

158



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR EXTRACTO DE CENTELLA ASIATICA EN OVULOS QUE TAMBIEN CONTIENEN NITROFURAZONA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

VILLAGRAN RAMIREZ MARIA DE LOURDES

297363



MEXICO, D.F.

EXAMENADO POR COMISIÓN DE EXAMINADORES FACULTAD DE QUIMICA

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

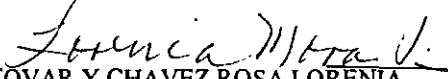
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

Jurado asignado:

Presidente	Profa. CARRERA GARCIA ISaura LUISA.
Vocal	Profa. MORA-TOVAR Y CHAVEZ ROSA LORENIA.
Secretario	Profa. AYALA MONDRAGON CONSUELO.
1er. Suplente	Profa. GONZALEZ MONZON NORMA TRINIDAD.
2o. Suplente	Profa. MAYA RUIZ GEORGINA MARGARITA.

Sitio donde se desarrolló el tema:  
SANOFI WINTHROP S.A. DE C.V.

Asesor del tema:   
Q.F.B. MORA-TOVAR Y CHAVEZ ROSA LORENIA.

Supervisor técnico:   
Q.F.B. BUENTELLO RODRIGUEZ MARIA TERESA.

Sustentante:   
VILLAGRAN RAMIREZ MARIA DE LOURDES.

## DEDICATORIAS

A Dios: por ser el poder supremo que todo lo permite.

A mi mamá: Muy en especial a ella, por ser una mujer extraordinaria que me ha servido de ejemplo y guía, brindandome su apoyo y fortaleza en los momentos difíciles, sin su ayuda no hubiera sido posible el vivir este momento.

A mi hijo Carlos Francisco: Por ser la razón de mi existir, la alegría y la fuerza que me hace vivir día a día.

A mi Papá

A mi esposo: Por ser la persona con la que pienso llegar al final de mi vida con comprensión, amor y apoyo incondicional.

A mis hermanas: Gaby, Rosi, Ruth y Lilia.

A la Familia Vela Villagrán.

A la familia Rodríguez Villagrán.

A mis sobrinos José Angel y Fernando: Para que de algún modo entiendan que los sueños se puedan realizar.

A los que ya no están conmigo: Mis abuelitos, Hildita y Doña Pola.

A todos mis amigos que de alguna manera contribuyeron a la culminación de este trabajo.

Deseo agradecer muy en especial a todas las maestras del Departamento de Control Analítico por su gran apoyo y entusiasmo: Lore, Tere, Gina, Isaura, Chelo.

A la facultad de Química mi más profundo agradecimiento.

## INDICE

<b>CAPITULO I.- INTRODUCCION</b> .....	1
<b>CAPITULO II.- OBJETIVO</b> .....	2
<b>CAPITULO III.- GENERALIDADES</b>	
<b>1.- Propiedades Físicoquímicas, métodos de identificación y de valoración y propiedades farmacológicas del Extracto de Centella Asiática.</b>	
1.1.- Origen botánico .....	3
1.2.- Composición y nombres genéricos .....	3
1.3.- Nombres químicos y masas moleculares .....	3
1.4.- Fórmulas desarrolladas .....	3
1.5.- Descripción del Extracto de Centella Asiática .....	4
1.6.- Solubilidad .....	4
1.7.- Identificación .....	4
1.8.- Método de valoración	
1.8.1.- Valoración de asiaticósido .....	5
1.8.2.- Valoración de ácido madecásico y ácido asiático .....	5
1.9.- Farmacocinética y Farmacodinamia en humanos .....	6
1.10.- Indicaciones terapéuticas de óvulos que contienen Extracto de Centella Asiática y Nitrofurazona .....	6
1.11.- Contraindicaciones .....	6
1.12.- Precauciones y restricciones de uso durante el embarazo y la lactancia .....	6
1.13.- Reacciones secundarias y adversas .....	7
<b>2.-Cromatografía</b>	
2.1.- Definición .....	8
2.2.- Clasificación de la Cromatografía .....	8
2.3.- Mecanismos de Separación en Cromatografía Líquida	
2.3.1.- Cromatografía Líquido-Líquido .....	8
2.3.2.- Cromatografía Líquido-Sólido .....	10
2.3.3.- Cromatografía de fases estacionarias químicamente unidas .....	10
a) Cromatografía de fase inversa .....	11
b) Cromatografía de fase normal .....	12
2.3.4.- Cromatografía de iones .....	13
2.3.5.- Cromatografía de pares de iones .....	13
2.4.- Conceptos básicos: principales parámetros cromatográficos	
2.4.1 Parámetros de la retención.	
a) Tiempo de retención .....	14
b) Volumen de retención .....	14
c) Volumen muerto .....	14

d) Tiempo de retención corregido .....	14
e) Factor de capacidad .....	15
f) Factor de selectividad .....	15

#### 2.4.2 Parámetros de la eficiencia cromatográfica

a) Número de platos teóricos .....	15
b) Altura del plato teórico .....	15
c) Resolución .....	16
d) Fenómeno del ensanchamiento de banda .....	16

### 3.- Componentes de un sistema CLAR

3.1.- Bomba cromatográfica y gradiente de elución .....	17
3.2.- Inyector .....	19
3.3.- Detector .....	19
3.4.- Columna cromatográfica .....	21
3.5.- Sistema de recolección de datos .....	23
3.6.- Conexiones y accesorios .....	23

### 4.- Validación de métodos analíticos

4.1.- Validación de métodos analíticos .....	24
4.2.- Especificidad .....	24
4.3.- Linealidad .....	25
4.3.1.- Linealidad del sistema .....	26
4.3.2.- Linealidad del método .....	26
4.4.- Precisión .....	29
4.4.1.- Repetibilidad del sistema .....	29
4.4.2.- Repetibilidad del método .....	30
4.4.3.- Reproducibilidad del método .....	30
4.5.- Exactitud .....	32
4.6.- Estabilidad de la muestra analítica .....	33
4.7.- Tolerancia del método .....	34

## CAPITULO IV.- PARTE EXPERIMENTAL

Formulación .....	35
1.- Desarrollo del método .....	35
2.- Descripción del método .....	38
3.- Validación del método	
3.1.- Especificidad	
3.1.1.- Especificidad del método indicativo de control de calidad .....	40
3.1.2.- Especificidad del método indicativo de estabilidad .....	40
3.2.- Linealidad del sistema .....	40
3.3.- Repetibilidad del sistema .....	40
3.4.- Linealidad del método .....	41

3.5.- Exactitud del método .....	41
3.6.- Precisión del método .....	
3.6.1.- Repetibilidad del método .....	41
3.6.2.- Reproducibilidad del método .....	41
3.7.- Estabilidad de la muestra analítica .....	41
3.8.- Tolerancia del método .....	41

## **CAPITULO V.- RESULTADOS**

1 - Especificidad	
1.1.- Especificidad del método indicativo de control de calidad .....	42
1.2.- Especificidad del método indicativo de estabilidad .....	42
2.- Linealidad del sistema .....	43
3.- Repetibilidad del sistema .....	57
4.- Linealidad del método .....	57
5.- Exactitud del método .....	60
6.- Precisión del método	
6.1.- Repetibilidad del método .....	61
6.2.- Reproducibilidad del método .....	61
7.- Estabilidad de la muestra analítica .....	63
8.- Tolerancia del método .....	64

<b>CAPITULO VI.- CONCLUSIONES</b> .....	65
---	----

<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	67
---	----

## I. INTRODUCCION

La Centella Asiática es una planta de la familia de las Umbelíferas que crece espontáneamente en la isla de Madagascar; desde tiempos inmemoriales ha sido utilizada en la medicina tradicional por su propiedad de favorecer el tiempo y la calidad de cicatrización.

Comercialmente se dispone en la actualidad del Extracto de Centella Asiática, que ha sido formulado en diferentes formas farmacéuticas, tales como tabletas, ungüento, polvo y óvulos.

El Extracto de Centella Asiática contiene los constituyentes triterpénicos de la planta, los cuales son el ácido asiático, ácido madecásico y el asiaticósido.

En este trabajo, se presenta el desarrollo y validación de un método analítico para cuantificar el Extracto de Centella Asiática en óvulos que además contienen Nitrofurazona.

La metodología analítica que actualmente se utiliza para evaluar el contenido del ingrediente activo consta de dos fases: por un lado se cuantifica el Asiaticósido, disolviéndolo en ácido acético y realizando una reacción colorimétrica con antrona, y por otro lado, se efectúa la cuantificación del Acido Asiático y del Acido Madecásico, mediante una titulación en medio no acuoso con Hidróxido de tetrabutilamonio.

La metodología tiene varios inconvenientes: tiempos de análisis largos y problemas con la reproducibilidad de los resultados analíticos.

Por tal motivo se decidió desarrollar un método utilizando la Cromatografía Líquida de Alta Resolución para obtener resultados confiables con mayor rapidez.

Por las características químicas de los componentes del Extracto de Centella Asiática, se propuso emplear la cromatografía en fase reversa, en la que los componentes lipofílicos tendrán mayor afinidad por la columna, mientras que los componentes hidrofílicos son eluidos más rápidamente por su afinidad con la fase móvil.

Sin embargo, debido a que los ácidos del Extracto de Centella tienen una estructura química casi idéntica, sus propiedades fisicoquímicas también lo son, lo que complica la separación. En estos casos, se recomienda realizar un gradiente con la fase móvil, de tal manera que al inicio de la corrida cromatográfica se tenga mucha polaridad con una proporción mayor del componente acuoso, y ésta disminuya al aumentar la proporción de componente orgánico, incrementando así la fuerza de elución. De esta manera, se logra además, reducir tiempos de análisis, aumentar la separación cromatográfica, mejorar la forma de los picos y favorecer la limpieza de la columna.

Se llevó a cabo el desarrollo del método empleando un gradiente de acetonitrilo y agua como fase móvil, el cual se utilizó en las proporciones y tiempos que se determinaron. Se empleó una columna C<sub>18</sub> y se establecieron las condiciones requeridas para el análisis.

Posteriormente se procedió a la validación del método analítico propuesto.



## **II. OBJETIVO**

Desarrollar un método analítico indicativo de control de calidad, para cuantificar los componentes del Extracto de Centella Asiatica, en óvulos que también contienen nitrofurazona, utilizando la Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Evaluar si el método desarrollado es indicativo de estabilidad.

Validar el método analítico evaluando los siguientes parámetros:

Para sistema:

- Linealidad
- Repetibilidad

Para método:

- Especificidad
- Linealidad
- Exactitud
- Precisión evaluada como repetibilidad y reproducibilidad
- Estabilidad de la muestra analítica.
- Tolerancia

### III. GENERALIDADES.

#### 1.-PROPIEDADES FISICOQUIMICAS, METODOS DE IDENTIFICACION Y DE VALORACION,PROPIEDADES FARMACOLOGICAS DEL EXTRACTO DE CENTELLA ASIATICA.

##### 1.1.- Origen Botánico.<sup>1</sup>

Es el extracto obtenido de la Centella Asiática, planta de la familia de las umbelíferas, tribu de los hidrocotileos que crece espontáneamente en las regiones de Asia meridional, rodeando el Océano Indico, y en particular en la isla de Madagascar.

##### 1.2.- Composición y Nombres Genéricos.

El Extracto titulado de Centella Asiática (ETCA) contiene respectivamente (en peso): Acido Asiático: 30 %,Acido Madecásico: 30 %, Asiaticósido: 40 %.

##### 1.3.- Nombres Químicos y Masas Moleculares.<sup>2</sup>

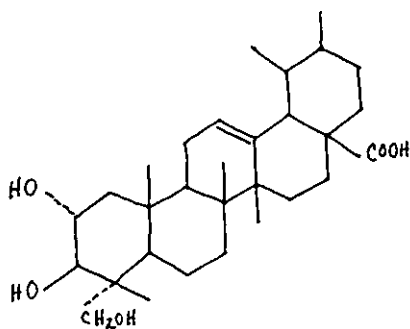
Acido Asiático: ácido 2 alfa, 3 beta, 23-trihidroxi-ursa-12-eno-28-oico. MM:488.

Acido Madecásico: ácido 2 alfa, 3 beta, 6 beta, 23-tetrahidroxi-ursa-12-eno-28-oico. MM: 504.

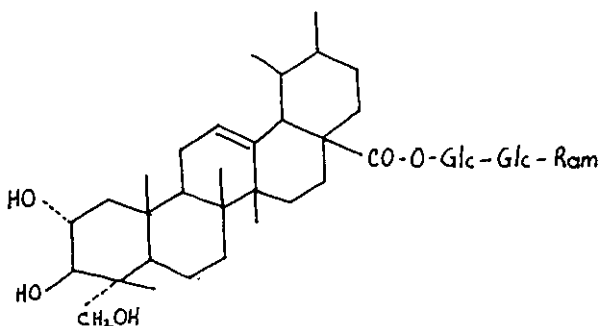
Asiaticósido: 1 asiatato de O-alfa-L-ramnopiranosil-(1-4)-O-beta-D-glucopiranosil-(1-6)-O-beta-D-glucopiranosilo. MM: 958.

##### 1.4.- Fórmulas Desarrolladas.

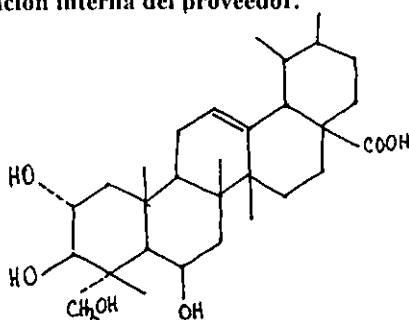
Acido Asiático:



Asiaticósido:



Acido Madecásico: \* Información interna del proveedor.



### 1.5.- Descripción del Extracto de Centella Asiática.

Polvo blanco-crema, con olor característico, ligeramente amargo.

### 1.6.- Solubilidad.

Metanol .....muy soluble.  
Propilenglicol.....muy soluble.  
Etanol.....poco soluble.  
Agua.....prácticamente insoluble.

### 1.7.- Identificación.

#### Cromatografía en capa fina

Fase estacionaria:  
Placas de Silicagel G (0.3 mm de grosor).

Fase móvil:  
n-Butanol.....60 mL.  
Etanol.....40 mL.  
Hidróxido de amonio..... 5 mL.  
Agua..... 10 mL.

Reactivo revelador:  
Acido sulfúrico 20 % v/v..... 100 mL.  
Etanol..... 50 mL  
Hipoclorito de sodio 20 % v/v..... 30 mL

Concentración de la solución de Referencia:

Asiaticósido: 3 mg/mL.  
Acido Madecásico: 5 mg/mL.  
Acido Asiático: 5 mg/mL.  
Concentración de la solución problema: 10 mg/mL.  
Todas las soluciones se disuelven en Metanol R.A.  
Volumen de inyección: 5 µL.

Resultado:

El cromatograma obtenido con la solución problema debe presentar 3 manchas cuyo color y Rf corresponden a los obtenidos por las soluciones de referencia.

	Rf APROXIMADO	COLOR
Asiaticósido	0.25	Morado
Acido Madecásico	0.60	Malva
Acido Asiático	0.75	Café

### 1.8.- Método de Valoración.

#### 1.8.1.- Valoración del Asiaticósido.

Se realiza mediante la valoración espectrofotométrica del compuesto formado en la reacción de la fracción osídica de la molécula con antrona en ácido sulfúrico.

Se preparan por triplicado solución blanco, solución de referencia de Extracto de Centella Asiática y solución de la muestra en ácido acético glacial, a concentraciones especificadas.

Una alícuota de estas soluciones se hace reaccionar con antrona disuelta en ácido sulfúrico, a temperaturas y tiempos controlados. Se determina la absorbancia a 620 nm en celdas de 1 cm, utilizando agua como blanco.

Se realizan los cálculos necesarios para obtener la proporción de asiaticósido con relación al producto seco.

#### 1.8.2.- Valoración de Acido Madecásico y Acido Asiático.

Se realiza mediante valoración potenciométrica en medio no acuoso.

#### Reactivos

-Metanol R.A.

-Solución valorada de Hidróxido de tetrabutilamonio 0.1 N en 2-propanol.

#### Equipo

Titulador automático Mettler DL 40, provisto de un electrodo de vidrio EA 109 y de un electrodo de referencia EA 427.

#### Procedimiento.

Transferir alrededor de 0.30 g exactamente pesados de Extracto de Centella, al vaso del titulador que contenga 60 mL de metanol, agitar hasta disolver.

Titular con la solución valorada de Hidróxido de tetrabutilamonio, burbujeando nitrógeno durante la titulación.

Realizar la titulación de un blanco con los mismos reactivos y bajo las mismas condiciones de prueba.

## Cálculos

Emplear la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Acido Asiático y Acido Madecásico} = (v-v') * N * 0.496 * \frac{100}{p}$$

En donde:

v= mililitros de solución titulante empleada en la muestra.

v'= mililitros de solución titulante empleada en el blanco.

N= normalidad de la solución de Hidróxido de tetrabutilamonio.

p= peso de muestra BS de extracto de Centella expresado en gramos.

0.496 = miliequivalente químico, expresado en gramos, correspondiente al promedio de pesos equivalentes de ácido asiático y ácido madecásico.

### 1.9.- Farmacocinética y Farmacodinamia en humanos.<sup>18</sup>

El extracto titulado de Centella Asiática posee una acción de estimulación sobre la biosíntesis del colágeno por los fibroblastos, contribuyendo a una mejor troficidad del tejido conjuntivo, actuando como factor regularizante a nivel del tejido conjuntivo cicatricial. Por intermedio de los fibroblastos, controla la formación de fibras colágenas cuando la regeneración celular se encuentra perturbada, deficiente, excesiva o desorganizada.

El Asiaticósido actúa sobre la síntesis de las proteínas conjuntivas y especialmente sobre la integración por los Ácidos Ribonucleicos matriciales de la alanina y de la prolina que representan el 40 % de los aminoácidos de las fibras conjuntivas.

La penetración de los ácidos Madecásico y Asiático trititados, asociados al Extracto de Centella Asiática, es importante y rápida para las formas tópicas.

La radiactividad del tejido celular subcutáneo llega al máximo después de 1 a 3 horas del depósito, en el curso de las horas siguientes, la penetración es menos intensa pero no despreciable.

Comparativamente las tasas de radiactividad presentes en el tejido celular subcutáneo después de la administración oral son considerablemente menores, es decir las formas tópicas son capaces de ejercer rápidamente efectos locales.

### 1.10.- Indicaciones terapéuticas de óvulos que contienen Extracto de Centella Asiática y Nitrofurazona.

Restaurador del epitelio y antiséptico vaginal.

Vaginitis por bacterias susceptibles, úlceras del cérvix, de las cuales se haya determinado su origen, ectoprión, electrofulguraciones.

### 1.11.- Contraindicaciones.

Hipersensibilidad conocida para alguno de los componentes de la fórmula.

### 1.12.- Precauciones y restricciones de uso durante el embarazo y la lactancia.

Por su empleo local y la casi nula absorción a la circulación sistémica, a criterio del médico puede ser utilizado durante el embarazo y la lactancia.

### **1.13.- Reacciones secundarias y adversas.**

Han sido reportados algunos casos, poco frecuentes, de reacciones locales: prurito, ardor, dermatitis medicamentosa; Estas reacciones se controlan al suspender la administración del medicamento.

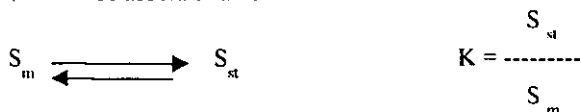
## 2.- CROMATOGRAFIA

### 2.1.- Definición

La cromatografía es una técnica que permite separar, aislar e identificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos.<sup>4,5,6,7,8,9</sup>

En la cromatografía de líquidos de alta resolución como en todos los otros métodos cromatográficos, las separaciones están basadas en la diferencia de distribución de las especies entre dos fases no miscibles, una estacionaria (sólido o líquido impregnado sobre un soporte) y una móvil (disolvente o mezcla de disolventes). La fase estacionaria se encuentra empacada en una columna a través de la cual, se hace fluir en forma continua, la fase móvil.

La distribución de cada soluto en un sistema cromatográfico dado, está representada por un equilibrio, al cual se asocia una constante característica denominada Coeficiente de Distribución:



donde los subíndices "st" y "m" representan la fase estacionaria y la fase móvil respectivamente.

Si los diferentes componentes de una mezcla poseen coeficientes de distribución diferentes, su velocidad de migración a lo largo del sistema será diferente y podrán separarse. Debido a que los solutos sólo migran cuando se encuentran en la fase móvil, aquellos que tengan mayor afinidad por la fase estacionaria, interaccionarán más fuertemente con ella, tendrán un coeficiente de distribución mayor y viajarán más lentamente. Por el contrario, los solutos que se distribuyen principalmente en la fase móvil aparecerán en el efluente de la columna rápidamente.

### 2.2.- Clasificación de la cromatografía.

De acuerdo con la naturaleza de las fases involucradas y con los mecanismos de separación, es posible distinguir diferentes tipos de cromatografía sin embargo trataremos sólo la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), porque es la técnica utilizada en este trabajo.

En la CLAR se agrupan diferentes técnicas de separación tal como se muestra en la figura No. 1<sup>4,10</sup>

### 2.3.- Mecanismos de separación en cromatografía líquida.

#### 2.3.1.- Cromatografía Líquido-líquido.<sup>4,5,6,7,9</sup>

Este tipo de cromatografía se refiere al proceso cromatográfico que se realiza sobre una fase estacionaria líquida, impregnada en un soporte poroso, idealmente inerte y utilizando una fase móvil constituida por otro líquido no miscible con el primero. Es decir que el proceso es prácticamente idéntico al de extracción líquido-líquido.

Para que la solubilidad mutua de las fases fuera lo más débil posible, se escoge una de las fases polar y la otra apolar o poco polar. Es así como aparecieron dos formas distintas de cromatografía líquido-líquido:

-Cromatografía en fase "normal" en donde la fase estacionaria es polar y la fase móvil apolar.

-Cromatografía de fase "inversa", donde la fase estacionaria es apolar y la fase móvil polar.

El mecanismo de separación se basa en la distinta solubilidad que presenta una molécula entre la fase móvil y en la fase estacionaria.

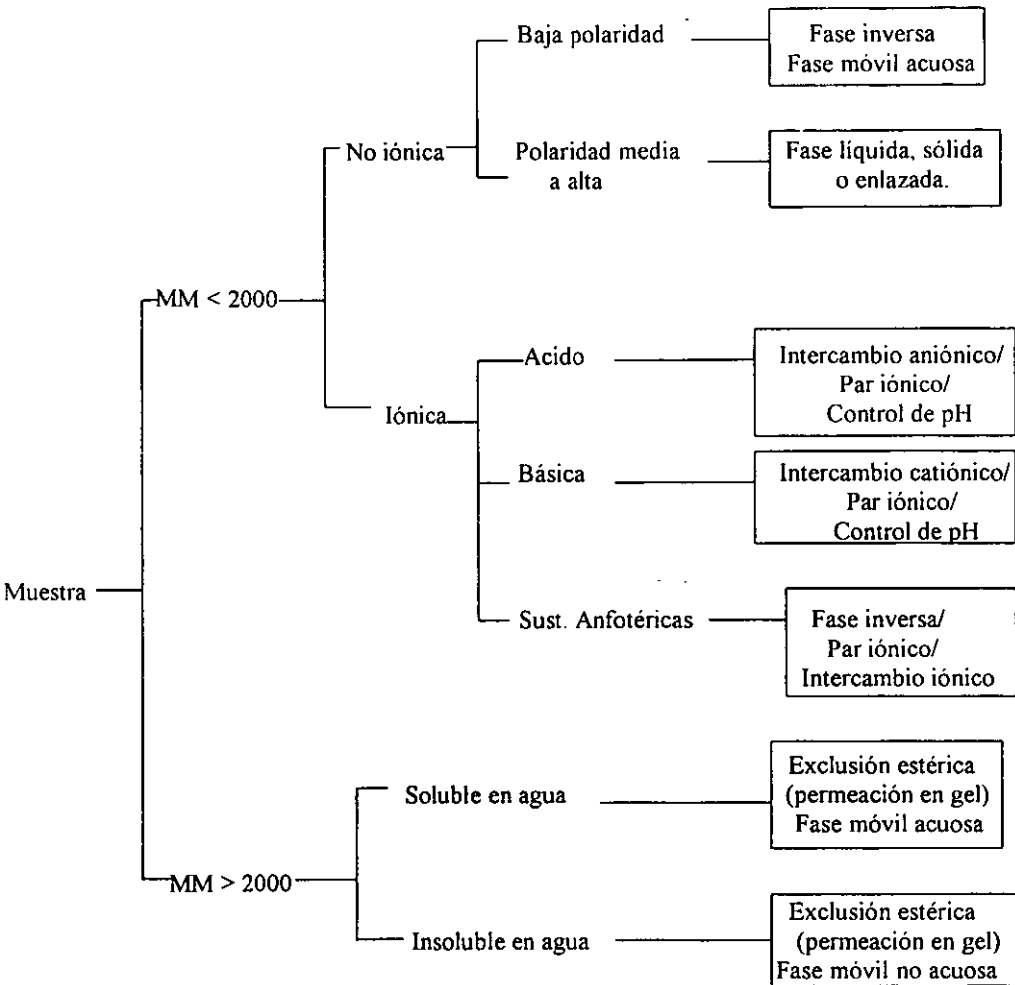


Figura No. 1 Guía para la selección de técnicas de cromatografía líquida.



Aunque este tipo de cromatografía haya permitido excelentes separaciones, presenta el problema de la estabilidad de la fase estacionaria que, poco a poco es arrastrada por la fase móvil, aún si se toma la precaución de saturarla previamente con la fase estacionaria. Debido a lo anterior, la cromatografía Líquido-Líquido no suele ser muy empleada.

### 2.3.2.- Cromatografía Líquido-Sólido.

En este tipo de Cromatografía se utilizan como adsorbentes, sólidos porosos de alta superficie específica y en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), se usa casi exclusivamente la sílice, que está constituida por una red tridimensional de enlaces siloxano ( Si-O-Si ) con grupos silanol ( Si-OH ) de superficie.

El mecanismo de separación es el siguiente: Los grupos silanol de superficie son los principales responsables de la adsorción de los solutos. Las interacciones serán más fuertes con los solutos más polares y en particular con los solutos que pueden formar puente de Hidrógeno ( y todavía más con las aminas debido a la interacción ácido-base con el silanol ).

La fase estacionaria corresponde a la capa monomolecular en la superficie del adsorbente, las moléculas de soluto y de eluente van a competir para fijarse en esta capa.

Los solutos de mayor polaridad tendrán la mayor retención, de la misma manera que el aumento de polaridad del eluente producirá una disminución de la retención.

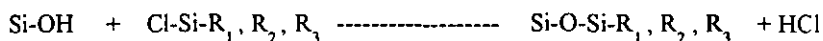
Uno de los disolventes de mayor fuerza eluente es el agua debido a su habilidad para formar puentes H con los silanoles de superficie. La cantidad de agua adsorbida en la superficie del adsorbente, corresponde a la actividad de la sílice, una actividad alta se debe a una cantidad baja de agua adsorbida y corresponde entonces a una retención mayor de los solutos.

Para eluentes polares, que contienen mayores cantidades de agua, el equilibrio se puede alcanzar rápidamente, pero para disolventes no polares, puede ser necesario esperar varios días para alcanzarlo. Mientras que se está equilibrando la fase estacionaria, se observa un cambio continuo de la retención de los solutos, que impide un uso correcto de la columna. La obtención de resultados precisos, es entonces difícil, cuando se emplean disolventes no polares.

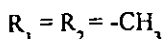
Esta dificultad experimental explica por qué, aunque la sílice permita lograr excelente selectividad y eficiencia para moléculas orgánicas no polares y de polaridad intermedia, se prefiere en la actualidad reemplazar los métodos inicialmente desarrollados con esta fase, por métodos en los que se utilizan fases químicamente unidas ( fase normal o fase inversa ), que no presentan problema de actividad.

### 2.3.3.- Cromatografía de fases estacionarias químicamente unidas.

Estas fases se obtienen por silanización de los grupos silanol de la sílice, por un cloro o un etoxi silano, conteniendo la función química deseada según la siguiente reacción:



En general:



$R_1$  = cadena conteniendo la función química deseada.

Cuando se introduce un grupo no polar (  $C_1$ ,  $C_6$ ,  $C_8$ ,  $C_{18}$ , fenil o ciclohexil por ejemplo ), se usa un clorosilano y se obtiene una fase estacionaria tipo fase inversa.

Cuando se introduce un grupo polar ( NO, NH, CN, diol, sulfonato, amonio cuaternario, etc...), se usa en general un metoxi o etoxi silano ( en lugar del cloro ) y se obtiene una fase estacionaria tipo fase normal.

Las fases estacionarias químicamente unidas presentan muchas ventajas:

- Buena estabilidad química,
- Desaparición del problema de la actividad de la sílice.
- Grandes posibilidades de polaridades compatibles con todos los disolventes.

Aún con una tasa de unión máxima, es imposible por razones estéricas, hacer reaccionar todos los grupos silanol de superficie que pueden ser accesibles a los solutos . Por esas razones, la mayor parte de las sílices insertadas ( principalmente la fase inversa ) recibe un tratamiento complementario con trimetilclorosilano ( o hexametildisilazano HMDS ), la cual es una molécula más pequeña que permite completar el recubrimiento. Dicho tratamiento permite reducir de manera importante la posibilidad de acceso del soluto a la superficie pero no totalmente, lo que es importante para explicar el mecanismo de retención en ciertos casos.

#### a) Cromatografía de fase inversa.

Con fases estacionarias modificadas con una función no polar, se usa en general como fase móvil una mezcla de agua con disolvente orgánico polar ( metanol, acetonitrilo, isopropanol, tetrahidrofurano, dioxano, etc...). La retención en este tipo de cromatografía, está regida por el efecto hidrofóbico que se puede explicar de la siguiente manera:

- Una molécula no polar o poco polar tiene más repulsión que atracción por el agua,
- Las cadenas hidrocarbonadas de la fase estacionaria también tienen una repulsión con respecto a la fase móvil ( fases no miscibles ).

De estos estados de repulsión, resulta que si la molécula de soluto se fija en la superficie de las cadenas hidrocarbonadas, la superficie de contacto global cadena+soluta con respecto a la fase móvil acuosa va a disminuir, lo que baja el estado de repulsión y conduce a un estado energético menor.

La retención se explica entonces por un estado de "menor repulsión" y no por un estado de mayor interacción en la fase estacionaria .

El mecanismo exacto de la retención en fase inversa todavía no se conoce de manera precisa y es probable que, además, el disolvente orgánico se adsorba en la superficie de la fase estacionaria ( también por efecto hidrofóbico ) para formar una pseudo fase líquida en la cual se disuelve o se adsorbe el soluto.

Para esos dos mecanismos, las reglas generales que rigen la retención son muy parecidas y se pueden resumir de la siguiente manera:

- La retención del soluto aumenta cuando la parte no polar de su molécula aumenta y disminuye

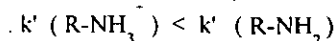
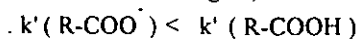
cuando su polaridad aumenta :

- . molécula con más carbonos :  $k'$  aumenta.
- . molécula con más funciones polares :  $k'$  disminuye.

-El aumento de concentración del disolvente orgánico en la fase móvil hace bajar la retención del soluto ( menos efecto hidrofóbico y mayor solubilidad del soluto en la fase móvil ).

-Para un mismo eluente, la retención es mayor cuando la fase estacionaria contiene más cadenas hidrocarbonadas ( mayor capacidad y/o mayor efecto hidrofóbico ), ésto permite explicar las diferencias entre fases comerciales.

-Una molécula ionizada tiene una retención menor que su forma neutra ( mayor solubilidad de la forma ionizada en agua ) :



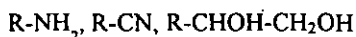
Esto explica la importancia de la regulación del pH del eluente.

Resulta de las propiedades de la fase inversa que las moléculas muy polares o ionizadas no deberían tener retención en este sistema ( suponiendo que no se usa la técnica de pares de iones ). Sin embargo, se observa experimentalmente que muchas moléculas ( principios activos con funciones amina, vitaminas, moléculas biológicas, etc...), experimentan retenciones mucho mayores a lo que podría esperarse del mecanismo de fase inversa. Esto se debe a la interacción de esas moléculas con la matriz de sílice de la fase estacionaria y en particular con los grupos silanol residuales, de tal manera que se notan grandes variaciones de retención de una fase a otra y eventualmente de una columna a otra de la misma fase. Para esos casos, la situación puede mejorarse de diversas maneras:

- Seleccionando un pH adecuado,
- utilizando reactivos de pares de iones,
- utilizando una fase estacionaria con mayor tasa de carbón,
- utilizando una fase estacionaria sin matriz de sílice, por ejemplo de poliestireno.

## b) Cromatografía de fase normal.

Las funciones químicas más utilizadas son:



Esas fases permiten trabajar con las nuevas posibilidades de selectividad ofrecidas por las funciones químicas introducidas sin los problemas de actividad de la sílice, ( son sílices desactivadas ).

Además, las funciones químicas se introducen mediante una cadena carbonada corta ( en general  $C_3$  ) que las separa del átomo de silicio.

Esto implica que es posible tener también el sistema de fase inversa con estas fases, utilizando un eluente agua-solvente polar.

Las columnas de fase normal son también muy estables y presentan posibilidades de selectividad muy amplias por la superposición de los mecanismos que las rigen.

### 2.3.4 Cromatografía de Iones.

Los campos principales de aplicación de esta técnica son en las áreas de los productos inorgánicos (aniones y cationes minerales) y sobre todo la Bioquímica. Para los cationes minerales, las técnicas espectroscópicas tales como absorción atómica y emisión, son mucho más utilizadas, pero, para los aniones minerales, la cromatografía de líquidos sigue teniendo mucha aceptación.

Sin embargo, la aplicación más importante de la cromatografía de iones se encuentra en el campo de la Bioquímica en donde aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, bases púricas y pirimidínicas, etc., son iónicos y sensibles a la temperatura.

### 2.3.5 Cromatografía de pares de iones.

Para aplicar la técnica de cromatografía de pares de iones, se usa una columna de fase inversa clásica tipo  $C_8$  o  $C_{18}$ .

La fase móvil está constituida por una mezcla agua/disolvente orgánico y contiene además algún amortiguador que permita fijar el pH del medio, de manera que los solutos y los contra-iones se encuentren ionizados en esta fase.

La fase móvil contiene también una sal del contra-ion que se pretende utilizar para la formación de pares de iones con los solutos.

El contra-ion es en general un ion orgánico, cuya molécula contiene una parte hidrocarbonada importante. Como contraiones aniónicos (para separar solutos catiónicos), se emplean generalmente los alquilsulfonatos y como contra-iones catiónicos se usan tetralquil amonios o las aminas terciarias.

Al agregar un contra-ion de signo opuesto, se observa en general un aumento de la retención del soluto ionizado. Este aumento de retención va a depender de la naturaleza del contra-ion, de su concentración, de la composición del eluyente y de la tasa de carbono de la fase estacionaria, según el siguiente mecanismo:

Debido a su parte hidrocarbonada importante, el contra-ion se va a adsorber en la fase estacionaria. Según las reglas del efecto hidrofóbico, se plantea lo siguiente:

-Al equilibrio existe una constante de reparto que fija las concentraciones relativas en las dos fases.

-La constante de reparto disminuye cuando la concentración del disolvente orgánico aumenta en el eluyente, de tal forma que la concentración de contra-ion disminuye en la fase estacionaria.

El soluto va entonces a adsorberse en la fase estacionaria gracias a la formación de un par de iones con el contra-ion, según un mecanismo parecido al de intercambio iónico.

La amplitud del aumento de retención del soluto va a depender de la constante de equilibrio de la formación del par de iones y de la concentración del contra-ion en la fase estacionaria.

Las separaciones en cromatografía de pares de iones, son en general estables y relativamente reproducibles, sin embargo, cabe mencionar que esto supone que el sistema haya alcanzado el equilibrio y por lo tanto que el contra-ion se haya adsorbido hacia su concentración de equilibrio en la fase estacionaria, según el valor de la constante de reparto correspondiente a las condiciones experimentales. En ciertos casos (constante de reparto grande para contraiones de cadena larga y

concentración baja en fase móvil), será necesario esperar mucho tiempo para llegar al equilibrio. Para contra-iones de cadena corta ( $C_5$  o  $C_6$  sulfonatos por ejemplo), la adsorción en fase estacionaria es, en general muy baja. El aumento de retención que se puede observar en algunos casos, corresponde probablemente a la formación de un par de iones en la fase móvil que, entonces se adsorbe, por ser más hidrofóbico que cada componente. Los contra-iones cortos permiten también disminuir los fenómenos de adsorción del soluto en los silanos residuales por efecto de competición, lo que puede mejorar la eficiencia de la separación cromatográfica.

## 2.4.- Conceptos básicos: principales parámetros cromatográficos.

### 2.4.1.- Parámetros de la Retención.

#### a) Tiempo de retención ( $t_r$ ).

Se llama tiempo de retención, al tiempo transcurrido desde el momento en que el soluto es depositado en la fase estacionaria (inyección), hasta que el máximo de la banda atraviesa la celda del detector.

#### b) Volumen de retención ( $V_r$ ).

Es el volumen de la fase móvil que se requiere para éluir al soluto, se calcula conociendo la velocidad de flujo ( $F$ ) y el tiempo de retención ( $t_r$ ):

$$V_r = F * t_r$$

El tiempo de retención y el volumen de retención son parámetros característicos de cada compuesto en una columna dada, empleando un sistema fase móvil / fase estacionaria dado, por ello, estos parámetros pueden servir como base para identificar un compuesto en una mezcla.

Sin embargo se debe señalar que los métodos cromatográficos en columna no son útiles cuando se destinan únicamente al análisis cualitativo, pues sería imposible tener los patrones de retención de todos los solutos en todas las combinaciones posibles de fase móvil / fase estacionaria.

#### c) Volumen muerto ( $V_m$ )

Es el volumen intersticial de fase móvil en la columna. Una especie que no es retenida aparece en el efluente de la columna (Volumen muerto) en el tiempo  $t_0$ .

Estos parámetros están ligados por la ecuación:

$$V_m = t_0 * F$$

#### d) Tiempo de retención corregido ( $t'_r$ ).

Es el tiempo que pasa el soluto efectivamente en la fase estacionaria.

$$t'_r = t_r - t_0$$

e) **Factor de capacidad ( k' ).**

Nos permite comparar directamente la retención de un compuesto entre columnas de diferente longitud o diámetro.

$$k' = \frac{\text{cantidad de soluto en fase estacionaria}}{\text{cantidad de soluto en fase móvil}} = \frac{t'_r}{t_o}$$

f) **Factor de selectividad ( α ).**

Describe la separación entre dos picos adyacentes.

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}}$$

donde  $k'_2 > k'_1$  y por lo tanto  $\alpha \geq 1$

El valor de  $\alpha$  es importante para determinar la posibilidad de lograr una separación, es evidente que aún teniendo una columna magnífica dos solutos no pueden separarse si  $\alpha = 1$ .

## 2.4.2 Parámetros de la Eficiencia Cromatográfica.

a) **Número de Platos Teóricos ( N ).**

La eficiencia de una columna se mide por el Número de Platos Teóricos, (N), que contiene. Se refiere a que si comparáramos el proceso cromatográfico, con un proceso de destilación fraccionada o de extracción líquido-líquido, podríamos dividir imaginariamente la columna en una serie de platos, considerando que en cada uno de ellos, la fase móvil y los solutos que contiene se ponen en equilibrio con la fase estacionaria contenida en el plato, así obtendríamos un número que refleja la eficiencia.

Una columna será tanto más eficiente, cuanto mayor sea el número de platos teóricos que contiene.

Para calcularlos se aplica la siguiente fórmula:

$$N = 16 \left( \frac{t_r}{w} \right)^2 = 5.54 \left( \frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2$$

En donde:

$t_r$  = Tiempo de retención.

$w$  = Ancho del pico a la base, determinado por la extrapolación de las tangentes a los puntos de inflexión sobre la línea base.

$w_{1/2}$  = Anchura del pico a la mitad de su altura.

b) **Altura del Plato Teórico ( H ).**

Sirve para comparar entre sí, la eficiencia de columnas de diferente longitud:

$$H = \frac{L}{N}$$

donde L es la longitud de la columna. La altura equivalente a un plato teórico disminuye con el diámetro de partícula de la fase estacionaria.

### c) Resolución ( R ).

Mide la separación efectiva entre dos componentes, la cual depende fundamentalmente de dos factores:

- La separación entre los máximos de los picos ( relacionada con la diferencia entre sus constantes de distribución).
- El ensanchamiento de las bandas en su migración a través de la columna.

$$R = \frac{\Delta t}{1/2 w_1 + w_2} = \frac{2 ( t_{r2} - t_{r1} )}{w_1 + w_2} \quad (*)$$

En donde:

$t_{r1}, t_{r2}$  = Tiempos de retención de dos componentes separados.

$w_1, w_2$  = Anchura del pico a la base, obtenida por extrapolación de las tangentes a los puntos de inflexión sobre la línea base, para cada componente separado.

Un valor de  $R = 1.5$ , significa separación completa.

### d) Fenómeno del Ensanchamiento de Banda. <sup>4,5,6,7,9</sup>

Cuando una muestra se aplica en la fase estacionaria, los solutos que la constituyen se encuentran completamente mezclados, formando el conjunto una banda estrecha. A medida que la fase móvil fluye, los componentes de la muestra viajan a lo largo del sistema, se van alejando gradualmente uno de otro y eventualmente se separan, constituyendo cada uno, una banda distinta. Sin embargo, durante la migración, las bandas se dispersan o se ensanchan debido a varios procesos físicos y este ensanchamiento tiene efectos negativos sobre la separación.

El fenómeno del ensanchamiento de las bandas es muy importante, pues determina en gran parte la posibilidad de lograr una buena separación entre los compuestos. Por ello la calidad de una columna se juzga según el grado de ensanchamiento que produce en las bandas de los solutos. Entre más pequeño sea ese ensanchamiento, se dice que la columna es más eficiente.

### 3.- COMPONENTES DE UN SISTEMA CLAR.

Este tipo de sistema cromatográfico está constituido por los elementos que se muestran en la Figura 2.

Los siguientes elementos son indispensables para la aplicación de la técnica:

- Bomba
- Inyector
- Columna
- Detector
- Graficador y/o integrador.

Otros son opcionales:

- Sistema de gradiente
- Muestreador automático
- Regulador de temperatura de la columna ( Horno para columna ).
- Sistema computarizado de operación del conjunto.

#### 3.1 Bomba cromatográfica y gradiente de elución.

Requisitos principales:

- Flujo desde 0.025-0.2 mL/min hasta 5-10 mL/min, para cromatografía analítica y semipreparativa.
- Presión: desde 400-700 psi, hasta 4000-5600 psi.
- Reproducibilidad del flujo: < 1 %, independiente de presión y viscosidad, estable.
- Sin pulsaciones.
- Materiales químicamente resistentes a la fase móvil.
- Posibilidad de gradiente de elución con bajo volumen muerto.

Eluente cromatográfico.

La reserva de eluente aspirado por la bomba cromatográfica no necesita tener características especiales. Sin embargo, es indispensable tomar las siguientes precauciones :

- Utilizar un filtro de aspiración del eluente para evitar la introducción de partículas sólidas en suspensión que pueden dañar empaques y válvulas de retención de bombas y tapan progresivamente la cabeza de la columna por acumulación.

- Desgasificar el eluente antes de utilizarlo. Esto para evitar que el oxígeno disuelto en el eluente provoque burbujas indeseables durante la aspiración de la bomba y sobre todo durante la descompresión en la celda del detector.

- Mantener tapada o cubierta la reserva de disolvente para evitar la entrada de polvo y la evaporación de los disolventes volátiles, la cual puede provocar daños a la salud, además de cambiar la composición de la fase móvil.

#### GRADIENTE DE ELUCION. <sup>11,12,13</sup>

Cuando una separación cromatográfica es muy compleja, la elución con gradiente o programación de disolventes es ventajosa y en ocasiones esencial. Algunas de las ventajas de la elución con gradiente, son los tiempos menores de análisis, mejor forma de los picos (en especial en picos tardíos), mejor limpieza de la columna y mejor reconocimiento de las condiciones isocráticas. Los aparatos formadores de gradientes se clasifican en dos categorías: baja presión y alta presión.



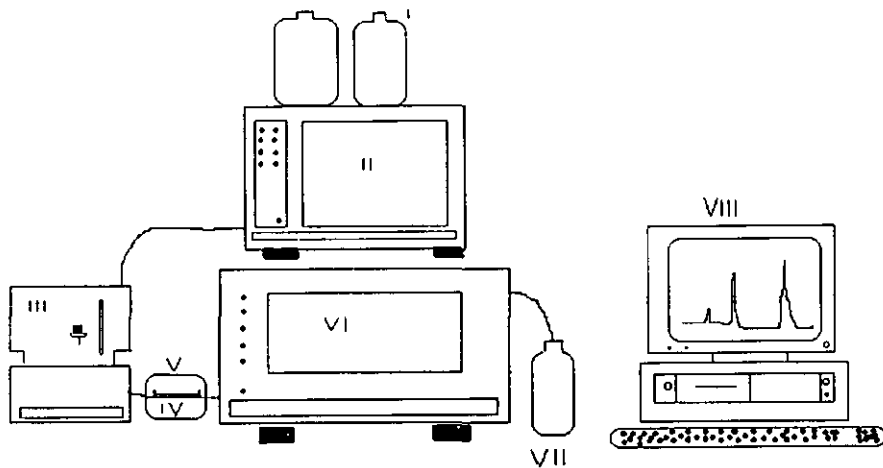


Figura No. 2 Representación esquemática de los componentes de un sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

- I. Reservorios de fase móvil.
- II. Bombas
- III. Inyector y muestreador automático
- IV. Columna
- V. Regulador de temperatura de la columna
- VI. Detector
- VII. Desechos
- VIII. Computadora

Los aparatos de baja presión constan normalmente de una sola bomba y el mezclado se realiza en la entrada de la misma. En general se utilizan válvulas de intercambio para medir los diferentes porcentajes de las fases móviles que entran a la bomba con cada golpe.

Los sistemas de gradiente de alta presión son sistemas de bombas binarios o ternarios, donde cada bomba impulsa una fase móvil diferente. A su vez cada bomba aporta una fracción de la velocidad final del flujo, dependiendo de la composición deseada.

Mientras los sistemas de gradiente de baja presión son normalmente más baratos que los de alta presión, en general los sistemas de alta presión son más flexibles, más reproducibles y permiten un mayor intervalo en la composición y selección de la forma del gradiente.

Con cualquier tipo de formador de gradiente que se use, es necesario siempre asegurar una mezcla adecuada de los disolventes, esto implica la utilización de una cámara de mezclado, y para cromatografía de alta resolución se usa un mezclador dinámico.

### **3.2 Inyector.**

La inyección de la muestra analítica puede realizarse en forma manual por medio de una jeringa, o automáticamente empleando un automuestreador.<sup>8</sup>

La inyección manual se realiza con jeringa a través de un sello cuando la presión en la columna es menor de 1000 psi. Para presiones mayores, se requiere de una válvula de inyección. Algunos sistemas de válvulas incluyen un loop calibrado, los cuales son unas válvulas de alta presión con 6 o 4 puertas y dos posiciones. Una de las posiciones comunica directamente a la bomba con la columna, mientras se introduce la muestra en el loop a baja presión.

El loop es en general un capilar externo con un volumen conocido o para volúmenes muy pequeños, un canal interior.

El loop se llena con la muestra después de enjuagar repetidamente y se inyecta el volumen total o también puede hacerse inyectando un volumen parcial conocido.

Existen también equipos de muestreo automático, los cuales consisten de un carrusel que contiene los viales con las muestras perfectamente tapados y un sistema de inyección que transfiere la muestra desde los viales al loop calibrado, de volumen fijo o variable, desde el cual es depositado a la columna. En este módulo del sistema cromatográfico puede programarse el volumen de muestra, el número de inyecciones y ciclos de enjuague del loop, así como el intervalo entre inyecciones y otras variables de operación.

### **3.3 Detector.**

Hay dos tipos diferentes de detectores:

- El detector universal que detecta también el eluyente y funciona por diferencia entre la respuesta del soluto y la del disolvente. Este tipo de detector tiene una sensibilidad limitada.

- El detector específico que tiene una respuesta variable según el tipo de molécula detectada. Se buscarán entonces detectores que tengan una respuesta mínima con respecto al eluyente y máxima con respecto al soluto.

#### Principales características del detector ideal.

- Es universal o específico.
- Tiene una alta sensibilidad y una respuesta estable en el tiempo.

- Tiene una celda y conexiones de bajo volumen.
- Tiene un alto intervalo de linealidad de respuesta.

### Detectores refractométricos.

Es un detector universal. La señal es la diferencia entre el índice de refracción de la celda de medida que recibe el efluente de la columna y la celda de referencia que contiene el eluente empleado.

El soluto provoca entonces una variación muy pequeña del índice en la celda de medida proporcional a la concentración. El detector refractométrico no es muy sensible y sus límites de detección son en general del orden de 0.1 a 1 µg inyectados. Además es sensible a la temperatura y a las variaciones de flujo y no puede utilizarse para gradiente de elución.

### Detectores de luz ultravioleta.

Son los detectores más utilizados y representan aproximadamente el 80 % de los detectores de CLAR.

El principio de la detección está basado en la absorción de luz provocada por el soluto. La concentración del soluto en la celda está relacionada a la fracción de luz transmitida, por la ley de Lambert-Beer:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon l c$$

En donde:

- A = absorbancia
- $I_0$  = intensidad de la luz incidente
- I = intensidad de la luz transmitida
- $\epsilon$  = coeficiente de extinción molar del soluto a la longitud de onda de trabajo
- l = longitud del camino óptico en la celda
- c = concentración del soluto.

$\epsilon$  que es el coeficiente de respuesta del soluto varía mucho con la longitud de onda y la naturaleza del producto ( es posible encontrar valores de  $\epsilon$  entre 0.1 y  $10^6$  ), lo que implica que el detector UV es específico. Si se escoge un eluente constituido por disolventes de bajo  $\epsilon$ , es posible obtener sensibilidades altas y, en casos favorables, límites de detección muy bajos ( hasta menos de 0.1 ng inyectados).

Los detectores UV no necesitan en la actualidad celda de referencia y la eventual absorbancia del eluente está compensada electrónicamente. Son poco sensibles a la temperatura y a las variaciones de flujo. Tiene varias gamas de sensibilidad expresadas en fracciones de unidad de absorbancia (AUFs).

### Detector de longitud de onda fija.

Es el detector más sencillo y menos caro. La fuente UV es una lámpara de vapor de mercurio que,

proporciona una longitud de onda de 254 nm ( es posible utilizar una longitud de onda secundaria de 280 nm ).

#### Detector de longitud de onda variable.

Es el detector más utilizado. Permite trabajar en general de 190 a 600 nm con selección manual de la longitud de onda. Contiene una fuente continua tal como una lámpara de Deuterio o Xenón a presión alta y un monocromador o filtro de interferencia para generar radiación monocromática a la longitud de onda seleccionada por el operador . Los aparatos integrados y computarizados permiten el cambio de longitud de onda programable en tiempos pre-establecidos.

#### Detectores de arreglo de diodos.

El detector no posee monocromador para elegir la longitud de onda. Un haz de luz policromática atraviesa la celda y es dispersada después. Un conjunto de diodos electroluminiscentes recibe el haz fraccionado, lo que permite registrar en cada momento la totalidad del espectro UV-visible.

#### Detector de fluorescencia .

Utiliza las propiedades de fluorescencia de ciertas moléculas. En casos favorables es un detector muy sensible que permite detectar hasta picogramos de soluto. Es un detector altamente específico que puede utilizarse con gradiente de elución. Es poco sensible a las variaciones de flujo o de temperatura.

Menos de 20 por ciento de las moléculas presentan fluorescencia natural, lo que limita el uso de este detector. Sin embargo, la aparición de reactivos de derivatización eficientes ha permitido un desarrollo importante, sobre todo en el análisis de productos biológicos.

#### Otros detectores.

- Detector electroquímico: Es en general amperométrico. Detector de alta sensibilidad pero de uso más limitado que el detector de fluorescencia.

- Detector conductimétrico: Detector en principio universal pero de hecho utilizado únicamente para análisis de aniones y cationes en sistemas acuosos.

### **3.4 Columna cromatográfica**

La columna cromatográfica está constituida por un tubo de acero inoxidable ( de vidrio o de titanio en ciertos casos ) que contiene la fase estacionaria. El tubo tiene una superficie interior con excelente nivel de pulido, los más comunes diámetros interiores: ( D. I. ) 2.3, 4.6, 6.7 mm. Diámetros exteriores ( D.E. ): 1/4 ", 3/8", 1/2". Longitud : de 3 a 30 cm.

Las dos extremidades tienen conexiones de reducción para recibir capilares de 1/16" de D.E., y contienen un sello de acero inoxidable poroso que permite mantener la fase estacionaria en la columna. Esas conexiones deben ser cuidadosamente diseñadas para:

- Tener un volumen muerto mínimo.
- Lograr una repartición regular de la fase móvil en la columna.

La columna cromatográfica es el elemento central del sistema y hay que tener las siguientes

precauciones para obtener un tiempo de vida correcto y una buena reproducibilidad de las características cromatográficas : <sup>10</sup>

- Trabajar únicamente con disolventes y soluciones reguladoras filtradas.
- Inyectar solamente muestras filtradas.
- Proteger la columna empleando una precolumna (llenada en seco con material de relleno del mismo tipo del material de la columna).
- Evitar bases o ácidos fuertes, es decir, no salir del margen de trabajo de pH 2 a 8.
- No rebasar, con soportes no modificados, el límite de temperatura de 160° C, ni con materiales de superficie modificada el de 80 ° C.
- Evitar los esfuerzos mecánicos ( golpes, variaciones repentinas de la presión, vibraciones) y cambios rápidos de la velocidad de flujo ( no más de  $\pm 1$  mL/min. ).
- Diseñar el sistema cromatográfico de tal modo que nunca queden adsorbidas moléculas de la muestra de forma irreversible, ni se precipiten en la columna. Por consiguiente y de ser posible, disolver la muestra en los mismos disolventes que sirven de eluyentes.
- Al inyectar muestras disueltas en sistemas amortiguados, procurar que las sales sean lo suficientemente solubles en la mezcla de eluyentes elegida, ya que existe el riesgo de que estas precipiten, sobre todo si es elevada la proporción de componentes orgánicos en la fase móvil y por lo tanto se obstruya la columna.
- Evitar los cambios rápidos de la composición del eluyente. Las columnas nuevas vienen humedecidas con el disolvente que especifica el proveedor, si para el problema a tratar se requiere de otro disolvente, se debe pasar lentamente al eluyente deseado, aumentando o reduciendo poco a poco la polaridad, y teniendo en cuenta la miscibilidad y las propiedades humectantes, acondicionando la columna cuidadosamente hasta alcanzar un estado de equilibrio estable.
- Procurar que la columna no se seque por dentro. Almacenar la columna tapada por ambos extremos y humedecida con eluyentes que no causen problemas, ( no usar soluciones reguladoras o salinas ) tales como n-heptano para materiales de sílice, y metanol para soportes de polaridad mediana o de fase invertida.
- Procurar utilizar cada columna para una aplicación determinada, ya que la variación continua de muestras y eluyentes, desgasta la columna y acelera la pérdida de eficiencia.
- En la cromatografía de pares iónicos la columna empleada debe reservarse para este fin, puesto que la readaptación a otras aplicaciones, supone procesos de lavado complicado.
- Regenerar la columna periódicamente, considerando los siguientes criterios:

\* Para empaques Si, R-NH<sub>2</sub>, DIOL, R-CN.

1. Lavar la columna utilizando porciones cada vez, de 20-25 mL, de la siguiente serie de disolventes de polaridad creciente:

n-heptano-acetato de etilo-acetona-metanol.

2. Activar el material soporte lavándolo con varios disolventes secos de polaridad decreciente, utilizando porciones cada vez de 20-25 mL, como ejemplo se sugiere:

metanol-acetona-acetato de etilo-n-heptano.

\* Para empaques de fase inversa:

1. Pasar aproximadamente 30 mL de metanol o acetonitrilo puro por la columna.
2. Pasar a continuación cerca de 30 mL de metanol / cloroformo 1:1 a través de la columna.
3. Pasar otra vez metanol o acetonitrilo puro ( 20-30 mL ).
4. Aumentar gradualmente el contenido de agua de la fase móvil hasta alcanzar la composición requerida del eluyente. Condicionar la columna cuidadosamente hasta obtener un equilibrio estable.

### 3.5 Sistemas de recolección de datos.

Estaciones computarizadas de recolección de datos reciben y guardan señales del detector e imprimen cromatogramas con altura y área de los picos cromatográficos. De igual manera, sirven para programar el cromatógrafo de líquidos, controlando automáticamente las variables de operación, dando la oportunidad de largos periodos de trabajo sin la atención del usuario.

### 3.6 Conexiones y accesorios.

#### Conexiones.

Debido a los pequeños volúmenes que se requieren para que aparezcan los picos cromatográficos y a las presiones de operación, las conexiones son especialmente diseñadas y tienen importancia en el sistema cromatográfico.

Inicialmente las conexiones eran de acero inoxidable aunque en la actualidad se fabrican con un polímero especial con las siguientes características:

- La tuerca se aprieta a mano sin requerir llaves,
- La pieza inferior de la tuerca (que asegura la operación a presión) es móvil, se ajusta al tubo pero no queda fija permanentemente, es decir esos sistemas son totalmente intercambiables entre equipos y entre proveedores.

#### Tubería.

Para un sistema normal se tiene que usar tubo capilar de 1/16" de D.E. y de 0.01" de D.I.

En general se usa tubo de acero inoxidable aunque en la actualidad se fabrican de otros materiales (polímeros) que es más fácil de cortar y más flexible.

#### Accesorios.

Entre otros cabe mencionar que, según los casos, será útil usar pre-columna o microfiltro para proteger la columna de partículas y/o impurezas irreversiblemente adsorbidas. En este caso es preciso verificar los volúmenes muertos.

## 4.- VALIDACION DE METODOS ANALITICOS

### 4.1.- Validación de métodos analíticos.<sup>14</sup>

La validación de métodos analíticos es parte fundamental del desarrollo de una nueva formulación y de la técnica de análisis de control de calidad de una forma farmacéutica, ya que es durante esta secuencia de pruebas y análisis, en donde se determina si el estudio, el cual está siendo evaluado sistemáticamente, cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado.

Actualmente existen aspectos regulatorios que indican que los métodos de prueba que están siendo empleados para verificar la calidad de los productos con respecto a las especificaciones establecidas, deben cumplir con estándares de exactitud y confiabilidad. Asimismo, se establece que para los métodos analíticos descritos en la USP y en el NF, no es necesario validar su exactitud y confiabilidad, sin embargo debe verificarse su adecuabilidad bajo las condiciones de uso.

De acuerdo con esta regulación, es esencial y obligatorio que las propuestas para nuevos métodos analíticos estén soportadas por suficientes datos de laboratorio que documenten la validez de estos métodos.

Esto se logra mediante la validación del método analítico, que se define, como el proceso documentado por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. La capacidad se expresa en este caso en términos de parámetros analíticos.

Durante el desarrollo y validación de métodos analíticos se debe contar con un esquema de validación el cual incluye :

1. Objetivo
2. Revisión bibliográfica exhaustiva.
3. Pruebas preliminares.
4. Desarrollo del método.
5. Optimización del método.
6. Validación del método.

La validación incluye dos categorías, sistema y método, en cada una de las categorías se evalúan los siguientes parámetros:

#### 1. Sistema:

- Linealidad.
- Precisión ( evaluada como Repetibilidad ).

#### 2. Método

- Especificidad.
- Linealidad.
- Exactitud.
- Precisión ( evaluada como Repetibilidad y Reproducibilidad ).
- Estabilidad de la muestra analítica.
- Tolerancia.

A continuación se describen cada uno de estos parámetros.

### 4.2.- Especificidad.

Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

## **Especificidad para métodos indicativos de control de calidad**

Con el método propuesto :

1. Analizar placebo del producto que contenga todos los componentes de la formulación, excepto el Extracto de Centella Asiática.
2. Analizar placebo cargado al 100 %.
3. Analizar la solución de Referencia de Extracto de Centella Asiática.

Identificar la(s) respuesta(s) del (los) activo(s) y de los excipientes y/o de otras sustancias presentes.

Criterio de aceptación :

Los cromatogramas obtenidos del análisis de las muestras deben presentar los siguientes resultados:

1. El cromatograma de la solución placebo no presenta ningún pico característico a los mismos tiempos de retención que los correspondientes a los componentes del Extracto de Centella Asiática.
2. El cromatograma de la solución de placebo cargado al 100 % presenta picos característicos similares en tiempo de retención y área a la solución de Referencia de Extracto de Centella Asiática.

## **Especificidad para métodos indicativos de Estabilidad**

En caso de contar con los posibles productos de degradación, preparar muestras con placebo "añadido" de éstos y la sustancia de interés y analizar con el método propuesto.

Si no se cuenta con los productos de degradación, es necesario degradar la muestra bajo diferentes condiciones; se sugieren los siguientes métodos para degradar la sustancia, los cuales se elegirán dependiendo de las propiedades fisicoquímicas del compuesto:

1. Colocar la sustancia de interés, el placebo y muestras del producto en un horno a 70-120°C o a 20°C por debajo del punto de fusión de la sustancia de interés durante un número de días apropiado ( 2 a 4 semanas).
2. Exponer la sustancia de interés, el placebo y muestras del producto a la luz UV o a la luz fluorescente y/o a humedad.
3. Si se trata de formas farmacéuticas líquidas o semisólidas, pueden degradarse por oxidación con peróxido de hidrógeno y permanecer 2-4 semanas a temperatura ambiente.
4. Por hidrólisis ( pH 1-2 y 10-12 ), colocando las muestras a 60-80°C durante 2-4 semanas.

Criterio de aceptación :

Verificar que los productos de degradación y/o sustancias relacionadas no interfieran con la cuantificación de la sustancia de interés, utilizando el método desarrollado.

### **4.3.- Linealidad**

La linealidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.



#### 4.3.1.- Linealidad del sistema

Se determina construyendo una curva de calibración ( concentración contra respuesta medida ) utilizando cinco diluciones preparadas a partir de una misma solución de la sustancia de referencia y haciendo el análisis por triplicado para cada dilución, en el intervalo de las concentraciones a analizar deberá incluirse la concentración seleccionada como 100 por ciento.

El criterio de aceptación para este parámetro es el siguiente:

El coeficiente de correlación ( r ), deberá ser mayor o igual a 0.99.

El coeficiente de determinación ( r<sup>2</sup> ) deberá ser mayor o igual a 0.98.

Para el cálculo de r y r<sup>2</sup> aplicar las siguientes fórmulas:

$$r = \left| \frac{[nt(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)]^2}{[nt(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2][nt(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]} \right|^{1/2}$$
$$r^2 = \frac{[nt(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)]^2}{[nt(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2][nt(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2]}$$

En donde:

x = concentración (µg/mL)

y = área

n = número de replicaciones ( propiedad medida ) de cada dilución de la solución patrón.

t = número de diluciones.

#### 4.3.2.- Linealidad del método.<sup>15</sup>

Se determina preparando por triplicado y por separado muestras de placebo cargado con porcentajes del principio activo de 50, 75, 100, 125 y 150 por ciento de la cantidad requerida por el método analítico.

Las concentraciones de los placebos cargados deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema.

Los valores que representan la cantidad adicionada y la cantidad recuperada, se tratan por el método de mínimos cuadrados para evaluar la correlación lineal entre los datos. La recta que se obtiene a través de este tratamiento estadístico, está definida por la siguiente ecuación:

$$y = mx + b$$

Donde:

y = Cantidad recobrada

x = Cantidad adicionada

m = Pendiente

- b = Ordenada al origen
- Criterio de aceptación:
- m estadísticamente igual a 1
- b estadísticamente igual a 0
- $r \geq 0.99$
- $r^2 \geq 0.98$

La pendiente ( m ) y la ordenada al origen ( b ) para la recta obtenida se determinan de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$m = \frac{nt(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)}{nt(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2}$$

$$b = \frac{\Sigma y - m(\Sigma x)}{nt}$$

Las ecuaciones para el cálculo de r y r<sup>2</sup> son las mismas que se mencionan en el inciso correspondiente a la Linealidad del sistema.

Para realizar el análisis de varianza se determina la suma de cuadrados de la regresión ( SCr ), la suma de cuadrados del error de regresión ( SCer ), la suma de cuadrados de la falta de ajuste (SCfa) y la suma de cuadrados del error puro (SCep ) de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$SCr = m(\Sigma xy) + b(\Sigma y) - ((\Sigma y)^2 / n)$$

$$SCer = \Sigma y^2 - m(\Sigma xy) - b(\Sigma y)$$

$$SCep = \Sigma y^2 - ((\Sigma yi^2) / r)$$

$$SCfa = SCer - Scep$$

Con los resultados anteriores se construye la tabla de análisis de varianza:

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Media de Cuadrados	F <sub>calculada</sub>	F <sub>tablas</sub>
Regresión	1	SCr	SCr/g.l.r.	Fr = MCr / MCer	F <sub>(g.l.r,g.l.er;0.99)</sub>
Error de regresión	n - 2	SCer	SCer/g.l.e.r.		
Falta de ajuste	(n-2) - t (r - 1)	SCfa	SCfa/g.l.f.a.	Ffa = MCfa/MCep	F <sub>(g.l.f.a.;g.l.ep;0.95)</sub>
Error puro	t (r - 1)	Scep	Scep/g.l.e.p.		

En donde:  
t = número de concentraciones

r = número de replicaciones por concentración

n = r = número de pares ordenados

Criterio de aceptación:

Se comparan los valores de Fr y Ffa contra las F de tablas.

Si Fr es mayor o igual que  $F_{(g.l.r;g.l.er;0.99)}$  y Ffa es menor o igual que  $F_{(g.l.fa;g.l.ep;0.95)}$ , el modelo lineal es correcto para describir la relación existente entre miligramos adicionados y miligramos recuperados.<sup>13</sup>

Para determinar si la pendiente y la ordenada al origen de la recta obtenida son estadísticamente igual a 1 y 0 respectivamente, se aplicó la prueba estadística t de Student, realizando los siguientes cálculos:

Se calculó la media cuadrática del error de regresión ( McErrReg ), la media cuadrática de regresión ( McReg ), la desviación estándar de la pendiente ( $s_m$ ), la desviación estándar para la ordenada al origen ( $s_b$ ), la t para la pendiente ( $t_m$ ) y la t para la ordenada al origen ( $t_b$ ):

$$\text{McErrReg} = \frac{(\Sigma y^2) - m(\Sigma xy) - b(\Sigma y)}{n - 2}$$

$$\text{McReg} = b(\Sigma y) + m(\Sigma xy) - ((\Sigma y)^2 / n)$$

$$s_m = (\text{McErrReg} \left| \frac{x_p^2}{n(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2} + \frac{1}{n} \right|)^{1/2}$$

Donde:  $x_p$  = promedio de x

$$s_b = (\text{McReg} \left| \frac{1}{n(\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2} \right|)^{1/2}$$

$$t_m = \frac{1 - m}{s_m}$$

$$t_b = \frac{0 - b}{s_b}$$

Criterio de aceptación:

En las tablas de distribución t de Student, se determina el valor para la t con n-1 grados de libertad y un nivel de significancia de 0.95 ( $t_{(n-1;0.95)}$ ):

Se comparan el valor de t de tablas contra los valores calculados de  $t_m$  y  $t_b$ :

Si el valor absoluto de  $t_m$  es menor que  $t_{(n-1;0.95)}$ , estadísticamente la pendiente es igual a 1.

Si el valor absoluto de  $t_b$  es menor que  $t_{(n-1;0.95)}$ , estadísticamente la ordenada al origen es igual a 0.

#### 4.4.- Precisión.<sup>14</sup>

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a una muestra homogénea del producto.

La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

##### a) **Repetibilidad.**

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.).

##### b) **Reproducibilidad.**

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o en diferentes laboratorios, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc.).

#### 4.4.1.- Repetibilidad del sistema.

Se determina por el análisis sextuplicado de una misma solución estándar correspondiente al 100 %. Los resultados se tabulan de la siguiente manera:

Número de Determinación	Respuesta (y)
1	$y_1$
2	$y_2$
3	$y_3$
4	$y_4$
5	$y_5$
6	$y_6$

Se determina la sumatoria de y ( $\Sigma y$ ):

$$\Sigma y = y_1 + y_2 + y_3 + y_4 + y_5 + y_6$$

Se determina la sumatoria de  $y^2$  ( $\Sigma y^2$ ):

$$\Sigma y^2 = y_1^2 + y_2^2 + y_3^2 + y_4^2 + y_5^2 + y_6^2$$

Se calcula el promedio de las y ( $y_p$ ):

$$y_p = \frac{\Sigma y}{n}$$

Donde n = número de determinaciones = 6

Se calcula la desviación estándar (s) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$s = \left| \frac{n(\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}{n(n-1)} \right|^{1/2}$$

Se calcula el coeficiente de variación (C.V.):

$$C.V. = \frac{s}{y_p} * 100$$

El criterio de aceptación es:

El Coeficiente de Variación (CV)  $\leq$  1.5 %

#### 4.4.2.- Repetibilidad del método.<sup>15</sup>

Tiene como objetivo demostrar que existe una concordancia entre mediciones repetidas e independientes de una misma propiedad bajo las mismas condiciones (mismo equipo, analista, día del análisis, etc.). Para cuantificar este parámetro se utilizan los datos obtenidos al evaluar la exactitud del método.

El Criterio de aceptación es:

El Coeficiente de Variación (CV)  $\leq$  2.0 %

Las ecuaciones para calcular el CV son las mismas que se menciona en el inciso correspondiente a la repetibilidad del sistema, con la diferencia de que n = 10.

#### 4.4.3.- Reproducibilidad del método.<sup>14,15</sup>

Tiene como objetivo demostrar la concordancia de los resultados obtenidos al aplicar el método en condiciones diferentes y que por lo tanto, son independientes del laboratorio, analista, día del análisis o equipo utilizado en la determinación.

Se determina realizando el análisis por triplicado de una muestra homogénea del producto, realizado cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes.

Para establecer las fuentes de variación del método se realiza un tratamiento estadístico:

DIA (j)	ANALISTA (i)	
	1	2
1	Y <sub>111</sub>	Y <sub>211</sub>
	Y <sub>112</sub>	Y <sub>212</sub>
	Y <sub>113</sub>	Y <sub>213</sub>
2	Y <sub>121</sub>	Y <sub>221</sub>
	Y <sub>122</sub>	Y <sub>222</sub>
	Y <sub>123</sub>	Y <sub>223</sub>

Realizar los siguientes cálculos :

1. Calcular la suma de las combinaciones analista-día y<sub>ij</sub> :

$$y_{11.} = y_{111} + y_{112} + y_{113}$$

$$y_{12.} = y_{121} + y_{122} + y_{123}$$

$$y_{21.} = y_{211} + y_{212} + y_{213}$$

$$y_{22.} = y_{221} + y_{222} + y_{223}$$

2. Calcular la suma para cada analista ( $y_{i..}$ ):

$$y_{1..} = y_{111} + y_{112} + y_{113} + y_{121} + y_{122} + y_{123}$$

$$y_{2..} = y_{211} + y_{212} + y_{213} + y_{221} + y_{222} + y_{223}$$

3. Calcular la suma total ( $y_{...}$ ):

$$y_{...} = y_{1..} + y_{2..}$$

4. Calcular la suma del cuadrado de cada analista en cada día:

$$\sum \sum y_{ij}^2 = (y_{11.})^2 + (y_{12.})^2 + (y_{21.})^2 + (y_{22.})^2$$

5. Calcular las sumas del cuadrado de cada analista en los dos días:

$$\sum y_{i..}^2 = (y_{1..})^2 + (y_{2..})^2$$

6. Calcular la suma de cada dato elevado al cuadrado:

$$\sum \sum \sum y_{ijk}^2 = (y_{111})^2 + (y_{112})^2 + (y_{113})^2 + \dots + (y_{221})^2 + (y_{222})^2 + (y_{223})^2$$

7. Calcular la suma de cuadrados del analista (SCa), efecto del factor analista, con la siguiente fórmula:

$$SCa = \frac{\sum y_{i..}}{dr} - \frac{(y_{...})^2}{adr}$$

8. Calcular la suma de cuadrados del día anidado en el analista (SCd), con la siguiente fórmula:

$$SCd = \frac{\sum \sum y_{ij.}^2}{r} - \frac{\sum y_{i..}^2}{dr}$$

9. Calcular la suma de cuadrados del error (SCe) con la siguiente fórmula:

$$SCe = \sum \sum \sum y_{ijk}^2 - \frac{\sum \sum y_{ij.}^2}{r}$$

r

Donde:

a = número de analistas

d = número de días

r = número de repeticiones

Con los datos anteriores construir la tabla de análisis de la varianza (ANAEVA) :

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F <sub>cal</sub>	F <sub>0,05*</sub>
Analista (α)	gla = a-1	SCa	SCa MCa = $\frac{SCa}{gla}$	MCa Fa = $\frac{MCa}{MCd}$	F <sub>gla,gld,0.95</sub>
Día (δ)	gld = (d-1)a	SCd	SCd MCd = $\frac{SCd}{gld}$	MCd Fd = $\frac{MCd}{MCE}$	F <sub>gld,gld,0.95</sub>
Error (ε)	gle = (r-1)ad	SCE	SCE MCE = $\frac{SCE}{gle}$	_____	_____

F<sub>0,05\*</sub> = Los valores de F<sub>0,05</sub> se obtienen de la tabla de F, localizando el cruce del valor de los grados de libertad (gl) del numerador horizontalmente y el valor de los grados de libertad del denominador verticalmente, para un α = 0.05.

Criterio de aceptación:

La interpretación de los resultados se realiza de la siguiente manera:

Si Fa < Fgla,gld;0.05 El método analítico es reproducible por los analistas.

Si Fa ≥ Fgla,gld;0.05 El método analítico no es reproducible por los analistas.

Si Fd < Fgld,gld;0.05 El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

Si Fd ≥ Fgld,gld;0.05 El método analítico no es reproducible en distintos días por un mismo analista.

#### 4.5.- Exactitud.<sup>14</sup>

Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

Se realiza analizando 10 soluciones de placebo cargado al 100 por ciento de la cantidad de principio activo requerida por el método analítico. ( De estas soluciones se utilizarán 9 de ellas para evaluar el parámetro de Estabilidad de la muestra, por lo tanto no se desecharán ).

Calcular el porcentaje de recobro de cada una de estas soluciones por comparación contra una solución de concentración conocida, determinar el promedio de estos recobros ( y<sub>p</sub> ) y la desviación estándar ( s ).

Se aplica la prueba estadística de t de Student para la media y se calcula el valor de t experimental :

$$H_0 : y_p = \mu$$

donde μ = 100 %

$$H_1 : y_p \neq \mu$$

$$t = \frac{(y_p - 100)(n)^{1/2}}{s}$$

En la tabla de Distribución de t de Student, localizar el valor para la t con n-1 grados de libertad y un nivel de significancia de 0.95.

Comparar el valor de t experimental ( $t_{exp}$ ) contra el valor de t de tablas ( $t_{tab(n-1,0.95)}$ ).

El criterio de aceptación es:

Si  $t_{exp} < t_{tab(n-1,0.95)}$ , entonces se acepta  $H_0$  y se concluye que el valor de la media que se obtiene en forma experimental, no es significativamente diferente del 100 por ciento.

#### 4.6.- Estabilidad de la muestra analítica.<sup>14,15</sup>

Al evaluar este parámetro se determina cuanto tiempo puede transcurrir desde que la muestra está lista para cuantificar hasta el momento de la determinación, sin que sufra cambios en su integridad fisicoquímica y en la concentración de la sustancia de interés, almacenándola bajo diferentes condiciones.

Por lo tanto, es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Se analizan 9 de las muestras utilizadas para determinar la exactitud del método, se dividen en tres partes iguales, almacenándolas bajo distintas condiciones (por ejemplo: temperatura ambiente, refrigeración, protegidas de la luz, etc.) durante un tiempo preestablecido por el analista, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia. Reanalizarlas bajo las mismas condiciones de operación, utilizando una solución de referencia recientemente preparada, para cada tiempo, de acuerdo a lo establecido en el método analítico. La determinación debe ser efectuada por un mismo analista.

Calcular el porcentaje de recobro de cada una de estas soluciones y tabular los resultados con base al siguiente formato:

Inicial	Condición/tiempo		
	1	2	m
$y_1$	$y_4$	$y_7$	$y_{n-2}$
$y_2$	$y_5$	$y_8$	$y_{n-1}$
$y_3$	$y_6$	$y_9$	$y_n$

Para cada muestra y condición (tratamiento) se calcula el promedio ( $y_{pi}$ ) y la varianza ( $s_i^2$ ).

Calcular la varianza ponderada ( $s_{pi}^2$ ) del tratamiento y la condición inicial.

$$S_{pi}^2 = \frac{2s_0^2 + 2s_i^2}{2(c+1)} \quad \text{donde } c = \text{número de condiciones a comparar}$$

Para cada uno de los tratamientos se calculó el intervalo de confianza:

$$IC = (y_i - y_0) \pm t_D * ((2/3) * s_{pi}^2)^{1/2}$$



Donde  $t_D = t$  de Dunnet con  $c$  comparaciones y  $2(c-1)$  grados de libertad y una probabilidad acumulada de 0.975. Este valor es 2.86.

#### 4.7.- Tolerancia del método.<sup>15</sup>

Es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistemas de elución, tipos de empaque ( soporte, fase estacionaria ), condiciones ambientales, cambios en el pH. Para métodos cromatográficos: ligeros cambios en la composición de la fase móvil, probar columnas con menor eficiencia, etc.

Al evaluar la tolerancia del método se establece cuáles condiciones pueden afectar el resultado del análisis.

Cada análisis se efectúa por triplicado, analizando en paralelo una muestra bajo las condiciones normales del método, también por triplicado y que servirá como control.

Para cada tratamiento se calcula el promedio ( $y_{pi}$ ) y la varianza ( $s_i^2$ ).

Se calcula la varianza ponderada ( $s_{pi}^2$ ) del tratamiento  $i$  y del tratamiento control :

$$S_{pi}^2 = \frac{((N_o - 1) s_o^2) + ((N_i - 1) s_i^2)}{(N_o - 1) + (N_i - 1)}$$

Donde

$N_i$  = número de repeticiones del tratamiento  $i$

$N_o$  = número de repeticiones del tratamiento control

$s_o^2$  = varianza del tratamiento control

$s_i^2$  = varianza del tratamiento  $i$

Se calcula el valor de  $t$  de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$t = \frac{y_{p_o} - y_{p_i}}{S_{p_i} \left( \left( \frac{1}{N_i} \right) + \left( \frac{1}{N_o} \right) \right)^{1/2}}$$

En tablas de distribución  $t$  de Student se localizó el valor para la  $t$  con  $(N_i + N_o - 2)$  grados de libertad y un nivel de significancia del 95 %.

Criterio de aceptación :

Para un tratamiento dado, el cambio al método no afecta al resultado si el valor de la  $t$  calculada es menor que la  $t$  de tablas.

## IV.- PARTE EXPERIMENTAL

### Formulación

Cada óvulo contiene:

Extracto de Centella Asiática .....	15 mg
Nitrofurazona .....	6 mg
Excipiente c.b.p. ....	2 g

### I.- Desarrollo del método.

Se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva, para conocer lo que había a la fecha sobre metodología de valoración para el extracto de la Centella Asiática.

Se encontraron metodologías espectrofotométricas, incluyendo la metodología vigente en el laboratorio de Control de Calidad en que se hace el estudio, así como un método general para separar un grupo de saponinas triterpénicas mediante CLAR. Sin embargo, con el antecedente de la problemática que implicaba el método espectrofotométrico, se optó por el método cromatográfico.

El método cromatográfico de referencia consistía de las siguientes condiciones:

Gradiente de 20 a 80 % de Acetonitrilo, y 80 a 20 % de Agua; en 25 minutos, con un periodo de 15 minutos de equilibrio del sistema, en presencia de Acido Trifluoroacético, velocidad de flujo de 1 mL/min, detectando a 210 nm.

Los compuestos que se estudiaron fueron los siguientes:

Madecásido, Hederacósido C, Asiaticósido, Crisantelina A,  $\alpha$  Hederina, Acido equinocístico-3-glucósido, Gipsogenina-3-glucurónido y  $\beta$  Escina, los cuales fueron disueltos en metanol a una concentración de 1 mg/mL; se inyectaron 10-30  $\mu$ L de muestra.<sup>16</sup>

A partir de esta información se realizó una prueba con las mismas condiciones cromatográficas, inyectando la solución problema de Extracto de Centella Asiática que como ya se mencionó, contiene la mezcla de Asiaticósido, Acido Asiático y Acido Madecásico, encontrándose lo siguiente:

Con la metodología aplicada, se lograba separar los 3 componentes del Extracto de Centella Asiática, sin embargo las corridas eran demasiado largas (por lo menos 40 min.), por lo que había que determinar cuál era el gradiente que permitiera mejores tiempos de retención, así como tiempos de estabilización y de retorno a las condiciones iniciales, que permitieran obtener resultados repetibles.

Otro parámetro importante, fue la concentración de la solución, la cual se debía optimizar de tal forma, que permitiera resultados precisos, sin saturar la columna y además permitiera realizar la prueba de Uniformidad de Dosis, en el producto terminado (óvulos).

De esta forma, se pensó en desarrollar el método siguiendo inicialmente el objetivo de mejorar tiempos de análisis para posteriormente retomar el parámetro de concentración.

Analizando la estructura química de los componentes del Extracto de Centella Asiática, se observa que el asiaticósido es más hidrofílico que el Acido Madecásico y Asiático, por lo que tendrían mayor afinidad por la fase estacionaria y por lo tanto tardarían más en eluir.

Por esta razón, se procede a disminuir la polaridad de la fase móvil con lo que los componentes del Extracto de Centella Asiática serían más afines a ésta y eluirían más rápido.

Sin embargo, debido a que se utilizaría un gradiente como fase móvil, se deben considerar los siguientes puntos:

1. Composición inicial del gradiente: Influencia de la polaridad inicial en los tiempos de retención.
2. Influencia de composición final del gradiente.
3. Pendiente del gradiente: Cómo influye en la forma de los picos y línea base, así como en tiempos

de retención.

De acuerdo con lo anterior, se realizaron varias pruebas:

Manteniendo el tiempo constante (25 min.), se cambiaron las proporciones de los disolventes de la fase móvil, disminuyendo al inicio la proporción de agua. Se observaron tiempos de retención menores, a tal grado, que con algunas proporciones, el primer pico eluye con el frente de la fase móvil, al tiempo  $t_0$ : (Gradiente de 60 a 20 % de Agua y 65 a 20 % de Agua en 25 min.) y de igual manera, disminuyendo la cantidad de Acetonitrilo al final del gradiente, no se observa la elución, en el tiempo programado, de los últimos dos picos.

Con estas pruebas preliminares se realizó lo siguiente:

Con ayuda del Cromatógrafo de Líquidos, que despliega en la pantalla de Status y control, cómo evoluciona el gradiente de concentración de los disolventes en el tiempo, se fue registrando la composición de disolventes al momento de elución del último pico de interés, así como el tiempo de corrida cromatográfica. Esta nueva composición y tiempo se programaron en la siguiente corrida, registrando nuevamente los mismos parámetros y registrando éstos en la siguiente corrida cromatográfica, y así sucesivamente.

Se mantuvieron constantes el tiempo de equilibrio (6 min.) y el tiempo de regreso a las condiciones iniciales (2 min), los que fueron determinados al hacer una prueba preliminar y observar que no afectaba tiempos de elución y forma del cromatograma en el método de referencia.

Cuando la pendiente del gradiente se hizo muy pronunciada, se modificó la composición inicial por ensayo y error hasta encontrar los tiempos óptimos.

Algunos de los sistemas que se probaron fueron los siguientes:

COMPOSICION %B	DURACION DEL GRADIENTE (min)	LONGITUD DE ONDA Y FLUJO	TIEMPOS DE RETENCION (min)*
20 a 80	25	210 nm, 1 mL/min	10.0,15.0,17.5
40 a 80	25	"	$t_0$ , 4.0,7.5
35 a 80	25	"	$t_0$ ,5.0,7.9
30 a 80	25	"	4.8,10.0,13.0
20 a 65	25	"	9.8,no observados.
25 a 70	17	"	3.26,8.6,11.2
25 a 85	16	"	3.8,8.2,10.09
25 a 90	15	"	3.8,7.7,9.35
25 a 75	10	"	2.99,6.55,8.02
23 a 95	8	"	3.30,5.54,6.45
20 a 95	8	"	3.6,5.8,6.67
25 a 95	8	"	2.88,5.33,6.27
12 a 95	8	"	3.77,5.12,5.73
15 a 95	7	"	3.53,4.9,5.53
15 a 95	7	220 nm, 0.8 mL/min	4.1,5.6,6.3

\*Tiempos correspondientes a asiaticósido, ácido madecásico y ácido asiático respectivamente.

$t_0$  es el tiempo de retención de una molécula no retenida, sale con el frente del solvente.

Posteriormente se probaron tiempos mínimos necesarios para regresar a las condiciones iniciales, así como para estabilizar el sistema cromatográfico antes de la nueva inyección.

El tiempo para regresar a las condiciones iniciales del gradiente no afectaba la forma de los cromatogramas; se eligió un minuto para acortar tiempo y para no forzar demasiado a la bomba; sin embargo, el tiempo de estabilización del sistema, es decir el tiempo en que la proporción de fase móvil inicial pasaba en la columna antes de inyectar la muestra, sí afectaba la estabilidad de la línea base.

De tal forma, se probaron 1, 2, 2.5, 3, 3.5, 3.45, 4, 4.5 y 5 min., observando en cada corrida el cromatograma y la línea base.

Cuando se tenía el penúltimo gradiente mostrado en la tabla, se realizó la prueba de especificidad para control de calidad y al inyectar el placebo que contiene todos los componentes de la formulación excepto el Extracto de Centella Asiática, se observaron unos picos que eluían al inicio del gradiente por lo que se pensó en retrasar un poco más los picos del Extracto de Centella Asiática y el flujo se bajó a 0.8 mL/min.

Se modificó la longitud de onda se incrementando 10 nm, con el objeto de restringir ligeramente la absorbancia de impurezas que absorben a bajas longitudes de onda.

El siguiente punto que se abordó, fue la concentración de la solución muestra, ya que el método debía servir para realizar la prueba de Uniformidad de Dosis por Uniformidad de Contenido, por lo que la cantidad inicial de Extracto de Centella Asiática debía ser 15 mg invariablemente; sin embargo, podrían hacerse las siguientes diluciones, considerando el material volumétrico con el que contaba el laboratorio:

10 mL = 1500 µg/mL.

20 mL = 750 µg/mL.

25 mL = 600 µg/mL.

50 mL = 300 µg/mL.

100 mL = 150 µg/mL.

Se eligió como concentración del 100 % 300 µg/mL ya que 50 mL de disolvente es una cantidad intermedia en cuanto a costo, además de que los volúmenes pequeños tienen mayor error.

Por otro lado entre más diluída se introduzca la muestra a la columna, se satura menos a la columna con el excipiente.

## **2.- Descripción del método**

### **Reactivos.**

Acetonitrilo grado HPLC

Agua grado HPLC

Metanol grado HPLC

Extracto de Centella Asiática Sustancia de Referencia (Estandar interno).

### **Sistema cromatográfico.**

Columna: Nova-Pak C<sub>18</sub>, 3.9 \* 75 mm

Detector: Arreglo de diodos, 220 nm.

Flujo: 0.8 mL/min

Vol. de Inyección: 20 µL.

### **Fase móvil.**

Disolvente A: Agua grado HPLC.

Disolvente B: Acetonitrilo grado HPLC.

Inicialmente gradiente de 15 % de disolvente B, hasta llegar a 95 % de disolvente B, en 7 minutos empleando una curva lineal, regreso en un minuto a la composición inicial ( 15 % de disolvente B ), dejando estabilizar el sistema 3 minutos entre cada inyección.

### **Preparación de la solución de referencia.**

Nota: Proteger de la luz todas las soluciones.

Pesar exactamente alrededor de 15 mg de Extracto de Centella Asiática Sustancia de Referencia, transferirla cuidadosamente a un matraz volumétrico de 50 ml, adicionar 25 ml de metanol grado HPLC, agitar hasta disolución completa y llevar a volumen con el mismo disolvente. Filtrar la solución a través de un filtro Millex de 0.45 micras o equivalente (Concentración final teórica : 300 µg/mL).

### **Preparación de la solución de la muestra.**

Nota: Proteger de la luz todas las soluciones.

Determinar el peso promedio de 10 óvulos y transferirlos a un vaso de precipitados de 100 ml, fundir a baño maría a no más de 60 ° C, retirar del baño y agitar con una varilla de vidrio hasta obtener una pasta homogénea. Transferir a un vaso de precipitados de 100 mL la cantidad de pasta equivalente a 15 mg de Extracto de Centella Asiática, exactamente pesada, agregar 20 mL de metanol grado HPLC y calentar a 65 ° C hasta disolver, transferir esta solución cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 mL, enjuagar el vaso con dos porciones de 10 mL de metanol, adicionando los lavados a el matraz volumétrico, llevar a volumen con el mismo disolvente. Agitar y filtrar la solución a través de un filtro Millex de 0.45 micras o equivalente (Concentración final: 300 µg/mL).

### **Procedimiento**

Inyectar 6 veces la solución de referencia y calcular el coeficiente de variación para la suma de áreas de los picos correspondientes a Acido Asiático, Acido Madecásico y Asiaticósido. Si este es

menor de 1.5 %, inyectar la solución problema, en caso contrario, dejar estabilizar el sistema y repetir las inyecciones de la solución de referencia hasta que el coeficiente de variación sea menor de 1.5 %.

Inyectar la solución de referencia para comprobar la adecuabilidad del sistema, cada 6 soluciones de muestra analizadas.

### Cálculos.

Sumar las áreas de los picos con tiempo de retención cercanos a 4.1, 5.6 y 6.3 minutos. Cada pico corresponde al Asiaticósido, ácido madecásico y ácido asiático respectivamente.

Determinar los miligramos de Extracto de Centella Asiática por óvulo, aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{mg de Extracto de Centella Asiática/óvulo} = \frac{A_m}{A_s} * \frac{W_s}{50} * \frac{50}{W_m} * \frac{P_s}{100} * W_p$$

Donde:

$A_m$  = Suma de las áreas correspondientes al asiaticósido, ácido asiático y ácido madecásico en la solución de la muestra.

$A_s$  = Suma de las áreas correspondientes al asiaticósido, ácido asiático y ácido madecásico en la solución de referencia.

$W_s$  = Peso de la sustancia de referencia expresado en miligramos.

$P_s$  = Pureza de la sustancia de referencia, expresada en porcentaje.

$W_m$  = Peso de la muestra expresado en miligramos.

$W_p$  = Peso promedio de los óvulos expresado en miligramos.

### 3.- Validación del método.

#### 3.1.- Especificidad.

##### 3.1.1.- Especificidad del método indicativo de Control de calidad.

Se analizaron las siguientes muestras:

- \* Solución de Extracto de Centella Asiática Sustancia de Referencia.
- \* Solución de placebo, con todos los componentes de la formulación excepto el Extracto de Centella Asiática.
- \* Solución de placebo cargado al 100 %.

##### 3.1.2.- Especificidad del método indicativo de estabilidad.

Para probar la especificidad del método para análisis de estabilidad, se analizaron muestras de Estándar de Extracto de Centella Asiática, placebo con todos los componentes de la formulación excepto el Extracto de Centella Asiática y placebo cargado al 100 %, las cuales fueron sometidas a los siguientes tratamientos:

- \* Exposición a la luz durante 4 semanas.
- \* Hidrólisis en medio ácido, calentando a reflujo durante 24 h las soluciones con 20 mL de HCl 1.0 N
- \* Hidrólisis en medio alcalino, calentando a reflujo durante 24 h las soluciones con 20 mL de NaOH 1.0 N.

#### 3.2.- Linealidad del sistema.

Se prepararon 5 soluciones que correspondieron a las concentraciones de 50 %, 75 %, 100 %, 125 % y 150 %, preparadas, según se indica a continuación, a partir de una misma solución de Extracto de Centella Asiática, sustancia de referencia.

Se pesaron 375.0 mg de Extracto de Centella Asiática Sustancia de Referencia y se diluyeron a 100 mL con metanol, resultando una concentración de 3.75 mg/mL.

Todas las alícuotas de la solución de Extracto de Centella Asiática, se diluyeron a 50 mL con metanol HPLC.

Nivel (%)	Alicuota (mL)	mg adicionados	Concentración final (mg/mL)
50	2.0	7.50	0.150
75	3.0	11.25	0.225
100	4.0	15.00	0.300
125	5.0	18.75	0.375
150	6.0	22.50	0.450

Cada una de las concentraciones se preparó y analizó por triplicado.

Se construyó la curva de calibración (concentración contra respuesta medida).

#### 3.3.- Repetibilidad del sistema.

Se determinó el análisis por sextuplicado de una misma solución de Extracto de Centella Asiática Sustancia de Referencia, correspondiente al 100 %.

### **3.4.- Linealidad del método.**

Se realizó el mismo procedimiento que para la linealidad del sistema en cuanto a la solución de Extracto de Centella Asiática Sustancia de Referencia y adicionalmente a cada muestra se le agregaron 2 g de placebo, que contiene todos los componentes de la formulación excepto el analito en estudio, para lo cual, se preparó una solución de placebo pesando 40 g de éste y diluyendo a un volumen de 100 mL con metanol. De esta solución se tomaron 5 mL y se adicionaron a cada muestra antes de la dilución final.

Nivel (%)	Alicuota sol Patrón Std. (mL)	Alicuota sol. del placebo. (mL)	mg adicionados	Concentración (mg/mL)
50	2.0	5.0	7.50	0.150
75	3.0	5.0	11.25	0.225
100	4.0	5.0	15.00	0.300
125	5.0	5.0	18.75	0.375
150	6.0	5.0	22.50	0.450

Se preparó y analizó por triplicado cada una de las muestras.

### **3.5.- Exactitud del método.**

Se realizó preparando y analizando diez muestras de placebo cargado al 100 %.

### **3.6.- Precisión del método.**

#### **3.6.1.- Repetibilidad del método.**

Para evaluar este parámetro se utilizaron los datos obtenidos en la exactitud del método, determinando el coeficiente de variación (C.V.).

#### **3.6.2.- Reproducibilidad del método.**

Se realizó analizando una muestra homogénea del producto, por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.

### **3.7.- Estabilidad de la muestra analítica.**

De las muestras preparadas para evaluar la Exactitud del método, se tomaron 9 soluciones, tres muestras se dejaron sobre la mesa de trabajo, a exposición de la luz y temperatura ambiente, tres se guardaron en una gaveta (obscuridad) y las tres restantes se guardaron en el refrigerador.

Se reanalizaron a las 24 y 48 horas, empleando cada día una solución de Extracto de Centella Asiática Sustancia de Referencia, recientemente preparada.

### **3.8.- Tolerancia del método.**

Se realizó variando los siguientes parámetros:

a) Se utilizaron 2 diferentes marcas comerciales de disolvente de la muestra.

b) Se varió la velocidad de flujo de la fase móvil: el control fue 0.8 mL/min, la modificación fue 1.0 mL/min.



## V. RESULTADOS

### I.- Especificidad.

#### I.1.- Especificidad del método indicativo de Control de Calidad.

Al inyectar la solución de placebo ( Figura No. 3 ), que contiene todos los componentes de la formulación, excepto el Extracto de Centella Asiática, no se observan picos con tiempos de retención similares a los picos que presenta la solución de Referencia del Extracto de Centella Asiática (Figura No 4).

Al inyectar la solución de placebo cargado ( Figura No. 5 ), se observan los tres picos correspondientes a los componentes del Extracto de Centella Asiática, en tiempos y áreas similares a los picos que aparecen en la solución de referencia de Extracto de Centella Asiática, además de los picos característicos de la solución placebo.

#### I.2.- Especificidad del método indicativo de estabilidad.

Las muestras degradadas por la acción de la luz fueron preparadas como indica el método analítico y al inyectarlas al cromatógrafo de líquidos se observó lo siguiente:

La solución de referencia ( Figura No. 6 ) no presenta degradación por efecto de la luz, se observan los mismos picos característicos que los presentes en una solución de referencia de Centella Asiática recientemente preparada.

La solución de Placebo ( Figura No. 7 ) presenta una serie de picos no resueltos que inician desde los 2.8 min. hasta 4.9 min.

En el cromatograma correspondiente a la solución de placebo cargado ( Figura No. 8 ), se observa interferencia con el primer pico del Extracto de Centella Asiática, correspondiente a el asiaticósido que eluye a los 4.1 min. Los demás picos no presentan ninguna interferencia.

Las muestras degradadas en medio ácido, dieron los siguientes resultados:

La solución de placebo ( Figura No. 9 ), que contiene todos los componentes de la formulación excepto el Extracto de Centella Asiática, degradado en estas condiciones exhibe un pico a los 5.05 min.

La solución de placebo cargado ( Figura No. 10 ), exhibe el pico observado en la solución placebo degradado a los 5.07 min y en seguida el pico correspondiente al Acido Madecásico a los 5.43 min, la separación entre ambos es mínima, sin embargo sí se logra resolver los picos.

El Asiaticósido se degradó casi completamente, ya que se observa un pico muy pequeño a los 4.1 min y el pico correspondiente al Acido Asiático está incrementado a aproximadamente el triple de área y altura.

En la solución de referencia degradada ( Figura No. 11 ), se observa lo siguiente: Sólo se observan tres picos: el pico correspondiente al Asiaticósido, de tamaño mucho más pequeño que el que se presenta en una solución recientemente preparada, el siguiente pico es el correspondiente al Acido Madecásico a los 5.45 min., el tercer pico correspondiente al Acido Asiático, se observa incrementado aproximadamente al triple de área y altura con respecto a la solución de referencia sin degradar.

Las muestras degradadas en medio alcalino dieron los siguientes resultados:

En el cromatograma correspondiente a la solución de placebo, ( Figura No. 12 ), que contiene todos los componentes de la formulación excepto el Extracto de Centella Asiática, se observan picos con tiempos de retención de 2.74, 3.18, 3.64, 3.9 y 6.0 min. que no son similares a los tiempos de retención de los componentes del Extracto de Centella asiática, en una solución de la Sustancia de

Referencia.

En el cromatograma correspondiente al placebo cargado ( Figura No. 13 ) se observan los mismos picos que presenta el cromatograma de la solución de placebo degradado y adicionalmente picos de tiempos de retención similares a los observados en una solución de Extracto de Centella Asiática sin degradar, pero la altura y el área de los picos es muy característica:

El pico correspondiente al asiaticósido (  $t_r = 4.2$  min. ) presenta área y altura menor que la correspondiente al mismo compuesto en una solución sin degradar.

El pico correspondiente al ácido madecásico no presenta diferencia significativa de área y altura respecto al mismo compuesto en una solución sin degradar, pero el pico debido al ácido asiático presenta área aproximadamente tres veces mayor que el valor que presenta el mismo compuesto en una solución sin degradar.

En el comatograma correspondiente a la solución de Referencia ( Figura No. 14 ), se observan solo los tres picos de los componentes del Extracto de Centella Asiática, con las mismas características de disminución de área del pico debido al asiaticósido e incremento de área en el pico correspondiente al ácido asiático.

## 2.- Linealidad del sistema.

En la gráfica No. 1 se presentan los resultados obtenidos para evaluar este parámetro.

Los datos de los análisis realizados se muestran a continuación, junto con  $x^2$ ,  $y^2$ ,  $xy$  y la curva corregida por mínimos cuadrados:

Tabla No. 1 Linealidad del sistema.

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) x	Area y	$x^2$	$y^2$	Xy	Curva corregida
0					-0.38
150	6.2392	22500	38.9276	935.8800	6.3258
150	6.2736	22500	39.3581	941.0400	6.3258
150	6.2347	22500	38.8715	935.2050	6.3258
225	9.6488	50625	93.0993	2170.9800	9.6773
225	9.8618	50625	97.2551	2218.9050	9.6773
225	9.9461	50625	98.9249	2237.8725	9.6773
300	12.9907	90000	168.7583	3897.2100	13.0289
300	12.9481	90000	167.6533	3884.4300	13.0289
300	13.0597	90000	170.5558	3917.9100	13.0289
375	16.3414	140625	267.0414	6128.0250	16.3805
375	16.2844	140625	265.1817	6106.6500	16.3805
375	16.3368	140625	266.8910	6126.3000	16.3805
450	19.7455	202500	389.8848	8885.4750	19.7320
450	19.8586	202500	394.3640	8936.3700	19.7320
450	19.6639	202500	386.6690	8848.7550	19.7320
$\Sigma = 4500$	195.4333	1518750	2883.4356	66171.0075	

Número de observaciones (  $n$  ) = 15.

Los coeficientes de correlación (  $r$  ) y de determinación (  $r^2$  ) para la recta de regresión son los siguientes:

$$r = 0.9997$$

$$r^2 = 0.9995$$

0.9995 es mayor que 0.98 y 0.9997 es mayor que 0.99, por lo tanto el sistema es lineal.

Figura No. 3 Especificidad para método indicativo de Control de Calidad.  
Solución de Placebo que contiene todos los componentes de la formulación excepto el  
Extracto de Centella Asiática.

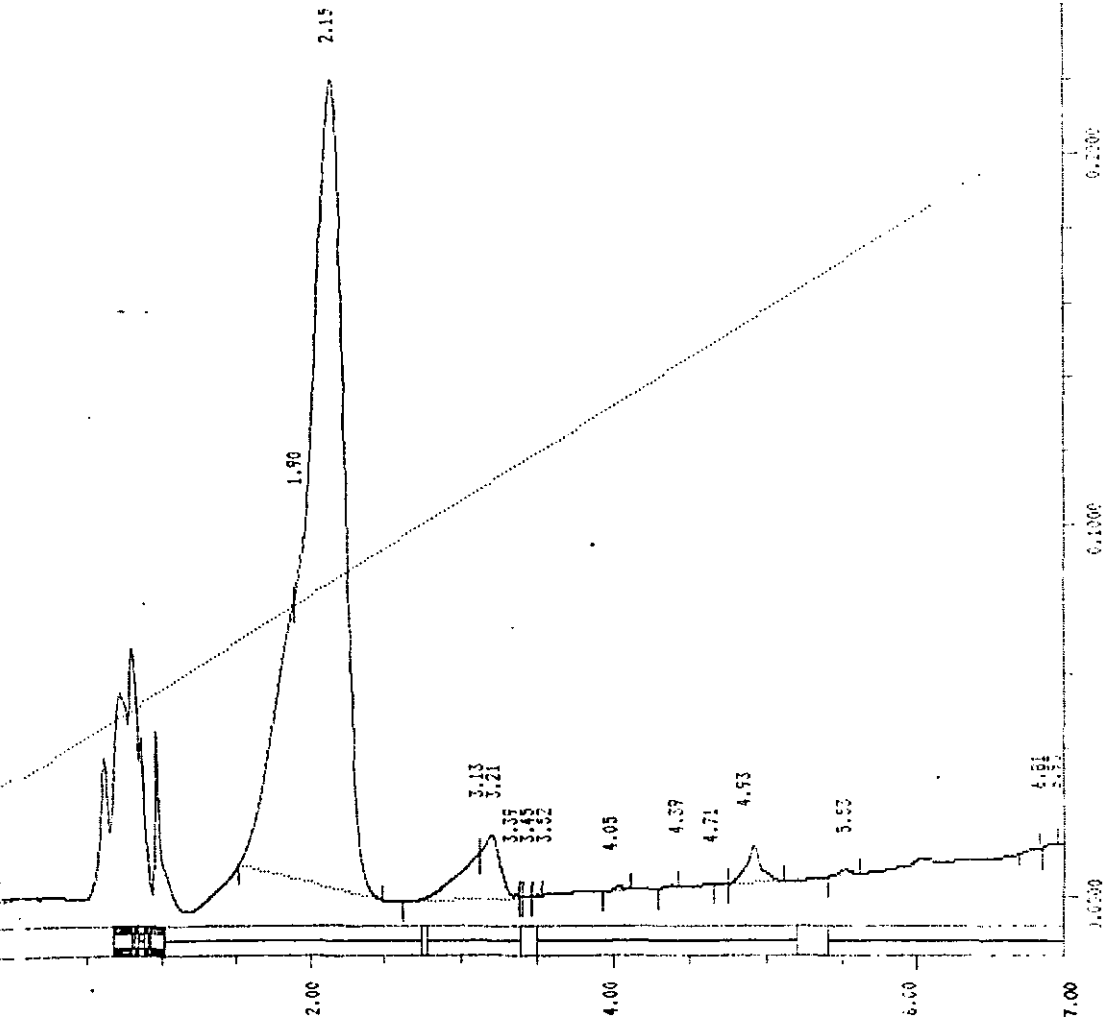


Figura No. 4 Especificidad para método indicativo de Control de Calidad  
Solución de Referencia de Extracto de Centella Asiática.

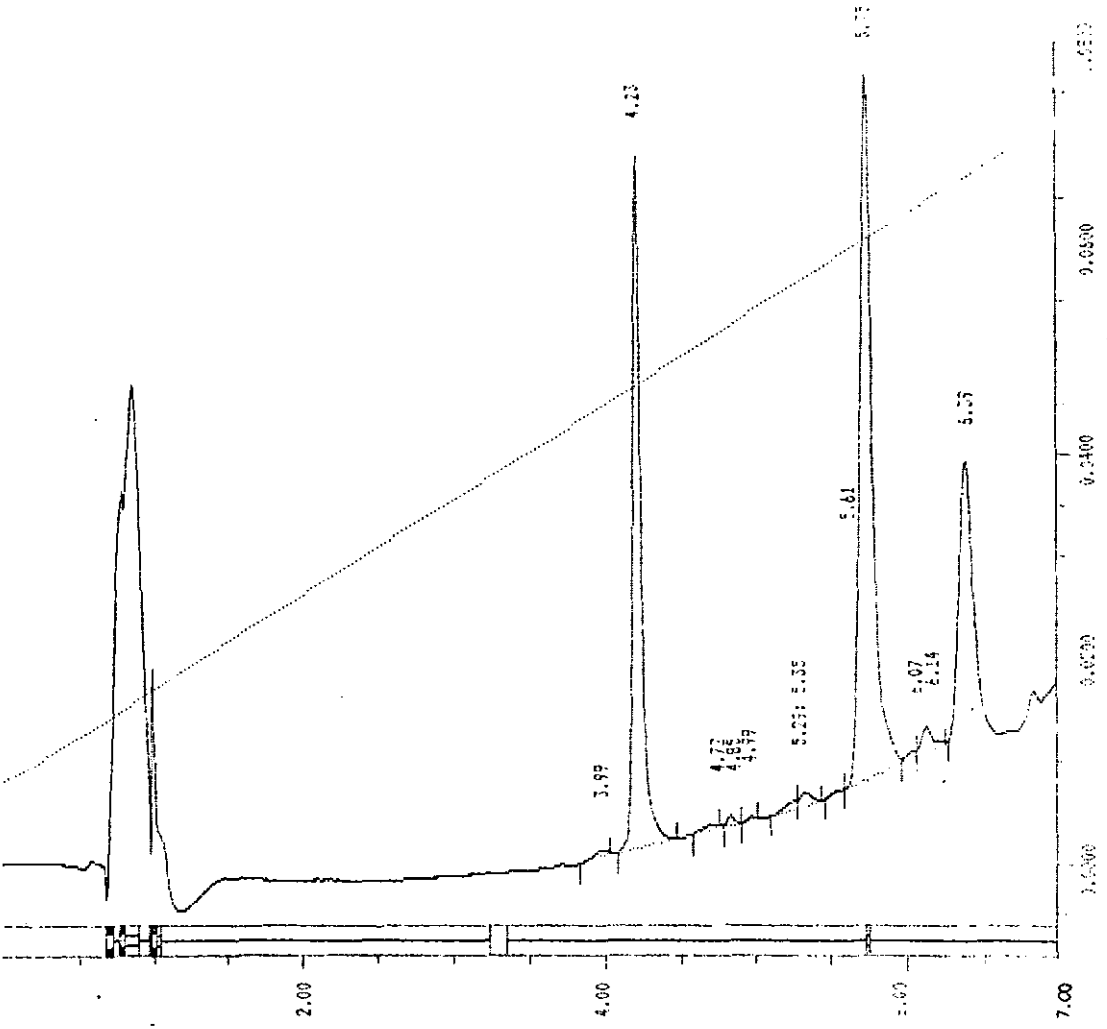


Figura No. 5 Especificidad para método indicativo de Control de Calidad  
Solución de placebo cargado al 100 % con Extracto de Centella Asiática.

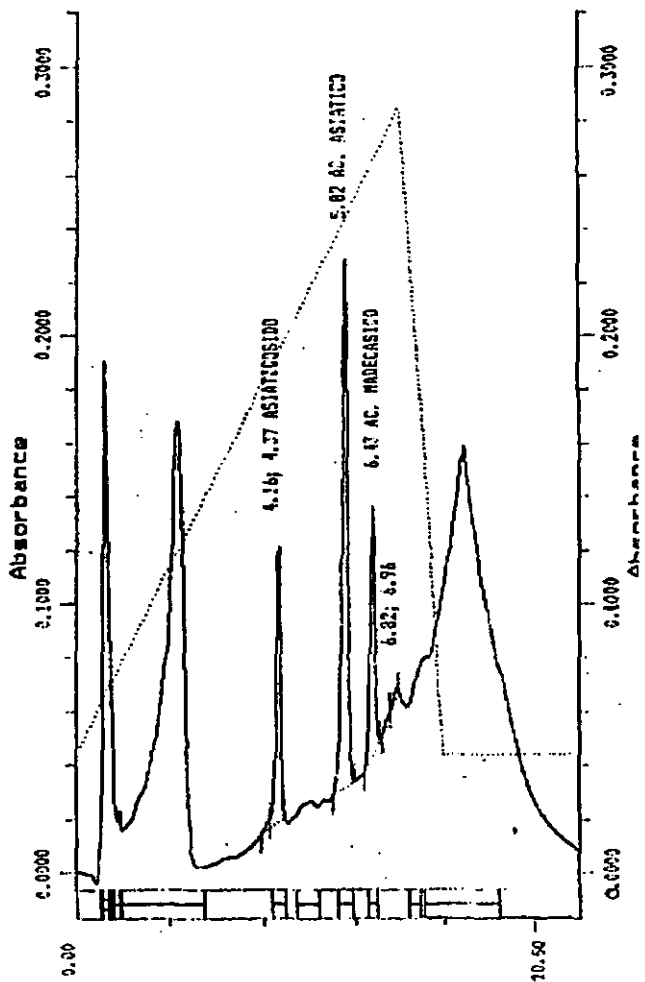


Figura No. 6 Especificidad para método indicativo de estabilidad.

Solución de Referencia de Extracto de Centella Asiática degradada por exposición a la luz a temperatura ambiente.

Peak	Retention Time	Component Name	Concentration mg / mL	Peak Area	Peak Height	Base Code	Response Factor	Rel. Ret Time	Area Percent	Height Percent
1	2.500									
2	4.077		4.4967	4.49675	0.05757	BCB	1.0000	0.0000	32.498	37.787
3	4.538		0.0000	0.01465	0.00034	BCB	0.0000	0.0000	0.105	0.225
4	4.814		0.0323	0.03231	0.00042	BCB	1.0000	0.0000	0.234	0.278
5	5.149		0.0000	0.03823	0.00048	BCB	0.0000	0.0000	0.276	0.313
6	5.633		6.5672	6.56716	0.06791	BCS	1.0000	0.0000	47.460	44.573
7	5.893		0.0074	0.00744	0.00059	SNB	1.0000	0.0000	0.054	0.388
8	6.080		0.0803	0.08028	0.00114	BCB	1.0000	0.0000	0.580	0.748
9	6.330		2.6004	2.60037	0.02390	BCB	1.0000	0.0000	18.793	15.688

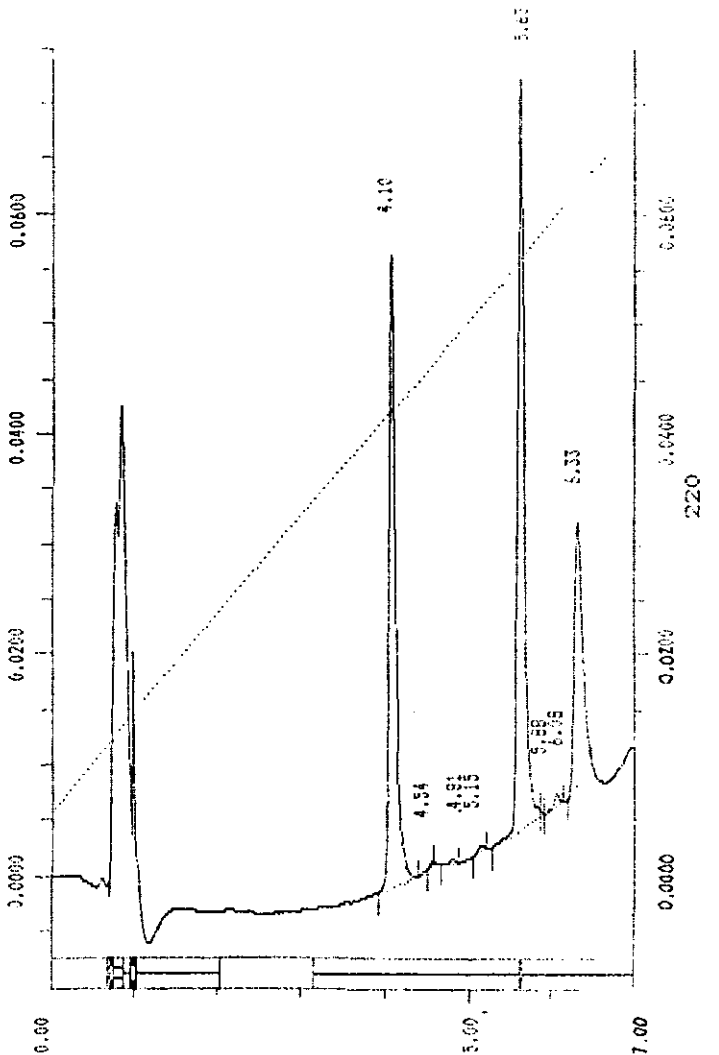


Figura No. 7 Especificidad para método indicativo de estabilidad.

Solución de placebo, que contiene todos los componentes de la formulación excepto el Extracto de Centella Asiática degradada por exposición a la luz a temperatura ambiente.

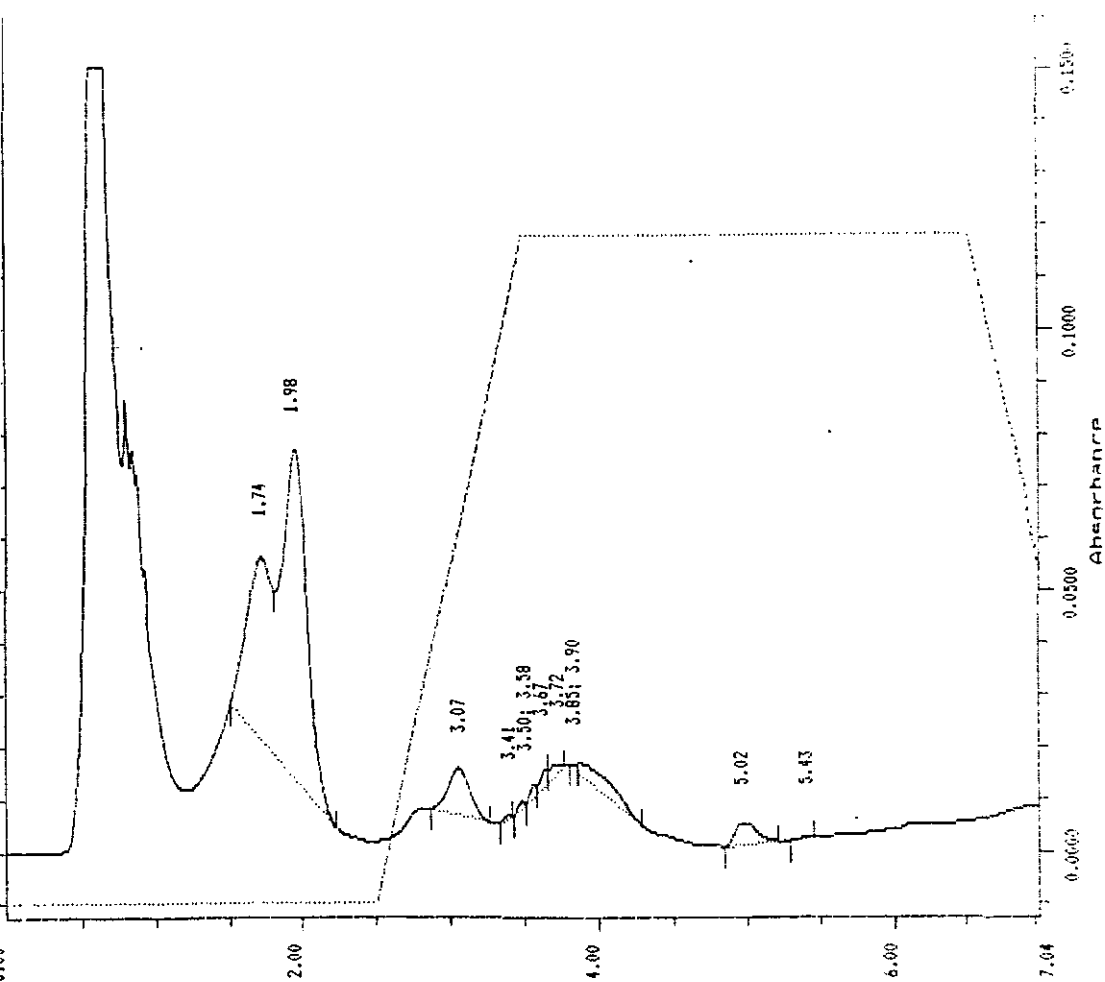


Figura No. 8 Especificidad para método indicativo de estabilidad.  
 Solución de placebo cargado al 100 % con Extracto de Centella Asiática, degradada por exposición a la luz a temperatura ambiente.

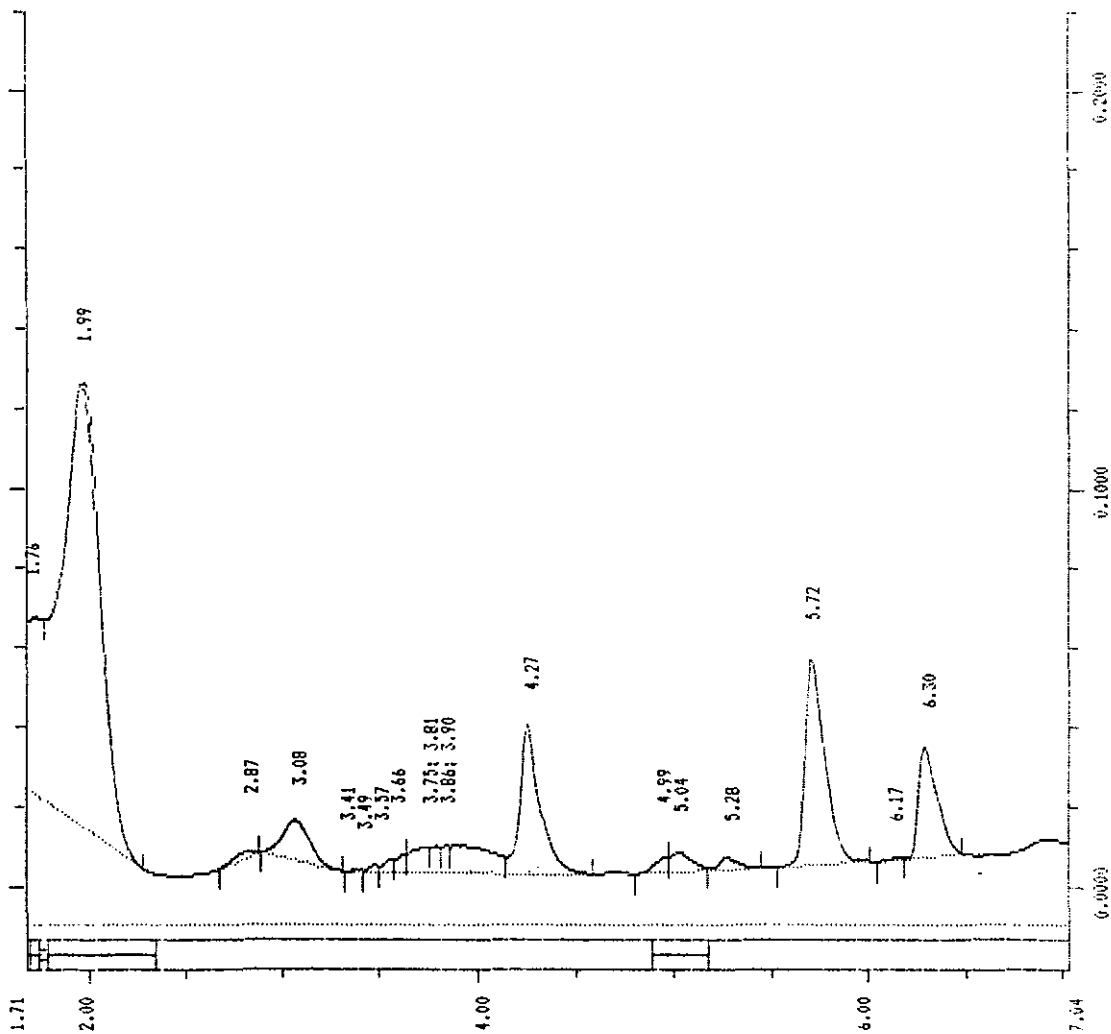




Figura No. 9 Especificidad para método indicativo de estabilidad.  
Solución de placebo, que contiene todos los componentes de la formulación excepto  
el Extracto de Centella Asiática degradada en medio ácido.

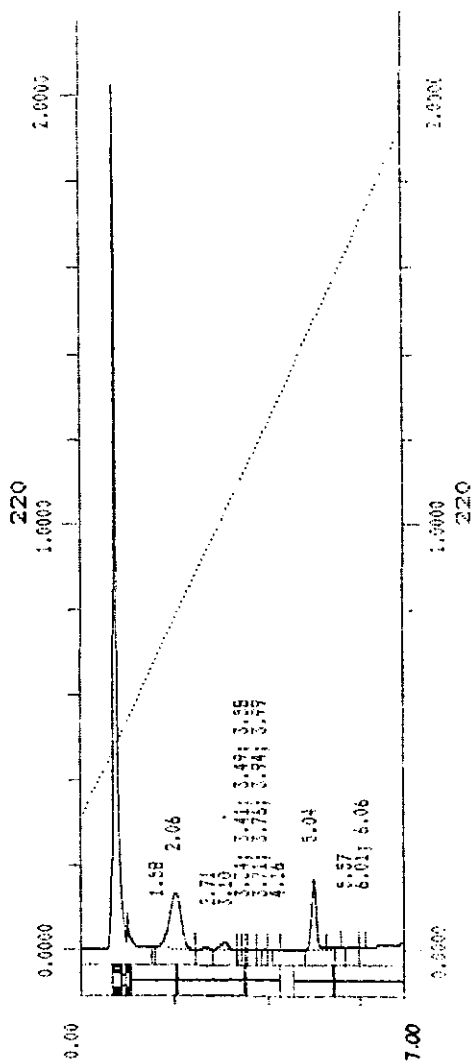


Figura No. 10 Especificidad para método indicativo de estabilidad.

Solución de placebo cargado al 100 % con Extracto de Centella Asiática, degradada en medio ácido.

Peak Number	Retention Time	Component Name	Concentration (µg / mL)	Peak Area	Peak Height	Base Code	Response Factor	Rel. Ret Time	Area Percent	Height Percent
1	2.148 2.506		64.4007	64.40072	0.19134	BCP	1.0000	0.0000	66.282	40.172
2	3.117		1.7250	1.72496	0.01441	BNS	1.0000	0.0000	1.775	3.026
3	3.205		3.1535	3.15348	0.02066	SCS	1.0000	0.0000	3.246	4.337
4	3.400		0.0335	0.03348	0.00054	SNS	1.0000	0.0000	0.034	0.115
5	3.467		0.0149	0.01494	0.00019	SNB	1.0000	0.0000	0.015	0.046
6	3.754		0.1733	0.17333	0.00151	BCV	1.0000	0.0000	0.179	0.317
7	3.926		0.1259	0.12595	0.00117	VCV	1.0000	0.0000	0.149	0.245
8	4.154		0.6126	0.61252	0.00886	VCV	1.0000	0.0000	0.630	1.860
9	4.261		0.5339	0.53368	0.00735	VCB	1.0000	0.0000	0.550	1.544
10	4.531		0.0000	0.11065	0.00130	BCB	0.0000	0.0000	0.114	0.273
11	5.102		0.0000	11.33813	0.09841	BNS	0.0000	0.0000	11.669	20.662
12	5.275		0.0530	0.05300	0.00284	SNV	1.0000	0.0000	0.054	0.596
13	5.447		7.4325	7.43253	0.05533	VCB	1.0000	0.0000	7.656	11.616
14	5.363		0.0920	0.09797	0.00106	BCV	1.0000	0.0000	0.091	0.222
15	6.059		0.0695	0.06947	0.00066	VNS	1.0000	0.0000	0.071	0.179
16	6.204		7.2812	7.28115	0.07047	SCR	1.0000	0.0000	7.494	14.796

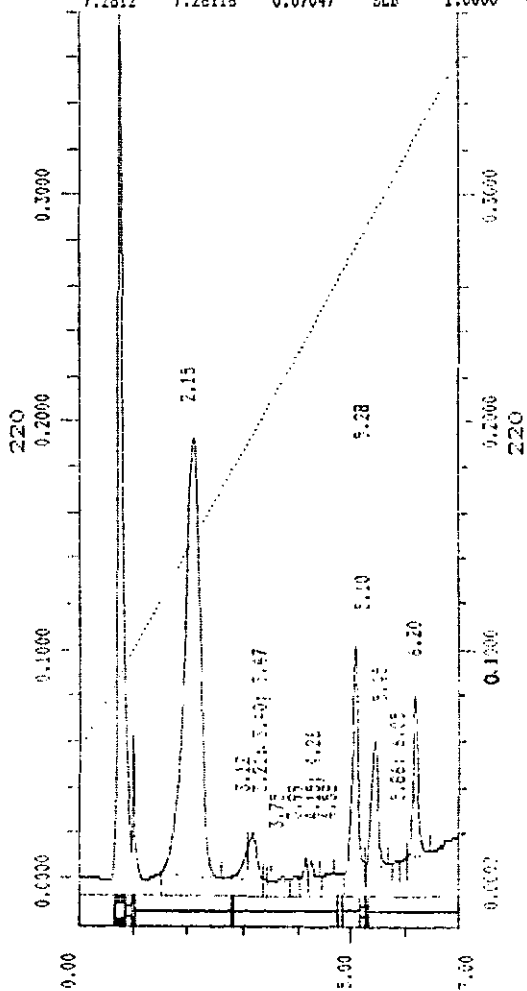


Figura No. 11 Especificidad para método indicativo de estabilidad.

Solución de Referencia de Extracto de Centella Asiática degradada en medio ácido.

Peak Number	Retention Time	Component Name	Concentration mg / mL	Peak Area	Peak Height	Base Code	Response Factor	Rel. Ret Time	Area Percent	Height Percent
	2.500									
1	3.766		0.0363	0.03628	0.00072	BCB	1.0000	0.0000	0.273	0.596
2	3.998		0.0365	0.03649	0.00091	BCB	1.0000	0.0000	0.275	0.676
3	4.183		0.4315	0.43150	0.00702	BCV	1.0000	0.0000	3.249	5.818
4	4.285		0.0000	0.40241	0.00387	VCB	0.0000	0.0000	3.031	4.870
5	5.228		0.0000	0.11045	0.00163	BCV	0.0000	0.0000	0.831	1.348
6	5.420		5.1752	6.17621	0.04447	VCB	1.0000	0.0000	46.507	36.875
7	5.848		0.0513	0.05132	0.00072	BCB	1.0000	0.0000	0.386	0.600
8	6.053		0.1205	0.12048	0.00168	BCV	1.0000	0.0000	0.908	0.893
9	6.184		5.9146	5.91456	0.05327	VCB	1.0000	0.0000	44.538	48.324

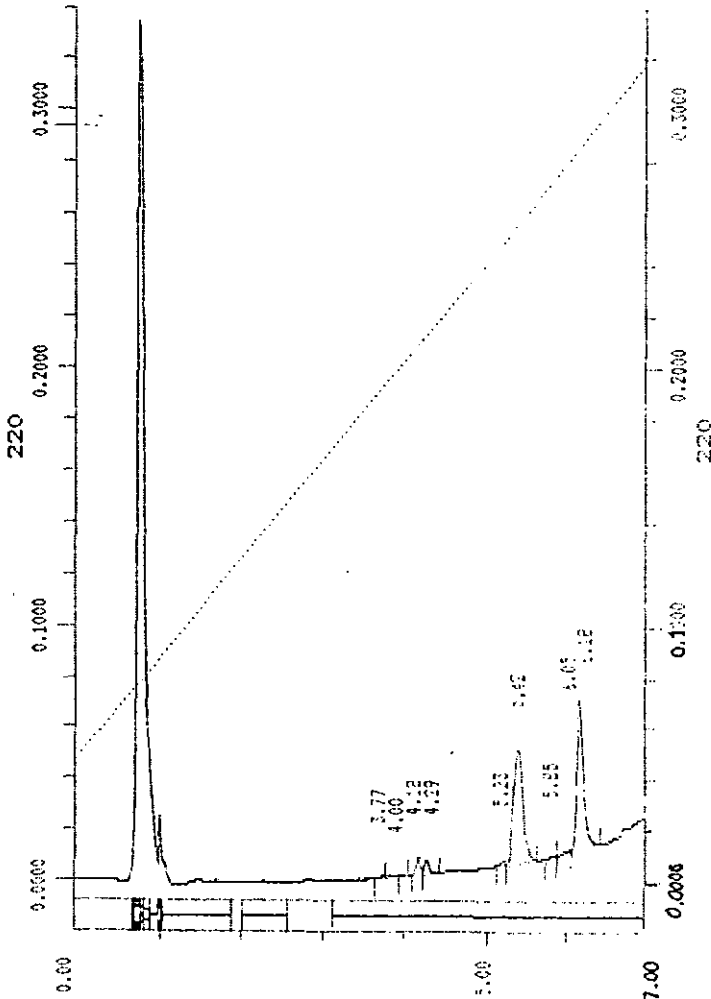


Figura No. 12 Especificidad para método indicativo de estabilidad.

Solución de placebo, que contiene todos los componentes de la formulación excepto el Extracto de Centella Asiática degradada en medio alcalino.

Peak	Retention Time	Component Name	Concentration mg / mL	Normalized Concentration	Peak Area	Peak Height	Base Code	Response Factor	Rel. Ret Time	Area Percent	Height Percent
1	2.738		0.0000	0.000	6.02525	0.03269	BCV	0.0000	0.0000	61.127	58.410
2	3.176		0.0000	0.000	3.30903	0.01759	VCB	0.0000	0.0000	33.570	31.430
3	3.639		0.0000	0.000	0.12551	0.00140	BCB	0.0000	0.0000	1.273	2.565
4	3.871		0.0000	0.000	0.07121	0.00102	BCB	0.0000	0.0000	0.723	1.831
5	4.091		0.0000	0.000	0.01681	0.00030	BCB	0.0000	0.0000	0.170	0.542
6	6.629		0.0000	0.000	0.30920	0.00276	BCB	0.0000	0.0000	3.137	5.282

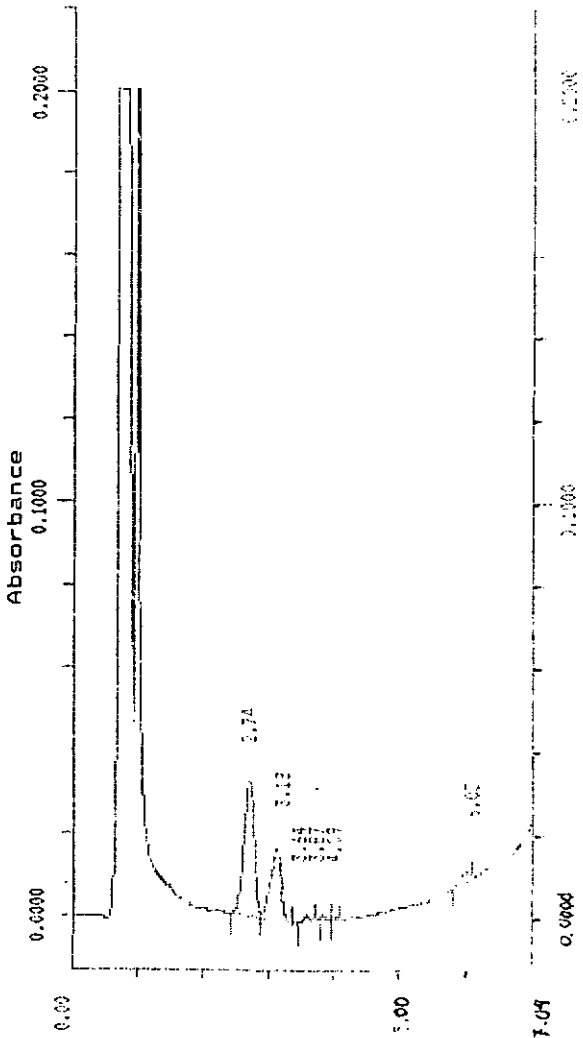


Figura No. 13 Especificidad para método indicativo de estabilidad.

Solución de placebo cargado al 100 % con Extracto de Centella Asiática, degradada en medio alcalino.

Retention Time	Component Name	Concentration ag / mL	Normalized Concentration	Peak Area	Peak Height	Base Code	Response Factor	Rel. Ret Time	Area Percent	Height Percent
1	2.864	0.0000	0.000	7.40504	0.04200	BCB	0.0000	0.0000	28.577	23.420
2	3.435	0.0000	0.000	3.88064	0.02258	BCB	0.0000	0.0000	14.976	12.590
3	3.915	0.0000	0.000	0.12876	0.00190	BCS	0.0000	0.0000	0.497	1.061
4	3.950	0.0000	0.000	0.09381	0.00130	SNV	0.0000	0.0000	0.362	0.723
5	4.120	0.0000	0.000	0.05512	0.00199	VCV	0.0000	0.0000	0.212	0.608
6	4.236	0.0000	0.000	1.11978	0.01983	VCS	0.0000	0.0000	4.322	11.055
7	4.308	0.0000	0.000	0.11478	0.00238	SNB	0.0000	0.0000	0.443	1.327
8	4.525	0.0000	0.000	0.04044	0.00069	BBB	0.0000	0.0000	0.158	0.383
9	5.133	0.0000	0.000	0.10934	0.00159	BNS	0.0000	0.0000	0.422	0.886
0	5.322	0.0000	0.000	6.36468	0.03365	SES	0.0000	0.0000	24.562	18.765
1	5.458	0.0000	0.000	0.29537	0.00453	SNB	0.0000	0.0000	1.140	2.528
2	5.912	0.0000	0.000	0.10655	0.00112	BCV	0.0000	0.0000	0.411	0.625
3	5.991	0.0000	0.000	6.19836	0.04668	VCS	0.0000	0.0000	23.920	26.029

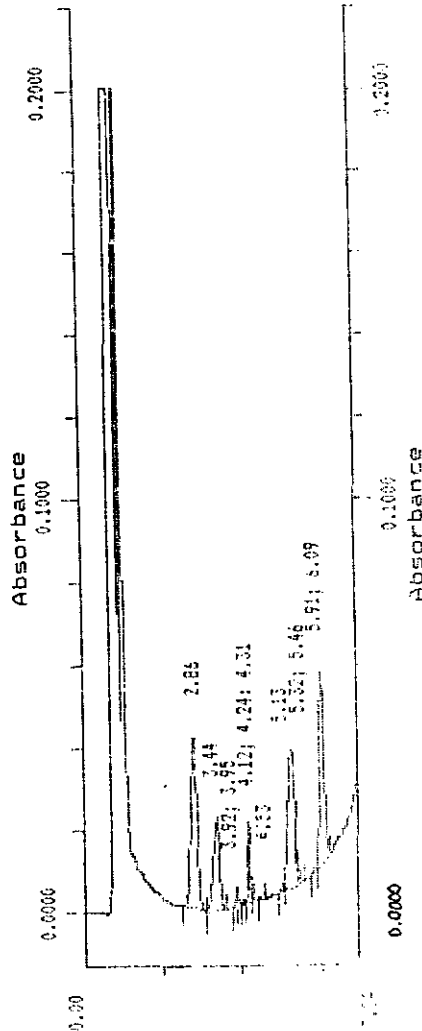
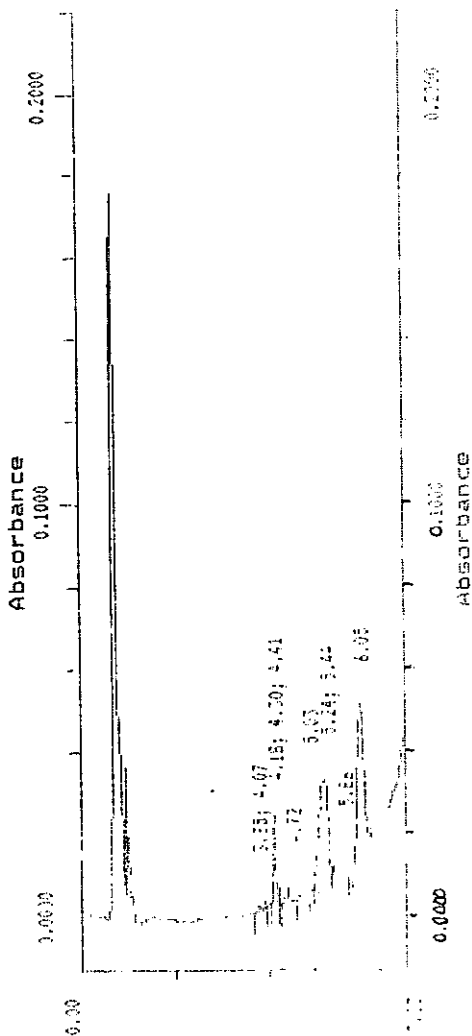


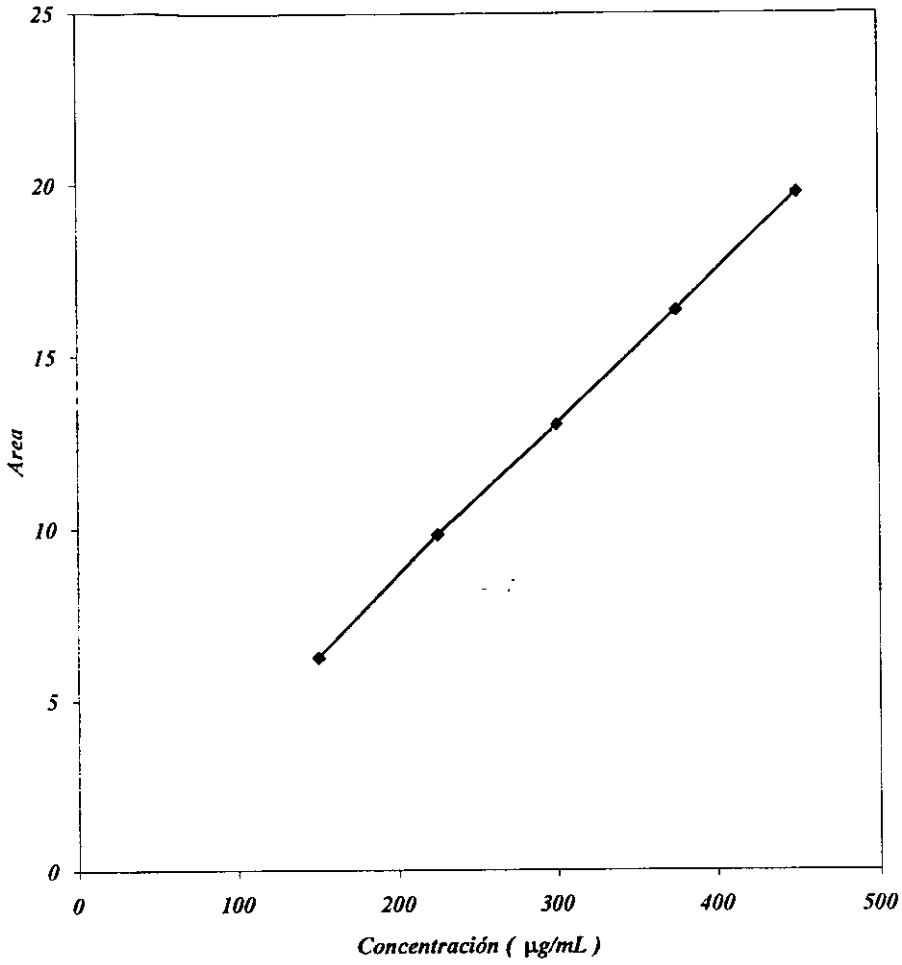
Figura No. 14 Especificidad para método indicativo de estabilidad.

Solución de Referencia de Extracto de Centella Asiática degradada en medio alcalino.

Retention Time	Component Name	Concentration ng / mL	Normalized Concentration	Peak Area	Peak Height	Base Code	Response Factor	Ret. Time	Area Percent	Height Percent
3.856		0.0000	0.000	0.17650	0.00185	BCB	0.0000	0.0000	1.266	1.878
4.667		0.0000	0.000	0.39369	0.00150	BCV	0.0000	0.0000	0.665	1.527
4.183		0.0000	0.000	1.35373	0.02214	VCS	0.0000	0.0000	9.603	22.521
4.300		0.0000	0.000	0.00979	0.00065	SNV	0.0000	0.0000	0.070	0.859
4.405		0.0000	0.000	0.05810	0.00116	VCB	0.0000	0.0000	0.412	1.181
4.720		0.0000	0.000	0.06757	0.00096	BCB	0.0000	0.0000	0.479	0.972
5.033		0.0000	0.000	0.07061	0.00143	BNS	0.0000	0.0000	0.501	1.453
5.237		0.0000	0.000	6.07039	0.02716	SEV	0.0000	0.0000	43.064	27.651
5.436		0.0000	0.000	0.25129	0.00419	VCB	0.0000	0.0000	1.854	4.265
5.859		0.0000	0.000	0.04785	0.00054	BCV	0.0000	0.0000	0.339	0.850
6.049		0.0000	0.000	5.69471	0.03651	VCB	0.0000	0.0000	41.747	37.143



Grafica No. 1 Linealidad del sistema



### 3.- Repetibilidad del sistema.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla No. 2:

Tabla No. 2 Repetibilidad del sistema.

Número de Determinación	Respuesta (y)
1	12.9907
2	12.9481
3	13.0597
4	13.3535
5	13.2082
6	13.2014

Se determinó la sumatoria de y ( $\Sigma y$ ):

$$\Sigma y = 78.76$$

Se determinó la sumatoria de  $y^2$  ( $\Sigma y^2$ ):

$$\Sigma y^2 = 1034.02$$

Se calculó el promedio de las y ( $y_p$ ):

$$y_p = 13.13$$

Se calculó la desviación estándar (s):

$$s = 0.15398$$

Se calculó el coeficiente de variación (C.V.):

$$C.V. = 1.2\%$$

1.2% es menor que 1.5% por lo que se concluye que el sistema es preciso.

### 4.- Linealidad del método.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 3.

En la gráfica No. 2 se encuentran representados los miligramos adicionados contra los miligramos recuperados. Se determinó la pendiente (m), la ordenada al origen (b), el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) para la recta obtenida, obteniendo los siguientes resultados:

$$m = 1.0244$$

$$b = -0.4037$$

$$r = 0.9992$$

$$r^2 = 0.9984$$



*Gráfica No. 2 Linealidad del método*

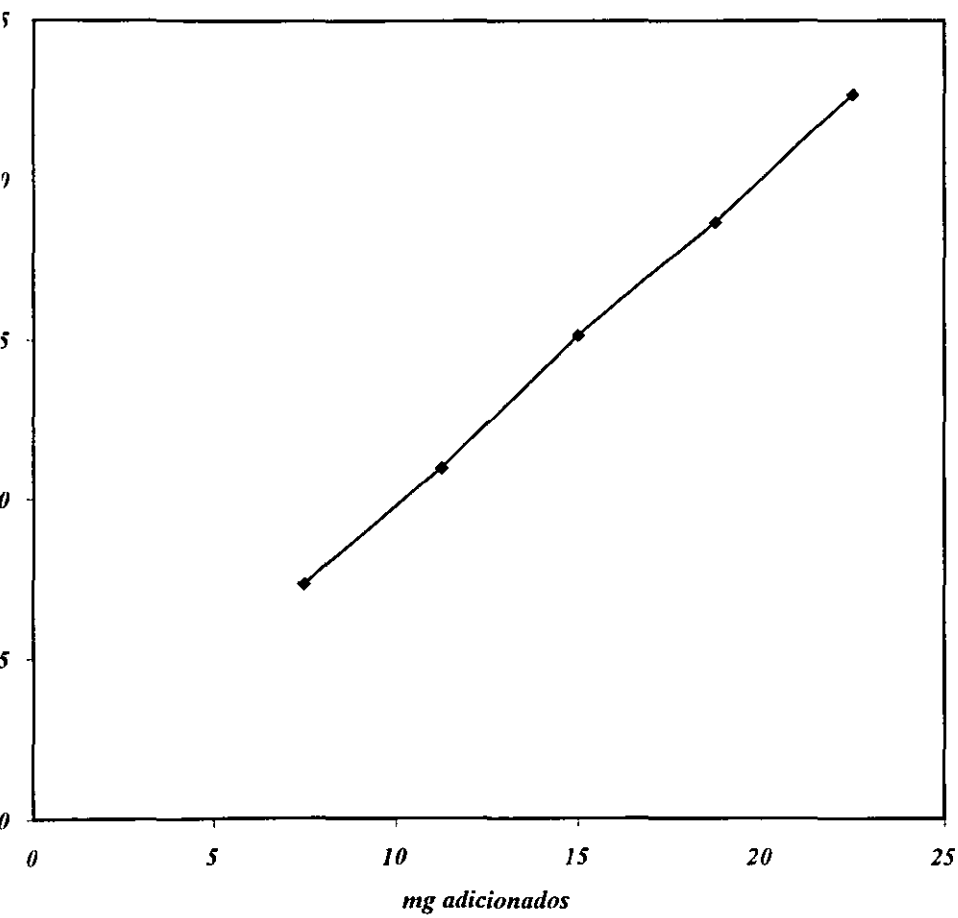


Tabla No. 3 Linealidad del método.

Miligramos Adicionados X	Miligramos Recuperados y	$x^2$	$y^2$	xy	$y_i^2$	Curva Corregida
0						-0.404
7.4980	7.1201	56.220	50.696	53.387		7.277
7.4980	7.0785	56.220	50.105	53.075		7.277
7.4980	7.7913	56.220	60.704	58.419	483.556	7.277
11.2470	10.9243	126.495	119.340	122.866		11.118
11.2470	10.9224	126.495	119.299	122.844		11.118
11.2470	11.0699	126.495	122.543	124.503	1083.503	11.118
14.9960	15.1246	224.880	228.754	226.809		14.958
14.9960	15.0830	224.880	227.497	226.185		14.958
14.9960	15.2080	224.880	231.283	228.059	2062.577	14.958
18.7450	18.4800	351.375	341.510	346.408		18.799
18.7450	18.7246	351.375	350.611	350.993		18.799
18.7450	18.7926	351.375	353.162	352.267	3135.686	18.799
22.4940	22.4419	505.980	503.639	504.808		22.640
22.4940	22.7442	505.980	517.299	511.608		22.640
22.4940	22.8718	505.980	523.119	514.478	4631.878	22.640

$\Sigma = 224.94$        $224.3772$        $3794.85$        $3799.56$        $3796.708$        $11397.199$   
 $n = \text{número de observaciones} = 15$        $r = \text{número de repeticiones} = 3$        $t = \text{número de tratamientos} = 5$

Para determinar si la pendiente y la ordenada al origen de la recta obtenida son estadísticamente igual a 1 y 0 respectivamente, se aplicó la prueba estadística t de Student, realizando los siguientes cálculos:

Se calculó la media cuadrática del error de regresión ( McErrReg ), la media cuadrática de regresión ( McReg ), la desviación estándar de la pendiente (  $s_m$  ), la desviación estándar para la ordenada al origen (  $s_b$  ), la t para la pendiente (  $t_m$  ) y la t para la ordenada al origen (  $t_b$  ).

Se obtuvieron los siguientes resultados:

$$\text{McErrReg} = 0.0556$$

$$\text{McReg} = 442.50$$

$$s_m = 0.2620$$

$$s_b = 0.265$$

$$t_m = -0.093$$

$$t_b = 1.526$$

En las tablas de distribución t de Student, se determinó el valor para la t con n-1 grados de libertad y un nivel de significancia de 0.95 (  $t_{(n-1;0.95)}$  ) :

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

$$t_{(n-1;0.95)} = t_{(14;0.95)} = 2.145$$

Criterio de aceptación :

0.093 es menor que 2.145, por lo tanto el método analítico, estadísticamente, tiene una pendiente igual a 1.

1.526 es menor que 2.145, por lo tanto el método analítico es lineal con una ordenada al origen igual a 0.

Para realizar el análisis de varianza se obtuvieron los siguientes resultados:

$$SCr = 442.49$$

$$SCer = 0.7231$$

$$Scep = 0.4941$$

$$SCfa = 0.2290$$

Con estos resultados se construyó la tabla de análisis de varianza:

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Media de Cuadrados	F <sub>calculada</sub>	F <sub>tablas</sub>
Regresión	1	442.5	442.5	Fr = 7955	F <sub>(1;13;0.99)</sub> =9.07
Error de regresión	13	0.7231	0.0556		
Falta de ajuste	3	0.2290	0.0763	Ffa = 1.5451	F <sub>(3;10;0.95)</sub> =3.71
Error puro	10	0.4941	0.0494		

Criterio de aceptación:

7955 es mayor que 9.07 y 1.55 es menor que 3.71, por lo tanto el modelo lineal es correcto para describir la relación existente entre miligramos adicionados y miligramos recuperados.

### 5.- Exactitud del método.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla No. 4:

Se calculó el valor de t :

$$t = 0.117$$

En las tablas de distribución t de Student, se determinó el valor para la t con n-1 grados de libertad y un nivel de significancia de 0.95 :

$$t_{(9;0.95)} = 2.262$$

Tabla No. 4 Exactitud del método.

Observación ( n )	% recuperado ( y )
1	100.10
2	100.70
3	99.40
4	102.50
5	100.20
6	98.50
7	99.30
8	100.90
9	99.80
10	99.00

$$y_p = \text{promedio de las } y = 100.04 \%$$

$$s = \text{desviación estándar de } y = 1.083$$

0.117 es menor que 2.262 por lo tanto el método analítico es exacto.

## 6.- Precisión del método.

### 6.1 Repetibilidad del método.

Para evaluar este parámetro, se utilizaron los datos obtenidos al evaluar la exactitud del método.

Se determinó el coeficiente de variación ( C.V. ):

$$C.V. = 1.1 \%$$

1.1 % es menor que 2.0 %, por lo tanto el método analítico es repetible.

### 6.2 Reproducibilidad del método.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla No. 5

Tabla No. 5. Reproducibilidad del método.

DIA (j)	ANALISTA (i)	
	1	2
1	101.30	101.19
	101.30	100.56
	104.00	100.81
2	102.00	101.99
	102.60	102.61
	102.00	102.83

Se calculó la suma de las combinaciones analista-día (  $y_{ij}$  ):

$$y_{11} = 101.30 + 101.30 + 104.00 = 306.60$$

$$y_{12} = 101.19 + 100.56 + 100.81 = 306.60$$

$$y_{21} = 102.00 + 102.60 + 102.00 = 302.56$$

$$y_{22} = 101.99 + 102.61 + 102.83 = 307.43$$

Se calculó la suma para cada analista ( $y_{i..}$ ):

$$y_{1..} = 101.30 + 101.30 + 104.00 + 101.19 + 100.56 + 100.81 = 613.20$$

$$y_{2..} = 102.00 + 102.60 + 102.00 + 101.99 + 102.61 + 102.83 = 609.99$$

Se calculó la suma total ( $y_{...}$ ):

$$y_{...} = 613.20 + 609.99 = 1223.19$$

Se calculó la suma del cuadrado de cada analista en cada día:

$$\Sigma\Sigma y_{ij}^2 = (306.60)^2 + (306.60)^2 + (302.56)^2 + (307.43)^2 = 374062.9$$

Se calculó la suma del cuadrado de cada analista en los dos días:

$$\Sigma y_{i..}^2 = (613.20)^2 + (609.99)^2 = 748102.0$$

Se calculó la suma de cada dato elevado al cuadrado:

$$\Sigma\Sigma\Sigma y_{ijk}^2 = (101.3)^2 + (101.3)^2 + (104.0)^2 + (101.19)^2 + (100.56)^2 + (100.81)^2 + (102.0)^2 + (102.6)^2 + (102)^2 + (101.99)^2 + (102.61)^2 + (102.83)^2 = 124693.3$$

Se calculó la suma de cuadrados del analista (SCa), efecto del factor analista :

$$SCa = \frac{748102}{2 * 3} - \frac{(1223.19)^2}{2 * 2 * 3} = 0.8587$$

Se calculó la suma de cuadrados del día anidado en el analista (SCd) :

$$SCd = \frac{374062.9}{3} - \frac{748102}{2 * 3} = 3.9528$$

Se calculó la suma de cuadrados del error (SCe) :

$$SCe = 124693.3 - \frac{374062.9}{3} = 5.6807$$

Con los datos obtenidos se construyó la tabla de análisis de varianza ( Tabla No. 6 ) :  
 Tabla No. 6 Análisis de varianza para la reproducibilidad del método.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F <sub>cal</sub>	F <sub>0,05*</sub>
Analista (α)	gla = a-1 = 1	SCa = 0.8587	SCa MCa = ----- gla = SCa = 0.8587	MCa Fa = ----- MCd SCa = ----- MCd = 0.4345	F <sub>gla,gld,0.95</sub> = F <sub>(1,2,0.95)</sub> = 38.51
Día (δ)	gld = (d-1)a = 2	SCd = 3.9528	SCd MCd = ----- gld = 1.9764	MCd Fd = ----- MCe = 2.7833	F <sub>gld,gld,0.95</sub> = F <sub>(2,8,0.95)</sub> = 6.06
Error (ε)	gle = (r-1)ad = 5.6807	SCe = 5.6807	SCe MCE = ----- gle = 0.7101		

Criterio de aceptación :

0.4345 es menor que 38.51, por lo que el método analítico es reproducible por los analistas.

2.7833 es menor que 6.06, por lo que el método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista.

### 7.- Estabilidad de la muestra analítica.

Los resultados se muestran en la tabla No. 7, así como los cálculos necesarios para obtener el intervalo de confianza:

Tabla No. 7. Estabilidad de la muestra analítica

Condición Tiempo ( hrs)	Luz			Obscuridad			Refrigeración		
	0	24	48	0	24	48	0	24	48
Y <sub>1</sub>	99.70	98.80	103.10	98.40	99.20	100.20	99.30	101.60	101.80
Y <sub>2</sub>	100.6	100.40	108.80	98.90	101.30	100.40	98.60	100.60	101.40
Y <sub>3</sub>	99.80	100.30	103.70	99.80	99.90	102.50	99.60	100.00	105.80
promedio ( $\bar{y}_{pi}$ )	100.0	99.83	105.20	99.03	100.13	101.03	99.17	100.73	103.00
varianza ( $s_i^2$ )	3	0.803	9.81	-	1.1433	1.623	0.263	0.65	5.92
varianza ponderada ( $s_{pi}^2$ )	0.243	0.35	3.351	-	0.55	0.71	-	0.304	2.061
( $2/3 * s_{pi}^2$ ) <sup>1/2</sup>	-	1.382	4.275	-	1.732	1.968	-	1.288	3.352
y <sub>i</sub> - y <sub>0</sub>	-	-0.2	5.17	-	1.10	2.00	-	1.57	3.83
y <sub>i</sub> - y <sub>0</sub> + t*( $2/3 * s_{pi}^2$ ) <sup>1/2</sup>	-	1.182	9.445	-	2.832	3.968	-	2.858	7.182
y <sub>i</sub> - y <sub>0</sub> - t*( $2/3 * s_{pi}^2$ ) <sup>1/2</sup>	-	-1.582	0.895	-	-0.632	0.032	-	0.282	0.478
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CONCLUSION	-	Estable	Inestab.	-	Estable	Inestab	-	Inestab	Inestab

Criterio de aceptación :

Para un tratamiento dado, la muestra es estable si en el intervalo de confianza está incluido el valor de cero.

### 8.- Tolerancia del método.

Los resultados obtenidos al variar las dos condiciones mencionadas en la parte experimental (diferentes marcas comerciales del disolvente de las muestras y la velocidad de flujo), así como los resultados de los cálculos realizados se encuentran en la tabla No. 8.

Tabla No. 8. Tolerancia del método.

Condición	Tratamiento Control	Utilizando diferente marca de reactivo	Tratamiento control	Velocidad de flujo 1 mL/min
Y <sub>1</sub>	114.60	115.50	96.70	98.50
Y <sub>2</sub>	115.80	114.90	97.50	96.40
Y <sub>3</sub>	114.60	114.80	97.34	97.00
Promedio ( $\bar{y}_{pi}$ )	115.00	115.17	97.18	97.3
Varianza ( $s_i^2$ )	0.32	0.20	0.12	0.78
$\sum Y_i - y_d$	-	0.17	-	0.12
Varianza ponderada ( $s_{pi}^2$ )	-	0.26	-	0.45
t calculada	-	0.78	-	0.33
t tablas	-	2.78	-	2.78

Criterio de aceptación :

Para un tratamiento dado, el cambio al método no afecta al resultado si el valor de la t calculada es menor que la t de tablas.

En ambos casos la t calculada es menor que la t de tablas, por lo que el método es tolerante al cambio de marcas de disolventes y al incremento de la velocidad de flujo.

## VI. CONCLUSIONES.

1.-El método analítico propuesto para la valoración del Extracto de Centella Asiática en óvulos que también contienen nitrofurazona, es específico para control de calidad y no lo es para estudios de estabilidad.

Esto se concluye por las pruebas de especificidad realizadas, pues en el análisis efectuado en muestras de placebo ( que contiene todos los componentes de la formulación excepto el Extracto de Centella Asiática ), placebo cargado y solución de referencia de Extracto de Centella Asiática sin degradar, se observa que la respuesta obtenida se debe únicamente a los componentes del Extracto de Centella Asiática y no a los componentes de la formulación.

Asimismo, se comprobó que los posibles productos de degradación si interfieren con la cuantificación del Extracto de Centella Asiática.

También se concluye que aunque la solución es estable a la luz durante 24 horas, es recomendable proteger las muestras de la luz durante el análisis de rutina, con objeto de minimizar cualquier posible interferencia.

2.-El sistema para el método analítico propuesto es lineal, ya que los resultados analíticos obtenidos son proporcionales a la concentración del extracto de Centella Asiática en el intervalo de 50 % a 150 %.

Esto se concluye ya que el coeficiente de correlación y de determinación de la curva de calibración, cumplen con los valores establecidos.

3.-Existe una correlación lineal entre los miligramos adicionados y los miligramos recuperados, por lo que se concluye que el método es lineal en el intervalo de 50 % a 150 %.

Esto se comprobó al realizar el análisis de varianza, con el que se demuestra que el modelo lineal es correcto para describir la relación existente entre miligramos adicionados y miligramos recuperados.

Adicionalmente se evaluaron estadísticamente la pendiente y la ordenada al origen mediante pruebas de t de Student que permite concluir que estadísticamente estos parámetros son iguales a 1 y 0 respectivamente.

Asimismo, los valores del coeficiente de correlación y de determinación nos demuestran que existe proporcionalidad entre la cantidad adicionada y la cantidad medida.

4.-El método analítico es exacto ya que al aplicar la prueba de t de Student, se demuestra que estadísticamente la media de los resultados obtenidos experimentalmente es igual al valor de referencia.

5.-Tanto el sistema como el método analítico son repetibles, ya que existe concordancia en los resultados analíticos obtenidos del análisis tanto de una solución de la Sustancia de Referencia como de placebos cargados al 100 %.

Esto se comprobó determinando el coeficiente de variación el cual se encontró en cada caso dentro de los valores establecidos en ambos parámetros.

6.-El método analítico es reproducible tanto por un mismo analista en diferentes días, como por dos analistas en diferentes días, ya que el análisis de varianza efectuado indica que no hay interacción debida al analista ni al día.

7.-En cuanto a la estabilidad de la muestra analítica, se concluye que sólo son estables durante 24 h, ya sea expuestas a la luz o mantenidas en la obscuridad, ambas a temperatura ambiente.



8.-El método es tolerante al cambio de marca de reactivo con el que se disuelve la muestra y al incremento de la velocidad de flujo en 0.2 mL/min.

Esto se demostró al aplicar pruebas de t de Student con las que se comprobó que en ambos casos, la media de los resultados analíticos obtenidos para las condiciones modificadas, no difiere estadísticamente de la media de los resultados para las condiciones normales de operación.

Conclusión final:

El método analítico propuesto está validado, pues cumple con los parámetros analíticos estudiados. Por lo tanto, se asegura que es confiable y satisface los requerimientos para el control de calidad.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.-Macquart F. X., Bellon G., Gillery P., Randoux A., Borel J.P., "Estimulación de la síntesis del colágeno en cultivos de fibroblastos por extractos triterpénicos de Centella Asiática", Semaine Des Hopitaux París, No. 25 (1989), Págs. 1571-1574,
- 2.-The Merck Index, Ancylopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. 12ª. Ed. (1996). Pág. 140.
- 3.- Diccionario de especialidades Farmacéuticas, Versión electrónica, México (1999).
- 4.- Willard H., Merrit Jr. L., Dean J., Settle F., "Métodos instrumentales de análisis", Compañía editorial Continental S.A. de C.V. Méx. (1986). Págs. 554-569.
- 5.- Skoog D., West D., Holler F., " Fundamentos de Química analítica", 4ª. Edición, Ed. Reverté S.A. (1997). Págs. 664-743.
- 6.- Connors K., "Curso de Análisis Farmacéutico (Ensayo del medicamento)", Ed. Reverté S.A. (1981). Págs. 402-445.
- 7.- Bidlingmeyer B., "Practical HPLC methology and applications", John Wiley & Sons, Inc. (1992). Págs. 18-25, 284-316.
- 8.- The Pharmacopoeia of the United States of América 23, United States Pharmacopoeial Convention. Inc. U.S.A. ( 1995 ), Págs. 1774-1777.
- 9.- Vera L., Thibert M., Material del curso "Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia", Leasca S.A. de C.V., México D.F. (1994).
- 10.- Cromatografía en la Química Farmacéutica, Manual práctico. Reactivos Merck S.A. de C.V. Págs. 9,31
- 11.- Lindsay S., "High Performance Liquid Chromatography", Ed. John Wiley & Sons Ltd. London UK (1992). Págs. 56-57.
- 12.- Ravindranath B., " Principles and Practice of Chromatography", Ellis Horwood limited (1989). Págs. 54-64,302-303.
- 13.- Pharma News, Actualización en tecnología farmacéutica, "La cromatografía Líquida de Alta resolución", Vol. 2 No. 2, (1991), Pág. 19.
- 14.- Comité de elaboración de Guías oficiales de validación, Requisitos mínimos para la validación de un método analítico, Colegio Nacional de Q.F.B. México ( 1989 ).
- 15.-Sanofi-Winthrop S.A. de C.V., Procedimiento Estándar de Operación para la validación de métodos analíticos, (1993).
- 16.- Burnouf-Radosevich M., Delfel N., "High-performance liquid chromatography of triterpene saponins", Journal of Chromatography, 368 ( 1986 ), Págs. 433-438.