CV	%DEA
MUESTRA CONTROL BAJO	**15.00**	14.0925	15.0992	16.5104	15.0144	1.6136	10.75	0.10
		12.8448	16.3994	16.6803				
		13.9070	16.8967	13.5859				
		15.4395	12.8875	17.0574				
		14.0250	12.9894	16.8004				
MUESTRA CONTROL MEDIO	**400.00**	394.4818	410.4080	411.8456	397.6621	9.7632	2.46	0.58
		393.3054	387.7920	399.3626				
		391.1442	376.0266	401.3955				
		397.8022	400.6944	405.2996				
		385.9093	407.1087	402.3555				
MUESTRA CONTROL ALTO	**700.00**	701.9019	779.9227	755.2378	749.8552	27.6929	3.69	7.12
		717.8951	789.4339	789.8283				
		709.5974	733.8705	734.8868				
		755.0962	761.4100	769.0247				
		729.9015	753.2335	766.5875				

Tabla 17. Reproducibilidad inter-día.

8.8 EXACTITUD:

La exactitud del método se determinó utilizando los datos obtenidos de las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad. Todos los resultados cumplen con el criterio de aceptación **%DEA ≤ 15%**. Por lo tanto el método es exacto.

8.9 RECOBRO:

La capacidad del método para recuperar concentraciones con precisión fue evaluada con muestras a tres niveles de concentración. Se compararon muestras pre-cargadas (adicionadas con Captopril y Nifedipino antes de aplicar el tratamiento de la muestra) y muestras post-cargadas (adicionadas con Captopril y Nifedipino después de aplicar el tratamiento de la muestra a blancos de muestra). Se encontró que para Captopril el método es capaz de recuperar el **89.92%** y de Nifedipino (**EI)** el **99.82%**. Los resultados generales fueron los siguientes.

	PRE-CARGADAS		**POST-CARGADAS**		**RECOBRO %**	**RECOBRO %**
	Captopril Área	Nifedipino Área	Captopril Área	Nifedipino Área	Captopril	Nifedipino
MUESTRAS CONTROL BAJO	518	16821	543	16526		
	491	15749	554	15523		
	407	16586	529	16901		
	512	16018	533	16126		
	521	16585	561	16702		
promedio	489.80	16351.80	544.00	16355.60	**90.04**	**99.98**
DE	47.7462	448.3779	13.5647	545.9920		
%CV	**9.75**	**2.74**	**2.49**	**3.34**		
MUESTRAS CONTROL MEDIO	14482	16523	15581	16129		
	13918	16379	15449	16417		
	13608	15933	15391	16437		
	14111	16362	15980	15894		
	14121	16494	15504	16411		
promedio	14048.00	16338.20	15581.00	16257.60	**90.16**	**100.50**
DE	319.4347	237.0880	233.8023	239.7223		
%CV	**2.27**	**1.45**	**1.50**	**1.47**		
MUESTRAS CONTROL ALTO	26810	16642	30187	15928		
	26482	15716	29746	16434		
	25404	16207	27890	16137		
	26446	16121	29193	16343		
	25716	15726	29116	16392		
promedio	26171.60	16082.40	29226.40	16246.80	**89.55**	**98.99**
DE	586.5107	384.5248	864.8707	211.5838		
%CV	**2.24**	**2.39**	**2.96**	**1.30**		
				Promedio	**89.92**	**99.82**
				DE	0.32	0.77
				%CV	**0.36**	**0.77**

Tabla 18. Recobro.

8.10 TOLERANCIA A LA DILUCIÓN DE LA MUESTRA:

Se evaluó la tolerancia del método a la dilución de la muestra, se evaluaron factores de dilución **1:2** y **1:4**. Los resultados demuestran que de ser necesario diluir las muestras, el método genera resultados precisos y exactos con **%CV < 15%**. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

	Concentración Adicionada ng/mL	FACTOR DILUCIÓN (FD)	Concentración Recuperada ng/mL	Concentración Adicionada* FD ng/mL	PROMEDIO	DE	%CV	%DEA
MUESTRA ADICIONADA	**1000**	**2**	547.1997	1094.3994	1092.1319	14.6235	1.34	9.21
			549.4191	1098.8382				
			540.8322	1081.6644				
			555.7573	1111.5146				
			537.1215	1074.2430				
MUESTRA ADICIONADA	**1000**	**4**	270.8848	1083.5392	1091.3199	16.8908	1.55	9.13
			278.0653	1112.2612				
			267.2444	1068.9776				
			272.2030	1088.8120				
			275.7524	1103.0096				

Tabla 19. Tolerancia a la dilución de la muestra.

8.11 APLICACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO A UN ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD DE UNA DOSIS ORAL DE 25 mg DE CAPTOPRIL, EN VOLUNTARIOS SANOS QUE CUMPLE CON LO ESTABLECIDO EN LA NOM-177-SSA1-1998.

Con los resultados obtenidos del total de muestras analizadas del estudio, se elaboró la gráfica de los valores promedio de las concentraciones plasmáticas de Captopril a cada tiempo de muestreo para ambas formulaciones, prueba (**Cmáx**=789.0431ng/mL) y referencia (**Cmáx**=803.7703ng/mL), (**Tmáx**=1.00 hora). Los resultados se muestran a continuación.

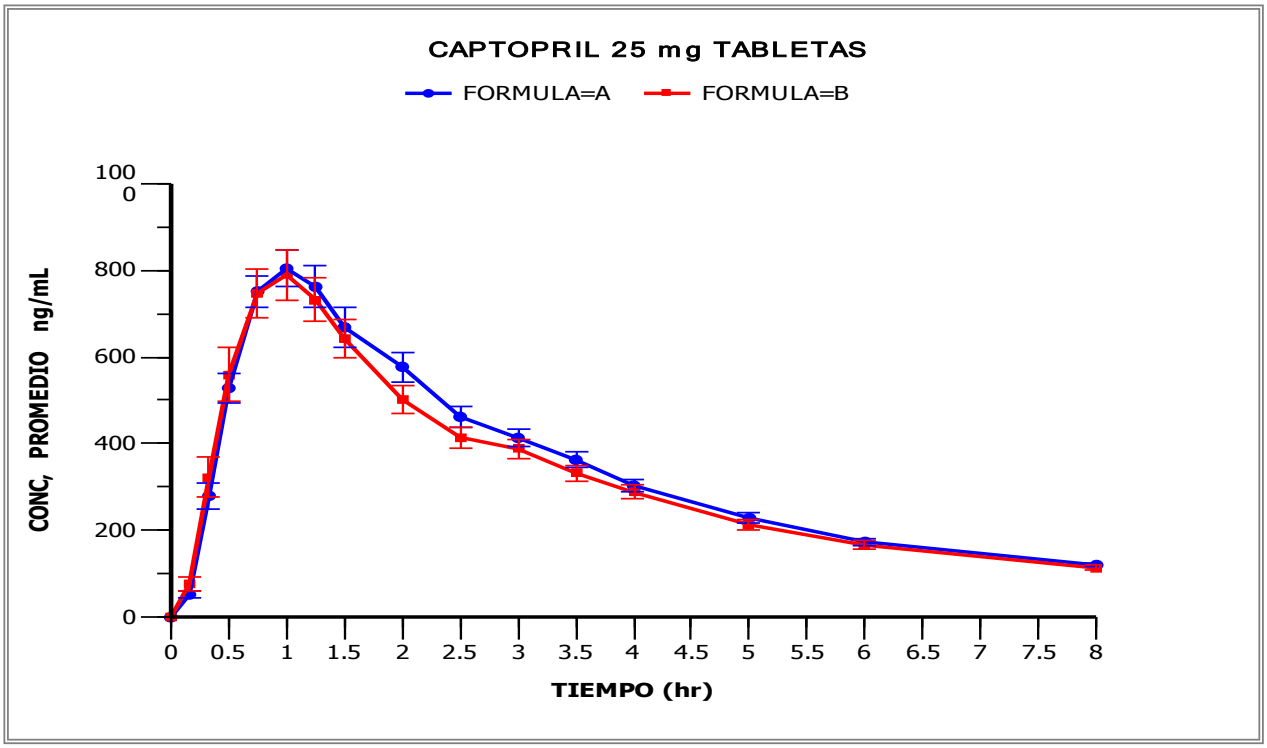


Fig. 13. Gráfica de la concentración plasmática promedio de Captopril vs. Tiempo, de ambas formulaciones, escala normal.

La clave del éxito de un método analítico para cuantificar un analito por cromatografía de líquidos masas depende de muchos factores los principales son: las condiciones del detector, condiciones cromatográficas y el tratamiento de la muestra.

El primer paso para el desarrollo de un método analítico es realizar una revisión bibliográfica para conocer las condiciones en que se ha trabajado el analito de interés, posteriormente se analizaran las propiedades

fisicoquímicas de la molécula en este caso fue del Captopril, teniendo en cuenta esto se preparó una solución a una concentración de 500ng/mL, la cual sólo se utilizó para la búsqueda de iones por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un detector de masas-masas, no para el rango de la curva de calibración, obteniendo una transición para la molécula de captopril de **218.1→116.1** por fuente de ionización ESI en modo positivo.

Posteriormente se procedió a buscar las condiciones cromatográficas para la cuantificación de captopril, partiendo de información obtenida en la búsqueda bibliográfica (**tabla 2**), donde se observaron picos cromatográficos bien definidos con una columna Zorbax Eclipse Plus C8, (2.1 x 100 mm), 3.5 µm, la fase móvil fue ácido fórmico **0.2%**: Acetonitrilo HPLC (**47/53% v/v**) con un flujo de 0.25 mL/min, volumen de inyección 5µL y temperatura de la columna de 35°C.

En el tratamiento de la muestra se empleó un reactivo derivatizante **DTT**, debido a que el captopril es una molécula que se degrada muy rápidamente en plasma debido a sus componentes (pH, oxígeno y compuestos metálicos), convirtiéndose en disulfuro de captopril, este reactivo permitió regresarlo a su estado natural por que rompe la molécula de disulfuro, por lo que se pudo cuantificar como captopril total, las pruebas nos indicaron que al adicionar 80µL de **DTT**, en un tiempo de reacción de 10min, se obtenía una mayor recuperación de captopril, se le adicionó ácido fórmico para evitar nuevamente la degradación de la molécula ya que en este medio es más estable. La extracción de captopril en plasma se realizó adicionando 1mL de acetonitrilo permitiendo la correcta precipitación de proteínas, posteriormente se realizó una dilución con agua que fue con la solución que se obtuvieron mejores picos cromatográficos y mejor estabilidad de la muestra, la dilución se utilizó para disminuir la supresión iónica, que se pudiera generar por los componentes del plasma, así como para obtener respuestas más pequeñas y evitar la saturación de iones en el equipo.

Cuando se encontraron las condiciones óptimas para el tratamiento de la muestra, se seleccionó el estándar interno, el que se extrajo en las mismas condiciones que captopril sin verse afectado, este fue el Nifedipino, el cual se le buscó una concentración que igualara la altura del pico cromatográfico de Captopril en la muestra control de concentración media, para obtener la solución de adecuabilidad que fue 26.1438ng/mL y 196.0784ng/mL para captopril y nifedipino (**EI**), respectivamente; el estándar interno nos sirve en los métodos biológicos ya que ayuda a compensar las pérdidas de analito que pudieran sufrirse en la extracción, al igual que el efecto de la matriz en la señal del analito.

Al finalizar el desarrollo del método analítico para cuantificar captopril en plasma humano por **CLAR-EM-EM**, se procedió a evaluarlo por medio de los parámetros de validación de métodos analíticos, por los resultados obtenidos el método analítico es selectivo, lineal, preciso y exacto ya que los datos cumplen con los criterios de aceptación establecidos en la **Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998.**

El modelo matemático que se aplicó fue una regresión lineal por mínimos cuadrados a la ecuación y = mx + b, con ponderación 1/x. Éste fue el que presentó una menor dispersión de los datos, así como una mayor r^2=0.9924 y se comprobó con una prueba de carencia de ajuste donde "**F**" calculada es menor a "**F**" de tablas, $\mathbf{F_{cal} = 0.2470 \leq F_{tab} = 2.40}$ (**Anexo 3**).

El rango de la curva de calibración de 5 a 800ng/mL se estableció en base a las **Cmáx** reportadas en la literatura para una dosis de 25mg que fueron 349.15ng/mL y 229.9ng/mL (**tabla 2**).

El objetivo final del desarrollo y validación de un método analítico para cuantificar captopril en plasma humano fue aplicarlo en un estudio de Biodisponibilidad de una presentación oral de 25mg en voluntarios sanos, obteniendo una concentración máxima de 803.7703ng/mL para el tratamiento de referencia y 789.0431ng/mL para el tratamiento de prueba; debido a que la concentración máxima de algunos voluntarios estuvo por arriba del rango de la curva de calibración se tuvieron que reanalizar esas muestras con dilución 1:2 o 1:4.

La concentración máxima (**Cmáx**) de un fármaco es uno de los parámetros farmacocinéticos que se utiliza para determinar la biodisponibilidad entre dos medicamentos, por lo tanto es muy importante cuantificarla con exactitud y precisión.

Los métodos analíticos realizados por **CLAR/EM/EM,** son muy eficaces ya que permiten un alto rendimiento cuantitativo del analito de interés, así como resultan ser más económicos por las pequeñas cantidades que se manejan en flujos y fases móviles, lo que permite tiempos de retención más cortos. El método analítico aplicado para este estudio, fue diferente a lo reportado en la bibliografía, respecto al tratamiento de la muestra y el estándar interno por lo que disminuye tiempos de análisis y costos, lo cual es muy favorable en los estudios de biodisponibilidad ya que en éstos se manejan un gran número muestras.

9. CONCLUSIONES.

Se desarrolló y validó un método analítico para cuantificar Captopril en plasma humano en un rango de concentración de 5 a 800ng/mL, por **CLAR/EM//EM** el cual se aplicó en un estudio de biodisponibilidad de una presentación oral de 25mg en voluntarios sanos en base a lo establecido en la **Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998**, con una recuperación de captopril total por medio de la adicción de D-L-Dithiothreitol y utilizando Nifedipino como estándar interno.

ANEXOS

ANEXO 1. RESUMEN DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR CAPTOPRIL.

El método utilizado fue validado de acuerdo a los criterios establecidos en la **NOM-177-SSA1-1998** en lo referente a la validación de métodos analíticos para realizar pruebas de biodisponibilidad y bioequivalencia.

PRECISIÓN Y EXACTITUD: El método es preciso y exacto.

REPETIBILIDAD Y EXACTITUD INTRA DÍA		
MUESTRA CONTROL	**%CV**	**%DEA**
nivel bajo	6.56	6.25
nivel medio	1.12	1.87
nivel alto	2.88	3.27

REPRODUCIBILIDAD Y EXACTITUD INTER DÍA		
MUESTRA CONTROL	**%CV**	**%DEA**
nivel bajo	10.75	0.10
nivel medio	2.46	0.58
nivel alto	3.69	7.12

LINEALIDAD:

MODELO:
Modelo lineal, con ponderación 1/x
$r^2 > 0.98$ $r > 0.99$

RANGO DE CONCENTRACIÓN:
5 a 800ng/mL

RECOBRO:

MUESTRA CONTROL	% Recobro
nivel bajo	90.04
nivel medio	90.16
nivel alto	89.55
Promedio	89.92
%CV	0.36

FACTOR MATRIZ / EFECTO MATRIZ :

FACTOR MATRIZ	
promedio	99.39%
%CV	2.48
EFECTO MATRIZ	0.61%

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN:

	%CV	%DEA
5.0ng/mL	2.84	12.67

LÍMITE DE DETECCIÓN:
2.5ng/mL

SELECTIVIDAD: El método es selectivo para Captopril y Nifedipino (EI), no presenta picos de interferencia en Naproxeno, Ácido salicílico, Acetaminofén, Ibuprofeno, Heparina sódica y EDTA.

TOLERANCIA A LA DILUCION DE LA MUESTRA

FACTOR DE DILUCION 1:2 %CV 1.34 %DEA 9.21

FACTOR DE DILUCION 1:4 %CV 1.55 %DEA 9.13

ESTABILIDAD:

ESTABILIDAD EN SOLUCIÓN	
Captopril	28 días a -40°C
Nifedipino	28 días a -40°C

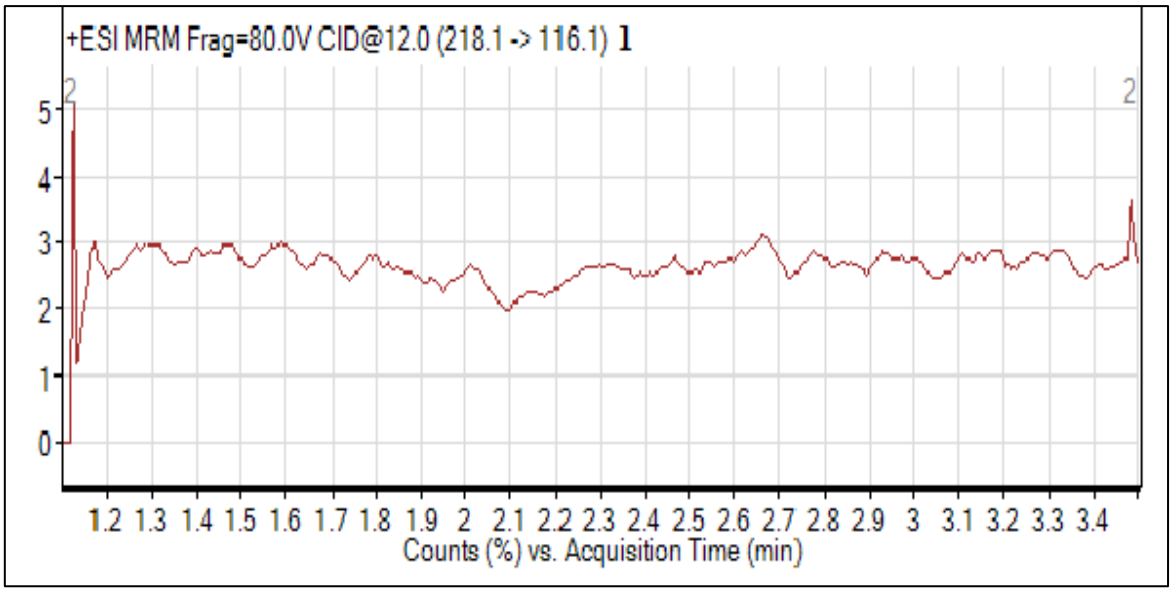
ESTABILIDAD DE MUESTRAS PLASMÁTICAS.	
Congelación muestra procesada,	24 Horas a -40°C
Temperatura Ambiente,	48 Horas a 25 ± 5 °C
Inyector automático,	24 Horas a 15 °C ± 2°C
Ciclos congelación-descongelación,	3 ciclos
Estabilidad a largo plazo,	58 días.

Nota: Se evaluaron las muestras a las diferentes condiciones de almacenamiento a las cuales son sometidas, observándose que Captopril y Nifedipino (**EI**) son estables por lo que el método es reproducible y confiable.

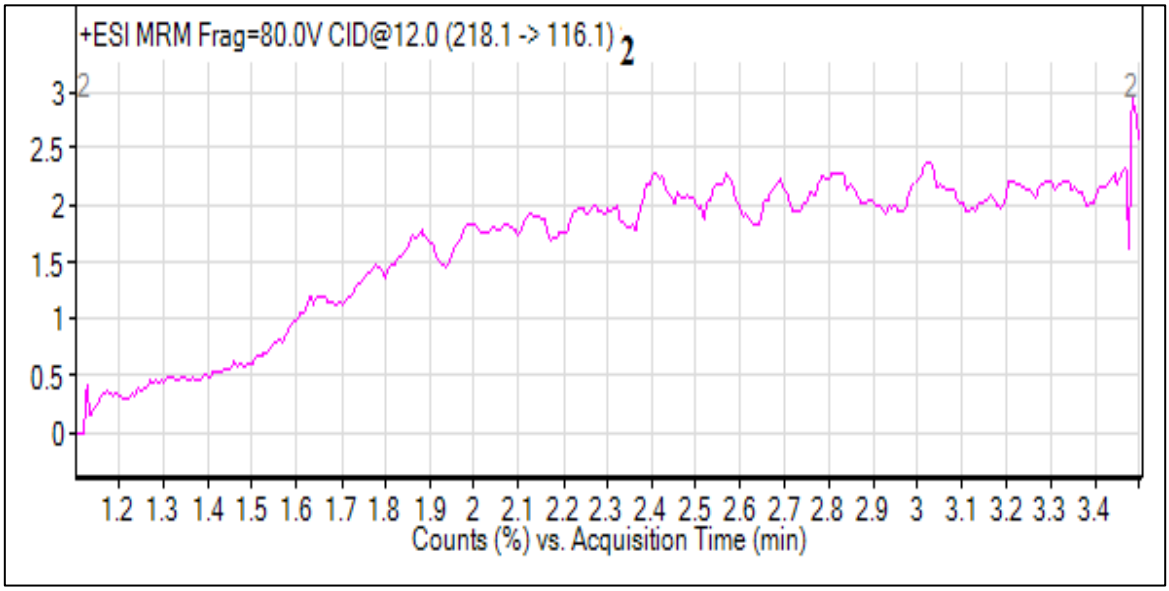
ANEXO 2. CROMATÓGRAMAS REPRESENTATIVOS DE LA SELECTIVIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO.

- Captopril Tiempo de retención: 1.30 minutos
- Nifedipino (EI) Tiempo de retención: 2.29 minutos

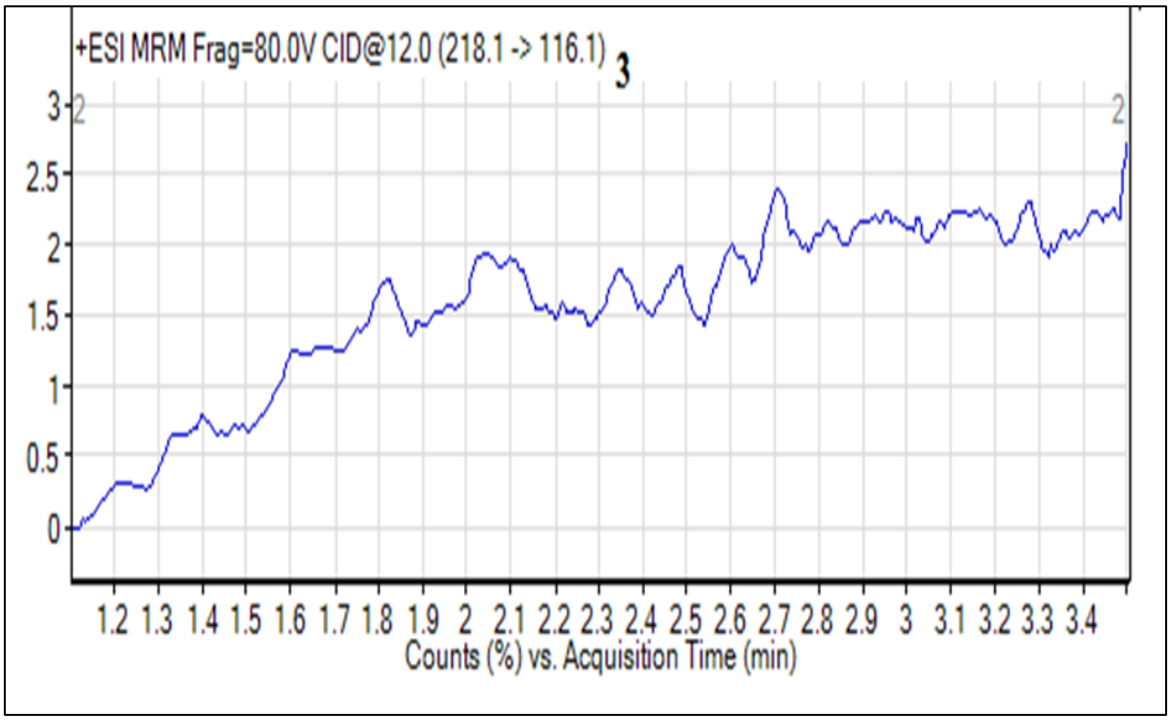
1. BLANCO DE REACTIVOS



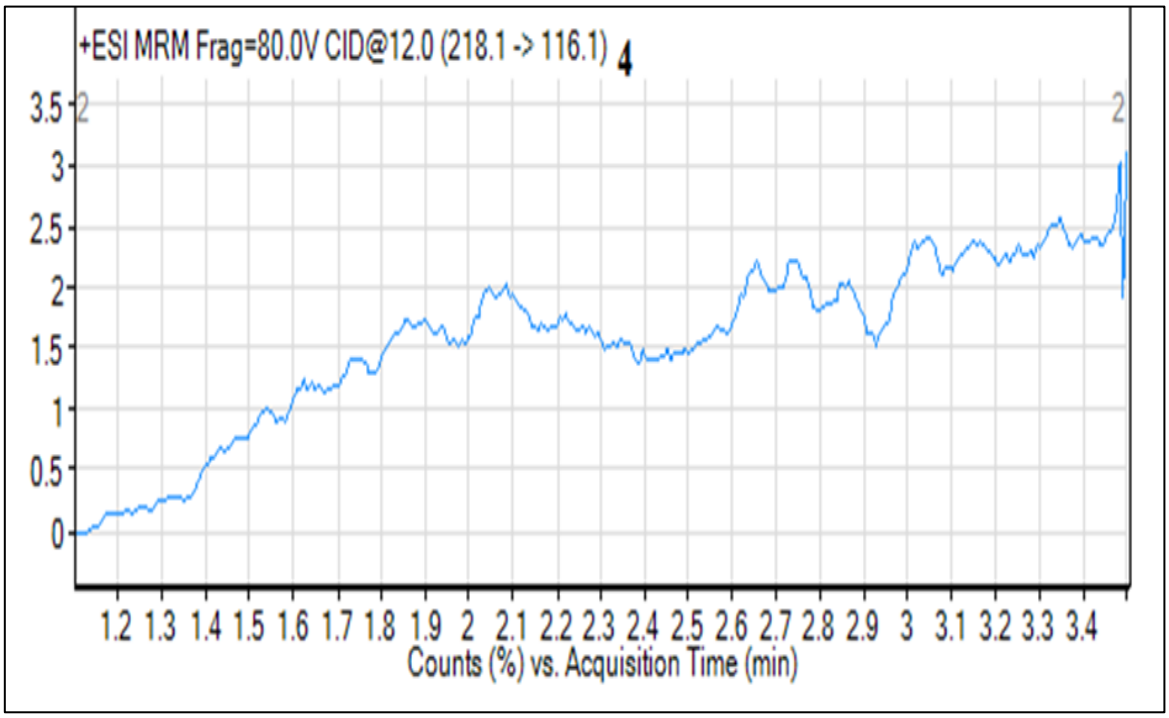
2. MEZCLA DE PLASMA 6 FUENTES DIFERENTES



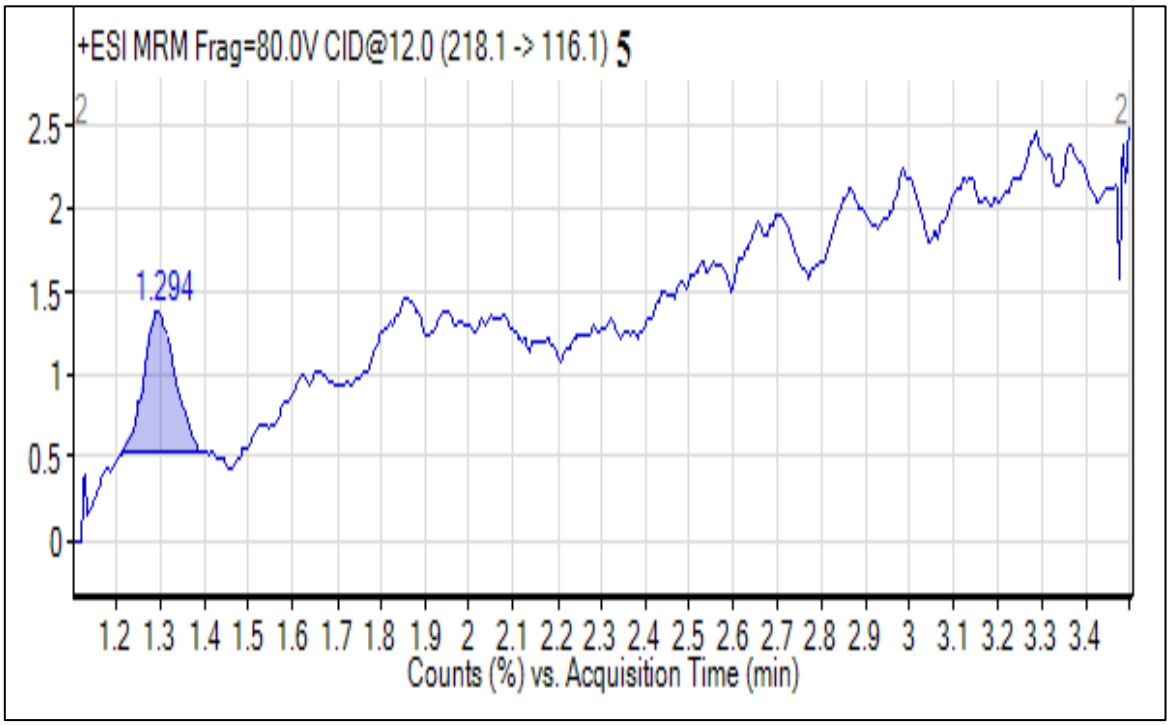
3. BLANCO DE PLASMA HEMOLIZADO



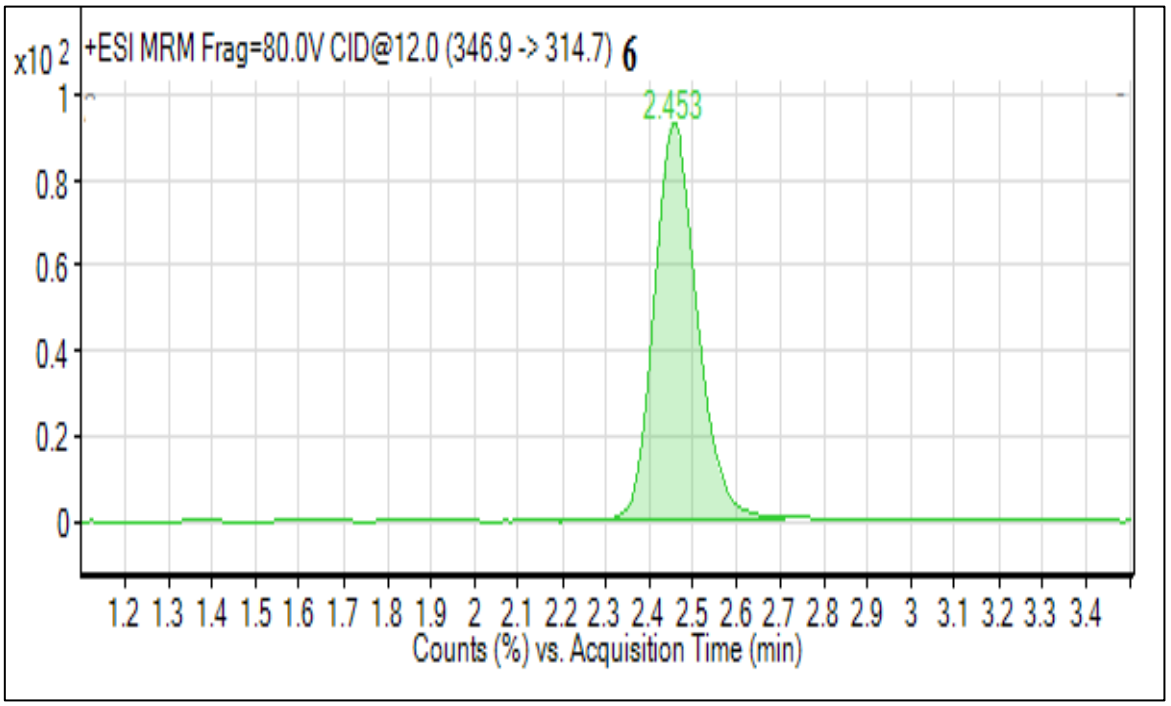
4. BLANCO DE PLASMA LIPÉMICO



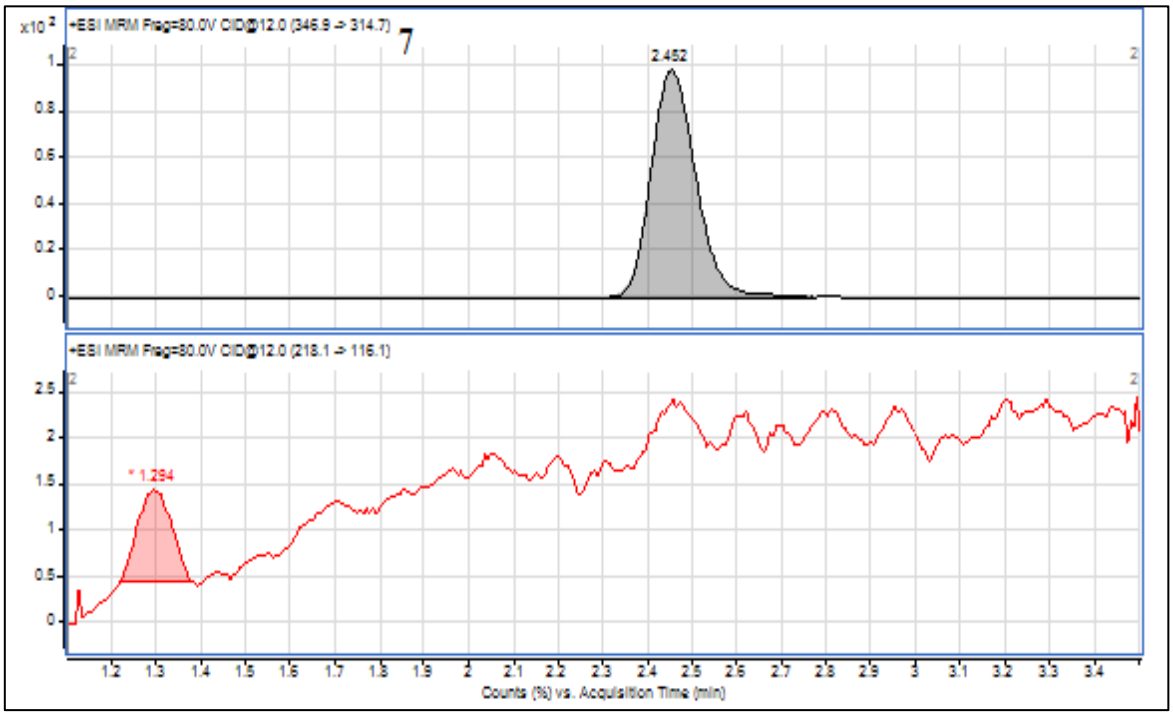
5. MEZCLA DE PLASMA 6 FUENTES DIFERENTES + Captopril



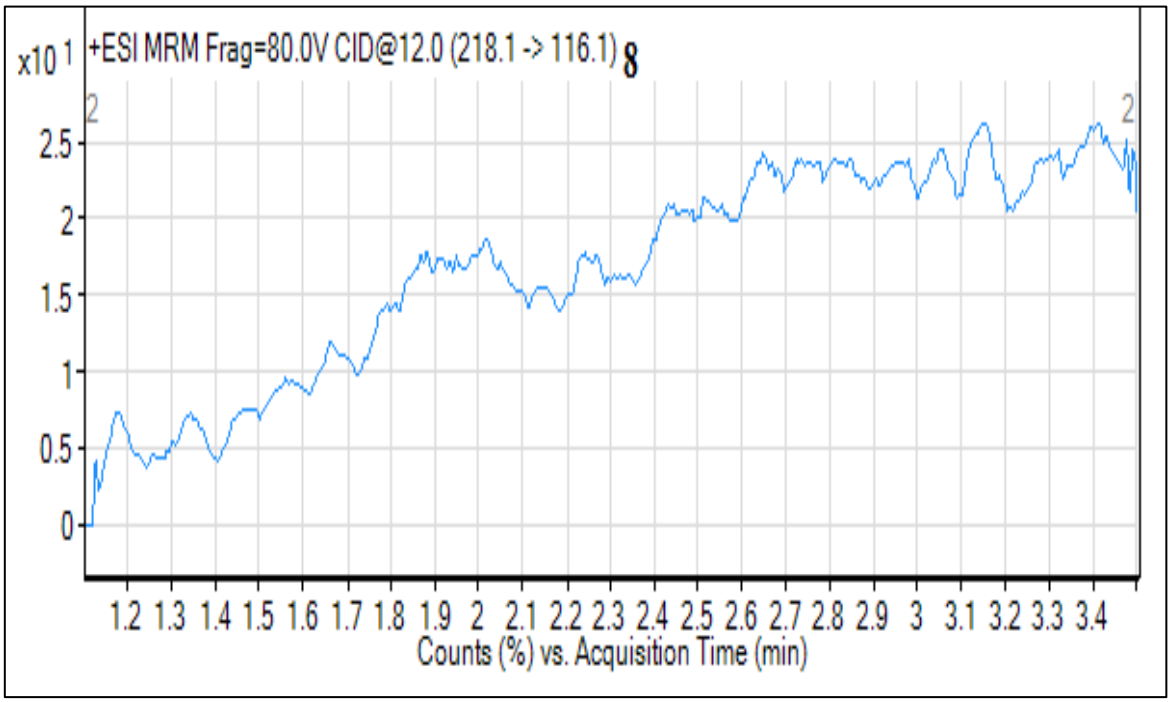
6. MEZCLA DE PLASMA 6 FUENTES DIFERENTES + Nifedipino (EI)



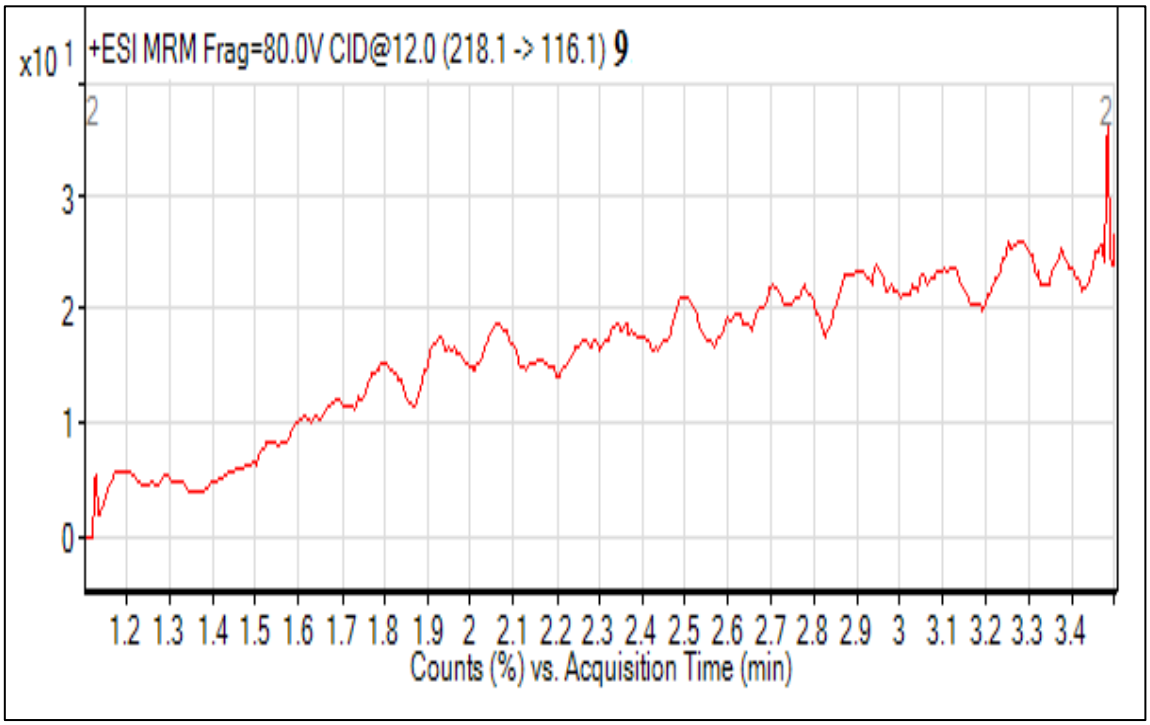
7. MEZCLA DE PLASMA 6 FUENTES DIFERENTES + Captopril + Nifedipino (EI)



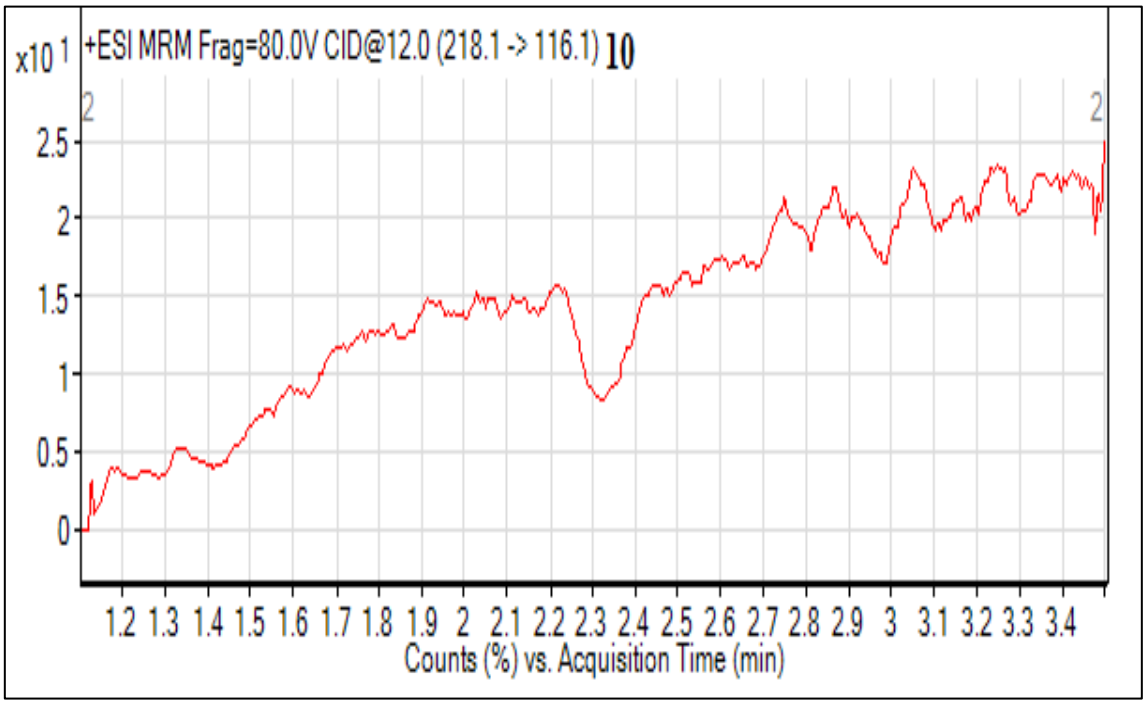
8. MEZCLA DE PLASMA 6 FUENTES DIFERENTES + EDTA



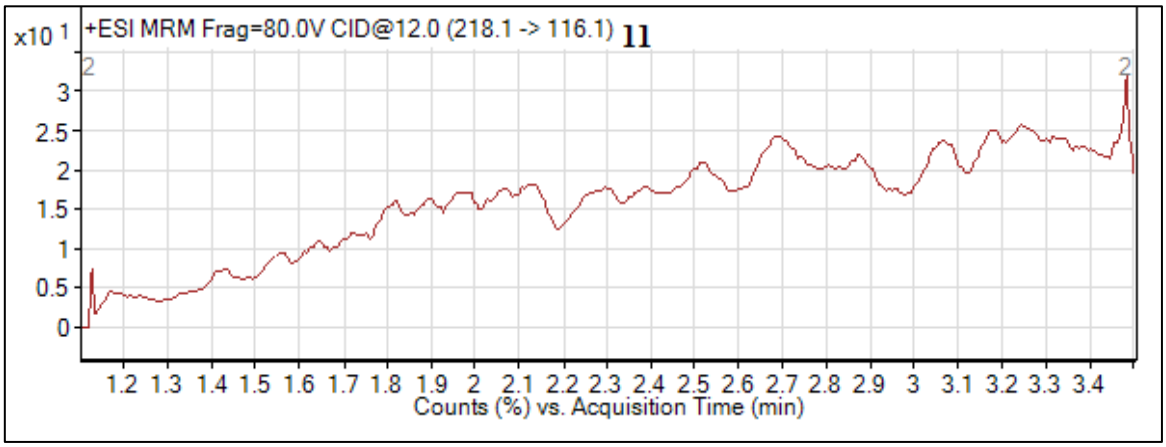
9. MEZCLA DE PLASMA 6 FUENTES DIFERENTES + HEPARINA



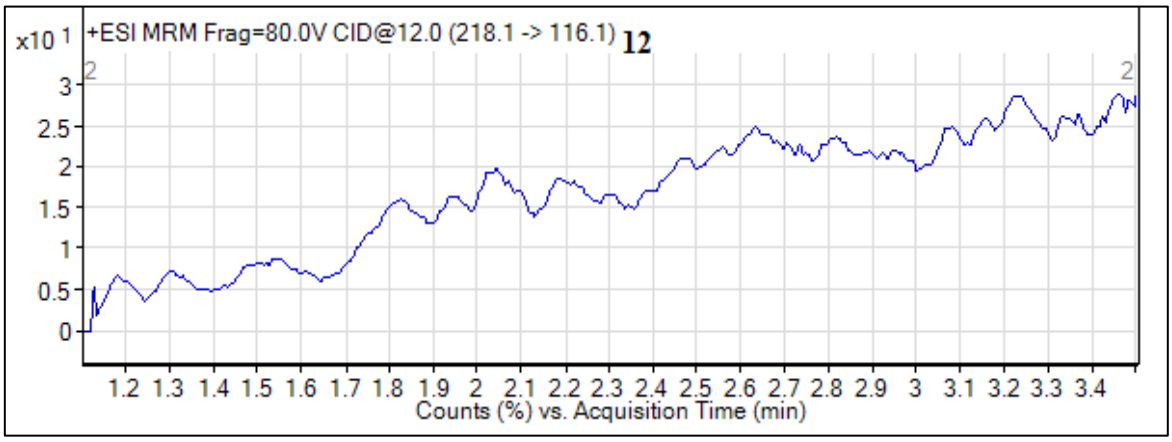
10. MEZCLA DE PLASMA 6 FUENTES DIFERENTES + NAPROXENO



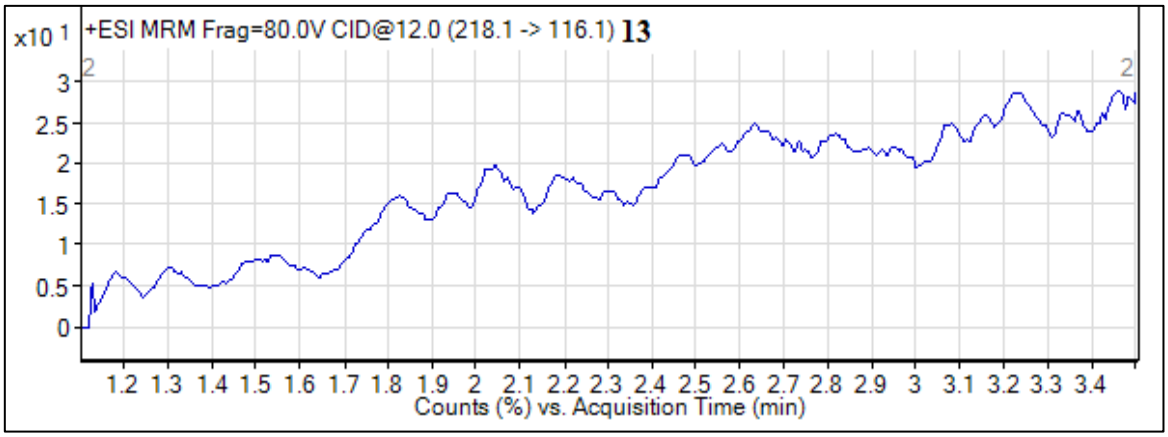
11. MEZCLA DE PLASMA 6 FUENTES DIFERENTES + IBUPROFENO



12. MEZCLA DE PLASMA 6 FUENTES DIFERENTES + ÁCIDO SALICÍLICO



13. MEZCLA DE PLASMA 6 FUENTES DIFERENTES + ACETAMINOFÉN



ANEXO 3. MODELOS MATEMÁTICOS. [30, 31]

MODELO		m	b	r2	∑%DEA
1	LINEAL	0.0020	-0.0104	0.9876	943.19
2	1/X	0.0019	-0.0016	0.9924	314.98
3	$1/X^2$	0.0019	-0.0006	0.9858	315.52
4	1/Y	0.0019	-0.0017	0.9922	319.10
5	$1/Y^2$	0.0019	-0.0010	0.9917	332.68

Modelo matemático 1/x.

EC	Conc. adic.	Area FARM	Area EI	Factor de respuesta	W 1/X	WX	WY	WXY	WX2	WY2	Conc. recuperada	Residuales	DEA %
EC-1-1	5	165	15918	0.0104	0.2000	1.00	0.0021	0.0104	5.00	0.0000	6.1326	1.1326	22.65
EC-1-2	5	152	15763	0.0096	0.2000	1.00	0.0019	0.0096	5.00	0.0000	5.7612	0.7612	15.22
EC-1-3	5	130	18344	0.0071	0.2000	1.00	0.0014	0.0071	5.00	0.0000	4.4476	-0.5524	11.05
EC-1-4	5	136	18562	0.0073	0.2000	1.00	0.0015	0.0073	5.00	0.0000	4.5709	-0.4291	8.58
EC-1-5	5	196	17988	0.0109	0.2000	1.00	0.0022	0.0109	5.00	0.0000	6.4053	1.4053	28.11
EC-2-1	10	285	16186	0.0176	0.1000	1.00	0.0018	0.0176	10.00	0.0000	9.8545	-0.1455	1.46
EC-2-2	10	310	15577	0.0199	0.1000	1.00	0.0020	0.0199	10.00	0.0000	11.0330	1.0330	10.33
EC-2-3	10	274	19961	0.0137	0.1000	1.00	0.0014	0.0137	10.00	0.0000	7.8599	-2.1401	21.4
EC-2-4	10	309	17208	0.0180	0.1000	1.00	0.0018	0.0180	10.00	0.0000	10.0338	0.0338	0.34
EC-2-5	10	368	18436	0.0200	0.1000	1.00	0.0020	0.0200	10.00	0.0000	11.0638	1.0638	10.64
EC-3-1	25	688	15945	0.0431	0.0400	1.00	0.0017	0.0431	25.00	0.0001	22.9801	-2.0199	8.08
EC-3-2	25	740	15423	0.0480	0.0400	1.00	0.0019	0.0480	25.00	0.0001	25.4633	0.4633	1.85
EC-3-3	25	912	19630	0.0465	0.0400	1.00	0.0019	0.0465	25.00	0.0001	24.6817	-0.3183	1.27
EC-3-4	25	827	17349	0.0477	0.0400	1.00	0.0019	0.0477	25.00	0.0001	25.3030	0.3030	1.21
EC-3-5	25	907	18253	0.0497	0.0400	1.00	0.0020	0.0497	25.00	0.0001	26.3422	1.3422	5.37
EC-4-1	100	2534	15110	0.1677	0.0100	1.00	0.0017	0.1677	100.00	0.0003	86.9906	-13.0094	13.01
EC-4-2	100	2892	14946	0.1935	0.0100	1.00	0.0019	0.1935	100.00	0.0004	100.2460	0.2460	0.25
EC-4-3	100	3474	20067	0.1731	0.0100	1.00	0.0017	0.1731	100.00	0.0003	89.7742	-10.2258	10.23
EC-4-4	100	3290	16613	0.1980	0.0100	1.00	0.0020	0.1980	100.00	0.0004	102.5797	2.5797	2.58
EC-4-5	100	3712	18253	0.2034	0.0100	1.00	0.0020	0.2034	100.00	0.0004	105.3169	5.3169	5.32
EC-5-1	200	4743	15086	0.3144	0.0050	1.00	0.0016	0.3144	200.00	0.0005	162.3785	-37.6215	18.81
EC-5-2	200	5750	15272	0.3765	0.0050	1.00	0.0019	0.3765	200.00	0.0007	194.2969	-5.7031	2.85
EC-5-3	200	6964	19622	0.3549	0.0050	1.00	0.0018	0.3549	200.00	0.0006	183.1973	-16.8027	8.4
EC-5-4	200	6635	17603	0.3769	0.0050	1.00	0.0019	0.3769	200.00	0.0007	194.5119	-5.4881	2.74
EC-5-5	200	7169	18440	0.3888	0.0050	1.00	0.0019	0.3888	200.00	0.0008	200.6018	0.6018	0.3
EC-6-1	300	7735	15161	0.5102	0.0033	1.00	0.0017	0.5102	300.00	0.0009	262.9991	-37.0009	12.33
EC-6-2	300	8317	14574	0.5707	0.0033	1.00	0.0019	0.5707	300.00	0.0011	294.0822	-5.9178	1.97
EC-6-3	300	10657	19703	0.5409	0.0033	1.00	0.0018	0.5409	300.00	0.0010	278.7719	-21.2281	7.08
EC-6-4	300	10673	17017	0.6272	0.0033	1.00	0.0021	0.6272	300.00	0.0013	323.1299	23.1299	7.71
EC-6-5	300	10688	18489	0.5781	0.0033	1.00	0.0019	0.5781	300.00	0.0011	297.8850	-2.1150	0.71
EC-7-1	600	15295	14138	1.0818	0.0017	1.00	0.0018	1.0818	600.00	0.0020	556.7751	-43.2249	7.2
EC-7-2	600	19069	15193	1.2551	0.0017	1.00	0.0021	1.2551	600.00	0.0026	645.8266	45.8266	7.64
EC-7-3	600	22745	19729	1.1529	0.0017	1.00	0.0019	1.1529	600.00	0.0022	593.2811	-6.7189	1.12
EC-7-4	600	21458	16566	1.2953	0.0017	1.00	0.0022	1.2953	600.00	0.0028	666.4788	66.4788	11.08
EC-7-5	600	20972	17750	1.1815	0.0017	1.00	0.0020	1.1815	600.00	0.0023	608.0045	8.0045	1.33
EC-8-1	800	19517	14155	1.3788	0.0013	1.00	0.0017	1.3788	800.00	0.0024	709.3918	-90.6082	11.33
EC-8-2	800	23921	14642	1.6337	0.0013	1.00	0.0020	1.6337	800.00	0.0033	840.3979	40.3979	5.05
EC-8-3	800	28404	19827	1.4326	0.0013	1.00	0.0018	1.4326	800.00	0.0026	737.0330	-62.9670	7.87
EC-8-4	800	29634	16865	1.7571	0.0013	1.00	0.0022	1.7571	800.00	0.0039	903.8174	103.8174	12.98
EC-8-5	800	29400	17579	1.6725	0.0013	1.00	0.0021	1.6725	800.00	0.0035	860.2992	60.2992	7.54
					1.8063	40.00	0.0750	19.7850	10200.00	0.0387			
												∑ %DEA	314.98
							m=	0.0019					
							b=	-0.0016					
							r=	0.9962					
							r2=	0.9924					

Resultados de Carencia de Ajuste con el modelo 1/x.

EC	Conc. adicionada	Conc. recuperada	X2	Y2	Y prom	(Y-Yprom)2	SUMA	Ypred	Ypred-Yprom)2	SCTotales
EC-1-1	5	6.1326	25.0000	37.6089		0.4477		0.5262	104029265.0892	103914932.3
EC-1-2	5	5.7612	25.0000	33.1910		0.0886		0.5262	104029265.0892	103922505.5
EC-1-3	5	4.4476	25.0000	19.7809	5.4635	1.0321	3.2520	0.5262	104029265.0892	103949289.2
EC-1-4	5	4.5709	25.0000	20.8933		0.7967		0.5262	104029265.0892	103946774.1
EC-1-5	5	6.4053	25.0000	41.0273		0.8869		0.5262	104029265.0892	103909373.8
EC-2-1	10	9.8545	100.0000	97.1105		0.0131		5.6157	103925471.0522	103839066
EC-2-2	10	11.0330	100.0000	121.7279		1.1322		5.6157	103925471.0522	103815047.8
EC-2-3	10	7.8599	100.0000	61.7788	9.9690	4.4481	6.7961	5.6157	103925471.0522	103879718.8
EC-2-4	10	10.0338	100.0000	100.6771		0.0042		5.6157	103925471.0522	103835411.2
EC-2-5	10	11.0638	100.0000	122.4071		1.1985		5.6157	103925471.0522	103814421.4
EC-3-1	25	22.9801	625.0000	528.0834		3.8966		20.8841	103614399.7744	103571734.8
EC-3-2	25	25.4633	625.0000	648.3783		0.2593		20.8841	103614399.7744	103521197.6
EC-3-3	25	24.6817	625.0000	609.1874	24.9540	0.0742	6.2787	20.8841	103614399.7744	103537102.1
EC-3-4	25	25.3030	625.0000	640.2427		0.1218		20.8841	103614399.7744	103524458.7
EC-3-5	25	26.3422	625.0000	693.9091		1.9268		20.8841	103614399.7744	103503314
EC-4-1	100	86.9906	10000.0000	7567.3609		99.8179		97.2263	102066037.1303	102272959.5
EC-4-2	100	100.2460	10000.0000	10049.2556		10.6570		97.2263	102066037.1303	102005031.4
EC-4-3	100	89.7742	10000.0000	8059.4086	96.9815	51.9446	263.2387	97.2263	102066037.1303	102216665.5
EC-4-4	100	102.5797	10000.0000	10522.5953		31.3402		97.2263	102066037.1303	101957896.7
EC-4-5	100	105.3169	10000.0000	11091.6450		69.4791		97.2263	102066037.1303	101902627.3
EC-5-1	200	162.3785	40000.0000	26366.7739		606.0836		199.0158	100019685.5361	100753845.6
EC-5-2	200	194.2969	40000.0000	37751.2791		53.2846		199.0158	100019685.5361	100114094.8
EC-5-3	200	183.1973	40000.0000	33561.2346	186.9973	14.4400	915.3605	199.0158	100019685.5361	100336337.2
EC-5-4	200	194.5119	40000.0000	37834.8740		56.4697		199.0158	100019685.5361	100109792.4
EC-5-5	200	200.6018	40000.0000	40241.0670		185.0826		199.0158	100019685.5361	99987965.12
EC-6-1	300	262.9991	90000.0000	69168.5378		805.1115		300.8053	97994056.1489	98743986.46
EC-6-2	300	294.0822	90000.0000	86484.3451		7.3365		300.8053	97994056.1489	98127207.3
EC-6-3	300	278.7719	90000.0000	77713.7542	291.3736	158.8039	2022.1097	300.8053	97994056.1489	98430767.65
EC-6-4	300	323.1299	90000.0000	104412.9096		1008.4598		300.8053	97994056.1489	97552563.66
EC-6-5	300	297.8850	90000.0000	88735.4623		42.3980		300.8053	97994056.1489	98051881.84
EC-7-1	600	556.7751	360000.0000	309998.5627		3283.0713		606.1738	92041501.2302	92991785.59
EC-7-2	600	645.8266	360000.0000	417092.0492		1008.2786		606.1738	92041501.2302	91282228.59
EC-7-3	600	593.2811	360000.0000	351982.4178	614.0732	432.3146	7506.8387	606.1738	92041501.2302	92289048.76
EC-7-4	600	666.4788	360000.0000	444194.0154		2746.3449		606.1738	92041501.2302	90888026.12
EC-7-5	600	608.0045	360000.0000	369669.4980		36.8293		606.1738	92041501.2302	92006377.26
EC-8-1	800	709.3918	640000.0000	503236.7252		10159.8484		809.7528	88176742.3199	90071644.02
EC-8-2	800	840.3979	640000.0000	706268.5793		912.6439		809.7528	88176742.3199	87602152.04
EC-8-3	800	737.0330	640000.0000	543217.6995	810.1879	5351.6299	27701.7630	809.7528	88176742.3199	89547743.72
EC-8-4	800	903.8174	640000.0000	816885.9257		8766.4918		809.7528	88176742.3199	86419010.59
EC-8-5	800	860.2992	640000.0000	740114.7816		2511.1491		809.7528	88176742.3199	87230010.29
		10200.0000				38425.6375	38425.6375	10200.0000	3959335791.4061	3959375996.7610

Y=m x X + b	
Pendiente (m) =	1.0179
O. Origen (b) =	-4.5632
r2 =	0.9876
r=	0.9938

FV	SUM CUAD	GL	SCM	F
regresión	3959335791	1	3959335791	3742157.243
residual	40205.3549	38	1058.0357	
carencia de ajuste	1779.7174	6	296.6196	**0.2470**
error puro	38425.6375	32	1200.8012	
total	3959375997	39		
			Ftab (0.95,6,32)=	**2.40**

ANEXO 4. CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS DE LA ADECUABILIDAD DEL SISTEMA Y CURVA DE CALIBRACIÓN (DIA 4).

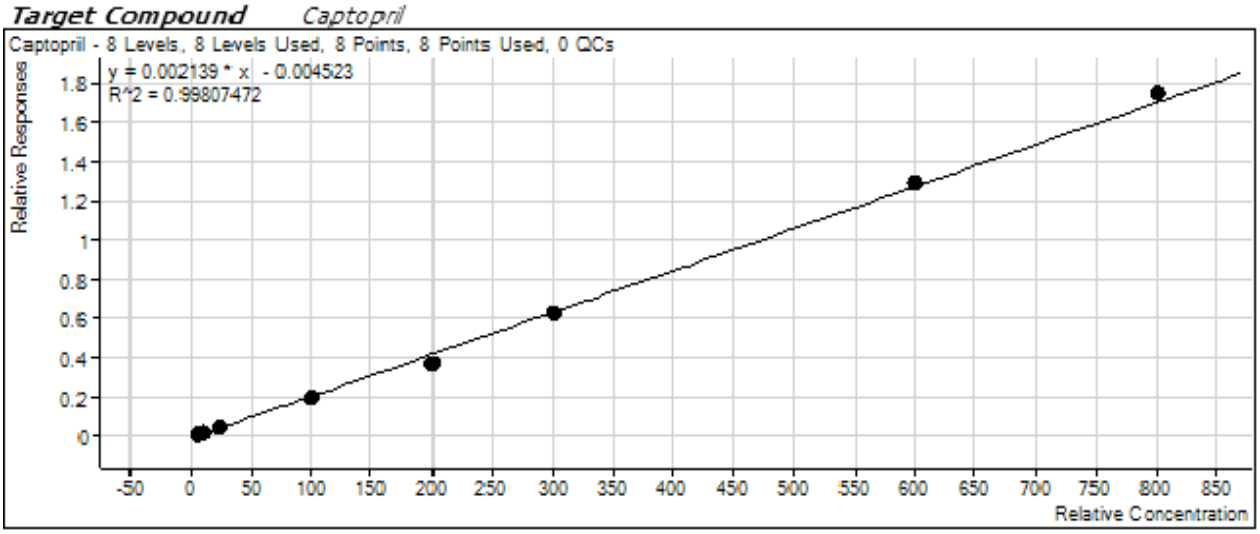
Batch Info CURVA DE CALIBRACIÓN

Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\VALIDACION\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:17:00 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	10:14:50 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:59 a.m.	**Batch State**	Processed

Calibration Info

Target Compound *Captopril*



Calibration STD	Level	Enabled	Response	RF	Exp Conc
015.d	EC1	☑	136	0.0015	5.0000
016.d	EC2	☑	309	0.0018	10.0000
017.d	EC3	☑	827	0.0019	25.0000
018.d	EC4	☑	3290	0.0020	100.0000
019.d	EC5	☑	6635	0.0019	200.0000
020.d	EC6	☑	10673	0.0021	300.0000
021.d	EC7	☑	21458	0.0022	600.0000
022.d	EC8	☑	29634	0.0022	800.0000

Target Compound *Nifedipino*

Calibration STD	Level	Enabled	Response	RF	Exp Conc
015.d	EC1	☑	18562	18561.6196	1.0000
016.d	EC2	☑	17208	17207.6060	1.0000
017.d	EC3	☑	17349	17348.5892	1.0000
018.d	EC4	☑	16613	16612.9973	1.0000
019.d	EC5	☑	17603	17603.1160	1.0000
020.d	EC6	☑	17017	17016.6674	1.0000
021.d	EC7	☑	16566	16565.5522	1.0000
022.d	EC8	☑	16865	16865.2688	1.0000

Batch Info BLANCO DE REACTIVO DE LA ADECUABILIDAD DEL SISTEMA.

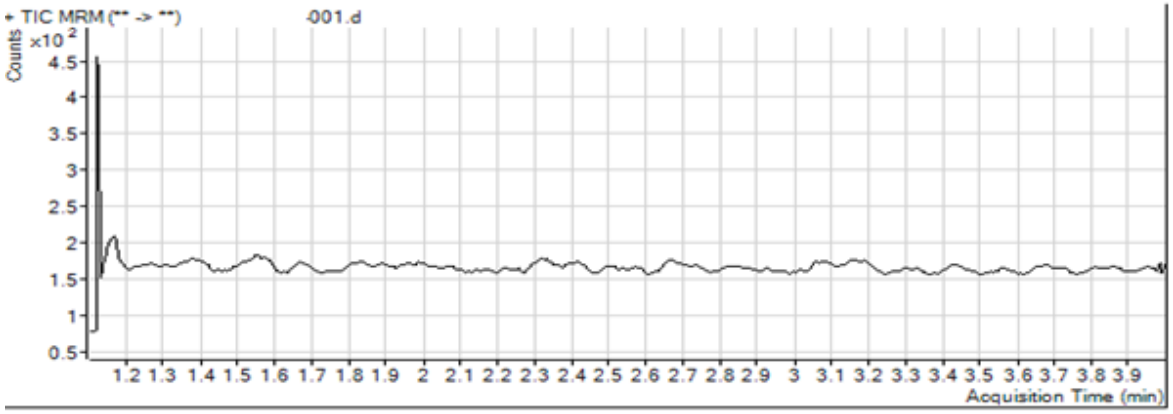
Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\VALIDACION\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:17:00 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	10:14:50 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:59 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

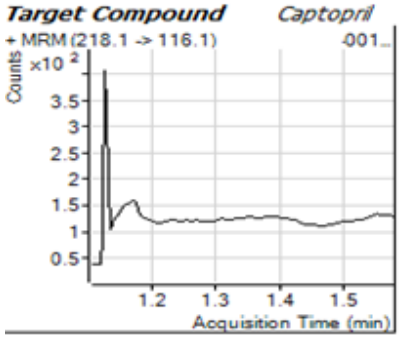
Acq Time	09:52
Data File	001.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	BCO REACT
Sample Info	
Sample Type	Sample
Sample Pos	Vial 1

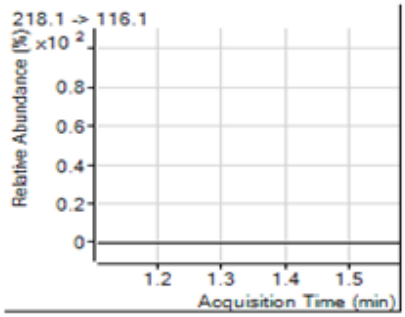
Sample Chromatogram

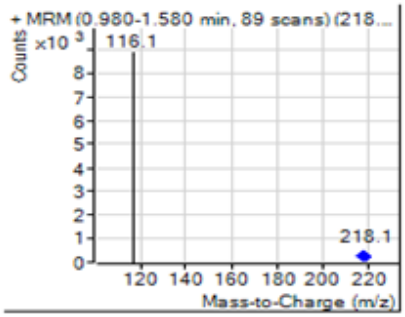


Quantitation Results
Compound Graphics

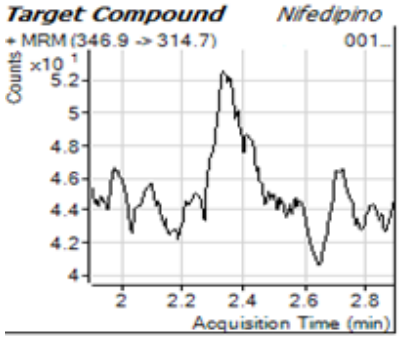
Target Compound *Captopril*

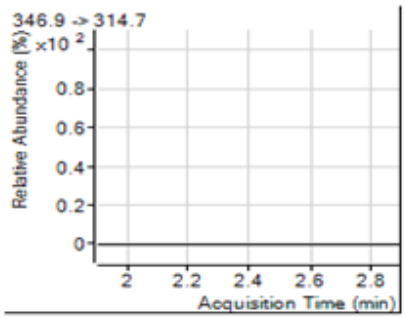


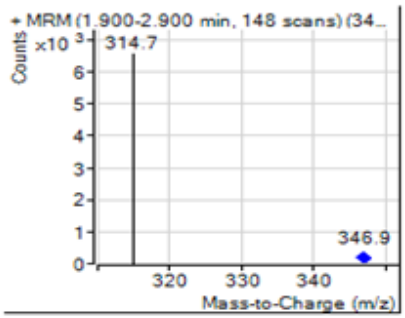




Target Compound *Nifedipino*







Batch Info **ADECUABILIDAD DEL SISTEMA, INYECCIÓN 1.**

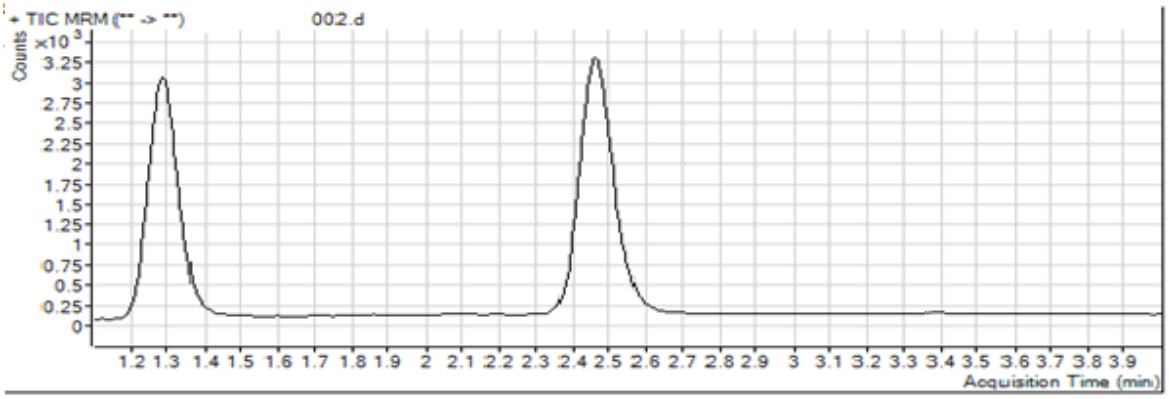
Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\VALIDACION\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:17:00 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	10:14:50 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:59 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

Acq Time	09:57
Data File	002.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	ADE I
Sample Info	
Sample Type	Sample
Sample Pos	Vial 2

Sample Chromatogram

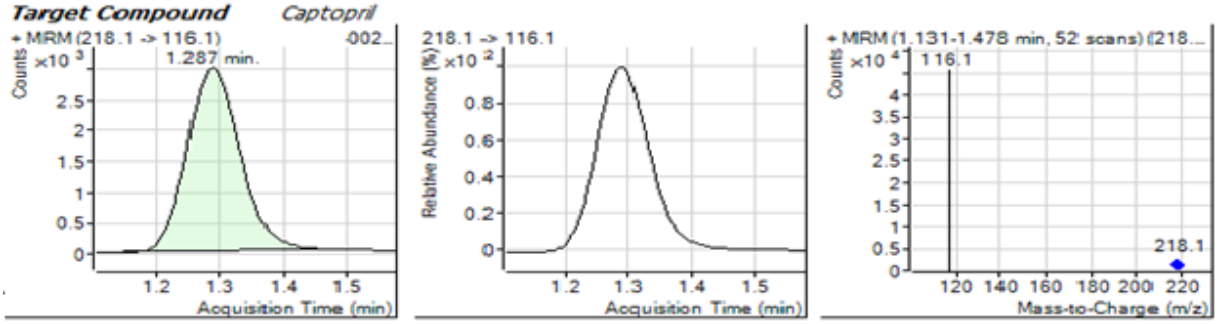


Quantitation Results

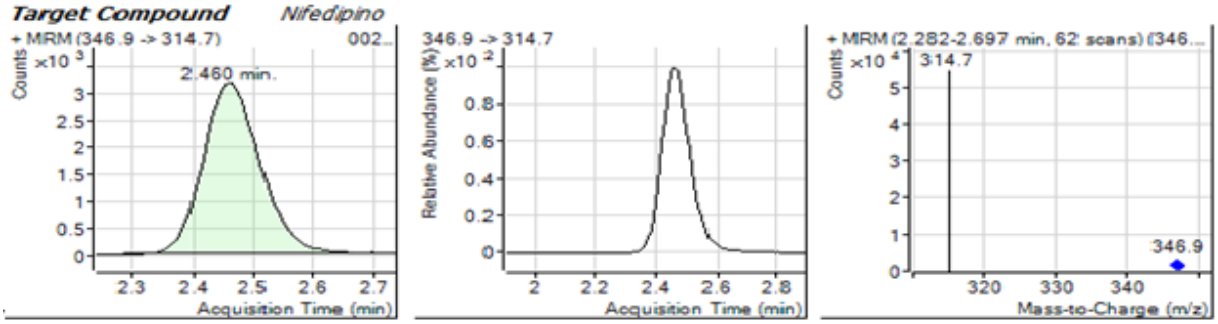
Compound	RT	Response	Final Conc	Accuracy
Captopril	1.287	17428	383.1826	
Nifedipino	2.460	21380		

Compound Graphics

Target Compound *Captopril*



Target Compound *Nifedipino*



Batch Info ADECUABILIDAD DEL SISTEMA, INYECCIÓN 2.

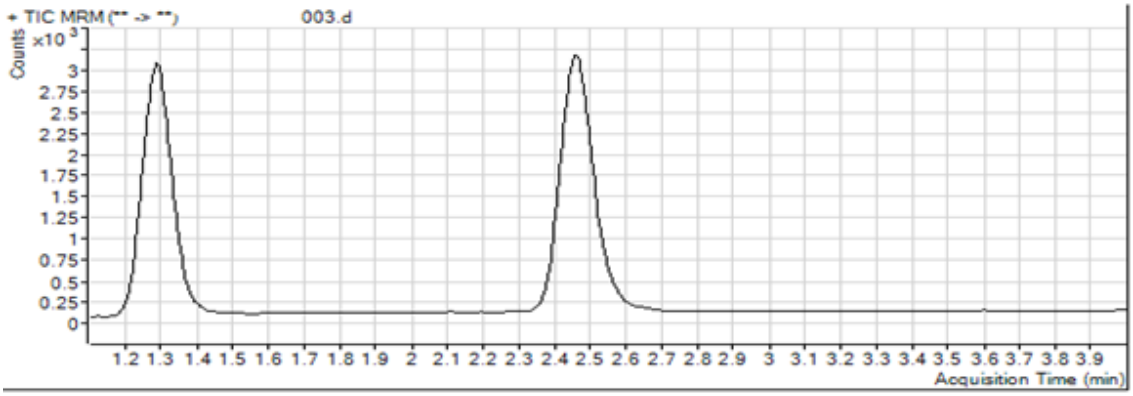
Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\VALIDACION\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:17:00 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	10:14:50 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:59 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

Acq Time	10:01
Data File	003.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	ADE I
Sample Info	
Sample Type	Sample
Sample Pos	Vial 2

Sample Chromatogram

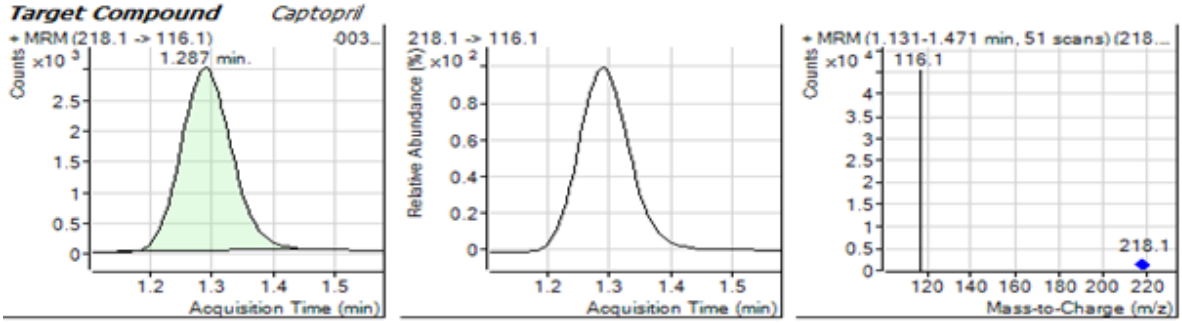


Quantitation Results

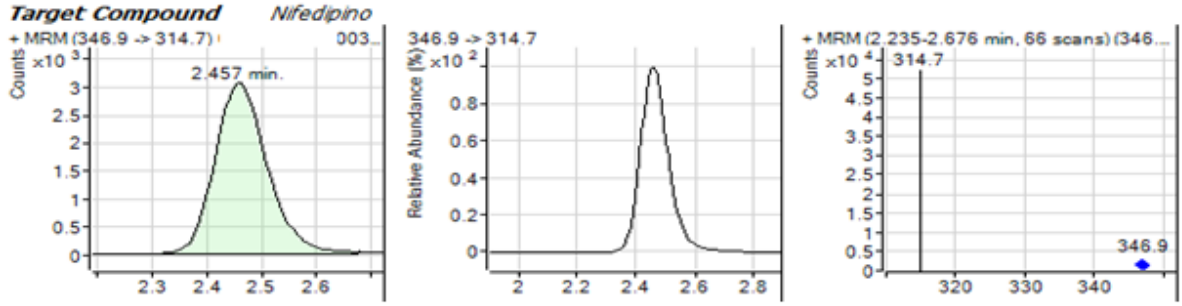
Compound	RT	Response	Final Conc	Accuracy
Captopril	1.287	17363	401.9638	
Nifedipino	2.457	20300		

Compound Graphics

Target Compound *Captopril*



Target Compound *Nifedipino*



Batch Info ADECUABILIDAD DEL SISTEMA, INYECCIÓN 3.

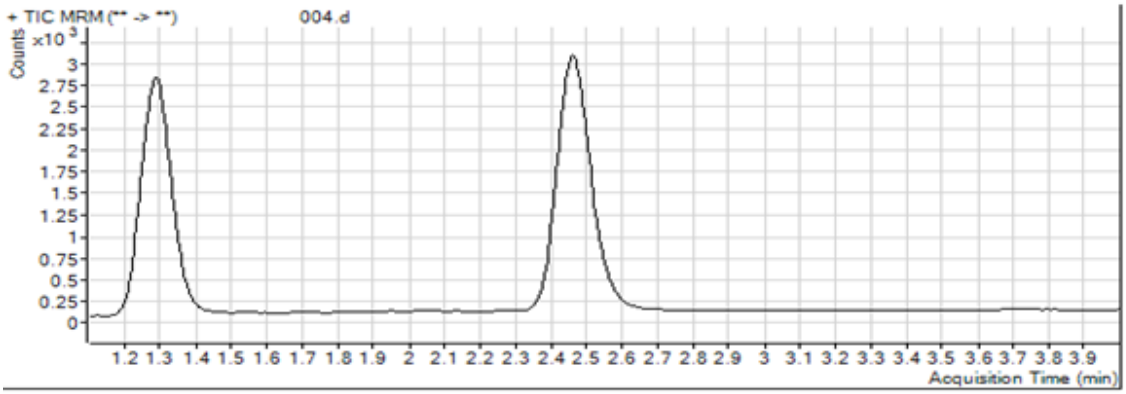
Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\VALIDACION\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:17:00 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	10:14:50 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:59 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

Acq Time	10:06
Data File	004.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	ADE I
Sample Info	
Sample Type	Sample
Sample Pos	Vial 2

Sample Chromatogram

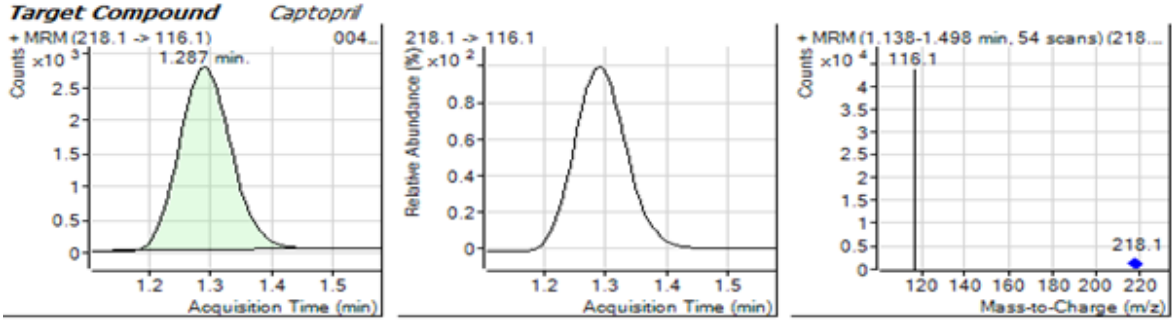


Quantitation Results

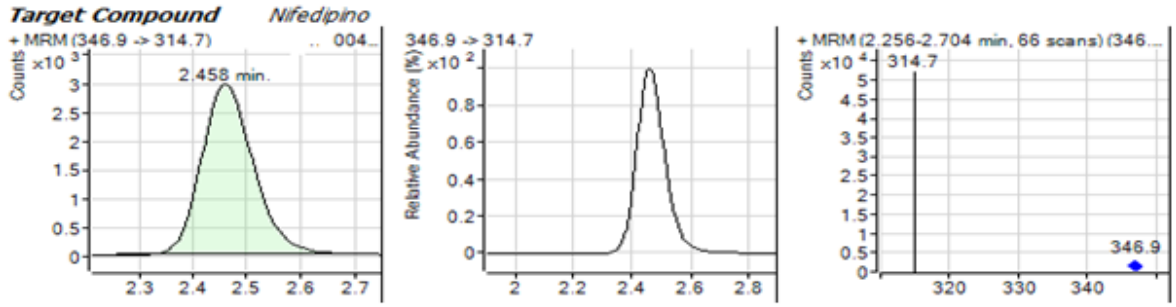
Compound	RT	Response	Final Conc	Accuracy
Captopril	1.287	16629	386.9967	
Nifedipino	2.458	20198		

Compound Graphics

Target Compound *Captopril*



Target Compound *Nifedipino*



Batch Info **ADECUABILIDAD DEL SISTEMA, INYECCIÓN 4.**

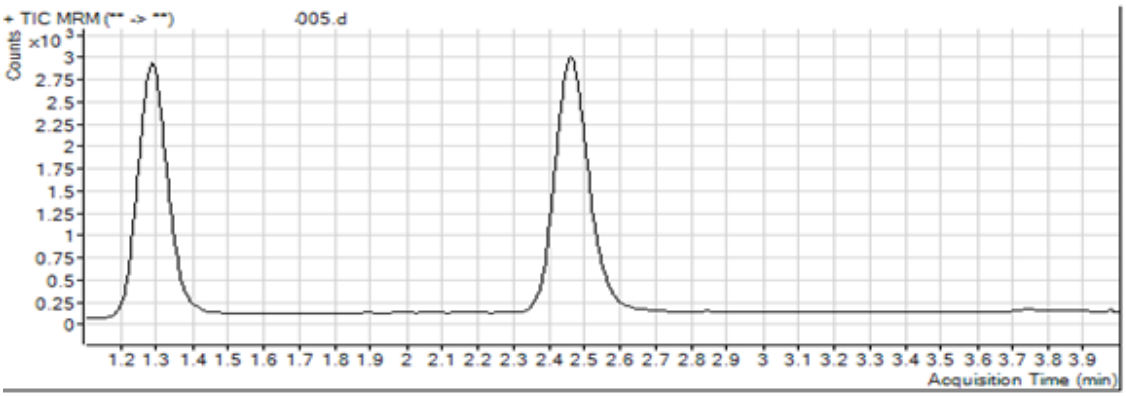
Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\VALIDACION\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:17:00 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	10:14:50 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:59 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

Acq Time	10:10
Data File	005.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	ADE I
Sample Info	
Sample Type	Sample
Sample Pos	Vial 2

Sample Chromatogram

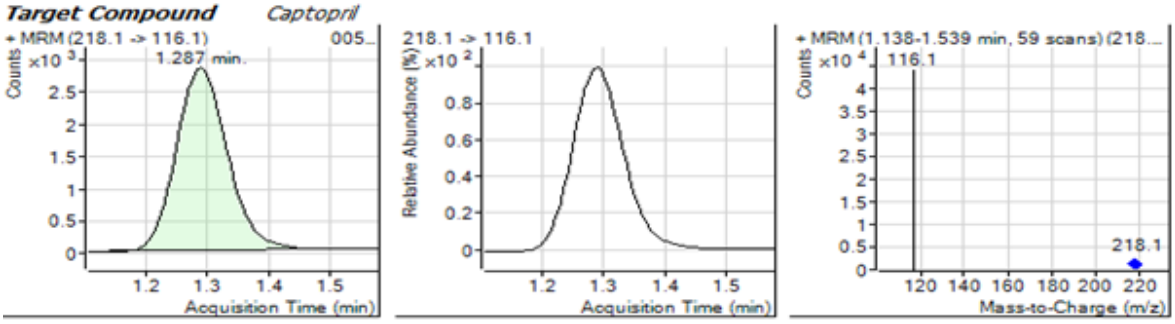


Quantitation Results

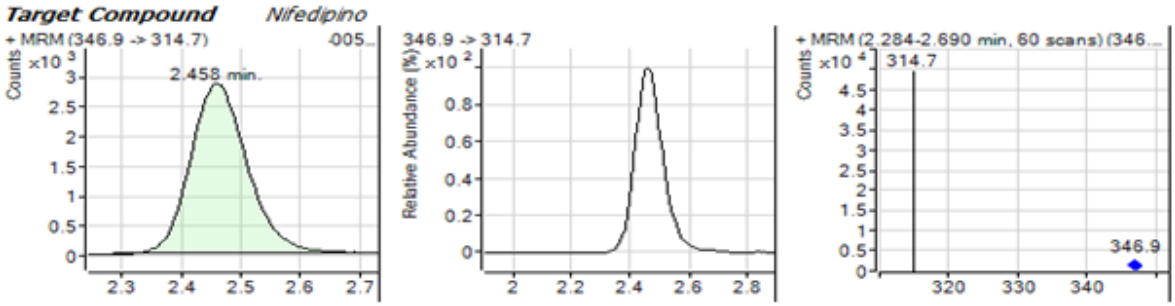
Compound	RT	Response	Final Conc	Accuracy
Captopril	1.287	16683	407.4209	
Nifedipino	2.458	19242		

Compound Graphics

Target Compound *Captopril*



Target Compound *Nifedipino*



Batch Info ADECUABILIDAD DEL SISTEMA, INYECCIÓN 5.

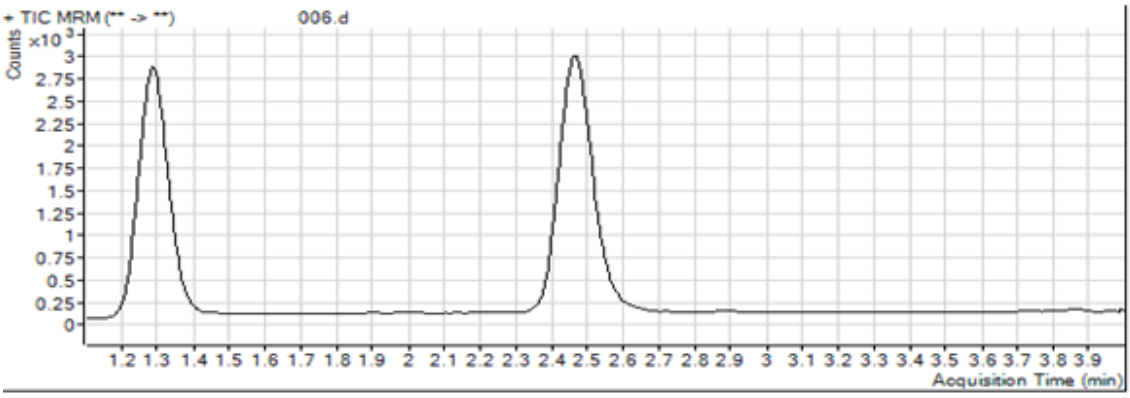
Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\VALIDACION\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:17:00 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	10:14:50 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:59 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

Acq Time	10:15
Data File	006.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	ADE I
Sample Info	
Sample Type	Sample
Sample Pos	Vial 2

Sample Chromatogram

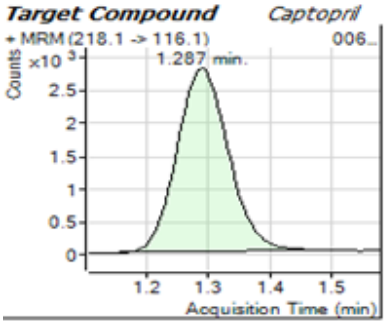


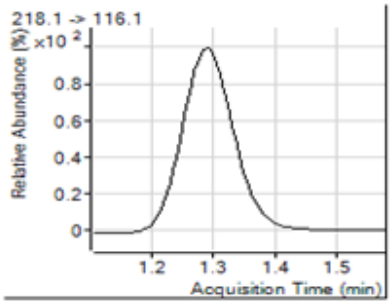
Quantitation Results

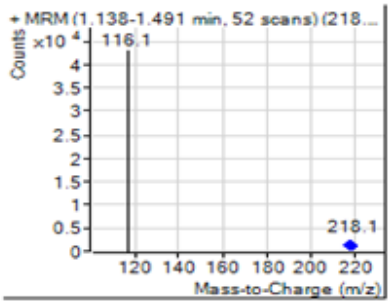
Compound	RT	Response	Final Conc	Accuracy
Captopril	1.287	16414	399.7423	
Nifedipino	2.462	19298		

Compound Graphics

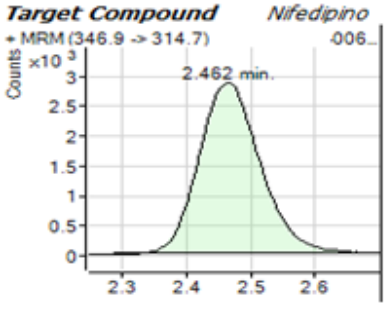
Target Compound *Captopril*

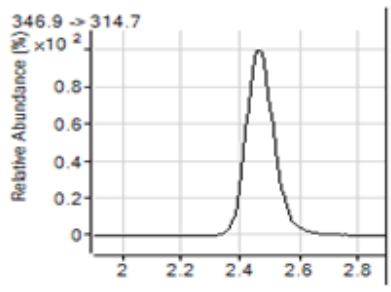


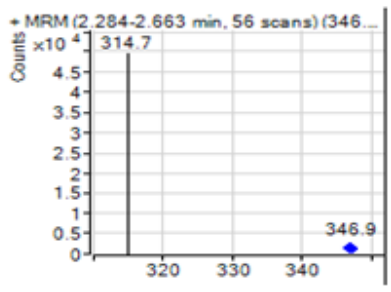




Target Compound *Nifedipino*







Batch Info ADECUABILIDAD DEL SISTEMA, INYECCIÓN 6.

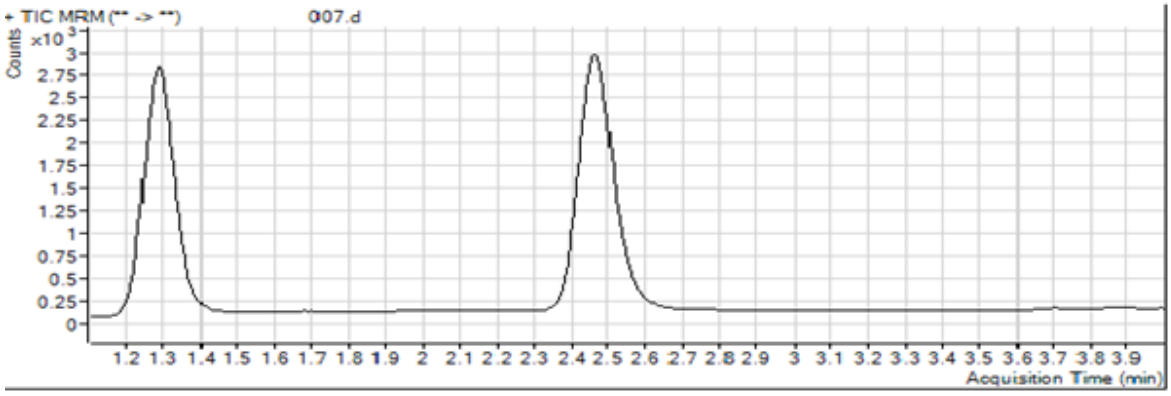
Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\VALIDACION\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:17:00 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	10:14:50 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:59 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

Acq Time	10:19
Data File	007.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	ADE I
Sample Info	
Sample Type	Sample
Sample Pos	Vial 2

Sample Chromatogram

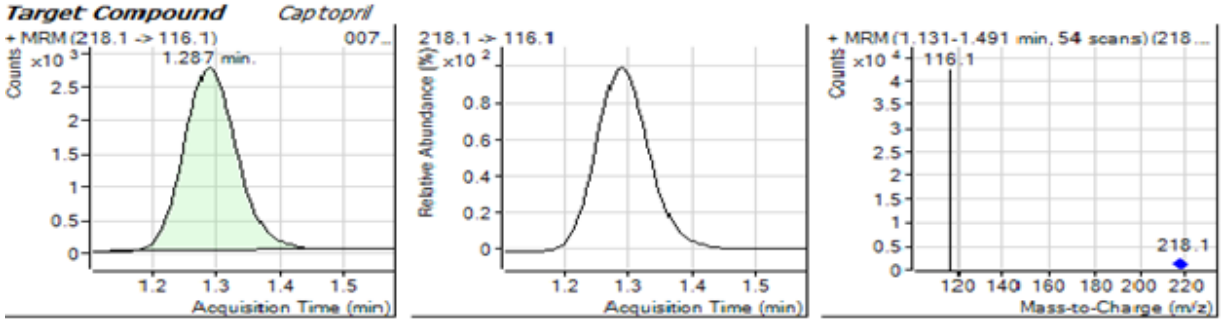


Quantitation Results

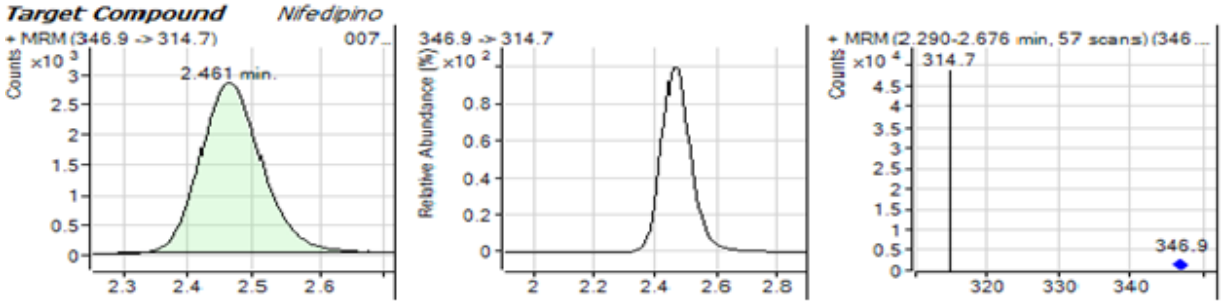
Compound	RT	Response	Final Conc	Accuracy
Captopril	1.287	16108	397.0598	
Nifedipino	2.461	19067		

Compound Graphics

Target Compound *Captopril*



Target Compound *Nifedipino*



Batch Info ADECUABILIDAD DEL SISTEMA. INYECCIÓN 7.

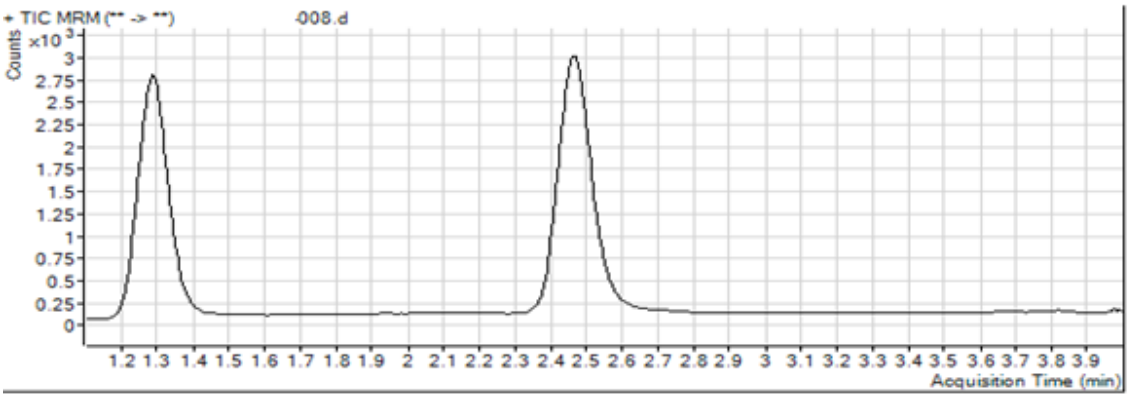
Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\VALIDACION\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:17:00 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	10:14:50 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:59 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

Acq Time	10:24
Data File	008.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	ADE I
Sample Info	
Sample Type	Sample
Sample Pos	Vial 2

Sample Chromatogram

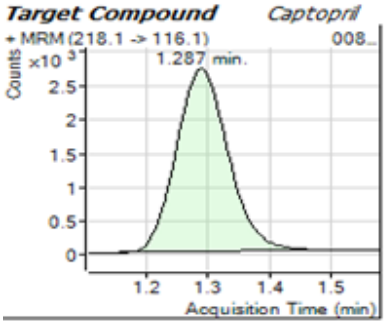


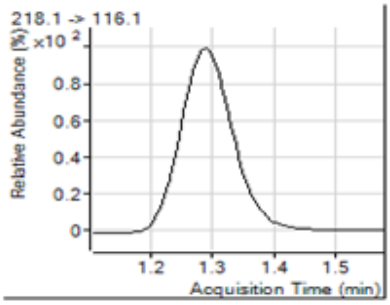
Quantitation Results

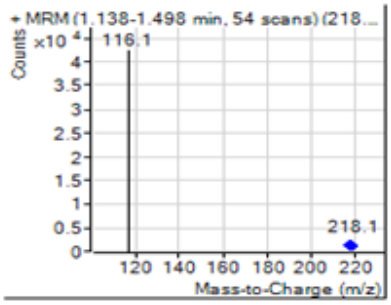
Compound	RT	Response	Final Conc	Accuracy
Captopril	1.287	16112	391.5009	
Nifedipino	2.462	19344		

Compound Graphics

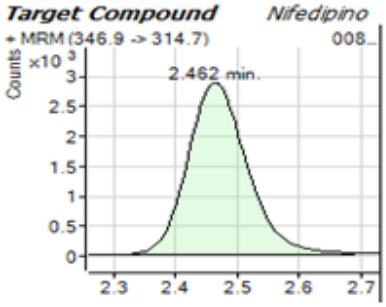
Target Compound *Captopril*

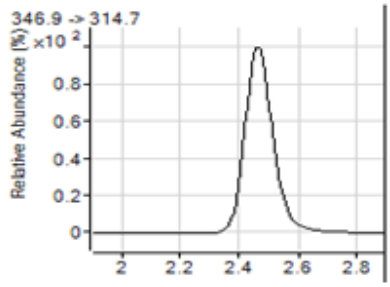


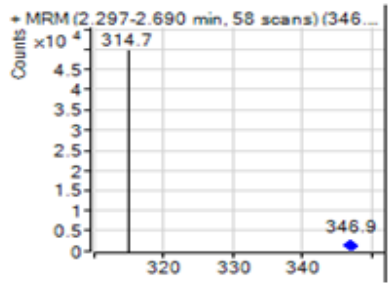




Target Compound *Nifedipino*







Batch Info ADECUABILIDAD DEL SISTEMA, INYECCIÓN 8.

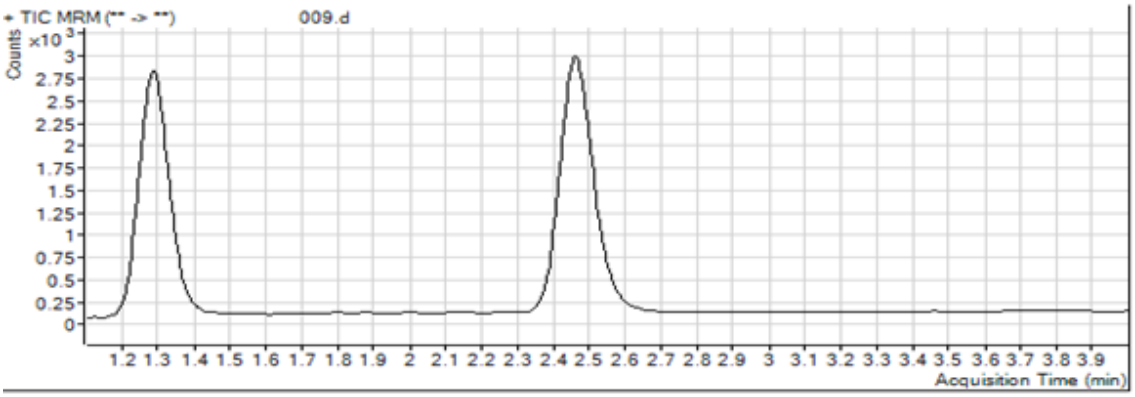
Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\VALIDACION\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:17:00 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	10:14:50 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:59 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

Acq Time	10:28
Data File	009.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	ADE I
Sample Info	
Sample Type	Sample
Sample Pos	Vial 2

Sample Chromatogram

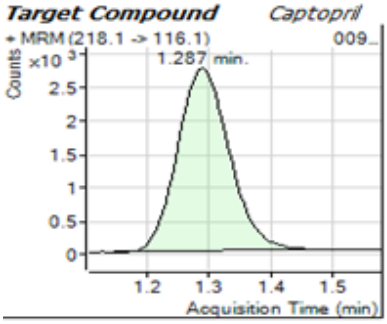


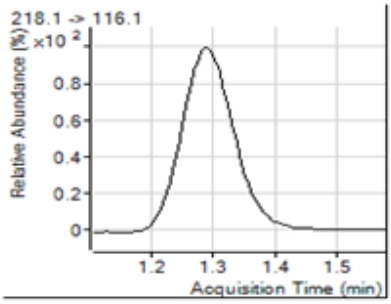
Quantitation Results

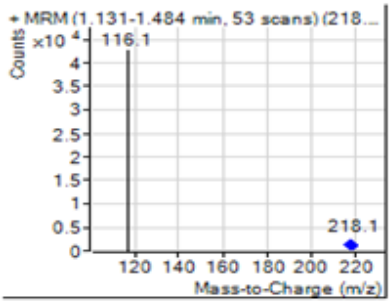
Compound	RT	Response	Final Conc	Accuracy
Captopril	1.287	16200	399.8329	
Nifedipino	2.459	19042		

Compound Graphics

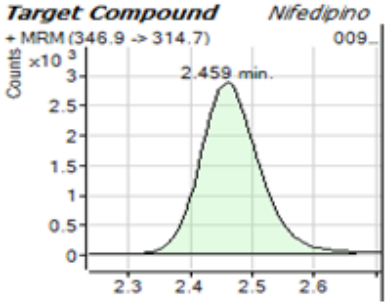
Target Compound *Captopril*

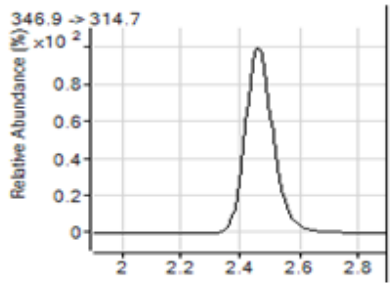


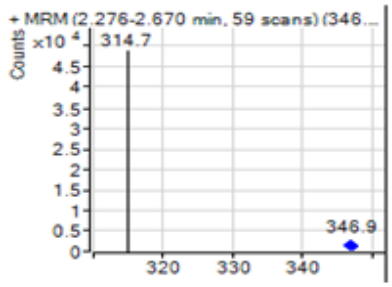




Target Compound *Nifedipino*







Batch Info ADECUABILIDAD DEL SISTEMA, INYECCIÓN 9.

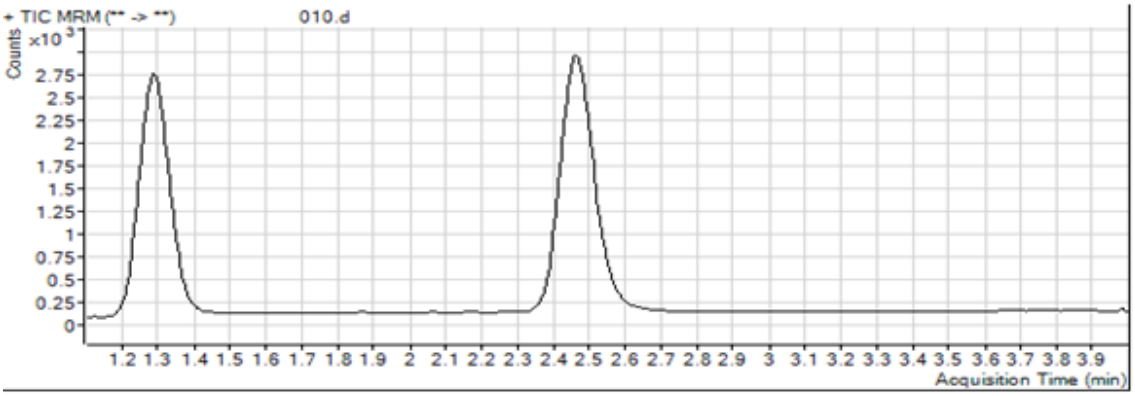
Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\VALIDACION\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:17:00 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	10:14:50 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:59 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

Acq Time	10:33
Data File	010.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	ADE I
Sample Info	
Sample Type	Sample
Sample Pos	Vial 2

Sample Chromatogram

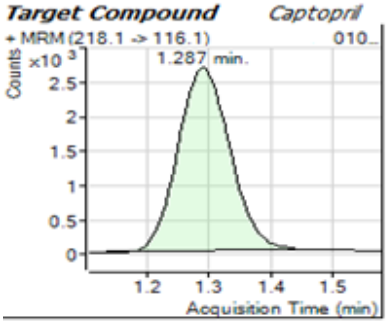


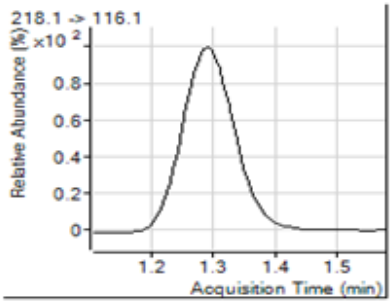
Quantitation Results

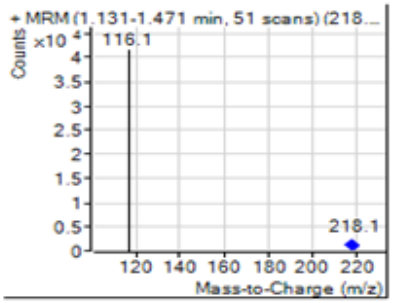
Compound	RT	Response	Final Conc	Accuracy
Captopril	1.287	15758	388.1408	
Nifedipino	2.460	19083		

Compound Graphics

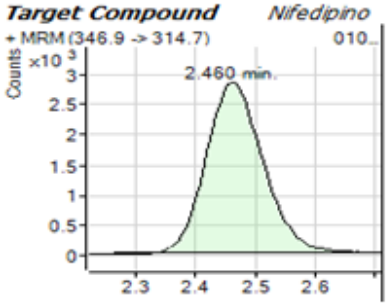
Target Compound *Captopril*

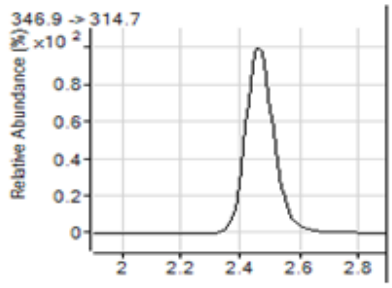


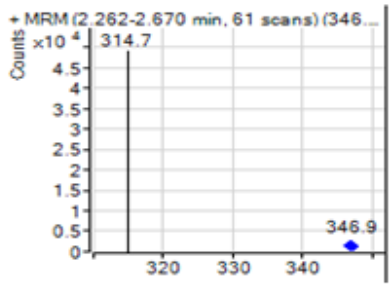




Target Compound *Nifedipino*







Batch Info **ADECUABILIDAD DEL SISTEMA, INYECCIÓN 10.**

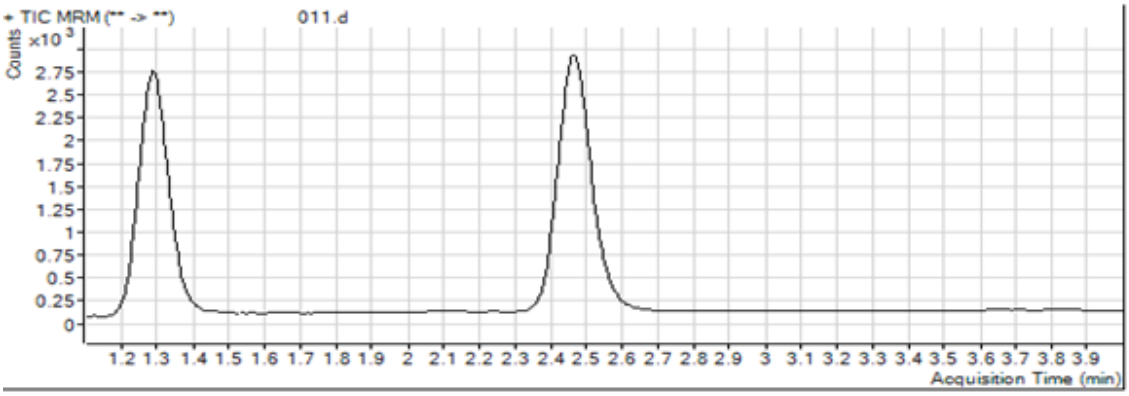
Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\VALIDACION\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:17:00 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	10:14:50 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:59 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

Acq Time	10:37
Data File	011.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	ADE I
Sample Info	
Sample Type	Sample
Sample Pos	Vial 2

Sample Chromatogram

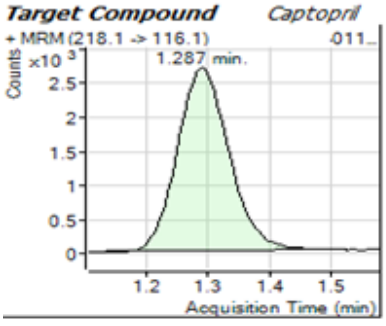


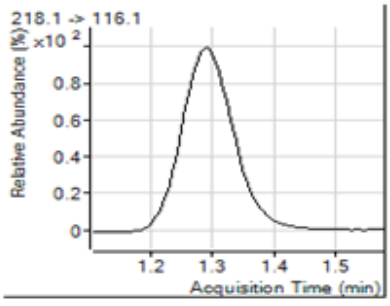
Quantitation Results

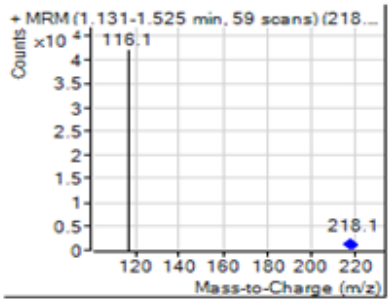
Compound	RT	Response	Final Conc	Accuracy
Captopril	1.287	15866	398.5709	
Nifedipino	2.461	18709		

Compound Graphics

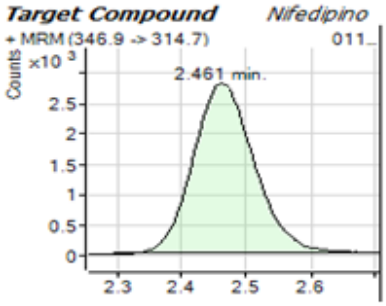
Target Compound *Captopril*

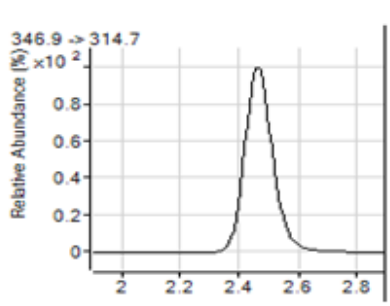


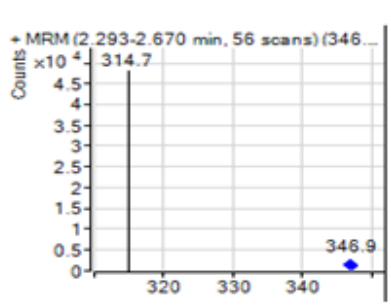




Target Compound *Nifedipino*







Batch Info BLANCO DE REACTIVO DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN.

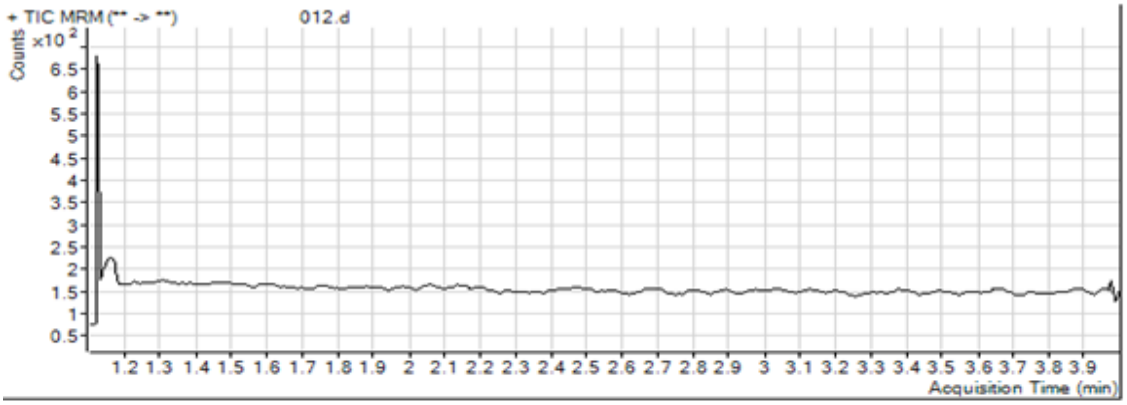
Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\VALIDACION\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:17:00 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	10:14:50 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:59 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

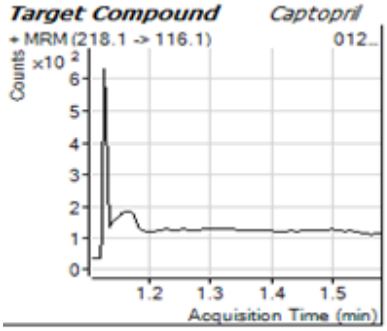
Acq Time	10:45
Data File	012.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	BCO REACT
Sample Info	
Sample Type	Sample
Sample Pos	Vial 1

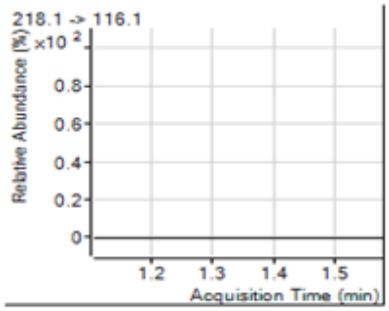
Sample Chromatogram

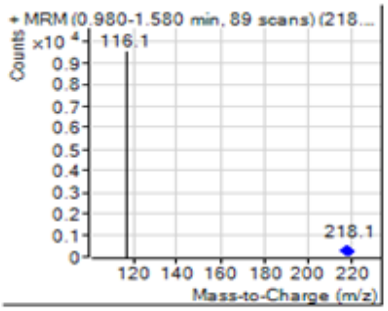


Quantitation Results
Compound Graphics

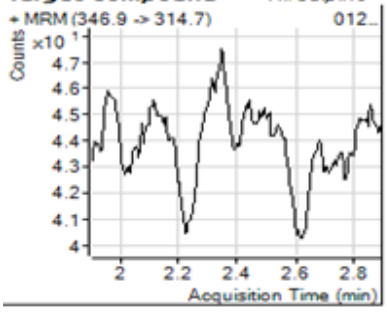
Target Compound *Captopril*

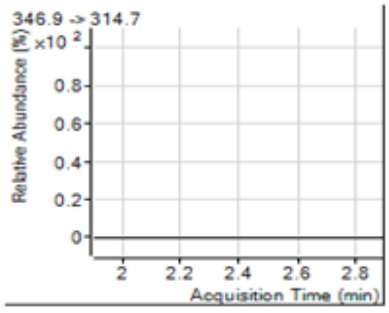


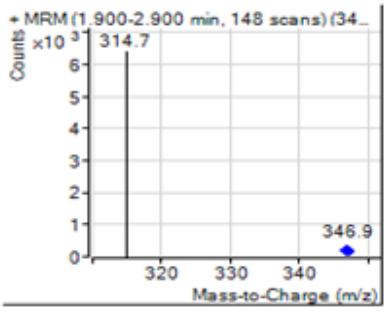




Target Compound *Nifedipino*







Batch Info BLANCO DE PLASMA (MUESTRA BLANCO) DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

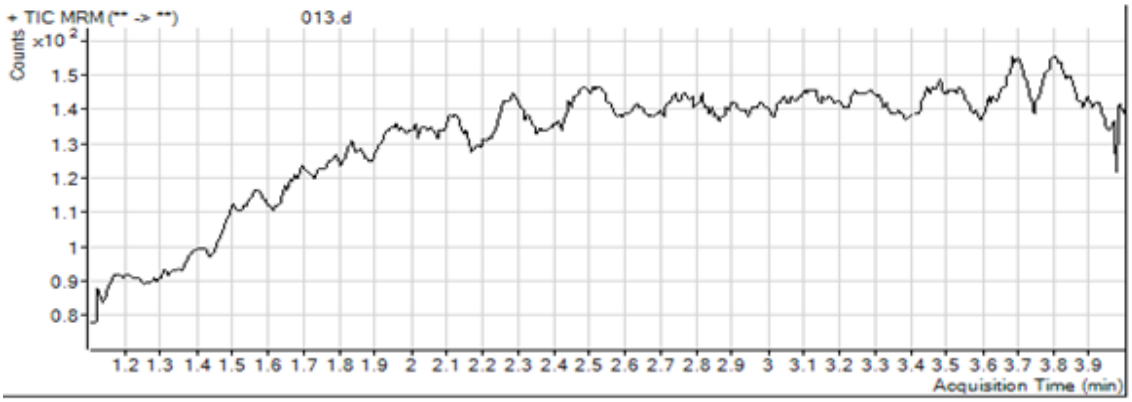
Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\VALIDACION\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:17:00 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	10:14:50 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:59 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

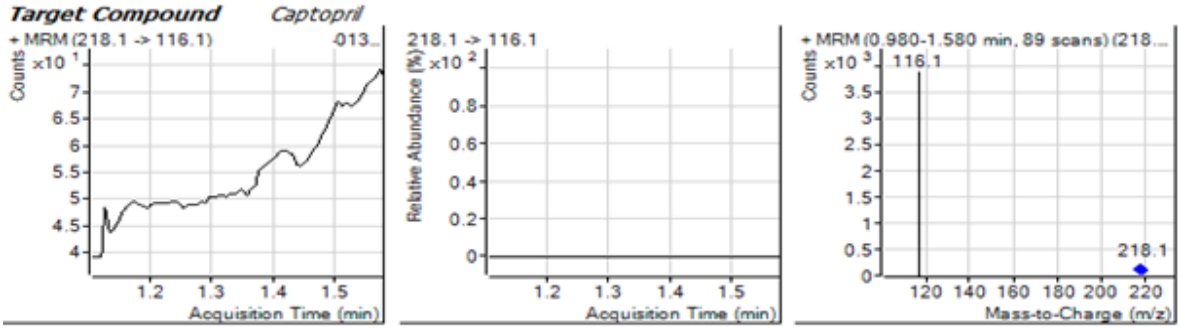
Acq Time	11:06
Data File	013.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	BCO PL
Sample Info	
Sample Type	Sample
Sample Pos	P1-A1

Sample Chromatogram

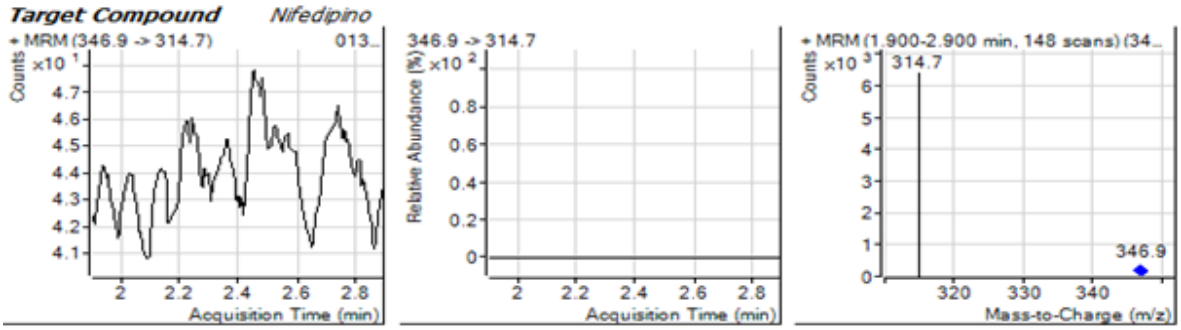


Quantitation Results
Compound Graphics

Target Compound *Captopril*



Target Compound *Nifedipino*



Batch Info BLANCO DE PLASMA + ESTÁNDAR INTERNO (EI). (MUESTRA CERO).

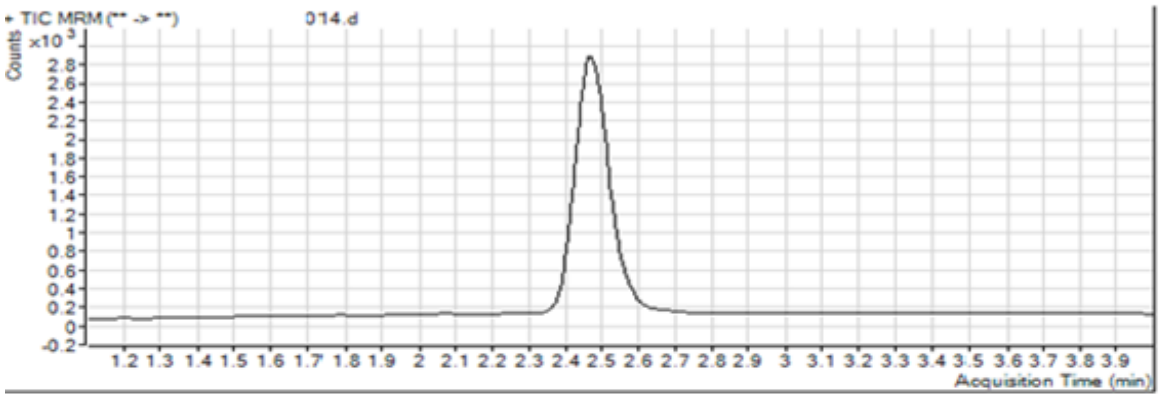
Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\VALIDACION\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:17:00 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	10:14:50 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:59 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

Acq Time	11:11
Data File	014.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	BCO PL + EI
Sample Info	
Sample Type	Sample
Sample Pos	P1-A2

Sample Chromatogram

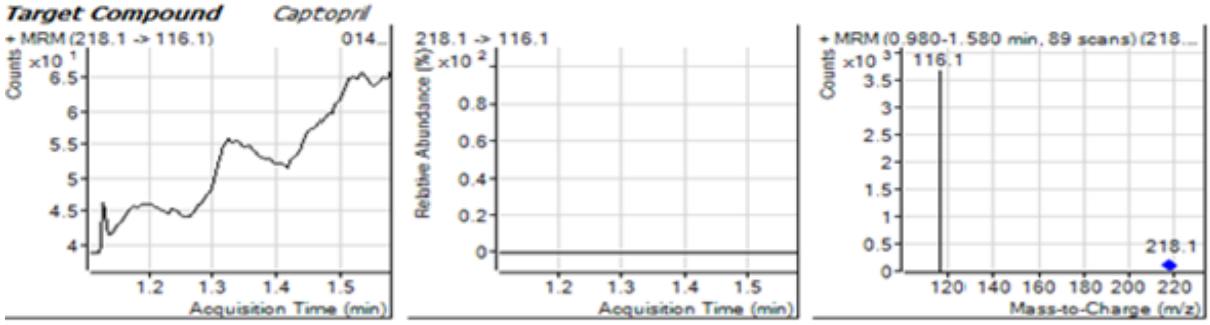


Quantitation Results

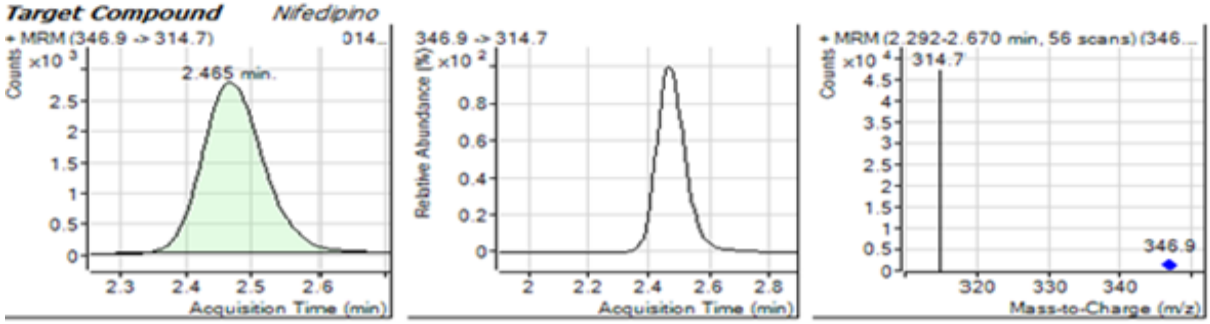
Compound	RT	Response	Final Conc	Accuracy
Nifedipino	2.465	18342		

Compound Graphics

Target Compound *Captopril*



Target Compound *Nifedipino*



Batch Info **ESTÁNDAR DE CALIBRACIÓN 1 (EC1).**

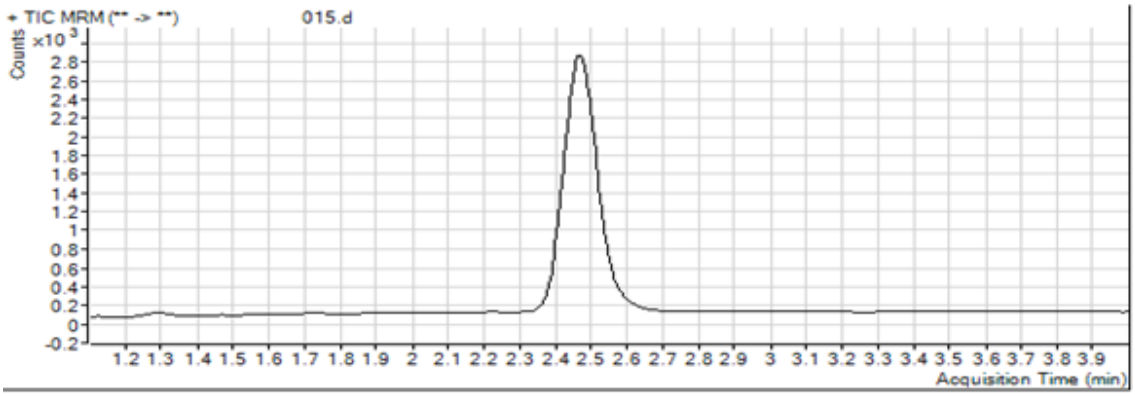
Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\VALIDACION\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:17:00 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	10:14:50 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:59 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

Acq Time	11:15
Data File	015.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	EC1
Sample Info	
Sample Type	Calibration
Sample Pos	P1-A3

Sample Chromatogram

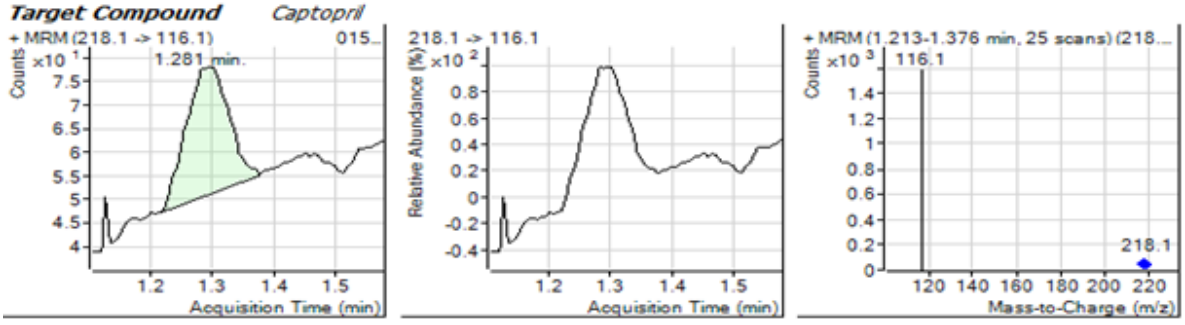


Quantitation Results

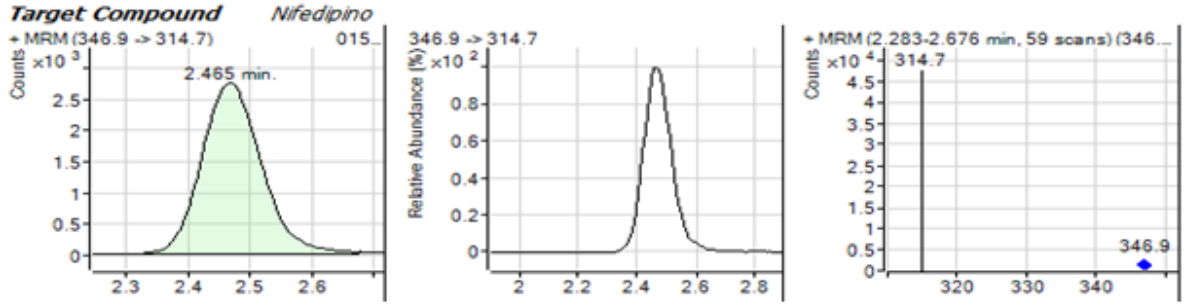
Compound	RT	Response	Final Conc	Accuracy
Captopril	1.281	136	5.5396	110.8
Nifedipino	2.465	18562		

Compound Graphics

Target Compound *Captopril*



Target Compound *Nifedipino*



Batch Info ESTÁNDAR DE CALIBRACIÓN 2 (EC2).

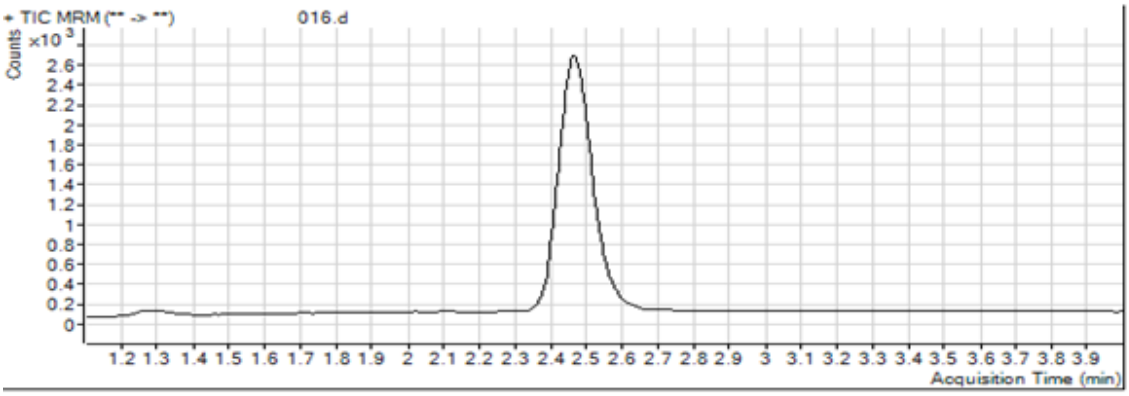
Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\VALIDACION\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:17:00 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	10:14:50 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:59 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

Acq Time	11:20
Data File	016.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	EC2
Sample Info	
Sample Type	Calibration
Sample Pos	P1-A4

Sample Chromatogram

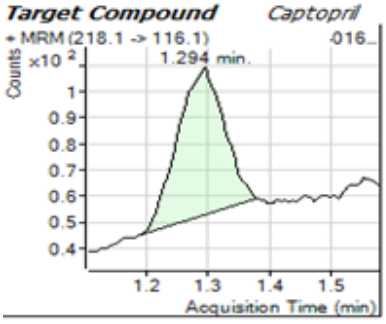


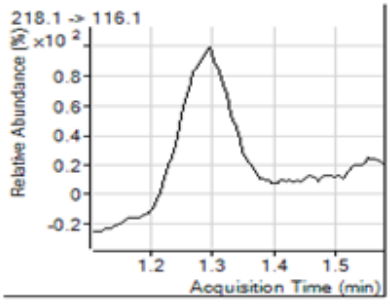
Quantitation Results

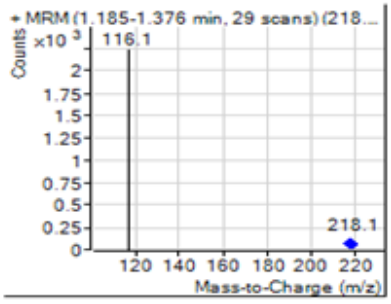
Compound	RT	Response	Final Conc	Accuracy
Captopril	1.294	309	10.5091	105.1
Nifedipino	2.461	17208		

Compound Graphics

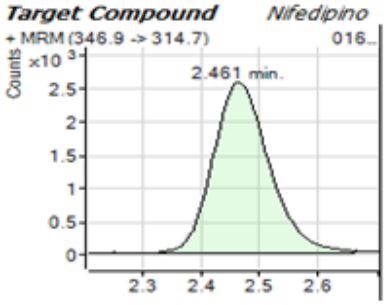
Target Compound *Captopril*

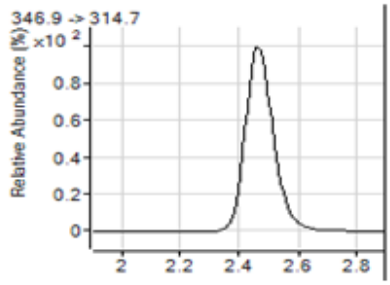


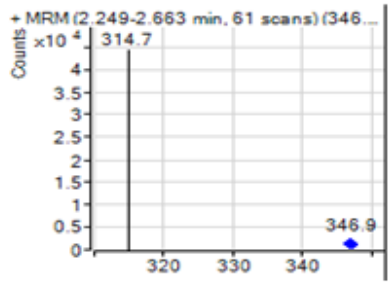




Target Compound *Nifedipino*







Batch Info

ESTÁNDAR DE CALIBRACIÓN 3 (EC3).

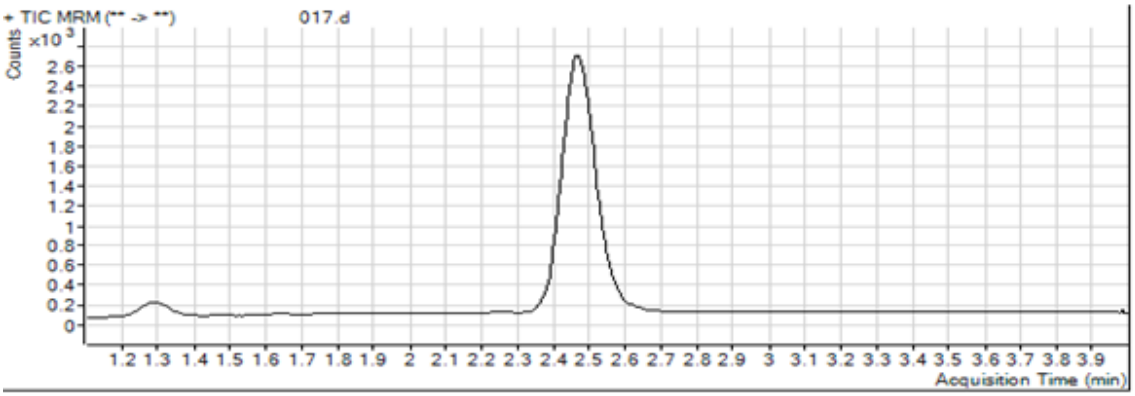
Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\VALIDACION\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:17:00 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	10:14:50 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:59 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

Acq Time	11:24
Data File	017.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	EC3
Sample Info	
Sample Type	Calibration
Sample Pos	P1-A5

Sample Chromatogram

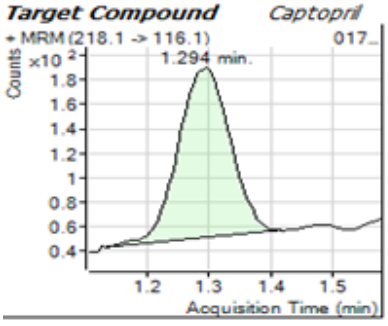


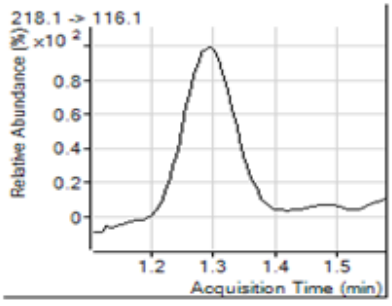
Quantitation Results

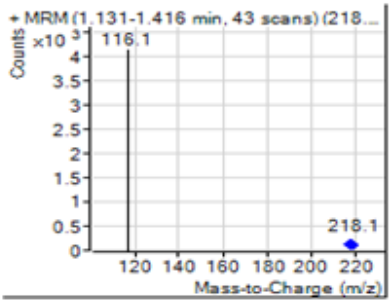
Compound	RT	Response	Final Conc	Accuracy
Captopril	1.294	827	24.3994	97.6
Nifedipino	2.464	17349		

Compound Graphics

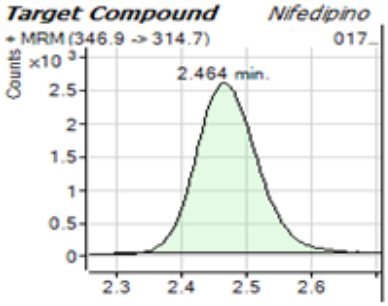
Target Compound *Captopril*

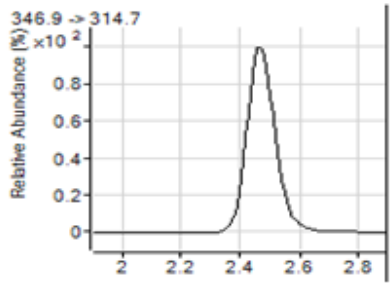


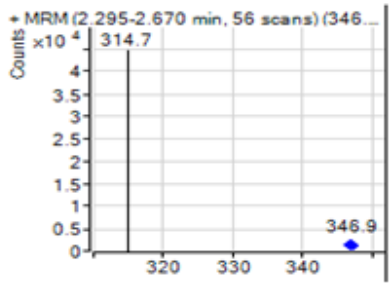




Target Compound *Nifedipino*







Batch Info ESTÁNDAR DE CALIBRACIÓN 4 (EC 4).

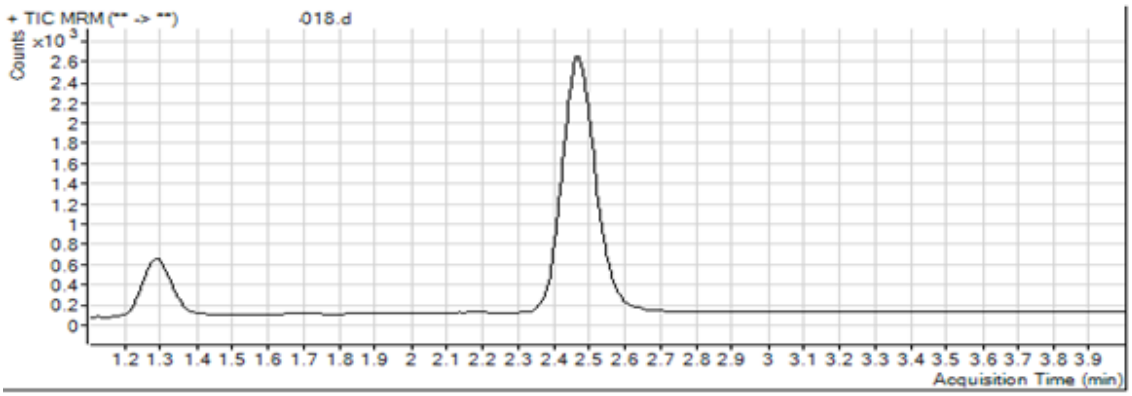
Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\VALIDACION\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:17:00 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	10:14:50 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:59 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

Acq Time	11:29
Data File	018.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	EC4
Sample Info	
Sample Type	Calibration
Sample Pos	P1-A6

Sample Chromatogram

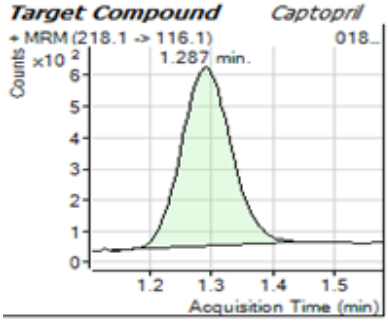


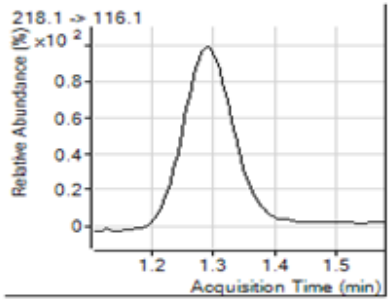
Quantitation Results

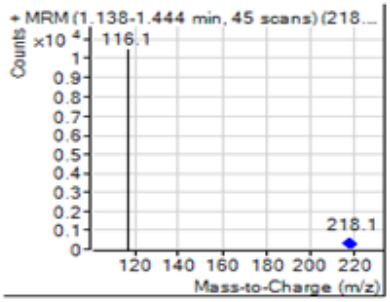
Compound	RT	Response	Final Conc	Accuracy
Captopril	1.287	3290	94.6947	94.7
Nifedipino	2.464	16613		

Compound Graphics

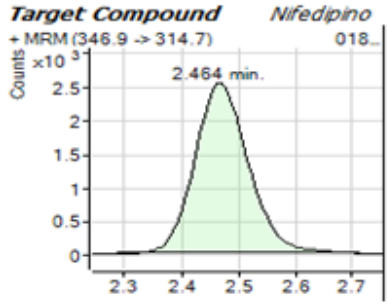
Target Compound *Captopril*

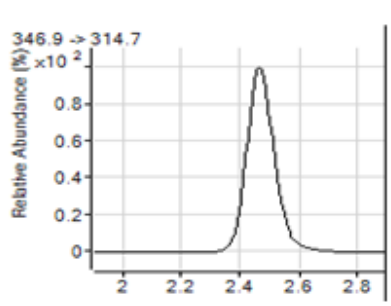


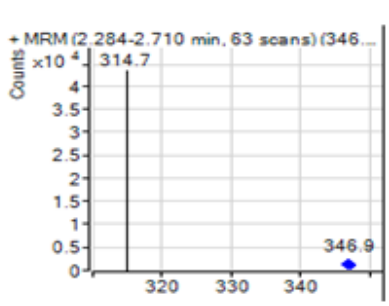




Target Compound *Nifedipino*







Batch Info ESTÁNDAR DE CALIBRACIÓN 5 (EC5).

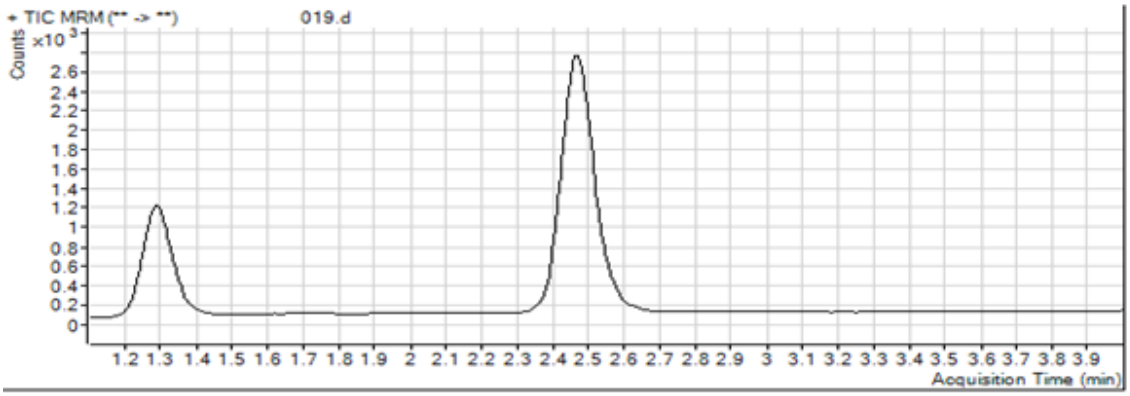
Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\VALIDACION\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:17:00 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	10:14:50 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:59 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

Acq Time	11:33
Data File	019.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	EC5
Sample Info	
Sample Type	Calibration
Sample Pos	P1-A7

Sample Chromatogram

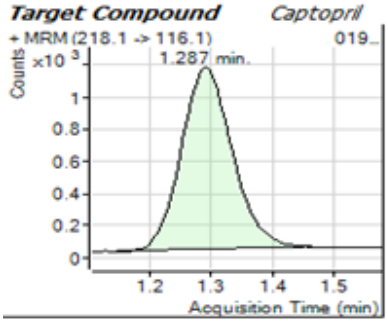


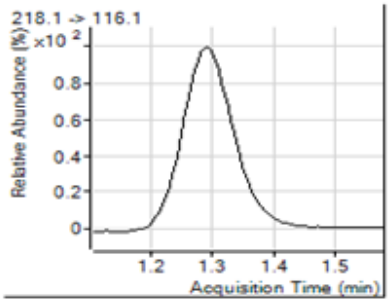
Quantitation Results

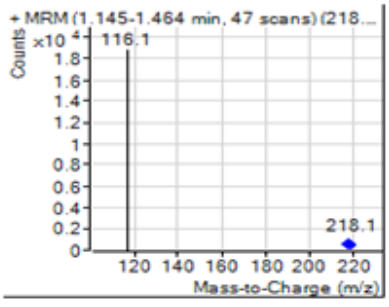
Compound	RT	Response	Final Conc	Accuracy
Captopril	1.287	6635	178.3210	89.2
Nifedipino	2.464	17603		

Compound Graphics

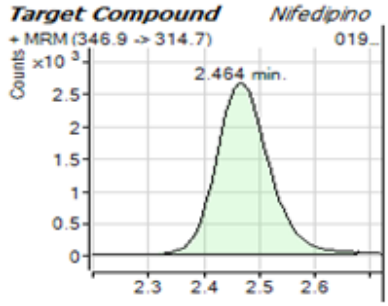
Target Compound *Captopril*

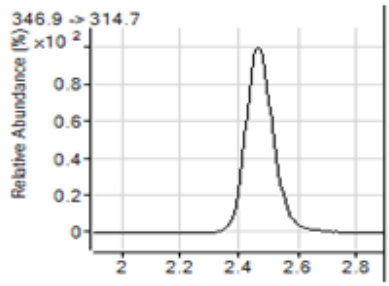


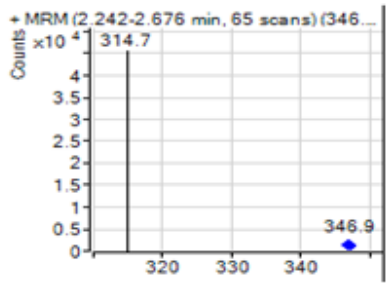




Target Compound *Nifedipino*







Batch Info **ESTÁNDAR DE CALIBRACIÓN 6 (EC6).**

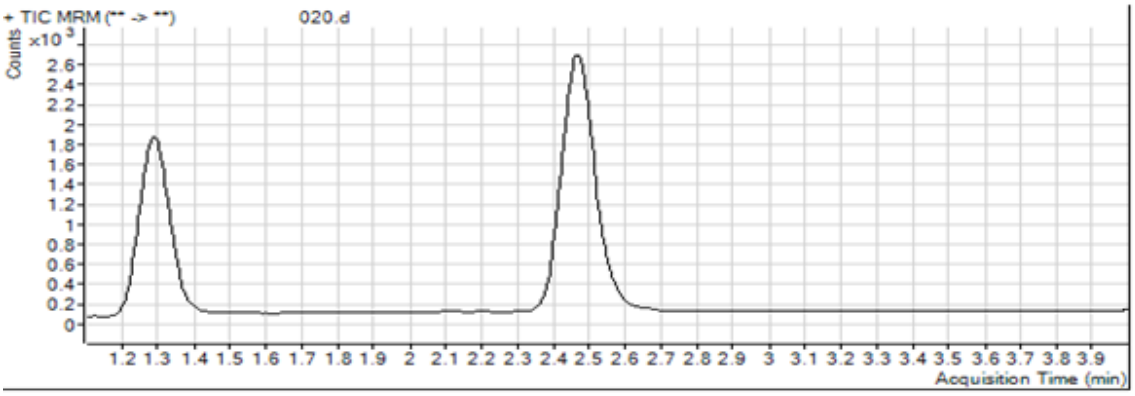
Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\VALIDACION\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:17:00 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	10:14:50 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:59 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

Acq Time	11:38
Data File	020.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	EC6
Sample Info	
Sample Type	Calibration
Sample Pos	P1-A8

Sample Chromatogram

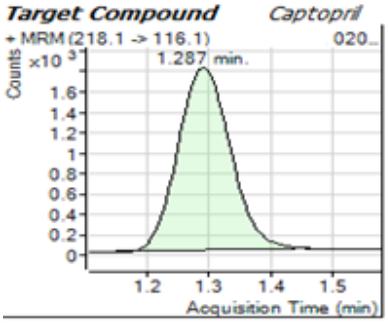


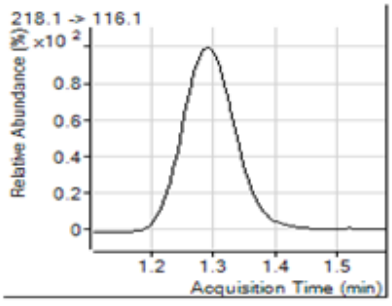
Quantitation Results

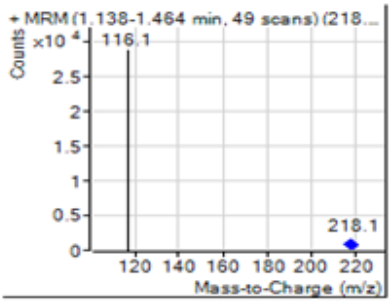
Compound	RT	Response	Final Conc	Accuracy
Captopril	1.287	10673	295.3271	98.4
Nifedipino	2.464	17017		

Compound Graphics

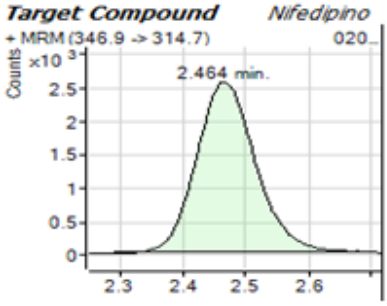
Target Compound *Captopril*

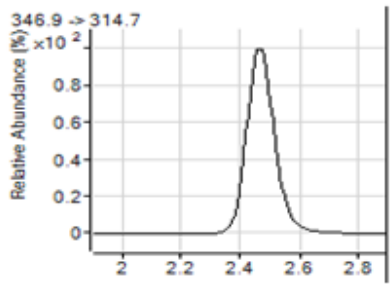


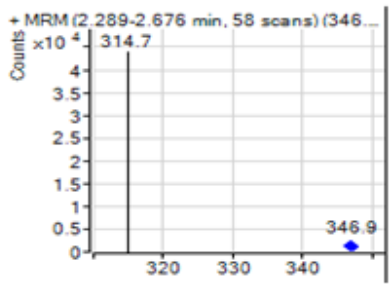




Target Compound *Nifedipino*







Batch Info ESTÁNDAR DE CALIBRACIÓN 7 (EC7).

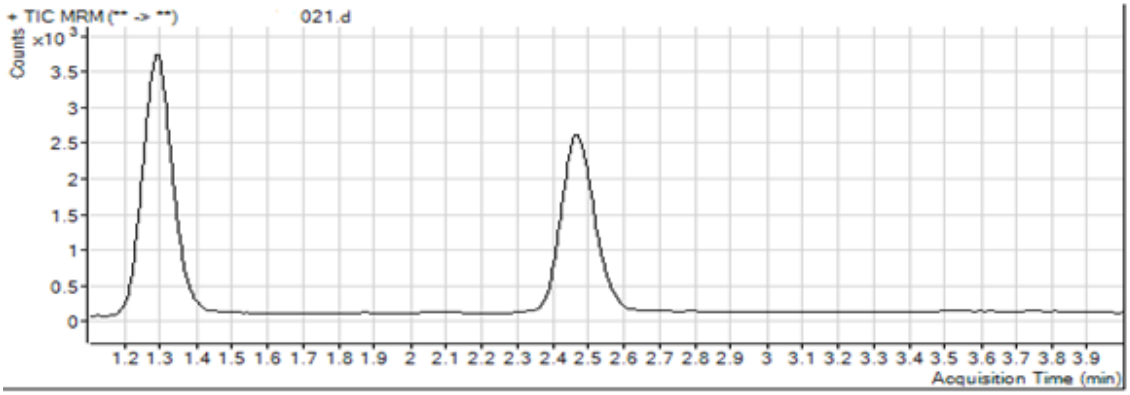
Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\VALIDACION\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:17:00 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	10:14:50 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:59 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

Acq Time	11:43
Data File	021.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	EC7
Sample Info	
Sample Type	Calibration
Sample Pos	P1-A9

Sample Chromatogram

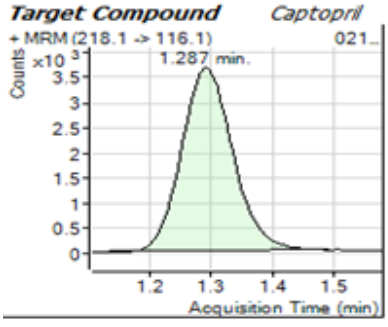


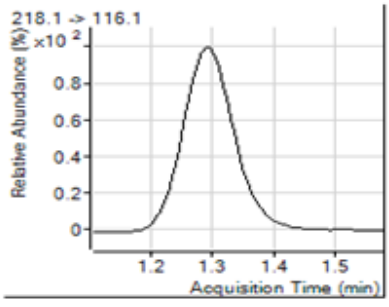
Quantitation Results

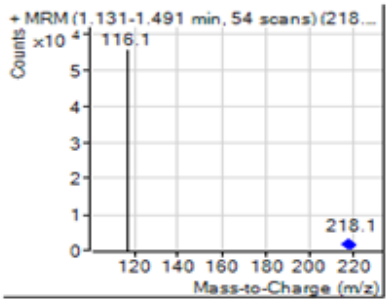
Compound	RT	Response	Final Conc	Accuracy
Captopril	1.287	21458	607.6701	101.3
Nifedipino	2.463	16566		

Compound Graphics

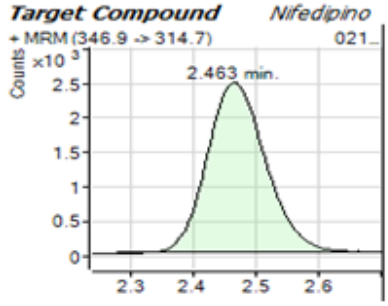
Target Compound *Captopril*

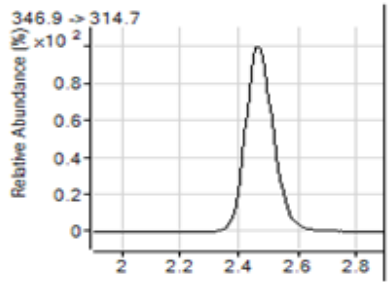


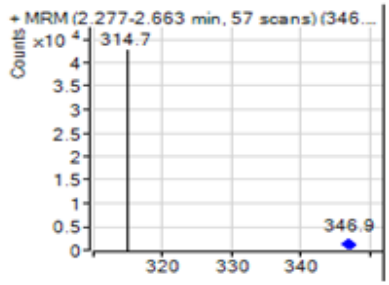




Target Compound *Nifedipino*







Batch Info ESTÁNDAR DE CALIBRACIÓN 8 (EC8).

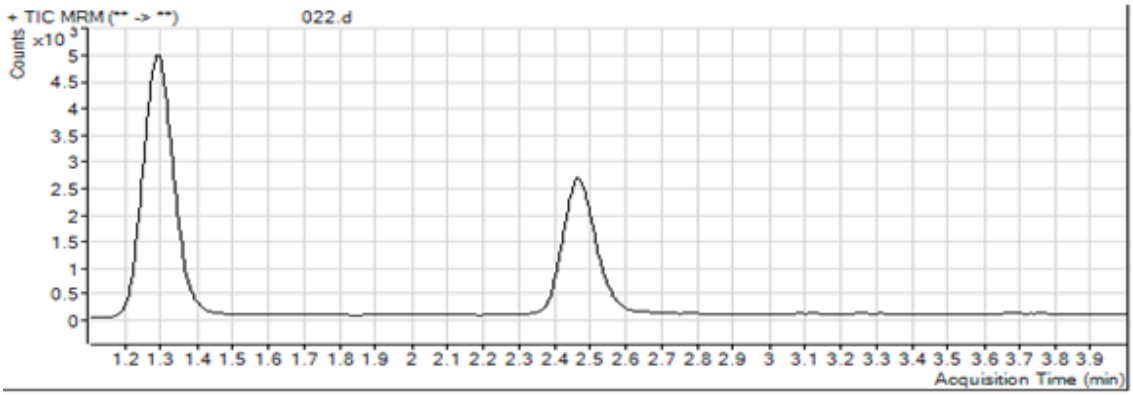
Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\VALIDACION\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:17:00 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	10:14:50 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:59 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

Acq Time	11:47
Data File	022.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	EC8
Sample Info	
Sample Type	Calibration
Sample Pos	P1-A10

Sample Chromatogram

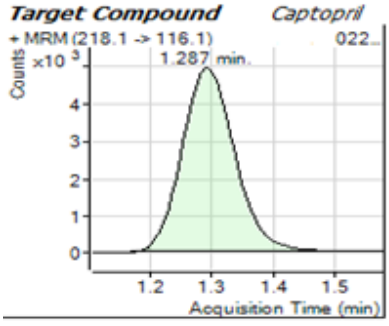


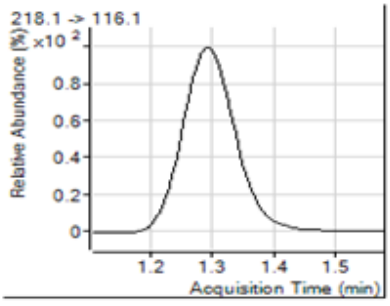
Quantitation Results

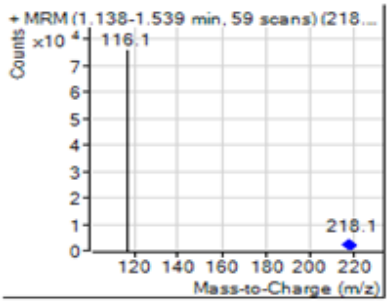
Compound	RT	Response	Final Conc	Accuracy
Captopril	1.287	29634	823.5391	102.9
Nifedipino	2.463	16865		

Compound Graphics

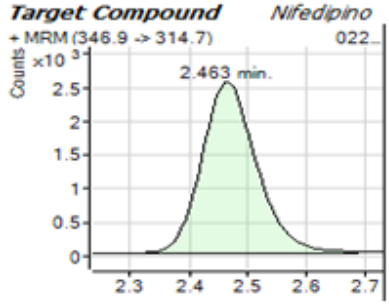
Target Compound *Captopril*

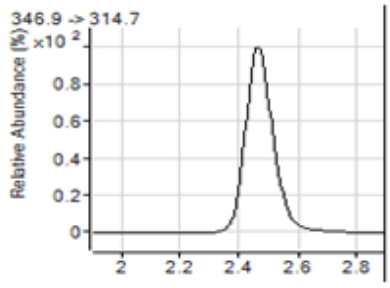


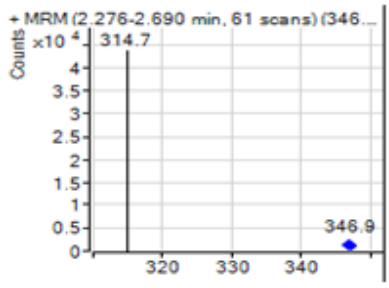




Target Compound *Nifedipino*







Batch Info BLANCO DE REACTIVO DESPUES DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN (VERIFICACIÓN DE ACARREO).

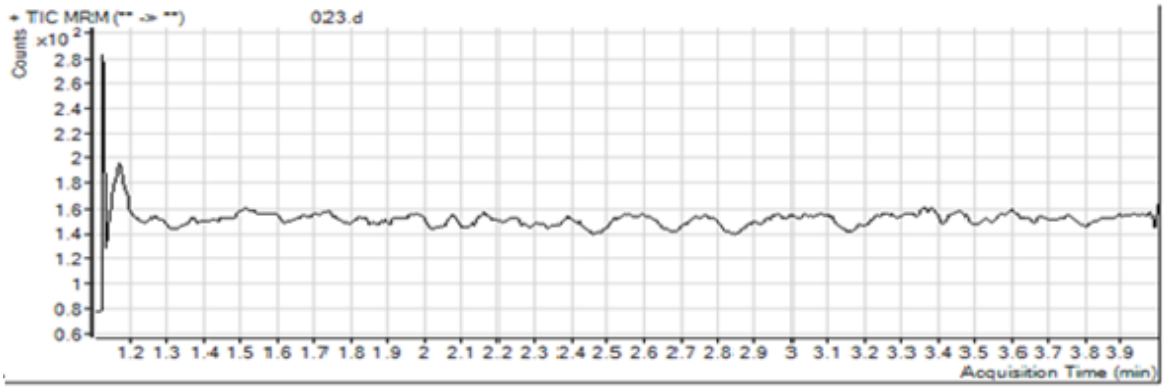
Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\VALIDACION\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:17:00 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	10:14:50 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:59 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

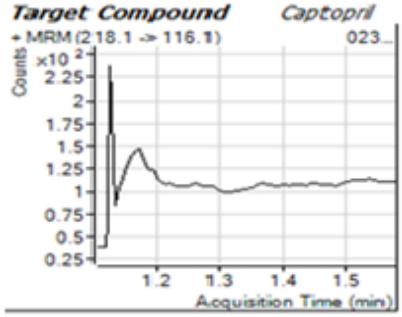
Acq Time	11:52
Data File	023.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	BCO REACT
Sample Info	
Sample Type	Sample
Sample Pos	Vial 1

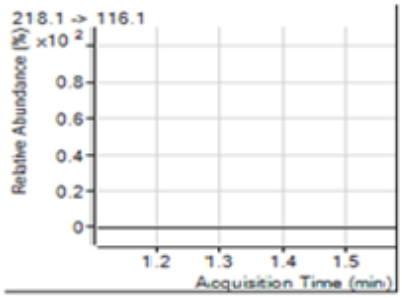
Sample Chromatogram

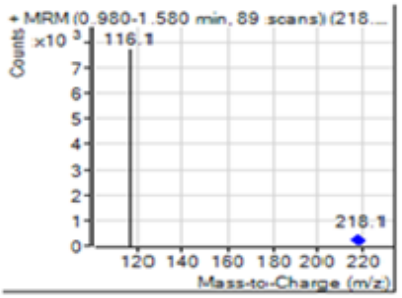


Quantitation Results
Compound Graphics

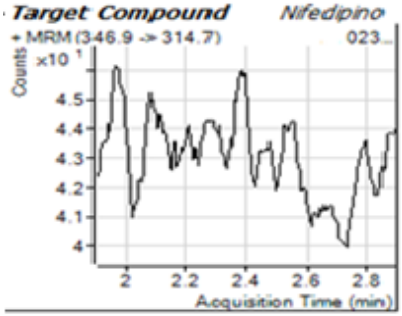
Target Compound *Captopril*

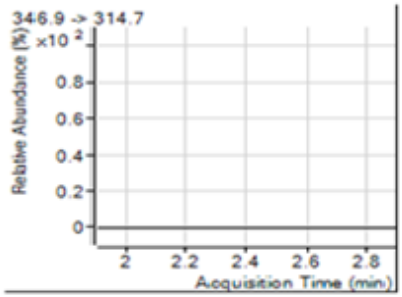


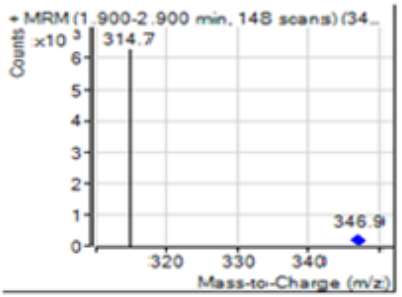




Target Compound *Nifedipino*







Batch Info BLANCO DE PLASMA DESPUES DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN (VERIFICACIÓN DE ACARREO).

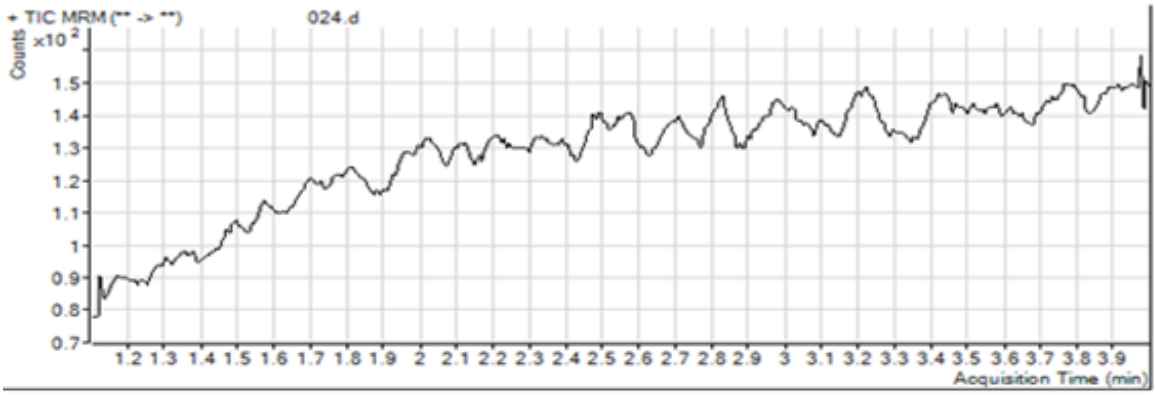
Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\VALIDACION\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:17:00 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	10:14:50 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:59 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

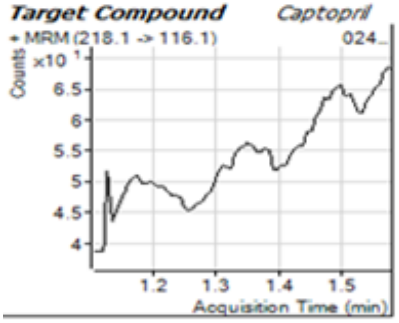
Acq Time	11:56
Data File	024.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	BCO PL
Sample Info	
Sample Type	Sample
Sample Pos	P1-A1

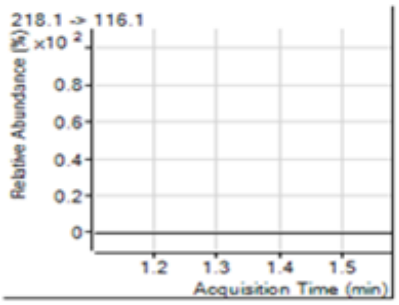
Sample Chromatogram

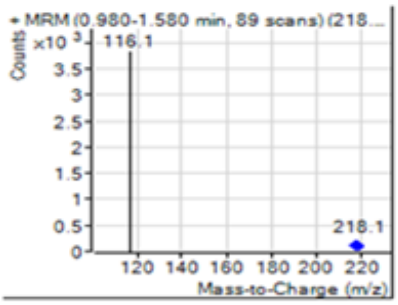


Quantitation Results
Compound Graphics

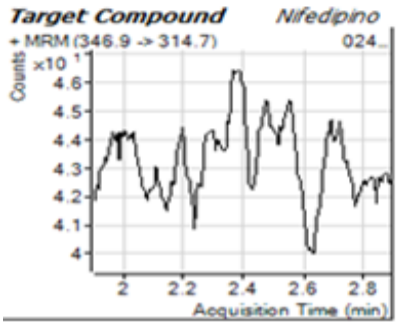
Target Compound *Captopril*

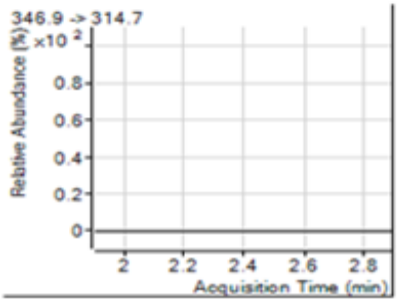


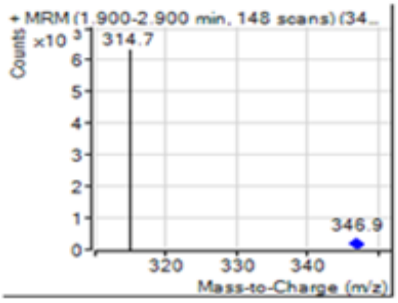




Target Compound *Nifedipino*







ANEXO 5. CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS DE LA APLICACIÓN DEL ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD EN VOLUNTARIOS SANOS.

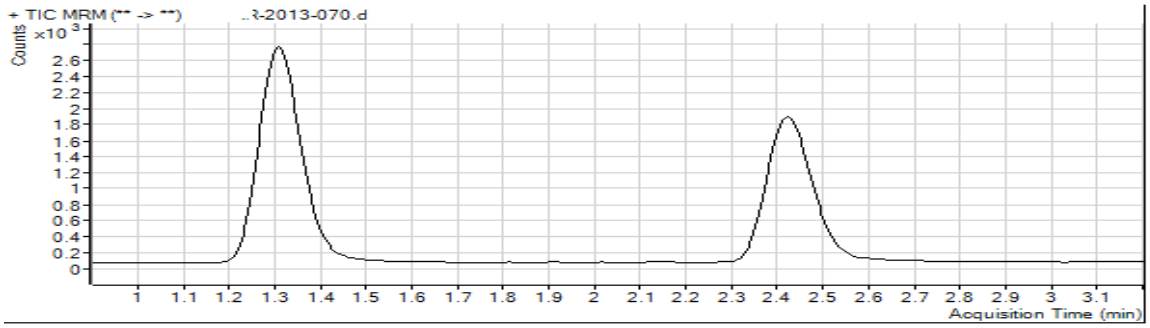
Batch Info VOLUNTARIO 11, PERIODO 1, TRATAMIENTO DE REFERENCIA, MUESTRA 326.
Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\ESTUDIO\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:12:20 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	08:36:22 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	1/0/1900 8:12 AM	**Batch State**	Processed

Analysis Info

Acq Time	17:34
Data File	070.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	M-326
Sample Info	
Sample Type	Sample
Sample Pos	P2-D2

Sample Chromatogram

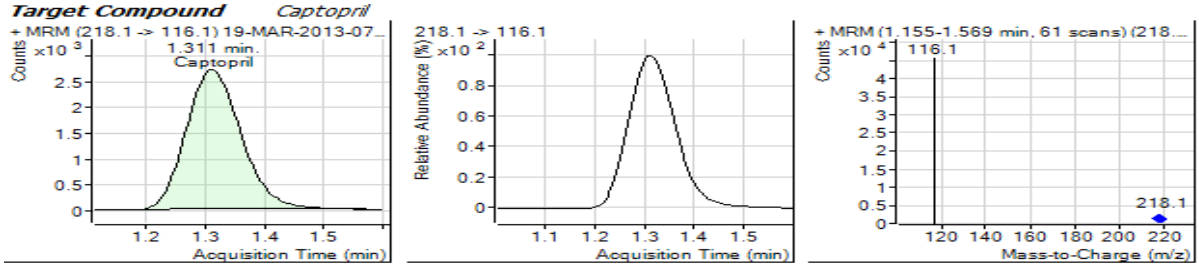


Quantitation Results

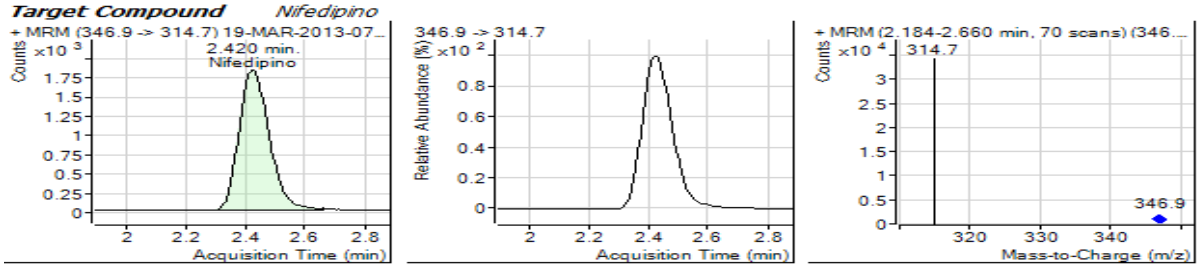
Compound	RT	Response	Final Conc	Accuracy
Captopril	1.311	17533	633.6550	
Nifedipino	2.420	12959		

Compound Graphics

Target Compound *Captopril*



Target Compound *Nifedipino*



Cromatogramas de voluntario 11, periodo 1, tratamiento de referencia, tiempo de muestreo 1 hora, concentración máxima 633.6550ng/mL.

Batch Info VOLUNTARIO 11, PERIODO 2, TRATAMIENTO DE PRUEBA, MUESTRA 342.

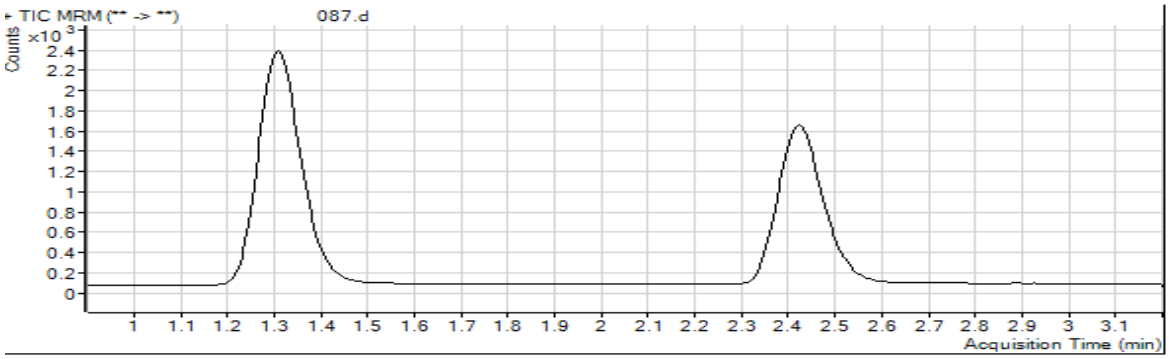
Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\ESTUDIO\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:12:20 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	08:36:22 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:12:20 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

Acq Time	18:38
Data File	087.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	M-342
Sample Info	
Sample Type	Sample
Sample Pos	P2-E6

Sample Chromatogram

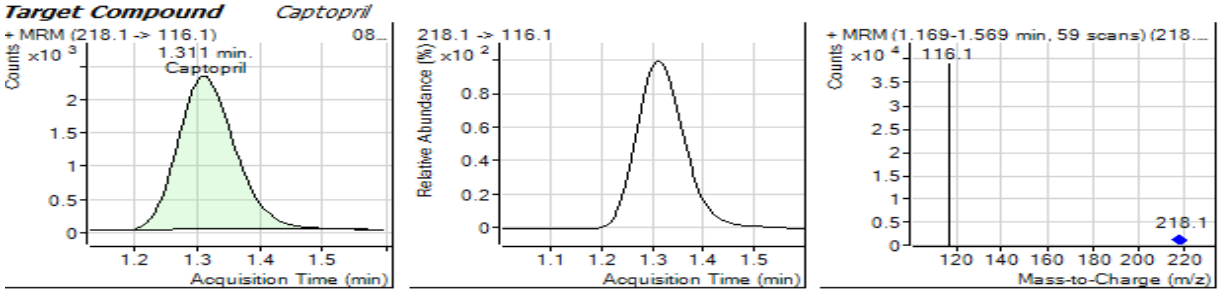


Quantitation Results

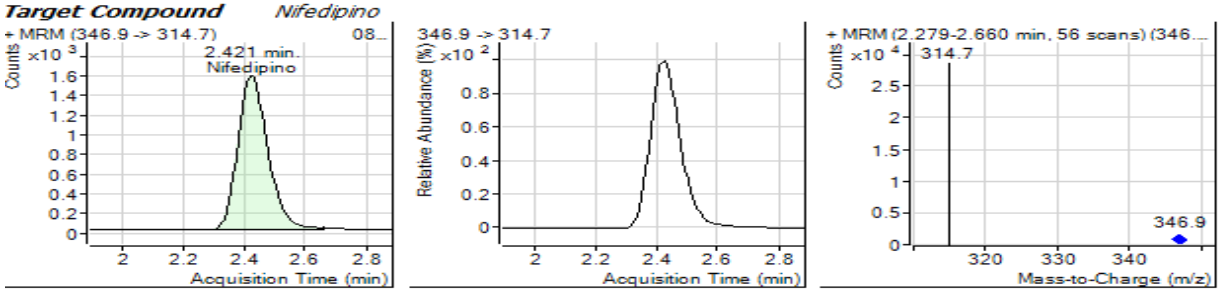
Compound	RT	Response	Final Conc	Accuracy
Captopril	1.311	14938	645.3623	
Nifedipino	2.421	10841		

Compound Graphics

Target Compound *Captopril*



Target Compound *Nifedipino*



Cromatogramas de voluntario 11, periodo 2, tratamiento de prueba, tiempo de muestreo 1 hora, concentración máxima 645.3623ng/mL.

Batch Info VOLUNTARIO 23. PERIODO 1, TRATAMIENTO DE REFERENCIA, MUESTRA 710.

Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\ESTUDIO\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:16:29 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	08:37:55 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:28 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

Acq Time	22:26
Data File	174.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	M-710
Sample Info	
Sample Type	Sample
Sample Pos	P1-F2

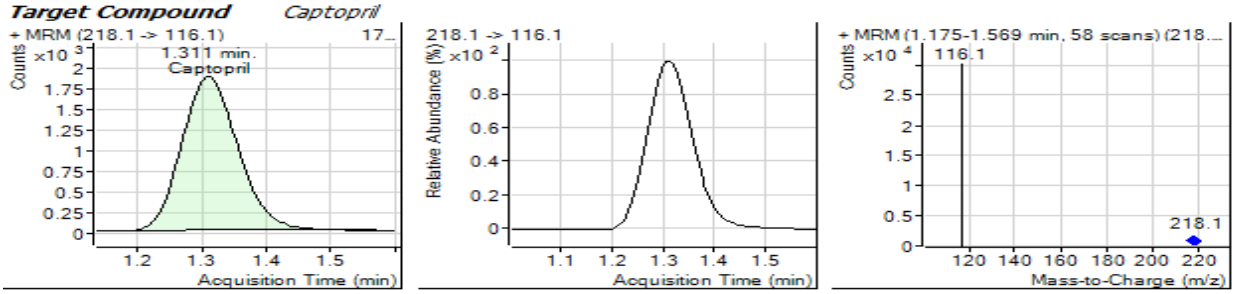
Sample Chromatogram

Quantitation Results

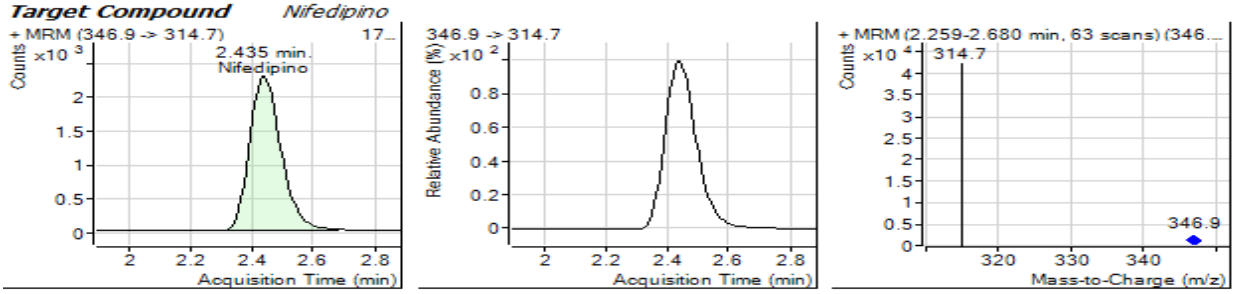
Compound	RT	Response	Final Conc	Accuracy
Captopril	1.311	11390	779.1732	
Nifedipino	2.435	16396		

Compound Graphics

Target Compound *Captopril*



Target Compound *Nifedipino*



Cromatogramas de voluntario 23, periodo 1, tratamiento de referencia, tiempo de muestreo 1 hora, concentración máxima 779.1732ng/mL.

Batch Info VOLUNTARIO 23, PERIODO 2, TRATAMIENTO DE PRUEBA, MUESTRA 726.

Batch Data Path D:\MassHunter\Data\CAPTOPRIL\ESTUDIO\QuantResults\002.batch.bin

Analysis Time	08:16:29 a.m.	**Analyst Name**	Administrator
Report Time	08:37:55 a.m.	**Reporter Name**	Administrator
Last Calib Update	08:16:28 a.m.	**Batch State**	Processed

Analysis Info

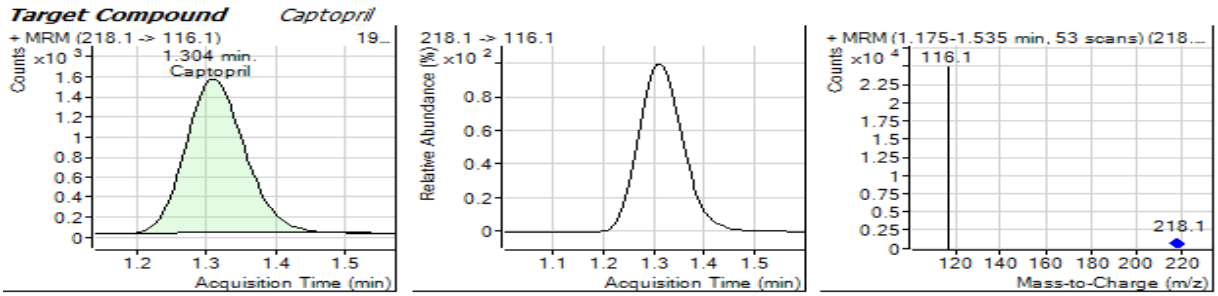
Acq Time	23:30
Data File	191.d
Acq Method File	CAPTOPRIL.m
Sample Name	M-726
Sample Info	
Sample Type	Sample
Sample Pos	P1-G6

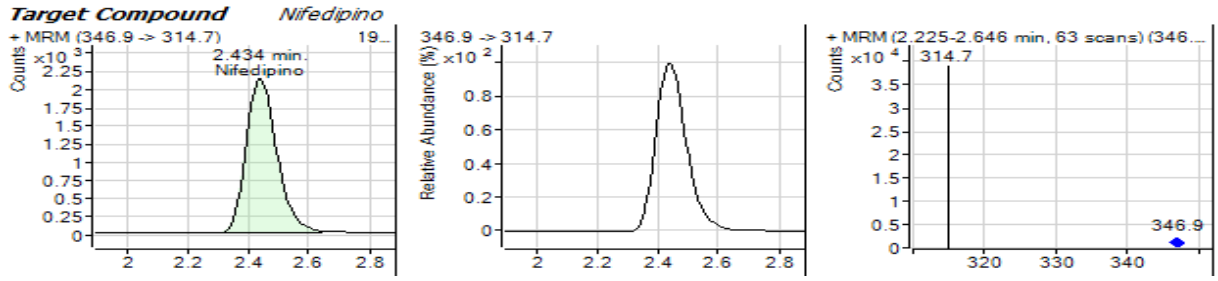
Sample Chromatogram

Quantitation Results

Compound	RT	Response	Final Conc	Accuracy
Captopril	1.304	9228	689.6634	
Nifedipino	2.434	15015		

Compound Graphics





Cromatogramas de voluntario 23, periodo 2, tratamiento de prueba, tiempo de muestreo 1 hora, concentración máxima 689.6634ng/mL.

10. REFERENCIAS

1. Skoog Douglas, et al., Principios de análisis instrumental. Editorial Mc Graw-Hill/ Interamericana. 5ª edición; España, 2008. pp.785-800.
2. Kenneth A. Rubinson, et al., Análisis instrumental. Editorial Pearson Educación, España 2001. pp. 108-117, 536-669.
3. Rouessac Francis et al., Análisis Químico, Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas. España 2003. pp. 57-98, 301-330.
4. Connors A. Kenneth. Curso de análisis farmacéutico (Ensayo del medicamento), 2da edición, España 1981. pp. 331-347
5. Jason S. Pagea, Ryan t. Kellya, et al., Ionization and transmission Efficiency in an Electrospray Ionization-Mass Spectrometry Interface. J. Am Soc Mass Spectro. 2007; 18(9):1582-1590.
6. Cárdenas R. Hilda, Cortes A. Alma. Aspectos Biofarmacéuticos de la evaluación de Medicamentos. México. 1996. pp. 109-132.
7. Aiache, J. M. et al., Biofarmacia. Editorial El Manual Moderno. México, 1983. pp. 86-125.
8. R. Gennaro Alfonso. Remington Farmacia Tomo I. Editorial Panamericana, Argentina, 1987. pp. 844, 850, 885-895.
9. Moffat, Anthony C; Osselton, M David et al., Clarke's Analysis of Drugs and Poisons.
10. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Comisión Permanente de los Estados Unidos Mexicanos, SSA 10ª Ed. 2011, Tomo I: pp. 834, 835, 1151 y 1152; Tomo II, pp. 2569 – 2594.
11. The Merck Index, An Enciclopedia of Chemicals, Drug and Biologicals, 12 th. ed., 1996. pp. 244, 936, 493.
12. Bertran G. Katzung, Farmacología básica y clínica. Editorial el manual moderno; 10ª edición; México, 2007. pp. 163-166, 179-180.
13. 2002 Drug Hand book. Blanchar Loeb. pp. 125
14. M. J. Escribano García, S. Torrado Durán. Estudio de estabilidad de soluciones acuosas de captopril en concentración de 1 mg/ml. Farmacia Hospitalaria, 2005; 29(1):30-36.
15. Barrientos Rafael E. The determination of Total Captopril in Human Plasma Samples containing Hydrochlorothiazide by LC-MS/MS using Enalapril as the Internal Standard. Institute of Biomedical Sciences, USP.
16. Quanyun A. Xu, Lawrence A. Trissel. Stability-Indicating HPLC Methods for drug analysis. 2003. pp. 91-93, 466-468.

17. Colegio de químicos farmacéuticos biólogos. Guía de Validación de métodos analíticos. México:CNQFB;2002:8-70.
18. Harris Daniel C. Análisis químico cuantitativo. 3ra edición. Editorial Reverté. España, 2007. pp. 49-51.
19. System suitability in bioanalytical LC/MS/MS. J. Pharm Biomed Anal. 2007; 28; 44(2):484-91.
20. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
21. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad.
22. Isam Ismail Salem, et al., A selective and rapid method forth equantification of captopril in human plasma using liquid chromatography/selected reaction monitoring mass spectrometry. J. Pharma. Biom. Anal. 2005; 37(5):1073-1080.
23. Khalid Hamad Abu-Shandia, Engelbert Redel. Quantification and Stability Evaluation of the Highly Specific Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibitor Captopril in Human Plasma Using a Gas Chromatographic Method with N, N, N', N'-tetramethyl-2-butenediamide Derivatizing Agent Jordan. J. Chem. 2009; 4(2):183-194.
24. R. Rezende Kennia, M. Mundim Iram, et al., Determination of captopril in human plasma, using solid phase extraction and high-performance liquid chromatography, coupled to mass spectrometry: Application to bioequivalence study. Biomedical Chromatography B. 2007; (850):59-67.
25. Nukhet Aykin, et al. Determination de Captopril en biological samples by high-performance liquid chromatography with Thioglo3 derivatization. Biomedical Chromatography. 2001; 15: 427-432.
26. Medvedovici Andrei, Albu Florin, et al., Assay of free captopril in human plasma as monobromobimane derivative, using RPLC/ (+) ESI/MS/MS: validation aspects and bioequivalence evaluation. J. Biomed. Chromatogr. 2009; 23:1092-1100.
27. Vancea Szende, Imre Silvia, et al., Determination of free captopril in human plasma by liquid chromatography with mass spectrometry detection. Talanta. 2009; (79):436-441.
28. Lunn George. HPLC. Methods for pharmaceutical analysis. Vol. 2 A-D. USA 1999. pp. 967-975.

29. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), Aguascalientes, Estadísticas a propósito del día mundial de la salud. [Abril 2013], [Octubre 2013]. Disponible en:

http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2013/salud0.pdf

30. Almeira A.M, et al., Linear regression for calibrations lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. J. Chromatography B, 2002; (774):215-222.
31. Philip Rowe. Essential Statistics for the Pharmaceutical Sciences, Jhon Wiley & Sons LTD, Publications, 2007.