



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

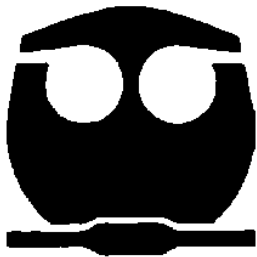
**ESTUDIO DEL PERFIL DE DISOLUCIÓN A pH 6.8, DEL COMPUESTO
AG-4-FENILCUMARINA DOSIFICADO EN CÁPSULAS, POR
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

YUKIE EKATERINA LEE URQUIZA



MÉXICO, D. F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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. Dra. Inés Fuentes Noriega.

VOCAL. Dra. Helgi Helen Jung Cook.

SECRETARIO. Maria de Lourdes Mayet Cruz.

1^{er}. SUPLENTE. Lauro Misael del Rivero Ramírez.

2^o. SUPLENTE. M. en C. 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:

Yukie Ekaterina Lee Urquiza.

A LA Dra. RACHEL MATA ESSAYAG

FACULTAD DE QUÍMICA PAIP 6390-05

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi mamá por su apoyo y por toda su comprensión a lo largo de mi vida, porque a pesar de mis tropiezos y errores, me entendió y sobre todo confió en que si terminaría el gran proyecto de ser una profesionista. Agradezco su compañía y por ser una de mis inspiraciones por las cuales he terminado esta carrera.

Gracias a mi padre por enseñarme a no rendirme frente adversidades, por apoyarme en momentos difíciles de mi vida y por creer que puedo ser una gran persona.

Gracias a mi hermana, por su compañía y por ser un ejemplo para mí de cómo llegar a ser una persona responsable e independiente.

Muchas gracias de todo corazón a mis papás y a mi hermana, por enseñarme a ser fuerte y proponerme a mi misma que cada día puedo ser una mejor persona. Los Quiero Mucho.

Gracias a mis tíos César, Elena y mi prima Grecia, por ser mi familia y parte de mi vida.

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.

AGRADECIMIENTOS

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.

Gracias a Roberto por su compañía en los últimos semestres de la carrera, fue un apoyo muy importante porque me enseñó a recuperar la confianza en mi misma, por ayudarme y estar a mi lado en todo momento, y sobre todo porque forma parte de mi vida.

A mis amigos Javier, Arturo, Claudia y Lulú, que han estado conmigo por un largo tiempo, no solo en mi vida profesional. Son muy importantes para mí.

A Montse y Roberto por el gran trabajo en equipo que realizamos juntos, para poder culminar con éxito este proyecto.

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. | IV |
| LISTA DE FIGURAS. | V |
| LISTA DE TABLAS. | VII |
| | |
| I. ANTECEDENTES. | |
| 1.1. Antecedentes de la especie <i>Hintonia standleyana</i> . | 1 |
| 1.2. Diabetes mellitus. | 2 |
| 1.3. Preparado farmacéutico de <i>Hintonia standleyana</i> . | 3 |
| 1.4. Importancia de los perfiles de disolución. | 3 |
| 1.5. Validación de Métodos Analíticos. | 5 |
| 1.6. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM). | 7 |
| | |
| II. OBJETIVOS. | 8 |
| | |
| III. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES. | 9 |
| 3.1. Solución amortiguadora de fosfatos 0.05M (pH 6.8). Medio de disolución. | 9 |
| 3.2. Agua acidificada con TFA al 0.1%, para la preparación de la fase móvil. | 10 |
| 3.3. Fase móvil [ACN:H ₂ O (TFA 0.1%)]. | 11 |
| 3.4. Desgasificación del medio de disolución. | 11 |
| 3.5. Llenado de vasos del disolutor para la prueba de disolución. | 12 |

| ÍNDICE | | Página |
|---|--|-----------|
| IV. PARTE EXPERIMENTAL. | | 13 |
| 4.1. Preparación de la muestra. | | 13 |
| 4.2. Desarrollo del método analítico. | | 13 |
| 4.2.1 Condiciones cromatográficas del método analítico. | | 14 |
| 4.3. Prueba de estabilidad (A). | | 14 |
| 4.4. Prueba de estabilidad (B). | | 15 |
| 4.5. Prueba de influencia del filtro. | | 15 |
| 4.6. Prueba preeliminar de disolución. | | 16 |
| 4.7. Prueba de validación. | | 18 |
| 4.7.1. Linealidad del método. | | 19 |
| 4.7.2. Exactitud del método. | | 19 |
| 4.7.3. Precisión del método. | | 20 |
| 4.7.4. Selectividad del método. | | 20 |
| 4.8. Estudio del perfil de disolución. | | 21 |
| 4.8.1 Condiciones experimentales para perfil de disolución. | | 21 |
| V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. | | 22 |
| 5.1. Desarrollo del método analítico. | | 22 |
| 5.2. Prueba de Estabilidad (A). | | 23 |
| 5.3 Prueba de Estabilidad (B). | | 24 |
| 5.4. Prueba de influencia del filtro. | | 26 |
| 5.5. Prueba preeliminar de disolución. | | 26 |
| 5.6. Prueba de validación. | | 29 |

| ÍNDICE | | Página |
|--|--|---------------|
| 5.6.1. Linealidad del método. | | 29 |
| 5.6.2. Exactitud del método. | | 30 |
| 5.6.3. Precisión del método. | | 31 |
| 5.6.3.1. Repetibilidad. | | 31 |
| 5.6.3.2. Reproducibilidad. | | 32 |
| 5.6.4. Selectividad del método. | | 34 |
| 5.7. Estudio del perfil de disolución. | | 35 |
| | | |
| VI. CONCLUSIONES. | | 38 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA | | 39 |
| VIII. ANEXOS. | | 44 |
| ANEXO A. Reactivos. | | 44 |
| Tipos de filtro. | | 45 |
| Material. | | 45 |
| ANEXO B. Equipos | | 46 |

LISTA DE CUADROS

| | Página |
|--|-----------|
| Cuadro 1. Clasificación Biofarmacéutica. | 5 |
| Cuadro 2. Preparación de curva patrón con estándar de AG-4-Fenilcumarina. | 17 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| Figura 1. <i>Hintonia standleyana</i> (Copalchi). | 1 |
| Figura 2. Sistema desgasificador. | 11 |
| Figura 3. Cromatograma del estándar de AG-4-Fenilcumarina. | 22 |
| Figura 4. Estabilidad del estándar de AG-4-Fenilcumarina, a temperatura ambiente y durante 24 horas, en solución amortiguadora de fosfatos (pH 6.8). | 24 |
| Figura 5. Estabilidad del estándar AG-4-Fenilcumarina, a temperatura de $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y durante 5 horas, en solución amortiguadora de fosfatos (pH 6.8). | 25 |
| Figura 6. Cromatograma de la cápsula vacía. | 27 |
| Figura 7. Porcentaje de Fitofármaco (extracto de <i>H. standleyana</i> dosificado en cápsulas), disuelto en cada tiempo. | 28 |
| Figura 8. Linealidad del método de cápsulas dosificadas con polvo de extracto de <i>H. standleyana</i> . | 30 |
| Figura 9. Espectro en tercera dimensión de una cápsula vacía. | 34 |
| Figura 10. Espectro en tercera dimensión del estándar de AG-4-Fenilcumarina. | 35 |

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 11. Perfil de disolución de 12 cápsulas con polvo de extracto de
Hintonia standleyana. 37

Figura 12. Cromatograma de cápsulas dosificadas con polvo de extracto de
Hintonia standleyana. 37

LISTA DE TABLAS

| | Página |
|---|-----------|
| Tabla 1. Estabilidad del estándar de AG-4-F, a temperatura ambiente y durante 24 horas, en solución amortiguadora de fosfatos (pH 6.8). | 23 |
| Tabla 2. Estabilidad del estándar AG-4-Fenilcumarina, a temperatura de $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y durante 5 horas, en solución amortiguadora de fosfatos (pH 6.8). | 25 |
| Tabla 3. Influencia del filtro de teflón y del filtro de membrana. | 26 |
| Tabla 4. Porcentaje de Fitofármaco (extracto de <i>H. standleyana</i> dosificado en cápsulas) disuelto en cada tiempo. | 27 |
| Tabla 5. Linealidad del método de cápsulas dosificadas con polvo de extracto de <i>H. standleyana</i> . | 29 |
| Tabla 6. Exactitud del método de cápsulas dosificadas con polvo de extracto de <i>H. standleyana</i> . | 31 |
| Tabla 7. Precisión del método (Repetibilidad) de cápsulas dosificadas con polvo de extracto de <i>H. standleyana</i> . | 32 |
| Tabla 8. Áreas de las cápsulas dosificadas con polvo de extracto de <i>H. standleyana</i> (DÍA 2). | 33 |

LISTA DE TABLAS

Página

| | |
|---|-----------|
| Tabla 9. Precisión del método (Reproducibilidad) de cápsulas dosificadas con polvo de extracto de <i>H. standleyana</i> (DÍA 2). | 33 |
| Tabla 10. Porcentaje promedio de 12 cápsulas con polvo de extracto de <i>Hintonia standleyana</i> , disuelto a diferentes tiempos. | 36 |

I. ANTECEDENTES

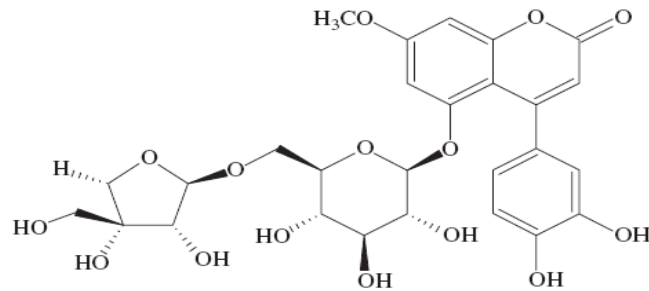
1.1. Antecedentes de la especie *Hintonia standleyana*.

Hintonia standleyana Bullock es conocida como “Copalchi” o “Quina amarilla”, que pertenece a la familia Rubiaceae. Es una planta endémica de México y de la región norte de América Central que se caracteriza por sus cortezas extremadamente amargas, y útiles para el tratamiento de la Diabetes mellitus.



Figura 1. *Hintonia standleyana* (Copalchi)

En un estudio realizado anteriormente por Guerrero Analco y colaboradores, comprobaron que un extracto preparado a partir de la corteza de la planta, ocasiona un decremento significativo en la concentración de la glucosa en sangre de ratas normales y diabéticas. El compuesto aislado y caracterizado encargado de disminuir los niveles de la glucosa en sangre, es una fenilcumarina (5-O-[β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina), la cual fue indicada como el principio activo del extracto de la corteza de *Hintonia standleyana*.





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

1.2. Diabetes mellitus.

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 es una enfermedad que presenta el aumento anormal del índice de glucosa en sangre, detectándose también en orina debido a la secreción anormal o al déficit de insulina por parte del páncreas. 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. Esta enfermedad se clasifica como:

-  Tipo I. Diabetes mellitus dependiente de insulina. Es la menos común y representa el 5% de todos los casos de esta enfermedad.
-  Tipo II. Diabetes mellitus no dependiente de insulina. Representa el 95% de todos los casos, y puede deberse a obesidad, falta de actividad física, etc.

1.3. Preparado farmacéutico de *Hintonia standleyana*.

El polvo del extracto de *Hintonia standleyana* (cuyo activo es AG-4-F), después de un proceso de liofilización fue dosificado en cápsulas de gelatina dura, cuyo contenido tiene un peso promedio de 0.22337 g de polvo del extracto de *Hintonia standleyana*.

1.4. Importancia de los perfiles de disolución.

La absorción de un fármaco después de ser administrado oralmente, depende de la liberación y disolución del producto medicinal; y de su permeabilidad a través del sistema gastrointestinal. Sin embargo, es importante mencionar que la forma farmacéutica seleccionada ejerce cierta influencia en la liberación del fármaco y en los niveles plasmáticos obtenidos. Al realizar un perfil de disolución, se determina experimentalmente la cantidad de fármaco (principio activo) que se disuelve en un intervalo de tiempo, de manera que esta prueba, al ser realizada *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 Biofarmacéutica (BCS), el cual clasifica a 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 rápidamente disuelta y por lo tanto, se absorbe fácilmente 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, entonces la limitación de la velocidad de absorción puede ser la disolución de la forma de dosificación, aunque también puede deberse a que uno o más de los excipientes controlen la liberación y la velocidad de disolución.

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 intestino delgado. La permeabilidad puede valorarse por medio de estudios farmacocinéticas, 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. Los requerimientos de disolución para un producto farmacéutico de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) son:

- 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 de fármacos de liberación inmediata en formas de dosificación sólidas orales, se pueden clasificar a los ingredientes activos farmacéuticos como:

CUADRO 1. Clasificación Biofarmacéutica.

| | | |
|-----------|------------------|--------------------|
| 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.

Así mismo, esta prueba sirve como un aseguramiento en el control de calidad de productos a escala y de lotes de producción. También es importante mencionar que al realizar una comparación de perfiles de disolución entre diversos productos, puede demostrarse si estos son equivalentes o no.






1.5. 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

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.

1.6. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM)

Actualmente, la herbolaria medicinal es considerada un área importante dentro de los sistemas de salud de muchos países del mundo. En México, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Secretaría de Salud publicó en el año 2001 la primera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM). Las plantas medicinales tienen un efecto terapéutico en el ser humano e implican riesgos cuando se emplean de forma inapropiada, por ello en la FHEUM se establecen los lineamientos oficiales para asegurar la idoneidad de las plantas utilizadas en nuestro país, haciendo énfasis en su identidad y pureza. Así mismo, no se incluyen especies de las que no se tiene certeza experimental sobre su eficacia e inocuidad, resultando que la mayoría de las especies utilizadas en la medicina tradicional cuentan con poca información que respalde su uso desde la perspectiva biomédica, careciendo de referentes sobre su control analítico, efectividad, toxicidad e identificación de metabolitos.

II. OBJETIVOS.

- Desarrollar un método analítico por medio de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para la cuantificación de: 5-O-[β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina, también conocida como "AG-4-Fenilcumarina" obtenida a partir de un extracto acuoso de la corteza de *Hintonia standleyana*, y que se encuentra dosificada en cápsulas.
- Validar el método analítico desarrollado, con las cápsulas dosificadas con polvo obtenido a partir del extracto acuoso de la corteza de *Hintonia standleyana* (cuyo activo es AG-4- Fenilcumarina).
- Elaborar el perfil de disolución de las cápsulas dosificadas con polvo obtenido a partir del extracto acuoso de la corteza de *Hintonia standleyana* (cuyo activo es AG-4-Fenilcumarina), en solución amortiguadora de fosfatos 0.05M (pH 6.8) como medio de disolución.

III. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

3.1. Solución amortiguadora de fosfatos 0.05M (pH 6.8). Medio de disolución.

Para preparar 50mL de NaOH 0.5M se hicieron los siguientes cálculos. Hidróxido de sodio (NaOH PM = 40)

$$M = \frac{0.5 \text{ mol}}{\text{L}} (0.05\text{L}) = 0.025\text{mol}$$

$$PM = \frac{\text{g}}{\text{mol}} ; \text{ g} = (40 \text{ g/mol}) (0.025 \text{ mol}) = \mathbf{1.0 \text{ g}} \text{ de NaOH}$$

Se pesó 1.0g de NaOH, se transfirió a un matraz volumétrico de 50mL y se aforo con agua destilada.

NOTA. En base a las ecuaciones anteriores, se pudieron preparar diferentes cantidades (mL) de NaOH 0.5M de acuerdo a como se fue requiriendo.

Para preparar 100mL de la solución amortiguadora de fosfatos 0.05M se efectuaron los siguientes cálculos. Fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄ PM= 136.09).

$$M = \frac{0.05 \text{ mol}}{\text{L}} (0.1\text{L}) = 0.005\text{mol}$$

$$PM = \frac{\text{g}}{\text{mol}} ; \text{ g} = (136.09 \text{ g/mol}) (0.005 \text{ mol}) = \mathbf{0.6804 \text{ g}} \text{ de KH}_2\text{PO}_4$$

Se pesaron 0.6804g de fosfato monobásico de potasio y se transfirieron a un matraz volumétrico de 100mL donde se disolvieron con 30mL de agua destilada, a continuación se adicionaron 5 mL de la solución de NaOH 0.5M que sirvió para ajustar el pH, se mezclaron y finalmente se llevó a volumen con agua destilada. Se verificó su pH.

NOTA. En base a las ecuaciones anteriores, se elaboraron diferentes cantidades (mL) de solución amortiguadora de fosfatos 0.05M, de acuerdo a como se fue requiriendo en cada prueba que se realizó, tomando en cuenta que al modificarse el volumen final de la solución, también se modifico la cantidad adicionada de NaOH 0.5M para el ajuste del pH, de acuerdo a la siguiente relación:

$$\begin{array}{l} \text{Volumen final (100mL)} - \text{Volumen de NaOH 0.5M (5mL)} \\ \text{Volumen final deseado} - \quad \quad \quad X \quad \quad \quad (1) \end{array}$$

3.2. Agua acidificada con TFA al 0.1%, para la preparación de la fase móvil.

Para preparar 250mL de agua acidificada con 0.1% TFA se efectuó el cálculo:

$$\begin{array}{l} \text{Volumen final deseado (250mL)} - 100\% \\ X \quad \quad \quad - \quad 0.1\% \quad \quad \quad x = 0.25\text{mL de TFA} \quad \quad \quad (2) \end{array}$$

3.3. Fase móvil [ACN:H₂O(TFA0.1%)]

La proporción de la fase móvil [ACN:H₂O (TFA 0.1%)] fue de 18:82, la cual se indica posteriormente en el capítulo IV en la parte correspondiente a condiciones cromatográficas. El equipo realizó la mezcla de los componentes de la fase móvil.

3.4. Desgasificación del medio de disolución.

Se prepararon 12L de solución amortiguadora de fosfatos 0.05M, que fueron colocados en un garrafón de vidrio limpio (B) del equipo desgasificador, se colocaron las conexiones como se muestra en la figura (2), se tapó y conectó 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. (Este procedimiento no es farmacopeico).

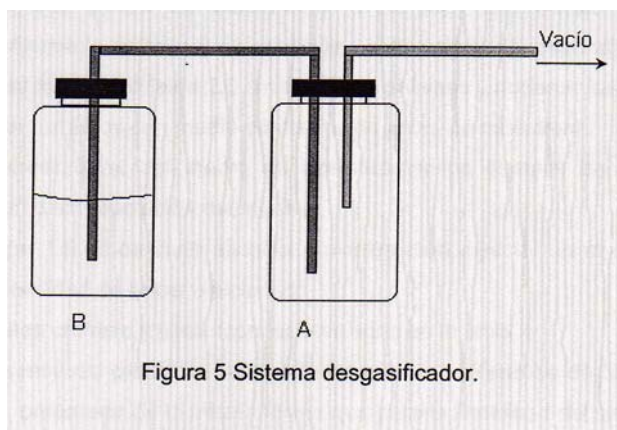


Figura 2. Sistema desgasificador.

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

Se llevó a cabo el siguiente procedimiento, con el medio previamente desgasificado:

- Se registro el peso de un matraz volumétrico de 250mL vacío = 100.8 g
- Se registro el peso del matraz volumétrico de 250mL con el medio de disolución adicionado hasta el aforo = 351.2 g
- El peso del medio de disolución es: $351.2\text{g} - 100.8\text{g} = 250.4\text{ g}$

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

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

Se realizó la siguiente relación para saber exactamente cuanto medio de disolución se debía pesar, sabiendo que dicho peso equivale a un volumen de 900mL.

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mL} - 1.0016 \text{ g} \\ 900 \text{ mL} - x \end{array} \quad x = 901.44\text{g de medio de disolución para cada vaso del disolutor.} \quad \mathbf{(3)}$$

IV. PARTE EXPERIMENTAL

Se preparó una solución a una sola concentración, con la finalidad de observar la respuesta del fitofármaco en estudio con las condiciones cromatográficas propuestas en un estudio anterior (Díaz, 2007) al presente trabajo. Una vez determinada la señal del fitofármaco, se procedió a modificar las condiciones cromatográficas para optimizar la cuantificación del fitofármaco de interés, utilizando como medio de disolución solución amortiguadora de fosfatos 0.05M (pH 6.8).

El procedimiento experimental de esta prueba, fue la siguiente:

Se preparó el medio de disolución como se indicó en la sección 3.1.

4.1. Preparación de la muestra. Se pesaron 0.0050g del estándar de AG-4-Fenilcumarina y se llevó al aforo con medio de disolución en un matraz volumétrico de 5mL. De la solución stock anterior se tomó una alícuota de 500 μ L y se transfirió a un matraz volumétrico de 10mL llevándolo a volumen con el medio de disolución [50 μ g/mL]. A continuación se transfirió una alícuota de 1mL a un vial y se inyectó en el cromatógrafo.







4.2. Desarrollo del método analítico.

Para obtener las condiciones cromatográficas óptimas para la cuantificación del estándar de AG-4-Fenilcumarina y del polvo dosificado en cápsulas obtenido a partir del extracto de *Hintonia standleyana* (cuyo activo es AG-4-Fenilcumarina), se preparó una solución de una sola concentración y se sometió a diferentes condiciones cromatográficas, modificando la proporción de la fase móvil y la velocidad de flujo.

La preparación del medio de disolución se realizó como en la sección 3.1., y la preparación de la muestra como se realizó en la sección 4.1.

Finalmente después de ciertas modificaciones a la proporción de la fase móvil y a la velocidad de flujo, se obtuvieron las condiciones cromatográficas ideales para el método analítico.

4.2.1 Condiciones cromatográficas del método analítico.

-  Volumen de inyección: 20 µL
-  Velocidad de flujo: 1.0 mL / min
-  Temperatura: 25°C
-  Longitud de onda (λ): 327nm
-  Proporción fase móvil [ACN – H₂O (TFA 0.1%)]: 18:82
-  Columna Phenomenex Synergi 4uMAX-RP80A
N° de serie: 341799-22




4.3. Prueba de estabilidad (A).

Se procedió a evaluar la estabilidad de la muestra, de acuerdo al siguiente procedimiento:

Medio de disolución (Ver sección 3.1.).

Muestra (Ver sección 4.1.). En este caso, la muestra se preparó por triplicado a partir de la misma solución stock. Finalmente de cada muestra se tomó una alícuota de 1mL y se colocaron en viales. Estas se consideraron como el tiempo cero.

Condiciones de estabilidad:

-  Temperatura ambiente.
-  Ausencia de luz.
-  Tiempos de muestreo: 0, 1, 2, 3, 5, 8, 12 y 24horas

4.4. Prueba de estabilidad (B).

Se procedió a evaluar nuevamente la estabilidad de la muestra con algunas modificaciones a la preparación de soluciones y a las condiciones de la prueba.

La preparación del medio de disolución y de la muestras se realizó como ya se mencionó anteriormente en la prueba de estabilidad (A), a excepción que en este caso, solo se prepararon por duplicado. A continuación las muestras se sometieron en presencia de luz a una temperatura de $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, y únicamente, a cada tiempo de muestreo se tomó 1mL de cada muestra y se colocaron en viales para ser inyectados en el cromatógrafo. Los tiempos de muestreo para esta prueba fueron: 0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, y 300minutos.

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

Se evaluaron para esta prueba los siguientes filtros: Filtro de teflón y de membrana.

El medio de disolución se preparó como ya se indicó en la sección 3.1.

Preparación de la muestra: De acuerdo a la siguiente relación:

1g de polvo de extracto de *Hintonia standleyana*
contiene 143.4 mg del activo AG-4-Fenilcumarina. (4)

Se calculó la cantidad de polvo de extracto de *H.standleyana*, necesaria para que la concentración de su activo AG-4-Fenilcumarina, fuera de 25µg/mL.

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

Se pesaron 0.0087g de polvo de extracto de *H.standleyana*, contenido en las cápsulas y se llevó al aforo con medio de disolución en un matraz volumétrico de 50mL [25µg/mL], de esta solución stock se tomaron 6 alícuotas de 2mL y se transfirieron a 6 tubos de ensaye respectivamente, utilizando el filtro de teflón para evaluar el %de retención del mismo. En el caso del filtro de membrana se realizó el mismo procedimiento que ya se indicó.

Finalmente de los 12 tubos y de la solución stock, se tomó 1mL y colocó en viales para su posterior cuantificación.

4.6. Prueba preeliminar de disolución.

Medio de disolución (Ver sección 3.1.).

Preparación de la curva patrón con estándar de AG-4-Fenilcumarina. Se pesaron 0.0050g del estándar de AG-4-Fenilcumarina, se transfirieron a un matraz volumétrico de 5mL y se llevó a volumen con medio de disolución. De la solución stock anterior se preparó una curva patrón de acuerdo al siguiente cuadro.








CUADRO 2. Preparación de 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 |

Finalmente de cada uno de los puntos de la curva patrón, se tomó 1mL y se colocó en viales para su posterior cuantificación en el equipo.

Preliminar de disolución. Se realizó a una cápsula vacía y a 2 cápsulas dosificadas con polvo obtenido a partir del extracto de *Hintonia standleyana* (cuyo activo es AG-4-Fenilcumarina).

Las condiciones experimentales controladas se mencionan a continuación:

-  Volumen del medio de disolución: 900 mL
-  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)

Una vez listo el equipo con las condiciones ya mencionadas, se procedió a realizar la prueba, donde a cada tiempo de muestreo se tomaron 2mL que directamente fueron colocados en viales para llevar a cabo su cuantificación.

Para poder calcular el porcentaje disuelto:

- Se registró el peso promedio del contenido de 20 cápsulas = **0.22337g**.
- En base a: 1g de polvo de extracto de *Hintonia standleyana* contiene 143.4 mg del activo AG-4-Fenilcumarina, se calculó la cantidad de activo (AG-4-Fenilcumarina), que hay en una cápsula dosificada con polvo de extracto de *Hintonia standleyana*.

| | | |
|--|---|-----------------------------|
| 1g de polvo de extracto de <i>H.standleyana</i> | - | 143.4 mg AG-4-Fenilcumarina |
| 0.2233g de polvo de extracto de <i>H.standleyana</i> | - | x |

$$x = 32.03\text{mg de AG-4-Fenilcumarina en el polvo de extracto de } \mathbf{Hintonia\ standleyana, contenido en cada cápsula.} \quad (5)$$

4.7. Prueba de validación.

Se realizó la validación del método analítico de la siguiente manera:

El medio de disolución se preparó como ya se indicó anteriormente.

Preparación de tres curvas realizadas con polvo de extracto de *Hintonia standleyana* (cuyo activo es AG-4-Fenilcumarina). Del polvo obtenido de las 20 cápsulas pesadas en la prueba anterior, se pesó el equivalente a 10mg del activo AG-4-Fenilcumarina, de acuerdo a la relación (4), que se indicó en la sección 4.5.

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

Se pesaron 0.0697g de polvo de extracto de *H. standleyana*, se transfirieron a un matraz volumétrico de 10mL y se llevaron a volumen con medio de disolución. A partir de ésta solución stock se prepararon 3 curvas patrón de acuerdo al **CUADRO 2**. Finalmente de cada uno de los puntos de las 3 curvas patrón se tomaron alícuotas de 1mL y colocaron en viales para su posterior cuantificación.

Los parámetros de calidad del método analítico que se evaluaron son los siguientes.

4.7.1. Linealidad del método.

Se determinó la linealidad para las cápsulas dosificadas con extracto de *H. standleyana*, en el medio de disolución SA de fosfatos pH 6.8, a partir de las 3 curvas patrón ya mencionadas anteriormente para esta prueba.

Criterio de aceptación de linealidad: Debe ser demostrada con al menos 5 puntos, por triplicado, con un coeficiente de regresión mayor o igual que 0.999 y un error relativo debido a la regresión no mayor al 3%.

4.7.2. Exactitud del método.

Se determinó a partir de los resultados de linealidad, donde de cada una de las 3 curvas patrón se obtuvo la ecuación y se calculó la concentración en cada punto. Con los resultados obtenidos se calculó la desviación estándar relativa (DEA).

$$\% \text{ DEA} = \{([Teórica]-[Experimental]) / [Teórica]\} \times 100 \quad (6)$$

Criterio de aceptación de la exactitud. El valor de la desviación estándar relativa (DEA) debe ser menor o igual del 3%.

4.7.3. Precisión del método.

Se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.

- Repetibilidad. De las 3 curvas patrón de linealidad, se calculó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (%CV).

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

- Reproducibilidad. Se determinó preparando, un mismo analista en dos días diferentes, las curvas patrón empleando el mismo procedimiento que para linealidad.

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

4.7.4. Selectividad del método.

Se preparó una muestra con estándar de AG-4-Fenilcumarina a una concentración de 50µg/mL, como se realizó en la sección 4.1. El espectro obtenido se comparó con el espectro de una cápsula vacía sometida a las condiciones de disolución.

Criterio de aceptación de selectividad. Se debe demostrar la selectividad ante otros componentes de la muestra, cualquier interferencia no debe producir un error mayor al aceptado en precisión y exactitud.







4.8. Estudio del perfil de disolución.

Medio de disolución (Ver sección 3.1.).

Preparación de la curva patrón con estándar de AG-4-Fenilcumarina: Se realizó como en la sección 4.6.

Perfil de disolución. Se realizó a 12 cápsulas dosificadas con polvo de extracto de *Hintonia standleyana* (cuyo activo es AG-4-Fenilcumarina).

4.8.1 Condiciones experimentales para el perfil de disolución.

-  Volumen del medio de disolución: 900 mL
-  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)

Con las condiciones del equipo controladas, se procedió a realizar la prueba. A cada tiempo de muestreo y de cada vaso, se tomaron 2mL (utilizando jeringas y filtros de teflón) y se transfirieron a tubos de ensaye. Finalmente de estos se tomaron alícuotas de 1mL y se colocaron en viales para su posterior cuantificación.

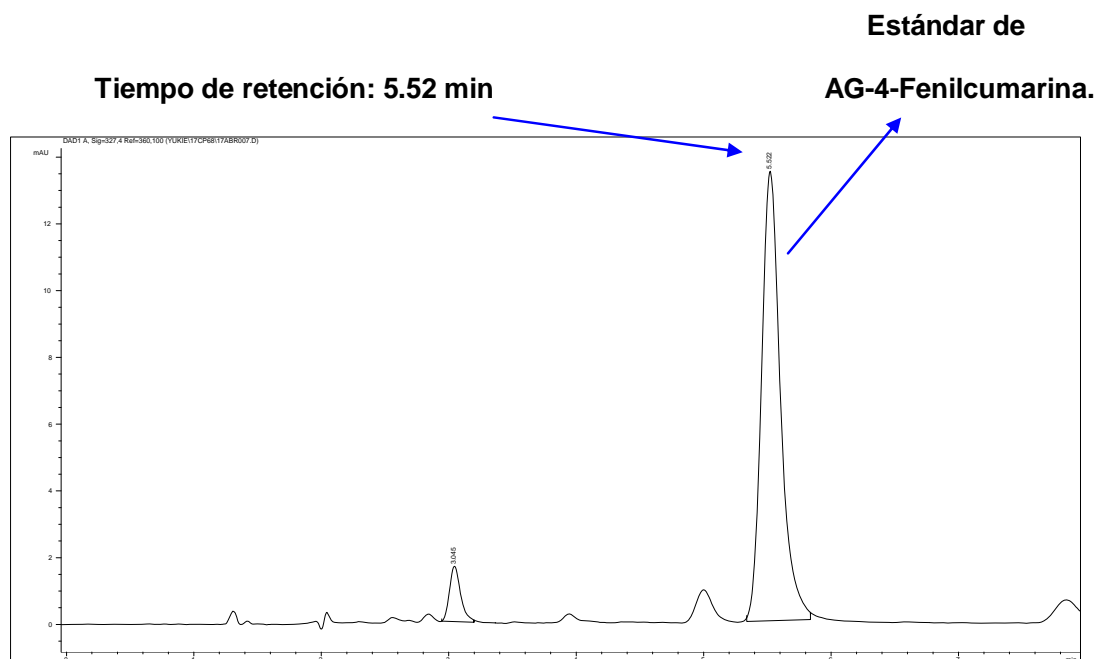
Para el cálculo del porcentaje disuelto, se consideró que el **polvo de extracto de *Hintonia standleyana* contenido en cada cápsula, tiene 32.03mg del activo AG-4-Fenilcumarina.**

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Desarrollo del método analítico.

En la figura (3) se muestra un cromatograma, en el que se observa que la señal del compuesto en estudio, presenta un pico bien definido y separado de los otros pequeños picos, haciéndolo adecuado para su aplicación en disolución. Esto quiere decir, que las condiciones cromatográficas (Sección 4.2.1) fueron óptimas para la cuantificación del estándar de AG-4-Fenilcumarina y del polvo dosificado en cápsulas, obtenido a partir del extracto de *Hintonia standleyana*.

Figura 3. Cromatograma del Estándar de AG-4-Fenilcumarina.



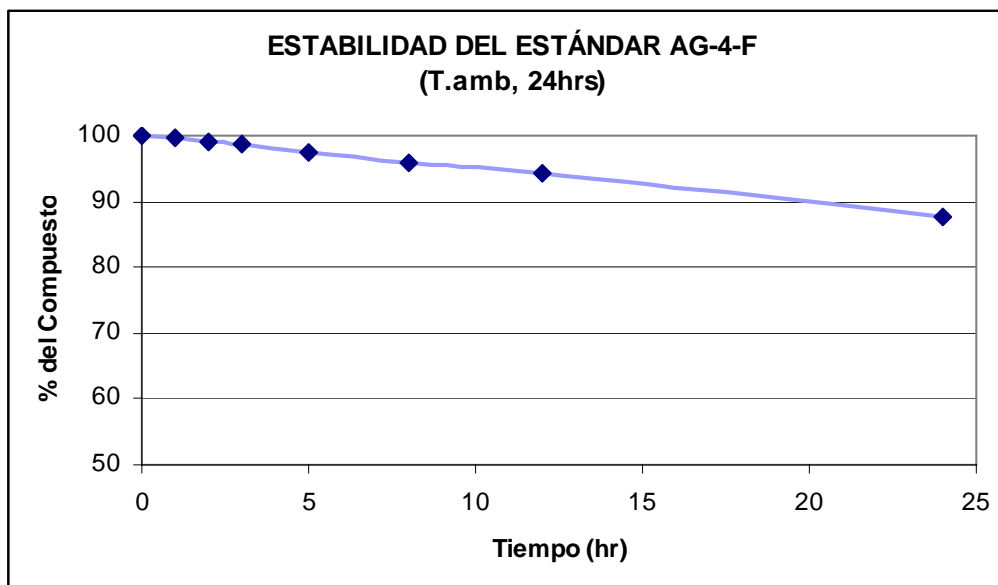
5.2 Prueba de Estabilidad (A).

En la tabla (1) se presentan los resultados de la estabilidad del estándar de AG-4-Fenilcumarina a temperatura ambiente y en solución amortiguadora de fosfatos (pH 6.8). En la figura (4) se presenta la cinética correspondiente. Los datos obtenidos muestran una disminución de las áreas con el transcurso del 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. Debido a esto, se procedió a realizar otra prueba de estabilidad, donde las muestras se sometieron a una temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, y con tiempos de muestreo no mayores a un máximo de cinco horas.

Tabla 1. Estabilidad del estándar de AG-4-Fenilcumarina, a temperatura ambiente y durante 24 horas, en solución amortiguadora de fosfatos (pH 6.8).

| TIEMPO (hr) | Area AG-4-F Determinación (1) | Area AG-4-F Determinación (2) | Area AG-4-F Determinación (3) | D.E. | PROMEDIO DE LAS ÁREAS | CV % | % DEL Compuesto |
|------------------------|--|--|--|-------------|--------------------------------------|-------------|--------------------------------|
| 0 | 316.4050 | 317.2164 | 314.3308 | 1.49 | 315.99 | 0.5 | 100.0 |
| 1 | 316.1058 | 316.9878 | 312.6472 | 2.29 | 315.25 | 0.7 | 99.8 |
| 2 | 313.0916 | 313.2992 | 310.9415 | 1.31 | 312.44 | 0.4 | 98.9 |
| 3 | 311.6747 | 312.2305 | 310.4397 | 0.92 | 311.45 | 0.3 | 98.6 |
| 5 | 308.2407 | 309.1022 | 306.8756 | 1.12 | 308.07 | 0.4 | 97.5 |
| 8 | 303.2521 | 304.5487 | 301.5320 | 1.51 | 303.11 | 0.5 | 95.9 |
| 12 | 297.6648 | 301.2089 | 294.9339 | 3.15 | 297.94 | 1.1 | 94.3 |
| 24 | 278.3468 | 281.8637 | 271.2233 | 5.42 | 277.14 | 1.9 | 87.7 |

Figura 4. Estabilidad del estándar de AG-4-Fenilcumarina, a temperatura ambiente y durante 24 horas, en solución amortiguadora de fosfatos (pH 6.8).



5.3 Prueba de Estabilidad (B).

Como puede observarse en la tabla (2), la disminución de las áreas de la AG-4-Fenilcumarina es mínima, indicando que el compuesto en estudio es estable a la temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, durante cinco horas.

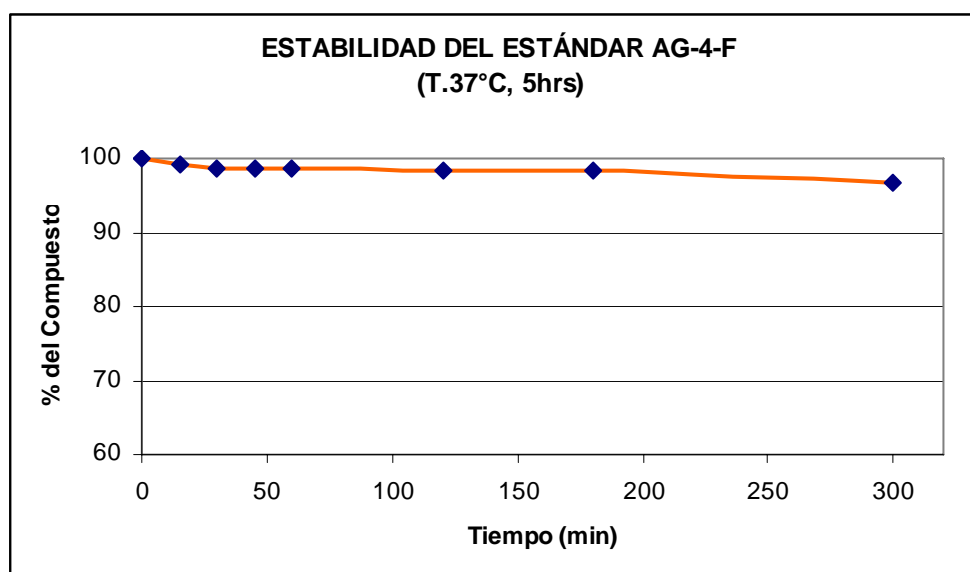
Como en este caso no se observó una drástica degradación del compuesto, es válido llevar a cabo la prueba de disolución de las cápsulas dosificadas con polvo de extracto de *H. standleyana*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 2. Estabilidad del estándar AG-4-Fenilcumarina, a temperatura de 37°C ± 0.5°C y durante 5 horas, en solución amortiguadora de fosfatos (pH 6.8).

| TIEMPO (min) | Area AG-4-F Determinación (1) | Area AG-4-F Determinación (2) | DE | PROMEDIO DE LAS ÁREAS | C.V.% | % DEL Compuesto |
|--------------|-------------------------------|-------------------------------|------|-----------------------|-------|-----------------|
| 0 | 370.25159 | 370.13461 | 0.08 | 370.19 | 0.02 | 100 |
| 15 | 365.45734 | 368.21628 | 1.95 | 366.84 | 0.5 | 99.1 |
| 30 | 364.44830 | 365.22266 | 0.55 | 364.84 | 0.2 | 98.6 |
| 45 | 364.51620 | 364.77313 | 0.18 | 364.64 | 0.05 | 98.5 |
| 60 | 364.17294 | 365.40375 | 0.87 | 364.79 | 0.2 | 98.5 |
| 120 | 362.75580 | 365.90366 | 2.23 | 364.33 | 0.6 | 98.4 |
| 180 | 363.13223 | 364.77252 | 1.16 | 363.95 | 0.3 | 98.3 |
| 300 | 357.69046 | 358.35013 | 0.47 | 358.02 | 0.1 | 96.7 |

Figura 5. Estabilidad del estándar AG-4-Fenilcumarina, a temperatura de 37°C ± 0.5°C y durante 5 horas, en solución amortiguadora de fosfatos (pH 6.8).



5.4. Prueba de influencia del filtro.

Los resultados que se presentan en la tabla (3), muestran 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. Por lo que el filtro de teflón fue el que se utilizó para realizar el perfil de disolución.

Tabla 3. Influencia del filtro de teflón y del filtro de membrana.

| | PROMEDIO DE ÁREAS (n = 6) | D.E. (n = 6) | % RETENIDO |
|-------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|-------------------|
| FILTRO DE TEFLÓN | 202.1858 | 1.05 | 0.1% |
| FILTRO DE MEMBRANA | 202.0148 | 1.31 | 0.2% |
| ÁREA SIN FILTRAR | 202.2334 | | |

Los cálculos se realizaron en base a:

Área sin filtrar - 100 %

Promedio de áreas del filtrado - X **100% - X= % Retenido.**

5.5. Prueba preliminar de disolución.

A pesar de que el primer tiempo de muestreo presenta un coeficiente de variación alto (Tabla 4), en la figura (6) se observa una curva con tres puntos distribuidos en la fase ascendente y de inflexión.

Como a los 30 minutos se alcanzó el 100% disuelto, se eliminaron los últimos dos tiempos de muestreo.

Tabla 4. Porcentaje de Fitofármaco (extracto de *H. standleyana* dosificado en cápsulas) disuelto en cada tiempo.

Medio de disolución: Solución amortiguadora de Fosfatos (pH 6.8)

| Tiempo (min) | Vaso1 | Vaso2 | MEDIA (n=2) % Disuelto | D.E (n=2) | CV% (n=2) |
|--------------|--------|--------|---------------------------|-----------|-----------|
| 10 | 14.37 | 23.02 | 18.70 | 6.12 | 32.7 |
| 15 | 58.58 | 67.29 | 62.93 | 6.16 | 9.8 |
| 30 | 101.90 | 103.02 | 102.46 | 0.80 | 0.8 |
| 45 | 105.42 | 104.50 | 104.96 | 0.65 | 0.6 |
| 60 | 105.38 | 104.45 | 104.92 | 0.66 | 0.6 |
| 75 | 105.51 | 104.85 | 105.18 | 0.47 | 0.4 |
| 90 | 105.67 | 104.94 | 105.31 | 0.52 | 0.5 |

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

Figura 6. Cromatograma de la cápsula vacía.

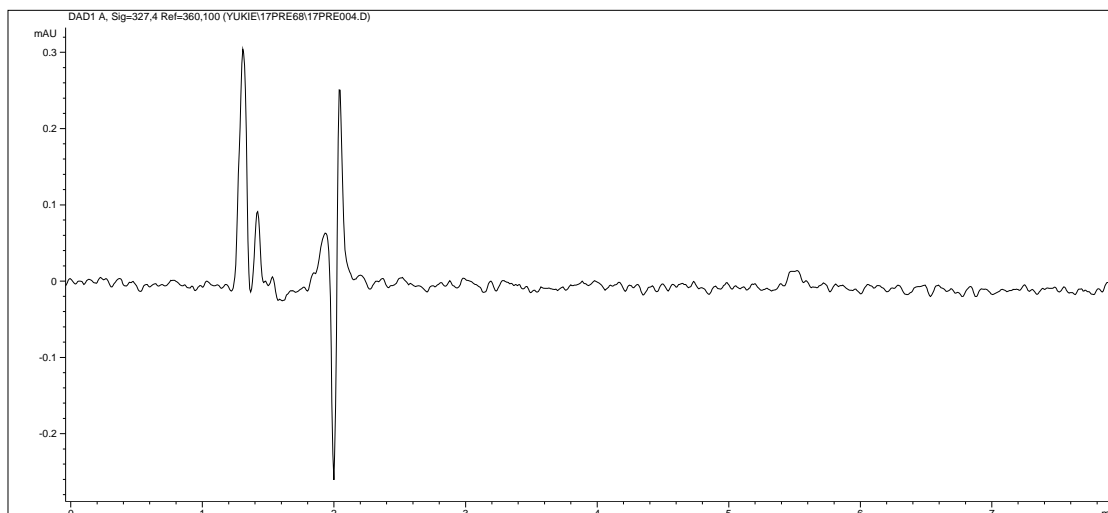
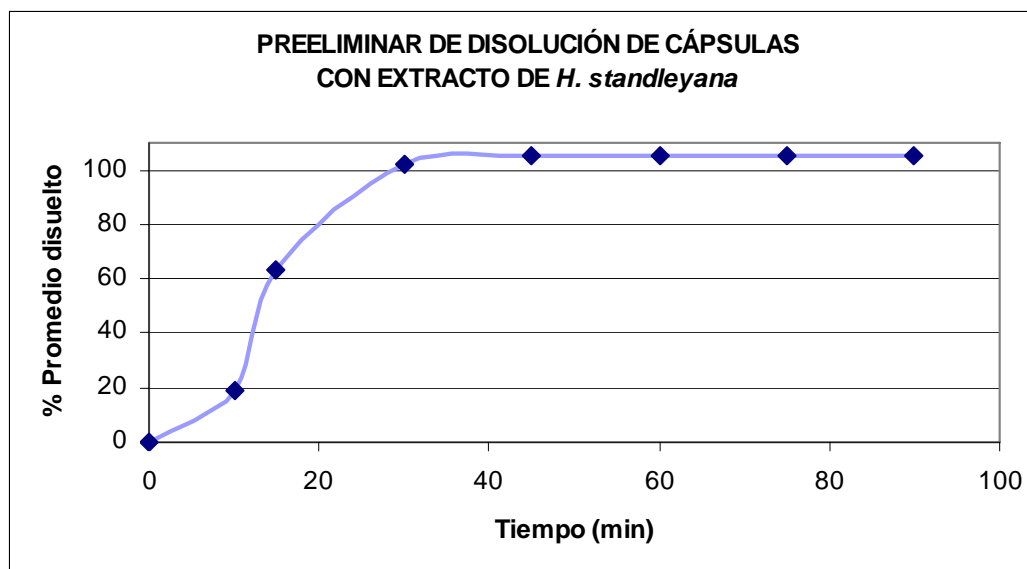


Figura 7. Porcentaje de Fitofármaco (extracto de *H. standleyana* dosificado en cápsulas), disuelto en cada tiempo.

Medio de disolución: Solución amortiguadora de Fosfatos (pH 6.8)



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

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% | |
| 32.81 mg de AG-4-Fenilcumarina | - | x | x = 102.46 % |

5.6. Prueba de validación.

Se evaluaron cada uno de los siguientes parámetros:

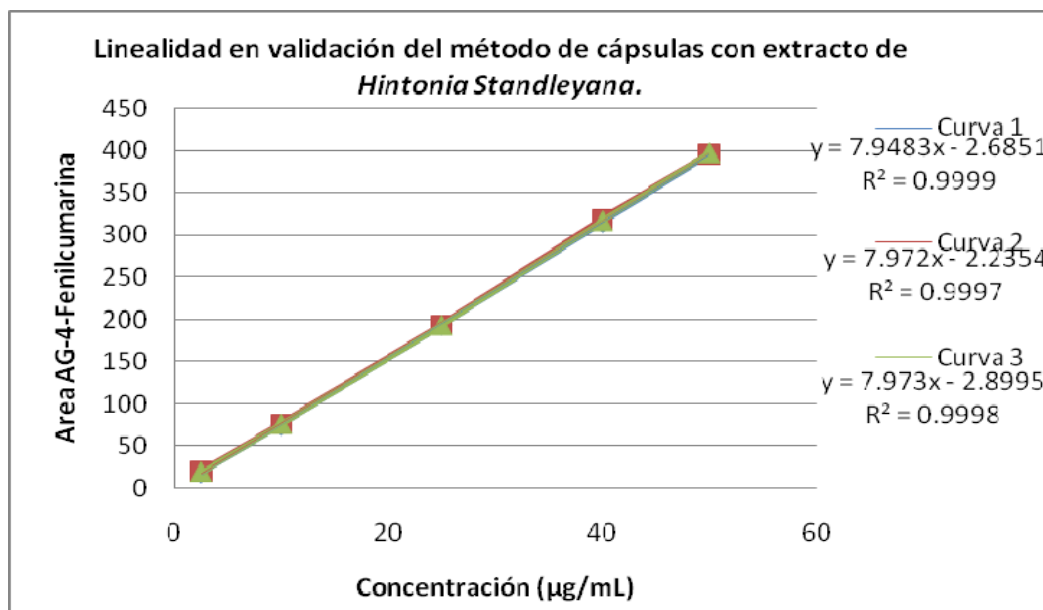
5.6.1. Linealidad del método.

En la tabla (5) se muestran los resultados de linealidad obtenidos de las cápsulas que contienen el extracto de *Hintonia standleyana*, y se observa que se encuentran dentro de las especificaciones ya que el coeficiente de correlación es mayor a 0.99, y el Error Relativo debido a la Regresión es menor al 3%. Por lo tanto, se considera que el método analítico en el intervalo de concentraciones de 2.5 a 50 µg/mL es lineal.

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

| Co [µg/mL] | Area AG-4-F Determinación (1) | Area AG-4-F Determinación (2) | Area AG-4-F Determinación (3) |
|------------------------|--|--|--|
| 2.5 | 19.2367 | 19.9785 | 19.4242 |
| 10 | 75.6085 | 76.2323 | 76.0624 |
| 25 | 194.0113 | 193.6789 | 192.8933 |
| 40 | 315.2822 | 319.2627 | 316.5681 |
| 50 | 395.8382 | 396.0951 | 397.1144 |
| Intercepto (b) | -2.6851 | -2.2353 | -2.8994 |
| Pendiente (m). | 7.9482 | 7.9719 | 7.9730 |
| Correlación (r) | 0.9999 | 0.9999 | 0.9999 |
| ERR (%) | 1.16 | | |

Figura 8. Linealidad del método de cápsulas dosificadas con polvo de extracto de *H. standleyana*.



5.6.2. Exactitud del método.

El cálculo de la concentración, se realizó a partir de los datos obtenidos en la linealidad, que se encuentran en la sección 5.6.1.

En los resultados que se presentan en la tabla (6) se observa que a partir de la $Co=10\mu\text{g/mL}$, se cumple con el criterio de aceptación, que especifica que el valor de la Desviación Estándar Relativa (DEA) no debe ser mayor al 3%. Por otro lado, la menor concentración no cumple con la especificación, lo cual puede deberse a poca sensibilidad en el método. Es importante mencionar, que a pesar de que el método no es exacto en la concentración más baja, se considera como un método confiable, ya que se trata de un producto natural.

Tabla 6. Exactitud del método de cápsulas dosificadas con polvo de extracto de *H. standleyana*.

| Co Nominal [µg/mL] | Concentración experimental (µg/mL) | | | Promedio | % DEA |
|-----------------------|------------------------------------|---------|---------|----------|-------|
| | Curva 1 | Curva 2 | Curva 3 | | |
| 2.5 | 2.7580 | 2.7865 | 2.7999 | 2.78 | 11.3 |
| 10 | 9.8504 | 9.8429 | 9.9036 | 9.87 | 1.3 |
| 25 | 24.7471 | 24.5754 | 24.5569 | 24.63 | 1.5 |
| 40 | 40.0046 | 40.3286 | 40.0685 | 40.13 | 0.3 |
| 50 | 50.1397 | 49.9664 | 50.1709 | 50.09 | 0.2 |

Para calcular el %DEA, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ DEA} = \{([Teórica]-[Experimental]) / [Teórica]\} \times 100$$

5.6.3. Precisión del método.

5.6.3.1. Repetibilidad.

A partir de los datos obtenidos en la linealidad que se encuentran en la sección 5.6.1, se calculó el coeficiente de variación (%CV).

En la tabla (7) se puede observar que los resultados cumplen con el criterio de aceptación, pues los coeficientes de variación se encuentran dentro del valor de especificación.

Tabla 7. Precisión del método (Repetibilidad) de cápsulas dosificadas con polvo de extracto de *H. standleyana*.

| Co [µg/mL] | Area AG-4-F Determinación (1) | Area AG-4-F Determinación (2) | Area AG-4-F Determinación (3) | Media (n= 3) | D.E. (n= 3) | CV % (n= 3) |
|-----------------------------|--|--|--|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 2.5 | 19.2367 | 19.97853 | 19.42421 | 19.55 | 0.39 | 1.9 |
| 10 | 75.60857 | 76.23239 | 76.06242 | 75.97 | 0.32 | 0.4 |
| 25 | 194.01135 | 193.67891 | 192.89334 | 193.53 | 0.57 | 0.3 |
| 40 | 315.28226 | 319.2627 | 316.56818 | 317.04 | 2.03 | 0.6 |
| 50 | 395.8382 | 396.09515 | 397.11441 | 396.35 | 0.67 | 0.2 |

5.6.3.2. Reproducibilidad.

Los cálculos de la concentración del DÍA 1 se realizaron a partir de los datos de linealidad que se encuentran en la sección 5.6.1.

Los cálculos para obtener la concentración del DÍA 2 se realizaron a partir de los datos que se presentan en la tabla (8).

Los resultados de la reproducibilidad se muestran en la tabla (9), 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 lo contrario, la concentración más baja se encuentra fuera de especificación, lo cual quiere decir que el método no es preciso a esa concentración.

Tabla 8. Áreas de las cápsulas dosificadas con polvo de extracto de *H. standleyana* (DÍA 2).

| Co [µg/mL] | Area AG-4-F Determinación (1) | Area AG-4-F Determinación (2) | Area AG-4-F Determinación (3) |
|---------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 2.5 | 20.42957 | 20.20404 | 20.13208 |
| 10 | 77.52006 | 78.69545 | 77.15589 |
| 25 | 198.31145 | 194.04488 | 197.51305 |
| 40 | 315.42548 | 315.24423 | 313.47833 |
| 50 | 395.45657 | 393.89761 | 395.16287 |

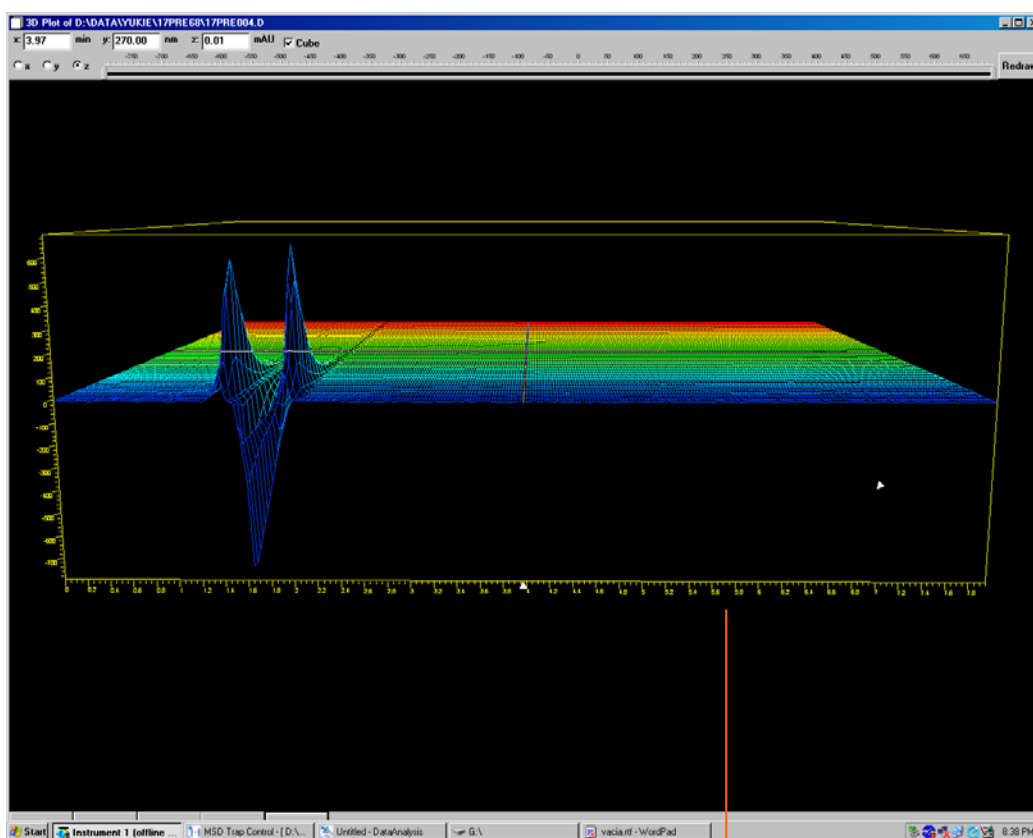
Tabla 9. Precisión del método (Reproducibilidad) de cápsulas dosificadas con polvo de extracto de *H. standleyana*.

| Co Nominal [µg/mL] | Co experimental [µg/mL] Día 1 | | | Co experimental [µg/mL]Día 2 | | | Media (x= 6) | D.E. (x= 6) | CV % (x= 6) |
|--------------------------|----------------------------------|---------|---------|---------------------------------|---------|---------|------------------|-----------------|-----------------|
| | C 1 | C 2 | C 3 | C 1 | C 2 | C 3 | | | |
| 2.5 | 2.7581 | 2.7865 | 2.7999 | 2.6066 | 2.6113 | 2.6213 | 2.70 | 0.09 | 3.5 |
| 10 | 9.8504 | 9.8430 | 9.9036 | 9.8276 | 10.0402 | 9.8469 | 9.89 | 0.08 | 0.8 |
| 25 | 24.7471 | 24.5754 | 24.5569 | 25.1057 | 24.6907 | 25.0976 | 24.80 | 0.25 | 0.9 |
| 40 | 40.0047 | 40.3286 | 40.0686 | 39.9187 | 40.0841 | 39.7918 | 40.03 | 0.18 | 0.5 |
| 50 | 50.1397 | 49.9665 | 50.1709 | 50.0413 | 50.0738 | 50.1423 | 50.09 | 0.08 | 0.2 |

5.6.4. Selectividad del método.

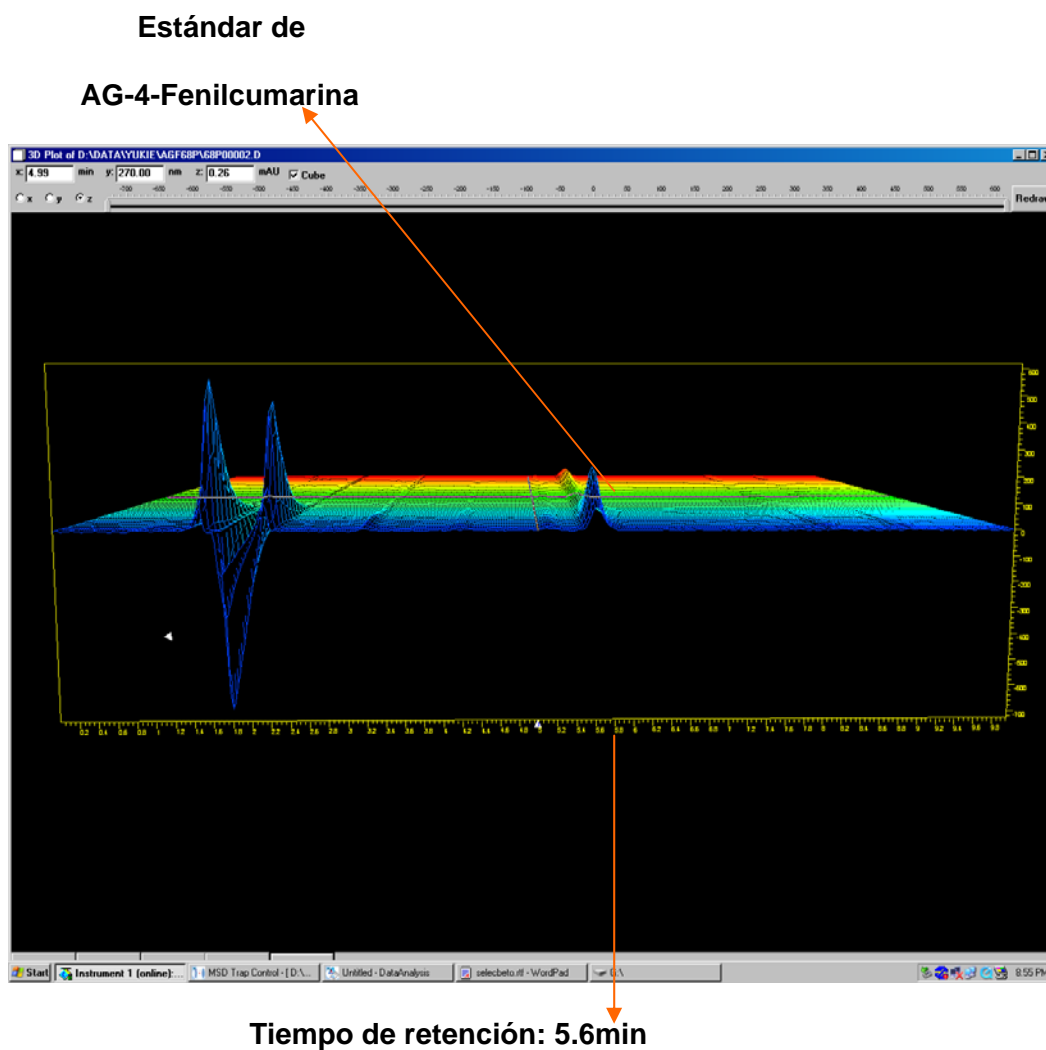
En la figura (9) se presenta el espectro en tercera dimensión de la cápsula vacía, el cual muestra que no hay ninguna señal en el mismo tiempo que se observa la respuesta del estándar de AG-4-Fenilcumarina, que se presenta en la figura (10). De acuerdo a estos resultados, es evidente que no existe interferencia causada por algún componente de la cápsula que produzca errores en la cuantificación; por lo tanto, el método se considera selectivo para la AG-4-Fenilcumarina.

Figura 9. Espectro en tercera dimensión de una cápsula vacía.



Al tiempo de 5.6 minutos no se observó ninguna señal.

Figura 10. Espectro en tercera dimensión del Estándar de AG-4-Fenilcumarina.



5.7. Estudio del perfil de disolución.

En los resultados obtenidos en la tabla (10) se observa una liberación del fitofármaco mayor al 85% antes de 30 minutos, por lo que las cápsulas que contienen el extracto de *Hintonia standleyana* (cuyo activo es AG-4-Fenilcumarina), presentan una rápida disolución a pH 6.8.

Y se observa que al tiempo de 15 minutos el coeficiente de variación se encuentra fuera de la especificación.

La figura (11) muestra la cinética correspondiente al perfil de disolución de las 12 cápsulas dosificadas con polvo de extracto de *H. standleyana*.

La figura (12) muestra el cromatograma de esta prueba, en el cual se observa un pico definido del contenido de la cápsula y sin ninguna interferencia.

Tabla 10. Porcentaje promedio de 12 cápsulas con polvo de extracto de *Hintonia standleyana* disuelto a diferentes tiempos.

Medio de disolución: Solución amortiguadora de Fosfatos (pH 6.8)

| Tiempo (min) | MEDIA (n=12) % Disuelto | D.E. (n=12) | CV% (n=12) |
|-------------------------|--|------------------------|-----------------------|
| 10 | 30.5 | 6.0 | 19.7 |
| 15 | 68.6 | 7.9 | 11.5 |
| 20 | 99.7 | 3.2 | 3.3 |
| 30 | 105.5 | 0.5 | 0.5 |
| 45 | 107.0 | 0.01 | 0.02 |
| 60 | 106.6 | 0.8 | 0.8 |

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

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

Figura 11. Perfil de disolución de 12 cápsulas
con polvo de extracto de *H. standleyana*.

Medio de disolución: Solución amortiguadora de Fosfatos (pH 6.8)

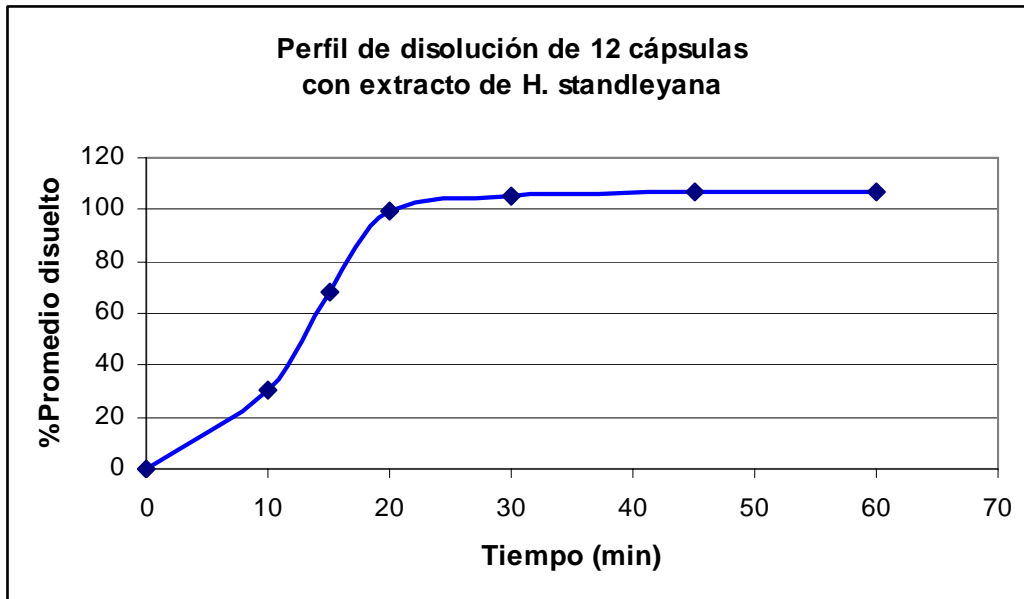
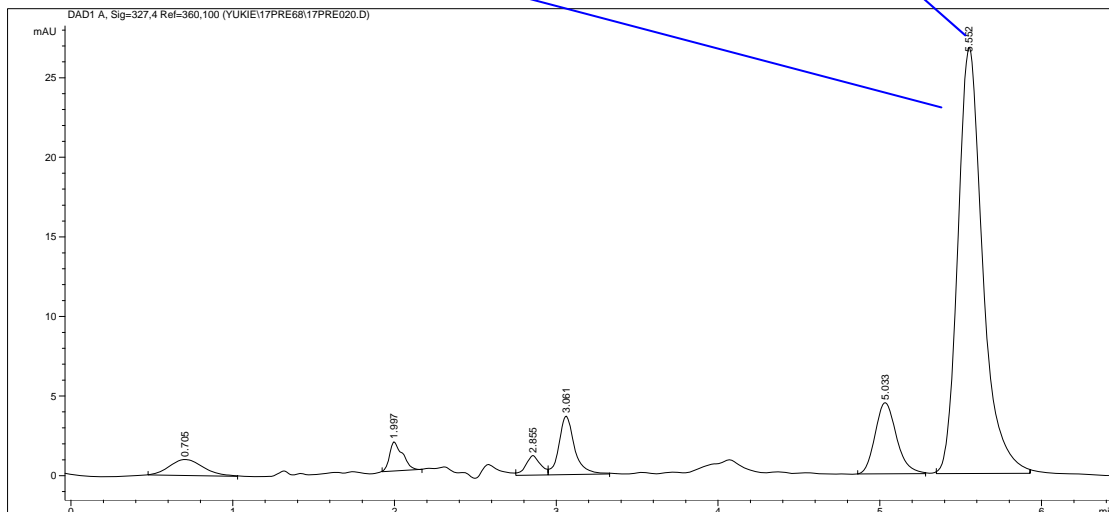





Figura 12. Cromatograma de cápsulas dosificadas con
polvo de extracto de *Hintonia standleyana*.

Contenido de cápsulas.

Tiempo de retención: 5.56 min



VI. CONCLUSIONES

-  Se desarrollo un método de cuantificación para la AG-4-Fenilcumarina, que esta presente en el polvo obtenido a partir de un extracto acuoso de la corteza de *Hintonia standleyana*, dosificado en cápsulas.
-  Se realizó la validación del método analítico de las cápsulas dosificadas con el polvo de extracto de *Hintonia standleyana*, evaluando su linealidad, precisión, exactitud y selectividad.
-  Se realizó el perfil de disolución de las cápsulas dosificadas con el polvo de extracto de *Hintonia standleyana* (cuyo activo es AG-4-Fenilcumarina), en solución amortiguadora de fosfatos 0.05M (pH 6.8) como medio de disolución, utilizando Aparato #1 (Canastillas) a 100rpm en el cual se logró un porcentaje mayor al 85% en menos de 30 minutos, por lo que puede considerarse como “Disolución rápida” en pH 6.8.

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 Sannders, 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. Duarte J. Vest D. Validating alternate laboratory assay methods. Pharmaceutical technology. may: 60-66
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. Guerrero A; Antihyperglycemic Effect of Constituents from *Hintonia Standleyana* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats; Planta Med 2005; 71: 1099-1105.
7. 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.
8. 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.
 9. HHS/FDA Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products - General Considerations, March 2003.
 10. 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.
 11. Hortwitz W. "Evaluation of Analytical Methods used for Regulation of Food and Drugs" *Anal. Chem.* 54(1):67A. 1982.
 12. ICH- Technical Coordination- R. Bass, (1998); ICH Topic Q1A Stability testing Guidelines: Stability testing of new drug substances and product.
 13. ICH-FDA Guidelines For the photostability testing of new drug substances and products; availability; notice Federal Register vol. 62 N°95 (05,1997).
 14. ICH-FDA Guidelines availability: Impurities in new drug substances; notice. Federal Register Vol. 61. N° 3 (01,1996).

15. 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.
16. ISO, International Organization for Standardization (1993) 3534-1, Statistics, Vocabulary and symbols, ISO, Geneva.
17. ISO, International Organization for Standardization (1994a) ISO Guide 5725, Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results.
18. 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.
19. 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.
20. IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry (2001) Selectivity in Analytical Chemistry Technical Draft. <http://www.iupac.org/publications/pac/2001/>
21. 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.

22. Multisource (Generic) pharmaceutical products: Guidelines on registration requirements to establish interchangeability (OMS).
23. Norma oficial mexicana, NOM-015-SSA2-1994, "Para la prevención, tratamiento y control de la Diabetes Mellitus en la atención primaria".
24. 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.
25. USP 24 The United States Pharmacopeia -NF19 The National Formulary, Chapter<1225> Validation of Compendial Methods, Enero 2000. ISBN 1-889788-03-1.
26. 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.
27. Westlake WJ. Bioavailability and Bioequivalence of Pharmaceutical Formulations, in Biopharmaceutical Statistics for Drug Development (Peace KE, ed.), Marcel Dekker, Inc., 1988, 329-352.
28. Youden, W.J. (1947) Technique for testing the accuracy of analytical data. Anal. Chem. 19, 946-950.

29. Youden, W.J., Steiner, E.H. (1975) Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists. AOAC, Arlington, VA.
30. www.emea.europa.eu
31. www.fda.gov/cder/guidance/cmc5.pdf
32. www.fda.gov/cder/guidance/3618fnl.htm
33. www.fda.gov/cder/guidance/index.htm



VIII. ANEXOS

ANEXO A.













REACTIVOS.

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. Hidróxido de Sodio (NaOH) Perlas
JT Baker
Lote:A18C66
4. Acetonitrilo HPLC (CH_3CN)
J.T. Baker
Lote: AC18903
5. Fosfato monobásico de Potasio (KH_2PO_4)
J.T. Baker
Lote: 3246-01
6. Estándar AG-4-Fenilcumarina.
RM-89

TIPOS DE FILTRO.

-  Full flow TM Filtres 35µm VARIAN
PROD LOT. 21024 A. MAT LOT. 331365
-  Swinex Millipore Durapore ^R
G0.45 µm H.A.

MATERIAL

-  Matraces volumétricos de 5mL.
-  Matraces volumétricos de 10mL.
-  Matraces volumétricos de 100mL.
-  Matraces volumétricos de 250mL.
-  Vasos de precipitado de 50mL y 100ml.
-  Tubos de ensaye.
-  Naves de pesado.
-  Termómetro.
-  Cronómetro.
-  Jeringas de 5mL.
-  Espátula.
-  Piseta.

ANEXO B.

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



Cromatografo (HPLC) Agilent 1100 Series

No. G1329-90010

DETECTOR. G1316A. No de serie. DE43650359

BOMBA. G1311A. No de serie. DE11115898

INYECTOR. G1313A. No de serie. DE11116771



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



Bomba de limpieza de columna (Liquid Chromatograph)

Shimadzu LC-10AS

No. De serie: 40351^a



Pipeta Biohit Line 10-100 μ L

No de serie. 5505662



Pipeta Transferpette100-1000 μ L

No de serie. 704180



Pipeta Eppendorf 500-5000 μ L

No de serie. 283943



Pipeta Eppendorf 100-1000 μ L

No de serie. 241239



Pipeta Eppendorf 20-200 μ L

No de serie. 1823162