



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

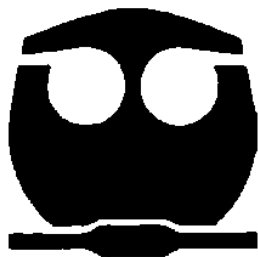
**ESTUDIO DEL PERFIL DE DISOLUCIÓN A pH 1.2, DEL COMPUESTO
AG-4-FENILCUMARINA DOSIFICADO EN CÁPSULAS, POR
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

ROBERTO RODRÍGUEZ MARTÍNEZ



MÉXICO, D. F.

2009



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. Inés Fuentes Noriega.
VOCAL. Helgi Helen Jung Cook.
SECRETARIO. Luis Jesús García Aguirre
1^{er}. SUPLENTE. Liz Jannet Medina Reyes.
2^o. SUPLENTE. Roberto Carlos Cañas Alonso

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO 113, DEPARTAMENTO DE FARMACIA,
CONJUNTO "E", DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO.
FACULTAD DE QUÍMICA.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

Asesor del tema:

Dra. Inés Fuentes Noriega.

Supervisor Técnico:

M. en C. Roberto Carlos Cañas Alonso.

Sustentante:

Roberto Rodríguez Martínez

A LA Dra. RACHEL MATA ESSAYAG

FACULTAD DE QUÍMICA PAIP 6390-05

Dedicatorias y Agradecimientos.

La culminación de este proyecto de mi vida no es más que el fruto del esfuerzo, sacrificio, amor, amistad, apoyo y confianza de aquellas personas que han compartido lo bueno y lo malo conmigo. Ahora estoy convencido que esta satisfacción y emoción que siento, bien valió la pena todo lo vivido hasta hoy. Y si en algún momento estuve a punto de no llegar a la meta cada uno de ustedes a su manera me impulsaron a cumplir este sueño.

Papá sé que me voy a quedar corto con expresar mi agradecimiento. Gracias por ser la mejor escuela de vida que tengo. Tu apoyo y sacrificio te prometo que va a valer la pena. Gracias por enseñarme que la honestidad y honradez es la llave de todas las puertas.

Mamá, te quiero mucho. Es difícil recordarte de mal humor y esa es tu gran virtud. Cuando te he necesitado siempre estás ahí. Gracias por tu paciencia y alegrar mi corazón. Sé que mi compromiso es grande pero prometo no defraudar las expectativas que tienes de mí.

Oscar y Osvaldo... mis hermanos... Gracias porque me han apoyado cuando los he necesitado. Oscar me estás dando ejemplo de responsabilidad y dedicación a tu trabajo y Osvild ojalá este momento de mi vida te inspire a seguir adelante. Los quiero mucho.

Inesita, gracias por todas las enseñanzas y experiencias que has compartido. Aunque bien sé que mis papas son el pilar fundamental de mi educación, tú has tenido una enorme influencia, platicar contigo es y será siempre una gran lección de vida. Te quiero mucho.

A mis padrinos Ime y Lalo. Estoy convencido que ambos comparten con la misma intensidad esta alegría que siento. Gracias por estar al pendiente de mí, por sus frecuentes palabras de apoyo y confianza brindada. Siempre me sentiré parte de su familia.

A mis primos Juan Carlos, Sergio, Juan Pablo, Jorge, Ime y Daniel. Por el enorme cariño y amistad que me han dado. De cada uno de ustedes he aprendido algo y no puedo más que agradecer el permitirme ser parte de su vida. Los quiero mucho.

Jorge, primo carnal, gracias por ser el mejor amigo de mi vida y sabes que me quedo corto. Hermanito, te has ganado mi admiración y respeto. Gracias por el apoyo incondicional que me has brindado y el interés a esta parte de mi vida.

Yukie... Cuquita, gracias por ayudarme a tratar de ser más perseverante y no rendirme, bien sabes lo mucho que te quiero. Además de permitirme ser parte de tú vida y tu familia de los que solo he recibido muestras de cariño y sabes a quien me refiero.

Arturo... compadre... Doctor... Gracias por tu amistad y por ser el mejor amigo que conservo de la universidad. Vamos pa' delante amigo.

A mis amigos de la vida... Carlitos nunca olvidare que siempre que nos veiamos me preguntabas por mi titulo, y desde donde nos ves y cuidas, te dedico este proyecto. Te extrañamos amigo. Manolete, Rodolfo, Edward, Jonathan, Isrra... Gracias por los buenos momentos y amistad.

Un gran agradecimiento a la Dra. Inés Fuentes por darme la oportunidad de realizar este proyecto y sobre todo por compartirme sus conocimientos.

A Roberto Carlos le agradezco sus enseñanzas, su paciencia y su tiempo para ayudarme en la realización de mi tesis.

A la Mtra. Margarita Rodríguez le agradezco la ayuda que me brindó en este proyecto tan importante, así como su paciencia para resolver las dudas que se me presentaron.

A los miembros del jurado por el tiempo que le dedicaron a la revisión de la tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de formar parte de la mejor institución de este país.

A todas las personas que conocí a lo largo de la carrera y en el laboratorio donde realicé este proyecto, por compartir conmigo tanto buenos como malos momentos.

Quiero agradecerle a Dios por guiarme y enseñarme el valor que tiene la vida. Y agradecerle a las personas que están conmigo y también las que se han ido, simplemente por ser parte de mi vida.

Con constancia y tenacidad se obtiene lo que se desea;

La palabra imposible no tiene significado.

Nuestra recompensa estará en el esfuerzo,

Y no en el resultado.

Un esfuerzo total es una victoria completa.

Mahatma Gandhi

ÍNDICE

	Página
LISTA DE CUADROS.	V
LISTA DE FIGURAS.	VI
LISTA DE TABLAS.	VIII
I. INTRODUCCIÓN.	1
II. ANTECEDENTES.	
2.1. Antecedentes de la especie <i>Hintonia standleyana</i> .	4
2.2. Propiedades fisicoquímicas de AG-4-Fenilcumarina	5
2.3. Diabetes mellitus.	6
2.4. Preparado fitofarmacéutico de <i>Hintonia standleyana</i> .	7
2.5. Disolución	7
2.5.1 Factores críticos en el proceso de disolución.	7
2.6. Perfil de disolución	8
2.6.1 Factores que afectan la velocidad de disolución	11
2.6.2 Aparato utilizado	11
2.7. Validación de Métodos Analíticos.	12
III. OBJETIVOS.	14
IV. METODOLOGÍA.	15
4.1. Reactivos utilizados durante el estudio	15
4.2 Filtros evaluados en el estudio	15
4.3 Material	16
4.4 Equipos	16

ÍNDICE	Página
4.5 Preparación de soluciones.	18
4.5.1 Solución de HCl 0.1N (pH 1.2). Medio de disolución.	18
4.5.2 Agua acidificada con TFA al 0.1%, para la preparación de la fase móvil.	18
4.5.3. Fase móvil [ACN:H₂O (TFA 0.1%)].	19
4.5.4 Solución stock de estándar de AG-4-Fenilcumarina.	19
4.5.5 Solución stock a partir del polvo de extracto de Hintonia Standleyana.	19
4.6 Desgasificación del medio de disolución	20
4.7. Llenado de vasos del disolutor para la prueba de disolución.	20
4.8 Procedimiento experimental.	22
4.8.1. Desarrollo y optimización del método analítico.	22
4.8.1.1 Preparación de la muestra.	22
4.8.1.2 Desarrollo de condiciones cromatográficas	22
4.8.1.3 Optimización y elección de condiciones cromatográficas.	23
4.8.2 Condiciones cromatográficas del método analítico	23
4.8.3. Prueba de estabilidad durante 24 hr/T amb.	23
4.8.4. Prueba de estabilidad durante 5hr/37°C.	24
4.8.5 Prueba de control de calidad	25
4.8.6 Validación del método analítico	25
4.8.6.1 Parámetros de validación del sistema	25
4.8.6.2 Parámetros de validación del método.	25
4.8.6.2.1 Linealidad	25
4.8.6.2.1.1 Curva patrón con polvo de extracto de H. standleyana	27

ÍNDICE	Página
4.8.6.2.2 Exactitud	27
4.8.6.2.3 Precisión.	28
4.8.6.2.4 Selectividad	29
4.8.6.3 Influencia del filtro	29
4.8.6.4 Preliminar de disolución.	31
4.8.6.4.1 Curva patrón con estándar de AG-4-Fenilcumarina	31
4.8.6.4.2 Cantidad de AG-4-Fenilcumarina contenida en Cada cápsula de gelatina dura.	32
4.8.6.4.3 Procedimiento del Preliminar de disolución.	32
4.8.6.5 Estudio del perfil de disolución.	34
5.8.1 Condiciones experimentales para perfil de disolución.	34
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	35
5.1. Desarrollo y optimización del método analítico.	35
5.2. Prueba de Estabilidad durante 24 hr/T. ambiente.	36
5.3 Prueba de Estabilidad durante 5hr / 37°C.	37
5.4 Prueba de control de calidad (Peso promedio)	39
5.5. Validación del método.	39
5.5.1. Linealidad del método.	39
5.5.2. Exactitud del método.	41
5.5.3. Precisión del método.	41
5.5.3.1. Repetibilidad.	41
5.5.3.2. Reproducibilidad.	42
5.5.4. Selectividad del método.	44

ÍNDICE	Página
5.6. Prueba de influencia del filtro.	46
5.7. Preliminar de disolución.	47
5.8. Estudio del perfil de disolución.	49
VI. CONCLUSIONES.	51
VII. BIBLIOGRAFÍA	52
VIII. ANEXOS.	56
8.1 Estudio completo del perfil de disolución	56

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Clasificación Biofarmacéutica.	10
Cuadro 2. Curva patrón con polvo de extracto de <i>Hintonia standleyana</i> .	27
Cuadro 3. Curva patrón con estándar de AG-4-Fenilcumarina	31

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Hintonia standleyana</i> (Copalchi).	4
Figura 2. Sistema desgasificador.	20
Figura 3. Cromatograma del estándar de AG-4-Fenilcumarina.	36
Figura 5. Estabilidad del estándar de AG-4-Fenilcumarina, a temperatura ambiente y durante 24 horas, en solución de HCl 0.1N (pH 1.2).	37
Figura 6. Estabilidad del estándar AG-4-Fenilcumarina, a temperatura de $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y durante 5 horas, en solución de HCl 0.1N (pH 1.2).	38
Figura 7. Linealidad del método	40
Figura 8. Espectro en tercera dimensión de una cápsula vacía.	44
Figura 9. Espectro en tercera dimensión del estándar de AG-4-Fenilcumarina.	45
Figura 10. Espectro en tercera dimensión del extracto de <i>H. standleyana</i>	45
Figura 11. Cromatograma de la cápsula vacía.	47

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 12. Perfil de disolución Preliminar	48
Figura 11. Perfil de disolución de 12 cápsulas con polvo de extracto de <i>Hintonia standleyana</i> .	50
Figura 12. Cromatograma de cápsulas dosificadas con polvo de extracto de <i>Hintonia standleyana</i> .	50

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Estabilidad del estándar de AG-4-F, a temperatura ambiente y durante 24 horas, en solución de HCl 0.1N (pH 1.2).	37
Tabla 2. Estabilidad del estándar AG-4-Fenilcumarina, a temperatura de $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y durante 5 horas, en solución de HCl 0.1N (pH 1.2).	38
Tabla 3. Peso promedio del contenido de polvo en cada cápsula	39
Tabla 4. Linealidad del método con cápsulas dosificadas con polvo de extracto de <i>H. standleyana</i> .	40
Tabla 5. Exactitud del método con cápsulas dosificadas con polvo de extracto de <i>H. standleyana</i> .	41
Tabla 6. Precisión del método (Repetibilidad) de cápsulas dosificadas con polvo de extracto de <i>H. standleyana</i> .	42
Tabla 7. Áreas de las cápsulas dosificadas con polvo de extracto de <i>H. standleyana</i> (DÍA 2).	43

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 8. Precisión del método (Reproducibilidad) de cápsulas dosificadas con polvo de extracto de <i>H. standleyana</i> (DÍA 2).	43
Tabla 9. Influencia del filtro de teflón y del filtro de membrana.	46
Tabla 10. Porcentaje de Fitofármaco (extracto de <i>H. standleyana</i> dosificado en cápsulas) disuelto en cada tiempo.	47
Tabla 11. Porcentaje promedio de 12 cápsulas con polvo de extracto de <i>Hintonia standleyana</i> , disuelto a diferentes tiempos.	49

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales juegan un papel primordial en los sistemas de salud de numerosas regiones del mundo, en particular en los países en vías de desarrollo. En estos países los sistemas de medicina tradicional han jugado siempre un papel importante en el cuidado de la salud. Se estima que cerca del 70% de la población mundial depende de los sistemas de medicina tradicional como una fuente primaria para el cuidado de su salud. Además en muchos de estos países los productos farmacéuticos son inaccesibles para un sector importante de su población debido a los altos costos o ubicación geográfica. Razón por lo que la herbolaria medicinal representa la opción terapéutica de primera instancia para estos sectores^{33, 34}.

El reconocimiento de los beneficios médicos y económicos de la medicina herbolaria continua creciendo tanto en países industrializados como EEUU, Japón y Comunidad Europea así como aquellos en vías de desarrollo³³. Aunque, con la percepción errónea de que son inocuos y libre de efectos colaterales²⁵.

Los criterios para asegurar la calidad, inocuidad, eficacia e incluso para definir lo que es una planta medicinal o un producto derivado de estas pueden diferir considerablemente en cada país. Por ejemplo, en EEUU no son considerados productos terapéuticos sino suplementos dietéticos. En cambio, en Europa se consideran medicamentos herbolarios y son regulados como los agentes terapéuticos convencionales.^{33, 34}

En el caso específico de México el empleo de las hierbas medicinales con fines curativos no se restringe al medio indígena y el rural, sino también a la población de zonas urbanas y suburbanas. Por lo que, muchas especies se explotan y comercializan de manera irracional, muchas veces bajo la creencia de que son inocuas. Aún más, estas plantas y productos derivados de ellas no son sujetos a control de calidad alguno. Razón por la que es necesario elaborar de manera rigurosa monografías de tipo Organización Mundial de la Salud (OMS) de las plantas y/o productos derivados de estas más utilizados con fines medicinales.³³

En el año 2001, siguiendo los lineamientos de la OMS, la Secretaria de Salud publicó la primera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM). Este documento fue elaborado con el objeto siguiente: “Establecer los métodos de análisis y especificaciones técnicas que deberán cumplir la plantas y los derivados de ellas que se utilicen en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios, con el propósito de contribuir al mejoramiento de este tipo de productos y su uso adecuado”⁶.

Hintonia standleyana Bullock conocida popularmente entre otros como “copalchi” es una planta cuya corteza es comercializada con fines terapéuticos, principalmente para el tratamiento de la diabetes, razón por la que en México, hacen de esta planta un candidato idóneo para la realización de estudios químicos, farmacológicos, clínicos y biofarmacéuticos enfocados para sentar las bases para el desarrollo de los procedimientos para su control de calidad y establecimiento de su eficacia, con el fin de elaborar la monografía correspondiente.

Con base a lo anterior, Guerrero Analco y colaboradores (2007) bajo la tutela de la Dra. Rachel Mata Essayag, prepararon un polvo a partir de un extracto acuoso de la planta *Hintonia standleyana* en el laboratorio 124 del conjunto E en la Facultad de Química (UNAM). El preparado fitofarmacéutico ya mencionado contiene AG-4-Fenilcumarina que es el activo causante del efecto terapéutico.

Como parte del proyecto el fitofármaco (polvo de extracto de *H. standleyana*) desarrollado se encuentra contenido en cápsulas de gelatina dura. Por lo tanto, el presente trabajo tiene como principales objetivos desarrollar y validar un método de cuantificación de la AG-4-Fenilcumarina por HPLC y en consecuencia desarrollar el perfil de disolución en pH 1.2 a las capsulas de gelatina dura conteniendo el polvo de extracto de *H. standleyana*.

II. ANTECEDENTES

2.1 Antecedentes de la especie *Hintonia standleyana*.

La palabra “copalchi” proviene de dos palabras en náhuatl “copal” y “chichic” que significan “incienso amargo o resina de incienso amargo”, respectivamente. Este término se utiliza para designar al menos a 11 especies de árboles o arbustos que pertenecen a las familias Rubiaceae y Euphorbiaceae y que conforman un complejo de plantas medicinales que se define como “un grupo de plantas que reciben el mismo nombre común, comparten características morfológicas y/o aromáticas y le son atribuidas propiedades curativas similares. Generalmente sobresale una planta que le da nombre al compuesto.”²⁴

Las plantas del complejo “copalchi” se caracterizan por sus cortezas extremadamente amargas y útiles en el tratamiento del paludismo y de la diabetes.

Hintonia standleyana Bullock (Figura 1) que es una de las once especies del complejo “copalchi” se conoce popularmente con los nombres de quina, copalchi, falsa quinacocostic-quina y quina amarilla. Esta especie pertenece a la familia Rubiaceae, es endémica de México y su distribución geográfica abarca el centro y sur de México

11.



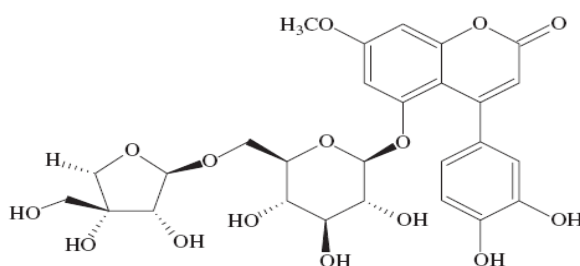
Figura 1. *Hintonia standleyana* (Copalchi)

En este contexto, en un estudio que precede al presente trabajo, Guerrero Analco y colaboradores (2007) realizaron un estudio fitoquímico y farmacológico orientado a establecer la inocuidad, eficacia y control de calidad de un extracto orgánico a partir de la especie *Hintonia standleyana*.

En dicho estudio, comprobaron que el extracto antes mencionado ocasiona un decremento significativo en la concentración de la glucosa en sangre de ratas normales y diabéticas. Evaluando de esta forma el potencial hipoglucemiante y antihiperoglucémico del extracto. El fraccionamiento biodirigido del extracto antihiperoglucémico permitió el aislamiento y caracterización de cinco compuestos, entre los que se encuentra, la **5-O-[β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina** (AG-4-Fenilcumarina), la cual fue identificada como el principio activo responsable de la actividad antihiperoglucémica.

2.2 Propiedades fisicoquímicas de AG-4-Fenilcumarina.

Formula estructural y Nombre químico:



5-O-[β-D-apiofuranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl]-7-methoxy-3',4'-dihydroxy-4-

phenylcoumarin

Formula condensada: $C_{27}H_{30}O_{15}$

pKa: No determinado.

Peso Molecular: 594 g/mol

Descripción: Polvo cristalino de color amarillo.

Soluble en: agua, etanol, metanol e isobutanol.

2.3 Diabetes mellitus.

La diabetes mellitus es considerado el desorden endócrino más común alrededor del mundo. De acuerdo a la OMS este padecimiento afecta a más de 174 millones de personas. La OMS estima que en México el número de pacientes diabéticos se incrementara de dos millones que tenían registrados en el 2002 a doce millones en el 2020. Estas cifras implican que en tan solo un par de décadas en nuestro país se alcanzaría uno de los índices de diabetes más altos en el mundo. Es por eso que durante los últimos años se han modificado los patrones de enfermedad y de muerte en México, la Diabetes mellitus ocupa el primer lugar como causa de muerte entre las enfermedades crónico degenerativas y representa 16.7% de las defunciones; además, es la cuarta causa de mortalidad general. A raíz de esta situación, los sistemas de salud deben ser capaces de adoptar estrategias nuevas ante los problemas de salud actuales, no sólo para satisfacer la creciente demanda de los enfermos diabéticos, sino para modificar las tendencias de estos padecimientos que pueden prevenirse.

La Diabetes mellitus se entiende como “una enfermedad crónico-degenerativa, de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales, y que se caracteriza por hiperglucemia crónica debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, lo que afecta al metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y grasas” (NOM-015-SSA2-1994).

Esta enfermedad se clasifica como:

- Tipo I. Diabetes mellitus dependiente de insulina ya que existe ausencia total de esta en el organismo. Es la menos común y representa el 5% de todos los casos de esta enfermedad.
- Tipo II. Diabetes mellitus no dependiente de insulina. Consiste en una disminución en la cantidad de insulina producida por el organismo o debilidad

de esta para realizar su función. Representa el 95% de todos los casos, y puede deberse a obesidad, falta de actividad física, etc.

Los pacientes por lo general son sometidos a una dieta estricta deficiente en glucosa, y en algunos casos también tienen la necesidad de la administración de insulina.

2.4 Preparado fitofarmacéutico de *Hintonia standleyana*.

El polvo del extracto de *Hintonia standleyana* (cuyo activo es AG-4-Fenilcumarina), después de un proceso de liofilización se dosificó en cápsulas de gelatina dura, cuyo contenido de dicho polvo tiene un peso promedio de 0.22337 g. Es importante señalar para efectos del presente estudio, que 1g de polvo de extracto de *H. standleyana* contiene 143.4mg de AG-4-Fenilcumarina.

2.5 Disolución.

La disolución se define como el proceso por el cual una sustancia sólida entra en el seno de un disolvente para producir una solución homogénea.

Después de la administración de un medicamento por vía oral y como requisito para que se lleve a cabo la absorción y que se alcance un efecto terapéutico, el principio activo tiene que ser liberado de la forma farmacéutica que lo contiene, la liberación del principio activo consiste en la salida y dilución del fármaco de la forma farmacéutica.⁽¹⁰⁾

2.5.1 Factores críticos en el proceso de disolución.

En la realización de una prueba de disolución existen factores que deben controlarse para tener resultados confiables, estos factores actúan incrementando ó disminuyendo la cantidad disuelta en el medio de disolución:

- Temperatura. La solubilidad es un fenómeno dependiente de la temperatura, su control cuidadoso durante el proceso de disolución es muy importante y debe mantenerse dentro de un intervalo de $\pm 0.5^\circ$ C. Durante la disolución es importante que el nivel de agua en el baño este al mismo nivel que el medio de disolución contenido en los vasos, y los vasos deben taparse para evitar la evaporación.
- Medio de disolución. La elección del medio apropiado para las pruebas de disolución depende ampliamente de la solubilidad del fármaco.
- Gases disueltos. Todos los líquidos están en equilibrio con el gas del medio ambiente que los rodea. A ciertas condiciones de presión y temperatura una porción del gas puede disolverse en el medio de disolución. Con la agitación, este gas puede liberarse como burbujas de aire que alteran el patrón de flujo y las burbujas pueden interferir en la interface s sólido-líquido. En algunos medios, como el agua destilada, el contenido de gas disuelto puede también modificar el pH.
- Composición del medio de disolución y pH. La velocidad de disolución puede verse influida por la composición del medio y el pH del mismo. Se ha encontrado que a pHs básicos aumenta y a pH ácidos disminuye

2.6 Perfil de disolución.

La prueba de disolución es una de las pruebas más usadas en la caracterización y en el control de calidad de los medicamentos y se emplea principalmente para:

- Evaluar la calidad de un producto medicinal lote a lote.
- Guiar el desarrollo de nuevas formulaciones

- Asegurar la continuidad de la calidad y el rendimiento del producto después de algún cambio en la formulación, el proceso de fabricación, el sitio de fabricación y el tamaño de lote de fabricación.

Las pruebas de disolución pueden llegar a ser especialmente importantes en los casos en que la disolución es el paso limitante de la velocidad en la absorción del medicamento.

Perfil de disolución: Es la determinación experimental de la cantidad de fármaco disuelto a diferentes tiempos, en condiciones experimentales controladas, a partir de la forma farmacéutica.

En algunos casos al realizar un perfil de disolución a un medicamento *in Vitro* nos sirve para predecir su comportamiento *in Vivo*, debido a que las condiciones experimentales semejan las características principales del sistema gastrointestinal.

Durante el desarrollo de una prueba de perfil de disolución, es importante conocer las características del fármaco de acuerdo al Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (BCS), mismo que clasifica un ingrediente activo farmacéutico en base a su solubilidad acuosa y su permeabilidad intestinal.

Un principio activo se considera altamente soluble, cuando la dosis más alta es soluble en pH 1.2 – 7.4 y por lo tanto siempre y cuando tenga buena permeabilidad, se absorberá a la circulación general después de la administración del producto, comprobándose de esta forma que los excipientes no afectan la disolución, estabilidad y absorción del proceso.

Por lo contrario cuando un principio activo se considera como de baja solubilidad, la limitación de la velocidad de absorción puede ser la disolución de la forma farmacéutica

Para poder clasificar los ingredientes activos farmacéuticos, es necesario que además de basarse en la solubilidad de los mismos, también son importantes sus características de permeabilidad. Un fármaco se considera altamente permeable, cuando más del 90% de la dosis administrada oralmente es absorbida en el tracto gastrointestinal. La permeabilidad puede valorarse por medio de estudios farmacocinéticos, tales como: estudios balance-masa, métodos de permeabilidad intestinal, perfusión intestinal en humanos, validación de líneas celulares, etc.

Otro factor que el BCS toma en cuenta para poder clasificar los ingredientes activos farmacéuticos, es el tipo de disolución que presente la forma farmacéutica. Y pueden ser:

- Disolución muy rápida. Liberación del principio activo mayor a 85% en 15min, realizando la determinación en tres pH fisiológicos (1.2, 4.5 y 6.8), utilizando paletas (75rpm) o canastillas (100rpm).
- Disolución rápida. Liberación del principio activo mayor a 85% en 30min, realizando la determinación en tres pH fisiológicos (1.2, 4.5 y 6.8), utilizando paletas (75rpm) o canastillas (100rpm).

Finalmente, sabiendo que el BCS se basa en los factores de solubilidad y permeabilidad intestinal, se pueden clasificar a los ingredientes activos farmacéuticos como:

CUADRO 1. Clasificación Biofarmacéutica.^(10, 21)

Clase I	Alta solubilidad	Alta Permeabilidad
Clase II	Baja solubilidad	Alta Permeabilidad
Clase III	Alta solubilidad	Baja Permeabilidad
Clase IV	Baja solubilidad	Baja Permeabilidad

En general, la importancia de realizar un perfil de disolución, es que este sirve como una herramienta para identificar los factores de la formulación que influyen y pueden tener un efecto en la biodisponibilidad del fármaco.

2.6.1 Factores que afectan la velocidad de disolución.

- Factores del soluto: Propiedades fisicoquímicas de las partículas: tamaño de partícula, humectabilidad, forma cristalina, pka, solubilidad, estabilidad, etc.
- Factores de la forma farmacéutica: Excipientes y cantidades, interacciones entre el fármaco y los excipientes, dureza de las tabletas, procedimientos de manufactura, condiciones de almacenamiento, caducidad, etc.
- Factores del medio de disolución: Viscosidad, tensión superficial, mezcla de disolventes, pH del medio y pKa del fármaco, fuerza iónica, presencia de tensoactivos, temperatura, composición, volumen, gases disueltos, etc.
- Factores del sistema de disolución: Tipo de aparato, capacidad, volumen de disolvente, velocidad de agitación, calibración del equipo, vibración, etc.
- Factores del tracto gastrointestinal: pH, fuerza iónica, motilidad, presencia o ausencia de alimentos, cantidad de enzimas, etc.

2.6.2 Aparato empleado.

Para llevar a cabo el estudio de los perfiles de disolución de la AG-4-Fenilcumarina se empleo el aparato de la USP número I (canasta).

Aparato I

El aparato consiste de un vaso, con o sin tapa, de vidrio u otro material inerte, de boca ancha de fondo esférico y transparente; un motor, un eje propulsor metálico y una

Canastilla cilíndrica. El vaso debe estar parcialmente sumergido en un baño de agua adecuado, durante la prueba el baño de agua debe mantener la temperatura del interior del vaso a 37 ± 0.5 °C, se debe garantizar que el fluido del baño se mantenga en movimiento suave y constante.

La cápsula se coloca en el interior de la canastilla de alambre de acero inoxidable, que se hace girar a una velocidad fija sumergida en el medio de disolución contenido en el vaso.

2.7 Validación de Métodos Analíticos.

La validación de métodos analíticos, es útil para evaluar y proporcionar la seguridad que los materiales utilizados o la producción de productos cumple con las especificaciones deseadas en cualquier punto del proceso de manufactura.

Los equipos o instrumentos utilizados son esencialmente una herramienta, ya que sus componentes básicos son la detección de una señal analítica y la interpretación de estas señales a una manera comprensible. En general la validación de un método analítico consiste en establecer, con un elevado grado de confianza, si el método desarrollado es fiable, reproducible y cumple con el propósito para lo cual fue diseñado, es decir, si permite cuantificar al analito de interés de manera inequívoca, con exactitud y precisión; además deberá ser demostrada en un laboratorio experimental utilizando muestras o estándares, donde la preparación y ejecución debe seguir un protocolo de validación que contiene paso a paso el procedimiento.

La validación de un método analítico considera los siguientes parámetros:

- Linealidad. Relación que se establece mediante una recta, entre la respuesta analítica y el valor real.
- Exactitud. Concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

- **Precisión.** Grado de concordancia entre una serie de mediciones obtenidas a partir de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea. Se determina por medio de repetibilidad (Expresa la variación obtenida en un mismo laboratorio con determinaciones independientes bajo las mismas condiciones) y reproducibilidad intralaboratorio (Expresa la variación obtenida en un mismo laboratorio, con determinaciones independientes y en diferentes condiciones como días, equipo, columnas o analistas).
- **Selectividad.** Capacidad del método analítico para diferenciar el analito en presencia de otros componentes de la muestra, tales como: impurezas, productos de degradación, etc.
- **Estabilidad.** Determinación de las condiciones donde las muestras a analizar mantienen constantes sus propiedades con respecto al tiempo, sometiéndolas a diferentes condiciones de luz y temperatura.

Es importante señalar que no existe hasta la fecha alguna Norma o guía, que regule los procedimientos de validación de métodos analíticos, para disolución de productos naturales o herbolarios como es el caso del presente estudio. Por lo que la validación del método se realizó en base a los requerimientos que se señalan en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998.

III. OBJETIVOS.

- Desarrollar un método analítico por medio de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) para la cuantificación de: **5-O-[β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina**, conocida como "**AG-4-Fenilcumarina**" contenida en polvo preparado a partir de un extracto acuoso de la corteza de *Hintonia standleyana*, y que se encuentra dosificado en cápsulas de gelatina dura.
- Validar el método analítico desarrollado, con las cápsulas de gelatina dura conteniendo polvo obtenido a partir del extracto acuoso de la corteza de *Hintonia standleyana* (cuyo activo es AG-4- Fenilcumarina).
- Realizar el perfil de disolución de las cápsulas conteniendo polvo del extracto de la corteza de *Hintonia standleyana*, en solución HCL 0.1N (pH 1.2) como medio de disolución.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Reactivos utilizados en el estudio.

1. Ácido Trifluoroacético (TFA) ($C_2HF_3O_2$)

Aldrich, Reagent Plus 99%.

Bath No.06830AE

2. Metanol HPLC (CH_3OH)

JT Baker

Lote: C34D04

3. Acetonitrilo HPLC (CH_3CN)

J.T. Baker

Lote: AC18903

4. Ácido Clorhídrico (HCl)

J.T. Baker 36.5%-38.0%

Lote: E45C19

5. Estándar AG-4-Fenilcumarina.

RM-89

4.2 Tipos de filtro evaluados en el estudio.

- Teflón en forma de cubeta. Full flow™ Filtres 35µm VARIAN

PROD LOT. 21024 A.

- Swinex (Membrana) Millipore Durapore^R

G0.45 µm H.A.

4.3 MATERIAL

- Matracas volumétricos de 5mL.
- Matracas volumétricos de 10mL.
- Matracas volumétricos de 100mL.
- Matracas volumétricos de 250mL.
- Vasos de precipitado de 50mL y 100ml.
- Tubos de ensaye.
- Naves de pesado de cristal.
- Termómetro.
- Cronómetro.
- Jeringas de 5mL.
- Espátula.
- Piseta.
- Pipeta Pasteur de plástico.
- Probeta de vidrio de 500mL.
- Probeta de plástico de 1000mL.

4.4 EQUIPOS.

- Balanza Analítica Sartorius.
 - N° de informe: BMIN071026. Fecha de calibración: 2007/10/26
- Balanza Analítica Sartorius.
 - N° de informe: V070454. Fecha de calibración: 2007/05/15
 - Alcance: 2100g
- Potenciómetro Thermo Orion (410).
 - N° de informe: LBI-EHI-03-01. Fecha de calibración: 2007/03/22

- Cromatógrafo (HPLC) Agilent 1100 Series
 - No. G1329-90010
 - DETECTOR UV-Vis de arreglo de diodos (DAD). G1316A.
 - BOMBA cuaternaria/isocrática. G1311A.
 - INYECTOR. G1313A. No de serie. DE11116771
 - Sistema de recolección de datos HP-Chemstation para sistemas Agilent LC y LC/MS.
- Columna Phenomenex Synergi 4uMAX-RP80A
 - N° de serie: 341799-22
- Disolutor Pharma Alliance USP
 - Dissolution Tester (USP)
 - Mod. TDT-08L
- Desionizador Milli-Q
 - Water system
- Sonicador Transsonic T70014
- Bomba de limpieza de columna (Liquid Chromatograph)
 - Shimadzu LC-10AS
- Pipeta Biohit Line 10-100µL. No de serie. 5505662
- Pipeta Transferpette100-1000µL. No de serie. 704180
- Pipeta Eppendorf 500-5000µL. No de serie. 283943
- Pipeta Eppendorf 100-1000µL. No de serie. 241239
- Pipeta Eppendorf 20-200µL. No de serie. 1823162

4.5.3. Fase móvil Acetonitrilo : Agua acidificada [ACN : H₂O(TFA0.1%)]

La proporción de la fase móvil [ACN_{HPLC} : H₂O(TFA 0.1%)] es de 19:81, la cual se justifica posteriormente en la parte correspondiente a desarrollo del método analítico. Es importante hacer notar que el equipo realiza la mezcla de los componentes de la fase móvil, logrando de este modo, la proporción antes mencionada.

4.5.4 Solución stock de estándar de AG-4-Fenilcumarina (1000 µg/mL).

Pesar 0.0050g del estándar de AG-4-Fenilcumarina y llevar al aforo con medio de disolución HCL 0.1N en un matraz volumétrico de 5 mL.

4.5.5 Solución stock a partir del polvo de extracto de *Hintonia standleyana* contenido en cápsulas cuyo activo es AG-4-Fenilcumarina (1000µg/mL).

De acuerdo a la información que se tiene del proyecto predecesor a éste (Díaz Huerta, 2007), la preparación de la solución se realiza considerando la siguiente relación:

$$\begin{array}{l}
 \mathbf{1g \text{ de polvo de extracto de } *Hintonia standleyana*} \\
 \mathbf{contiene 143.4 \text{ mg del activo AG-4-Fenilcumarina.} \quad (3)}
 \end{array}$$

Calcular el equivalente a 10mg de activo AG-4-Fenilcumarina considerando lo anterior:

$$\begin{array}{rcl}
 1g \text{ de polvo de extracto} & - & 143.4 \text{ mg AG-4-Fenilcumarina} \\
 x & - & 10 \text{ mg AG-4-Fenilcumarina} \quad \mathbf{x = 0.0697g}
 \end{array}$$

En consecuencia pesar 0.0700g de polvo de extracto de *H. standleyana* Transferir a un matraz volumétrico de 10mL y llevar a volumen con medio de disolución HCl 0.1N obteniendo una concentración final de 1000µg/mL de AG-4-Fenilcumarina.

4.6. Desgasificación del medio de disolución.

Desgasificar con ayuda de vacío el medio de disolución de la siguiente forma: Preparar 12L de solución HCl 0.1N, que son colocados en un garrafón de vidrio limpio (B) del equipo desgasificador, colocar las conexiones como se muestra en la figura (2), tapar y conectar al vacío. Se abrió la llave de vacío y se espero a que pasara todo el medio de disolución del garrafón (B) al (A), se cerró el vacío y se invirtieron las conexiones de los garrafones. Se repitió el mismo procedimiento tres veces. (Cabe señalar que este procedimiento no es farmacopeico).

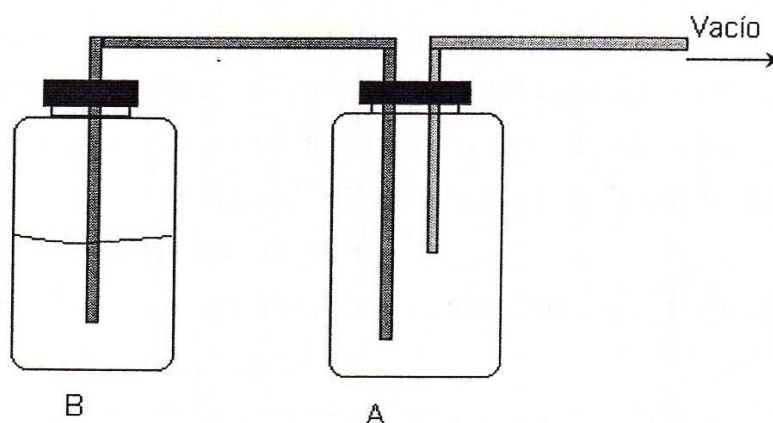


Figura 2. Sistema desgasificador.

4.7 Llenado de vasos del disolutor para la prueba de disolución.

Realizar el siguiente procedimiento, con el medio de disolución previamente desgasificado:

- Registrar el peso de un matraz volumétrico de 250mL vacío = 110.8 g
- Registrar el peso del matraz volumétrico de 250mL con el medio de disolución llevado hasta el aforo = 361.2 g
- El peso del medio de disolución es: $361.2\text{g} - 110.8\text{g} = 250.4\text{g}$

Considerando que 250 mL de medio de disolución pesa 250.4 g, obtenemos la densidad del medio a temperatura ambiente:

$$\begin{array}{l} 250 \text{ mL} - 250.4 \text{ g} \\ 1 \text{ mL} - x \end{array} \quad x = 1.0016 \text{ g pesa 1mL de medio de disolución.}$$

Tomando en cuenta lo anterior considerar la siguiente relación para saber exactamente cuanto medio de disolución se debe pesar, sabiendo que dicho peso equivale a un volumen de 900mL.

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mL} - 1.0016 \text{ g} \\ 900 \text{ mL} - x \end{array} \quad x = 901.44\text{g de medio de disolución en cada vaso del disolutor.} \quad \mathbf{(4)}$$

NOTA: Se pesó el medio de disolución en una balanza analítica con alcance de 2100g. Colocando el vaso sobre una base de corcho para impedir que éste pierda equilibrio sobre la balanza.

4.8. Procedimiento Experimental.

4.8.1. Desarrollo y optimización del método analítico.

4.8.1.1 Preparación de la muestra.

Se preparó solución stock de estándar de AG-4-Fenilcumarina como ya se indicó anteriormente. De esta solución se tomó una alícuota de 500 μL y se transfirió a un matraz volumétrico de 10mL llevándolo a volumen con el medio de disolución HCl 0.1N de esta forma la concentración final es de [50 $\mu\text{g}/\text{mL}$].

4.8.1.2. Desarrollo de condiciones cromatográficas.

De la muestra se tomó 1mL que se colocó en un vial con la finalidad de observar la respuesta del fitofármaco en medio de disolución HCl 0.1N, con las condiciones cromatográficas propuestas en un estudio anterior (Díaz, 2007) al presente trabajo. El estudio antes mencionado propone las siguientes condiciones:

- Volumen de inyección: 20 μL
- Velocidad de flujo: 0.4 mL / min
- Temperatura: ambiente
- Longitud de onda (λ): 327nm
- Proporción fase móvil [ACN – H₂O (TFA 0.1%)]: 19:81

Una vez que se logró obtener una réplica de la señal del fitofármaco (AG-4-Fenilcumarina) en las condiciones propuestas por Díaz (2007), lo siguiente fue modificar las condiciones cromatográficas para optimizar el método para la cuantificación del fitofármaco de interés.

4.8.1.3 Optimización y elección de condiciones cromatográficas.

Para optimizar el método para la cuantificación del fitofármaco, se preparó una solución con concentración 50µg/mL de estándar de AG-4-Fenilcumarina en HCl 0.1N como ya se menciona, mismo que se sometió a diferentes condiciones cromatográficas, modificando la proporción de la fase móvil y la velocidad de flujo.

Finalmente después de realizar y analizar lo antes mencionado, se establecieron las condiciones ideales para la detección y cuantificación del fitofármaco en pH 1.2.

4.8.2 Condiciones cromatográficas elegidas del método analítico.

Las condiciones cromatográficas que se establecieron para la cuantificación de AG-4-Fenilcumarina para el presente estudio, después del desarrollo y optimización del método, son las que se muestran a continuación:

- Volumen de inyección: **20 µL**
- Velocidad de flujo: **1.0 mL / min**
- Temperatura: **25°C**
- Longitud de onda (λ): **327nm**
- Proporción fase móvil [ACN_{HPLC} : H₂O (0.1% TFA)] **(19:81)**
- Columna C-12 Phenomenex Synergi 4uMAX-RP80A
 - N° de serie: 341799-22

4.8.3 Prueba de estabilidad durante 24 hrs a temperatura ambiente.

Se evaluó la estabilidad del estándar de AG-4-Fenilcumarina, de acuerdo procedimiento que a continuación se explica:

- Tiempos de muestreo: **0, 1, 2, 3, 5, 8, 12 y 24 hrs.**

- Se preparó solución stock de estándar de AG-4-Fenilcumarina (Sección 4.5.4).
- De esta solución se tomó una alícuota de 500 μL y se transfirió a un matraz volumétrico de 10mL llevándolo a volumen con medio de disolución HCl 0.1N de esta forma la concentración final es de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Este paso se realizó por triplicado.
- Finalmente de cada matraz se tomó una muestra de 1mL que es colocada en un vial para su análisis en el cromatógrafo durante los tiempos de muestreo establecidos. Es importante señalar que el tiempo cero se considera como la primer corrida cromatográfica inmediata a la preparación de la muestra.

4.8.4 Prueba de estabilidad durante 5 hrs a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

Se evaluó nuevamente la estabilidad del estándar de AG-4-Fenilcumarina a las condiciones mencionadas, ya que estas, son las que se usarían en el estudio de disolución. Y se realizó de la siguiente manera:

- Tiempos de muestreo: **0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 300min.**
- Se preparó solución stock de estándar de AG-4-Fenilcumarina (Sección 4.5.4).
- De esta solución se tomó una alícuota de 500 μL y se transfirió a un matraz volumétrico de 10mL llevándolo a volumen con medio de disolución HCl 0.1N de esta forma la concentración final es de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Inmediatamente el contenido se vertió en un tubo de ensaye que se colocó en un baño de agua a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ en presencia de luz. Este paso se realizó por duplicado.
- Finalmente, de cada tubo, se tomó 1mL de solución a cada tiempo de muestreo para ser inyectados en el cromatógrafo (Todo esto sin retirar los tubos del baño de agua a 37°C). Es importante señalar que el tiempo cero se considera como la primer corrida cromatográfica inmediata a la preparación de la muestra y antes de someterla a las condiciones de estabilidad.

4.8.5 Prueba de Control de Calidad (Peso Promedio)

Se tomaron 20 cápsulas al azar para obtener el peso del polvo de extracto de *H. standleyana* contenido en cada una. Esto se realizó por diferencia de peso, es decir:

$$(\text{Peso de cápsula llena}) - (\text{Peso de cápsula vacía}) = \text{Peso del polvo de extracto de } Hintonia \text{ standleyana.}$$

Con los datos obtenidos se calculó el peso promedio y CV%.

4.8.6 Validación del método analítico.

Al no existir una Norma o regulación para disolución de medicamentos a partir de productos naturales, para fines del presente estudio, se tomo como referencia la NOM-177-SSA1-1998 para cubrir los parámetros de validación del método analítico.

4.8.6.1 Parámetros de Validación del Sistema.

No se realizó experimentalmente la validación del sistema (Linealidad y precisión) ya que no se contaba con la suficiente cantidad de estándar de AG-4-Fenilcumarina. En consecuencia se realizó en cada ocasión que se empleaba el cromatógrafo una Adecuabilidad del Sistema que nos permitía determinar si se estaba desempeñando adecuadamente y en consecuencia era aceptable para su uso.

4.8.6.2 Parámetros de validación del método.

4.8.6.2.1 Linealidad del método.

Para demostrar la linealidad del método se preparó una curva con polvo de extracto de *H. standleyana*, contenido en las cápsulas, con al menos 5 puntos (que incluya los puntos extremos excepto el cero) por triplicado. El coeficiente de regresión debe ser mayor o igual que 0.99 y un error relativo debido a la regresión no mayor que el 3%.

Procedimiento:

- Ya que se preparó la curva patrón por triplicado, cada una de las muestras, se analizan en el cromatógrafo obteniéndose las áreas correspondientes.
- Con los datos de áreas obtenidos se realizan los cálculos necesarios para obtener coeficiente de regresión y Error Relativo debido a la Regresión.

Detalle de cálculos:

A partir de las áreas obtenidas se calcularon para cada curva: Pendiente (m), Ordenada al origen (b) y Coeficiente de regresión (r). El Error Relativo debido a la Regresión (ERR) se calculó utilizando las siguientes ecuaciones:

- Desviación estándar de la regresión ($S_{y/x}$)

$$S_{y/x} = \left[\frac{\sum y^2 - (m * \sum yx) - (b * \sum y)}{N - 2} \right]^{1/2}$$

Donde:

m = Pendiente.

y = Áreas de muestras.

b = Intercepto al origen.

N = Numero de muestras.

x = Concentración.

- Error Relativo debido a la Regresión (ERR)

$$ERR (\%) = \left(\frac{S_{y/x}}{\hat{Y}} \right) * 100$$

Donde \hat{Y} = Promedio de la Respuesta.

4.8.6.2.1.1 Preparación de curva patrón con polvo de extracto de

H. standleyana.

Con el polvo de extracto de *H. standleyana* contenido en 20 cápsulas que se obtuvo en la prueba de Peso Promedio se preparó una solución stock con HCl 0.1 N tal como se muestra en la sección 4.5.5

A partir de ésta solución stock, cuya concentración es de 1000µg/mL de AG-4-Fenilcumarina, se preparó la curva patrón con HCl 0.1 N como medio de disolución de acuerdo al siguiente cuadro:

CUADRO 2. Preparación de curva patrón (Polvo de extracto de *H. standleyana*).

Volumen de la solución stock (µL)	Volumen final (mL)	Concentración [µg/mL]
25	10	2.5
100	10	10
250	10	25
400	10	40
500	10	50

4.8.6.2.2 Exactitud del método.

De cada una de las 3 curvas patrón se obtuvo la ecuación de la recta y se calculó la concentración experimental en cada punto. Con los datos obtenidos se determinó el valor promedio de la Desviación Estándar Absoluta (DEA).

Criterio de aceptación de exactitud. El valor de la Desviación Estándar Absoluta (DEA) debe ser menor o igual del 3%.

Detalle de cálculos:

- **Concentración Experimental:** Se obtiene a partir de la ecuación de la recta en cada curva ($y = mx + b$). Despejando x tenemos lo siguiente:

$$x = \left(\frac{y - b}{m} \right) \quad \text{Donde:}$$

x = Concentración Experimental. b = Intercepto al origen.
 y = Áreas de cada muestra. m = Pendiente.

- **Desviación Estándar Absoluta (DEA %)**

$$\text{DEA \%} = \left[\frac{\text{Concentración Nominal} - \text{Concentración Experimental}}{\text{Concentración Nominal}} \right] * 100$$

4.8.6.2.3 Precisión del método.

Se evaluó como repetibilidad y reproducibilidad.

- **Repetibilidad.** De las 3 curvas patrón de linealidad, calcular la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (%CV) para cada una de las concentraciones nominales.

Criterio de aceptación de la repetibilidad. El valor del coeficiente de variación (%CV), debe ser menor o igual al 3%.

- **Reproducibilidad.** El evento aleatorio que se analiza es un mismo analista en dos días diferentes. Por lo tanto, se preparan curvas patrón por triplicado y por día, empleando el mismo procedimiento que para linealidad.

Criterio de aceptación de la reproducibilidad. De las curvas patrón preparadas en dos días diferentes, se determina para cada concentración la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (%CV), que debe ser menor o igual al 3%.

4.8.6.2.4 Selectividad del método.

Preparación de las muestras:

- Estándar de AG-4-Fenilcumarina: Partiendo de una solución stock del estándar (Sección 4.5.4) se preparó una muestra, transfiriendo 500 μL de la solución stock a un matraz volumétrico de 10 mL para obtener una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AG-4-Fenilcumarina en HCl 0.1N.
- Polvo de extracto de *H. standleyana*: De una solución stock del polvo (Sección 4.5.5) se preparó una muestra, en HCl 0.1N, transfiriendo 500 μL de la solución stock a un matraz volumétrico de 10 mL para obtener una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AG-4-Fenilcumarina.
- Cápsula vacía: Se realizó una corrida cromatográfica a la solución obtenida de una cápsula de gelatina dura disuelta en HCl 0.1N con la finalidad de observar alguna posible interferencia de esta al método.

De las muestras se obtuvieron al realizar la corrida cromatográfica un espectro en 3D del barrido en la región del UV que se comparan de forma cualitativa entre sí.

Criterio de aceptación de selectividad. Se debe demostrar la selectividad del método para el fitofármaco (AG-4-Fenilcumarina) ante otros componentes de la muestra, cualquier interferencia no debe producir un error mayor al aceptado en precisión y exactitud.

4.8.6.3 Prueba de influencia del filtro. (Especificación: %Retenido \leq 2.0%).

Para esta prueba se evaluaron los siguientes filtros: Filtro de teflón tipo acrodisk (cubeta) y de membrana (swinnex).

Preparación de la muestra:

Calcular la cantidad de polvo de extracto de *H. standleyana*, necesaria para que la concentración de su activo AG-4-Fenilcumarina, sea de 25µg/mL, que es una concentración intermedia en la curva patrón:

$$\begin{array}{rcl} 1\text{g de polvo de extracto} & - & 143.4 \text{ mg AG-4-Fenilcumarina} \\ x & - & 1.25 \text{ mg AG-4-Fenilcumarina} \end{array} \quad x = \mathbf{0.00872g}$$

En consecuencia, se pesaron 0.0087g de polvo de extracto de *H. standleyana*, contenido en las cápsulas y llevar al aforo con HCl 0.1N en un matraz volumétrico de 50mL [25µg/mL]. El contenido se transfirió a un vaso de precipitado para realizar el procedimiento de filtración

Procedimiento:

- Del vaso se tomo 1mL sin filtrar que se colocó en un vial para obtener su respuesta cromatográfica (muestra sin filtrar). Esta respuesta se consideró como el 100% en el momento de efectuar los cálculos.
- Inmediatamente después se tomó 2 mL de la solución contenida en el vaso usando filtro de teflón, la muestra, se colocó en un tubo de ensaye del que se tomó 1mL para su análisis en el cromatógrafo. Este mismo procedimiento se realizó 6 veces utilizando el mismo filtro.
- Con las áreas obtenidas de las seis muestras se calculó el porcentaje de fitofármaco retenido mismo que se detallará en la parte de resultados.
- En el caso del filtro de membrana (swinnex) se realiza el mismo procedimiento que ya se indicó con la misma solución de 25 µg/mL contenida en el vaso.

4.8.6.4 Prueba preliminar de disolución.

Se llevó a cabo colocando en el disolutor una cápsula vacía y 2 cápsulas conteniendo polvo de extracto de *Hintonia standleyana* con la finalidad de determinar las condiciones y tiempos de muestreo. Cabe señalar que para efecto de cálculos es necesario preparar una curva patrón con estándar de AG-4-Fenilcumarina.

4.8.6.4.1 Preparación de curva patrón con estándar de AG-4-Fenilcumarina.

Se preparó una solución stock con HCl 0.1 N tal como se muestra en la sección 4.5.4. A partir de ésta solución stock, cuya concentración es de 1000µg/mL de AG-4-Fenilcumarina, se preparó la curva patrón con HCl 0.1 N como medio de disolución de acuerdo al siguiente cuadro:

CUADRO 3. Curva patrón con estándar de AG-4-Fenilcumarina.

Volumen de la solución stock (µL)	Volumen final (mL)	Concentración [µg/mL]
25	10	2.5
100	10	10
250	10	25
400	10	40
500	10	50

De cada una de las soluciones se tomo 1mL y se coloco en viales para su posterior inyección al cromatógrafo.

4.8.6.4.2 Cantidad de AG-4-Fenilcumarina contenida en cada cápsula.

Registrar el peso promedio del contenido de 20 cápsulas, previamente pesadas de manera individual, conteniendo polvo de extracto de *Hintonia standleyana* = **0.2234g**.

En base a la relación ya mencionada (1g de polvo de extracto de *Hintonia standleyana* contiene 143.4 mg del activo AG-4-Fenilcumarina), se calculó la cantidad de activo, que hay en cada cápsula conteniendo polvo de extracto de *Hintonia standleyana* considerando el peso promedio:

$$\begin{array}{rcl}
 1\text{g de polvo de extracto de } H.\textit{standleyana} & - & 143.4 \text{ mg AG-4-Fenilcumarina} \\
 0.2234\text{g de polvo de extracto de } H.\textit{standleyana} & - & x
 \end{array}$$

$$\mathbf{x = 32.03\text{mg de AG-4-Fenilcumarina}}$$

En conclusión cada cápsula contiene 32.03 mg de AG-4-Fenilcumarina que para efectos de cálculo en la disolución será considerado como el 100% de contenido.

4.8.6.4.3 Procedimiento del preliminar de disolución.

Las condiciones experimentales de disolución controladas son las siguientes:

- Volumen del medio de disolución: 900 mL
- Medio de Disolución: HCl 0.1N (pH 1.2)
- Aparato No. 1 (Canastillas)
- Temperatura: 37°C ± 0.5°C
- Velocidad de agitación: 100rpm
- Tiempos de muestreo: 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos.
- *Tiempos de muestreos únicamente de la cápsula vacía: 5, 15, 45 y 90 min.
- Volumen de muestreo: 2mL (SIN REPOSICIÓN DE VOLUMEN)

a) Procedimiento:

- ~ Encender disolutor y termocirculador. En el panel de control del equipo ajustar 100 rpm y 37°C.
- ~ Proceder al llenado de vasos como se indico anteriormente (sección 4.7), con medio de disolución previamente desgasificado, y colocarlos en su respectivo espacio dentro del disolutor para que alcancen la temperatura deseada.
- ~ Una vez que se comprobó que la temperatura de trabajo es constante en el interior de cada vaso. Colocar los vástagos del disolutor e incorporarles su respectiva canastilla que contienen una cápsula en estudio.
- ~ Bajar los vástagos y accionar las rpm.
- ~ En cada tiempo de muestreo se toman 2mL que se colocan en un tubo de ensaye previamente etiquetado.
- ~ Se tomó 1mL de cada muestra y se coloco en viales para realizar la corrida cromatográfica.

b) Cálculos para determinar el perfil de disolución:

- ~ Graficar las áreas vs. Concentraciones de AG-4Fenilcumarina para cada punto de la curva patrón. Obtener la ecuación de la recta y coeficiente de correlación.
- ~ Calcular la concentración de las muestras interpolando en la ecuación de la recta.
- ~ Determinar la cantidad disuelta a cada tiempo de cada vaso, para ello multiplicar la concentración de las muestras por el volumen del medio de disolución y sumando los μg tomados en cada alícuota del tiempo de muestreo anterior.
- ~ Calcular el % disuelto en cada tiempo, de acuerdo al contenido de fitofármaco por cápsula y determinar su promedio, desviación estándar y su % CV en cada tiempo. Graficar con estos datos **% disuelto promedio vs tiempo**.

4.8.6.5 Estudio del perfil de disolución.

Se llevó a cabo evaluando 12 cápsulas conteniendo polvo de extracto de *Hintonia standleyana* elegidas aleatoriamente.

La preparación de la curva patrón con estándar de AG-4-Fenilcumarina se realizó de acuerdo a lo descrito en el preliminar de disolución (Sección 4.8.6.4).

4.8.6.5.1 Condiciones experimentales para el perfil de disolución.

Después de evaluar el preliminar de disolución, las siguientes son las condiciones que se plantearon para el estudio de disolución:

- Volumen del medio de disolución: 900 mL
- Medio de disolución: HCl 0.1N
- Aparato No. 1 (Canastillas)
- Temperatura: 37°C ± 0.5°C
- Velocidad de agitación: 100rpm
- Tiempos de muestreo: 5, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 minutos.
- Volumen de muestreo: 2mL (SIN REPOSICIÓN DE VOLUMEN)

El procedimiento para llevar a cabo el estudio del perfil de disolución fue el mismo que el mostrado en el preliminar de disolución (Sección 4.8.6.4.3 inciso a), así como los cálculos para determinar el perfil de disolución (Sección 4.8.6.4.3 inciso b)

Para el cálculo del porcentaje disuelto, se considera que el **polvo de extracto de *Hintonia standleyana* contenido en cada cápsula tiene 32.03mg del activo AG-4-Fenilcumarina** como se menciona con anterioridad.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 Desarrollo y optimización del método analítico.

La figura 3 muestra el cromatograma que se obtuvo aplicando las condiciones cromatográficas del estudio que precede al presente (Díaz, 2007), se visualiza que la señal de interés está bien definida, pero el tiempo de retención es alto. Razón por la que basándonos en esto se modificó la proporción y flujo de la fase móvil, con la finalidad de disminuir el tiempo de retención.

En la figura 4 observamos un cromatograma típico en el que se puede visualizar que la señal o pico del compuesto en estudio (AG-4-Fenilcumarina) está bien definido y con una separación adecuada de las señales de menor intensidad. Lo antes mencionado indica que las condiciones cromatográficas (sección 4.8.2) desarrolladas en el presente estudio, fueron las adecuadas para la cuantificación de AG-4-Fenilcumarina.

std de AG-4-Fenilcumarina con tiempo de retención de 11.54 min

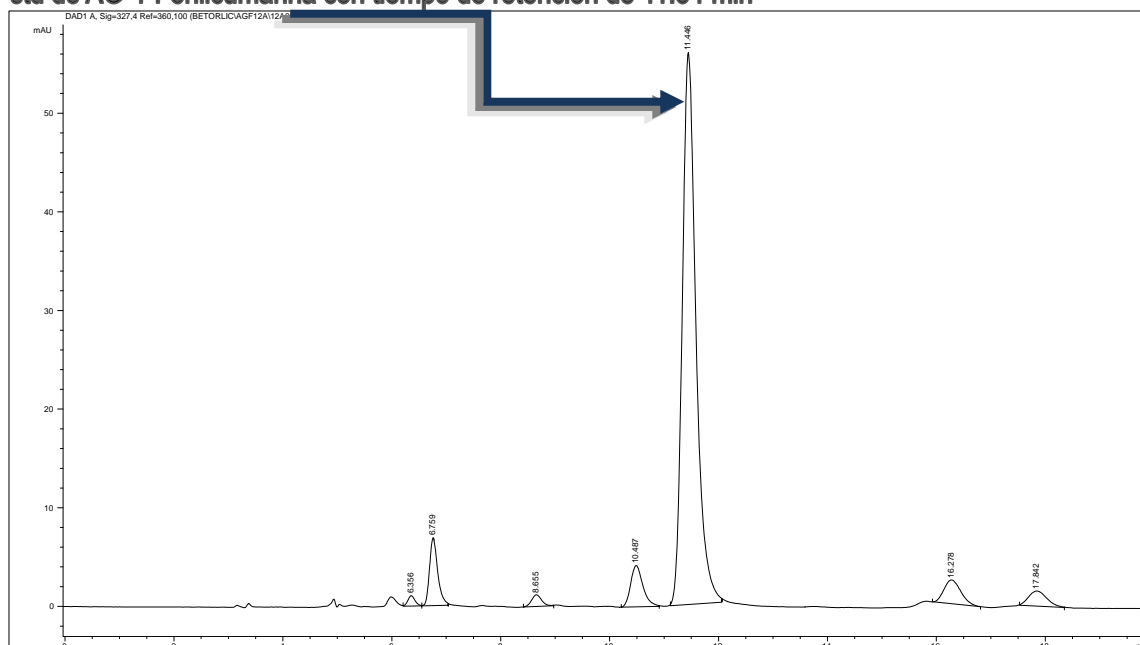


Figura 3. Cromatograma del estándar de AG-4-Fenilcumarina obtenido a partir de las condiciones cromatográficas propuestas por Díaz (2007)

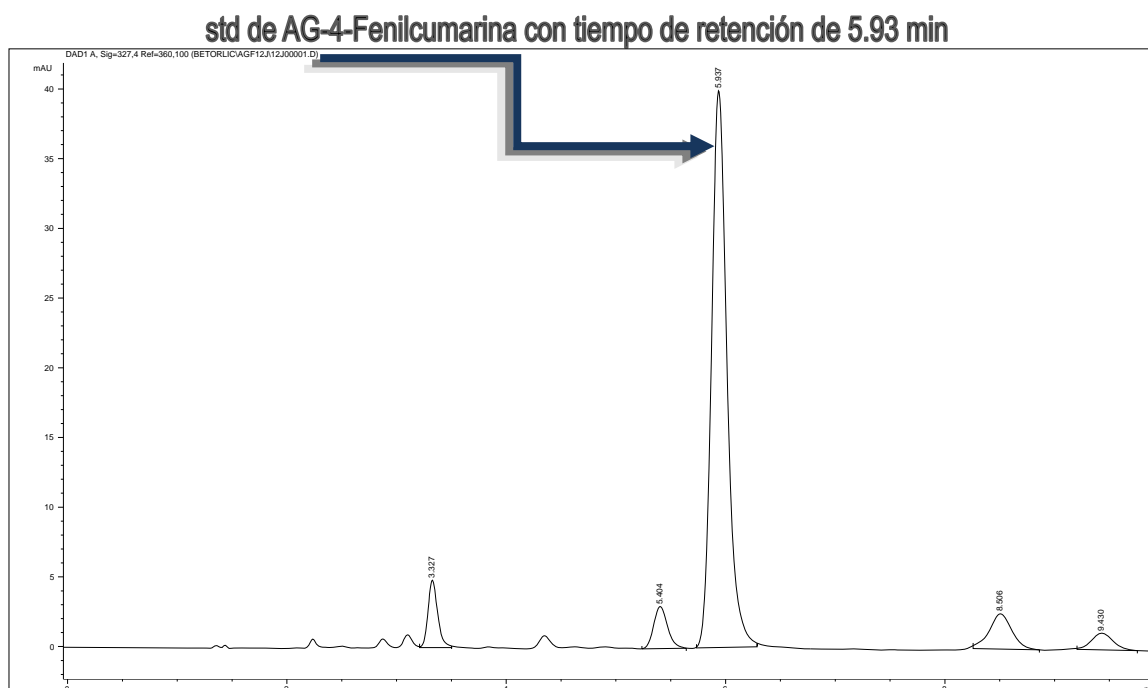


Figura 4. Cromatograma del estándar de AG-4-Fenilcumarina obtenido con las condiciones cromatográficas elegidas para el presente estudio

5.2 Prueba de Estabilidad durante 24hr / Temperatura ambiente.

La tabla 1 muestra los resultados de estabilidad del estándar de AG-4-Fenilcumarina a temperatura ambiente en solución de HCl 0.1N (pH 1.2). La figura 5 muestra la cinética correspondiente.

Los resultados muestran una disminución de las áreas a medida que transcurre el tiempo, lo cual pudo deberse a una degradación del compuesto; esto es un indicativo de que la AG-4-Fenilcumarina no es estable a temperatura ambiente durante 24 horas y es predecible saber que a medida que transcurra mayor tiempo las áreas y/o porcentaje del compuesto irán disminuyendo.

Considerando lo anterior y sabiendo que las condiciones de temperatura en el estudio de disolución es de $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, se procedió a realizar otra prueba de estabilidad a la temperatura ya mencionada y con tiempo de muestreo no mayores a 5 horas. Esto a razón de que es el tiempo en que aproximadamente tardaría la prueba de disolución.

Tabla 1. Estabilidad del estándar de AG-4-Fenilcumarina, a temperatura ambiente durante 24 horas, en solución de HCl 0.1N (pH 1.2).

Tiempo (hrs)	Áreas de muestras			D.E.	Promedio Áreas	CV %	% No degradado compuesto
	Muestra1	Muestra2	Muestra3				
0	375.29669	374.78262	374.70609	0.32118	374.92847	0.086	100
1	373.38324	372.97327	373.08133	0.21249	373.14595	0.057	99.52
2	373.25177	371.75873	370.00711	1.62405	371.67254	0.437	99.13
3	371.70236	371.11761	369.59122	1.09001	370.80373	0.294	98.90
5	366.45593	366.1084	365.10587	0.70101	365.89007	0.192	97.59
8	360.06888	358.91266	357.85464	1.10748	358.94539	0.309	95.74
12	353.57373	352.04797	350.077	1.75308	351.89957	0.498	93.86
24	341.73517	341.409	338.3064	1.89248	340.48352	0.556	90.81

D.E. = Desviación estándar (n=3)
 CV% = Coeficiente de variación (%)

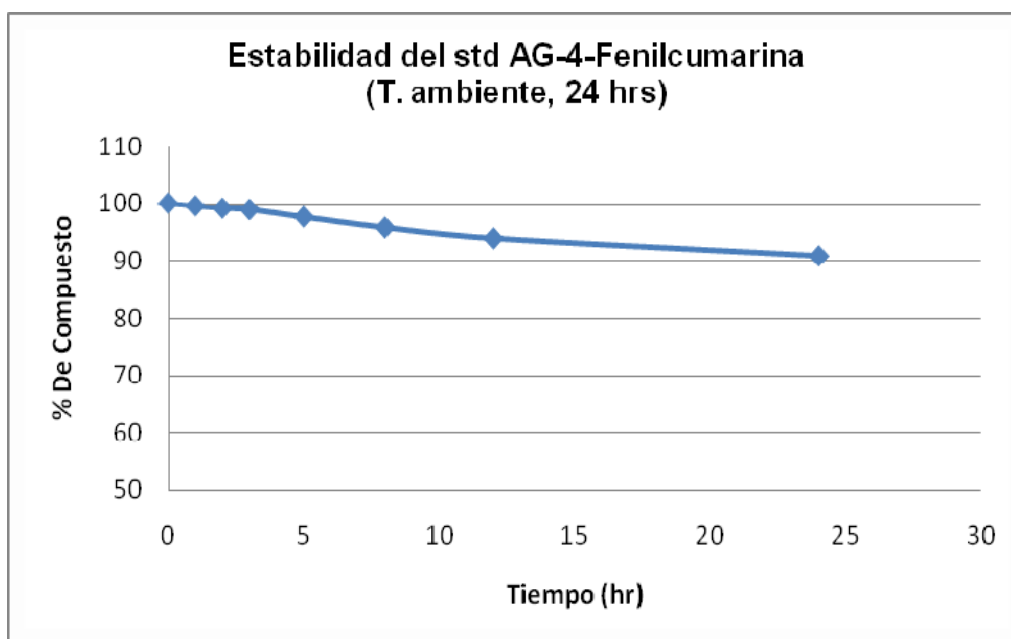


Figura 5. Estabilidad del estándar de AG-4-Fenilcumarina, a temperatura ambiente durante 24 horas, en solución de HCl 0.1N (pH 1.2).

5.3 Prueba de Estabilidad 5hr / 37°C.

En la tabla 2 se presentan los resultados de estabilidad a 37°C ±0.5°C. La cinética se presenta en la figura 6. Los datos muestran que la disminución de las áreas de la

AG-4-Fenilcumarina es mínima durante las cinco horas en la que se llevó a cabo dicha prueba.

Dado que no se observa una drástica degradación del compuesto, en este lapso de tiempo, la prueba de disolución a las cápsulas dosificadas con polvo de extracto de *H. standleyana* fue confiable.

Tabla 2. Estabilidad del estándar AG-4-Fenilcumarina en temperatura de 37°C ± 0.5°C durante 5 horas, en solución de HCl 0.1N (pH 1.2).

Tiempo (min)	Áreas de las muestras		D.E.	Promedio Áreas	CV %	% No degradado Compuesto
	Muestra 1	Muestra 2				
0	352.16711	353.37958	0.8573	352.77335	0.2430	100
15	353.09024	351.3385	1.2387	352.21437	0.3517	99.84
30	350.87256	350.10425	0.5433	350.48841	0.1550	99.35
45	350.3732	348.04059	1.6494	349.20690	0.4723	98.99
60	348.37982	347.5809	0.5649	347.98036	0.1623	98.64
120	343.08118	343.27246	0.1353	343.17682	0.0394	97.28
180	338.85413	338.65662	0.1397	338.75538	0.0412	96.03
300	330.15692	328.02512	1.5074	329.09102	0.4581	93.29

D.E. = Desviación estándar (n=2)
 CV% = Coeficiente de variación (%)

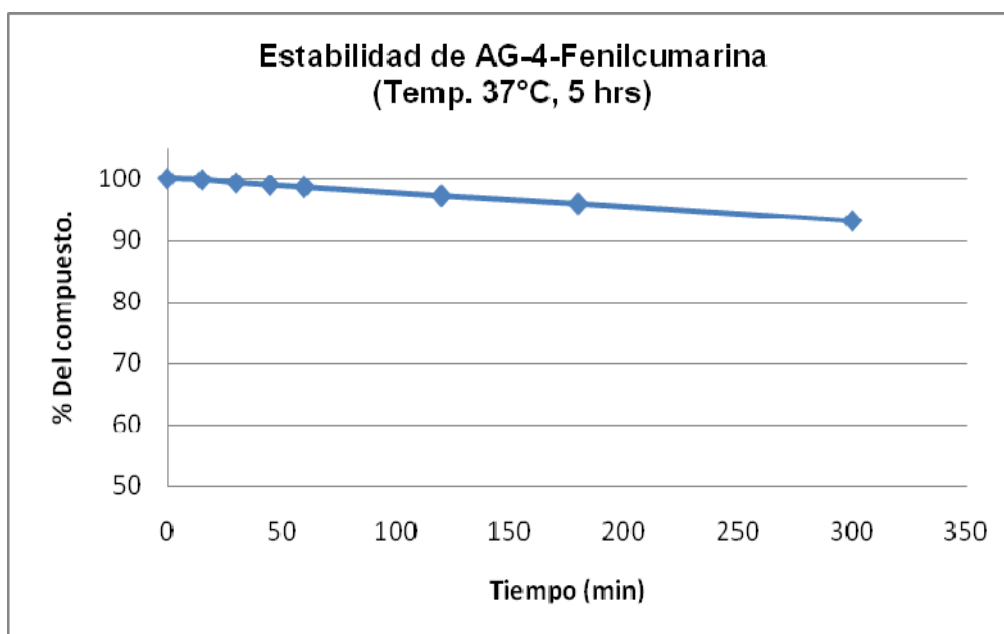


Figura 6. Estabilidad del estándar AG-4-Fenilcumarina en temperatura de 37°C ± 0.5°C durante 5 horas, en solución de HCl 0.1N (pH 1.2).

5.4 Prueba de Control de calidad (Peso promedio)

La tabla 3 muestra los datos y resultado del contenido promedio de polvo de extracto de *Hintonia standleyana* en cada cápsula.

Tabla 3. Resultados para determinar peso promedio del contenido de polvo de extracto de *H. standleyana* en cada cápsula.

No. De cápsula	Peso del contenido de la cápsula (g)	No. de cápsula	Peso del contenido de la cápsula(g)
1	0.2252	11	0.2227
2	0.2217	12	0.2226
3	0.2233	13	0.2234
4	0.2239	14	0.2229
5	0.2244	15	0.2236
6	0.2227	16	0.2239
7	0.2239	17	0.2226
8	0.2235	18	0.2244
9	0.2227	19	0.2234
10	0.223	20	0.2236
		D.E.	0.0008
		Promedio	0.2234
		CV %	0.36

D.E. = Desviación estándar (n=20)
CV% = Coeficiente de variación (%)

5.5. Validación del método.

Se evaluaron cada uno de los siguientes parámetros de validación del método:

5.5.1. Linealidad del método.

La tabla 4 muestra los resultados de linealidad obtenidos de la curva patrón preparada por triplicado a partir del polvo de extracto de *Hintonia standleyana* contenido en las cápsulas de gelatina dura. Se observa que se encuentran dentro de las especificaciones ya que el coeficiente de correlación en las tres curvas es mayor a 0.99, y el Error Relativo debido a la Regresión (ERR) es menor al 3%. La figura 9 muestra la gráfica que reafirma lo antes mencionado.

En consecuencia, se considera que el método analítico en el intervalo de concentraciones de 2.5 a 50 µg/mL es lineal.

Tabla 4. Linealidad del método de cápsulas dosificadas con polvo de extracto de *Hintonia standleyana*.

Conc. (µg/mL)	Áreas de AG-4Fenilcumarina. Día 1		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
2.5	19.70244	21.9656	20.3061
10	77.17368	76.72836	76.63361
25	190.017	190.70476	189.87405
40	312.71423	312.31671	312.27701
50	390.2211	389.95975	389.91803
Intercepto Origen (b)	-1.360654	-0.06070	-1.214606
Pendiente (m)	7.81672	7.78022	7.80456
Correlación (r)	0.9999	0.9999	0.9999
ERR %	1.35	1.43	1.39

ERR %= Error Relativo debido a la Regresión.

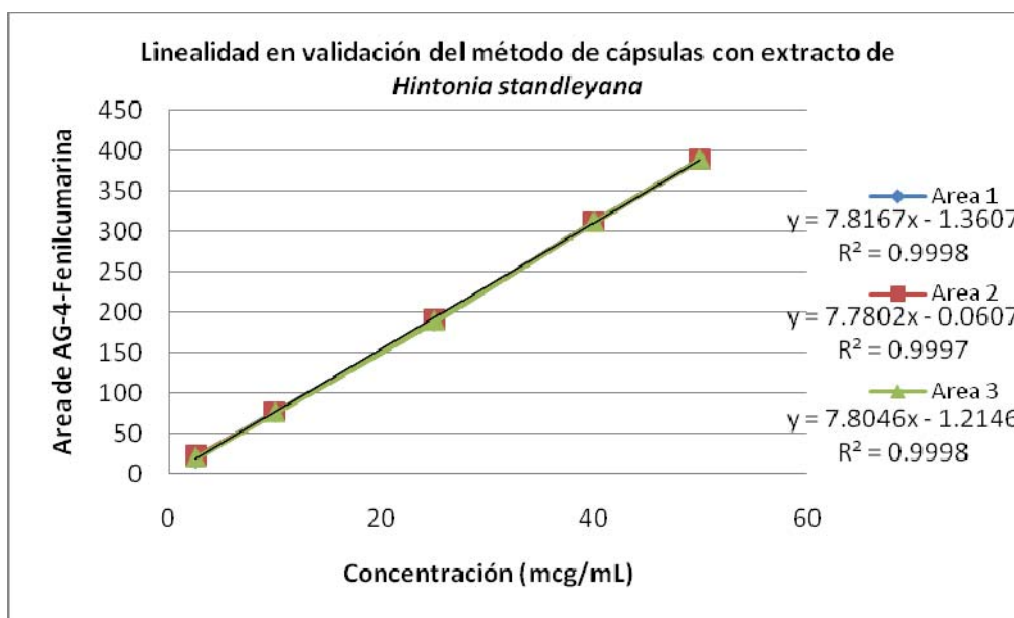


Figura 7. Linealidad del método de cápsulas dosificadas con polvo de extracto de *Hintonia standleyana*.

5.5.2. Exactitud del método.

Los resultados se presentan en la tabla 5. En ella se observa que a partir de la $C_0=10\mu\text{g/mL}$, se cumple con el criterio de aceptación, que especifica que el valor del porcentaje de la Desviación Estándar Absoluta (%DEA) con respecto a la cantidad nominal no debe variar en más de 3% en cada punto. La menor concentración ($2.5\mu\text{g/mL}$) no cumple con la especificación, lo cual puede deberse a poca sensibilidad en el método. Pero a pesar de que el método no es exacto en la concentración más baja se considera como confiable, a razón de que, no hay una regulación para estudios de disolución de productos naturales con efectos terapéuticos como es nuestro caso.

Tabla 5. Exactitud del método de cápsulas dosificadas con polvo de extracto de *H. standleyana*.

<i>Co Nominal</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Concentración experimental</i> ($\mu\text{g/mL}$)				
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	% DEA
2.5	2.694	2.831	2.757	2.76104	10.441
10	10.046	9.869	9.974	9.96381	0.361
25	24.483	24.519	24.484	24.4955	2.017
40	40.179	40.150	40.167	40.1659	0.414
50	50.095	50.129	50.115	50.1136	0.227

%DEA = Desviación Estándar Absoluta.

5.5.3. Precisión del método.

5.5.3.1. Repetibilidad.

A partir de los datos obtenidos en la linealidad que se encuentran en la sección 5.5.1, se calculó el coeficiente de variación (%CV) a cada concentración de la curva.

En la tabla 6 se puede observar que los resultados cumplen con el criterio de aceptación de la concentración 10 a 50µg/mL, pues los coeficientes de variación se encuentran dentro del valor de especificación. Lo que respecta a la concentración 2.5µg/mL que se encuentra fuera de especificación, se puede señalar que a pesar de que la sensibilidad del método es baja a dicha concentración. Aun así, los resultados son aceptables considerando que se trata de un producto natural sin una regulación para este tipo de estudios.

Tabla 6. Precisión del método (Repetibilidad) de cápsulas dosificadas con polvo de extracto de *Hintonia standleyana*.

Concentración (µg/mL)	Áreas de AG-4-Fenilcumarina			Día 1		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	D.E.	% C.V.
2.5	19.70244	21.9656	20.3061	20.65805	1.17191	5.673
10	77.17368	76.72836	76.63361	76.84522	0.28838	0.375
25	190.017	190.70476	189.87405	190.19860	0.44413	0.234
40	312.71423	312.31671	312.27701	312.43598	0.24178	0.077
50	390.2211	389.95975	389.91803	390.03296	0.16426	0.042

D.E. = Desviación estándar (n=3)
CV% = Coeficiente de variación (%)

5.5.3.2. Reproducibilidad.

Como bien se sabe, para esta parte de la validación se refiere la precisión del método en diferentes condiciones o evento aleatorio, para este estudio se evaluó dos días diferentes por un mismo analista

Para calcular la concentración experimental del DÍA 1 se realizó a partir de los datos de linealidad que se encuentran en la sección 5.7.1.

Los cálculos para obtener la concentración experimental del DÍA 2 se realizaron a partir de los datos que se muestran en la tabla 7.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 8 se muestran los resultados de esta prueba, y en ellos se puede observar que a partir de la $Co=10\mu\text{g/mL}$, se cumple con el criterio de aceptación. Por otro lado, en lo que respecta a la concentración más baja, esta se encuentra fuera de especificación, lo cual quiere decir que el método no es preciso a dicha concentración.

Tabla 7. Áreas de AG-4Fenilcumarina contenida en el polvo del extracto de *Hintonia standleyana* dosificada en cápsulas (DÍA 2).

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Áreas de AG-4-Fenilcumarina			Día 2		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	D.E.	% C.V.
2.5	19.33992	21.16297	21.32907	20.61065	1.1036	5.355
10	79.39484	80.93513	80.52	80.28332	0.7970	0.993
25	194.06372	192.04631	192.29558	192.80187	1.0999	0.570
40	307.6413	310.72464	307.08536	308.48377	1.9605	0.636
50	386.71893	385.08908	383.37622	385.06141	1.6715	0.434

D.E. = Desviación estándar (n=3)
CV% = Coeficiente de variación (%)

Tabla 8. Precisión del método (Reproducibilidad) de cápsulas dosificadas con polvo de extracto de *Hintonia standleyana*.

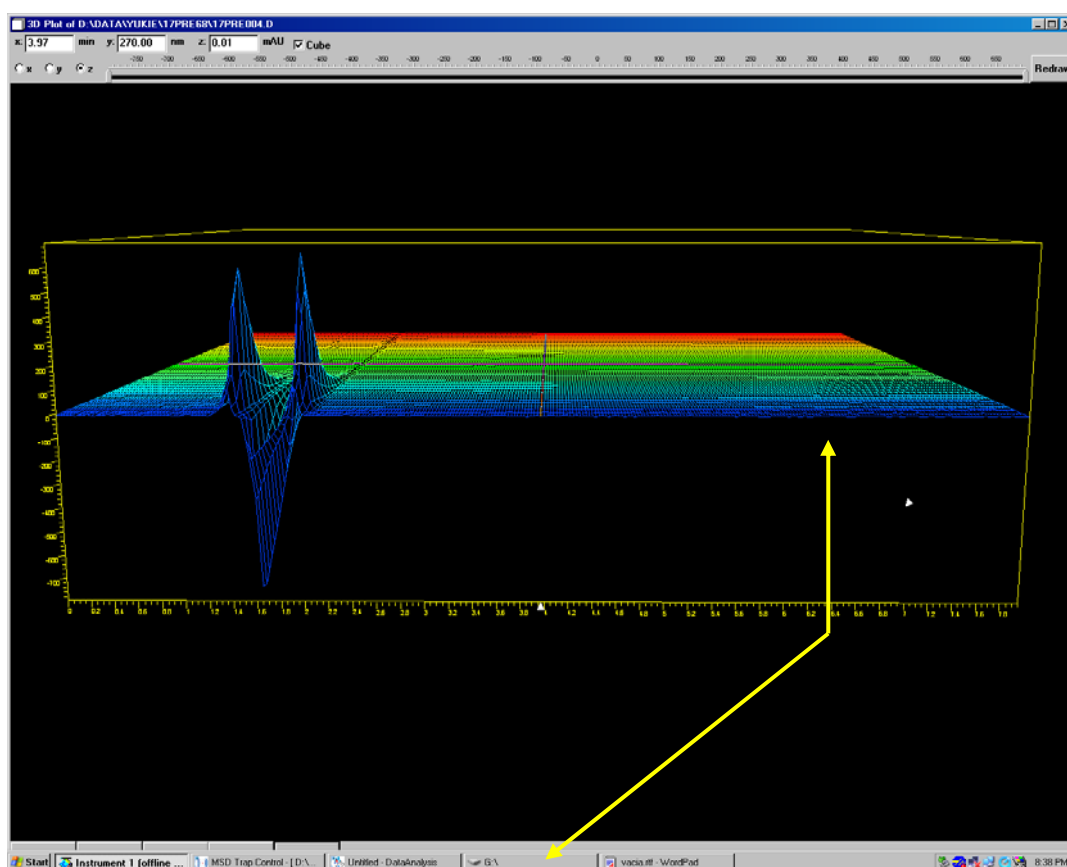
Co Nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Co experimental ($\mu\text{g/mL}$) Día 1			Co experimental ($\mu\text{g/mL}$) Día 2			Promedio	D.E.	CV%
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 1	Curva 2	Curva 3			
2.5	2.69	2.83	2.76	2.37	2.42	2.40	2.58	0.2063	8.00
10	10.05	9.87	9.97	10.17	10.22	10.19	10.08	0.1376	1.37
25	24.48	24.52	24.48	25.06	24.72	24.89	24.69	0.2428	0.98
40	40.18	40.15	40.17	39.82	40.22	39.99	40.09	0.1538	0.38
50	50.10	50.13	50.12	50.09	49.93	50.03	50.06	0.0765	0.15

D.E. = Desviación estándar (n=6)
CV% = Coeficiente de variación (%)

5.5.4. Selectividad del método.

La figura 10 muestra el espectro en tercera dimensión (3D) de un barrido en UV que se obtiene de una muestra en condiciones de disolución de una cápsula vacía. Por otra parte, la figura 11 corresponde a un espectro en 3D de un barrido en UV del estándar de AG-4-Fenilcumarina y la Fig. 12 al polvo del extracto de *H. standleyana*.

Analizando los espectros es evidente que en el tiempo de retención en el que se presenta la señal de la AG-4-Fenilcumarina (Fig. 11 y 12), en el espectro de la cápsula vacía (Fig. 9) no se presenta ninguna señal. Por lo que se concluye que no existe alguna interferencia causada por algún componente de la cápsula que pueda provocar un error en la cuantificación de la AG-4-Fenilcumarina. Considerando lo anterior el método se considera selectivo para AG-4-Fenilcumarina en estudios de disolución.



En el tiempo 5.8 minutos no se observó ninguna señal.

Figura 8. Espectro en tercera dimensión de una cápsula vacía.

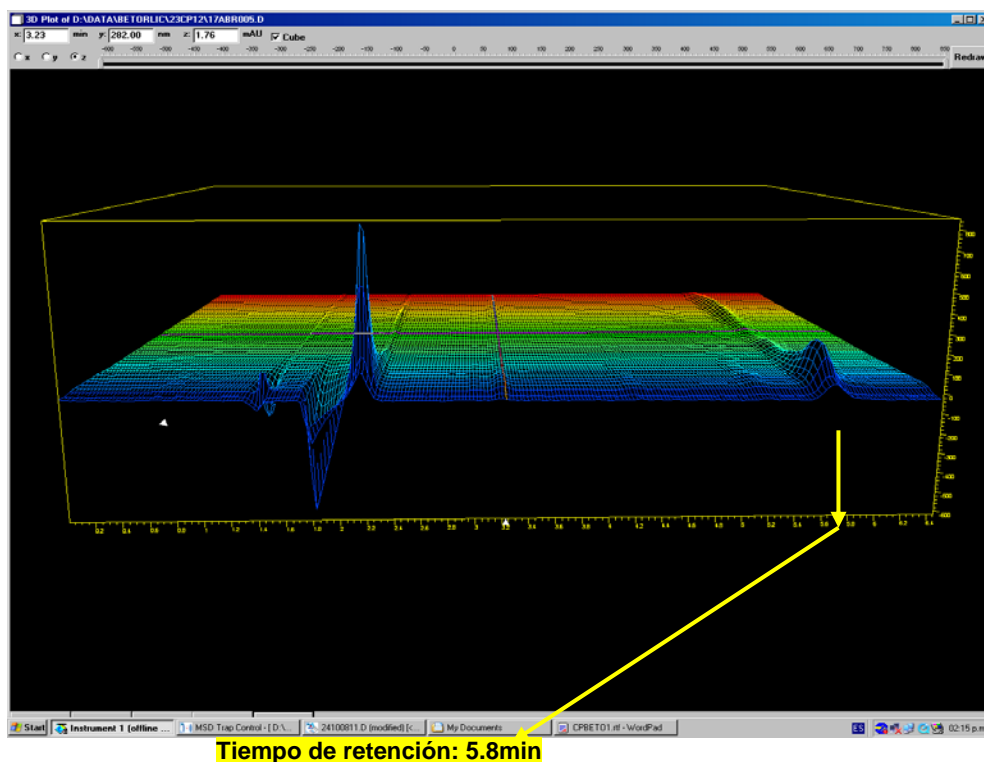


Figura 9. Espectro en tercera dimensión del Estándar de AG-4-Fenilcumarina.

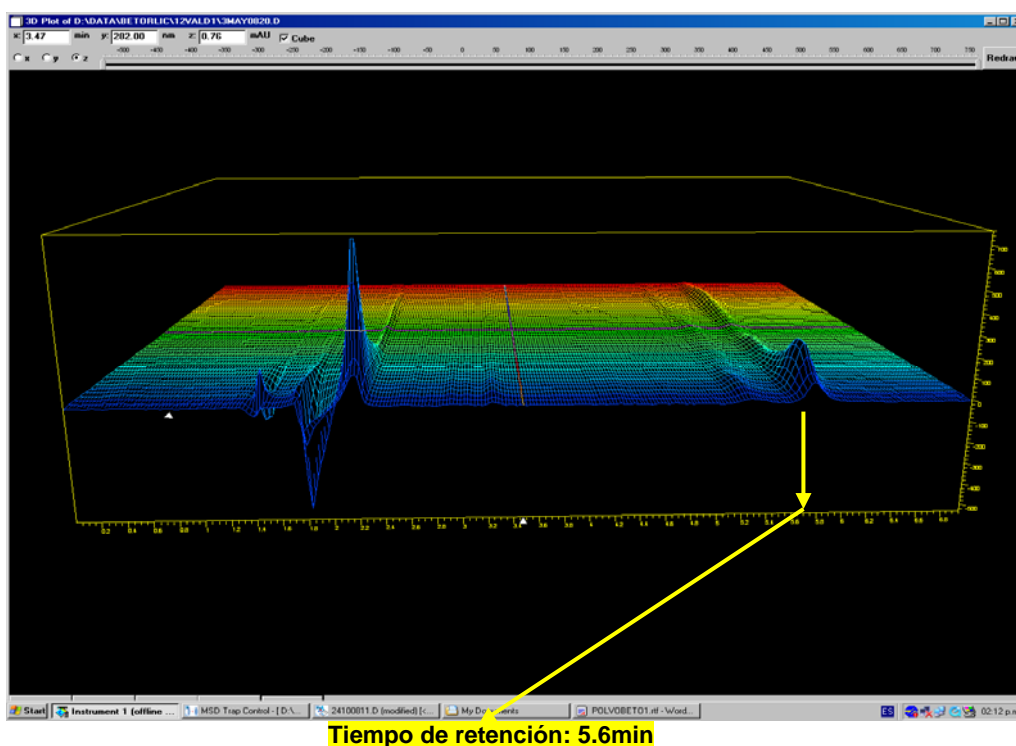


Figura 10. Espectro en tercera dimensión del polvo de extracto de *H. standleyana*.

5.6. Influencia del filtro.

En la tabla 9 se presentan los resultados que obtenidos de esta prueba. En ella se puede observar que el porcentaje de retención obtenido al utilizar el filtro de teflón se encuentra dentro de la especificación y es menor al obtenido con el filtro de membrana (swinnex) el cual también se encuentra dentro de especificación. Por ello el de teflón se eligió para realizar el perfil de disolución.

Tabla 9. Influencia del filtro de teflón y del filtro de membrana (swinnex).

Áreas de AG-4Fenilcumarina			
	Área Teflón	Área swinnex	Área sin filtrar
Tubo 1	241.85133	241.05179	242.85977
Tubo 2	242.14912	242.7971	
Tubo 3	243.18736	241.61885	
Tubo 4	242.89917	241.53818	
Tubo 5	242.76389	242.09206	
Tubo 6	242.21924	242.5161	
D.E.	0.51445794	0.654680919	
Promedio	242.511685	241.93568	
CV %	0.212	0.271	
% Retenido	0.143	0.381	

D.E. = Desviación estándar (n=6)
 CV% = Coeficiente de variación (%)

Los cálculos se realizaron en base a la siguiente relación:

Área sin filtrar	---	100 %
Promedio de áreas del filtrado	---	X

$$100\% - X = \% \text{ Retenido.}$$

5.7. Preliminar de disolución.

A pesar de que el primer tiempo de muestreo presentó un coeficiente de variación alto (Tabla 10), en la figura 14 se observa una curva con tres puntos distribuidos en la fase ascendente y de inflexión. Por otro lado, en los 30min ya hay un 100% de fitofármaco disuelto, razón por la cual, se redujeron los tiempos de muestreo. La figura 13 que se refiere a la cápsula vacía, muestra que no hay señal que interfiera en la cuantificación de la AG-4-Fenilcumarina.

Tabla 10. Porcentaje de Fitofármaco (extracto de *H. standleyana*) dosificado en cápsulas disuelto, en medio pH 1.2, en cada tiempo.

Tiempo (min)	% Disuelto		D.E.	Media % Disuelto	C.V. %
	Vaso1	Vaso2			
5	8.70	18.10	6.64745	13.40	49.620
10	62.80	75.02	8.63668	68.91	12.533
15	96.02	106.66	7.52010	101.34	7.420
30	107.08	109.04	1.38989	108.06	1.286
45	108.41	108.13	0.19595	108.27	0.181
60	107.49	108.81	0.93534	108.15	0.865
75	107.53	108.04	0.35833	107.79	0.332
90	107.17	107.84	0.47965	107.51	0.446

D.E. = Desviación estándar (n=2)
 CV% = Coeficiente de variación (%)
 Medio de Disolución = HCl 0.1N (pH 1.2)

VASO 3 = Cápsula vacía. No se registro ninguna señal.

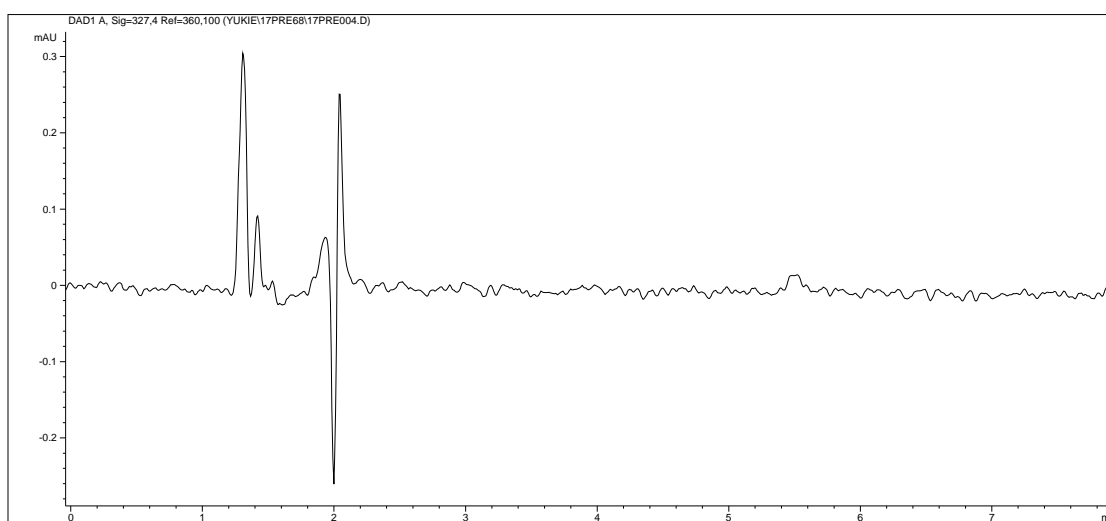
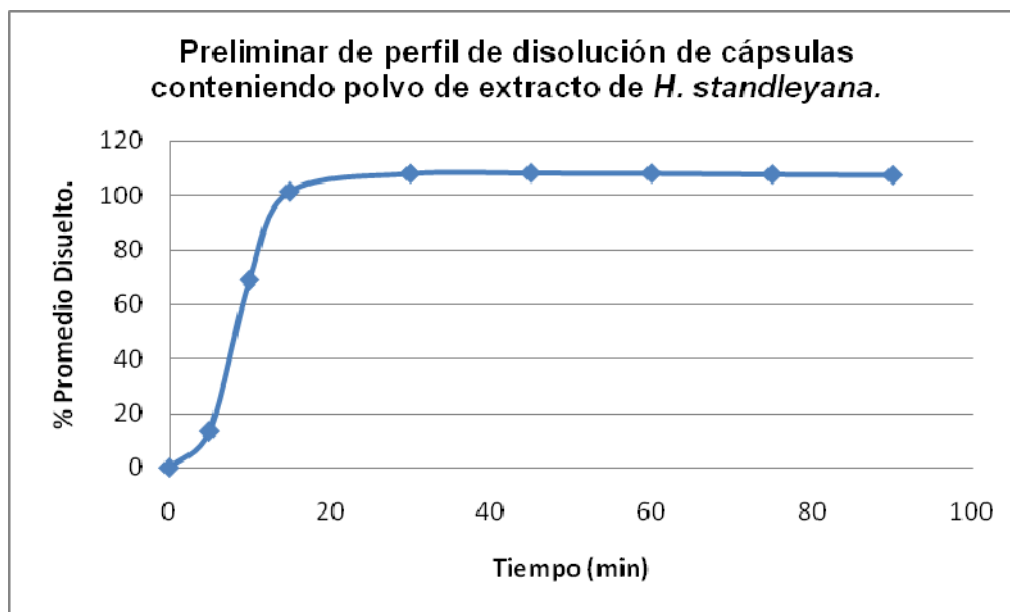


Figura 11. Cromatograma de la cápsula vacía.



Medio de Disolución = HCl 0.1N (pH 1.2)

Figura 12. Perfil de disolución preliminar de cápsulas dosificadas con polvo de extracto de *H. standleyana*

Para calcular el porcentaje de fitofármaco disuelto a cada tiempo se basa en lo siguiente:

32.03mg de AG-4-Fenilcumarina hay en el polvo de extracto de *Hintonia standleyana*, contenido en cada cápsula.

Ejemplo. Al tiempo de 30 minutos.

32.03 mg de AG-4-Fenilcumarina - 100%

34.27 mg de AG-4-Fenilcumarina - x

x = 107.08 %

5.8. Estudio del perfil de disolución.

En los resultados que se muestran en la tabla 11 se observa una liberación del fitofármaco mayor al 85% antes de los 15 minutos, por lo que las cápsulas que contienen el extracto de *Hintonia standleyana*, presentan una muy rápida disolución en pH 1.2 considerando que las condiciones de disolución fueron con aparato 1 (canastillas) a 100rpm. Lo anterior basado en la guía “Exención de los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia in vivo para formas posológicas orales sólidas de liberación inmediata en base a su sistema de clasificación Biofarmacéutica” publicada por la FDA. Aunque para darle una clasificación más certera es necesario comparar con perfiles de disolución en pH 4.5 y 6.8.

La figura 15 muestra la cinética correspondiente al perfil de disolución de las 12 cápsulas dosificadas con polvo de extracto de *H. standleyana*.

La figura 16 muestra el cromatograma ejemplo de los obtenidos en el estudio de perfil de disolución, donde se observa el pico bien definido de la AG-4-Fenilcumarina que es el compuesto activo del polvo de extracto de *H. standleyana*.

Tabla 11. Porcentaje disuelto promedio de 12 cápsulas con polvo de extracto de *Hintonia standleyana* a diferentes tiempos.

Tiempo (min)	Promedio % Disuelto (n=12)	Cantidad (mg) Disuelta AG-4-Fc	DE (n=12)	% CV (n=12)
5	12.97	4.5	4.11299	31.72
10	64.19	20.6	6.27816	9.78
15	99.15	31.7	2.22840	2.25
20	105.02	33.6	1.31986	1.26
30	105.21	33.7	1.26128	1.20
45	104.73	33.5	1.28933	1.23
60	104.31	33.3	1.22088	1.17

D.E. = Desviación estándar (n=12)
 CV% = Coeficiente de variación (%)
 Medio de Disolución = HCl 0.1N (pH 1.2)

Para calcular el porcentaje de fitofármaco disuelto a cada tiempo se utilizó la relación:

32.03mg de AG-4-Fenilcumarina hay contenido en cada cápsula.

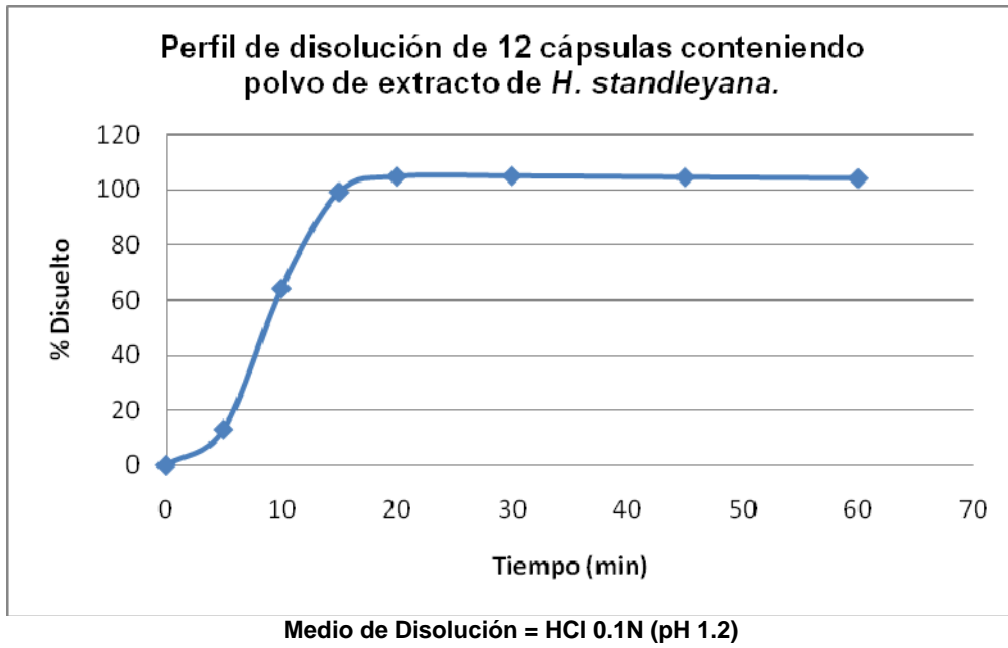


Figura 13. Perfil de disolución de 12 cápsulas con polvo de extracto de *H. standleyana*.

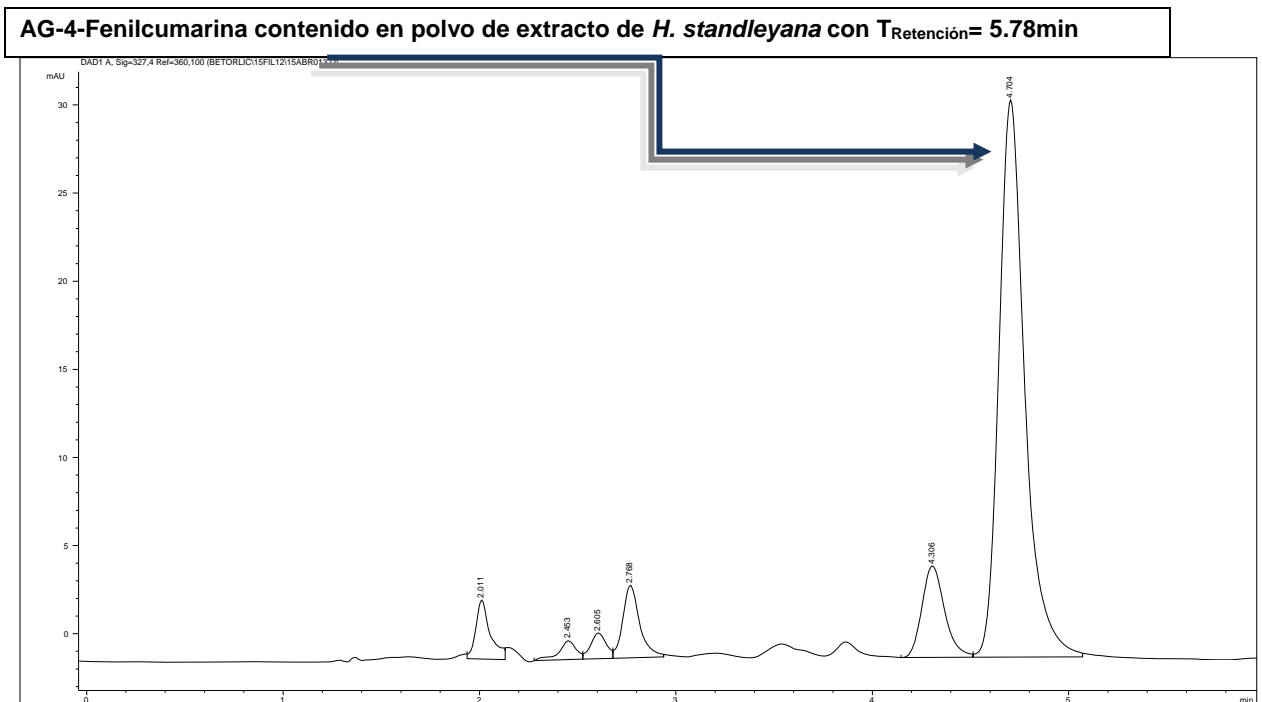


Figura 14. Cromatograma obtenido a partir de cápsulas que contienen polvo de extracto de *Hintonia standleyana*.

VI. CONCLUSIONES

- Se desarrollo un método analítico para la cuantificación de AG-4-Fenilcumarina presente en el polvo obtenido a partir de un extracto acuoso de la corteza de *Hintonia standleyana*.
- El método analítico se valido demostrándose lineal, preciso, exacto, selectivo. En el rango de concentración de 2.5 – 50 µg/mL
- El perfil de disolución de las cápsulas dosificadas con el polvo de extracto de *Hintonia standleyana*, en solución de HCl 0.1N (pH 1.2) demostró que el fitofármaco (AG-4-Fenilcumarina) se disuelve más del 85% a los 15min. Por lo que podría considerarse como una disolución “Muy rápida”.

VII. BIBLIOGRAFÍA.

1. Argotte-Ramos, R., Ramírez-Ávila, G., Rodríguez-Gutiérrez, M.C., Ovilla-Muñoz, M., Lanz-Mendoza, H., Rodríguez, M., González-Cortazar, M., Álvarez, Laura., 2006. Antimalarial 4-phenylcoumarins from the stem bark of *Hintonia latiflora*. J. Nat. Prod. 69, 1442–1444.
2. Boshell, BR. Gómez-Pérez, FJ.: Diabetes Mellitus en: Conn HF, Conn RB, Editores. "Current Diagnosis". WB Saunders, Co 1974:681-86.
3. Deciga-Campos, M., Guerrero-Analco, JA., Quijano, L., Mata, R., 2006. Antinociceptive activity of 3-O-b-D-glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin from *Hintonia standleyana* (Rubiaceae). Pharmacol. Biochem. Behav. 83, 342-348.
4. Díaz Huerta, Mitzi Rocio, "Validación de métodos analíticos por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) para cuantificar Xantocilina en *Matricaria recutita* y establecer los perfiles de disolución de cápsulas duras de un extracto acuoso de *Hintonia standleyana*", Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, 2007.
5. EURACHEM (1998) The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. EURACHEM Secretariat, Teddington, Middlesex, <http://www.vtt.fi/ket/eurachem>
6. FHEUM (Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos) 2001. Secretaria de Salud. 1era Edición. México D.F.
7. Guerrero A; Antihyperglycemic Effect of Constituents from *Hintonia Standleyana* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats; Planta Med 2005; 71: 1099-1105.

8. Guidance on the selection of comparator pharmaceutical products for equivalence assessment of interchangeable multisource (generic) products. Thirty-sixth Report of the WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. WHO Technical Report Series, No. 902, 2002: 161-180.
9. Guidance for industry. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. FDA, CDER, Agosto 2000.
10. Hauschke D, Steinijans VW, Diletti E. A distribution-free procedure for the statistical analysis of bioequivalence studies. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*, 1990, 28:72-78.
11. Hersch-Martínez (1996) Destino común los recolectores y su flora medicinal Instituto Nacional de Antropología e Historia. México D.F.
12. HHS/FDA Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products - General Considerations, March 2003.
13. Hokanson G. A Life Cycle Approach to the validation of analytical methods during pharmaceutical product development. Part I. The initial method validation process. *Pharm. Technol.* 1994. 18(9): 118-130.
14. Hortwitz W. "Evaluation of Analytical Methods used for Regulation of Food and Drugs" *Anal. Chem.* 54(1):67A. 1982.
15. ICH- Technical Coordination- R. Bass, (1998); ICH Topic Q1A Stability testing Guidelines: Stability testing of new drug substances and product.
16. ICH-FDA Guidelines For the photostability testing of new drug substances and products; availability; notice Federal Register vol. 62 N°95 (05,1997).
17. ICH-FDA Guidelines availability: Impurities in new drug substances; notice. Federal Register Vol. 61. N° 3 (01,1996).

18. ICH Impurities: Guideline for residual solvents (07,1997).Mata, R., Camacho, M., Mendoza, S., Cruz, M.C., 1992. Phenylstyrene from *Hintonia latiflora*. *Phytochemistry* 31, 3199–3201.
19. ISO, International Organization for Standardization (1993) 3534-1, Statistics, Vocabulary and symbols, ISO, Geneva.
20. ISO, International Organization for Standardization (1994a) ISO Guide 5725, Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results.
21. IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry (1999a) Harmonised Guidelines for In-House Validation of Methods of Analysis (Technical report) http://www.iupac.org/projects/1997/501_8_97.html.
22. IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry (1999b) Harmonised guidelines for the use of recovery information in analytical measurement, *Pure Appl. Chem.*, 71, 337-348.
23. IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry (2001) Selectivity in Analytical Chemistry Technical Draft. <http://www.iupac.org/publications/pac/2001/>.
24. Linares E. y Bye R. (1987) A study of four medicinal plants complexes of Mexico and adjacent United States. *Journal of Ethnopharmacology*. 19, 153-83.
25. Mahady G.B. (1998) Herbal Medicine and Pharmacy Education. *Journal American Pharmaceutical Association*. 38, 274.
26. Mata R., Analaco J., Development and Validation of Liquid Chromatography Method for Quantification of the Active Markers of *Hintonia standleyana* and *Hintonia latiflora* Crude Drugs, *Pharmaceutical Biology* 2008; 46: 105-110.
27. Multisource (Generic) pharmaceutical products: Guidelines on registration requirements to establish interchangeability (OMS).

28. Norma oficial mexicana, NOM-015-SSA2-1994, "Para la prevención, tratamiento y control de la Diabetes Mellitus en la atención primaria".
29. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
30. USP 24 The United States Pharmacopeia -NF19 The National Formulary, Chapter<1225> Validation of Compendial Methods, Enero 2000. ISBN 1-889788-03-1.
31. Vander-Heyden, Y., Nijhuis A., Smeyers-Verbeke, J., Vandeginste, B.G.M., Massart, D.L. (2001) Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 24, 723-753.
32. Westlake WJ. Bioavailability and Bioequivalence of Pharmaceutical Formulations, in Biopharmaceutical Statistics for Drug Development (Peace KE, ed.), Marcel Dekker, Inc., 1988, 329-352.
33. WHO-TRM (Organización Mundial de Salud-Medicina Tradicional) Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review. WHO, Geneva, Switzerland 1-5.
34. Organización Mundial de Salud (1999) Guidelines for the assessment of herbal medicines. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
35. Youden, W.J. (1947) Technique for testing the accuracy of analytical data. Anal. Chem. 19, 946-950.
36. www.emea.europa.eu
37. www.fda.gov/cder/guidance/cmc5.pdf
38. www.fda.gov/cder/guidance/3618fnl.htm
39. www.fda.gov/cder/guidance/index.htm

VIII. Anexo.

8.1 Estudio completo de Disolución.

Curva Patrón	
Co (µg/mL)	Relacion A.
2.5	18.2748
10	71.2194
25	176.6527
40	286.8815
50	361.4311
Pend. (m)	7.2166
Inters. (b)	-1.13251101
Corr. (r)	0.999926

Ecuacion de la recta: $y = mx + b$

Despejando: $x = (y - b) / m$

Donde:

x = Concentracion (µg/mL)

y = Abs.

Volumen de muestra (mL): **2**

Volumen en vaso durante el muestreo.	
Tiempo (min)	Vol. (mL)
5	900
10	898
15	896
20	894
30	892
45	890
60	888

Areas a los diferentes tiempo de muestreo AG-4-FC												
Tiempo (min)	Vaso1	Vaso2	Vaso3	Vaso4	Vaso5	Vaso6	Vaso7	Vaso8	Vaso9	Vaso10	Vaso11	Vaso12
5	49.33078	27.38799	43.67053	23.3139	18.41585	38.43253	21.61215	17.6308	34.52927	26.29276	37.88463	31.60074
10	144.20628	161.44733	186.69087	143.22598	141.22447	167.44078	142.77747	142.77249	148.64659	165.26801	172.61534	172.70073
15	246.47028	242.30542	255.7317	237.6582	234.01004	247.1169	241.89737	244.08548	242.14824	242.41319	248.42917	245.91948
20	261.7948	262.28729	263.97302	259.42657	259.98465	260.2637	259.24863	256.46008	254.47096	255.06172	255.12263	255.05568
30	260.23102	262.94525	263.9949	259.88712	260.75534	261.11905	260.70923	257.58157	254.26553	255.08575	256.23758	256.41507
45	259.87399	262.67981	262.09534	258.58774	259.89096	259.41611	258.75406	255.37595	252.70575	253.29591	256.53613	255.96443
60	257.49533	260.24731	263.10403	256.6933	258.72006	258.70801	257.39432	255.49211	254.02646	252.95218	253.51617	254.46368

Concentraciones calculadas a los diferentes tiempos (µg/mL)												
Tiempo (min)	Vaso1	Vaso2	Vaso3	Vaso4	Vaso5	Vaso6	Vaso7	Vaso8	Vaso9	Vaso10	Vaso11	Vaso12
5	6.99263	3.95205	6.20829	3.38750	2.70879	5.48247	3.15170	2.60001	4.94160	3.80028	5.40655	4.53580
10	20.13939	22.52846	26.02642	20.00355	19.72621	23.35896	19.94140	19.94071	20.75468	23.05789	24.07599	24.08783
15	34.30997	33.73285	35.59331	33.08889	32.58337	34.39957	33.67631	33.97951	33.71107	33.74778	34.58141	34.23365
20	36.43347	36.50171	36.73530	36.10530	36.18264	36.22130	36.08065	35.69424	35.41861	35.50047	35.50891	35.49964
30	36.21678	36.59288	36.73833	36.16912	36.28943	36.33983	36.28304	35.84964	35.39015	35.50380	35.66341	35.68800
45	36.16730	36.55610	36.47511	35.98907	36.16965	36.10385	36.01212	35.54402	35.17401	35.25579	35.70478	35.62556
60	35.83769	36.21903	36.61488	35.72656	36.00740	36.00573	35.82370	35.56011	35.35702	35.20816	35.28631	35.41760

Cantidad acumulada a cada tiempo en Vol. De muestreo (mg)												
Tiempo (min)	Vaso1	Vaso2	Vaso3	Vaso4	Vaso5	Vaso6	Vaso7	Vaso8	Vaso9	Vaso10	Vaso11	Vaso12
5	0.00000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0.01398525	0.00790409	0.01241659	0.00677501	0.00541758	0.01096494	0.00630339	0.00520001	0.00988321	0.00760056	0.0108131	0.0090716
15	0.05426404	0.05296101	0.06446943	0.04678211	0.04486999	0.05768287	0.0461862	0.04508144	0.05139256	0.05371633	0.05896509	0.05724725
20	0.12288397	0.12042671	0.13565605	0.1129599	0.11003673	0.12648201	0.11353881	0.11304046	0.1188147	0.1212119	0.12812791	0.12571455
30	0.19575091	0.19343013	0.20912665	0.1851705	0.182402	0.19892462	0.18570011	0.18442894	0.18965193	0.19221285	0.19914573	0.19671382
45	0.26818446	0.26661589	0.28260331	0.25750875	0.25498086	0.27160427	0.25826619	0.25612823	0.26043222	0.26322045	0.27047255	0.26808983
60	0.34051906	0.3397281	0.35555353	0.32948689	0.32732017	0.34381198	0.33029042	0.32721626	0.33078024	0.33373203	0.34188211	0.33934095

Cantidad de fitofarmaco disuelto en cada tiempo (mg)												
Tiempo (min)	Vaso1	Vaso2	Vaso3	Vaso4	Vaso5	Vaso6	Vaso7	Vaso8	Vaso9	Vaso10	Vaso11	Vaso12
5	6.55559	3.70504	5.82028	3.17579	2.53949	5.13982	2.95471	2.43751	4.63275	3.56276	5.06864	4.25231
10	18.85271	21.08140	24.35796	18.71843	18.45764	21.86133	18.65982	18.65808	19.42416	21.57633	22.53190	22.54123
15	32.07690	31.53695	33.28489	30.92975	30.45602	32.16395	31.47741	31.75929	31.51506	31.55165	32.33495	32.00865
20	34.05155	34.11264	34.34540	33.73602	33.80512	33.85757	33.71364	33.35330	33.10240	33.18103	33.19580	33.18475
30	33.84717	34.19432	34.34516	33.79231	33.90133	33.96468	33.89869	33.49472	33.07300	33.18116	33.33640	33.35682
45	33.79829	34.15717	34.09807	33.62237	33.78726	33.74289	33.64450	33.20839	32.86967	32.94827	33.37178	33.29595
60	33.49039	33.84233	34.22432	33.37655	33.63417	33.64912	33.46721	33.22032	33.03602	32.90128	32.98172	33.10062

Porcentaje de Fitofarmaco disuelto respecto al marbete en cada tiempo. (%)						Marbete: 32.03mg de AG-4-Fenilcumarina en cada cápsula.						
Tiempo (min)	Vaso1	Vaso2	Vaso3	Vaso4	Vaso5	Vaso6	Vaso7	Vaso8	Vaso9	Vaso10	Vaso11	Vaso12
5	20.47	11.57	18.17	9.92	7.93	16.05	9.22	7.61	14.46	11.12	15.82	13.28
10	58.86	65.82	76.05	58.44	57.63	68.25	58.26	58.25	60.64	67.36	70.35	70.38
15	100.15	98.46	103.92	96.56	95.09	100.42	98.27	99.15	98.39	98.51	100.95	99.93
20	106.31	106.50	107.23	105.33	105.54	105.71	105.26	104.13	103.35	103.59	103.64	103.61
30	105.67	106.76	107.23	105.50	105.84	106.04	105.83	104.57	103.26	103.59	104.08	104.14
45	105.52	106.64	106.46	104.97	105.49	105.35	105.04	103.68	102.62	102.87	104.19	103.95
60	104.56	105.66	106.85	104.20	105.01	105.05	104.49	103.72	103.14	102.72	102.97	103.34

Resultados de media (x), Desviación estandar (DE) y Coeficiente de variación (CV%) de los porcentajes disueltos en cada tiempo.

Tiempo (min)	X (n=12)	DE (n=12)	CV% (n=12)
5	12.97	4.11299	31.72
10	64.19	6.27816	9.78
15	99.15	2.22840	2.25
20	105.02	1.31986	1.26
30	105.21	1.26128	1.20
45	104.73	1.28933	1.23
60	104.31	1.22088	1.17