



# Bioéquivalence de deux formulations du valsartan 80mg, comprimés pelliculés sécables ; chez 15 volontaires algériens sains : Etude pilote.

**Mansouri. K., Behloul. S., Cherait. I., Nekhoul. K., Hadjaz. I. M.**

Service De Bioéquivalence, Laboratoire National De Contrôle Des Produits Pharmaceutiques , Alger 16000, Algérie

### Résumé :

Une étude randomisée, en chassé croisé a été menée chez 15 volontaires algériens sains à jeun, afin de comparer la biodisponibilité de deux formulations de comprimés pelliculés sécables de Valsartan 80 mg. La présente étude visait à évaluer la variabilité intra-sujet de ce principe actif dans la population algérienne. Le médicament test a été comparé au TAREG (Novartis) qui est le médicament de référence. L'étude a été réalisée au service de bioéquivalence du laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques, en collaboration avec le Centre Hospitalier Universitaire Ibn Badis, Constantine, Algérie. Le médicament a été administré avec 200 mL d'eau minérale après 10 h de jeun en deux périodes, séparées par une période de wash-out d'une semaine. Une série d'échantillons sanguins ont été récoltés pendant 24 heures. Une méthode fiable, simple et robuste de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) a été développée et validée en employant la précipitation des protéines (dénaturation) pour la quantification du valsartan dans le plasma humain et en utilisant le losartan comme étalon interne. La méthode est linéaire dans l'intervalle de 50-5000 ng/ml avec une limite inférieure de quantification de 50 ng/ml. Différents paramètres pharmacocinétiques dont la  $SSC_{0-t}$ ,  $SSC_{0-\infty}$ ,  $C_{max}$ ,  $T_{max}$  et  $T_{1/2}$  ont été déterminés à partir des concentrations plasmatiques des deux formulations et concordent avec les valeurs bibliographiques. L'analyse pharmacocinétique et statistique a été réalisée avec le Kinetica 4.4.1. Les  $SSC_{0-t}$ ,  $SSC_{0-\infty}$  et  $C_{max}$  ont été testées pour la bioéquivalence après log-transformation des données.

En se basant sur les résultats de l'ANOVA, aucune différence significative n'a été retrouvée; les intervalles de confiance à 90% ([85,82%, 118,76%] pour  $SSC_{0-t}$ , [86,09%, 118,83%] pour  $SSC_{0-\infty}$ ) des ratios test / référence pour ces paramètres étaient inclus dans l'intervalle d'acceptation réglementaire 80-125%. Mais pour la  $C_{max}$ , l'intervalle de confiance à 90% du rapport test / référence n'était pas dans cette plage d'acceptation [90,18%, 131,07%]. Les résultats de l'analyse pharmacocinétique suggèrent que les deux formulations de

valsartan ne sont pas bioéquivalentes chez les volontaires algériens sains à jeun.

Mots-clés: Valsartan, bioéquivalence, LC-MS / MS, pharmacocinétique

### Introduction

La bioéquivalence de deux formulations galéniques du même principe actif nécessite la détermination de leur biodisponibilité relative, ceci par la démonstration de l'équivalence du taux et de la vitesse d'absorption. La surface sous la courbe SSC permet de caractériser le taux d'absorption tandis que le pic de concentration plasmatique  $C_{max}$  et son moment d'apparition  $T_{max}$  renseignent sur la vitesse d'absorption.

Le valsartan est un antagoniste non péptidique, puissant et spécifique du récepteur de l'angiotensine II, il inhibe de manière sélective le récepteur AT1 et il est indiqué dans l'hypertension artérielle.

Il présente une absorption rapide après administration par voie orale, ses pics de concentration plasmatique sont atteints après 2 à 4 heures. La biodisponibilité absolue moyenne est de 23 %. Sa liaison aux protéines sériques est forte (94 à 97 %). Il se caractérise aussi par une décroissance cinétique multi-exponentielle ( $t_{1/2\alpha} < 1$  h et  $t_{1/2\beta}$  d'environ 9 heures). Son excrétion, sous forme inchangée se fait principalement par voie biliaire (>80%) et dans les urines (< 20%).

L'alimentation diminue la biodisponibilité du valsartan, en effet le taux d'exposition (mesuré par l'ASC) et les pics plasmatiques ( $C_{max}$ ) diminuent respectivement d'environ 40 % et 50 %. Cependant ces taux plasmatiques sont similaires huit (08) heures après la prise, que le patient ait été à jeun ou non.

Vue la forte variabilité inter et intra individuelle du valsartan, il est nécessaire de réaliser des études de biodisponibilité comparative. Le but de cette étude est d'évaluer chez des volontaires algériens sains la biodisponibilité d'une formulation galénique produite localement du valsartan et sa variabilité intra individuelle et de justifier l'application

d'une méthode LC-MS/MS validée.

## 2. Matériel et méthodes :

### 2.1 Médicaments à l'étude

Deux formulations du valsartan 80mg ont été évaluées :

Le médicament de référence TAREG® 80 mg comprimé pelliculé sécable (N° de lot : 135,024 , date de péremption : 05/2017 ,fabriqué par NOVARTIS)

Le médicament test : valsartan 80 mg comprimé pelliculé sécable (N° de lot : 5,063, date de péremption : 05/2018)

### 2.2 Volontaires de l'étude :

16 volontaires algériens sains (12 hommes et 04 femmes) ont été inclus , cependant 15 seulement ont complété l'étude car l'un d'entre eux s'est retiré avant la période (I) pour des raisons personnels avec un âge moyen (SD), 28,93 (4,13) ans (entre 23-38); poids moyen (SD), 80,75 (12,09) kg (entre 46,1-90 kg); taille moyenne (SD), 1,746 (0,000854) m (entre 1,55-1,87 m) et un IMC moyen 22,14 (3,50) kg / m<sup>2</sup> entre ( 18,47-29,06 kg / m<sup>2</sup>).

Les volontaires ont été soumis à un examen clinique complet et une série d'analyses médicales (analyses hématologiques, biochimiques, sérologiques et urinaires) et il leur a été demandé de s'abstenir de prendre des médicaments deux semaines avant et pendant l'étude, de prendre des vitamines deux jours avant l'étude, de consommer du pamplemousse sept jours avant l'étude et ainsi que de consommer du tabac et de la caféine ou des boissons ou aliments contenant des bases xanthiques pendant 48 heures avant l'administration des médicaments de l'étude.

### 2.3 Considérations éthiques

Cette étude a été conduite selon les principes éthiques énoncés dans la déclaration d'Helsinki (Séoul, 2008) et aux bonnes pratiques cliniques . Elle a été réalisée au sein du laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques (Alger) conformément au protocole ayant reçu l'approbation préalable du comité d'éthique du centre hospitalier universitaire Issad Hassani (Beni Messous, Alger) et du ministère de la santé. Tous les volontaires ont donné leur consentement par écrit avant de débiter l'étude.

### 2.4 Design de l'étude :

C'est une étude randomisée, ouverte, en chassé croisé avec deux séquences et deux périodes séparées par un wash out de 7 jours après administration d'une dose unique à jeun.

Au matin de chaque période et après 10h de jeun, les volontaires ont reçu une dose unique de valsartan 80 mg ( test ou référence) avec 200ml d'eau minérale . La prise d'aliment n'est pas permise Les sujets sont restés à jeun pendant les quatre (04) heures suivant la prise du médicament, des repas standardisés (déjeuner, collation et dîner) ont été servi à l'ensemble des volontaires. Le staff

médical du Centre hospitalier universitaire Ibn Badis (Constantine) ont contrôlé l'état de santé des volontaires le long de l'étude.

Le premier prélèvement a été effectué avant l'administration, les autres après 30', 1h, 1h30', 1h50', 2h10', 2h30', 2h50', 3h10', 3h30', 3h50', 4h10', 4h40', 5h10', 5h40', 6h40', 7h40', 9h40', 11h40', 13h40' et 24h après l'administration des médicaments.

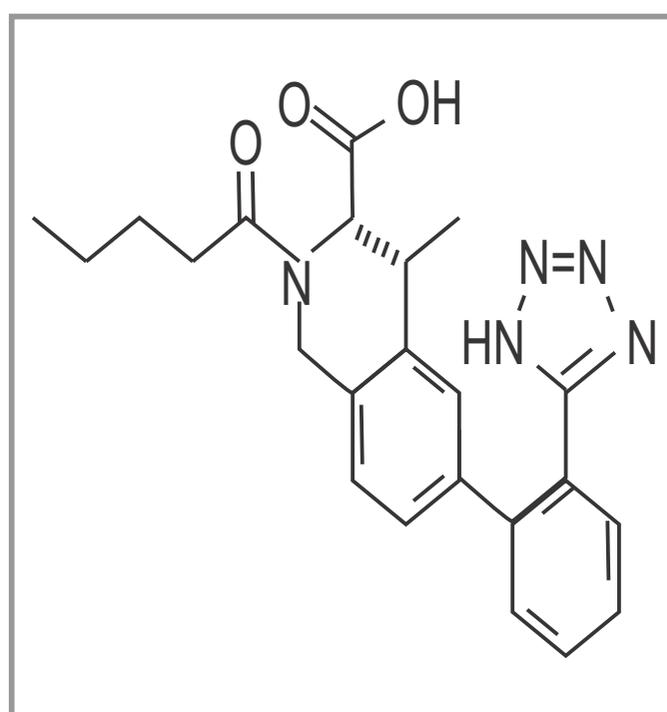
### 2.5 Les prélèvements sanguins :

Approximativement 04 ml de sang ont été prélevé à chaque volontaire par cathétérisme avant (0h) et à **30', 1h, 1h30', 1h50', 2h10', 2h30', 2h50', 3h10', 3h30', 3h50', 4h10', 4h40', 5h10', 5h40', 6h40', 7h40', 9h40', 11h40', 13h40' et 24h** après l'administration des médicaments. Les échantillons de sang ont été recueillis dans des tubes héparinés, ensuite ils ont été centrifugés à 3600 tr / min pendant 10 minutes à 20 ° C; le plasma a été séparé et congelé à -80 ° C au niveau de godets correctement étiquetés. Après une période de 7 jours, l'étude a été répétée de la même manière pour compléter le chassé croisé.

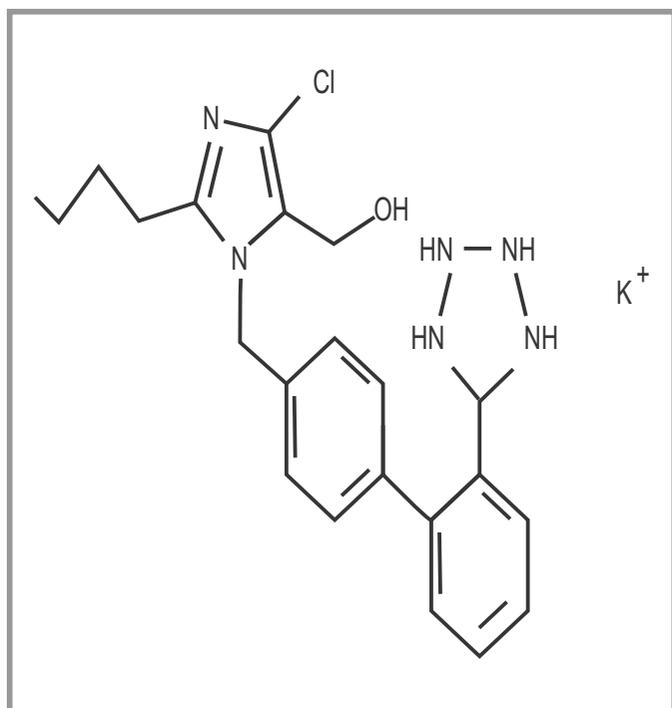
### 2.6 Optimisation des paramètres de la MS et des conditions chromatographiques

Une méthode LC-MS/MS a été développée et validée pour le dosage plasmatique du valsartan. Tous les solvants utilisés sont de grade HPLC, les autres réactifs et produits chimiques sont de grade analytique.

Le valsartan (hydrochloride) et le losartan (K<sup>+</sup>) (étalon interne) sont utilisés comme standards de référence (**Fig1**).



(A) Valsartan



(B) Losartan

**Fig 1 :** Les structures chimiques du valsartan *N*-pentanoyl-*N*-{[2-(1*H*-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]methyl}-L-valine et du losartan (1-((2'-(1*H*-tetrazol-5-yl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)-2-butyl-4-chloro-1*H*-imidazol-5-yl)methanol [8], [9].

Le système LC-MS/MS est constitué de : - HPLC Perkin Elmer SER200 qui contient un auto-injecteur SER200 et une pompe binaire (LC-200Q).

Spectromètre de masse AB sciex, 4000 qtrap triple quadrupole équipé d'une source type ESI.

Le logiciel Analyst 1.5.1 a été utilisé pour l'interprétation des résultats. La méthode a été développée en mode négatif par l'électrospray ionisation (source ESI), par infusion directe de solutions aqueuses de standards de référence ; valsartan et losartan ; concentrées à 0.1 µg/ml. Les ions de transitions  $m/z$  **434.1 179.2** et **421.1 127.1** ont été sélectionnés respectivement pour les MRM du valsartan et du losartan. Les paramètres de qualification et de quantifications des composés à l'étude ont été optimisés : Declustering potential -**75V** et -**85V**, entrance potential -**5V** et -**9V**, collision cell exit potential -**1V** et -**9V** et énergie de collision -**37V** et -**35V** pour le valsartan et le losartan respectivement. Les paramètres de la source ont été optimisés : Curtain gaz **30**, CAD : **Hight**. ion source gaz-1 : **60**, ion source gaz-2 : **60**, ion spray voltage : -**4500V** et la température : **650°C**. La séparation chromatographique a été effectuée en utilisant une colonne INNOVAL C18 (150\*4) mm, 5µm, 100 Å à 40°C, la phase mobile est constituée de l'acétonitrile grade HPLC et de 0.1% du tampon acide formique. La phase mobile a été éluée avec un

débit de 1.0ml/min en mode gradient comme indiqué dans le **tableau I**, le temps d'analyse est de 5min. Les temps de rétentions sont de 3.7min et 4.2min respectivement pour le losartan et le valsartan [10]. L'exploitation quantitative des données a été faite par mesure du ratio de l'air de l'étalon sur l'air de l'étalon interne en utilisant le logiciel Analyst 1.5.1. La méthode a été validée selon les lignes directrices internationales [11]. La méthode a été validée dans un intervalle de [50-5000] ng/ml avec une limite inférieure de quantification de 50ng/ml.

**Tableau I.** Mode Gradient

Temps (min)	Phase A (%)	Phase B (%)
0.0	80	20
0.5	80	20
2.5	05	95
4.8	05	95
5.0	80	20

## 2.7 Préparation de l'échantillon

L'échantillon a été préparé en ajoutant à 200µl d'échantillon de plasma, 200µl d'étalon interne ( Losartan à 5µg/ml), 100µl d'acide formique 1M et 200µl d'acétonitrile. Le mélange a été vortexé pendant 30s puis centrifugé à 10.000g pendant 10min. Le surnageant a été ensuite transféré dans une vial. 10µl de chaque échantillon ont été injectés dans la LC-MS/MS pour l'analyse.

La procédure décrite ci-dessus a été utilisée pour l'extraction des échantillons de la courbe de calibration, des échantillons de contrôles de qualité ainsi que des échantillons de volontaires.

## 2.8 analyse pharmacocinétique :

L'analyse pharmacocinétique a été réalisée à l'aide du logiciel « Kinética » version 4.4.1. La constante de vitesse d'élimination ( $k_e$ ) a été obtenue par régression log linéaire des concentrations plasmatiques de la phase terminale en fonction du temps sur une échelle semi-logarithmique. La demi-vie d'élimination ( $T_{1/2}$ ) a été calculée par l'équation  $0,693 / k_e$ . La surface sous la courbe des concentrations plasmatiques en fonction du temps  $SSC_{0-t}$  a été calculée par la méthode des trapèzes jusqu'au dernier prélèvement quantifié. La surface sous la courbe de la concentration plasmatique extrapolée à l'infini  $SSC_{0-\infty}$  est calculée à partir de  $SSC_{0-t} + C_t / k_e$ ,  $C_t$  est la dernière concentration quantifiable.

## 2.9 Analyse statistique

A fin de démontrer la bioéquivalence des deux médicaments

R et T, les  $SSC_{0-t}$ ,  $SSC_{0-\infty}$  et  $C_{max}$  sont considérés comme des variables primaires. ces derniers ont été évalués par l'analyse de variance ANOVA (via le logiciel kinetica 4.4.1) appliquée au chassé croisé et le calcul de l'intervalle de confiance à 90% du ratio test / référence (T / R) en utilisant les données log-transformées pour chaque paramètre. Les médicaments R et T seront considérés bio équivalents si la différence entre les deux paramètres comparés est trouvée statistiquement non significative ( $p \geq 0,05$ ) et que les intervalles de confiance à 90% de ces derniers soient entre 80% -125%

### 3 Résultats et discussion

L'ensemble des volontaires ont complété les deux périodes de l'étude sans aucune violation du protocole. Aucun événement indésirable n'a été reporté par les participants ou par les investigateurs cliniciens durant l'étude.

La relation entre la concentration et le ratio des aires des pics était linéaire dans l'intervalle de 50-5000ng/ml avec une LIQ de 50ng/ml. Comme indiqué dans le **tableau 2**, l'exactitude

intra jour de la méthode variait de 86.6% - 107.5% quand la précision intra jour de la méthode variait de 2.11 - 8.17% et l'exactitude inter jour de la méthode variait de 90.91 - 101.18% quand la précision inter jour de la méthode variait de 2.36-8.65%.

La reproductibilité du dosage plasmatique du valsartan augmente la sensibilité de la méthode, à cet effet, une procédure simple de précipitation des protéines utilisant l'acide formique 1M et l'acétonitrile a été appliquée avec succès pour l'extraction du valsartan du plasma humain. La méthode développée utilisant une technique de centrifugation offre les avantages d'une procédure de préparation d'échantillon simple et sécurisée sans effet matrice avec un bon rendement d'extraction qui reste un défi critique dans le développement des méthodes LC-MS/MS.

Les études de stabilités ont démontré que le valsartan est stable dans le plasma pendant 7 semaines quand il est conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Le temps d'analyse est de 5min, ceci est favorable pour une analyse d'échantillons à grande échelle

**Tableau 2:** Precision et exactitude du dosage du valsartan dans le plasma humain

Concentration ng/ml	Precision (CV%)		Exactitude (%)	
	Intra-jour	Inter-jour	Intra-jour	Inter-jour
50 (LIQ)	8.17	8.65	107.5	101.18
150	3.25	4.54	86.9	100.08
1000	2.11	6.37	88.2	90.91
3500	3.11	2.36	86.6	92.47
Moyenne± écart type	4.16±2.72	5.48±2.67	92.3±10.15	96.16±5.22

**LIQ= Limite inférieure de quantification .CV=coefficient de variation= ( écart type/ moyenne)\*100. Toutes les données ont été présentées comme des moyennes arithmétiques.**

Les deux formulations ont été rapidement absorbées par le tractus gastro-intestinal et le valsartan était quantifiable au premier temps de prélèvement (0,5 h) chez tous les

volontaires. des concentrations maximales de 3 105,33 ng / mL et 3 412 ng / mL ont été atteintes à 2.86 h et 2.476 h après l'administration des deux médicaments référence et test respectivement, puis les concentrations ont diminué et sont restées détectables jusqu'à 24 heures après l'administration. Le temps de demi-vie d'élimination était de 5,71 h et 5,61 h pour les deux formulations référence et test respectivement.



**Tableau 3 :** paramètres pharmacocinétiques du valsartan comprimés pelliculés sécables (moyenne arithmétique  $\pm$  écart type, n=15)

Paramètre pharmacocinétique	Test	Référence
$C_{max}$ (ng/ml)	3412 $\pm$ 1760,38	3105,33 $\pm$ 1442,89
$SSC_{0 \rightarrow t}$ (ng. h /ml)	17342,03 $\pm$ 8603,03	16791,59 $\pm$ 6967,44
$SSC_{0 \rightarrow \infty}$ (ng. h/ml)	18027,56 $\pm$ 9054	17455,67 $\pm$ 7482,67
$t_{max}$ (h)	2,47 $\pm$ 1,01	2,86 $\pm$ 1,27
$t_{1/2}$ (h)	5,61 $\pm$ 1,95	5,71 $\pm$ 1,50

Ces valeurs sont en accord avec les données bibliographiques. Le tableau 3 montre les paramètres pharmacocinétiques de valsartan calculées pour les deux médicaments.

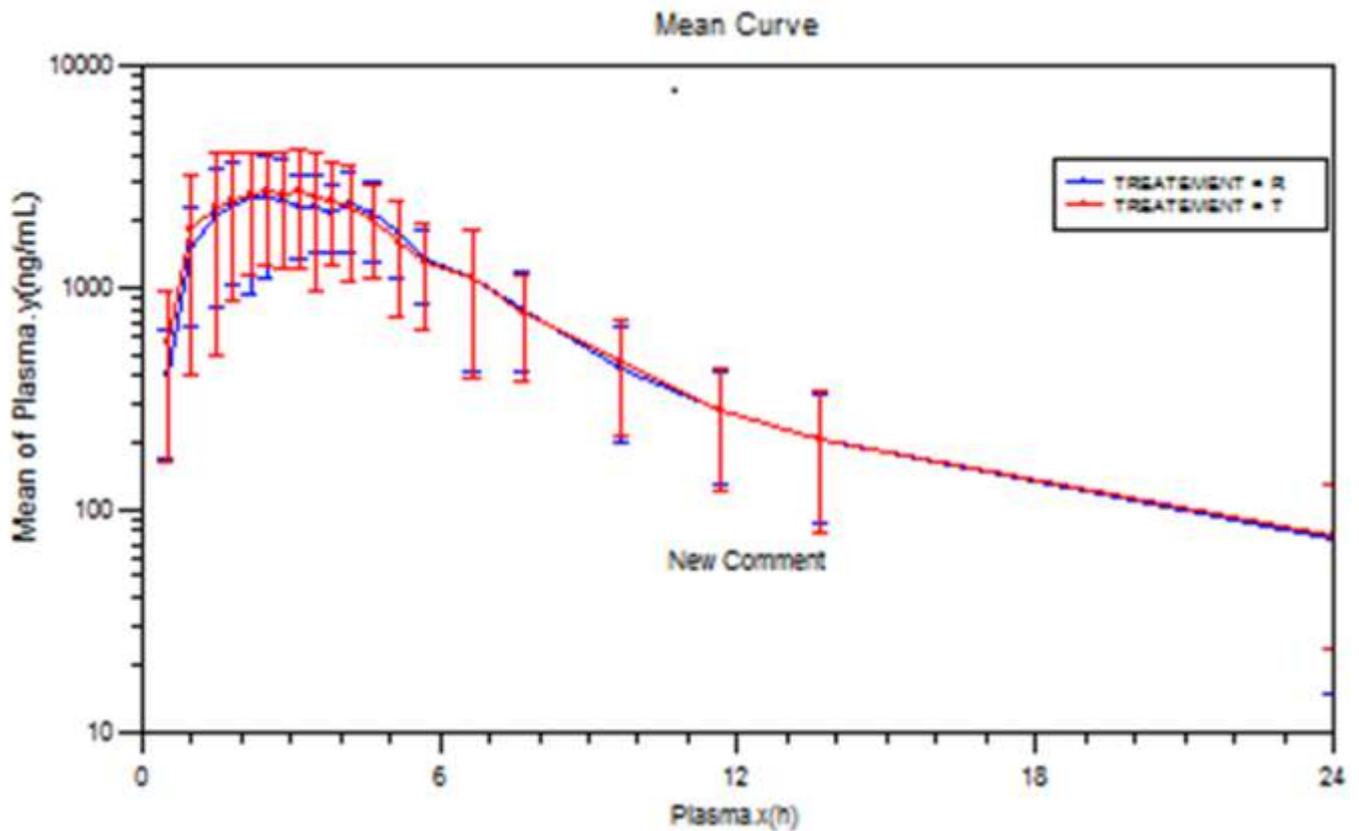
La biodisponibilité relative de la formulation test est de 100,958% pour  $SSC_{0 \rightarrow t}$  101,151 % pour  $SSC_{0 \rightarrow \infty}$ , and 108,72% pour  $C_{max}$ .

Les intervalles de confiance à 90 % calculés pour les  $SSC_{0 \rightarrow t}$ ,  $SSC_{0 \rightarrow \infty}$ , et la  $C_{max}$  sont le résultat du Test bi-unilatéral de Schuirmann, les résultats sont présentés au niveau du tableau 4

**Tableau 4:** évaluation statistique de la bioéquivalence après administration orale de 80 mg de valsartan de chaque formulation

	Moyenne géométrique $\pm$ SD		CI	$CV_{intra}$	t- test	
	Test	Reference			inférieur	supérieur
$AUC_{0-t}$ ( ng/ml.h)	9,66 $\pm$ 0,45	9,65 $\pm$ 0,40	[85,824%, 118,76%]	25, 51%	2,133	2,4619
$AUC_{0-\infty}$ ( ng/ml.h)	9,69 $\pm$ 0,45	9,68 $\pm$ 0,41	[86,098%, 118,83%]	25,30%	2,402	2,4716
$C_{max}$ (ng/ml)	7,84 $\pm$ 0,28	7,78 $\pm$ 0,26	[90,183%, 131,07%]	29,52%	1,3218	2,9059

Les courbes des concentrations plasmatiques moyennes des deux médicaments T et R en fonction du temps sont pratiquement identiques (**Fig. 2**) ce qui préjuge de leur même activité in vivo.



**Figure 3:** Courbes des moyennes arithmétiques des concentrations plasmatiques en fonction du temps après prise du valsartan test et référence (sur échelle semi-logarithmique)

Le ratio  $SSC_{0-t}/SSC_{0-\infty}$  pour les deux formulations est  $> 80\%$ , ceci démontre que le temps de prélèvement fixé est suffisant pour couvrir  $> 80\%$  de la pharmacocinétique du médicament.

Les moyennes et les écarts type des  $SSC_{0-t}$ ,  $SSC_{0-\infty}$ , et de la  $C_{max}$  ne diffèrent pas significativement entre les deux formulations, ceci suggère que les profils plasmatiques dus à la prise du valsartan test sont comparables à ceux dus à la prise du valsartan référence. L'analyse de la variance (ANOVA) de ces paramètres, après leur log-transformation démontre une différence statistiquement non significative des inférences statistiques (effet séquence, effet traitement et effet période) avec  $p \geq 0,05$ .

L'intervalle de confiance à  $90\%$  de la  $SSC_{0-t}$  et la  $SSC_{0-\infty}$  sont compris dans l'IC  $[80\%, 125\%]$  contrairement à celui de la  $C_{max}$  qui n'est pas inclus dans cet intervalle réglementaire. Dans cette étude, la variabilité intra-sujet des  $SSC_{0-t}$ ,  $SSC_{0-\infty}$  et de la  $C_{max}$  sont égales à  $25.51\%$ ,  $25.30\%$  et  $29.52\%$ , cette forte

variabilité concorde avec les valeurs retrouvées au sein de la bibliographie, il est clair que le nombre de sujet inclus dans cette étude est insuffisant pour démontrer la bioéquivalence. Le nombre de sujet nécessaire doit être proportionnel à la variabilité intra sujet

Le nombre de sujet nécessaire pour une puissance  $> 80\%$ , un risque d'erreur  $\alpha = 5\%$ , une forte variabilité intra individuelle ( $30\%$ ), et une différence de biodisponibilité réelle  $\leq 20\%$  est estimé à 52 sujets.

Afin de démontrer la forte variabilité intrasujet des deux formulations de valsartan et de minimiser le nombre de sujets inclus dans cette étude, il est recommandé de réaliser une étude à plan répliqué.

#### 4. conclusion :

Dans cette étude une méthode simple sélective et exacte ; de dosage du valsartan dans le plasma humain par LC-MS/MS ; a été développée et validée en mode ESI négatif. La méthode a prouvé sa performance selon les paramètres de validation testés. De plus cette méthode utilise une extraction par



précipitation des protéines et offre une bonne rentabilité de par son temps d'analyse court. Ceci approuve l'applicabilité de la méthode dans notre étude de bioéquivalence

Les résultats de l'analyse pharmacocinétique démontrent que les deux formulations test et référence du valsartan comprimé pelliculé sécable à 80 mg testées chez des volontaires algériens sains ne sont pas bioéquivalentes.

Cette étude pilote a permis d'évaluer la variabilité du valsartan. La forte variabilité intra sujet constatée a été précédemment rapportée dans des études ultérieures.

Il est nécessaire de réaliser une étude pivot avec un design d'étude et un nombre de sujet adéquats afin de palier à la variabilité intrasujet.

### References

- [1] Food and Drug Administration. 2003. Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products Center for Drug Evaluation and Research (CDER).
- [2] Siddiqui, N., et al. 2011. "Pharmacological and Pharmaceutical Profile of Valsartan: A Review." *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 1 (04): 12-9.
- [3] Mistry, N. B., Westheim, A., and Kjeldsen, S. 2006. "The Angiotensin Receptor Antagonist Valsartan: A Review of the Literature with a Focus on Clinical Trials Expert Opin." *Pharmacother* 7 (5): 575-81.
- [4] Flesch, G., Muller, P., and Lloyd, P. 1997. "Absolute Bioavailability and Pharmacokinetics of Valsartan: An Angiotensin II Receptor Antagonist in Man." *Eur J Clin Pharmacol*. 52: 115-20.
- [5] Aydam, M., and Takka, S. 2007. "Bioavailability File: Valsartan, FABAD." *J. Pharm. Sci.* 32: 185-96.
- [6] Diovan. 2007. East Hanover, NJ: Novartis Pharmaceuticals Corporation.
- [7] Sechaud, R., Graf, P., Bigler, H., et al. 2002. "Bioequivalence Study of a Valsartan Tablet and a Capsule Formulation after Single Dosing in Healthy Volunteers Using a Replicated Crossover Design." *Int J Clin Pharmacol Ther.* 40: 35-40.
- [8] Zaid, A. N., Cortesi, R., Qaddomi, R. A., and Khammash, S. 2011. "Formulation and Bioequivalence of Two Valsartan Tablets after a Single Oral Administration." *Sci Pharm.* 79 (1): 123-35.
- [9] Das, A. K., Dhanur, S., et al. 2015. "Human Bioequivalence Evaluation of Two Losartan Potassium Tablets under Fasting Conditions." *Indian J Pharm Sci.* 77 (2): 190-5.
- [10] Jangala, H., Vats, P., Khuroo, A. H., and Monif, T. 2014. "Development and Validation of a LC-MS/MS Method for the Simultaneous Estimation of Amlodipine and Valsartan in Human Plasma: Application to a Bioequivalence Study." *Sci Pharm.* 82 (3): 585-600.
- [11] Food and Drug Administration of the United States. 2001. "Guidance for Industry-Bioanalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM).
- [12] Devanshu, S., Rahul, M., Annu, G., Kishan, S., and Anroop, N. 2010. "Quantitative Bioanalysis by LC-MS/MS: A Review." *The Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 7 (01).
- [13] Kinetica, T. M. 2005. Version 4.4.1, Innaphase, User Manual.
- [14] Iqbal, M., et al. 2010. "Pharmacokinetics and Bioequivalence Study of Three Oral Formulations of Valsartan 160 mg: A Single-Dose, Randomized, Open-Label, Three-Period Crossover Comparison in Healthy Indian Male Volunteers." *Clinical Therapeutics* 32 (3): 589-96
- [15] Perez, M., Cardenas, W., et al. 2006. "A Comparative, Crossover, Double Blind, Randomized Study for Bioequivalence Assessment between Two Formulations of Valsartan Capsules vs. Tablets." *Revista Colombia Médica* 37: 114-20.
- [16] Mak, W. Y., Tan, S. S., Wong, J. W., et al. 2015. "Bioequivalence Study of Two Valsartan 160 mg Formulations: An Open-label, Randomised-sequence, Single-dose, Two-way Crossover Study in Healthy Volunteers under Fasting Conditions." *J Bioequiv Availab* 7: 179-83.
- [17] Schuirmann, D. J. 1987. "Pharmacometrics: A Comparison of the Two One-Sided Tests Procedure and the Power Approach for Assessing the Equivalence of Average Bioavailability." *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 15 (6): 657-81.
- [18] Hari, M., et al. 2013. "An Overview of Bioavailability and Bioequivalence Study in Human Subjects." *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science Research* 3 (2): 79-87.
- [19] Se'chaud, R., and Graf, P., et al. 2002. "Bioequivalence Study of a Valsartan Tablet and a Capsule Formulation after Single Dosing in Healthy Volunteers Using A Replicated Crossover Design." *Int J Clin Pharmacol Ther* 40: 35-40

