



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE FARMACIA

**OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO
POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN
(HPLC) CON DETECCIÓN U.V A SER APLICADO EN EL
ENSAYO DE DISOLUCIÓN DE SILIMARINA CÁPSULAS**

FARMACÉUTICO, JACQUELINE PÉREZ

FARMACÉUTICO, ANA MARÍA SOJO

CARACAS, OCTUBRE 2013



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA



FACULTAD DE FARMACIA

POSTGRADO DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

**OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO
POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN
(HPLC) CON DETECCIÓN U.V A SER APLICADO EN EL
ENSAYO DE DISOLUCIÓN DE SILIMARINA CÁPSULAS**

FARMACÉUTICO, JACQUELINE PÉREZ

FARMACÉUTICO, ANA MARÍA SOJO

Trabajo presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela para
optar al título de Especialista en Aseguramiento de la Calidad

TUTOR: PhD, MIRIAM REGNAULT

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por permitirnos culminar esta meta y por estar siempre presente en nuestras vidas.

A la Universidad Central de Venezuela, Facultad de Farmacia, por brindarnos la oportunidad de seguir creciendo profesionalmente.

A la Profesora Miriam Regnault nuestra Tutora, por aceptar este reto junto a nosotras, por brindarnos su apoyo, conocimientos y orientación en todo momento para el logro de los objetivos propuestos.

A Laboratorios Vargas, S.A por permitirnos llevar a cabo este proyecto, por darnos todo el apoyo en lo económico, aporte de infraestructura y materiales para la realización de este trabajo de grado.

A nuestros padres por su apoyo incondicional.

A todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron al desarrollo y conclusión de este Trabajo Especial de Grado.

RESUMEN

La silimarina es un flavonolignano extraído de la planta *Silybum marianum* (cardo mariano), perteneciente a las familias de las Asteraceae. Es de origen mediterráneo que crece espontánea en zonas baldías de Europa, Norte de África y el Medio Oriente y en algunas partes de USA. Los frutos del cardo mariano contienen glucósidos, lípidos, prótidos, esteroides y se ha comprobado que se trata de una mezcla de varios componentes de estructura química semejante. Estos compuestos reciben el nombre de silibinina (en mayor proporción), silidianina, silicristina e isosilibinina. La silimarina es empleada por la medicina alternativa complementaria en tratamientos de enfermedades hepáticas. Clínicamente se ha sugerido que tiene efecto hepatoprotector en varias formas de hepatitis tóxica, hígado graso, cirrosis, hepatitis virales y actividad antioxidante.

El presente trabajo tiene como objetivo la optimización y validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para su aplicación en el ensayo de disolución de un producto farmacéutico nacional en cápsulas conteniendo silimarina. Para la optimización del método se evaluaron dos tipos de solventes orgánicos, sistemas de gradientes de elución y velocidad de flujo. Las condiciones óptimas se consiguieron utilizando una columna de fase reversa Lichrospher 100 RP18 25 cm de longitud, 4,0 mm de diámetro interno y tamaño de partícula 10 μ , un gradiente de elución: (0 – 20) minutos 57%A : 43%B flujo de 0,5 mL/min; (21 – 40) minutos 52%A : 48%B, flujo de 0,8 mL/min; (41 – 45) minutos 57%A : 43%B, flujo de 0,5 mL/min, empleando como solvente A: Solución de ácido fosfórico 0,05 M pH 3,0; solvente B: metanol, detector U.V a una

longitud de onda de 288nm, un volumen de inyección de 50 μ L, y bajo estas condiciones se realizó la validación de la metodología analítica. Se demostró que el método cumple con los parámetros de validación establecidos: Especificidad: es capaz de separar los compuestos de interés sin que exista interferencia de otras sustancias. Linealidad: la curva de calibración fue lineal en el rango de 40 – 140% de la concentración estándar de trabajo. Precisión: RSD a los 15 y 45 minutos menor al 10%. Precisión Intermedia: RSD a los 15 y 45 minutos menor al 15%. Exactitud: porcentaje de recuperación del analito para los 15 minutos entre 91 y 104% y para los 45 minutos entre 95 y 101%. Límite de detección: $6,46 \times 10^{-11}$ mg/mL. Límite de cuantificación: $1,95 \times 10^{-10}$ mg/mL. La precisión intermedia demostró la fortaleza del método analítico al no ser afectado por la variabilidad operacional y ambiental.

El presente trabajo representa una mejora en los tiempos de análisis y precisión de los resultados analíticos de la cuantificación del producto Silimarina, con respecto al procedimiento objeto de estudio.

INDICE

	pp.
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE GRAFICOS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
1. INTRODUCCION	1
1.1 Compuestos Fenólicos. Flavonoides	5
1.2 Metodologías empleadas para la cuantificación de Silimarina.....	5
1.3 Disolución de Formas Farmacéuticas Sólidas.....	9
1.3.1 Parámetros Generales del Ensayo de Disolución.....	11
1.3.1.1 Aparatos de Disolución.....	11
1.3.1.2 Velocidad de Agitación.....	12
1.3.1.3 Medio de Disolución.....	13
1.3.1.4 Tiempo.....	15
1.4 Fundamentos de Cromatografía Líquida.....	16
1.4.1 Eficiencia del Proceso Cromatográfico.....	16
1.4.2. Tiempo de Retención.....	17
1.4.3. Factor de Capacidad.....	18
1.4.4. Resolución del Proceso Cromatográfico.....	18
1.4.5 Asimetría del pico (Factor de Cola o tailing factor).....	22
1.5 Validación de un Método Analítico.....	22
1.5.1 Datos requeridos para la Validación.....	22

1.5.2 Exactitud.....	24
1.5.3 Precisión.....	24
1.5.4 Especificidad.....	25
1.5.5 Límite de Detección.....	26
1.5.6. Límite de Cuantificación.....	26
1.5.7 Linealidad e Intervalo.....	27
1.5.8 Robustez.....	28
1.6 Aptitud del Sistema.....	28
2. OBJETIVOS	30
2.1- Objetivo general.....	30
2.2– Objetivos específicos.....	30
3. METODOLOGIA	31
3.1 Materiales y métodos.....	31
3.1.1 Equipos.....	31
3.1.2 Patrones de Referencia.....	32
3.1.3 Muestra de Silimarina Cápsula.....	32
3.1.4 Reactivos y Solventes.....	32
3.1.5 Columna.....	32
3.1.6 Condiciones Cromatográficas.....	33
3.1.7 Preparación de las Soluciones de Estándar y Muestra.....	33
3.2 Procedimiento.....	34
3.2.1 Optimización del Método Analítico.....	34
3.2.1.1 Optimización de la Fase Móvil.....	34
3.2.2 Validación.....	37
3.2.2.1 Validación del método cromatográfico.....	37

3.2.2.1.1 Especificidad.....	37
3.2.2.1.2. Adecuación del Sistema.....	38
3.2.2.1.3 Linealidad.....	38
3.2.2.1.4 Precisión.....	39
3.2.2.1.5 Exactitud.....	39
3.2.2.1.6 Límite de detección y Límite de cuantificación.....	40
3.2.2.1.6.1 Límite de Detección.....	40
3.2.2.1.6.2 Límite de Cuantificación.....	40
3.2.2.1.7 Fortaleza.....	41
3.2.2.1.8 Validación del Método de Disolución.....	41
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	42
4.1 Desarrollo del método analítico.....	42
4.1.1 Optimización de la Fase Móvil.....	42
4.2 Validación.....	59
4.2.1 Especificidad.....	59
4.2.2 Adecuación del Sistema.....	63
4.2.3 Linealidad.....	65
4.2.4 Precisión.....	66
4.2.5 Exactitud.....	73
4.2.6 Límite de Detección.....	79
4.2.7 Límite de Cuantificación.....	80
4.2.8 Fortaleza.....	80
5. CONCLUSIONES.....	81
6. RECOMENDACIONES.....	81
7. BIBLIOGRAFIA.....	82

LISTA DE TABLAS

	pp.
I. Datos requeridos para la Validación (USP 35, 2012).....	23
II. Comparación de la resolución, tiempo de elución y número de platos teóricos de los cromatogramas obtenidos de los sistemas de gradientes 1, 2 y 3.....	49
III. Tiempo de retención de los patrones y la muestra de Silimarina cápsulas, Especificidad.....	59
IV. Resumen de los parámetros cromatográficos.....	63
V. Resultados linealidad y rango.....	65
VI. Datos Analista 1 y Analista 2 para calcular el porcentaje disuelto de silimarina cápsulas.....	67
VII. Áreas de la muestra a los 15 y 45 minutos (Analista 1).....	69
VIII. Resultados de repetibilidad a los 15 minutos (Analista 1).....	70
IX. Resultados de repetibilidad a los 45 minutos (Analista 1).....	70
X. Áreas de la muestra a los 15 y 45 minutos (Analista 2).....	71
XI. Resultados ensayo de disolución a los 15 minutos (Analista 2).....	72
XII. Resultados ensayo de disolución a los 45 minutos (Analista 2).....	72
XIII. Áreas de la muestra de referencia para la exactitud a los 15 y 45 minutos.....	74
XIV. Resultados del ensayo de disolución de referencia para la exactitud a los 15 minutos.....	74
XV. Resultados del ensayo de disolución de referencia para la exactitud a los 45 minutos.....	75
XVI. Áreas de la muestra a los 15 y 45 minutos.....	76

XVII. Resultados de Exactitud a los 15 minutos.....	77
XVIII. Resultados de Exactitud a los 45 minutos.....	77
XIX. Resultados de los Límites de Confianza a los 15 minutos.....	78
XX. Resultados de los Límites de Confianza a los 45 minutos.....	78
XXI. Respuesta del ruido de fondo analítico.....	79

LISTA DE GRAFICOS

	pp.
1. Linealidad (área vs. concentración mg/mL).....	66

LISTA DE FIGURAS

	pp.
1. Estructura química de los compuestos activos del <i>Silybum marianum</i> : Silicristina, Silidianina, Isómeros de Silibinina (Silibinina A y B), e isómeros de Isosilibinina (Isosilibinina A y B) Fuente: Lee J et al. (15).....	4
2. Nomograma de Fuerza de solvente para HPLC en fase reversa. Fuente: Regnault, M. (18).....	21
3. Cromatogramas del método analítico de casa matriz: patrón silibinina A y B y muestra de disolución.....	43
4A. Cromatogramas del ensayo para la proporción 50% metanol en la fase móvil: patrón silibinina A y B, y muestra de disolución.....	45
4B. Cromatogramas del ensayo para la proporción 45% metanol en la fase móvil: patrón silibinina A y B y muestra de disolución.....	46
4C. Cromatogramas del ensayo para la proporción 40% metanol en la fase móvil: patrón silibinina A y B y muestra de disolución.....	47
5A. Cromatogramas del ensayo evaluando Sistema de gradiente N° 1 patrón silibinina A y B y muestra de disolución.....	50
5B. Cromatogramas del ensayo evaluando Sistema de gradiente N° 2 patrón silibinina A y B y muestra de disolución.....	51
5C. Cromatogramas del ensayo evaluando Sistema de gradiente N° 3 patrón silibinina A y B y muestra de disolución.....	52
6A. Cromatogramas evaluando pH 5,0 en la fase acuosa, empleando Sistema gradiente N° 3: patrón silibinina A y B y muestra de disolución...	54
6B. Cromatogramas evaluando pH 3,0 en la fase acuosa, empleando Sistema gradiente N° 3: patrón silibinina A y B y muestra de disolución...	55

7A. Cromatogramas evaluando como fase orgánica acetonitrilo, empleando el Sistema gradiente N° 4: patrón silibinina A y B y muestra de disolución.	57
7B. Cromatogramas evaluando como fase orgánica acetonitrilo y metanol, empleando el Sistema gradiente N° 5: patrón silibinina A y B y muestra de disolución.....	58
8A. Cromatogramas del ensayo de especificidad: patrón silicristina, patrón silidianina, patrón isosilibinina A y B.....	60
8B. Cromatogramas del ensayo de especificidad: patrón silibinina A y B, muestra de disolución.....	61
8C. Cromatogramas del ensayo de especificidad: blanco A (Solución de Buffer pH 7,5), blanco B (Solución Acido fosfórico 0,05M pH 3,0 – Metanol (50:50) y placebo.....	62

1.- INTRODUCCION

Las plantas medicinales se han usado desde la antigüedad para el tratamiento de diversas enfermedades y son parte integral de muchas culturas a lo largo del mundo, su uso se ha diversificado extensamente por su actividad antitumoral, antimicrobiano, inmunológica, anticonceptiva, padecimientos hepáticos, gastrointestinales, hipoglicemiantes, entre otras.

(1)

Constituyen una alternativa viable para resolver en buena medida los problemas de salud, de manera complementaria e inclusive de manera integral y de bajo costo. La cultura de nuestros pueblos en el uso de las plantas medicinales, se ha caracterizado por el uso directo sin más modificación que la provocada por su deshidratación y decocción. Bajo este criterio de consumo es como se han establecido tradicionalmente alternativas viables para resolver sus problemas de salud sobre todo en aquellos grupos desfavorecidos históricamente tanto social como económicamente. A esta costumbre también se ha sumado parte de la población con mayores recursos culturales y económicos; de tal manera que, con base a esta práctica médica actualmente existe un incremento en el desarrollo y uso de fitofármacos como nuevo recurso de aplicación fitoterapéutica. **(2)**

Las plantas medicinales han sido usadas por cientos de años para el tratamiento de desordenes del hígado. Estos tratamientos incluyen hepatitis viral aguda, hepatitis crónica viral, colelitiasis crónica, enfermedad hepática crónica y envenenamiento por hongos. Estas patologías han sido estudiadas sin que a la fecha se cuente con tratamientos satisfactorios y efectivos

empleados por la medicina convencional. Ante este problema actualmente se ha puesto mucha atención en el uso de otras alternativas de la Medicina Alternativa Complementaria, utilizando como principal recurso las plantas medicinales; particularmente aquellas que sean ricas en compuestos polihidroxifenólicos, flavonoides y terpenoides los que con sus grupos hidroxifenólicos reaccionan con radicales libres formando aductos que no resultan ser tóxicos. Las plantas que contienen esta clase de compuestos se caracterizan por su potente efecto hepatoprotector. **(2)**

En las enfermedades del hígado se produce un estrés oxidativo donde participan diferentes sustancias ricas en oxígeno, que en primera instancia afectan la membrana celular por peroxidación de los lípidos y se producen tóxicos que se unen a proteínas y ADN formando aductos que alteran la estructura y significado fisiológico y metabólico de estas biomoléculas. Si los agentes generadores de radicales libres actúan de manera intensa y crónica además de activar las células estelares producen muerte celular, por lo tanto en este cuadro multifisiopatológico, el hígado se convierte en el órgano clave que requiere mucha atención para prevenirlo de agentes tóxicos que alteren su metabolismo. **(2)**

Una de las plantas más estudiadas en enfermedades hepáticas es la *Silybum marianum* (cardo mariano) perteneciente a la familia Asteraceae, es una planta anual o bianual que puede alcanzar 1 ó 2 metros de altura, sus hojas son ovaladas, de color verde y con nervios blancos, sus flores son púrpura con grandes espinas en su base. Es de origen mediterráneo que crece espontánea en zonas baldías de Europa, Norte de África y el Medio Oriente y en algunas partes de USA. **(3) (4)**

Los frutos del cardo mariano contienen glucósidos, lípidos, prótidos, esteroides. En la década de 1960, los principios biológicamente activos de las semillas y extractos de los frutos, fueron aislados y se elucidaron las estructuras químicas, lo que condujo primeramente a una mezcla que contiene aproximadamente 60% de Silimarina la cual consta de cuatro flavonolignanos de Silibinina (50 a 60%), Silidianina (10%), Silicristina (20%), Isosilibinina (5%) sobre esta mezcla de flavonolignanos se han realizado la mayoría de los estudios clínicos. **(3) (5)**

La silimarina es empleada por la medicina alternativa complementaria en tratamientos de enfermedades hepáticas. Clínicamente se ha sugerido que tiene efecto hepatoprotector en varias formas de hepatitis tóxica, hígado graso, cirrosis, hepatitis virales y actividad antioxidante. Las actividades descritas se deben a los flavolignanos de la silimarina que actúan como agentes antioxidantes y depuradores de radicales libres. **(2)**

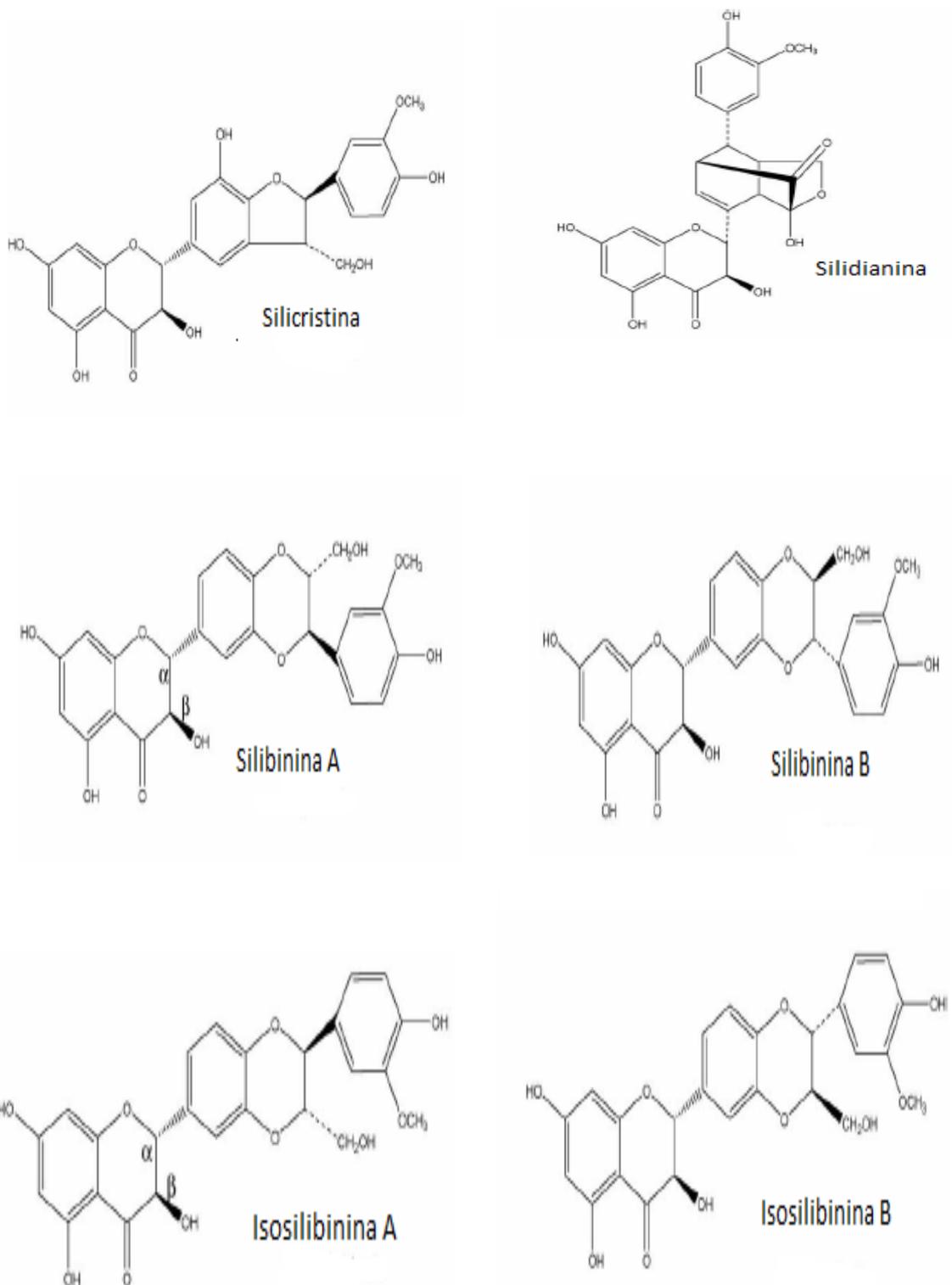


Figura 1. Estructura química de los compuestos activos del *Silybum marianum*: Silicristina, Silidianina, Isómeros de Silibinina (Silibinina A y B), e isómeros de Isosilibinina (Isosilibinina A y B) Fuente: Lee J et al. (15)

1.1.- Compuestos Fenólicos: Flavonoides

Existen una serie de principios activos de plantas que proceden de rutas biosintéticas mixtas, este es el caso de un importante grupo de moléculas activas denominadas genéricamente flavonoides o compuestos fenólicos.

Los flavonoides se originan a través de la combinación de la ruta del acetato y del sikimato, vías mediante las cuales se biosintetiza la estructura diarilpropanica; en la naturaleza pueden encontrarse tanto en forma libre o combinados con azúcares mediante uniones de oxígeno y carbono heteroxidicas, la mayoría de ellos están constituidos por un núcleo bencénico unido a una gamma pirona, incluyendo además en distintas posiciones; C1, C2 o C3, un segundo anillo bencénico dando lugar a los neoflavonoides, flavonoides propiamente dicho o a los isoflavonoides. (6)

1.2 Metodologías empleadas para la cuantificación de Silimarina

La presencia de la mezcla de estos flavonolignanos en la planta *Silybum marianum* ha sido demostrada, pero debido a la complejidad de la muestra y la baja concentración en que ellos están presentes, es necesario disponer de un método analítico que muestre una adecuada sensibilidad y selectividad para realizar la cuantificación e identificación.

Hasta ahora, los principales componentes de la silimarina se han extraído, separados y analizados por TLC, HPLC, espectrofotometría UV-Vis, detección electroquímica o MS y electroforesis capilar. (7)

La metodología más frecuente para la cuantificación e identificación de la Silimarina es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), varios autores han realizado estudios para el desarrollo y optimización de métodos

analíticos empleando columnas C18, C8 en fase reversa, detectores U.V, masas y de arreglo de diodos.

Quaglia *et al.* **(8)** realizaron un estudio para la determinación del contenido de silimarina en el extracto del fruto seco de *Silybum marianum* mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y electroforesis capilar, empleando como columnas Purospher C18 (250 x 4mm) 5µm (Sistema 1) y Lichrosphere C8 (250 x 4mm) 5µm, (Sistema 2). En el sistema 1 la fase móvil empleada fue una mezcla de agua acidificada a pH 2,6 con ácido fosfórico al 10% mezclado con acetonitrilo en una proporción de (62:38), en el sistema 2 se empleó una elución por gradiente, usando como solvente A: agua acidificada a pH 2,3 con ácido fosfórico al 10%, solvente B: Acetonitrilo; Solvente C: Metanol. En ambos casos se uso un flujo de 1mL/min y como detector un equipo de arreglo de diodos a una longitud de onda de 289nm. En la determinación del porcentaje de silimarina en los frutos seco de *Silybum marianum* se obtuvieron resultados comparables por HPLC y electroforesis capilar. El HPLC permitió una buena separación entre los picos de silibinina e isosilibinina, aunque este comportamiento no fue similar en electroforesis capilar.

Ding *et al.* **(9)**. En el 2001 lograron separar y cuantificar por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) los compuestos activos de la silimarina, (silibinina, isosilibinina, silidianina, silicristina), empleando una columna VP-ODS (150 x 4,6 mm) 5µm; precolumna: (10 x 4,6mm) 5µm, como fase móvil metanol y una mezcla de solvente agua: dioxano (9:1), se empleó una elución por gradiente a una velocidad de flujo de 1,5mL/min y temperatura de 40°C, longitud de onda de 288nm. Se logró confirmar la separación de

los dos diastereoisómeros de silibinina e isosilibinina por cromatografía líquida de espectrometría de masas.

Kvasnicka *et al.* **(10)** analizaron los componentes activos de silimarina en preparaciones farmacéuticas; mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y electroforesis capilar, evaluando los parámetros de precisión, exactitud, linealidad y límite de detección. La separación se realizó mediante una columna Purospher RP18 (150 x 4 mm) 5µm, como fase móvil se empleó una mezcla de Acido Fosfórico 85%: Metanol: Agua (0,5: 46: 64), flujo 1 mL/min, detector UV-Visible y una longitud de onda de 288 nm, con un tiempo de corrida de 25 minutos. Se determinó que las dos metodologías estudiadas producen resultados comparables.

Zhao *et al.* **(11)**, realizaron una determinación simultánea de diterpenos, flavonolignanos y compuestos fenólicos en preparaciones de *Silybum marianum* y *Salvia miltiorrhiza* mediante cromatografía líquida de espectrometría de masas con ionización electrospray, (HPLC-DAD-ESI MS). Se utilizó una columna Shimadzu, Japan (150 x 4.6mm) 5µm, como fase móvil se empleó una mezcla de gradiente Metanol (A) y una solución acuosa de Acido Fórmico al 0,5% (B), un flujo de 1,2 mL /min a una temperatura de 30°C, longitud de 254 y 280 nm, usando un detector de arreglo de diodo y masa. Se obtuvieron resultados de fácil interpretación concluyendo que este método puede emplearse con comodidad y sensibilidad para los análisis de control de calidad de los preparados que contienen compuestos *S. miltiorrhiza* y *S. marianum*.

Li *et al.* **(12)** desarrollaron un método para la cuantificación de Silibinina A y Silibinina B en plasma humano mediante la cromatografía líquida de

espectrometría de masas con ionización electrospray, se utilizó una columna Agilent Zorbax Eclipse XDB C18 (250 x 21,2 mm) 5 μ m, la fase móvil estuvo compuesta por una mezcla de metanol y agua conteniendo 0,1% de ácido fórmico (48:52, v/v), a una longitud de onda de 288nm. El método desarrollado fue selectivo y reproducible para la determinación de Silibinina A y Silibinina B.

De igual forma Lee *et al.* **(13)** Desarrollaron un método para la cuantificación simultánea de seis activos que constituyen estándares comerciales de silimarina, basado en cromatografía líquida de espectrometría de masas con ionización electrospray (HPLC-DAD-ESI MS), empleando una columna YMC ODS-AQ C18 (2.0mm x 100mm) 3 μ m, a una temperatura de 40°C, usando como fase móvil acetato de amonio ajustada a pH 4.0 con ácido fórmico (A) y una mezcla de metanol/agua/ ácido fórmico (90:10:0,1) (v/v/v) (B). Este método demostró ser útil en la evaluación y cuantificación de los seis activos constituyentes de productos comerciales extraídos del cardo lechozo y que son administrados en pacientes con Hepatitis C.

En el año 2009, Liu *et al.* **(14)**. Desarrollaron un método para la determinación de los compuestos activos de la silimarina, mediante cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC), empleando una columna C18 Acquity UPLC BEH, (50mm x 2,1mm), 1,7 μ m y una fase móvil de metanol y agua conteniendo 0,1% de ácido fórmico, con tiempos de corrida de 9 minutos; con detector UV-Visible, a una longitud de onda de 288 nm. El método desarrollado resultó ser capaz de disminuir los tiempos de retención y demostró una mejor resolución en comparación a los métodos convencionales por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), estos

resultados indican que este tipo de columna y fase móvil con adición de modificadores fueron significativos para la separación de los compuestos isómeros en el extracto herbario.

1.3 Disolución de Formas Farmacéuticas Sólidas

Desde finales de la década de 1960 las pruebas de disolución se convirtieron en un requisito obligatorio para diversos preparados farmacéuticos. La disolución es una herramienta cualitativa que puede proporcionar información valiosa acerca de la disponibilidad biológica de una droga así como la uniformidad entre un lote y otro, y se considera hoy en día una de las pruebas de control de calidad más importantes realizadas en los preparados farmacéuticos. **(16) (22)**

Para determinar la velocidad de disolución de las drogas en preparados sólidos en condiciones estandarizadas deben considerarse procesos fisicoquímicos como: la humidificación de los preparados sólidos, el proceso de hinchamiento, la desintegración y la desagregación. La humidificación de la superficie de los preparados sólidos controla el acceso de líquido hacia la superficie del mismo y muchas veces es un factor limitante en el proceso de disolución. La velocidad de humidificación va a depender de la tensión superficial en la interfase y del ángulo de contacto entre la superficie del sólido y el líquido; por lo que en algunos casos es necesaria la incorporación de tensoactivo en el preparado o al medio de disolución para reducir el ángulo de contacto e incrementar la disolución. **(16)**

La presencia de aire en el medio de disolución hace que las burbujas de aire sean atrapadas en los poros de los comprimidos y actúen como barrera en la interfase. En el caso de las cápsulas, la capa de gelatina es

extremadamente hidrofílica, por tanto, no existen problemas en cuanto a la capacidad de humidificación del preparado.

Una vez que el preparado sólido se ha desintegrado en gránulos o agregados, las características de penetración desempeñan un papel importante en el proceso de desagregación. Los lubricantes hidrófobos, como el talco y estearato de magnesio, muy a menudo empleados en la preparación de los comprimidos y cápsulas, enlentecen la velocidad de penetración y por lo tanto el proceso de desagregación. El gran tamaño de los poros facilita la penetración pero si es demasiado grande puede inhibir la penetración por disminución de la presión interna causada por la hinchazón del desintegrante. **(16) (22)**

Una vez que se produce la desagregación y dislocación, las partículas de la droga quedan expuestas al medio de disolución dando lugar al proceso de disolución.

A medida que el concepto de disolución adquirió importancia durante las últimas décadas, los métodos y técnicas in vitro han evolucionado considerablemente. Uno de ellos es el método con cubetas o vasos, los cuales incluyen todos los sistemas con compartimientos cerrados con un mecanismo mezclador por convección forzada, en los cuales hay un volumen de disolución (200 a 2000 mL) en una cubeta o vaso con un mecanismo de agitación de rotación u oscilación. **(16)**

La USP 35 describe dos aparatos con este mecanismo, el aparato 1 consiste en una cubeta cilíndrica de 1000 mL de vidrio o un material inerte, una canasta de acero inoxidable cilíndrica de malla 40 conectada a un vástago metálico de rotación y un motor de velocidad regulada. El conjunto se coloca

en un baño de agua que permite una temperatura constante de 37 grados +/- 0,5 grados durante la prueba. Se inserta cada uno de seis comprimidos o cápsulas en cada cesta y las canastas bajan hacia los vasos que contienen el medio de disolución respectivo, posteriormente se toman muestras filtradas de cada vaso con cierto intervalo de tiempo para la determinación de la cantidad de ingrediente activo disuelto. **(17)**

El aparato 2, es similar al aparato 1, excepto a que se usa una paleta metálica cubierta de un material inerte, dicha paleta va conectada a un motor de velocidad regulada. En este caso, los comprimidos o cápsulas se dejan caer libremente hasta al fondo y la paleta gira a la velocidad y tiempo indicado **(16)**.

1.3.1 Parámetros Generales del Ensayo de Disolución

1.3.1.1 Aparatos de Disolución

De acuerdo a la USP 35 la elección del aparato se basa en el conocimiento que se tenga de la formulación y de los aspectos prácticos del desempeño de la forma farmacéutica en el sistema de la prueba in vitro. El Aparato 1 (Cesta) y el Aparato 2 (Paletas) son los aparatos que se utilizan con mayor frecuencia para las formas farmacéuticas orales solidas.

Si el Aparato 1 o 2 no fuesen apropiados, se puede utilizar otro aparato oficial. El Aparato 3 (cilindro oscilante) ha demostrado ser especialmente útil para formas farmacéuticas de liberación modificada tipo perlas. El Aparato 4 (Celda de flujo) puede ofrecer ventaja para las formas farmacéuticas de liberación modificada que contienen ingredientes activos de solubilidad limitada. Adicionalmente, el Aparato 3 o el Aparato 4 pueden resultar útiles para cápsulas de gelatinas blandas, perlas, supositorios o fármacos poco

solubles. El Aparato 5 (paleta sobre disco) y el Aparato 6 (cilindro rotatorio) han demostrado ser útiles para evaluar y analizar las formas farmacéuticas transdérmicas. El Aparato 7 (soporte oscilante) se puede aplicar a formas farmacéuticas orales de liberación modificada que no se desintegran, al igual que a formas farmacéuticas transdérmicas. **(17)**

1.3.1.2 Velocidad de Agitación

Para cápsulas o tabletas de liberación inmediata, los aparatos de mayor uso son el Aparato 1 (cesta) a 100 rpm o el Aparato 2 (paletas) a 50 ó 75 rpm. Con una justificación apropiada, se aceptan otros aparatos y otras velocidades de agitación.

Las velocidades menores de 25 o mayores de 150 rpm son usualmente inapropiadas debido a la inconsistencia de la hidrodinámica por debajo de los 25 rpm y por la turbulencia por encima de 150 rpm.

Las velocidades de agitación entre 25 y 50 rpm son generalmente aceptables para las suspensiones. Para formas de dosificación que presentan la formación de conos (montículos) debajo de la paleta a 50 rpm, el cono puede reducirse al aumentar la velocidad de la paleta a 75 rpm, reduciendo el artefacto para mejorar los datos. Si se justificará, se puede emplear una velocidad de 100 rpm, especialmente para productos de liberación prolongada. El aumentar o disminuir la velocidad de rotación del aparato puede justificarse si los perfiles reflejan mejor el desempeño in vivo y/o los resultados del método demuestran una mejor discriminación sin afectar adversamente la reproducibilidad del método. **(17)**

1.3.1.3 Medio de Disolución

Los datos físicos y químicos para el fármaco y la unidad de dosificación deben conocerse antes de seleccionar el medio de disolución. Dos propiedades claves del producto farmacéutico son la solubilidad y la estabilidad del fármaco en solución en función del valor de pH. Cuando se selecciona la composición del medio se debe evaluar la influencia de las soluciones amortiguadoras, el valor de pH y los surfactantes respecto a la solubilidad y a la estabilidad del fármaco. Las propiedades claves de la unidad de dosificación que pueden afectar la disolución incluyen el mecanismo de liberación (inmediato, retardado o modificado) y la velocidad de desintegración afectados por la dureza, la friabilidad, la presencia de potenciadores de solubilidad y otros excipientes.

Por lo general, cuando se desarrolla un procedimiento de disolución, una meta es tener condiciones de exceso de medio (sink condition), definido como el volumen de medio igual a por lo menos tres veces el requerido para formar una solución saturada del fármaco. Cuando la condición de exceso de medio está presente, existirán mayores probabilidades de que los resultados de disolución reflejen las propiedades de la forma farmacéutica.

No se recomienda emplear una mezcla de un disolvente orgánico y agua como medio de disolución. Sin embargo, puede ser aceptable si existe una justificación apropiada para este tipo de medio.

Con frecuencia se usa agua purificada como medio de disolución, pero no es el ideal por diferentes razones. En primer lugar, la calidad del agua puede variar dependiendo de la fuente y el valor de pH no estar controlado.

En segundo lugar, el valor de pH puede variar día a día y también puede variar durante una corrida dependiendo de la sustancia activa y los excipientes. A pesar de estas limitaciones, se debe tener en cuenta que el agua es económica, está disponible, es de fácil eliminación, ecológicamente aceptable y apta para productos con una velocidad de liberación independiente del valor de pH del medio.

Las características de la disolución de una formulación oral deben evaluarse en el rango de pH fisiológico entre 1,2 y 6,8 (de 1,2 a 7,5 para las formulaciones de liberación modificada).

Durante el desarrollo del método, podría ser de utilidad medir el pH antes y después de una corrida para determinar si cambia durante la prueba.

Los medios típicos para la disolución pueden incluir los siguientes elementos: ácido clorhídrico diluido, soluciones amortiguadoras en el rango de pH fisiológico entre 1,2 y 7,5, fluido intestinal o gástrico simulados (con o sin enzimas), agua y surfactantes (con o sin ácidos, soluciones amortiguadoras) tales como: polisorbato 80, lauril sulfato de sodio y sales biliares.

La molaridad de las soluciones amortiguadoras y de los ácidos usados puede influenciar el efecto de solubilización y este factor puede ser evaluado.

Para compuestos escasamente solubles, las soluciones acuosas pueden contener un porcentaje de un surfactante (ej., lauril sulfato de sodio, polisorbato u óxido de lauril dimetilamina) que se utiliza para mejorar la solubilidad del fármaco. La necesidad de surfactantes y las concentraciones usadas pueden justificarse mostrando los perfiles a diferentes

concentraciones. Los surfactantes pueden emplearse, ya sea como agentes humectantes o para solubilizar el fármaco. (17)

1.3.1.4 Tiempo

Para las formas farmacéuticas de liberación inmediata, la duración del procedimiento es usualmente entre 30 y 60 minutos; en la mayoría de los casos, la especificación de un solo tiempo es adecuada para fines farmacopeicos. Se deben seleccionar suficiente tiempos para una adecuada caracterización de la fase ascendente y la fase de meseta de la curva o perfil de disolución. De acuerdo con el sistema de clasificación Biofarmacéutica, los fármacos altamente solubles y de alta permeabilidad formulados como productos que se disuelven rápidamente no requieren estar sujetos a un perfil de comparación si demuestra una liberación de 85% o más de la sustancia activa dentro de 15 minutos. Para estos tipos de productos solamente se requiere una prueba de un solo punto. Sin embargo, la mayoría de los productos no caen dentro de esta categoría. Los perfiles de disolución de productos de liberación inmediata por lo general presentan un incremento gradual que alcanza entre 85 y 100% en un periodo de aproximadamente entre 30 y 45 minutos. De este modo, los tiempos de disolución en el rango de 15, 20, 30, 45 y 60 minutos son comunes para la mayor parte de los productos de liberación inmediata. Para los productos de disolución rápida, entre los que se incluyen las suspensiones, se puede obtener información útil a partir de los primeros puntos, por ejemplo de 5 a 10 minutos. Para productos de disolución lenta, pueden ser de utilidad los tiempos que sobrepasen los 60 minutos. Los tiempos de la prueba de

disolución para las pruebas farmacopeicas generalmente se basan en una evaluación de los datos del perfil de disolución. **(17)**

1.4 Fundamentos de Cromatografía Líquida

Las técnicas de separación cromatográfica son métodos de separación de múltiples etapas en los que los componentes de una muestra se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido adsorbido sobre un sólido o un gel, puede estar empacada en una columna, extendida en una capa, distribuida como película o aplicada mediante otras técnicas. La fase móvil puede ser gaseosa o líquida o un fluido supercrítico.

El término cromatografía de líquidos, según se usa en los compendios es sinónimo de cromatografía líquida de alta presión y de cromatografía líquida de alta resolución. La cromatografía de líquidos es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida.

Las separaciones se logran por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada. Las fases estacionarias más comúnmente usadas son la sílice modificada o las microperlas de polímero. **(17)**

1.4.1 Eficiencia del Proceso Cromatográfico

La eficiencia del proceso cromatográfico es medida en términos del número de platos teóricos (N) de la columna ó del número de equilibrios que se establecen en una columna de determinada longitud. Para los picos gaussianos se calcula por la ecuación:

$$N = 16 (t_R / W)^2$$

Donde:

t_R = Tiempo de retención o tiempo necesario para eluir la máxima concentración de la columna, medido desde el punto de inyección.

W = Ancho del pico en su base, que se obtiene extrapolando los lados relativamente rectos del pico hasta la línea base.

El valor N depende de la sustancia cromatografiada así como de las condiciones operativas, tales como la velocidad de flujo y la temperatura de la fase móvil o gas transportador, la calidad del relleno, la uniformidad del relleno dentro de la columna, y, para columnas capilares, el espesor de la película de la fase estacionaria, el diámetro interno y la longitud de la columna.

Debido a las posibles variaciones en la realización de la triangulación del pico y al uso de integradores electrónicos, es conveniente determinar el número de platos teóricos por la siguiente ecuación:

$$N = 5,54 (t_R / W_{h/2})^2$$

Donde:

$W_{h/2}$ = Es el ancho del pico a la mitad de la altura. Sin embargo, en caso de discrepancias, solo se deben usar las ecuaciones basadas en el ancho del pico en la línea base.

1.4.2. Tiempo de Retención

En cromatografía líquida y de gases, el tiempo de retención, t_R , se define como el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición de la respuesta máxima. Se puede usar, t_R , como un parámetro para la identificación. Los tiempos de retención cromatográficos son característicos de los compuestos que representan, pero no son únicos.

El tiempo de retención de un compuesto depende de la velocidad del flujo de la fase móvil, volumen de la columna, composición de la fase móvil, pH, empaque de la columna y temperatura.

Para lograr la separación de un compuesto de una mezcla, en una columna cromatográfica, es necesario que el compuesto analizado sea parcialmente retenido en ella.

1.4.3. Factor de Capacidad

El factor de capacidad (k') es un valor práctico que nos expresa el grado de interacción del compuesto (s) con la columna:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Donde:

t_R = Tiempo de retención del compuesto analizado

t_0 = Tiempo de retención de un compuesto poco retenido ó no retenido en la columna.

Idealmente los valores de k' varían entre 1 (poca interacción) y 10 (gran interacción). Valores superiores a 10 significan que el tiempo de retención de análisis es muy largo y probablemente la resolución no es adecuada debido a que la difusión molecular provoca ensanchamiento de la bandas. **(18)**

1.4.4. Resolución del Proceso Cromatográfico

La resolución es la separación de dos componentes en una mezcla, calculada por:

$$R_s = 2 (t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 + W_2)$$

Donde:

t_{R2} y t_{R1} = Tiempos de retención de los componentes 1 y 2

W_1 y W_2 = Anchos correspondientes en las bases de los picos 1 y 2 obtenidos extrapolando los lados relativamente rectos de los picos hasta la línea base.

Esta ecuación es conveniente cuando los picos están bien resueltos ($R_s \geq 1,5$). Las bandas que se superponen tienen valores menores de resolución. Por lo tanto, es necesario un valor adecuado de R_s pero además es necesario que todos los componentes estén resueltos. Para análisis cuantitativo, se recomienda una resolución en línea base ($R_s \geq 1,5$) para todas las bandas de interés. Una resolución en exceso de $R_s = 1,5$ asegura un método más fuerte y pequeños cambios en la separación no comprometerán el método. Es menos preciso cuantificar con valores de $R_s < 1$).

La resolución depende de las diferentes condiciones experimentales que afectan el tiempo de retención y el número de platos teóricos.

Cuando los picos no están bien resueltos o se emplean integradores electrónicos, es conveniente determinar la resolución, mediante la ecuación:

$$R_s = 1,18 (t_{R2} - t_{R1}) / (W_{1,h/2} + W_{2,h/2})$$

La resolución se puede controlar seleccionando las mejores condiciones experimentales para ello es necesario estudiar la ecuación básica de la Resolución (R_s):

$$R_s = 1/4 (\alpha - 1) N^{0,5} (k'/1 + k')$$

Donde:

α = Factor de separación: k_2 / K_1

k_2 / K_1 = Factores de capacidad (k') para las bandas 1 y 2

N = Número de platos teóricos de la columna (promedio de las dos bandas)

K' = Promedio de los valores de k' para las dos bandas

De acuerdo con esta ecuación, la resolución está determinada por tres factores diferentes e independientes: el factor de separación (α), el número de platos teóricos (N) y el factor capacidad (k').

El factor k' está relacionado directamente con la fuerza del solvente, por lo que a valores mayores de k' mayor resolución del sistema cromatográfico. Un aumento en k' también lleva a mayores tiempos de corrida y a bandas más anchas, las cuales son más difíciles de cuantificar con exactitud, por lo tanto, los valores de k' deben ser intermedios, en un rango entre 1 y 20 para todas las bandas del cromatograma.

Los valores de $k' < 1$ debe evitarse ya que la resolución no es satisfactoria porque bandas interferentes son más probables de aparecer y la cuantificación se hace más difícil. En HPLC de fase reversa, la fuerza del solvente incrementa con el porcentaje de fase orgánica en la fase móvil.

Durante el desarrollo de la metodología analítica lo recomendable es comenzar con una fase móvil que es probablemente muy fuerte y luego ir reduciendo la fuerza del solvente para aumentar k' en las siguientes corridas. **(18)**

Una vez que la fuerza del solvente (k') ha sido ajustada adecuadamente para la muestra, el próximo parámetro a estudiar es la selectividad de la fase móvil (α), sin embargo en muchos casos, es posible obtener una separación

satisfactoria variando simplemente la fuerza del solvente. Para variar la selectividad de la fase móvil es necesario sustituir un solvente orgánico por otro para ello es necesario conocer que porcentaje de un solvente es equivalente al otro solvente. **(18)**

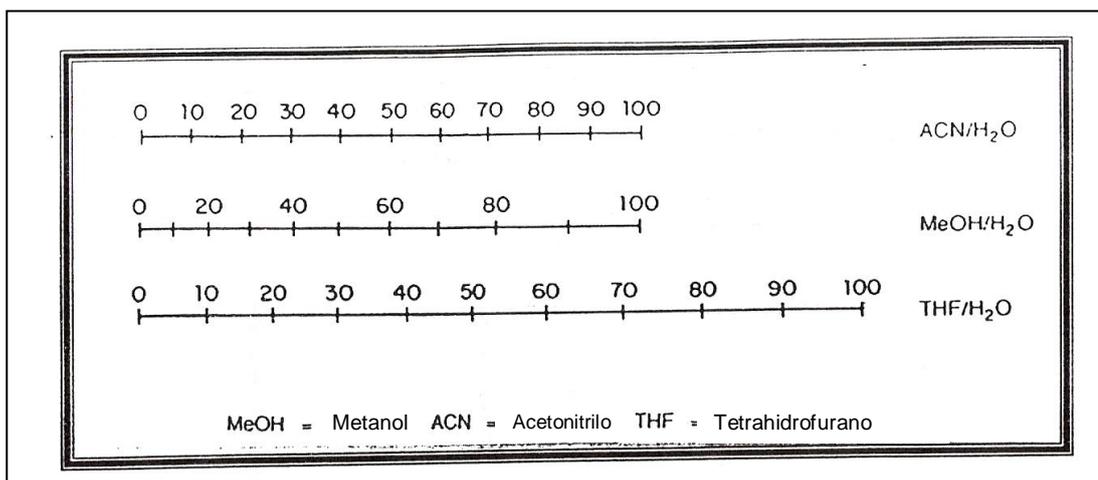


Figura 2. Nomograma de Fuerza de solvente para HPLC en fase reversa. Fuente: Regnault, M. **(18)**

La Figura 2 muestra la conversión en fases móviles utilizadas en fase reversa teniendo la misma fuerza (serie iso-elutrópica). Líneas verticales en esta figura interceptan fases móviles con la misma fuerza, ejemplo: 70% de metanol tiene la misma fuerza que 60% de acetonitrilo o 45% de THF. La composición de la fase móvil tiene un gran efecto en la distancia entre las bandas; ninguna otra variable ha probado ser tan poderosa en controlar los valores α .

El número de platos teóricos (N), es importante en la resolución de la muestra, por ello es necesario que el desarrollo de la metodología analítica se inicie con una columna cromatográfica que posea un número de platos teóricos apropiados, una vez ajustado N para alcanzar una resolución deseada en la muestra, es importante que además se ajuste el tiempo de

corrida (1 -20) minutos, la presión aproximadamente a 2000 PSI y fijar un mínimo de consumo de fase móvil, aunque no es una limitante. **(18)**

1.4.5 Asimetría del pico (Factor de Cola o tailing factor)

El factor de simetría de un pico se calcula por:

$$A_s = W_{0,05} / 2f$$

Donde

$W_{0,05}$ = Es el ancho del pico al 5% de la altura

f = Es la distancia del máximo del pico hasta el borde inicial del pico, midiendo la distancia en un punto ubicado al 5% de la altura de la línea base.

En una separación cromatográfica debe establecerse el límite máximo de asimetría del pico. Para un pico simétrico el factor es la unidad y su valor se incrementa conforme la asimetría se vuelve más pronunciada. **(17)**

1.5 Validación de un Método Analítico

De acuerdo a la USP 35, la validación de un procedimiento analítico es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas. **(17)**

1.5.1 Datos requeridos para la Validación

Los requisitos de las pruebas farmacopeicas varían desde determinaciones analíticas muy rigurosas hasta evaluaciones subjetivas de atributos. Considerando esta amplia variedad, es lógico que diferentes procedimientos de prueba requieran diferentes esquemas de validación. La USP 35 clasifica aquellas pruebas que requieran datos de validación en cuatro (4) categorías:

Categoría I: Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.

Categoría II: Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos procedimientos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.

Categoría III: Procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño (por ejemplo: disolución, liberación de fármacos, etc.).

Categoría IV: Pruebas de identificación.

En la tabla I se indican los datos que normalmente se requieren para cada una de estas categorías.

Tabla I. Datos requeridos para la Validación (USP 35, 2012).

Característica de Desempeño Analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis Cuantitativos	Pruebas de Límite		
Exactitud	SI	SI	*	*	NO
Precisión	SI	SI	NO	SI	NO
Especificidad	SI	SI	SI	*	SI
Límite de Detección	NO	NO	SI	*	NO
Límite de Cuantificación	NO	SI	NO	*	NO
Linealidad	SI	SI	NO	*	NO
Intervalo	SI	SI	*	*	NO

*Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

Las características de desempeño analítico habituales que deben considerarse en la validación de un método analítico son, exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, intervalo, robustez.

1.5.2 Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero. La exactitud debe establecerse en todo su intervalo.

En la valoración de un fármaco, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del procedimiento analítico con respecto a un analito de pureza conocida, por ejemplo, un estándar de referencia.

La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra, o como la diferencia entre la media de la valoración y el valor verdadero aceptado, considerando los intervalos de confianza. **(17)**

La International Conference on Harmonisation (ICH) recomienda que se evalúe la exactitud utilizando un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración, cubriendo el intervalo especificado (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración). **(19)**

1.5.3 Precisión

La precisión de un procedimiento analítico es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea.

La precisión de un procedimiento analítico habitualmente se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. La precisión puede ser una medida del grado de reproducibilidad o de repetibilidad del procedimiento analítico en condiciones normales de operación.

La precisión intermedia también conocida como tolerancia o fortaleza, expresa la variación dentro de un laboratorio, por ejemplo en diferentes días, con diferentes analistas, o con equipos diferentes dentro del mismo laboratorio. La repetibilidad se refiere a la utilización del procedimiento analítico en un laboratorio durante un período corto por el mismo analista con el mismo equipo.

La precisión de un procedimiento analítico se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea que permita calcular estadísticamente estimaciones validas de la desviación estándar o de la desviación estándar relativa (coeficiente de variación). **(17)**

La International Conference on Harmonisation (ICH) recomienda que se evalúe la repetibilidad utilizando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado para el procedimiento (es decir, tres concentraciones y tres determinaciones repetidas de cada concentración) o usando un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración de prueba. **(19)**

1.5.4 Especificidad

Es la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia resulta previsible, tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz.

En análisis cualitativos (pruebas de identificación) debe demostrarse la capacidad de distinguir compuestos de estructura estrechamente relacionada cuya presencia resulta probable.

En una valoración, la demostración de especificidad requiere evidencia de que el procedimiento no resulta afectado por la presencia de excipientes o impurezas.

Si no se dispone de estándares de impureza o de los productos de degradación, puede demostrarse la especificidad comparando los resultados de las pruebas de muestras que contengan impurezas o productos de degradación con los de un segundo procedimiento bien caracterizado por ejemplo un procedimiento farmacopeico u otro procedimiento validado.

Cuando se utilizan procedimientos cromatográficos, deberán presentarse cromatogramas representativos para demostrar el grado de selectividad y los picos deberán identificarse adecuadamente. **(17)**

1.5.5 Límite de Detección

El límite de detección es una característica de las pruebas de límite. Es la cantidad mínima del analito que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas. Las pruebas de límite simplemente comprueban que la cantidad del analito se encuentra por encima o por debajo de un nivel determinado. El límite de detección se expresa habitualmente como concentración del analito, por ejemplo, porcentaje, partes por billón, etc. **(17)**

1.5.6. Límite de Cuantificación

El límite de cuantificación es una característica de las valoraciones cuantitativas de los compuestos que se encuentran en baja concentración en

la matriz de una muestra. Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas. Se expresa habitualmente en concentración de analito (por ejemplo, porcentaje, partes por billón) en la muestra. (17)

1.5.7 Linealidad e Intervalo

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración de analito en muestras dentro de un intervalo dado. La linealidad se refiere a la linealidad de la relación entre la concentración y la medida de valoración.

El intervalo de un procedimiento analítico es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el procedimiento según se describe por escrito. El intervalo se expresa normalmente en las mismas unidades que los resultados de la prueba (por ejemplo, porcentaje, partes por billón) obtenidos mediante el procedimiento analítico.

La linealidad debe establecerse en el intervalo completo del procedimiento analítico. Debería establecerse inicialmente mediante examen visual de un gráfico de señales en función de la concentración de analito del contenido. Si parece existir una relación lineal, los resultados de la prueba deberían establecerse mediante métodos estadísticos adecuados, (por ejemplo mediante el cálculo de una línea de regresión por el método de los cuadrados mínimos).

El intervalo del procedimiento se valida verificando que el mismo proporciona precisión, exactitud, y linealidad aceptables cuando se aplica a muestras que contiene el analito en los extremos del intervalo, al igual que dentro del intervalo. **(17)**

La International Conference on Harmonisation (ICH) recomienda que, para establecer la linealidad, se utilicen normalmente un mínimo de cinco concentraciones.

Para pruebas de Disolución se recomienda $\pm 20\%$ por encima del intervalo especificado (por ejemplo, si los criterios de aceptación (Q) de un producto de liberación controlada cubren una región de 30%, después de 1 hora, y hasta 90%, después de 24 horas, el intervalo validado sería de 10% a 110% de la cantidad declarada). **(19)**

1.5.8 Robustez

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para no ser afectado por variaciones pequeñas, aunque deliberadas, en los parámetros del procedimiento indicado y provee una indicación de su aptitud durante condiciones normales de uso. La robustez puede determinarse durante la etapa de desarrollo del método analítico. **(17)**.

1.6 Aptitud del Sistema

Las pruebas de aptitud del sistema son una parte integral de los métodos de cromatografía líquida. Se emplean para verificar que el sistema cromatográfico sea adecuado para el análisis que se pretende efectuar.

Las pruebas se basan en el concepto de que el equipo, los sistemas electrónicos, las operaciones analíticas y las muestras analizadas constituyen un sistema integral que se puede evaluar como tal. **(17)**

El método analítico disponible para la cuantificación del porcentaje disuelto de Silimarina; se basa en la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución cuya metodología analítica viene descrita por casa matriz; sin embargo debido a la complejidad de la muestra por tratarse de un producto natural, los largos tiempos de retención y la gran variabilidad observada en la ejecución de dicho procedimiento que genera grandes desviaciones en la precisión de los resultados, se hace necesario proponer una optimización y validación del método analítico vigente para garantizar con evidencia documentada que el mismo cumple con los requisitos para las aplicaciones analíticas propuesta.

2.- OBJETIVOS

2.1- Objetivo general

Optimizar y validar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación del porcentaje disuelto de silimarina presente en las cápsulas de un producto farmacéutico nacional.

2.2– Objetivos específicos

- Optimizar la metodología por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), empleando la metodología de referencia.
- Validar la metodología por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) optimizada.
- Aplicar la metodología por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) optimizada para el ensayo de disolución de silimarina cápsulas.

3.- METODOLOGIA

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Equipos

Para la optimización, validación y aplicación del método analítico se empleó un Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC) marca Waters provisto de un inyector automático, sistema de bomba cuaternario 2695, detector de absorbancia U.V 2487 Dual, acoplado a una computadora HP con Software Empower 2 para controlar el sistema cromatográfico y procesamiento de datos y una impresora HP. (Cienvar, Caracas-Venezuela).

Para los ensayos de disolución se emplearon dos (2) equipos disolutores marca Hanson Research, modelo SR8 Plus y Vision Classic 6 (Cienvar, Caracas-Venezuela).

Para las pesadas de reactivo, muestras y patrones se utilizaron dos (2) balanzas. Una balanza electrónica, marca Mettler Toledo, modelo xs205 con un rango de trabajo de (0 – 220) g, con una resolución de 0,1mg y la otra una balanza digital, marca Ohaus, modelo Adventurer A210 con un rango de trabajo de (0 – 210) g, con una resolución de 0,1mg (Cenatec, Caracas-Venezuela).

Para el ajuste del pH del medio de disolución y la fase móvil se empleó un pH metro digital Metrohm modelo 827 Lab.

Para la disolución del patrón se utilizó el equipo Ultrasonido modelo Branson 8510.

3.1.2 Patrones de Referencia

Se dispuso de cantidad suficiente del patrón principal de Silibinina A y B, sin embargo de los patrones de Silicristina, Silidianina e Isosilibinina A y B se dispuso de cantidades reducidas para fines de identificación.

- Silibinina A y B Lote: 960212-4 / Fh, Potencia: 93,2%, expiración 15 Septiembre 2015 (MADAUS, Colonia – Alemania)
- Silicristina Lote: 99022-2 / Fh, expiración 21 Marzo 2016 (MADAUS, Colonia - Alemania)
- Silidianina Lote: 840705-4 / Fh, expiración 21 Febrero 2016 (MADAUS, Colonia - Alemania)
- Isosilibinina A y B Lote: 01.015-345-1 / Euromed, expiración 27 Noviembre 2012 (MADAUS, Colonia - Alemania)

3.1.3 Muestra de Silimarina Cápsula

Las muestras evaluadas fueron obtenidas directamente de las muestras de retención de un Laboratorio Nacional Lote: 1111033 Fecha expiración: Noviembre 2014.

3.1.4 Reactivos y Solventes

Grado HPLC: Metanol y Acetonitrilo (Merck), grado reactivo: Fosfato de potasio monobásico (Merck), Hidróxido de sodio (Merck), Ácido fosfórico (J. T. Baker) y agua grado HPLC.

3.1.5 Columna

Se utilizó una columna de fase reversa Lichrospher 100 RP18 (Merck), 25 cm de longitud, 4,0 mm de diámetro interno y tamaño de partícula 10 μ .

3.1.6 Condiciones Cromatográficas

Inicialmente se evaluaron las condiciones cromatográficas descritas en la metodología analítica proveniente de casa matriz, las fases móviles utilizadas fueron: Fase A (FA): ácido fosfórico: metanol: agua purificada (5:35:65 v/v) y Fase B (FB): ácido fosfórico: metanol: agua purificada (5:50:50 v/v), filtradas previamente por vacío a través de una membrana filtrante de 0,2 micras, se empleó un gradiente de elución binario: (0 – 35) minutos 100%FA : 0%FB; (35 – 40) minutos 0%FA : 100%FB; (40 – 41) minutos 100%FA : 0%FB; (41 – 60) minutos 100%FA : 0%FB, a un flujo de 0,8 mL/min, temperatura de 30°C, longitud de onda de 288 nm y un volumen de inyección de 50 µL. Para la optimización de la metodología analítica se modificaron los siguientes parámetros: pH y concentración de la fase acuosa, sistema de gradiente de elución, velocidad de flujo.

3.1.7 Preparación de las Soluciones de Estándar y Muestra

Durante la optimización y validación de la metodología analítica se utilizaron cuatro (4) patrones. Las soluciones madres de los patrones se prepararon por día de análisis, disolviendo cantidades conocidas en metanol. Las concentraciones empleadas fueron las siguientes: Silibinina A y B 0,2 mg/mL; Silicristina 0,5 mg/mL; Silidianina 0,5 mg/mL; Isosilibinina 0,5 mg/mL. Se tomó una alícuota de las soluciones madre de cada patrón y se llevo a volumen con el solvente (Solución Acido fosfórico 0,05M pH 3,0 – Metanol) (50:50), para obtener las siguientes concentraciones finales: Silibinina A y B 0,008 mg/mL; Silicristina 0,25 mg/mL; Silidianina 0,25 mg/mL; Isosilibinina 0,25 mg/mL. Los patrones fueron filtrados a través de filtro millipore 0,45µm y luego inyectados.

En relación a las muestras estas fueron tomadas directamente del vaso del disolutor y filtradas a través de papel de filtro Whatman N° 41 (8-12) μm .

3.2 Procedimiento

3.2.1 Optimización del Método Analítico

La optimización del método analítico para la determinación del porcentaje disuelto de silimarina se realizó partiendo de la metodología analítica de casa matriz la cual permite una separación y cuantificación de los compuestos de interés en un tiempo de corrida aproximadamente de 60 minutos. Para establecer las condiciones cromatográficas óptimas se realizaron diferentes ensayos variando el solvente y pH de la fase móvil, velocidad de flujo y gradiente de elución.

3.2.1.1 Optimización de la Fase Móvil

Se realizaron los ensayos partiendo de la composición química de la fase móvil (Fase móvil A y Fase móvil B) descrita por casa matriz; la diferencia entre ambas fases móviles radica en la proporción de agua purificada y metanol empleadas para su preparación, sin embargo la cantidad empleada de ácido fosfórico es la misma para ambas fases móviles, de acuerdo a esto se realizaron pruebas modificando la proporción de metanol en la fase móvil B variando así la fuerza del solvente (k'), conservando las condiciones cromatográficas de casa matriz en cuanto a velocidad de flujo, temperatura y volumen de inyección.

A fin de establecer la proporción de metanol para obtener una buena separación de los compuestos evaluados, se realizaron tres (3) variaciones de la proporción de metanol (fase orgánica), de la siguiente manera: N° 1 (50%FA : 50%FO); N° 2 (55%FA : 45%FO) y N° 3 (60%FA : 40%FO),

las fases móviles empleadas fueron: Fase Acuosa (FA): 1000mL agua purificada + 100mL ácido fosfórico y Fase Orgánica (FO): metanol. Se empleó un sistema isocrático a un flujo de 0,8 mL/min.

Una vez evaluada la proporción aproximada de metanol se utilizaron tres (3) sistemas de gradientes y modificaciones de la velocidad de flujo para optimizar los resultados obtenidos. Las fases móviles empleadas fueron: Fase Acuosa (FA): 1000mL agua purificada + 100mL ácido fosfórico y Fase Orgánica (FO): metanol. Los sistemas de gradientes evaluados fueron los siguientes: Sistema de gradiente N° 1: (0 – 20) minutos 60%FA : 40%FO; (21 – 60) minutos 55%FA : 45%FO, a una velocidad de flujo de 0,8 mL/min. Sistema de gradiente N° 2: (0 – 20) minutos 57%FA : 43%FO a un flujo de 0,5mL/min; (21 – 50) minutos 55%FA : 45%FO, a un flujo de 1,0 mL/min. Sistema de gradiente N° 3: (0 – 20) minutos 57%FA : 43%FO a un flujo de 0,5mL/min; (21 – 50) minutos 52%FA : 48%FO, a un flujo de 0,8 mL/min.

Aún y cuando se realizaron las pruebas antes descritas con la fase acuosa (1000 mL Agua Purificada + 100 mL Acido Fosfórico concentrado) la cual tiene un pH de 0,81 y una concentración de 0,75 Molar; se hizo necesario realizar ajustes en cuanto a la concentración de ácido fosfórico en la fase acuosa y el pH debido a que comprometía la eficiencia de la columna, el rango de pH recomendado por Merck para esta columna Lichrospher 100 RP18 10 μ (4,0 x 250) mm es de (2 - 7,5) razón por la cual se preparó una solución de Acido fosfórico 0,05 Molar cuyo pH sin ajustar es 1,72. Se realizaron pruebas evaluando el pH de la Solución de Acido fosfórico 0,05M a $3,0 \pm 0,01$ y pH $5,0 \pm 0,01$ empleando como Sistema de gradiente el N° 3

descrito anteriormente. El pH se ajustó con una Solución de Hidróxido de Sodio 5N.

De acuerdo con lo descrito por Regnault **(18)** para cambios en la selectividad (α) a veces es necesario sustituir un solvente orgánico por otro, en este caso se sustituyó el solvente metanol por acetonitrilo ya que por sus propiedades químicas tiene una selectividad diferente a la del metanol y de acuerdo con la revisión bibliográfica existen trabajos en los que se emplea el solvente acetonitrilo en la fase móvil.

Para determinar la proporción de acetonitrilo en la fase móvil equivalente a la utilizada con el metanol, se realizó la conversión empleando el nomograma de fuerza de solvente para HPLC (Figura 2).

Posterior al cambio del solvente de la fase orgánica de metanol a acetonitrilo se realizaron las pruebas empleando dos sistemas de gradientes de elución, los cuales se describen a continuación: Sistema de gradiente N° 4: (0 – 20) minutos 66%A : 34%B flujo de 0,5mL/min; (21 – 40) minutos 62%A : 38%B, flujo de 0,8 mL/min, usando como solvente A: Solución de ácido fosfórico 0,05 M pH 3,0; solvente B: Acetonitrilo. Sistema de gradiente N° 5: (0 – 20) minutos 66%A : 17%B : 17%C flujo de 0,5mL/min; (21 – 40) minutos 62%A : 19%B : 19%C flujo de 0,8 mL/min, como solvente A: Solución de ácido fosfórico 0,05 M pH 3,0; solvente B: Metanol; solvente C: Acetonitrilo.

Para la selección del sistema de gradiente de elución más adecuado se consideró la resolución, número de platos teóricos y el tiempo de elución de todos los componentes.

3.2.2 Validación

Una vez optimizada la metodología analítica se procedió a la validación para confirmar y documentar que las características de desempeño del procedimiento cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.

Las características de desempeño analítico consideradas en la validación fueron las siguientes: especificidad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión, precisión intermedia y exactitud.

3.2.2.1 Validación del método cromatográfico

Las condiciones experimentales de trabajo definitiva fueron las siguientes: columna: Lichrospher 100 RP18 10 μ (4,0 x 250) mm; volumen de inyección: 50 μ L; temperatura: 30°C; presión para el flujo de 0,5 mL/min = 715psi y para el flujo de 0,8 mL/min = 1078 psi; tiempo de corrida: 45 minutos; longitud de onda: 288 nm; Gradiente de elución: (0 – 20) minutos 57%A : 43%B flujo de 0,5mL/min; (21 – 40) minutos 52%A : 48%B, flujo de 0,8 mL/min; (41 – 45) minutos 57%A : 43%B, flujo de 0,5 mL/min, empleando como solvente A: Solución de ácido fosfórico 0,05 M pH 3,0; solvente B: Metanol.

El proceso de validación se realizó según lo descrito en la USP 35 y el Procedimiento Interno (Validación de Procedimientos Analíticos GCV000046-1.0) del Laboratorio donde se realizó el presente trabajo.

3.2.2.1.1 Especificidad

La especificidad consistió en realizar inyecciones del Blanco A (Solución de Buffer pH 7,5), Blanco B (Solución Acido fosfórico 0,05M pH 3,0 – Metanol) (50:50), placebo (preparado a partir de todos los excipientes de la formulación a excepción del principio activo), muestra y patrón para

identificar las respuesta de estos aplicando el procedimiento analítico y respetando las concentraciones finales indicadas en el mismo.

El procedimiento analítico cumple con los requerimientos de especificidad si es capaz de separar la sustancia de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes; y si además, los productos de degradación y/o sustancias relacionadas y otros componentes no interfieren con la cuantificación de la sustancia de interés. **(17)**

3.2.2.1.2. Adecuación del Sistema

Se realizaron cinco (5) inyecciones consecutivas del estándar al 100% de la concentración de trabajo y según la USP 35 el valor del porcentaje de Desviación Estándar Relativa (%RSD) de las cinco inyecciones debe ser menor o igual a 2,0 %. **(17)**

3.2.2.1.3 Linealidad

Se realizaron mediciones por duplicado de seis (6) soluciones estándar de Silibinina A y B al 40%, 60%, 80%, 100%, 120% y 140% de concentración en base al valor declarado del producto terminado.

Se seleccionó una concentración estándar de trabajo de 0,008mg/mL de silimarina la cual representa el 100%.

Para la solución estándar al 40% los valores de absorbancia se encontraron alrededor de 0,006 UA y para un 140% alrededor de 0,018 UA por lo tanto no se producen desviaciones de la ley Lambert Beer, adicionalmente se cumple con el rango de trabajo adecuado para pruebas de disolución; según lo establecido en la USP 35 se debe encontrar a $\pm 20\%$ del valor especificado (Q).

Se preparó una solución estándar madre de 0,194mg/mL con una potencia de 93,2% y se disolvió con metanol en un ultrasonido por 20 minutos. Se tomaron alícuotas de la solución estándar madre para obtener las siguientes concentraciones: 0,00325mg/mL (40%); 0,00488mg/mL (60%); 0,00650 mg/mL (80%); 0,00813mg/mL (100%); 0,00975 mg/mL (120%); 0.0114 mg/mL (140%) y utilizando como solvente Solución Acido fosfórico 0,05M pH 3,0 – Metanol) (50:50).

Cada una de las inyecciones se inyectó por duplicado y la evaluación de la linealidad del método se realizó por área de los picos cromatográficos en estudio, mediante el cálculo de una línea de regresión por el método de los cuadrados mínimos, reportando el coeficiente de correlación (r), la intersección con el eje de ordenadas, la pendiente de la línea de regresión.

3.2.2.1.4 Precisión

La precisión de la metodología analítica se realizó en seis (6) determinaciones de una muestra homogénea al 100 % de la concentración de trabajo y fue realizada a nivel de repetibilidad y precisión intermedia.

La determinación de la precisión intermedia consistió en evaluar los resultados obtenidos para el parámetro de precisión determinado en dos series de experimentos realizados por dos analistas, en diferentes días y equipo.

3.2.2.1.5 Exactitud

Se realizó sobre tres (3) preparaciones de muestras por triplicado a las concentraciones aproximadas de 80%, 100% y 120% del analito en base al valor declarado. Los resultados fueron evaluados mediante el Porcentaje de analito recuperado por el método analítico.

3.2.2.1.6 Límite de detección y Límite de cuantificación

Aún y cuando la USP 35 y la International Conference on Harmonisation (ICH) no incluyen la determinación de los parámetros de límite de detección y límite de cuantificación para métodos de disolución, en este caso se estimaron utilizando el enfoque basado en la desviación estándar de la respuesta del blanco y la pendiente de la curva de calibración. **(17)**

3.2.2.1.6.1 Límite de detección

El límite de detección (LOD) puede ser expresado como: **$LOD: 3,3 \sigma / S$**

donde: σ es la desviación estándar de las respuestas, **S** es la pendiente de la curva de calibración (Linealidad). La pendiente **S** se estimó de la curva de calibración del compuesto de interés y la estimación de σ se basó en la desviación estándar del blanco.

Para ello se realizó la medición de la magnitud de la respuesta del ruido de fondo analítico analizando seis (6) determinaciones de muestras placebo y calculando la desviación estándar de sus respuestas. **(19)**

3.2.2.1.6.2 Límite de Cuantificación

El límite de cuantificación (LOQ) puede ser expresado como: **$LOQ: 10 \sigma / S$**

donde: σ es la desviación estándar de las respuestas, **S** es la pendiente de la curva de calibración (Linealidad).. La pendiente **S** se estimó de la curva de calibración del compuesto de interés y la estimación de σ se basó en la desviación estándar del blanco.

Para ello se realizó la medición de la magnitud de la respuesta del ruido de fondo analítico analizando seis (6) determinaciones de muestras placebo y calculando la desviación estándar de sus respuestas. **(19)**

3.2.2.1.7 Fortaleza

Para la determinación de la fortaleza de la metodología analítica se evaluaron los resultados obtenidos en la precisión intermedia ya que expresa la variación dentro de un laboratorio y para ello, el método fue ejecutado por dos analistas en días y equipos diferentes.

3.2.2.1.8 Validación del Método de Disolución

Las condiciones experimentales del ensayo de disolución para la Silimarina cápsula, de acuerdo a lo establecido a la metodología analítica de casa matriz, son las siguientes: medio de Disolución: Buffer fosfato pH 7,5; volumen del medio: 900mL; temperatura: $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$; aparato: N° 2 (paletas); velocidad de agitación: 100 r.p.m; tiempo: (15 y 45) minutos; límite de aceptación: A los 15 minutos: Mínimo 60% ; A los 45 minutos: Mínimo 80%

Preparación del medio de disolución (Solución de Buffer pH 7,5)

Para ello se pesaron 40,8 gramos de hidrógeno fosfato de potasio KH_2PO_4 y 9,12 g de Hidróxido de sodio se transfirieron a un beaker de 4000 mL, se disolvieron con 2000 mL de agua purificada, se ajustó pH con una solución de hidróxido de sodio 0,2N y se transfirió a una fiola de 6L, llevando a volumen con agua purificada empleando para ello un cilindro graduado. Se desgasificó al vacío por espacio de 15 minutos. pH inicial: 7,25 pH final: 7,53

Preparación de la Muestra

Para ello se agregaron 900mL del medio de disolución a cada vaso del disolutor y se temperó a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Al alcanzar la temperatura, se colocó una (1) cápsula, previamente pesada, en cada vaso y se comenzó la agitación de las paletas. Al cabo de 15 minutos se tomó exactamente 5 mL

de muestra de cada vaso y se filtró por papel de filtro Whatman N° 41. Se repuso en cada uno de los vasos los 5 mL de Buffer pH 7,5 a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se continuó la agitación hasta completar los 45 minutos, se tomó 5 mL de muestra de cada vaso y se filtro por papel de filtro Whatman N° 41.

Las muestras tomadas se analizaron directamente sin diluir, inyectando 50 μ L y aplicando las condiciones de validación del método cromatográfico.

4.- RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Desarrollo del método analítico

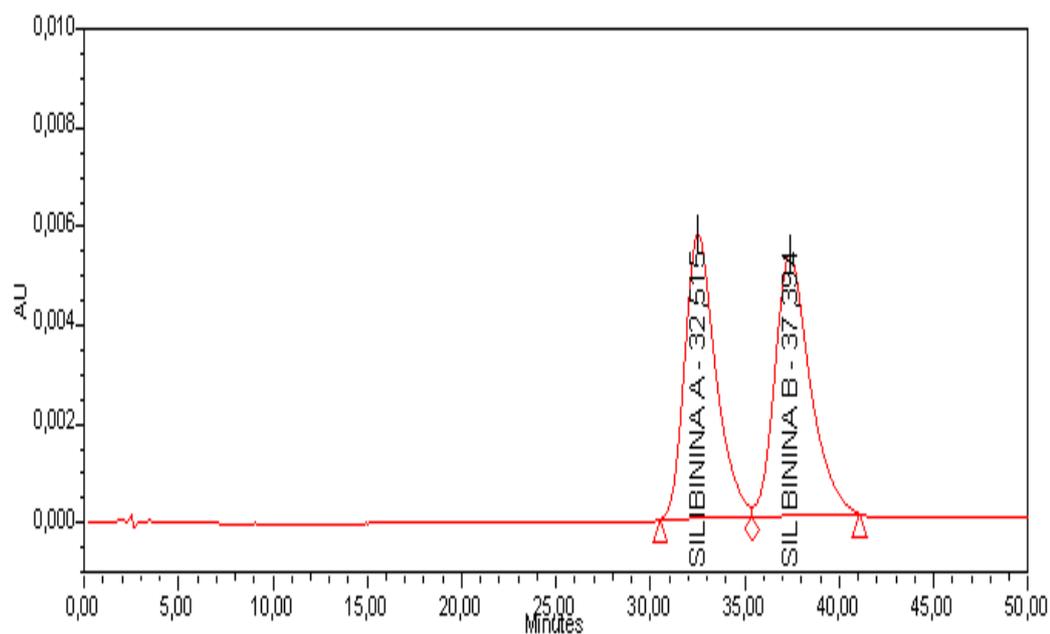
La optimización del método analítico para la cuantificación del porcentaje disuelto de Silimarina cápsulas se realizó empleando como guía la metodología analítica descrita por casa matriz. Se realizaron diferentes pruebas en el sistema de gradiente, pH y concentración de la fase móvil y velocidad de flujo.

La longitud de onda evaluada para el análisis fué 288nm ya que es la indicada por casa matriz y de acuerdo con la revisión bibliográfica existen trabajos en los que se emplea esta longitud de onda.

4.1.1 Optimización de la Fase Móvil

Para seleccionar la proporción de fase acuosa (Acido fosfórico + Agua) y fase orgánica (metanol) requerida para optimizar la separación de los compuestos de interés se estudiaron los cromatogramas del método analítico de casa matriz (Ver Figura 3).

Patrón Silibinina A y B



Muestra de disolución

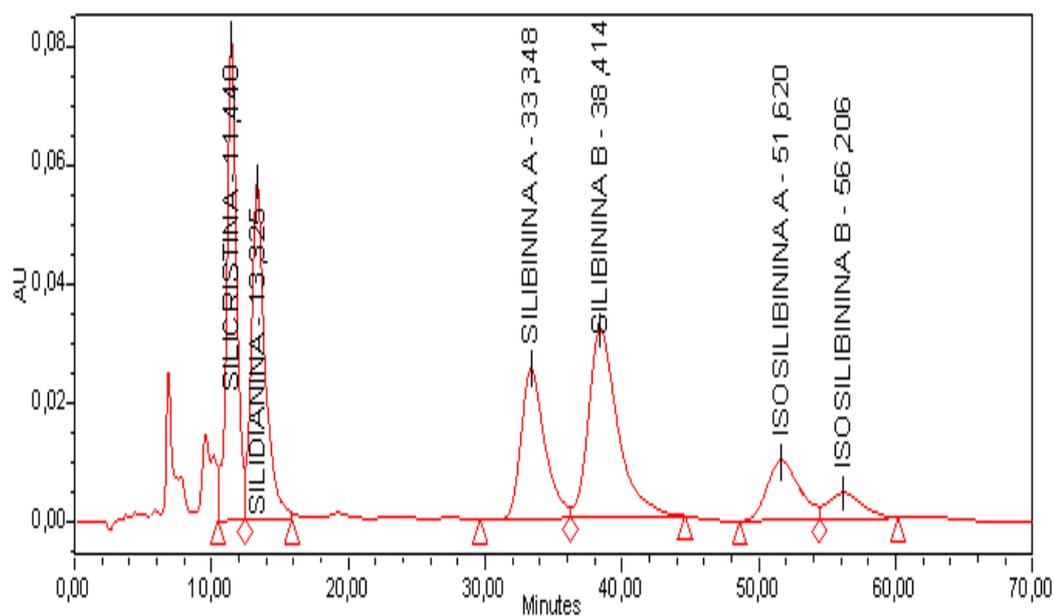


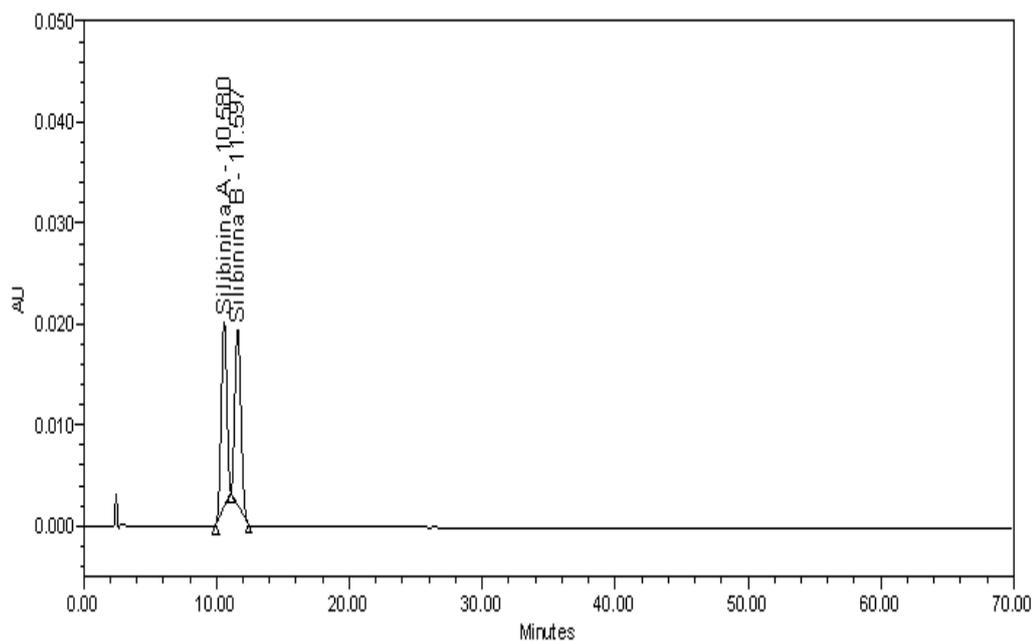
Figura 3. Cromatogramas del método analítico de casa matriz: patrón silibinina A y B y muestra de disolución.

Se pensó en reducir la fuerza del solvente en la fase móvil, disminuyendo el porcentaje de fase orgánica para incrementar el valor de k' y por ende la selectividad. Se evaluó bajo un sistema isocrático las siguientes proporciones de metanol en la fase móvil: 50%; 45%; 40% inyectando la solución de patrón de silibinina A y B y luego la muestra.

Las Figuras 4A; 4B; 4C muestran los cromatogramas obtenidos empleando una velocidad de flujo de 0,8 mL/min. En el cromatograma del patrón de silibinina A y B y de la muestra indicado en la Figura 4A, se observó que los picos no están bien definidos, ni resueltos ya que los compuestos de interés eluyen muy rápido debido a que existe poca interacción entre la fase estacionaria y la muestra al trabajar con esta proporción de metanol (50%).

En los cromatogramas mostrados en la Figura 4B los resultados obtenidos no fueron satisfactorios para el pico de silicristina ya que se observa la presencia de un pico que afecta la integración del mismo y en el caso de los cromatogramas mostrados en la Figura 4C aún y cuando se observa una buena resolución de los picos silibinina A y silibinina B y de los picos isosilibina A e isosilibina B el tiempo de elución de los compuestos aumenta significativamente cuando se reduce la fuerza del solvente, sin embargo de acuerdo con estas pruebas realizadas se puede deducir que el porcentaje de metanol requerido para separar los picos de silicristina y silidianina oscila entre (40 y 44)% y para la separación de los otros compuestos restantes la proporción de metanol oscila entre (45 y 48)%.

Patrón Silibinina A y B



Muestra de disolución

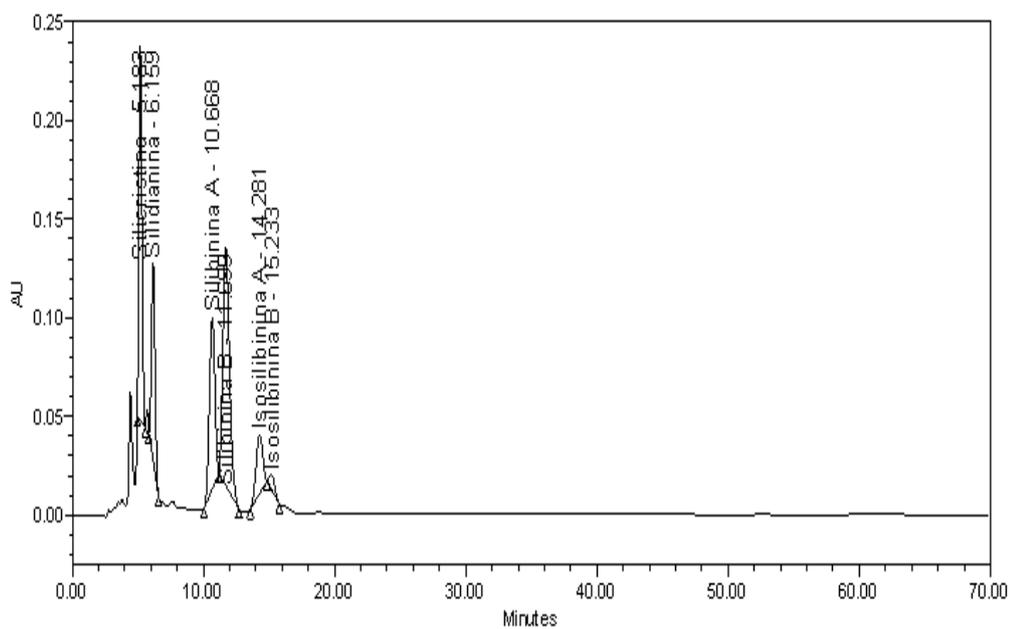
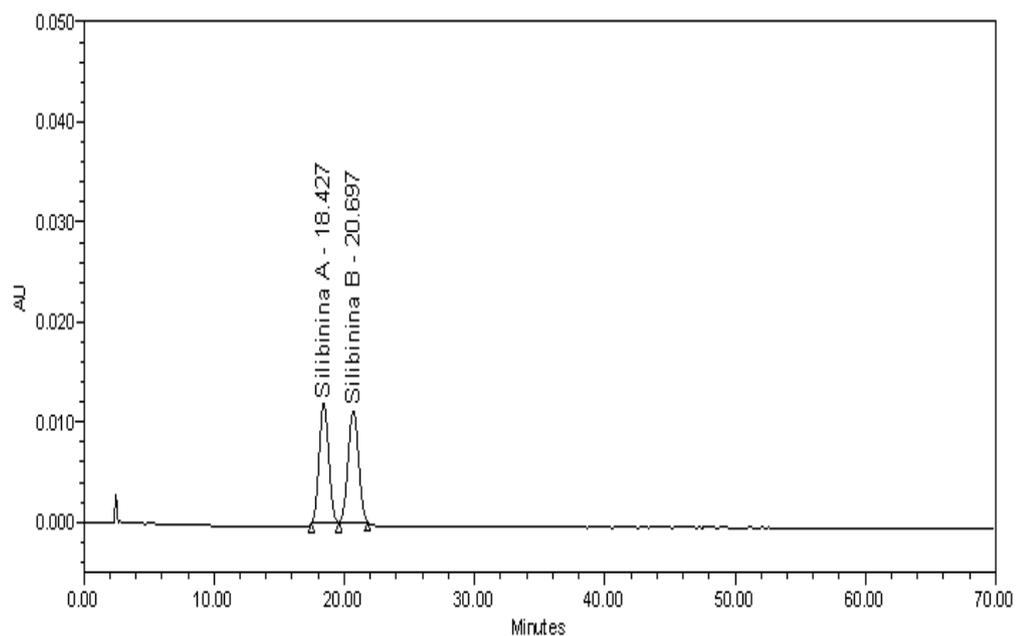


Figura 4A. Cromatogramas del ensayo para la proporción 50% metanol en la fase móvil: patrón silibinina A y B, y muestra de disolución.

Patrón Silibinina A y B



Muestra de disolución

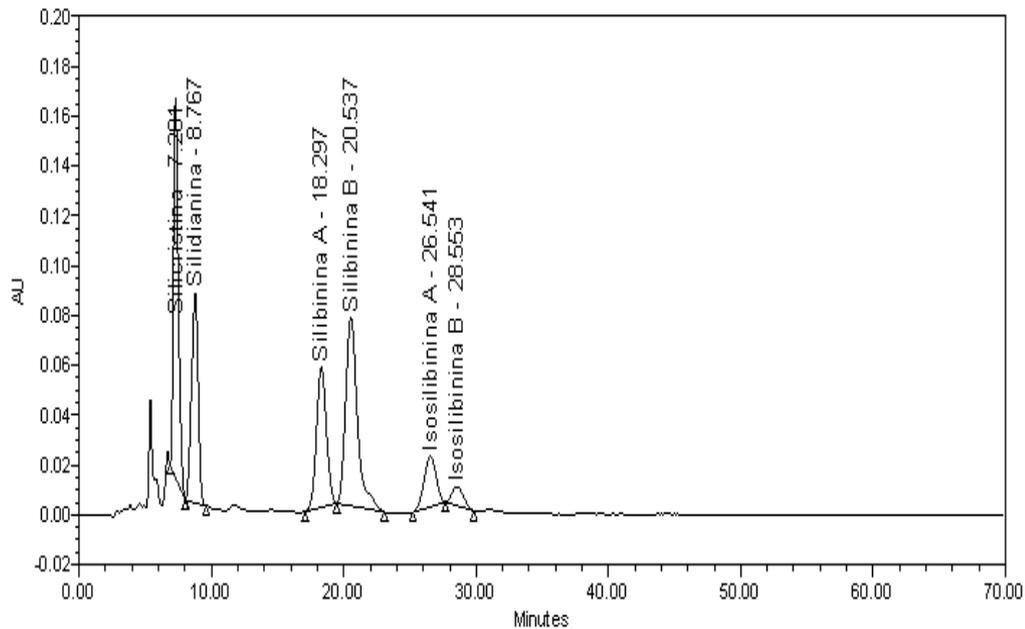
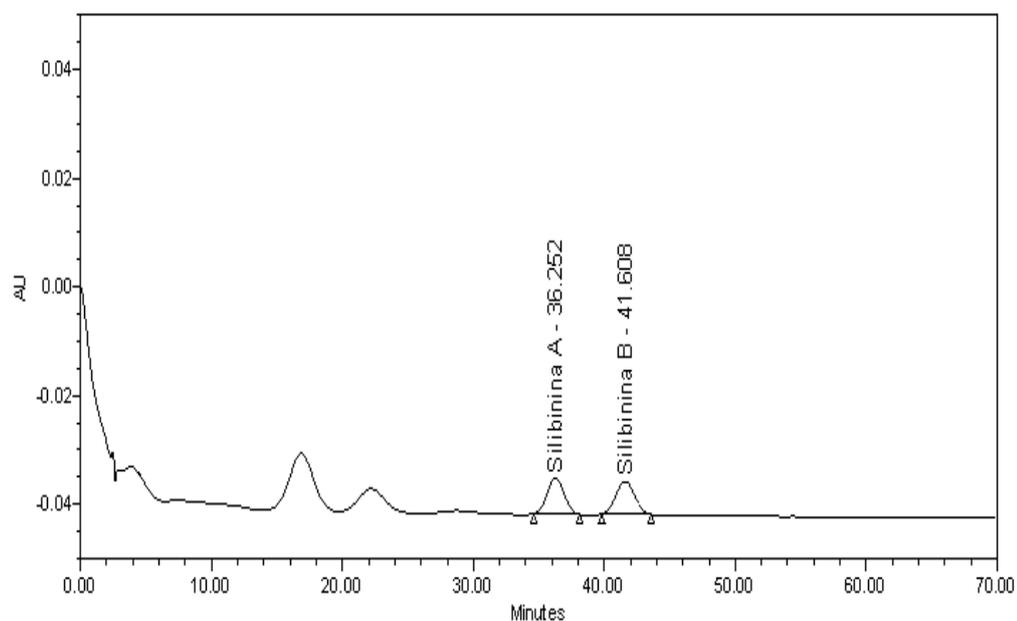


Figura 4B. Cromatogramas del ensayo para la proporción 45% metanol en la fase móvil: patrón silibinina A y B y muestra de disolución.

Patrón Silibinina A y B



Muestra de disolución

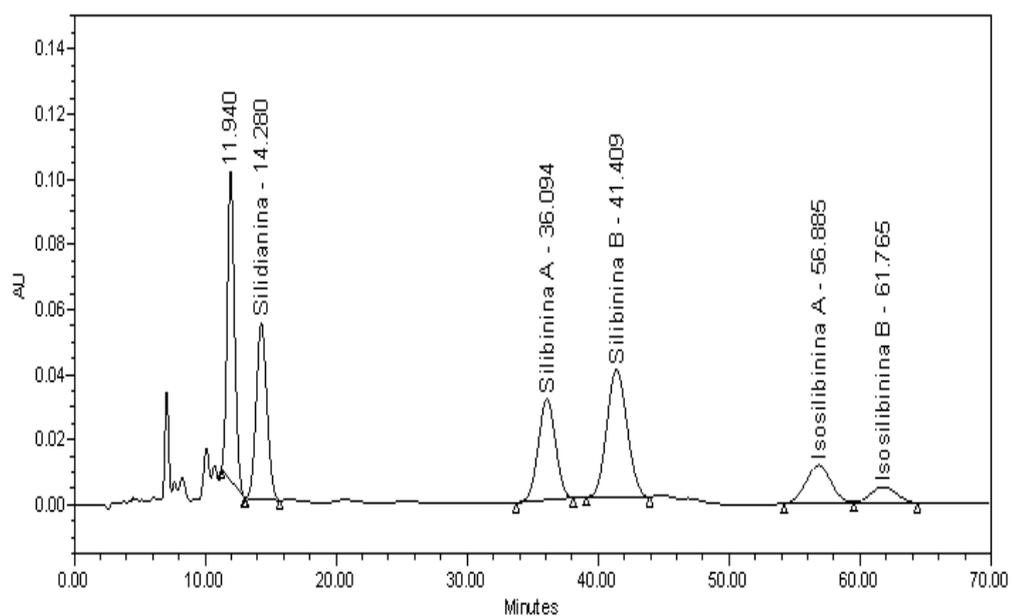


Figura 4C. Cromatogramas del ensayo para la proporción 40% metanol en la fase móvil: patrón silibinina A y B y muestra de disolución.

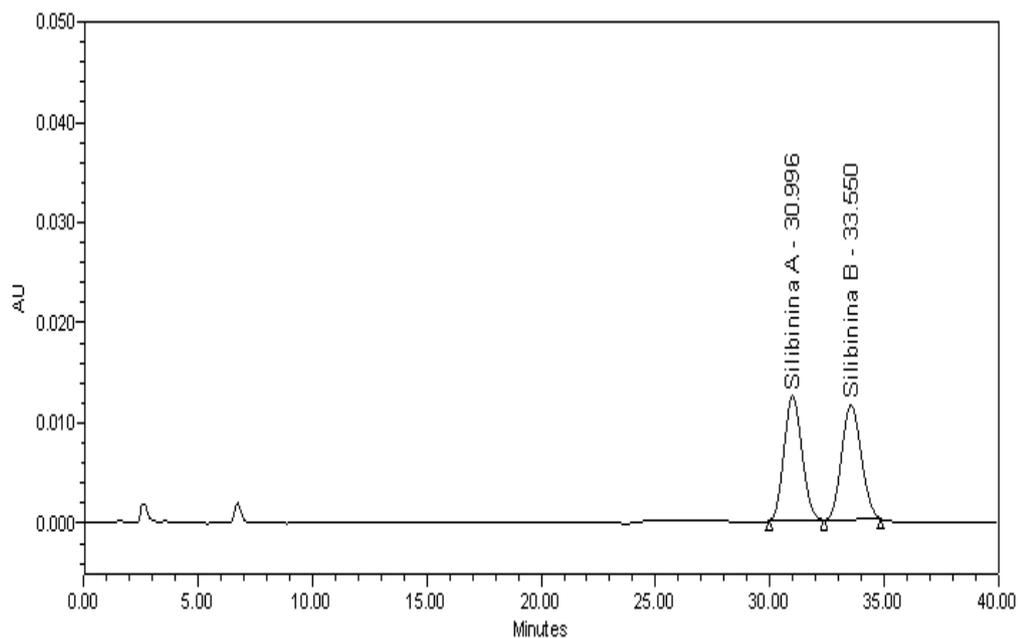
Para mejorar la separación de los picos obtenidos en el ensayo de la evaluación de la proporción de metanol bajo un sistema isocrático, se cambió a un sistema de gradiente modificando las proporciones de las fases móviles y velocidad de flujo. Las Figuras 5A; 5B; 5C; muestran los cromatogramas obtenidos. En los cromatogramas del patrón de silibinina A y B y de la muestra indicados en la Figura 5A empleando el Sistema de gradiente N° 1, se observó que los picos de silibinina A y silibinina B tienen buena resolución al igual que los picos de isosilibinina A e isosilibinina B, sin embargo el pico de la silicristina no está bien definido ya que eluyen otros picos que interfieren en su integración y los tiempos de retención de cada uno de los compuestos se ve incrementado, por lo que se pensó en aumentar la fuerza del solvente y disminuir la velocidad de flujo para el tiempo de 0-20 minutos y de esta manera aumentar la resolución del pico de la silicristina, para el tiempo de 21-50 minutos se mantuvo la proporción de metanol a la empleada en la Figura 5A, sin embargo se aumentó la velocidad de flujo a 1mL/min observando una disminución de los tiempos de elución de los picos de silibinina A, silibinina B, isosilibinina A e isosilibinina B (Ver Figura 5B). Adicionalmente; se estudió una fase móvil con los mismos componentes empleados anteriormente pero esta vez aumentando la proporción de metanol en el tiempo de 21-50 minutos y disminución de la velocidad de flujo (0,8mL/min), la resolución y los tiempos de elución obtenidos para los picos de silibinina A y silibinina B fue similar a la del Sistema de gradiente N° 2, pero con un aumento en el número de platos teóricos. (Ver Figura 5C).

Tabla II. Comparación de la resolución, tiempo de elución y número de platos teóricos de los cromatogramas obtenidos de los sistemas de gradientes 1, 2 y 3.

Sistema de Gradiente	Resolución	Tiempo de elución (min.)	Número de platos teóricos
1	Silibinina A y B = 1,6	Silibinina A= 31,00 Silibinina B= 33,55	Silibinina A=7275 Silibinina B=6985
2	Silibinina A y B = 1,5	Silibinina A= 28,33 Silibinina B= 30,83	Silibinina A= 8574 Silibinina B= 7965
3	Silibinina A y B = 1,5	Silibinina A= 28,91 Silibinina B= 30,59	Silibinina A=12029 Silibinina B=10866

La Tabla II compara la resolución, tiempo de elución y número de platos teóricos de los cromatogramas obtenidos empleando los Sistemas de gradientes 1, 2 y 3.

Patrón Silibinina A y B



Muestra de disolución

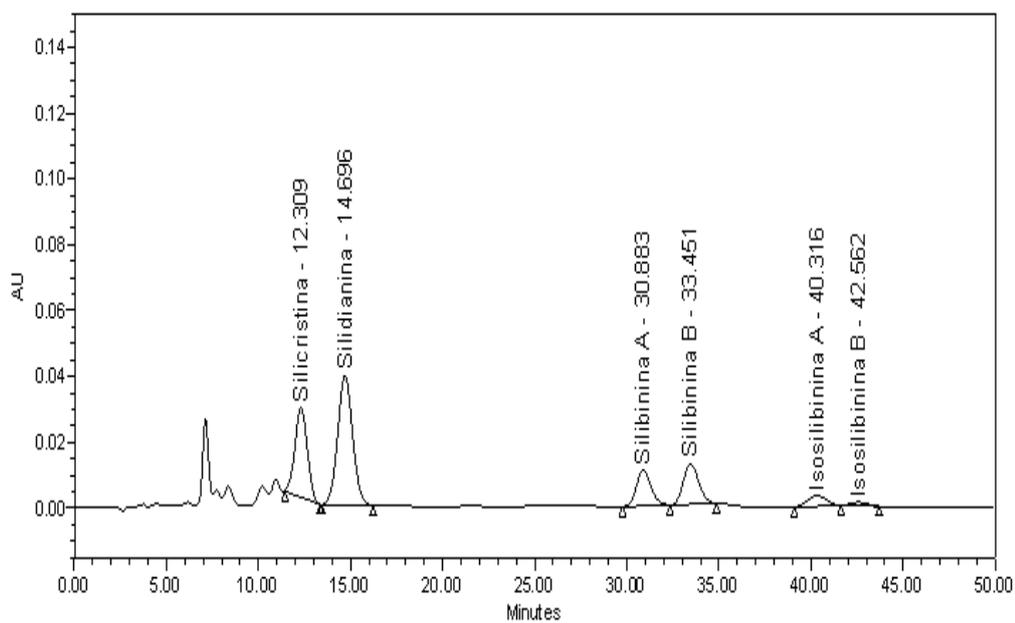
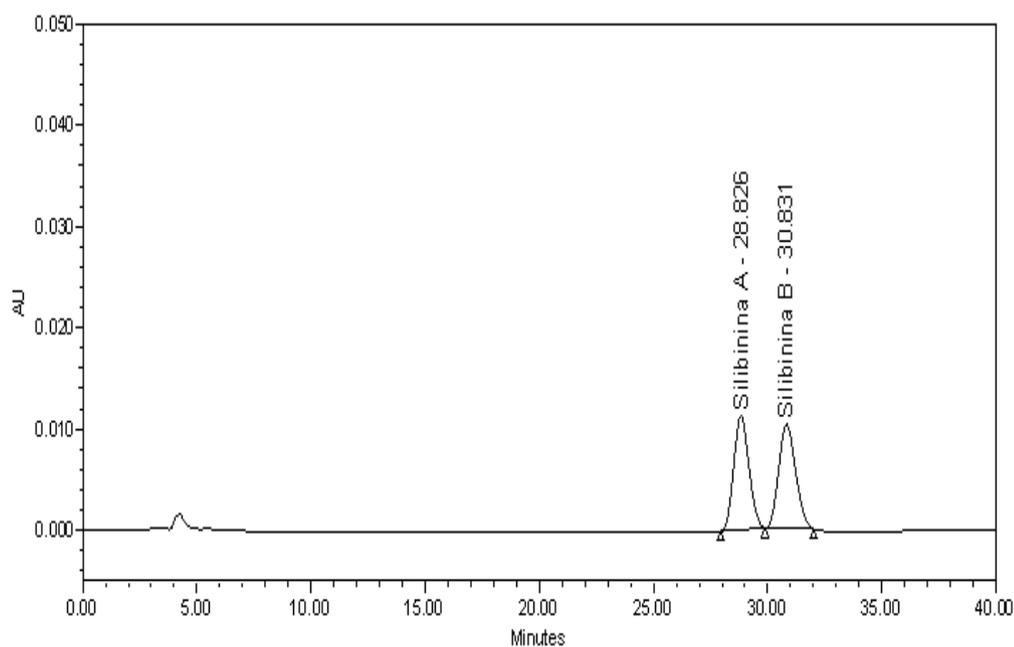


Figura 5A. Cromatogramas del ensayo evaluando Sistema de gradiente N° 1 patrón silibinina A y B y muestra de disolución.

Patrón Silibinina A y B



Muestra de disolución

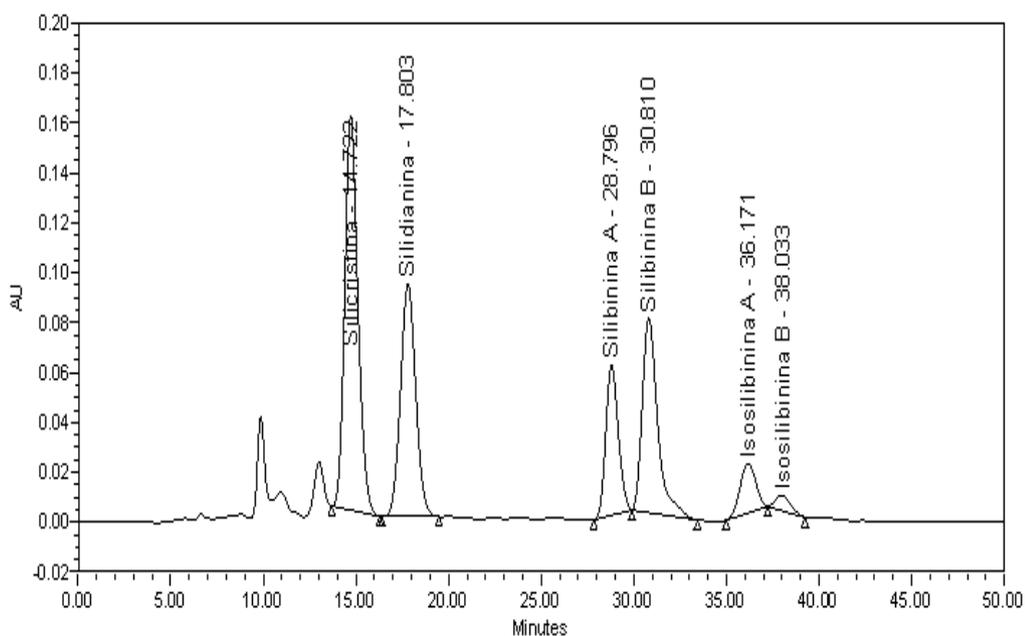
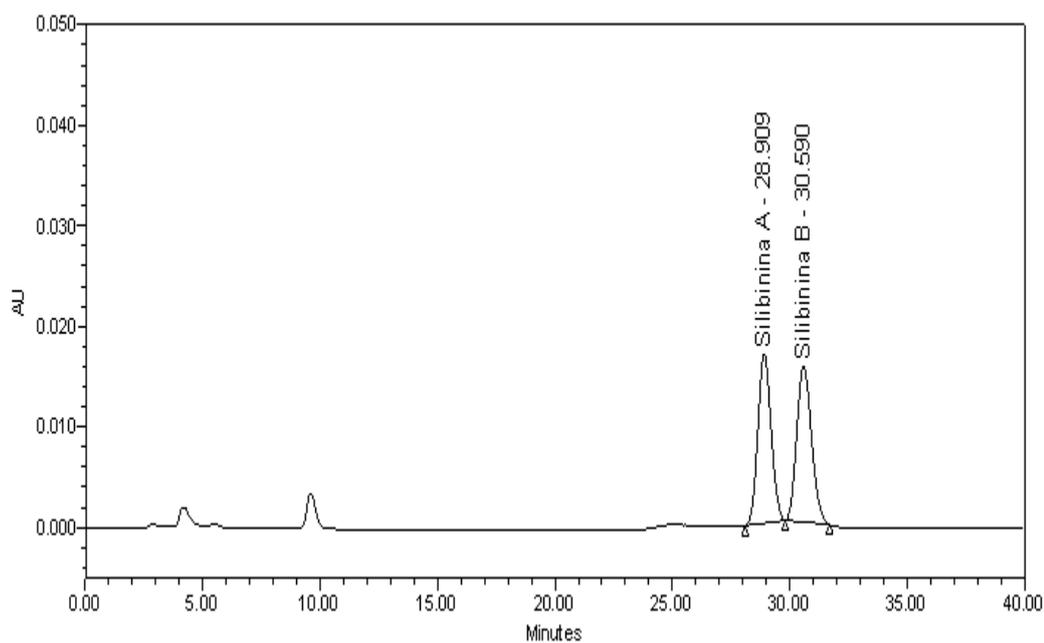


Figura 5B. Cromatogramas del ensayo evaluando Sistema de gradiente N° 2 patrón silibinina A y B y muestra de disolución.

Patrón Silibinina A y B



Muestra de disolución

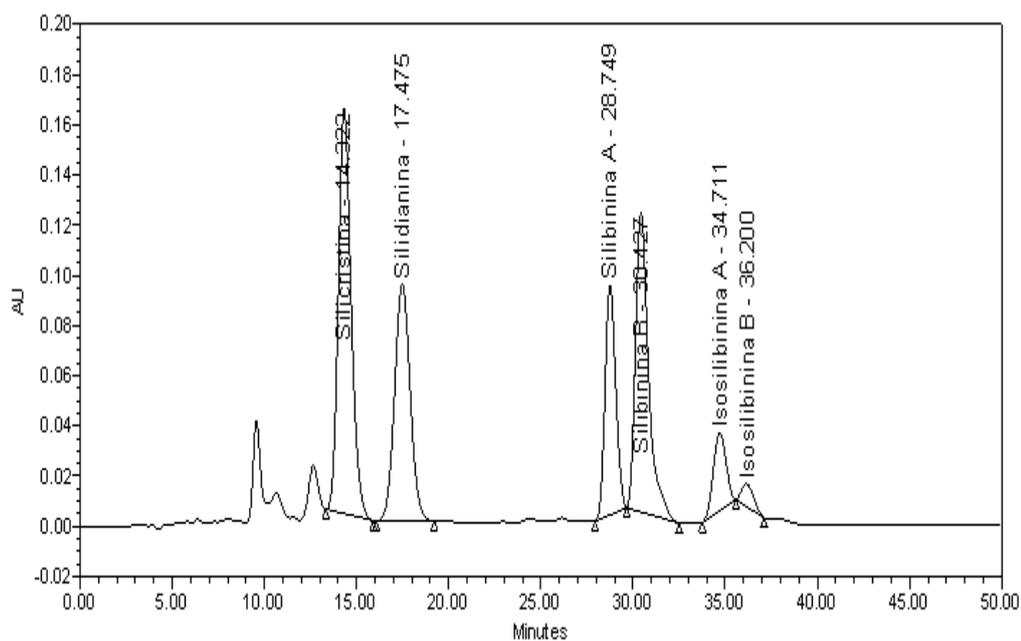
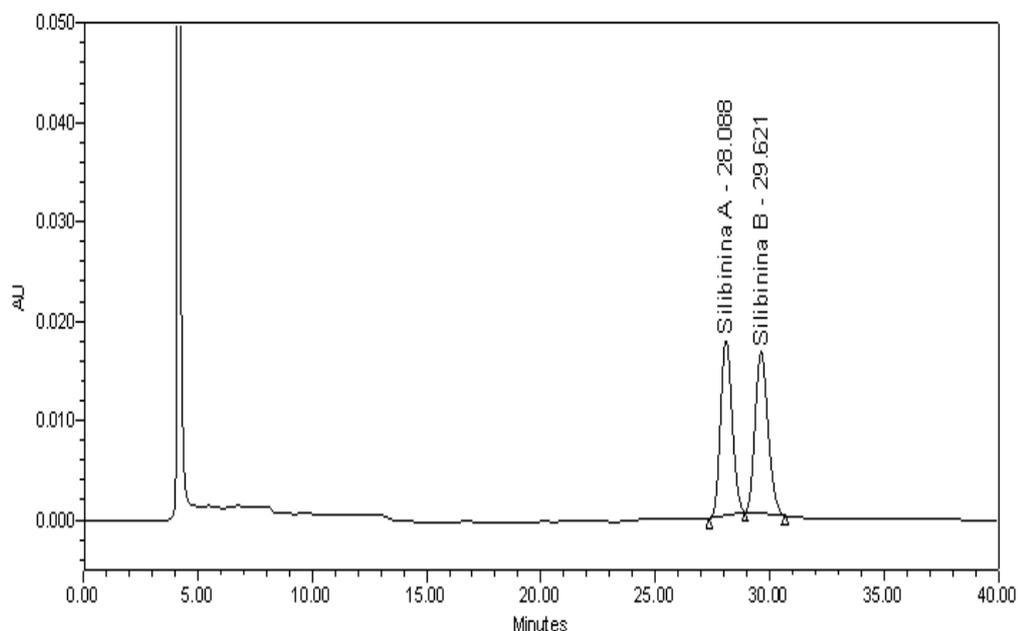


Figura 5C. Cromatogramas del ensayo evaluando Sistema de gradiente N° 3 patrón silibinina A y B y muestra de disolución.

Para la selección del pH óptimo de la fase acuosa se evaluó el pH $3,0 \pm 0,01$ y pH $5,0 \pm 0,01$, empleando el Sistema de gradiente N° 3. En los cromatogramas obtenidos del patrón de silibinina A y B y de la muestra para el pH 5,0 mostrados en la Figura 6A, se observa una disminución en la resolución del pico de la silicristina, situación que no se evidenció cuando se realizó el ensayo a pH 3,0 en donde todos los picos están resueltos mostrados en la Figura 6B. En los dos casos la resolución y los tiempos de elución son similares, por lo tanto se consideró como pH óptimo $3,0 \pm 0,01$ y de acuerdo con la bibliografía consultada el pH de trabajo reportado es de 2,6 para la mayoría de las fases acuosas para la determinación de la silimarina.

Patrón Silibinina A y B



Muestra de disolución

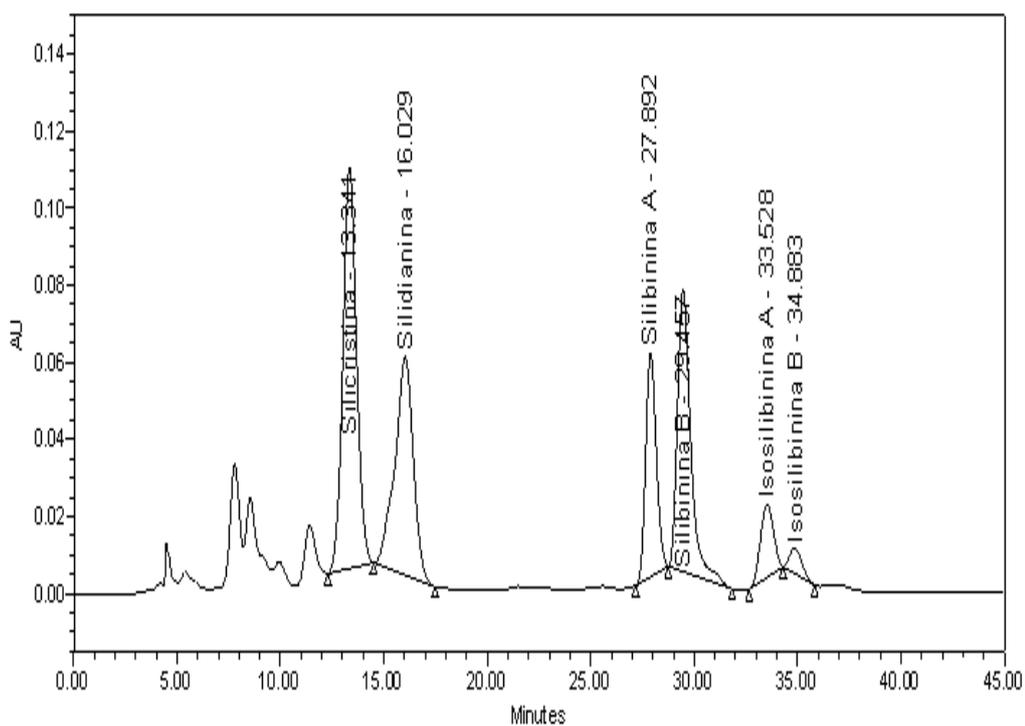
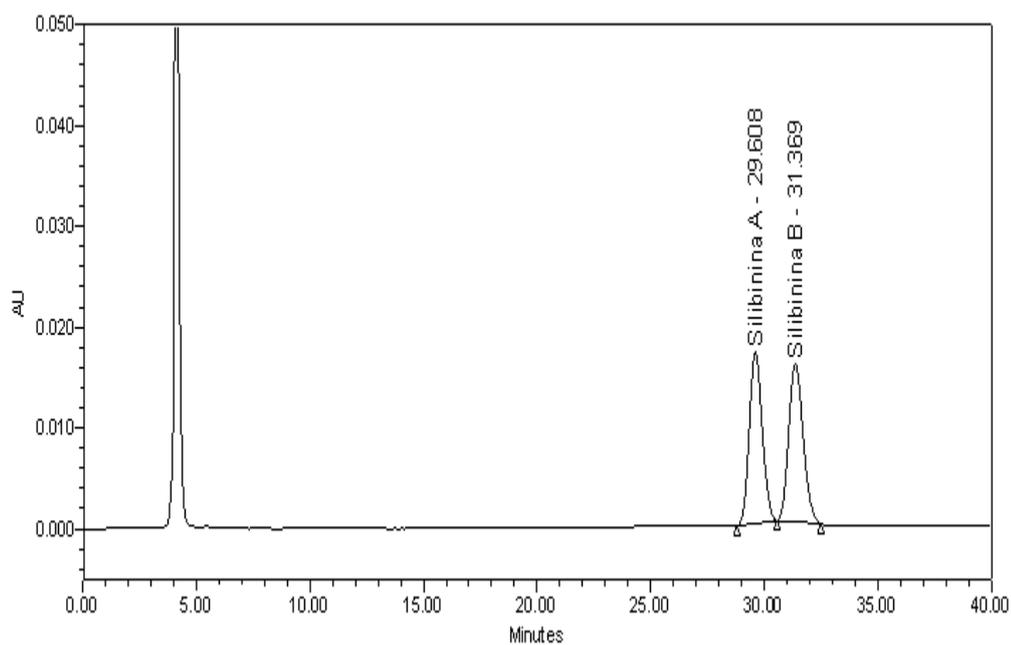


Figura 6A. Cromatogramas evaluando pH 5,0 en la fase acuosa, empleando Sistema gradiente N° 3: patrón silibinina A y B y muestra de disolución.

Patrón Silibinina A y B



Muestra de disolución

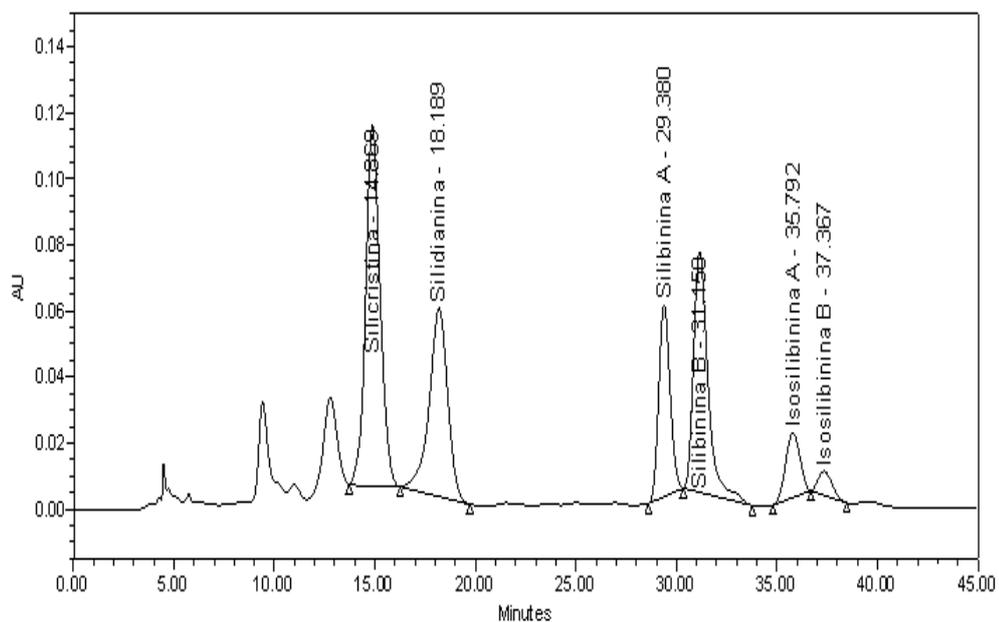


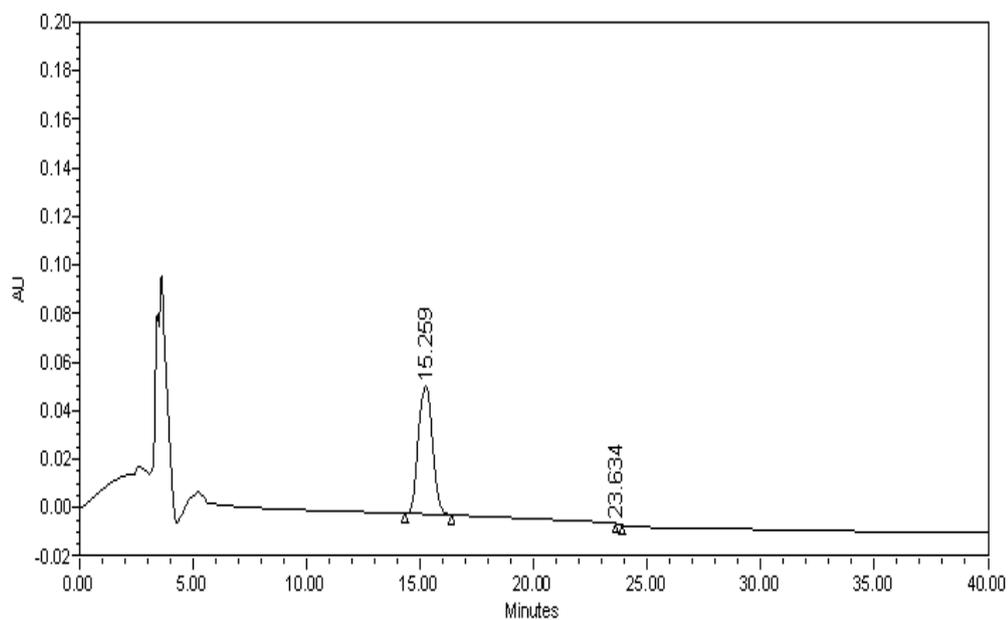
Figura 6B. Cromatogramas evaluando pH 3,0 en la fase acuosa, empleando Sistema gradiente N° 3: patrón silibinina A y B y muestra de disolución.

Como inicialmente con el uso de metanol las separaciones de los compuestos era aceptable empleando el Sistema de gradiente N° 3, se realizaron pruebas sustituyendo el metanol por otro solvente orgánico (acetonitrilo) de manera de evaluar cambios en la selectividad (α). Para determinar la proporción de acetonitrilo en la fase móvil equivalente a la utilizada con el metanol, se realizó la conversión empleando el nomograma de fuerza de solvente para HPLC (Figura 2).

En los cromatogramas mostrados en la Figura 7A empleando el Sistema de gradiente N° 4, se observó poca resolución de los compuestos y no se evidenció la presencia de los picos de isosilibinina A e isosilibinina B.

En la Figura 7B se muestran los cromatogramas de patrón de silibinina A y silibinina B y muestra de disolución empleando el Sistema de gradiente N° 5 donde se observó poca resolución para los picos de silicristina y silidianina así como para los picos de isosilibinina A e isosilibinina B.

Patrón Silibinina A y B



Muestra de disolución

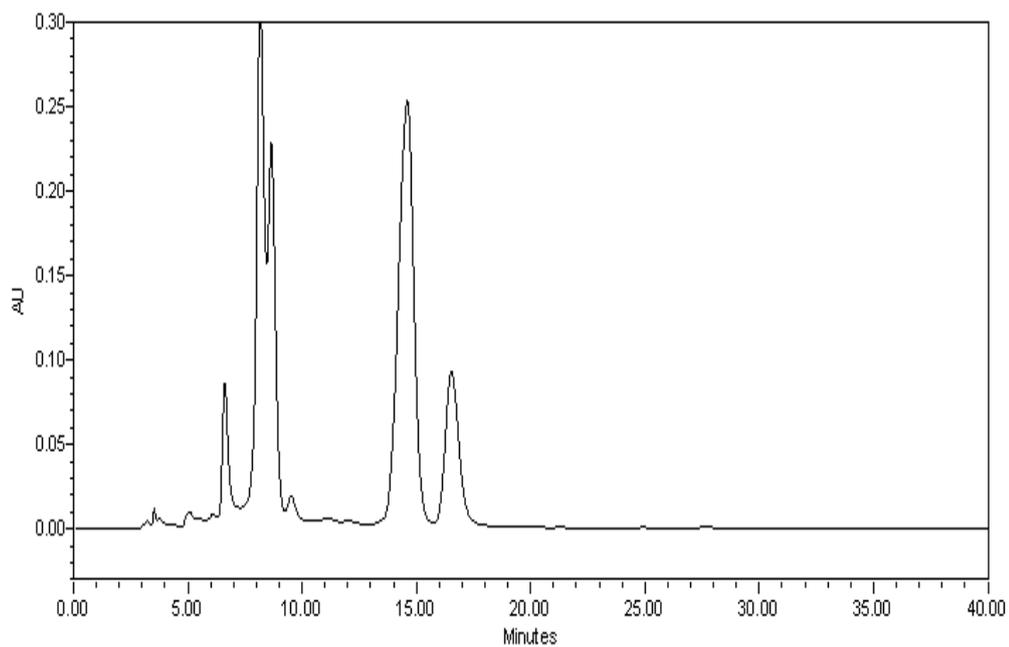
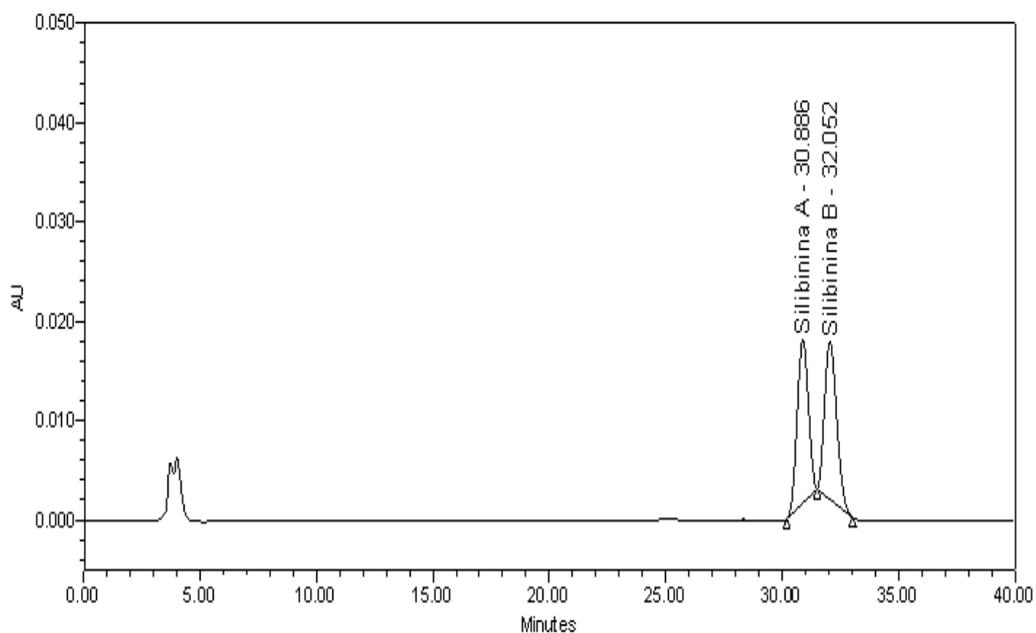


Figura 7A. Cromatogramas evaluando como fase orgánica acetonitrilo, empleando el Sistema gradiente N° 4: patrón silibinina A y B y muestra de disolución.

Patrón Silibinina A y B



Muestra de disolución

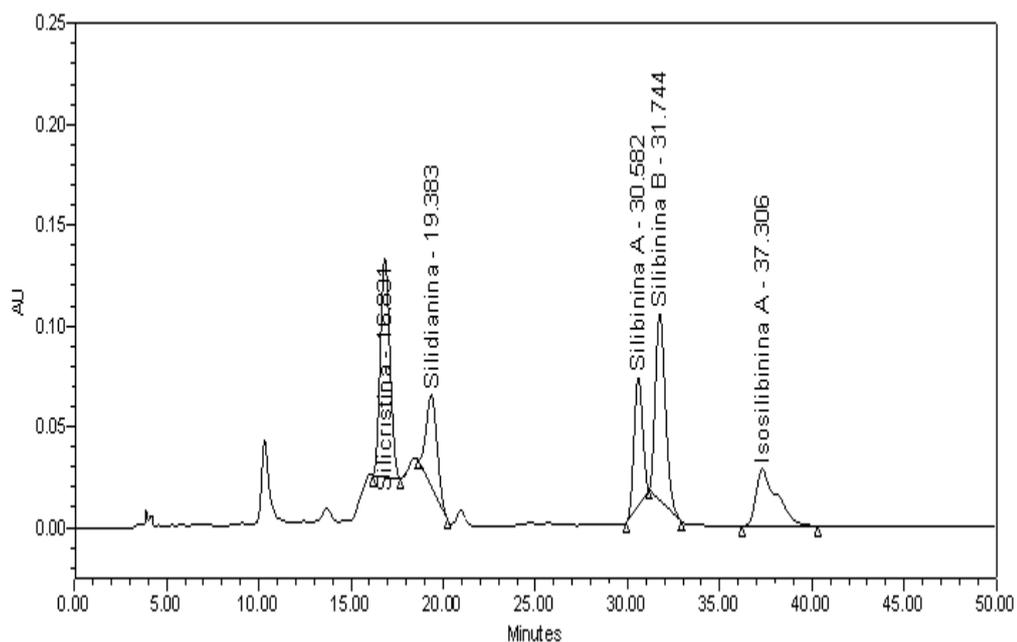


Figura 7B. Cromatogramas evaluando como fase orgánica acetonitrilo y metanol, empleando el Sistema gradiente N° 5: patrón silibinina A y B y muestra de disolución.

Después de evaluar los resultados obtenidos tanto para el patrón como para la muestra, se seleccionó el Sistema de gradiente N° 3 como el óptimo ajustando el pH de la fase acuosa a $3,0 \pm 0,1$, ya que proporciona un mayor número de platos teóricos y menor tiempo de elución de los compuestos.

4.2 Validación

4.2.1 Especificidad

De acuerdo a los cromatogramas obtenidos (Figura 8A, 8B), los tiempos de elución para los picos de Silicristina, Silidianina, Isosilibinina A y B, Silibinina A y B (patrones y muestra) se describen en la Tabla III.

Tabla III. Tiempo de retención de los patrones y la muestra de Silimarina cápsulas, Especificidad.

Sustancia de Interés	Tiempo de elución del Patrón (min.)	Tiempo de elución de la Muestra (min.)
Silicristina	14,03	14,40
Silidianina	17,05	17,41
Isosilibinina A y B	33,64 (A)* / 34,90 (B)*	33,99 (A)* / 35,38 (B)*
Silibinina A y B	28,12 (A)* / 29,66 (B)*	28,34(A)* / 29,96 (B)*

*A: Silibinina A

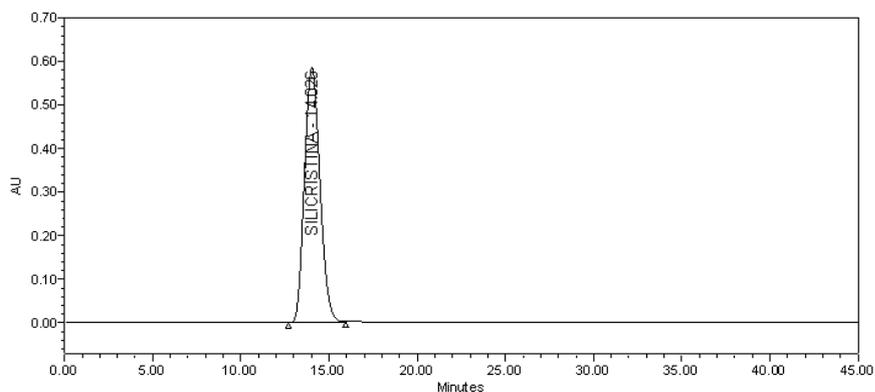
*B: Silibinina B

Para determinar que no hay interferencia de los reactivos y excipientes de la formulación, se inyectó un blanco A (Solución de Buffer pH 7,5), un blanco B (Solución Acido fosfórico 0,05M pH 3,0 – Metanol (50:50) y placebo (contiene todos los excipientes a excepción del principio activo). La Figura 8C muestra los cromatogramas obtenidos, no se evidenció ningún pico cromatográfico que pudiera interferir en la cuantificación de la silimarina.

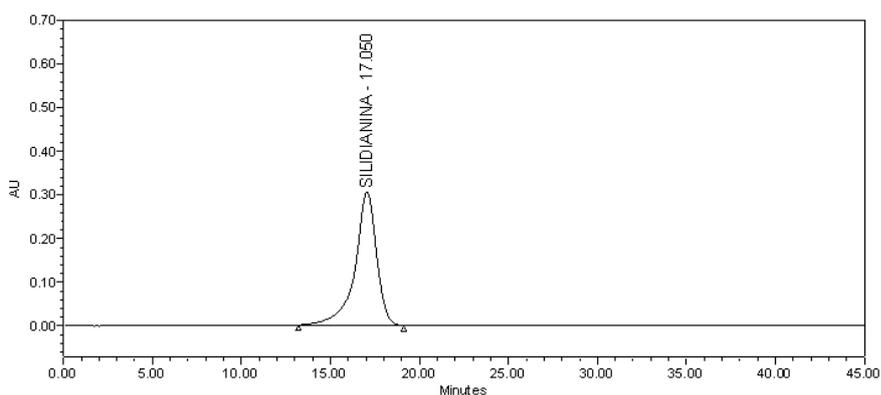
En base a los resultados obtenidos se puede decir que la metodología analítica cumple con los requerimientos de especificidad, ya que los

resultados demuestran que es capaz de separar las sustancias de interés sin que exista interferencia de otras sustancias presentes o productos de degradación.

Patrón de Silicristina



Patrón de Silidianina



Patrón de Isosilibinina A y B

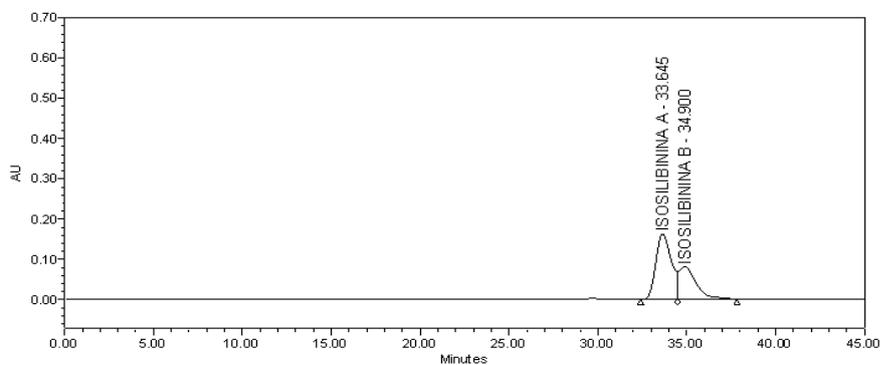
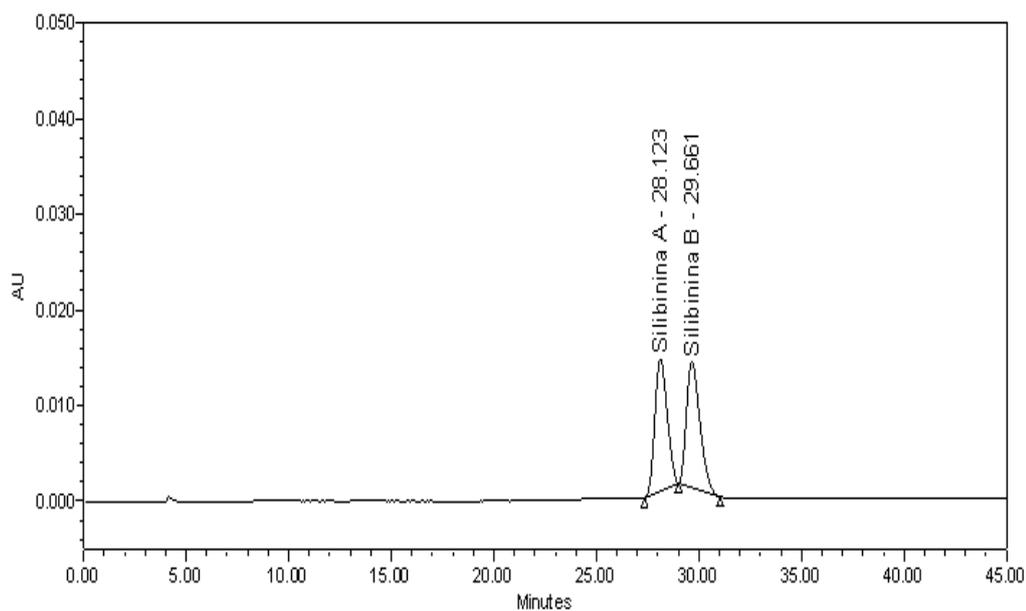


Figura 8A. Cromatogramas del ensayo de especificidad: patrón silicristina, patrón silidianina, patrón isosilibinina A y B.

Patrón de Silibinina A y B



Muestra de disolución

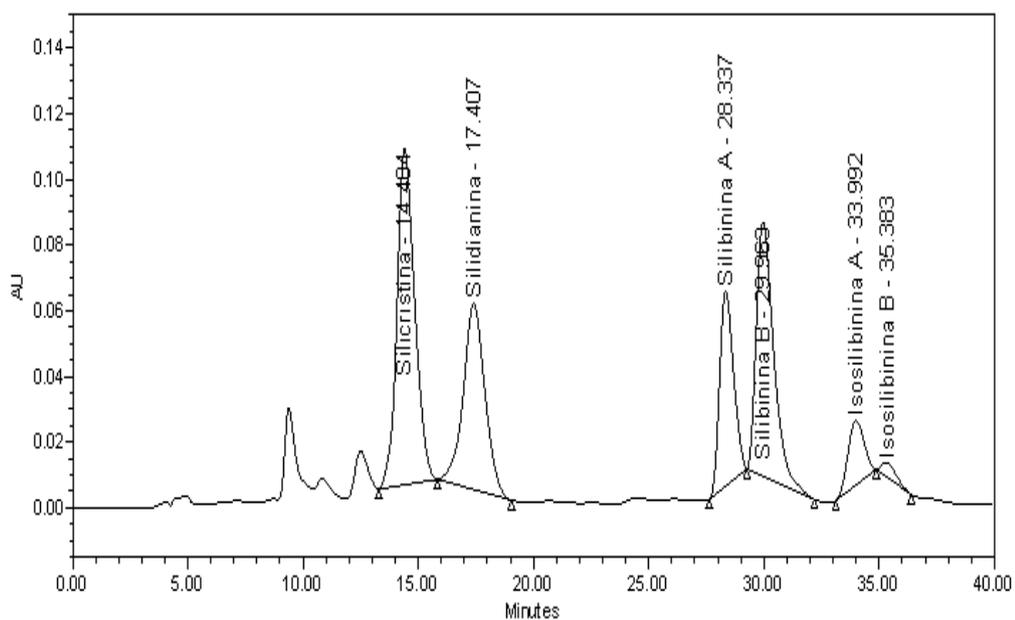
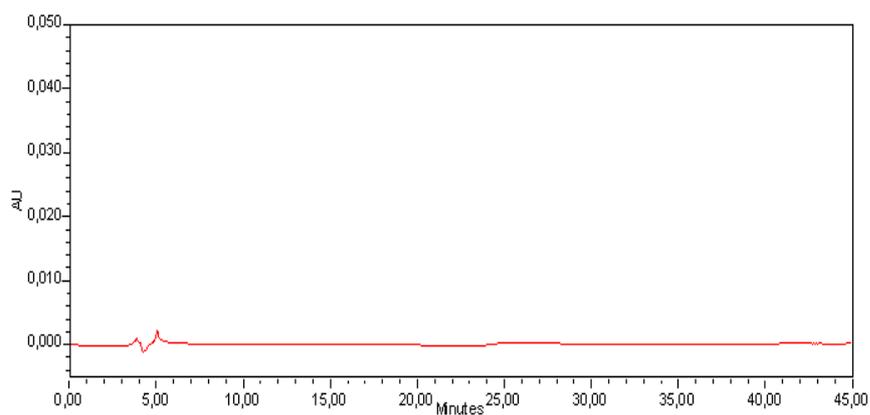
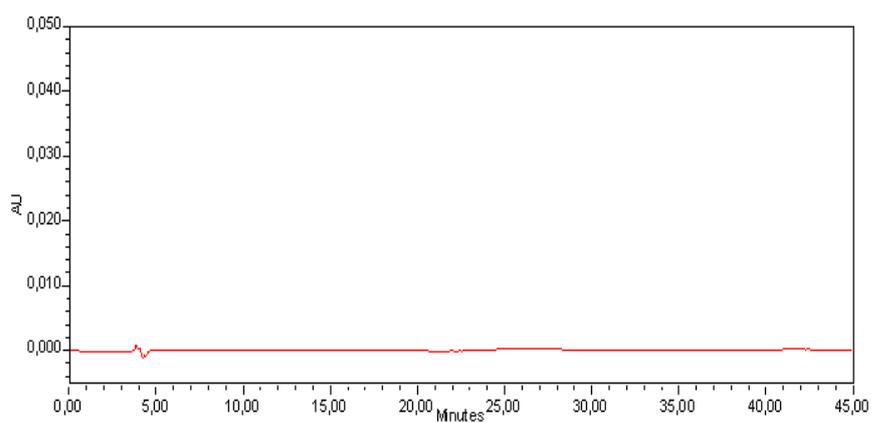


Figura 8B. Cromatogramas del ensayo de especificidad: patrón silibinina A y B, muestra de disolución.

Blanco A (Solución de Buffer pH 7,5)



Blanco B (Solución Acido fosfórico 0,05M pH 3,0 – Metanol (50:50))



Placebo

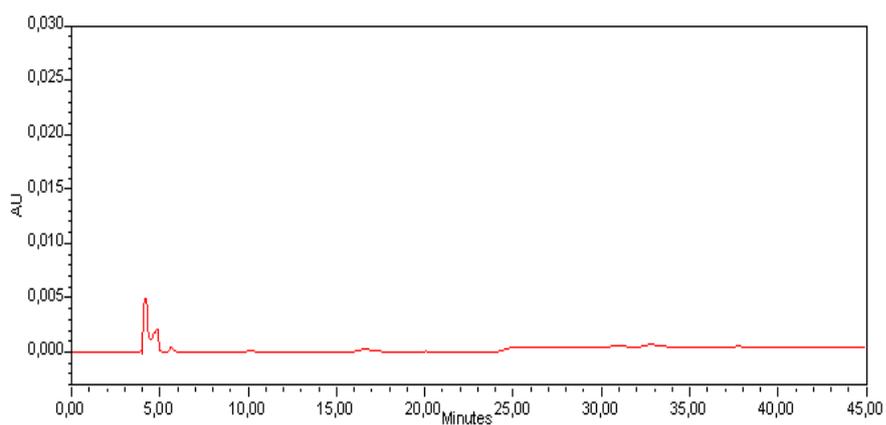


Figura 8C. Cromatogramas del ensayo de especificidad: blanco A (Solución de Buffer pH 7,5), blanco B (Solución Acido fosfórico 0,05M pH 3,0 – Metanol (50:50) y placebo.

4.2.2 Adecuación del Sistema

De las cinco (5) inyecciones consecutivas realizadas del estándar al 100% de la concentración de trabajo de Silibinina A y B, se calcularon los parámetros cromatográficos que determinan la adecuación del sistema.

Tabla IV. Resumen de los parámetros cromatográficos

Estándar	Área Silibinina A	Área Silibinina B	Área Total
1	554385	574853	1129238
2	553080	573936	1127016
3	554283	574693	1128976
4	554412	575289	1129701
5	555344	576578	1131922
Promedio	554301	575070	1129371
%RSD	0,1	0,2	

	Silibinina A	Silibinina B
Factor de Capacidad (k')	29,6	29,2
Número Platos Teóricos (N)	9179	7806
Factor de Cola (T)	1,2	1,5
Resolución de los picos (R)	1,2	

El valor del porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD) de las cinco inyecciones por área para la silibinina A fue de 0,1% y la silibinina B fue de 0,2% cumpliendo con el criterio de aceptación establecido por la USP 35 menor o igual a 2%.

En relación a los parámetros cromatográficos se tiene que el número de platos teóricos es mayor a 2000 indicando que la columna es eficiente, ya que a mayor número de platos teóricos aumenta el número de equilibrios presentes en la columna, por lo tanto existe una mayor posibilidad de lograr la separación de los compuestos.

El factor de capacidad (k') es un valor práctico que nos expresa el grado de interacción del compuesto con la columna, el cual está relacionado con el coeficiente de distribución entre ambas fases, el valor de factor de capacidad obtenido tiene valores ideales que van en un rango entre 1 y 20, para que la resolución no tenga un excesivo tiempo de análisis. Sin embargo, en este trabajo el valor obtenido de factor de capacidad es > 20 y existe una buena separación de los picos de interés con el frente del solvente y esto favorece la especificidad de la metodología analítica.

El grado de simetría de los picos, es importante ya que picos asimétricos pueden presentar problemas con la integración, por lo que su medición es relevante, puesto que puede llevar de acuerdo a su magnitud a errores considerables de cuantificación. **(21)**.

Se obtuvo un valor de 1,2 para la silibinina A y 1,5 para la silibinina B, para un pico simétrico el factor de asimetría es la unidad y este se incrementa a medida que la cola se hace más pronunciada, como norma general el factor de asimetría debería encontrarse entre 0.8 y 1,5, aunque pueden aceptarse valores de hasta 2,0 **(20)**.

En este caso el valor obtenido se encuentra dentro del rango establecido por lo que se considera aceptable.

De acuerdo con los valores obtenidos se puede decir que el sistema es apto para la determinación del porcentaje disuelto de silimarina cápsulas.

4.2.3 Linealidad

Se prepararon seis (6) concentraciones del patrón de silibinina A y B al (40%, 60%, 80%, 100%, 120% y 140%), cada concentración fue inyectada por duplicado en el equipo HPLC y el procesamiento de los datos se hizo por áreas. Los resultados se exponen a continuación.

Tabla V. Resultados linealidad y rango

Estándar	Concentración (mg/mL)	Área Silibinina A	Área Silibinina B	Área Total
40%-1	0,00325082	220371	229346	449717
40%-2	0,00325082	220701	229536	450237
60%-1	0,00487622	335677	351865	687542
60%-2	0,00487622	336375	352266	688641
80%-1	0,00650163	440478	456668	897146
80%-2	0,00650163	439762	456283	896045
100%-1	0,00812704	565627	586101	1151728
100%-2	0,00812704	565377	585121	1150498
120%-1	0,00975246	658050	684006	1342056
120%-2	0,00975246	656315	681786	1338101
140%-1	0,01137788	773987	801234	1575221
140%-2	0,01137788	775780	805393	1581173
Factor de Correlación (r)				0,9995
Factor de Determinación (r²)				0,999

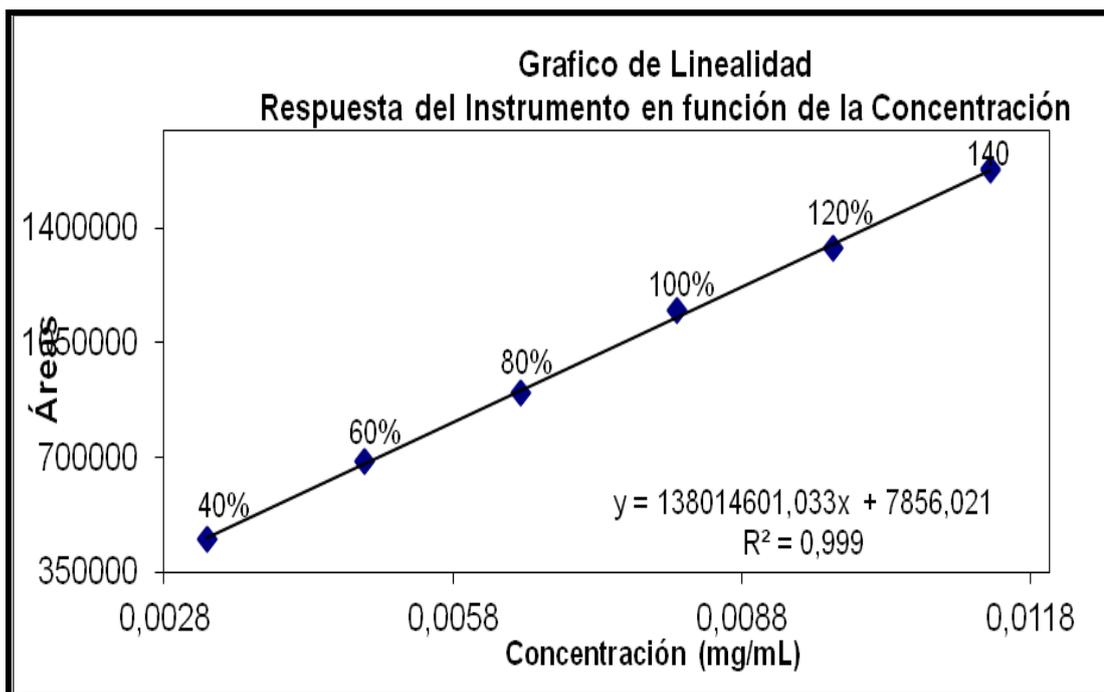


Gráfico 1. Linealidad (área vs. concentración mg/mL)

Se obtuvo que el método es lineal para el rango evaluado (0,003 – 0,011) mg/mL con un factor de correlación mayor a 0,99 y un coeficiente de determinación mayor a 0,98; lo que indica la relación lineal existente entre la concentración y la respuesta emitida por el equipo, por lo que cumple con el criterio de aceptación para el parámetro de linealidad ya que el valor de (**r**) debe ser mayor que 0,990 y el valor de (**r²**) debe ser mayor o igual a 0,98 (21).

4.2.4 Precisión

La precisión se realizó bajo condiciones de repetibilidad y precisión intermedia, el procesamiento de la data se hizo por áreas. Para la repetibilidad fue evaluado el coeficiente de variación del analista 1 y para la precisión intermedia fueron comparados los valores obtenidos entre ambos analistas.

Tabla VI. Datos Analista 1 y Analista 2 para calcular el porcentaje disuelto de silimarina cápsulas.

Peso Patrón (Analista 1)	21,8	mg
Área Promedio Patrón Silibinina A y B (Analista 1)	1103363	
Peso Patrón (Analista 2)	21,7	mg
Área Promedio Patrón Silibinina A y B (Analista 2)	1118456	
Potencia Patrón	93,2	%
Factor dilución Muestra	900	
Factor dilución Patrón	2500	
Contenido Declarado	108,2	mg/capsula
Peso Promedio Contenido Neto	361,93	mg
Peso cápsula vacía	75,4	mg

Fórmula para el cálculo del porcentaje disuelto de Silimarina:

% Disuelto

$$\frac{(S1 + S2 + S3 + S4 + I5 + I6) \times \text{Peso Std} \times \text{Potencia de Std} \times \text{FMx} \times \text{P. Prom Cont. Neto} \times 100}{(S7 + S8) \times \text{FStd} \times \text{Peso Cont.Cap.} \times \text{Cont. Declarado}}$$

Donde:

Mx : Muestra

Std : Estándar

F : Factor de dilución

S1: Área del pico del isómero Silicristina en la muestra

S2: Área del pico del isómero Silidianina en la muestra

S3: Área del pico del isómero Silibinina A en la muestra

S4: Área del pico del isómero Silibinina B en la muestra

I5: Área del pico del isómero Isosilibinina A en la muestra

I6: Área del pico del isómero Isosilibinina B en la muestra

S7: Área del pico del isómero Silibinina A en el estándar

S8: Área del pico del isómero Silibinina B en el estándar

Cont. Declarado: Contenido declarado (mg/cap.)

P. Prom Cont. Neto: Peso Promedio Contenido neto de las cápsulas

Peso Cont.Cáp: Peso contenido de la cápsula

Límite de Aceptación: A los 15 minutos: Mínimo 60% **(23)**

A los 45 minutos: Mínimo 80% **(23)**

La tabla VII presenta las áreas obtenidas a los 15 y 45 minutos del tiempo de disolución para las seis (6) inyecciones de la muestra y las tablas VIII y IX presentan los resultados obtenidos por el analista 1 para la repetibilidad.

Tabla VII. Áreas de la muestra a los 15 y 45 minutos (Analista 1)

Muestra	Área Silibinina A	Área Silibinina B	Área Silicristina	Área Silidianina	Área Isosilibinina A	Área Isosilibinina B
Dis-1-15min	1849643	3124146	4543181	2617502	673440	172258
Dis-2-15min	2055483	3472665	5033150	2863432	770391	213924
Dis-3-15min	1900534	3208270	4620862	2602988	712653	203480
Dis-4-15min	2090062	3535610	5130157	2911524	781413	223567
Dis-5-15min	2044427	3452268	5026859	2794682	765399	219966
Dis-6-15min	2001989	3390539	4936085	2709975	750396	220850
Dis-1-45min	2382213	4036490	6009416	3150014	889646	258691
Dis-2-45min	2541125	4307427	6516122	3355341	945499	278817
Dis-3-45min	2317771	3936005	5838752	3109030	865259	246776
Dis-4-45min	2483847	4212656	6337169	3311978	924655	269492
Dis-5-45min	2443567	4152144	6232711	3262125	910595	256585
Dis-6-45min	2325121	3960587	5904241	3064910	870985	249328

Tabla VIII. Resultados de repetibilidad a los 15 minutos (Analista 1)

Muestra	Sumatoria de todos los picos (15 minutos)	Peso cápsula llena (mg)	Peso contenido neto (mg)	% Disuelto (15 minutos)
Dis-1-15min	12980170	437,7	362,3	79
Dis-2-15min	14409045	467,6	392,2	81
Dis-3-15min	13248787	427,7	352,3	83
Dis-4-15min	14672333	464,1	388,7	84
Dis-5-15min	14303601	461,2	385,8	82
Dis-6-15min	14009834	435,0	359,6	86
Promedio				83
%RSD				2,8

Tabla IX. Resultados de repetibilidad a los 45 minutos (Analista 1)

Muestra	Sumatoria de todos los picos (45 minutos)	Peso cápsula llena (mg)	Peso Contenido Neto (mg)	% Disuelto (45 minutos)
Dis-1-45min	16726470	437,7	362,3	102
Dis-2-45min	17944331	467,6	392,2	101
Dis-3-45min	16313593	427,7	352,3	103
Dis-4-45min	17539797	464,1	388,7	100
Dis-5-45min	17257727	461,2	385,8	99
Dis-6-45min	16375172	435,0	359,6	101
Promedio				101
%RSD				1,3

El valor del Porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD) de los resultados de las seis (6) determinaciones a los 15 minutos fue de 2,8% y a los 45 minutos fue de 1,3% demostrando que el método analítico cumple con el parámetro de repetibilidad, ya que el (%RSD) debe ser menor o igual que

10% **(20)** de acuerdo con los criterios establecidos en el laboratorio donde se realizó el estudio.

La tabla X presenta las áreas obtenidas a los 15 y 45 minutos del tiempo de disolución para las seis (6) inyecciones de la muestra para el analista 2 y las tablas XI y XII presentan los resultados obtenidos por el analista 2.

Tabla X. Áreas de la muestra a los 15 y 45 minutos (Analista 2)

Muestra	Área Silibinina A	Área Silibinina B	Área Silicristina	Área Silidianina	Área Isosilibinina A	Área Isosilibinina B
Dis-1-15min	2253858	3679986	5365839	2870899	842098	191478
Dis-2-15min	2271021	3724951	5422005	2898519	849825	197847
Dis-3-15min	2331758	3839023	5584284	2952147	878668	201109
Dis-4-15min	2304805	3789590	5454796	2981544	864104	204213
Dis-5-15min	2280335	3758004	5540294	2853269	855740	200934
Dis-6-15min	2343215	3876582	5765684	2925915	876049	208370
Dis-1-45min	2747972	4537201	6940584	3293135	1024879	240054
Dis-2-45min	2666734	4424748	6735178	3183780	997907	236573
Dis-3-45min	2695737	4479181	6858875	3203678	1010098	237732
Dis-4-45min	2628841	4371622	6679133	3114987	981763	232726
Dis-5-45min	2620212	4357411	6707205	3075554	977049	236163
Dis-6-45min	2649090	4417734	6856795	3077870	988158	240129

Tabla XI. Resultados ensayo de disolución a los 15 minutos (Analista 2)

Muestra	Sumatoria de todos los picos (15 minutos)	Peso cápsula llena (mg)	Peso contenido neto (mg)	% Disuelto (15 minutos)
Dis-1-15min	15204158	467,6	392,2	84
Dis-2-15min	15364168	456,1	380,7	88
Dis-3-15min	15786989	460,1	384,7	89
Dis-4-15min	15599052	449,1	373,7	91
Dis-5-15min	15488576	452,2	376,8	90
Dis-6-15min	15995815	456,6	381,2	91
			Promedio	89
			%RSD	2,8

Tabla XII. Resultados ensayo de disolución a los 45 minutos (Analista 2)

Muestra	Sumatoria de todos los picos (45 minutos)	Peso cápsula llena (mg)	Peso Contenido Neto (mg)	% Disuelto (45 minutos)
Dis-1-45min	18783825	467,6	392,2	104
Dis-2-45min	18244920	456,1	380,7	104
Dis-3-45min	18485301	460,1	384,7	105
Dis-4-45min	18009072	449,1	373,7	105
Dis-5-45min	17973594	452,2	376,8	104
Dis-6-45min	18229776	456,6	381,2	104
			Promedio	104
			%RSD	0,4

Para la determinación de la precisión intermedia, los análisis fueron realizados por dos analistas, en diferentes días y equipo, bajo las mismas condiciones cromatográficas descritas en el punto 3.2.2.1. El valor del porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD) de los resultados de las

doce (12) determinaciones (Analista 1 y 2) a los 15 minutos fue de 4,8% y a los 45 minutos fue de 2,0 % demostrando que el método analítico cumple con el parámetro de precisión intermedia, ya que el (%RSD) debe ser menor o igual que 15% **(20)** de acuerdo con los criterios establecidos en el laboratorio donde se realizó el estudio.

4.2.5 Exactitud

La exactitud demuestra la proximidad entre los resultados obtenidos de una prueba y el valor verdadero, el ensayo se realizó sobre tres (3) preparaciones de muestras por triplicado a las concentraciones aproximadas de 80%, 100% y 120% del analito en base al valor declarado, para ello se realizaron pesadas de la muestra a las concentraciones antes descritas. Adicionalmente se realizó un ensayo de disolución de referencia para el cálculo de exactitud, sobre seis (6) determinaciones a la concentración al 100% pesando cada muestra sin cápsula y añadiendo cada cápsula vacía, aplicando las condiciones descritas en el punto 3.2.2.1.8.

Fórmula para el cálculo del porcentaje de recuperación de Silimarina:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\% \text{ disuelto Muestra}}{\% \text{ disuelto determinado de referencia para la exactitud}} \times 100$$

La tabla XIII presenta las áreas obtenidas a los 15 y 45 minutos del tiempo de disolución para las seis (6) inyecciones de la muestra y las tablas XIV y XV presentan los resultados obtenidos para el ensayo de disolución para fines de cálculo para la exactitud.

Tabla XIII. Áreas de la muestra de referencia para la exactitud a los 15 y 45 minutos

Muestra	Área Silibinina A	Área Silibinina B	Área Silicristina	Área Silidianina	Área Isosilibinina A	Área Isosilibinina B
Dis-1-15min	2041188	3554278	4136321	2255834	882842	266829
Dis-2-15min	2142286	3721794	4370968	2294589	920267	279128
Dis-3-15min	2115684	3675107	4265323	2290878	912353	277278
Dis-4-15min	2140736	3738726	4321870	2322641	923708	280640
Dis-5-15min	2153072	3750982	4160773	2530326	923005	282090
Dis-6-15min	2140273	3737032	4350775	2266199	922524	276515
Dis-1-45min	2351100	4135179	4768990	2478895	1015000	304892
Dis-2-45min	2383705	4162030	4664606	2653975	1021408	311170
Dis-3-45min	2309770	4035192	4841209	2331516	992393	298991
Dis-4-45min	2329826	4070488	4869995	2377674	999238	297900
Dis-5-45min	2326052	4068059	4456266	2672986	1001984	302912
Dis-6-45min	2317901	4066557	4862147	2349871	999066	296597

Tabla XIV. Resultados del ensayo de disolución de referencia para la exactitud a los 15 minutos

Muestra	Sumatoria de todos los picos (15 minutos)	Peso Muestra (mg)	% Disuelto (15 minutos)
Dis-1-15min	13137292	359,6	80
Dis-2-15min	13729032	360,6	83
Dis-3-15min	13536623	359,9	82
Dis-4-15min	13728321	360,3	83
Dis-5-15min	13800248	359,1	84
Dis-6-15min	13693318	360,0	83
		Promedio	82
		%RSD	1,8

Tabla XV. Resultados del ensayo de disolución de referencia para la exactitud a los 45 minutos

Muestra	Sumatoria de todos los picos (45 minutos)	Peso Muestra (mg)	% Disuelto (45 minutos)
Dis-1-45min	15054056	359,6	91
Dis-2-45min	15196894	360,6	92
Dis-3-45min	14809071	359,9	90
Dis-4-45min	14945121	360,3	90
Dis-5-45min	14828259	359,1	90
Dis-6-45min	14892139	360,0	90
		Promedio	90
		%RSD	0,9

La tabla XVI presenta las áreas obtenidas a los 15 y 45 minutos del tiempo de disolución para las nueve (9) determinaciones y las tablas XVII y XVIII presenta los resultados de exactitud para cada concentración.

Tabla XVI. Áreas de la muestra a los 15 y 45 minutos.

Muestra	Área Silibinina A	Área Silibinina B	Área Silicristina	Área Silidianina	Área Isosilibinina A	Área Isosilibinina B
80%-1-15min	1692216	2825288	3381336	1782343	723981	221367
80%-2-15min	1667363	2780155	3483051	1647485	712446	222617
80%-3-15min	1744876	2934161	3724787	1670282	747789	227078
100%-1-15min	2032620	3399037	4376006	1971560	870085	269727
100%-2-15min	1916287	3185188	4091548	1877460	818969	259959
100%-3-15min	2179771	3653548	4843713	2079949	933562	291763
120%-1-15min	2654453	4441258	5934900	2242363	1138397	367568
120%-2-15min	2594784	4361868	5755895	2186216	1102657	346862
120%-3-15min	1874175	3156899	4139894	1777648	801700	254002
80%-1-45min	1853918	3134763	4110759	1722753	793212	250553
80%-2-45min	1858955	3136116	4071339	1793919	796157	255268
80%-3-45min	2213900	3735851	4942395	2093704	954500	310901
100%-1-45min	2236028	3783633	4937914	2134449	965979	309353
100%-2-45min	2276062	3838087	5093130	2107088	981311	322681
100%-3-45min	2819903	4779539	6427171	2320808	1212615	395609
120%-1-45min	2848047	4825038	6507302	2325007	1227079	402469
120%-2-45min	2685919	4522543	6092718	2196721	1154827	379786
120%-3-45min	1874175	3156899	4139894	1777648	801700	254002

Tabla XVII. Resultados de Exactitud a los 15 minutos.

Muestra	Sumatoria de todos los picos (15 minutos)	Peso (mg)	% Disuelto (15 minutos)	% Recuperación
80%-1-15min	10626531	290,1	80	97
80%-2-15min	10513117	289,2	79	97
80%-3-15min	11048973	289,2	83	101
100%-1-15min	12919035	358,7	78	96
100%-2-15min	12149411	356,4	74	91
100%-3-15min	13982306	358,7	85	104
120%-1-15min	16778939	432,9	84	103
120%-2-15min	16348282	433,8	82	100
120%-3-15min	16695649	432,4	84	103
			Promedio	99

Tabla XVIII. Resultados de Exactitud a los 45 minutos.

Muestra	Sumatoria de todos los picos (45 minutos)	Peso (mg)	% Disuelto (45 minutos)	% Recuperación
80%-1-45min	12004318	290,1	90	100
80%-2-45min	11865958	289,2	89	99
80%-3-45min	11911754	289,2	90	100
100%-1-45min	14251251	358,7	87	96
100%-2-45min	14367356	356,4	88	98
100%-3-45min	14618359	358,7	89	99
120%-1-45min	17955645	432,9	90	100
120%-2-45min	18134942	433,8	91	101
120%-3-45min	17032514	432,4	86	95
			Promedio	99

El valor mínimo de porcentaje de recuperación obtenido a los 15 minutos fue 91% y el máximo de 104% y para los 45 minutos el valor mínimo de porcentaje de recuperación fue de 95% y el valor máximo de 101%, por lo que se considera que el método cumple con el parámetro de exactitud ya que los valores individuales de porcentaje del analito recuperado para las diferentes concentraciones están dentro del criterio establecido por el laboratorio donde se realizó el presente estudio (90 – 110) % **(20)**

Tabla XIX. Resultados de los Límites de Confianza a los 15 minutos

Muestra	Valor promedio (% disuelto a los 15 min)	Desviación Estándar	Valor de Referencia (% disuelto) 15 minutos	Límite de confianza p= 0,05 (95%)	Límite de confianza p= 0,01 (99%)
80%	81	2,08	82	Límite superior 86,2 Límite Inferior 75,8	Límite superior 92,9 Límite Inferior 69,1
100%	79	5,57		Límite superior 92,8 Límite Inferior 65,2	Límite superior 110,9 Límite Inferior 47,1
120%	83	1,15		Límite superior 85,9 Límite Inferior 80,1	Límite superior 89,6 Límite Inferior 76,4

Tabla XX. Resultados de los Límites de Confianza a los 45 minutos

Muestra	Valor promedio (% disuelto a los 45 min)	Desviación Estándar	Valor de Referencia (% disuelto) 45 minutos	Límite de confianza p= 0,05 (95%)	Límite de confianza p= 0,01 (99%)
80%	90	0,58	90	Límite superior 91,4 Límite Inferior 88,6	Límite superior 93,3 Límite Inferior 86,7
100%	88	1,00		Límite superior 90,5 Límite Inferior 85,5	Límite superior 93,7 Límite Inferior 82,3
120%	89	2,65		Límite superior 95,6 Límite Inferior 82,4	Límite superior 104,2 Límite Inferior 73,8

En las tablas XIX y XX se observan los límites de confianza, el cual indica que los valores de la muestra para cada una de las concentraciones evaluadas se encuentran en los intervalos descritos y con un nivel de confianza del 95% y 99%.

4.2.6 Límite de Detección

El límite de detección (LOD) se determinó mediante la ecuación $LOD: 3,3 \sigma / S$ (19), para ello la pendiente S se estimó de la curva de calibración del compuesto de interés y la estimación de σ se basó en la desviación estándar del blanco. Se realizó la medición de la magnitud de la respuesta del ruido de fondo analítico analizando seis (6) determinaciones de muestras placebo y calculando la desviación estándar de sus respuestas. La tabla XXI presenta la magnitud de la respuesta del ruido de fondo analítico analizado en seis (6) determinaciones de muestras placebo.

Tabla XXI. Respuesta del ruido de fondo analítico

Placebo	Peso Placebo (mg)	Respuesta del ruido fondo analítico
1	361,3	0,01058
2	359,1	0,00620
3	361,6	0,00503
4	362,7	0,00418
5	361,2	0,00364
6	362,0	0,00332
	Promedio	0,005492
	Desv. Std	0,002701

El valor obtenido de límite de detección (LOD) fue de $6,46 \times 10^{-11}$ mg/mL

4.2.7 Límite de Cuantificación

El límite de cuantificación (LOQ) se determinó mediante la ecuación $LOQ: 10 \sigma / S$ (19), para ello la pendiente **S** se estimó de la curva de calibración del compuesto de interés y la estimación de σ se basó en la desviación estándar del blanco. Para ello se realizó la medición de la magnitud de la respuesta del ruido de fondo analítico analizando seis (6) determinaciones de muestras placebo y calculando la desviación estándar de sus respuestas.

En la tabla XXI se presenta la magnitud de la respuesta del ruido de fondo analítico analizado en seis (6) determinaciones de muestras placebo.

El valor obtenido de límite de cuantificación (LOQ) fue de $1,95 \times 10^{-10}$ mg/mL

4.2.8 Fortaleza

La fortaleza del método analítico optimizado quedó demostrada al ejecutar la validación bajo diferentes condiciones dentro de un mismo laboratorio, en este caso diferentes analistas, diferentes días y equipo, obteniendo resultados reproducibles para los parámetros evaluados.

5.- CONCLUSIONES

El presente trabajo representa una mejora en los tiempos de análisis y precisión de los resultados analíticos de la cuantificación del producto Silimarina, con respecto al procedimiento objeto de estudio.

La optimización de esta metodología ofrece ventajas en comparación a la empleada anteriormente, ya que se logró reducir el tiempo de corrida de 60 minutos a 45 minutos.

Los resultados obtenidos en la validación de la metodología analítica están conformes con los criterios de aceptación establecidos y por lo tanto reúne las capacidades de desempeño necesarios para cumplir con la aplicación analítica propuesta para la cual fue diseñado.

6.- RECOMENDACIONES

Se recomienda que el método analítico optimizado se aplique para los análisis de rutina del ensayo de disolución de silimarina cápsulas.

Se sugiere evaluar una columna con un tamaño de partícula más pequeño (5 μ) empleando las condiciones cromatograficas optimizadas, esto con la finalidad de permitir separaciones más rápidas en comparación con columnas con tamaño de partículas más grandes (10 μ).

Así mismo se recomienda continuar evaluando la separación de este tipo de compuestos con sistemas analíticos novedosos como la Cromatografía Líquida de Ultra Rendimiento (UPLC), así como el uso de columnas cromatográficas quirales que pudieran mejorar los resultados presentados en este trabajo.

7. - BIBLIOGRAFIA

1. Bhattaram V, Graefe U, Kohlert C, Viet M, Derendorf H. Pharmacokinetics and Bioavailability of Herbal Medicinal Products. *International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 2002; 9 Supl III: 1-33.
2. Miranda M, Huacuja L, López A, Panduro A. Fitoterapia molecular como parte de la medicina alternativa complementaria en las enfermedades del hígado. *Investigación en Salud* 2005; VII: 64-68.
3. Hussain I, Khan F, Ullah R. Analysis of silymarin in the seeds of white and blue capitulum of *Silybum marianum* plants. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2011; 5(6). 742-745.
4. Kumar T, Larokar Y, Iyer S, Kumar A, Tripathi D. Phytochemistry and Pharmacological Activities of *Silybum marianum*. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research* 2011; 1(3). 124-123.
5. Silymarin, the Antioxidant Component of *Silybium marianum*, Prevents Sepsis-Induced Acute Lung and Brain Injuri. *Journal of Surgical Research* 2008; 145. 214-222.
6. Carretero M. Compuestos fenólicos: Flavonoides. *Panorama actual Med* 2000; 24 (234):525- 528
7. Radjabian T, Rezazadeh Sh, Huseini H. *Iranian Journal of Science & Technology* 2008; 32. 142-146
8. Quaglia M, Bossu E, Donati E, Mazzanti G, Brandt A. Determination of silymarine in the extract from the dried *silybum marianum* fruits by high performance liquid cromatography and capillary electrophoresis.

- Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 1999; 19. 435-442.
9. Din T, Tian S, Zhang Z, Gu D, Chen Y, Shi Y, Sun Z. Determination of active component in silymarin by RP-LC and LC / MS. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2001; 26. 155-161.
 10. Kvasnicka F, Biba B, Sevcik R, Voldrich M, Kratka J. Analysis of the active components of silymarin. Journal of Chromatography A 2003; (990): 239-245.
 11. Zhao Y, Chen B, Shouzhuo Y. Simultaneous determination of abietane-type diterpenes, flavonolignans and phenolic compounds in compounds in compound preparations of *Silybum marianum* and *Salvia miltiorrhiza* by HPLC-DAD-ESI MS. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2005; 38. 564-570
 12. Li W, Han J, Li Z, Li X, Zhou S, Liu C. Preparative chromatographic purification of diastereomers of silybin and their quantification in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B 2007; 862. 51-57.
 13. Lee J, Narayan M, Barrett J. Analysis and comparison of active constituents in commercial standardized silymarin extracts by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. Journal of Chromatography B 2007; 845. 95-103.
 14. Liu H, Du Z, Yuan Q. A novel rapid method for simultaneous determination of eight active compounds in silymarin using a reversed-phase UPLC-UV detector. Journal of Chromatography B 2009; 877. 4159-4163.

15. Lee J, Hus B, Wi D, Barrett J. Separation and characterization of silybin, isosilybin, silydianin and silychristin in milk thistle extract by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2006; 1116:57-68
16. Gennaro, Alfonso R. Remington Farmacia. Editorial Médica Panamericana 1998; 19. 867-884.
17. United States Pharmacopeial Convention. USP 35 - NF 30. Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention; 2012.
18. Regnault M. Desarrollo de un método analítico por HPLC. Caracas: Universidad Central de Venezuela 2005.
19. International Conference on Harmonisation. Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology; 1996.
20. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validación de Métodos Analíticos. Barcelona: 2002.
21. Quatrocchi O, Andrizzi S de, Laba R. Introducción a la HPLC: Aplicación y práctica. Buenos Aires: Farro S.A; 1992.
22. William A. Hanson. Handbook of Dissolution Testing. 2nd Edition, Revised. Aster Publishing Corporation. Oregon: 1991.
23. Laboratorios Vargas, S.A. Control de Calidad. Método Analítico Silimarina cápsulas. Caracas: 2011.