

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Desarrollo y validación de un método analítico por
cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la
cuantificación de senósidos en tabletas de chocolate,

Lima - 2019

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR
Bach. OBREGÓN PILLACA, JUAN CARLOS

LIMA - PERÚ
2019

A Dios, a mis padres que en vida fueron Víctor e Ignacia, hermanos, familiares y amigos.

AGRADECIMIENTO

Mi eterno agradecimiento a la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, por ser mi *Alma Mater*, a la Facultad de Ciencias de la Salud, en especial a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica y a los docentes por la noble labor realizada.

A mis asesores Mg. Maricela López Sierralta y Dr. Jhonnell Williams Samaniego Joaquin, por brindarme su amplio conocimiento y experiencia en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Al Dr. Luis Kanashiro Chinen y Dra. Elisa Zavala Fernández por su apoyo moral, académico, por la oportunidad brindada para crecer como persona y desarrollarme profesionalmente, de igual manera a mis compañeros de trabajo del departamento de investigación y desarrollo por su constante apoyo y colaboración.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes del estudio	3
2.2. Validación	9
2.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	13
2.4. Senósidos	15
2.5. Laxante	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Lugar de ejecución	19
3.2. Definición de la población y muestra.	19
3.3. Metodología y recolección de datos.	19
3.3.1 Desarrollo del método analítico.	19
3.3.2 Determinación de parámetros de validación.	21
3.4. Cálculos	25
3.4.1. Precisión instrumental	25
3.4.2. Especificidad:	26
3.4.3. Linealidad	26
3.4.4. Exactitud.	28
3.4.5. Precisión.	28
3.4.6. Robustez.	28
3.5. Análisis de datos	28
IV. RESULTADOS	29
V. DISCUSIÓN	41
VI. CONCLUSIONES	45
VII. RECOMENDACIONES	47
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXOS	53

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Tipos de procedimientos a validar según International Conference on Harmonisation (ICH)	12
Tabla 2	Datos requeridos para la validación según la farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 42 – NF 37).	13
Tabla 3	Elución en gradiente de la fase móvil de solución A y solución B. Lima – 2019.	20
Tabla 4	Muestras inyectadas que debe cumplir con las especificaciones. Lima – 2019	26
Tabla 5	Precisión instrumental de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.	33
Tabla 6	Especificidad de posibles interferentes, fotólisis y termólisis sometidas a estrés forzado de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019	34
Tabla 7	Especificidad de hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina y oxidativa sometidas a estrés forzado de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.	35
Tabla 8	Exactitud (recuperación) de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.	38
Tabla 9	Repetibilidad y precisión intermedia entre el analista uno y dos de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.	39
Tabla 10	Robustez entre análisis inicial y final de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Estructura química de senósidos A, B, C y D.	16
Figura 2	Desarrollo del método: resultados de pureza de pico de estándar (principio activo) de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.	31
Figura 3	Desarrollo del método: resultados de pureza de pico de muestra (principio activo más placebo) de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019	32
Figura 4	Área versus concentración de linealidad del sistema de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.	36
Figura 5	Área versus concentración de linealidad del método de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.	37

ÍNDICE DE ANEXOS

		Página
Anexo 1	Gráfica de ISOPLOT de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.	55
Anexo 2	Gráfica de isoabsorbancia tridimensional (3D) de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.	56
Anexo 3	Linealidad del sistema preparada con principio activo, de senósidos en tabletas de chocolate. Lima-2019.	57
Anexo 4	Linealidad del método preparada con principio activo cargado con placebo, de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.	58
Anexo 5	Resumen de los resultados de especificidad y linealidad. Lima – 2019.	59
Anexo 6	Resumen de los resultados de exactitud, precisión y robustez. Lima – 2019.	60
Anexo 7	Cromatograma de diluyente y placebo de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.	61
Anexo 8	Cromatograma de estándar (principio activo) y muestra (principio activo más placebo) de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.	62
Anexo 9	Matriz de consistencia.	63

RESUMEN

En la industria farmacéutica para el desarrollo de un nuevo producto farmacéutico es necesario la utilización de un método analítico que permita cuantificar el principio activo y el método por cromatografía líquida es de uso rutinario, por ser un método preciso y exacto; con la validación se obtiene pruebas documentadas y demostrativas para que el método sea fiable y reproducible, por ello el presente trabajo tiene como objetivo desarrollar y validar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de senósidos en tabletas de chocolate y documentar los resultados obtenidos, que se realizó en el Laboratorio Medifarma S.A. de Lima, el tipo de investigación fue descriptivo con muestreo aleatorio simple. Las condiciones cromatográficas empleadas son: una columna L11 (Phenyl) 15 cm x 4,6 mm x 5 μ m, temperatura del horno a 40 °C y longitud de onda a 274 nm, la fase móvil con gradiente de flujo que oscila entre 0,4 y 1,5 mL/minuto y de solvente compuesta por buffer fosfato pH 3,5 y Acetonitrilo, volumen de inyección 40 μ L. Los parámetros de validación evaluados permitieron comprobar que existe una adecuada especificidad, es lineal a concentraciones de 0,07; 0,11; 0,15; 0,19 y 0,23 mg/mL que muestran un coeficiente de correlación de 0,9996, con una precisión expresada como coeficiente de variación menor a 2 %, un porcentaje de exactitud del 98,6 % y la robustez que se evaluaron después de 24 horas con C.V. (%) \leq 2 %. Se concluye que el método propuesto es apto para la cuantificación de senósidos en tabletas de chocolate.

Palabras clave: desarrollo, validación, HPLC, senósidos.

I. INTRODUCCIÓN

En la Industria Farmacéutica para el desarrollo de un nuevo producto farmacéutico es necesario la utilización de un método analítico específico que permita cuantificar el principio activo de una formulación. Es por ello para asegurar la confiabilidad, los métodos analíticos se someten a un proceso de validación. La validación de los métodos analíticos se fundamenta en la determinación de diversos parámetros, que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan¹.

El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que es apto para el propósito indicado². Por ende varios organismos reguladoras como la Food and Drug Administration (FDA), Agencia Nacional de vigilancia Sanitaria (ANVISA), Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas (DIGEMID) y Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) y las referencias como la The United States Pharmacopeia (USP), International Conference on Harmonisation (ICH) y Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), exigen y recomiendan la validación como requisito imprescindible para el cumplimiento de la Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL)^{1,2}.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) tiene una amplia gama de aplicaciones y como tal está basado como una técnica automatizada que permite analizar de forma rápida y eficiente la separación, cuantificación y detección de las muestras por medio de la identificación de los picos en los cromatogramas, que esta puede ser optimizado mediante el ajuste de varias variables en el método (pH de la fase móvil, concentración del buffer, flujo, temperatura de la columna, longitud de onda del detector, etc.) que a su vez debe controlarse para lograr las separaciones deseadas^{3,4}.

Con la cromatografía líquida de alta resolución que presenta ventajas sobre los métodos tradicionales se pretende obtener una técnica analítica con tiempos de

análisis rápidos, separación de sustancias de mezclas complejas con alta resolución, ejecución de análisis con rapidez y exactitud, obteniendo errores relativos menores al 2 %. Además, el beneficio de la tecnología, al brindar un sistema automatizado que inyecta la muestra, realiza la separación, establece la identificación de cada pico y su concentración para luego repetir el ciclo con la muestra siguiente⁴.

El uso de las plantas medicinales en la salud complementaria es tan antiguo como la aparición de la especie humana, porque desde el principio de la civilización son parte de las prácticas de atención familiar y comunitaria. Entre las distintas prácticas complementarias utilizadas y difundidas a través de la cultura popular, las plantas medicinales siempre ocupan lugar destacado y durante mucho tiempo fue el principal recurso terapéutico utilizado para tratar la salud de las personas y sus familias, con el comienzo de la medicina moderna, este conocimiento vino a ser devaluado por profesionales de salud poniendo en énfasis en medicamentos industrializados. Sin embargo, en la actualidad se están restableciendo el uso de las plantas medicinales en la salud y cabe resaltar que los senósidos son un laxante natural de origen vegetal para el tratamiento de la constipación leve provocada por malos hábitos alimentarios, falta de ejercicio e inadecuada ingesta de fibra natural^{5,6}.

Para lo cual, en el presente trabajo de investigación se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Desarrollar y validar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de senósidos en tabletas de chocolate y documentar los resultados obtenidos.

Objetivos específicos:

- Desarrollar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en la cuantificación de senósidos en tabletas de chocolate.
- Determinar los parámetros de validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como: especificidad, Linealidad e intervalo, exactitud, precisión y robustez en la cuantificación de senósidos en tabletas de chocolate.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del estudio

En el año 2017 Bavand et al. publicaron un artículo que se titula “Desarrollo del método RP-HPLC y validación para la determinación de acetato de eptifibatida en sustancias farmacéuticas a granel y formas farmacéuticas de dosificación”, Irán, con el objetivo principal de desarrollar un método rápido, económico y validado para el ensayo y control de calidad del acetato de eptifibatida en sustancias farmacéuticas a granel y formas farmacéuticas terminadas. La separación cromatográfica se realizó usando elución isocrática a temperatura ambiente (25°C) en una columna Lichrospher® C18 (150 x 4,60 mm, tamaño de partícula 5 µm) con detección UV a 275 nm. La fase móvil estaba compuesta por la mezcla de Solución A (0,1 % v/v de ácido trifluoroacético en agua) y Solución B (0,1 % v/v de ácido trifluoroacético en acetonitrilo) en la proporción de (68:32 v/v). El volumen de flujo se ajustó a 1,0 mL/min y el volumen de inyección fue de 20 µL. La absorbancia máxima de acetato de eptifibatida mostró a 219 y 275 nm, se seleccionó la longitud de onda de 275 nm basándose en la pureza de pico. Es lineal con un coeficiente de correlación de 0,997, en rango de concentración de 0,15 a 2 mg/mL. Exacto con un porcentaje de recuperación de 96,36 a 103,18 %. Concluyendo que se desarrolló un método simple, rápido y validado según las pautas de ICH para la cuantificación de acetato de eptifibatida en formulación farmacéutica⁷.

En 2017 Bor et al., realizaron un estudio que lleva por título “Validación de un método por RP-HPLC para la determinación de Tiocolchicósido en tabletas”, Venezuela, el trabajo tiene como objetivo describir una nueva metodología analítica y su validación para la determinación de Tiocolchicósido en tabletas, utilizando la técnica analítica HPLC. Utilizando un cromatógrafo líquido de alta eficiencia de la casa comercial Waters y una Columna Sunfire C18 (L1) 250 mm x 4,6 mm x 5 µm. Las condiciones experimentales del cromatógrafo líquido fueron

las siguientes: fase móvil compuesta por metanol: acetonitrilo: agua (30:10:60) ajustada a pH 8,0 con ácido o-fosfórico 85 %. Flujo de fase móvil fue de 0,8mL/min, volumen de inyección de 20 µL y longitud de onda de 371 nm. Los resultados obtenidos en los parámetros de validación son: específico para el analito y preciso, tiene un comportamiento lineal en el rango de 0,020 a 0,060 mg/mL y un coeficiente de determinación de 0,999, exacto con un porcentaje de recuperación de 99,16 % y el 100,46 %. Concluyen que el método analítico propuesto para la evaluación de tabletas de Ticolchicósido permiten cuantificar el fármaco con un alto grado de confianza y puede ser aplicado como un método rutinario para pruebas de control de calidad y como un indicador de estabilidad⁸.

En 2017 Rodríguez et al., realizaron un trabajo titulado “Desarrollo y validación de un método para cuantificación de acetaminofén en supositorios mediante HPLC-DAD utilizando una variación del método QuEChERS”, Honduras, buscando con su trabajo desarrollar un método alternativo para determinar acetaminofén en supositorios, efectuando una variación al procedimiento de QuEChERS y empleando la separación mediante HPLC-DAD que recomienda la farmacopea, las condiciones cromatográficas utilizadas fueron una columna Alltima C18 de 150 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula de 5 µm, a una temperatura del horno de 45 °C. El volumen de flujo de la fase móvil fue de 1,5 mL/min y el volumen de inyección se fijó en 15 µL de las soluciones del estándar y las muestras. El detector de arreglo de diodos se controló a una longitud de onda de 243 nm. La fase móvil empleada fue agua-metanol (70:30) de grado HPLC. El tiempo de retención para el pico cromatográfico fue poco después de los dos minutos. Para la linealidad del método se obtuvo un coeficiente de correlación 0,999 en cinco diferentes concentraciones finales desde 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 y 20,0 partes por millón (ppm) y por triplicado. Concluyendo que el método desarrollado puede ser aplicado para el análisis de acetaminofén en supositorios, con iguales resultados al de la farmacopea, con la ventaja de ser más rápido, menos costoso y amigable con el ambiente y validado según las recomendaciones de ICH⁹.

En el año 2017 Sanabria et al., publicaron un trabajo titulado “Validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de cafeína en un ensayo de permeación *in vitro* empleando mucosa oral porcina”, Colombia, donde tienen como objetivo validar un método por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detector arreglo de diodos (HPLC-DAD) para cuantificar cafeína y

llevar a cabo un estudio de permeación con este activo, empleando mucosa bucal porcina como membrana de estudio, empleando un cromatógrafo Shimadzu con detector de arreglo de diodos (DAD) y una columna cromatográfica Kromasil® C18, 150 mm x 4,6 mm x 5 µm, las condiciones cromatográficas fueron: temperatura isocrática de 30 °C, utilizando como fase móvil Agua-Acetonitrilo (80:20 v/v), con un flujo 1 mL/min, volumen de inyección 10 µL y longitud de onda 273 nm. Las características de desempeño evaluadas permitieron comprobar que existe una adecuada selectividad, una linealidad entre 0,5 y 50 µg/mL, con una precisión expresada como RSD menor a 2 %, un porcentaje de recuperación del 99,9 % y unos límites de detección y cuantificación para el método de 2,99 y 2,69 ng/mL respectivamente. Donde concluyen que el método propuesto es útil para determinar el perfil de liberación bucal de la cafeína mediante un estudio *in vitro* con celdas de Franz empleando membrana bucal porcina¹⁰.

En 2016 Iveth et al., publicaron un trabajo titulado “Desarrollo y validación de un método para la cuantificación de atorvastatina en tabletas mediante HPLC-DAD”, Honduras, con el objetivo de determinar un método para la identificación y cuantificación de atorvastatina (ATO) en comprimidos mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). Se optimizó la mejor separación del analito con una separación en gradiente isocrática, con una fase móvil compuesta de agua ajustando a pH 3,0 con ácido orto fosfórico y acetonitrilo (50:50). El analito se logró separar utilizando una columna C18 de 150 x 4 mm, con un tamaño de partícula de 5 µm, a una temperatura de 40 °C y la longitud de onda del detector fue de 245 nm. El método fue validado siguiendo las recomendaciones recogidas por la Conferencia Internacional de Armonización (ICH), observándose buenas relaciones lineales para los analitos (r mayor que 0,998). La precisión y exactitud de los resultados intra e interdías fue del 98,0 al 102,0 %. Donde concluyen que el procedimiento propuesto es válido y aplicó con éxito para la determinación del compuesto en preparados farmacéuticos de comprimidos con buena exactitud y precisión (sin interferencia de excipientes), con lo cual el método se puede aplicar a los análisis de rutina del referido compuesto¹¹.

En el año 2018 Márquez, KL, publicó un trabajo titulado “Desarrollo y validación de un método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la cuantificación de Linezolidina en comprimidos”, en la Universidad Nacional de Trujillo, utilizando como fase móvil Agua: Acetonitrilo (70:30) y las condiciones

cromatográficas: 254 nm de longitud de onda; 1,0 mL/min de flujo, 10 μ L de volumen de inyección y 5 minutos de tiempo de corrida. El método utilizado fue específico para el analito. La linealidad de sistema y linealidad del método presentaron coeficientes de correlación de 0,9999 y 0,9999 respectivamente; por lo tanto, la linealidad es conforme. Para la repetibilidad se obtuvo un DSR de 0,11 %. El RSD para la precisión intermedia resultó 0,10 %. En el parámetro de exactitud el porcentaje de recuperación fue de 100,23 % con un DSR 0,30 %. En el parámetro de robustez se evaluó la estabilidad de las muestras en 2 condiciones: en muestras después de 24 horas a temperatura ambiente y en refrigeración, donde se observó que los resultados de Linezolida cumplen con el criterio de aceptación siendo la RSD y la diferencia absoluta entre las muestras iniciales y la nueva condición ≤ 2 %. Concluyendo que el método analítico es válido para la cuantificación de en Linezolida comprimido 600 mg/tab¹².

En el año 2017 Guarniz, D, publicó un trabajo titulado “Validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la disolución de Ezetimiba 10 mg y Simvastatina 40 mg en tabletas”, en la Universidad Nacional de Trujillo, con el objetivo de validar un método analítico por HPLC para la disolución de Ezetimiba 10 mg y Simvastatina 40 mg en tabletas. Las condiciones cromatográficas: 238 nm de longitud de onda, 0,7 mL/min de flujo, 20 μ L de volumen de inyección y 22 minutos de tiempo de corrida. El método utilizado fue específico para el analito. El estándar, muestra y placebo fueron analizados individualmente donde no se evidenció interferencia alguna. Los porcentajes de recuperación fueron de 100,169 % y 100,051 %, Para Precisión, se obtuvieron DSR aceptables (< 3 %). La linealidad presentó coeficientes de correlación de 0,9995 y 0,9996. Concluyendo que los parámetros de validación fueron conformes y permiten dar como validado el método analítico propuesto para la disolución de Ezetimiba 10 mg y Simvastatina 40 mg en tabletas¹³.

En el año 2017 Román, L, publicó un trabajo “Desarrollo de un método cuantitativo por HPLC para la determinación de ácido fenilgloxílico y ácido mandélico, como indicadores biológicos de la exposición a estireno”, en la Universidad Nacional Mayor San Marcos, con el objetivo de desarrollar un método para cuantificar ácido fenilgloxílico y ácido mandélico por HPLC. Las condiciones cromatográficas post ensayos preliminares son: columna C18 x 4,6 mm x 150 mm (5 μ m); flujo 0,8 mL/min; volumen de inyección 5 μ L; fase móvil buffer K_2HPO_4 10 mM pH 2,8: Acetonitrilo (90:10); longitud de onda: 254 nm; temperatura 30 °C. La veracidad

del método para el análisis de ácido fenilgloxílico en orina se determinó con Bio-rad (MRC: muestra de referencia certificada). Los resultados de ácido fenilgloxílico fueron 45,407 mg/L (Bio-Rad Nivel 1) y 218,085 mg/L (Bio-Rad Nivel 2). Se aplicó la t-Student en los datos señalados, cuyos resultados no se diferenciaron significativamente al valor de la MRC. Se usó la recuperación para determinación de la veracidad de ácido mandélico. El promedio de las recuperaciones en el Nivel 1 (99,9827) y en el Nivel 2 (99,9727) no presentó diferencia significativa con respecto al valor teórico (recuperación 100 %). Concluyendo que se desarrolló un método óptimo, confiable, sencillo y viable por HPLC para la determinación ácido fenilgloxílico y ácido mandélico como indicadores biológicos de la exposición a Estireno¹⁴.

En el año 2016 Samaniego, JW, publicó un trabajo “Desarrollo y validación de una técnica analítica por HPLC para calificar la equivalencia farmacéutica in vitro de cuatro medicamentos conteniendo paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato en tabletas”, en la Universidad Nacional Mayor San Marcos, con el objetivo de desarrollar y validar una técnica analítica por HPLC para calificar la equivalencia farmacéutica en tabletas. Las condiciones cromatográficas son: fase móvil una solución fosfato monobásico de potasio pH 3,5 que se ajustó con ácido fosfórico al 85%, flujo de 0,5 mL/min hasta el minuto 7,0 y luego se aumentó el flujo a 1,0 mL/min hasta el minuto 22,0 de forma constante hasta el minuto 35,0; luego se disminuyó el flujo a 0,5 mL/min hasta el minuto 40,0, midiendo la gradiente de acetonitrilo a los 22,0 minutos en un 20% hasta el minuto 35,0 y luego continuo con fase móvil; la temperatura de la columna fue de 30 °C y el volumen de inyección de 20µL. Las longitudes de onda UV empleadas son de, 202 nm para fenilefrina clorhidrato, 298 nm para paracetamol y 205 nm para clorfeniramina maleato. Se determinó que el método es específico para cada principio activo, es lineal con coeficientes de correlación mayor a 0,99, coeficientes de determinación mayor a 0,98 y coeficientes de variación menor a 2 %, es exacto con recobros de cada principio activo % R = 98 a 102 y % CVR total ≤ 2. Preciso, evaluando seis muestras la repetibilidad con desviación estándar (S), coeficiente de variación (CV) ≤ 4,0 % y robusto evaluando muestras después de 24 horas la desviación estándar relativa (DSR) ≤ 2 %. Los perfiles de disolución por método estadístico (f1) y (f2), revelando curvas de disolución distintas entre el producto de referencia y dos productos de estudio, con f1 y f2 fuera de rangos establecidos en dos de las cuatro formulaciones evaluadas. Concluyendo que se logró desarrollar una técnica

analítica validada, estableciendo que es específico, lineal, veraz, preciso y robusto, determinando tres medios de disolución donde de cuatro formulaciones evaluadas dos de ellos no son equivalentes farmacéuticos *in vitro*¹⁵.

En 2014 Ccorimanya, KA, publicó un trabajo “Desarrollo y validación prospectiva de una técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para cuantificar Lidocaína base en una pomada”, en la Universidad Católica de Santa María, con el objetivo de desarrollar un método para cuantificar Lidocaína base en pomada por HPLC. Las condiciones cromatográficas son de sistema isocrática en fase reversa, columna L1 (octadecilsilano) 150 mm x 4,6 mm x 5 µm Zorbax Extend, la fase móvil compuesta por Metanol: Buffer fosfato pH 8.0 (75:25), con un flujo de 1,0 mL/minuto, temperatura de 25 °C, la longitud de onda fijada en el detector UV fue 230 nm y el volumen de inyección de 10 µL. El tiempo de retención fue de 3,5 minutos estableciéndose un tiempo de corrida de 8,0 minutos. Se evaluaron los parámetros como la linealidad, precisión, exactitud, especificidad y rango, obteniéndose resultados adecuados lo que se demostró mediante el diseño experimental que la metodología analítica es lineal dado que se obtuvo un coeficiente de correlación $r = 0,9991$; es precisa ya que el coeficiente de variación (CV) de la precisión instrumental para las áreas y los tiempos fue $\leq 2,0 \%$; la repetibilidad tuvo un $CV = 1,00 \%$; la precisión intermedia tuvo un $CV = 0,8 \%$; es exacta con una recuperación media de 99,59 %; es específica dado que no se evidenció interferencia de productos degradados o de los excipientes en el análisis del principio activo. Concluyendo que el método desarrollado es confiable, consistente y puede emplearse en los análisis de rutina del Laboratorio¹⁶.

En 2013 Enciso M, realizó un trabajo titulado “Validación de la técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para la determinación de fenilefrina clorhidrato, guaifenesina y dextrometorfano bromhidrato en jarabe. Lima -2013”, en la Universidad Nacional San Cristóbal Huamanga, con el objetivo de validar una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance, (HPLC) para la determinación de contenido de dextrometorfano bromhidrato, fenilefrina clorhidrato y guaifenesina en jarabe. Para los parámetros de validación en el análisis de fenilefrina clorhidrato y guaifenesina se usó fase móvil, diluyente y una solución de muestra con una concentración final de 0,05 mg/mL y 1 mg/mL respectivamente, se usó una columna Eclipse XDB-Phenyl C18 de 4,6 x 250 mm 5 µm, mientras en el análisis del dextrometorfano bromhidrato se usó fase móvil y una solución de muestra con una concentración final de 0,1 mg/mL, se usó

una columna de eclipse XDB-C18 de 4,5 x 150 mm 5 µm; el método es específico sin presentar interferencia, es lineal con coeficiente de correlación de 0,99959 para la fenilefrina clorhidrato, 0,99997 para la guaifenesina y 0,99983 para el dextrometorfano bromhidrato. Exacto con un porcentaje de recuperación de 99,80 % para fenilefrina clorhidrato, 99,56 % para guaifenesina y 99,78 % para dextrometorfano bromhidrato en un rango de 80-120 %. Preciso con un Coeficiente de Variación de la repetibilidad de 0,65 % para la fenilefrina clorhidrato, 0,34 % para la guaifenesina y 1,23 % para el dextrometorfano bromhidrato, la desviación estándar relativa porcentual de la precisión intermedia fue de 0,61 % para la fenilefrina clorhidrato, 0,090 % para la guaifenesina y 0,342 % para el dextrometorfano bromhidrato y Robusto. Donde Concluye que el método analítico propuesto es lineal, exacto, preciso, reproducible, selectivo y presenta robustez, comprobándose así su validez¹⁷.

2.2. Validación

La validación de un procedimiento analítico es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, donde tiene como objetivo principal asegurar y demostrar que un procedimiento analítico seleccionado dará resultados reproducibles y confiables que sean adecuados para el propósito previsto. Que debe entenderse claramente ya que este rige las características o parámetros de validación como: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, intervalo y robustez^{18,19}.

2.2.1. Parámetros de validación

Especificidad: es como 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. Otras autoridades como la IUPAC usan el término de selectividad que se refiere a la medida en que el método se puede usar para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar^{18,19,20}.

La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede compensarse usando otros procedimientos analíticos complementarios que tienen implicancias en:

- **Pruebas de identificación:** aseguran o garantizan la identidad del analito.
- **Pruebas de pureza:** garantizan que todos los procedimientos analíticos efectuados permiten declarar con exactitud el contenido de impurezas de

un analito (por ejemplo, prueba de sustancias relacionadas, límite de metales pesados o impurezas orgánicas volátiles).

- **Valoraciones:** proporcionan un resultado exacto, que permite una declaración exacta del contenido o potencia del analito en una muestra^{18,19}.

Linealidad: la linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad para obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales por medio de una transformación matemática bien definida, a la concentración (cantidad) de analito en muestras dentro de un intervalo dado^{18,19}.

Intervalo: el intervalo de un procedimiento analítico es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito (incluyendo estos niveles) 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^{18,19}.

Exactitud: la exactitud de un procedimiento analítico es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese procedimiento y el valor verdadero, que a veces se le denomina con el término de veracidad. La exactitud de un procedimiento analítico debe establecerse en todo su intervalo; que se determina en la valoración de un fármaco, valoración de un fármaco en un producto formulado y el análisis cuantitativo de impurezas¹⁸.

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 y como recomendación de ICH y AEFI la exactitud se debe evaluar 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)^{18,19,21}.

Precisión: la precisión del procedimiento es el grado de concordancia entre los resultados de los análisis individuales cuando se aplica el procedimiento analítico 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 mediciones¹⁸.

- **La reproducibilidad:** se refiere al uso del procedimiento analítico en diferentes laboratorios. La reproducibilidad debe considerarse en el caso de la estandarización de un procedimiento analítico, por ejemplo, para la

inclusión de procedimientos en las farmacopeas o en un estudio en colaboración.

- **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 medida en que se debe establecer la precisión intermedia depende de las circunstancias en las que se pretende utilizar el procedimiento.
- **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, que debe evaluarse utilizando un mínimo de 9 determinaciones que cubren el rango especificado para el procedimiento (por ejemplo, 3 concentraciones y 3 repeticiones de cada una); o un mínimo de 6 determinaciones al 100% de la concentración de prueba^{18,19,21}.

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 indicados en la documentación, y provee una indicación de su aptitud durante condiciones normales de uso. La robustez puede determinarse durante la etapa de desarrollo del procedimiento analítico^{18,21}.

2.2.2. Tipos de procedimientos analíticos a validar

La discusión de la validación de los procedimientos analíticos está dirigida a los cuatro tipos más comunes de procedimientos analíticos:

- Pruebas de identificación.
- Pruebas cuantitativas de contenido de impurezas.
- Pruebas de límite para el control de impurezas;
- Pruebas cuantitativas como disolución, valoración del contenido en un producto farmacéutico¹⁹.

Tabla 1: Tipos de procedimientos a validar según International Conference on Harmonisation (ICH)¹⁹.

Tipo de procedimiento analítico.	Identificación	Pruebas de impurezas	Valoración	Disolución
Características		Cuantificación	Límite	Contenido
Exactitud	-	+	-	+
Precisión				
Repetibilidad	-	+	-	+
Precisión intermedia	-	+ (1)	-	+ (1)
Especificidad (2)	+	+	+	+
Límite de detección	-	- (3)	+	-
Límite de cuantificación	-	+	-	-
Linealidad	-	+	-	+
Intervalo	-	+	-	+

- Significa que esta característica no se evalúa normalmente.

+ Significa que esta característica es normalmente evaluada.

(1) En los casos en que se haya realizado reproducibilidad, la precisión no es necesaria.

(2) La falta de especificidad de un procedimiento analítico podría ser compensada por otro apoyo a los procedimientos analíticos.

(3) Puede ser necesario en algunos casos.

2.2.3. Categorías de validación¹⁸.

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, la disolución, liberación de fármacos entre otros).

Categoría IV: Pruebas de identificación, que por lo general se aplican a la validación de métodos espectroscópicos cualitativos de identificación. Sin

embargo, las diversas técnicas se pueden usar para distintos propósitos, y el uso específico del método.

Tabla 2: Datos requeridos para la validación según la farmacopea de los Estados Unidos de América (USP 42 – NF 37)¹⁸.

Características de desempeño analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis cuantitativo	Pruebas de límite		
Exactitud	Si	Si	a	a	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	a	Si
Límite de detección	No	No	Si	a	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	a	No
Linealidad	Si	Si	No	a	No
Intervalo	Si	Si	a	a	No

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

2.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía de líquida de alta resolución es un tipo de cromatografía de elución más versátil y ampliamente utilizado como una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida, que se emplean para separar y determinar mezclas complejas de diversos materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos. El gran poder de la cromatografía reside en la combinación de un amplio intervalo de posibles propiedades para la fase móvil, junto con la elección de numerosos tipos de fases estacionarias, significativamente diferentes, así como una amplia variedad de detectores^{18,22,23}.

2.3.1. Partes del HPLC

a) Recipientes de fase móvil y sistemas de solventes

Los aparatos de HPLC modernos tienen un equipamiento con uno o más recipientes de vidrio de 500 mL o más de un disolvente. Incluyen accesorios para eliminar los gases disueltos y partículas en suspensión de los líquidos. Los gases disueltos producen burbujas en la columna y pueden causar ensanchamiento de la banda; además, las burbujas como las partículas interfieren en el rendimiento de muchos detectores. Los desgasificadores pueden consistir en un sistema de

bomba de vacío, uno de destilación, un dispositivo para calentamiento y agitación o, un sistema de burbujeo o sparging que es un proceso en el que los gases disueltos se extraen de un disolvente mediante el burbujeo de un gas inerte e insoluble²².

Se conocen dos formas de elución:

- **Elución Isocrática:** la composición de fase móvil permanece constante.
- **Elución en gradiente:** la composición del disolvente cambia de manera continua o escalonada. Para trabajar en esta modalidad el cromatógrafo debe disponer de un sistema de programación de gradiente, que permita la mezcla reproducible de disolventes en distintas proporciones durante la separación cromatográfica^{22,24}.

b) Sistema de bombeo

Los aparatos de HPLC incluyen un sistema de bombeo de solventes de alta presión para forzar el paso de la fase móvil a través de la columna, cuyo relleno muy compacto, es responsable de una sobrepresión. Los requisitos de las bombas de la cromatografía incluyen: capacidad para generar presiones de hasta 6000 psi, salida libre de pulsos, velocidades de flujo 0,1 – 10 mL/min, reproducibilidad relativa de los flujos de 0.5% o mejor y resistencia a la corrosión por diversos disolventes²².

c) Sistema de inyectores

La inyección de la muestra en un HPLC es de suma importancia, para lo cual un inyector ideal debe introducir la muestra en la columna como una banda lo más estrecha posible, ser de fácil manejo, dar lugar a resultados reproducibles, tanto en la cantidad de muestra inyectada como en el ensanchamiento que origina en la banda cromatográfica y ser capaz de trabajar a presiones elevadas. Muchos instrumentos HPLC incluyen un muestreador dotado de un inyector automático, que permite la inyección continua de volúmenes variables. El sistema de inyección de muestras más usados se basa en unos bucles intercambiables de una amplia gama de tamaño 5 a 500 μL ²².

d) Columnas para HPLC

Las columnas HPLC son tubos rectos de acero inoxidable, a veces se utiliza tubos de vidrio o Tygon para aplicaciones de baja presión que miden entre 3 y 30 cm de longitud. Su diámetro entre 2 – 5 mm. Los rellenos o empaquetamientos suelen tener de 3 – 10 μm que comúnmente se prepara con partículas de sílice, que se sintetizan por aglomeración de partículas submicrónicas de sílice en condiciones

que producen partículas más grandes y de diámetro muy uniforme. Las partículas resultantes suelen cubrirse con películas orgánicas finas que se enlazan química o físicamente con la superficie. Otros materiales de relleno son las partículas de alúmina, partículas de polímero poroso o resinas de intercambio iónico²².

- **Precolumnas:** se utilizan muchas veces para alargar la vida de la columna analítica con el objetivo de retener impurezas de la muestra que podrían perjudicar la columna cromatográfica. El empaquetamiento de la precolumna es similar al de la columna analítica, pero con mayor tamaño de partícula.
- **Termostato para columna:** no suele ser necesario un control estricto de la temperatura de la columna. Sin embargo, es frecuente que se obtengan mejores cromatogramas y resultados reproducibles al mantener temperaturas de columna constante a unas décimas de grado Celsius²².

e) **Detectores**

Los detectores de HPLC deben tener una celda de flujo de volumen mínimo y compatible para no provocar ensanchamiento de las bandas, algunos de los detectores más usados son:

Detector de absorbancia.

Detector de fluorescencia.

Detector electroquímico.

Detector de índice de refracción.

Detector de conductividad.

Detector de espectrometría de masas²⁴.

2.4. Senósidos

Los senósidos son un complejo natural de glicósidos de antraquinona que se encuentran en el sen, aislado de *Cassia angustifolia* en forma de sales de calcio y que contiene 55 – 65% de estas. Este compuesto se describe como polvo pardusco; donde el pH es de 6,3 a 7,3 en una concentración de 100 mg/mL en agua. Farmacológicamente es una droga laxante²⁵.

***Cassia angustifolia* Vahl.**

Nombre científico: *Cassia angustifolia* Vahl.

Nombres vulgares: Sen, sen de la India o de Tinnevely.

2.4.1. Descripción de la planta

Es un arbusto de hasta 1 – 1,5 m de altura. Las hojas son alternas paripinnadas, con 5 – 8 pares de folíolos oval-lanceolados. Las flores son zigomorfas y están

agrupadas en racimos axilares. El cáliz tiene 5 sépalos casi iguales. La corola está formada por 5 pétalos de color amarillo vivo, con nerviaciones pardas. El androceo tiene diez estambres libres, de los que 3 son estériles. El fruto es una legumbre aplanada, lisa, dehiscente, algo curvada, con 6 – 8 semillas aplanadas²⁶.

2.4.2. Origen y ecología

Cassia angustifolia es originaria de las regiones predesérticas de Arabia y existe silvestre en Yemen y en Somalia. La planta requiere un clima cálido, en el que la temperatura no descienda de 10 °C²⁶.

2.4.3. Cultivo

Se cultiva en grandes cantidades en el Sur de la India, región de Tinnevely, de donde proviene casi toda la droga comercial.

2.4.4. Composición química

Los principios activos están constituidos por heterósidos hidroxiantracénicos, principalmente diantrónicos, como los senósidos A, B, C y D, y porcentajes pequeños de otros heterósidos hidroxiantracénicos, sobre todo 8-O-glucosil-áloe-emodina y 8-O-glucosil-reína, y antraquinonas libres.

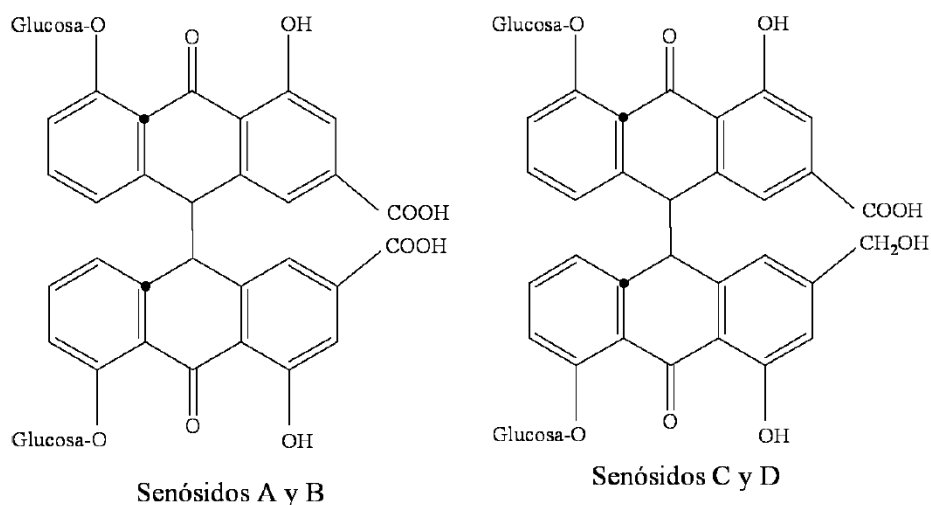


Figura 1: Estructura química de senósidos A, B, C y D

2.4.5. Acción farmacológica

Cassia angustifolia tiene acción laxante, debido a su contenido en heterósidos hidroxiantracénicos, que se manifiesta después de 6 a 12 horas de la administración oral. Dichos heterósidos llegan sin ser absorbidos al intestino grueso, donde son hidrolizados y transformados en los correspondientes metabolitos activos, por acción de las enzimas de la flora intestinal. Provocan un aumento del peristaltismo

intestinal y de la secreción de agua y electrolitos hacia la luz intestinal, con el consiguiente efecto laxante²⁶.

2.5. Laxante

Los laxantes son drogas que aceleran el pasaje de las heces o bien disminuyen la constipación fecal, actúan favoreciendo uno o más de los mecanismos que producen la diarrea. Sin embargo, la constipación es un síntoma que refleja un problema subyacente, además la constipación tiene diferentes significados en el caso de diferentes personas, pero, en general, se refiere a heces muy pequeñas, demasiado frecuentes o muy difíciles de expulsar²⁵.

Categoría de los laxantes de acuerdo a su mecanismo de acción

- **Los laxantes estimulantes:** actúan por diversos mecanismos que incluyen la inhibición de la absorción, el aumento de la secreción y efectos sobre la motilidad, como el bisacodilo, derivados de difenilmetano y laxantes antraquinónicos.
- **Los laxantes salinos:** ejercen un efecto osmótico que aumenta el contenido de agua y el volumen de las heces, como el citrato de magnesio y el fosfato de sodio.
- **Los laxantes hiperosmóticos:** ejercen un efecto osmótico y pueden tener cierto efecto sobre la motilidad intestinal, como la lactulosa.
- **Los laxantes aumentadores de volumen:** consisten en polisacáridos y derivados de la celulosa que son indigeribles. Como absorben agua aumentan el volumen de las heces y al hacerlo proporcionan un estímulo fisiológico para la defecación. También pueden afectar la composición de los ácidos biliares, con el consiguiente efecto sobre la absorción y la secreción de agua por parte del intestino.
- **Los laxantes lubricantes:** permiten el pasaje más fácil de las heces al cubrirlas con una capa oleosa. También pueden inhibir la reabsorción colónica de agua, como el aceite mineral.
- **Los laxantes emolientes:** son surfactantes que facilitan la mezcla de agua y sustancias lipídicas solubles para ablandar las heces; también estimulan la secreción de agua en tracto gastrointestinal, como el docusato de sodio²⁵.

Placebo: es la mezcla de todos los excipientes (matriz del producto farmacéutico) menos el principio activo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en los ambientes de Laboratorio Farmacéutico Medifarma S.A., ubicado en distrito Ate del departamento Lima.

3.2. Definición de la población y muestra.

Población: lote piloto de 20 kilos de tabletas de chocolate, elaborado en el área de investigación y desarrollo del Laboratorio Farmacéutico Medifarma S.A.

Muestra: 500 g de placebo de tabletas chocolate, que se realizó con muestreo de aleatorio simple.

Estándar de referencia: se usó estándar secundario de senósidos.

Nombre : Senósidos.

Lote : MP00010518 – 1.

Potencia : 61,7 % T/C Senósidos.

Fecha de expira : abril 2021.

3.3. Metodología y recolección de datos.

3.3.1 Desarrollo del método analítico.

Fase móvil:

Solución A (Buffer fosfato pH 3,5): se pesó 6,8 g de fosfato monobásico de potasio, se disolvió y se llevó a 1000 mL con agua purificada, se ajustó a pH 3,5 con ácido fosfórico.

Solución B: acetonitrilo

Sistema cromatográfico

Fase móvil : solución A y solución B en gradiente.

Columna cromatográfica : L11(Fenilo), 150 mm x 4,6 mm x 5 µm.

Detector : UV, 274 nm.

Temperatura : 40 °C

Volumen de inyección : 40 µL.

Tiempo de retención : 15,0 minutos aproximadamente

Tiempo de corrida : 50 minutos.

Velocidad de flujo : 0,4 mL/min. (gradiente ver tabla 3)

Tabla 3: Elución en gradiente de la fase móvil de solución A y solución B. Lima – 2019.

Tiempo	Solución A	Solución B	Flujo
0,0	92,0	8,0	0,4 mL/min.
5,0	92,0	8,0	0,4 mL/min.
15,0	92,0	8,0	0,4 mL/min.
22,0	92,0	8,0	0,4 mL/min.
23,0	92,0	8,0	1,0 mL/min.
24,0	92,0	8,0	1,5 mL/min.
33,0	92,0	8,0	1,5 mL/min.
34,0	92,0	8,0	1,0 mL/min.
35,0	92,0	8,0	0,4 mL/min.
50,0	92,0	8,0	0,4 mL/min.

Preparación de estándar

Se pesó aproximadamente 25 mg de Estándar de Referencia (ER) senósidos (equivalente aproximadamente a 15 mg de senósidos) y se transfirió a una fiola de 100 mL, se agregó 25 mL de solución buffer pH 3,5, se llevó al ultrasonido por 10 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y diluyó a volumen con el mismo solvente. Se homogenizó y filtró por membrana de 0,45 μ m y se inyectó. (concentración aproximadamente 0,15 mg/mL de senósidos).

Preparación de muestra

Se refrigeró 18 tabletas para luego desmenuzar con un rallador, se pesó aproximadamente 1167 mg de muestra (equivalente a 15 mg de senósidos) y se transfirió a una fiola de 200 mL, se adicionó 25 mL de éter de petróleo y se llevó a un baño maría de 50 °C (no tapar las fiolas) y se agitó intermitentemente durante 5 minutos hasta dispersar por completo. Se adicionó 100 mL de solución buffer fosfato pH 3,5 se calentó en baño maría y se agitó de manera intermitente durante 30 minutos, se filtró de inmediato a través de papel Whatman, se dejó enfriar la solución obtenida y luego se filtró por membrana de 0,45 μ m e inyectar. (concentración aproximadamente 0,15 mg/mL de senósidos).

Cálculos

$$\text{senosidos mg/tab} = \frac{A M}{A St} \times \frac{W St}{100} \times \text{Pot St} \times \frac{100}{15} \times 1$$

Donde:

AM : área de la muestra.

ASt : área del estándar.

WSt : peso del estándar.

PotSt : potencia del estándar expresado en fracción decimal como tal cual.

3.3.2 Determinación de parámetros de validación.

Precisión instrumental

Para la evaluación de precisión instrumental se inyectó seis veces consecutivas una solución de estándar. Se determinó el Coeficiente de Variación (C.V.) de las áreas y de los tiempos de retención obtenidos. La desviación estándar relativa obtenida debe ser menor o igual a 2 %.

Especificidad

A. Determinación de posibles interferencias.

Se analizó el placebo, según el método desarrollado y se preparó una muestra de placebo con el principio activo al 100 % y se efectuó el análisis respectivo comparando la respuesta del análisis con la de un estándar. Se determinó la especificidad del método midiendo el grado de interferencia obtenida por la diferencia de los resultados del análisis del principio activo con y sin placebo. Los resultados obtenidos deben concordar con ± 2 % del teórico.

Estándar: (Se evaluó por duplicado).

Se pesó aproximadamente 25 mg ER senósidos, se transfirió a una fiola de 100 mL. Se continuó según la preparación de estándar del método desarrollado.

Placebo: (Se evaluó por duplicado).

Se pesó aproximadamente 1142,00 mg de placebo, se transfirió a una fiola de 200 mL. Se continuó según la preparación de muestra del método desarrollado.

Muestra: (Se evaluó por duplicado).

Se pesó aproximadamente 1142,00 mg de placebo y 25 mg ER senósidos, se transfirió a una fiola de 200 mL. Se continuó según la preparación de muestra del método desarrollado.

B. Determinación de interferencia de productos de degradación.

Se trató el placebo, principio activo y la muestra con los siguientes métodos de degradación artificial o hasta lograr una degradación del analito.

B.1. Fotólisis: se expuso en lámpara de luz UV por cinco días.

Estándar: (Se evaluó por duplicado).

Se pesó aproximadamente 25 mg ER senósidos, se transfirió a una fiola de 100 mL. (Fiola A)

Placebo: (Se evaluó por duplicado).

Se pesó aproximadamente 1142,00 mg de placebo, se transfirió a una fiola de 200 mL. (Fiola B)

Muestra: (Se evaluó por duplicado).

Se pesó aproximadamente 1142,00 mg de placebo y 25 mg ER senósidos, se transfirió a una fiola de 200 mL. (Fiola C)

Se colocó a exposición en lámpara de luz UV por cinco días a las fiolas (A, B y C). Se continuó según la preparación de estándar y muestra (Fiolas A, B y C) con el método desarrollado.

B.2. Termólisis: se calentó en estufa a 80 °C por 24 horas.

Estándar: (Se evaluó por duplicado).

Se pesó aproximadamente 25 mg ER senósidos, se transfirió a una fiola de 100 mL. (Fiola A)

Placebo: (Se evaluó por duplicado).

Se pesó aproximadamente 1142,00 mg de placebo, se transfirió a una fiola de 200 mL. (Fiola B)

Muestra: (Se evaluó por duplicado).

Se pesó aproximadamente 1142,00 mg de placebo y 25 mg ER senósidos, se transfirió a una fiola de 200 mL. (Fiola C)

Se colocó en la estufa a 80 °C por 24 horas a las fiolas (A, B y C) y se enfrió. Se continuó según la preparación de estándar y muestra (Fiolas A, B y C) con el método desarrollado.

B.3. Hidrólisis ácida: se trabajó con HCl durante dos horas a 80 °C y se neutralizó con NaOH.

Estándar: (Se evaluó por duplicado).

Se pesó aproximadamente 25 mg ER senósidos, se transfirió a una fiola de 100 mL. (Fiola A)

Placebo: (Se evaluó por duplicado).

Se pesó aproximadamente 1142,00 mg de placebo, se transfirió a una fiola de 200 mL. (Fiola B)

Muestra: (Se evaluó por duplicado).

Se pesó aproximadamente 1142,00 mg de placebo y 25 mg ER senósidos, se transfirió a una fiola de 200 mL. (Fiola C)

Se adicionó 5 mL de HCl 1,0 N a las fiolas (A, B y C), Se llevó a estufa a 80 °C por dos horas, Se enfrió y neutralizó con aproximadamente 5 mL de NaOH de 1,0 N. Se continuó según la preparación de estándar y muestra (Fiolas A, B y C) con el método desarrollado.

B.4. Hidrólisis alcalina: se trabajó con NaOH durante dos horas a 80 °C y se neutralizó con HCl.

Estándar: (Se evaluó por duplicado).

Se pesó aproximadamente 25 mg ER senósidos, se transfirió a una fiola de 100 mL. (Fiola A)

Placebo: (Se evaluó por duplicado).

Se pesó aproximadamente 1142,00 mg de placebo, se transfirió a una fiola de 200 mL. (Fiola B)

Muestra: (Se evaluó por duplicado).

Se pesó aproximadamente 1142,00 mg de placebo y 25 mg ER senósidos, se transfirió a una fiola de 200 mL. (Fiola C)

Se adicionó 5 mL de NaOH 0,5 N a las fiolas (A, B y C), Se llevó a estufa a 80 °C por dos horas, Se enfrió y neutralizó con aproximadamente 5 mL de HCl de 0,5 N. Se continuó según la preparación de estándar y muestra (Fiolas A, B y C) con el método desarrollado.

B.5. Oxidación: se trabajó con peróxido de oxígeno al 30 % durante dos horas.

Estándar: (Se evaluó por duplicado).

Se pesó aproximadamente 25 mg ER senósidos, se transfirió a una fiola de 100 mL. (Fiola A)

Placebo: (Se evaluó por duplicado).

Se pesó aproximadamente 1142,00 mg de placebo, se transfirió a una fiola de 200 mL. (Fiola B)

Muestra: (Se evaluó por duplicado).

Se pesó aproximadamente 1142,00 mg de placebo y 25 mg ER senósidos, se transfirió a una fiola de 200 mL. (Fiola C)

Se adicionó 2 mL de peróxido de oxígeno a las fiolas (A, B y C), Se llevó a estufa a 80 °C por dos horas, y se enfrió. Se continuó según la preparación de estándar y muestra (Fiolas A, B y C) con el método desarrollado.

Linealidad e intervalo

A. Linealidad del sistema

Se preparó 5 concentraciones que cubran el rango de trabajo, al 50 %, 75 %, 100 %, 125 % y 150 % de la concentración nominal del trabajo, por pesadas independientes.

- **Preparación al 50 %:** (se trabajó por triplicado).

Se pesó aproximadamente 12,50 mg ER senósidos, se transfirió a una fiola de 100 mL. Se continuó según la preparación de estándar del método desarrollado.

- **Preparación al 75 %:** (se trabajó por triplicado).

Se pesó aproximadamente 18,75 mg ER senósidos, se transfirió a una fiola de 100 mL. Se continuó según la preparación de estándar del método desarrollado.

- **Preparación al 100 %:** (se trabajó por triplicado).

Se pesó aproximadamente 25 mg ER senósidos, se transfirió a una fiola de 100 mL. Se continuó según la preparación de estándar del método desarrollado.

- **Preparación al 125 %:** (se trabajó por triplicado).

Se pesó aproximadamente 31,25 mg ER senósidos, se transfirió a una fiola de 100 mL. Se continuó según la preparación de estándar del método desarrollado.

- **Preparación al 150 %:** (se trabajó por triplicado).

Se pesó aproximadamente 37,50 mg ER senósidos, se transfirió a una fiola de 100 mL. Se continuó según la preparación de estándar del método desarrollado.

B. Linealidad del método

Se preparó soluciones de placebo enriquecidas con el principio activo en tres niveles de concentración que cubran el intervalo de trabajo (75 %, 100 % y 125 %), por pesadas independientes y por triplicado. Simultáneamente con las muestras analizar dos estándares de concentración conocida al 100% de la concentración nominal del trabajo, para reportar los resultados de exactitud.

- **Preparación de las muestras al 75 %:** (se trabajó por triplicado).

Se refrigeró tabletas de placebo para luego desmenuzar con un material adecuado, Se pesó con exactitud aproximadamente 1142,00 mg de placebo y 18,75 mg de ER senósidos y se transfirió a una fiola de 200 mL. Se continuó según la preparación de muestra del método desarrollado.

- **Preparación de las muestras al 100 %:** (se trabajó por triplicado).

Se refrigeró tabletas de placebo para luego desmenuzar con un material adecuado, Se pesó con exactitud aproximadamente 1142,00 mg de placebo y 25

mg de ER senósidos y se transfirió a una fiola de 200 mL. Se continuó según la preparación de muestra del método desarrollado.

- **Preparación de las muestras al 125 %:** (se trabajó por triplicado).

Se refrigeró tabletas de placebo para luego desmenuzar con un material adecuado, Se pesó con exactitud aproximadamente 1142,00 mg de placebo y 31,25 mg de ER senósidos y se transfirió a una fiola de 200 mL. Se continuó según la preparación de muestra del método desarrollado.

Exactitud

Para este estudio se trabajó con las mismas muestras preparadas para la determinación de la linealidad de método.

Precisión

- **Repetibilidad:** se analizó independientemente 6 muestras.
- **Precisión intermedia:** un segundo analista realizó otro día, el análisis del mismo lote empleado en la repetibilidad usando el mismo método analítico y diferentes equipos.

Robustez

Se consideró las tres primeras muestras de repetibilidad como análisis inicial y estas mismas muestras permanecieron aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente y se volvió a correr con un estándar recientemente preparado.

3.4. Cálculos

3.4.1. Precisión instrumental

Para determinar los cálculos de C.V. (%) de las áreas y de los tiempos de retención obtenidos se aplicó las siguientes formulas²²:

Desviación estándar:

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x - X)^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n - 1)}}$$

Desviación estándar relativa:

$$RSD = \frac{S}{X}$$

Coficiente de variación:

$$CV(\%) = \frac{S}{X} \times 100$$

3.4.2. Especificidad:

Tabla 4: Muestras inyectadas que debe cumplir con las especificaciones. Lima – 2019.

Muestras sometidas al estrés	Muestras	referencia
Sin estrés	diluyente	La corrida del diluyente no debe mostrar picos en el tiempo de retención del principio activo analizados por este método
	Placebo	La corrida no debe dar una respuesta cuantificable, lo cual indica que los excipientes no interfieren en el análisis del analito.
	Principio Activo + Placebo	La corrida de placebo + principio activo debe mostrar el pico con el tiempo de retención semejante al estándar.
Fotólisis Termólisis Hidrólisis ácida Hidrólisis alcalina Oxidativa	Placebo	La corrida no debe dar una respuesta cuantificable, lo cual indica que los excipientes no interfieren en el análisis del analito.
	Principio Activo	El principio activo debe mostrar el pico con el tiempo de retención semejante al estándar sin ningún interferente.
	Principio Activo + Placebo	La corrida de placebo + principio activo debe mostrar el pico con el tiempo de retención semejante al estándar sin ningún interferente.

3.4.3. Linealidad

A. Regresión lineal^{21,28}.

Ecuación de la recta:

$$y = bx + a$$

Donde:

x: concentración del analito.

y: respuesta del área del pico cromatográfico.

b: pendiente de la recta.

a: intercepto de la recta con el eje “y”.

Fórmula para calcular la pendiente “b”.

$$b = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum(x - \bar{x})^2} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

Fórmula para calcular el termino independiente "a".

$$a = y - bx = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$$

B. Coeficiente de correlación (r) y Coeficiente de determinación (r²)^{21,28}.

Coeficiente de correlación: el coeficiente de correlación "r", permite establecer si existe relación entre las variables x (Concentración) e y (Respuesta).

$$r = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x - \bar{x})^2 \sum(y - \bar{y})^2}} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n})(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n})}}$$

Criterio de aceptación: 0,9990

Coeficiente de determinación: es el cuadrado del coeficiente de correlación "r", e indica la proporción de la varianza total de "y". este debe ser mayor o igual a 0,9980 para ingredientes activos para una formula.

C. Análisis de varianza: ANOVA

ANOVA

Planteamiento de la Hipótesis.

H₀: β = 0 el modelo lineal NO proporciona un buen ajuste a los datos.

H₁: β ≠ 0 el modelo lineal SI proporciona un buen ajuste a los datos

Criterio de aceptación:

Si F_{exp.} > F_{tablas} para una probabilidad del 95%, se rechaza la Hipótesis nula (H₀) demostrando que el modelo lineal SI proporciona un buen ajuste a los datos.

D. Tes de linealidad.

Coeficiente de variación de los factores de respuesta (f):

$$f = \frac{y}{x}$$

Criterio de aceptación: C.V. (%) ≤ 2 %

Significación estadística de la desviación estándar de la pendiente.

Test de Hipótesis para la pendiente b:

H₀: "b" es estadísticamente igual a cero.

H₁: "b" es estadísticamente diferente a cero.

Criterio de aceptación:

Si $t_{exp.} > t_{tabla}$ para una probabilidad del 95% ($p = 0,05$) y $(n-2)$ grados de libertad, se rechaza la Hipótesis nula (H_0), entonces “b” es estadísticamente diferente de cero.

El intervalo de confianza no incluye el cero.

E. Tes de proporcionalidad.

Test de Hipótesis para el intercepto a:

H_0 : “a” es estadísticamente igual a cero.

H_1 : “a” es estadísticamente diferente a cero.

Criterio de aceptación:

Si $t_{exp.} < t_{tabla}$ para una probabilidad del 95% ($p = 0,05$) y $(n-2)$ grados de libertad, se rechaza la Hipótesis nula (H_0), entonces “b” es estadísticamente diferente de cero.

El intervalo de confianza incluye el cero.

3.4.4. Exactitud²¹.

Se aplicó la siguiente fórmula:

$$\%R = \frac{X_H \times 100}{X_A}$$

Donde:

$\%R$: porcentaje de recuperación.

X_H : cantidad de analito hallado.

X_A : cantidad de analito añadido.

3.4.5. Precisión.

- **Repetibilidad:** se analizó 6 muestras y el C.V. (%) debe ser menor o igual a 2 %.
- **Precisión intermedia:** analizó un segundo analista y el C.V. (%) debe ser menor o igual a 2 % con respecto a primer analista de repetibilidad.

3.4.6. Robustez.

Se determinó el C.V. (%), del análisis de repetibilidad después de 24 horas.

3.5. Análisis de datos

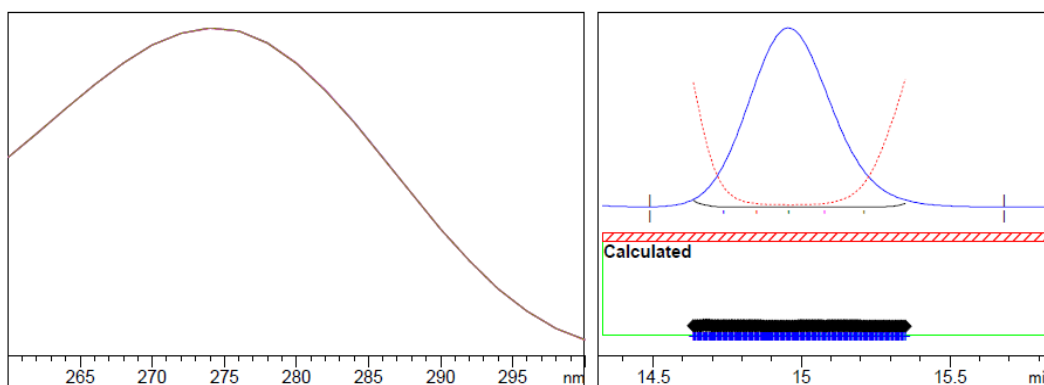
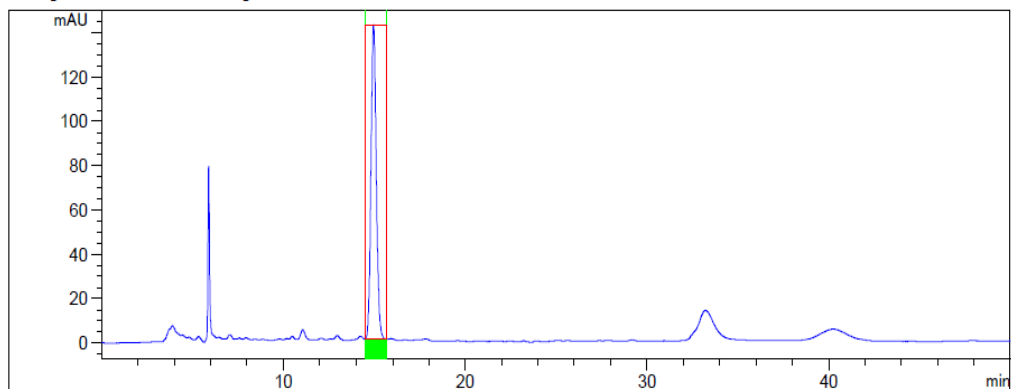
Los resultados obtenidos en cada parámetro fueron sometidos al análisis estadístico mediante el programa Excel para verificar el cumplimiento de cada uno de los parámetros según los criterios de aceptación y se realizó la interpretación estadística mediante la prueba de ANOVA y t de Student, para comparar se hizo el análisis de varianza con un 95 % de confianza y de esa manera tener confiabilidad en los resultados.

IV. RESULTADOS

Name: ST

Purity results peak 1 at 14.958 min.

Signal DAD1 A, Sig=274,4 Ref=off (ESTABILIDADES\EX LAX TABLETA\EXLAXTAB555 2019



-> The purity factor is within the calculated threshold limit. <-

Purity factor : 999.994 (108 of 108 spectra are within the calculated threshold limit.)
Threshold : 998.974 (Calculated with 108 of 108 spectra)
Reference : Peak start and end spectra (integrated) (14.490 / 15.684)
Spectra : 5 (Selection automatic, 5)
Noise Threshold: 0.100 (Default, noise spectra not available)

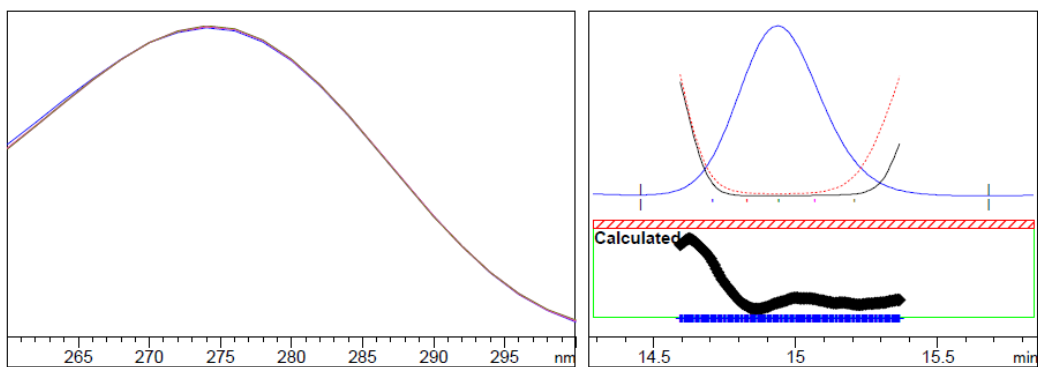
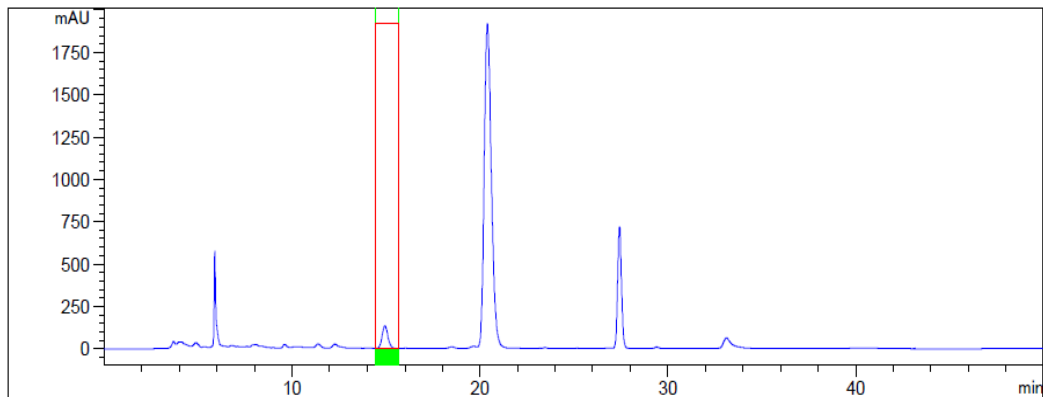
*** End of Report ***

Figura 2: Desarrollo del método: resultados de pureza de pico de estándar (principio activo) de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.

Name: R 100% M1

Purity results peak 1 at 14.939 min.

Signal DAD1 A, Sig=274,4 Ref=off (ESTABILIDA...LAX TABLETA\EXLAXTAB555 2019-01)



-> The purity factor is within the calculated threshold limit. <-

Purity factor : 999.402 (117 of 117 spectra are within the calculated threshold limit.)

Threshold : 998.489 (Calculated with 117 of 117 spectra)

Reference : Peak start and end spectra (integrated) (14.454 / 15.680)

Spectra : 5 (Selection automatic, 5)

Noise Threshold: 0.100 (Default, noise spectra not available)

*** End of Report ***

Figura 3: Desarrollo del método: resultados de pureza de pico de muestra (principio activo más placebo) de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.

Tabla 5: Precisión instrumental de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.

Estándar	senósidos	
Potencia	61,7 % T/C senósidos	
Nº de lote	MP00010518 - 1	
Peso	25,19 mg	
Nº Inyecciones	TR (minutos)	áreas
Inyección 1	15,165	2840,30054
Inyección 2	15,140	2841,18481
Inyección 3	15,120	2839,40088
Inyección 4	15,101	2840,29492
Inyección 5	15,171	2843,25659
Inyección 6	15,124	2842,73804
Promedio	15,14	2841,195963
RSD	0,0018	0,0005
C.V. (%)	0,18 %	0,05 %

Tabla 6: Especificidad de posibles interferentes, fotólisis y termólisis sometidas a estrés forzado de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.

Especificidad	Muestra	Senósidos					% Recuperación	
		Peso (mg)	Añadido (mg)	Hallado (mg)	Promedio hallado (mg)			
Determinación de posibles interferentes	Placebo	Pb1	0,00	0,00	0,00 0,00	0,00	0,00	
		Pb2	0,00	0,00	0,00 0,00	0,00		
	Principio Activo + Placebo	M1	25,75	15,89	15,79 15,75	15,77	98,74	
		M2	25,08	15,47	15,19 15,21	15,20		
	Fotólisis	Placebo	Pb1	0,00	0,00	0,00 0,00	0,00	0,00
			Pb2	0,00	0,00	0,00 0,00	0,00	
Principio Activo		PA1	25,01	15,43	15,62 15,65	15,64	100,37	
		PA2	25,40	15,67	15,58 15,58	15,58		
Principio Activo + Placebo		M1	25,50	15,73	15,52 15,48	15,50	97,90	
		M2	25,13	15,51	15,07 15,10	15,09		
Termólisis	Placebo	Pb1	0,00	0,00	0,00 0,00	0,00	0,00	
		Pb2	0,00	0,00	0,00 0,00	0,00		
	Principio Activo	PA1	25,07	15,47	15,62 15,62	15,62	100,08	
		PA2	25,15	15,52	15,40 15,38	15,39		
	Principio Activo + Placebo	M1	25,34	15,63	15,43 15,48	15,46	99,07	
		M2	25,05	15,46	15,36 15,33	15,35		

Tabla 7: Especificidad de hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina y oxidativa sometidas a estrés forzado de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.

Especificidad	Muestra		Senósidos				% Recuperación
			Peso (mg)	Añadido (mg)	Hallado (mg)	Promedio hallado (mg)	
Hidrólisis ácida	Placebo	Pb1	0,00	0,00	0,00 0,00	0,00	0,00
		Pb2	0,00	0,00	0,00 0,00	0,00	
	Principio Activo	PA1	25,84	15,94	11,63 11,61	11,62	71,94
		PA2	24,92	15,38	10,92 10,91	10,92	
	Principio Activo + Placebo	M1	25,01	15,43	11,55 11,45	11,50	74,99
		M2	25,74	15,88	11,99 11,98	11,99	
Hidrólisis alcalina	Placebo	Pb1	0,00	0,00	0,00 0,00	0,00	0,00
		Pb2	0,00	0,00	0,00 0,00	0,00	
	Principio Activo	PA1	25,08	15,47	13,02 12,98	13,00	83,72
		PA2	25,05	15,46	12,90 12,89	12,90	
	Principio Activo + Placebo	M1	25,03	15,44	13,23 13,21	13,22	84,79
		M2	25,03	15,44	12,95 12,99	12,97	
Oxidativa	Placebo	Pb1	0,00	0,00	0,00 0,00	0,00	0,00
		Pb2	0,00	0,00	0,00 0,00	0,00	
	Principio Activo	PA1	25,15	15,52	11,37 11,31	11,34	72,37
		PA2	25,23	15,57	11,15 11,16	11,16	
	Principio Activo + Placebo	M1	25,16	15,52	7,03 7,00	7,02	45,25
		M2	25,45	15,70	7,24 6,99	7,12	

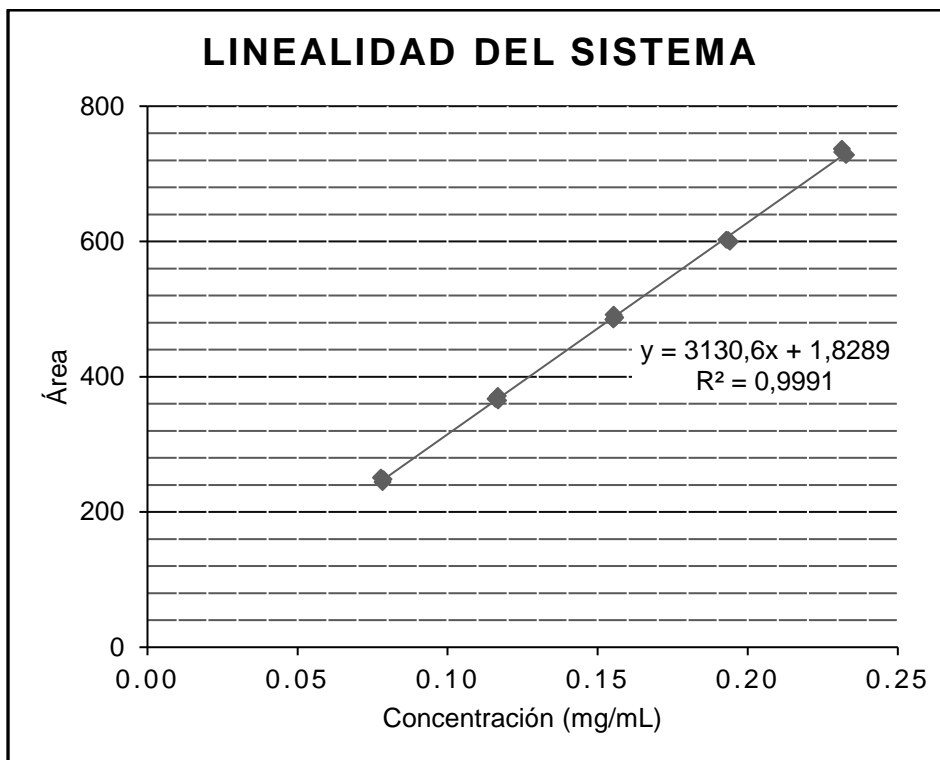


Figura 4: Área versus concentración de linealidad del sistema de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.

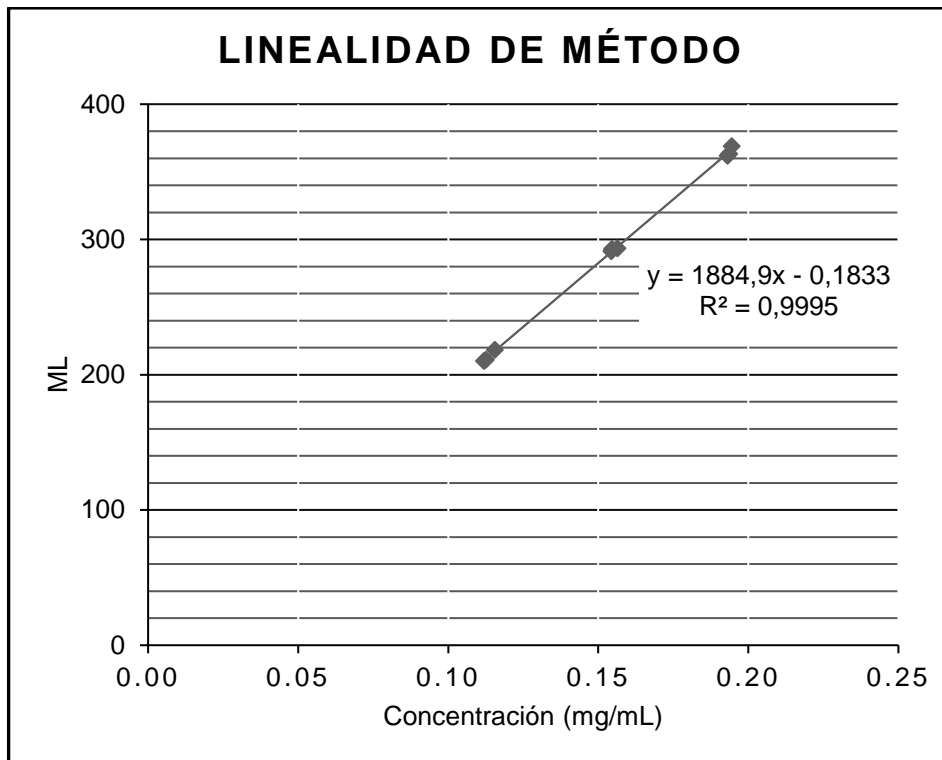


Figura 5: Área versus concentración de linealidad del método de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.

Tabla 8: Exactitud (recuperación) de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.

Concentración	Muestras	Peso (mg)	Senósidos añadido (mg)	Senósidos hallado (mg)	Promedio Senósidos hallado (mg)	Recuperación %
75%	M1	18,72	11,55	11,44	11,44	99,00
				11,43		
	M2	18,13	11,19	10,95	11,00	
				11,04		
	M3	18,23	11,25	11,06	11,04	
				11,03		
100%	M1	25,01	15,43	15,21	15,25	98,82
				15,29		
	M2	25,05	15,46	15,33	15,34	
				15,35		
	M3	25,34	15,63	15,36	15,36	
				15,35		
125%	M1	31,51	19,44	19,31	19,31	99,30
				19,30		
	M2	31,37	19,36	19,02	19,02	
				19,02		
	M3	31,28	19,30	18,94	18,93	
				18,93		
					Promedio:	98,60 %
					Desviación Estándar Relativa:	0,0049
					Coficiente de Variación (%):	0,49 %

Tabla 9: Repetibilidad y precisión intermedia entre el analista uno y dos de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.

Muestras	Analista 1			Analista 2			
	Senósidos mg/tableta	Promedio senósidos mg/tableta	%	Senósidos mg/tableta	Promedio senósidos mg/tableta	%	
M1	15,48	15,49	103,3	15,89	15,88	105,9	
	15,50			15,86			
M2	15,36	15,34	102,3	15,63	15,61	104,0	
	15,33			15,59			
M3	15,30	15,30	102,0	15,46	15,48	103,2	
	15,30			15,50			
M4	15,61	15,60	104,0	15,57	15,67	104,5	
	15,59			15,77			
M5	15,58	15,58	103,9	15,58	15,51	103,4	
	15,58			15,44			
M6	15,38	15,38	102,5	15,73	15,70	104,6	
	15,38			15,67			
		Promedio:	103,0 %			Promedio:	104,3 %
		RSD:	0,0082			RSD:	0,0093
		C.V. (%):	0,82 %			C.V. (%):	0,93 %
						Promedio del analista 1 y analista 2:	103,6 %
						RSD del analista 1 y analista 2:	0,0106
						C.V. (%) del analista 1 y analista 2:	1,06 %

Tabla 10: Robustez entre análisis inicial y final de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.

Muestra	Inicio			Final (después de 24 horas refrigerado)			Diferencia $y_1 - y_0$
	Senósidos mg/tab.	Promedio senósidos mg/tab.	% (y_0)	Senósidos mg/tab.	Promedio senósidos mg/tab.	% (y_1)	
M1	15,48	15,49	103,29	15,51	15,50	103,36	0,07
	15,50			15,50			
M2	15,36	15,34	102,29	15,32	15,34	102,25	0,05
	15,33			15,35			
M3	15,30	15,30	101,99	15,35	15,33	102,21	0,23
	15,30			15,31			
	Promedio	15,38	102,52	Promedio	15,39	102,61	
	RSD	0,0066	0,0066	RSD	0,0064	0,0064	
	C.V. (%)	0,66 %	0,66 %	C.V. (%)	0,64%	0,64 %	
Promedio de inicio y final (después de 24 horas refrigerado):							102,56 %
RSD de inicio y final (después de 24 horas refrigerado):							0,0058
C.V. (%) de inicio y final (después de 24 horas refrigerado):							0,58 %
Diferencia del promedio de inicio y final (después de 24 horas refrigerado):							0,08

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se desarrolló un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para cuantificar senósidos en tabletas de chocolate, cabe resaltar que este tipo de análisis presenta mayor ventaja en comparación a otros métodos analíticos como los gravimétricos, volumétricos, espectrofométricos y espectrofluorométricos. Además, según USP 42 – NF 37¹⁸ y Skoog²², es ventajoso por ser un método de separación basada en una fase estacionaria y una fase móvil líquida, con elución más versátil y ampliamente utilizado en la separación de mezclas complejas de manera rápida, exacta y fiable en el análisis. Así como mencionan Gennaro²⁵ y Mattos, et al.²⁶, los senósidos son un complejo natural de glicósidos de antraquinona constituidos por heterósidos hidroxiantracénicos como los senósidos A, B, C y D, estos se encuentran entre 55 – 65% en forma de sales de calcio, en esta investigación se trabajó con principio activo de 61,7 % T/C senósidos y para establecer una buena condición cromatográfica se realizaron diferentes pruebas en relación al tipo de fase estacionaria, proporción de buffer con modificador orgánico de la fase móvil y columna cromatográfica.

De manera similar Bavand et al⁷, en su trabajo de desarrollo y validación de un método para acetato de eptifibatida utilizó una columna cromatográfica semejante en tamaño, dimensión y micraje, pero con relleno distinto a la columna usada (fenilo) en el método desarrollado. Según Taylor²⁷, las columnas de fenilo son útiles para separar una variedad de analitos, incluidas especies aromáticas, policíclicas e insaturadas; siendo los Senósidos como estructura química policíclica, en las Figura 1 y 2 se demostró una buena separación, con una pureza de pico cromatográfico de 99,99 % para estándar y 99,94 % para muestra, de igual manera se puede observar en el Anexo 7, que el diluyente y el placebo no emite interferente y en el Anexo 8 se evidencia la separación en el estándar y muestra.

Se evaluó como indica USP 42 – NF 37¹⁸, ICH¹⁹, y AEFI²¹, los parámetros de validación que es, Especificidad – Selectividad, Linealidad, Precisión, Exactitud y Robustez para tener un método reproducible y confiable. Así mismo, Bor et al⁸, en su trabajo de Validación de un método para tiocolchicósido, trabajó con los parámetros establecidos, de la misma forma Rodríguez et al⁹, con trabajo de Desarrollo y validación de un método para acetaminofén, logro su validación según las recomendaciones de la ICH.

En Tabla 5, se muestra la precisión instrumental donde determinó el porcentaje de RSD para las áreas es de 0,05 % y de los tiempos de retención es de 0,18 %, lo cual indica alto grado de certeza para la cuantificación del analito, estos resultados son menor a 2 % según USP 42 – NF 37¹⁸.

La ICH¹⁹ menciona, que el método debe tener 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, las Tablas 6 y 7 los análisis demuestran que los placebos en todos los ensayos sometidas al estrés no son detectables siendo estas de 0,00 %, con este resultado obtenido se justifica según lo indicado por AEFI²², que la lectura del placebo debe tener una inferencia no mayor a 1,5 % en el pico principal y si los picos no tienen una clara separación se puede ampliar en no más de 0,5 %, en fotólisis el principio activo (PA) recuperado es 100,37 % y para placebo más principio activo (muestra) es de 97,90 %; termólisis PA es de 100,08 % y la muestra de 99,07 %; hidrólisis ácida para PA 71,94 % y muestra 74,99 %; hidrólisis alcalina PA 83,72 % y muestra 84,79 %; y en oxidativa PA 72,37 % y muestra 45,25 %. Para todo ello se aprovechó el detector del instrumento de arreglo de diodos (DAD), evaluando la especificidad a través de la pureza de pico cromatográfico, donde se determinó que no se presentan impurezas y, por tanto, a través del método desarrollado es posible alcanzar una señal que corresponde inequívocamente al analito de interés sin presencia del interferente. Además, se resalta que las muestras sometidas a fotólisis y termólisis son más estables en comparación a hidrólisis ácida, alcalina y oxidativa, es más las muestras (placebo más principio activo) de estrés oxidativa se degradan en mayor porcentaje de 54,75 % en comparación a los otros ensayos. Así como el trabajo de Sanabria et al¹⁰, validación de un método para cafeína por HPLC es específico (selectividad), el presente trabajo de investigación es específico para el analito de interés.

En cuanto a la linealidad Miller²⁸, menciona que en estudio de linealidad existe una relación lineal entre la señal analítica (y) y la concentración (x), en la Figura 3 y Figura 4 se presentan las curvas de calibración (relación de áreas versus concentración) para el sistema y para el método, en las cuales se puede apreciar la ecuación de la recta: para linealidad del sistema $y = 3130,6x + 1,8289$ y para linealidad del método $y = 1884,9x - 0,1833$. De acuerdo a la AEFI²¹, el valor para coeficiente de correlación es recomendable que sea mayor que 0,999 y para Gary²⁴, el valor de coeficiente de determinación debe ser mayor que 0.998, lo cual indica un indicio de ajuste aceptable de los datos a la línea de regresión, bajo estas condiciones los resultados de Anexo 7, muestra para linealidad del sistema $r = 0,9996$ y $r^2 = 0,9991$ y para linealidad del método $r = 0,9997$ y $r^2 = 0,9995$, con estos valores obtenidos se puede decir que existe un alto grado de relación entre la variable x (concentración) y la variable y (área).

Mediante el test de ANOVA y el estadístico de Fisher, en la Linealidad del sistema y método, el Anexo 7 muestra que para la regresión se encontró que $F_{\text{exp}} > F_{\text{tabla}}$ ($14476,490 > 4,667$ para sistema y $12775,938 > 5,591$ para el método), donde se comprobó que para una probabilidad de 95 %, se demuestra que existe una regresión significativa y que el modelo lineal si proporciona un buen ajuste de datos. Con respecto a los factores de respuesta (f), el Anexo 7 evidencia que el C.V. (%) es de 1,14 % para sistema y 0,49 % para el método, cumpliendo de esta manera lo que recomienda AEFI²², donde señala que el coeficiente de variación de los factores de respuesta debe ser menores a 5 %. En cuanto a la pendiente, el mismo Anexo 7 demuestra que en el test de Linealidad se encontraron que los valores de t_{exp} son mayores a t_{tabla} ($120,318 > 2,160$ para sistema y $113,031 > 2,365$ para método), por consiguiente, para $p = 0,05$ y $(n - 2)$ grados de libertad, se rechazó la hipótesis nula (H_0); es decir, que "b" es significativamente diferente de cero. De la misma forma, el Anexo 7 indica el intercepto que se emitió es de que $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabla}}$ ($0,428 < 2,160$ para sistema y $0,070 < 2,365$ para método), por lo tanto, para $p = 0,05$ y $(n - 2)$ grados de libertad, se rechazó la hipótesis nula (H_0); es decir, que "a" es estadísticamente igual a cero.

En relación a Exactitud en la Tabla 8 muestra que el porcentaje de recuperación es de 98,60 % y con un Coeficiente de Variación de 0,49 %, estos resultados evidencian lo recomendado por AEFI²² que los criterios de aceptación para la recuperación deben estar entre los valores 98,0 – 102,0 % y con un coeficiente de variación recomendado por USP 42 – NF 37¹⁵ que debe ser menores a 2 %.

En el estudio de la robustez se evaluó la estabilidad de la muestra en una condición, muestras después de 24 horas a temperatura ambiente, donde se observó que a la muestra no sufre cambios con el método analítico y no afectan la reproducibilidad de los resultados, siendo el porcentaje de Coeficiente de Variación C.V. (%) de 0,58 %.

VI. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló y validó un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de senósidos en tabletas de chocolate y se documentó los resultados obtenidos.
2. Se logró desarrollar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con una buena separación, con una pureza de pico cromatográfico de 99,99 % para estándar y 99,94 % para muestra, utilizando una columna cromatográfica de L11 (fenilo), 150 mm x 4,6 mm x 5 μ m, con un tiempo de retención de 15 minutos aproximadamente, a una longitud de onda de 274 nm, con volumen de inyección de 40 μ L, y un gradiente de flujo que oscila de 0,4 a 1,5 mL/min.
3. Se determinó los parámetros de validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en la cuantificación de senósidos en tabletas de chocolate, demostrando que el método analítico desarrollado es específico después de determinar interferencia en productos que sometieron a estrés, es lineal en concentraciones de 0,07; 0,11; 0,15; 0,19 y 0,23 mg/mL que muestran un coeficiente de correlación de 0,9996, es preciso con una repetibilidad y precisión intermedia que tiene un C.V. (%) menor a 2 %, es exacto con un porcentaje de recuperación de 98,60 % y robusto con un coeficiente de variación de 0,58 % después de 24 horas.

VII. RECOMENDACIONES

1. En el método desarrollado es muy importante tener cuidado en la preparación de muestra, en la parte de filtración de las muestras con papel Whatman para evitar el paso de excipiente (grasa).
2. Usar una columna cromatográfica que tenga no menor de 10000 platos teóricos para el activo.
3. La modificación del método analítico desarrollado y validado se tiene que revalidar.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castillo B, González R. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. Revista Cubana de Farmacia [Internet]. abril de 1996 [citado 2 de enero de 2019];30(1):0-0. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-75151996000100009&lng=es&nrm=iso&tlng=es
2. Validación de métodos analíticos [Internet]. [citado 2 de enero de 2019]. Disponible en: http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13_Modulo_Validacion_de_Metodos_Fisicoqcos.pdf
3. Pacheco JG. Evaluación de los Niveles de Benzo[A] Pireno por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en Pollos a la Brasa, Arequipa – 2017. Universidad Católica de Santa María - UCSM [Internet]. 23 de enero de 2018 [citado 4 de enero de 2019]; Disponible en: <https://tesis.ucsm.edu.pe:80/repositorio/handle/UCSM/7299>
4. Samaniego J, Arias G. Desarrollo y validación de una metodología analítica por HPLC para la cuantificación simultánea de fenilefrina clorhidrato, paracetamol, salicilamida, cafeína y clorfeniramina maleato en tabletas. Revista de la Sociedad Química del Perú [Internet]. abril de 2016 [citado 6 de enero de 2019];82(2):196-207. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/scielo.php>
5. Heisler EV, Budú M de LD, Schimith MD, Badke MR, Ceolin S, Heck RM. Uso de plantas medicinales en el cuidado de la salud: la producción científica de tesis y disertaciones de enfermería brasileña. Enfermería Global [Internet]. 2015;1-14. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf>
6. Medicinas.me. Senósidos A-B [Internet]. Medicinas.me. [citado 7 de enero de 2019]. Disponible en: <https://www.medicinas.me/medicamento/senosidos-a-b/>
7. Bavand M, Vahidi H, Ayatollahi AM, Hooshfar S, Kobarfard F. Desarrollo del método RP-HPLC y validación para la determinación de acetato de eptifibatida en sustancias farmacéuticas a granel y formas farmacéuticas de dosificación. Iran J Pharm Res [Internet]. 2017 [citado 26 de enero de 2019]; 16(2):490-7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5603858/>
8. Bor M, Guilarte A, Guzmán L, Macías K, Mendoza W. Validación de un método por RP-HPLC para la determinación de Ticolchicósido en

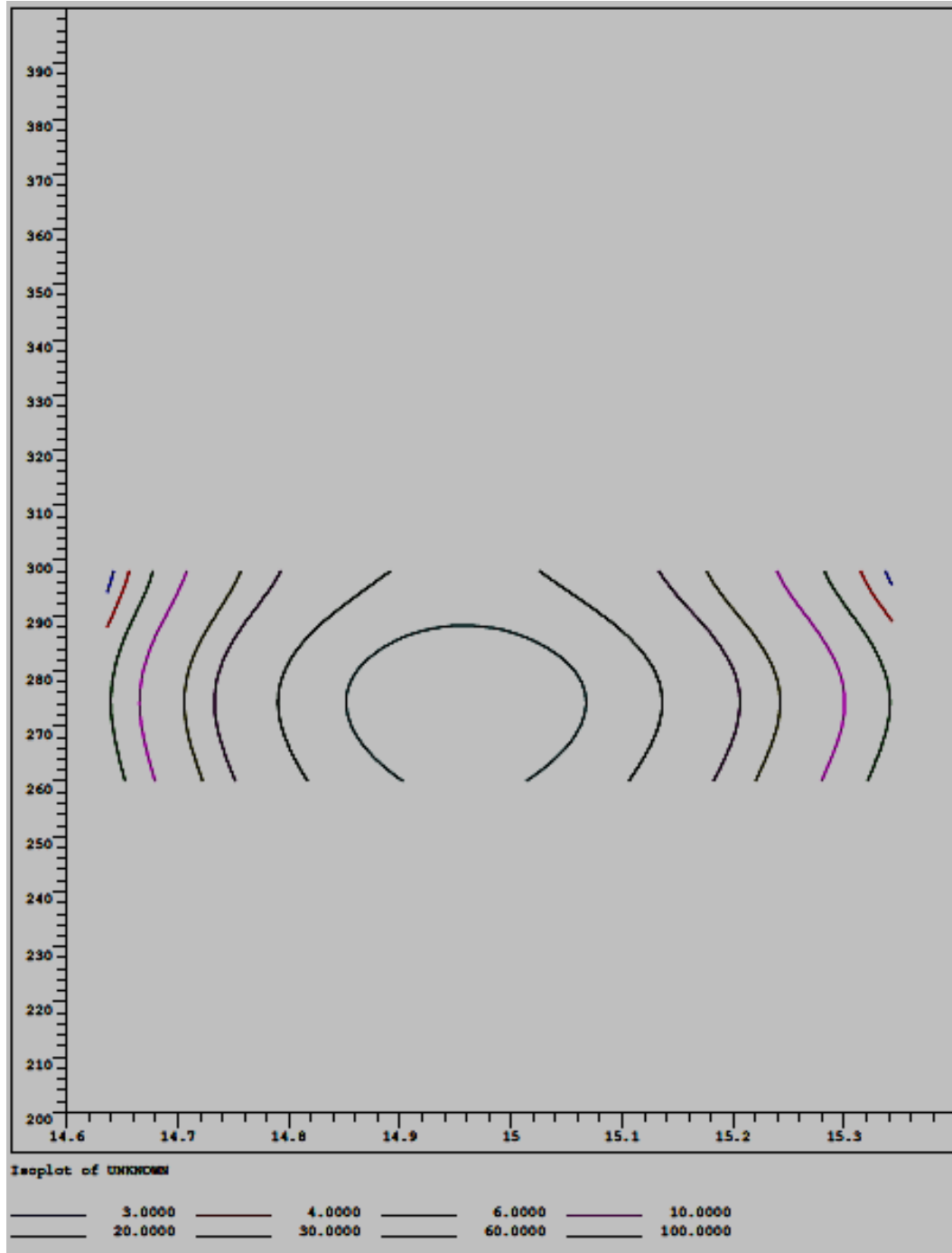
- tabletas. Venezuela. [Internet]. ResearchGate. [Citado 24 de enero de 2019]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/329174109>
9. Rodríguez A, Martínez Y, Ponce H. Desarrollo y validación de un método para cuantificación de acetaminofén en supositorios mediante HPLC-DAD utilizando una variación del método QuEChERS. Honduras. [Internet]. ResearchGate. [citado 24 de enero de 2019]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/317444170>
 10. Sanabria LM, Martínez JA, Baena Y. Validación de una metodología analítica por HPLC-DAD para la cuantificación de cafeína en un ensayo de permeación in vitro empleando mucosa oral porcina. Colombia. [Internet]. ResearchGate. [citado 22 de enero de 2019]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/322161582>
 11. Iveth J, Nairobi M, Ponce H. Desarrollo y validación de un método para la cuantificación de atorvastatina en tabletas mediante HPLC-DAD. Honduras. Portal Cienc. [Internet]. 15 de junio de 2016 [citado 27 de enero de 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/304002245_Desarrollo_y_validacion_de_un_metodo_para_la_cuantificacion_de_atorvastatina_en_tabletas_mediante_HPLC-DAD
 12. Márquez KL. Desarrollo y validación de un método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la cuantificación de Linezolid en comprimidos. Universidad Nacional de Trujillo [Internet]. 2018 [citado 28 de enero de 2019]; Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/10426>
 13. Guarniz D. Validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la disolución de Ezetimiba 10 mg y Simvastatina 40 mg en tabletas. Universidad Nacional de Trujillo [Internet]. 2017 [citado 31 de enero de 2019]; Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/10426>
 14. Román L. Desarrollo de un método cuantitativo por HPLC para la determinación de ácido fenilglioxílico y ácido mandélico, como indicadores biológicos de la exposición a estireno. Universidad Nacional Mayor San Marcos [Internet]. 2017 [citado 30 de enero de 2019]; Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/4720>

15. Samaniego JW. Desarrollo y validación de una técnica analítica por HPLC para calificar la equivalencia farmacéutica in vitro de cuatro medicamentos conteniendo paracetamol, clorfenamina maleato y fenilefrina clorhidrato en tabletas. Universidad Nacional Mayor San Marcos [Internet]. 2016 [citado 01 de febrero de 2019]; Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/6195>
16. Ccorimanya, AK. Desarrollo y validación prospectiva de una técnica analítica por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) para cuantificar Lidocaína base en una pomada, Arequipa-2012. Universidad Católica Santa María - UCSM [Internet]. 13 de septiembre de 2014 [citado 3 de febrero de 2019]; Disponible en: <https://tesis.ucsm.edu.pe:80/repositorio/handle/UCSM/3862>
17. Enciso M. Validación de la técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para la determinación de fenilefrina clorhidrato, guaifenesina y dextrometorfano bromhidrato en jarabe. Lima -2013. Universidad Nacional San Cristóbal Huamanga [Internet]. 2014 [citado 6 de febrero de 2019]; Disponible en: <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/1504>
18. Farmacopea de los Estados Unidos de América. (USP 42 - NF 37), (2019). The United States Pharmacopeia Convention. Maryland. United Book Press.
19. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human use (ICH). (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), Ginebra.
20. IUPAC. Selectivity in Analytical Chemistry, Pure & Applied Chemistry, 73 (2001) 1381-1386.
21. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI). Validación de Métodos Analíticos. Barcelona: Graficas Gispert S. A.; 2001.
22. Skoog D, West D, Holler F, Crouch S. Fundamentos de Química Analítica. 8º ed. México: Thomson; 2005
23. Rubinson K, Rubinson J. Análisis instrumental. 1 ed. Madrid: Pearson educación; 2001.
24. Gary C, Química Analítica. 6º ed. México: Mc Graw Hill; 2009.
25. Gennaro A. Remington Farmacia. 20a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2003.

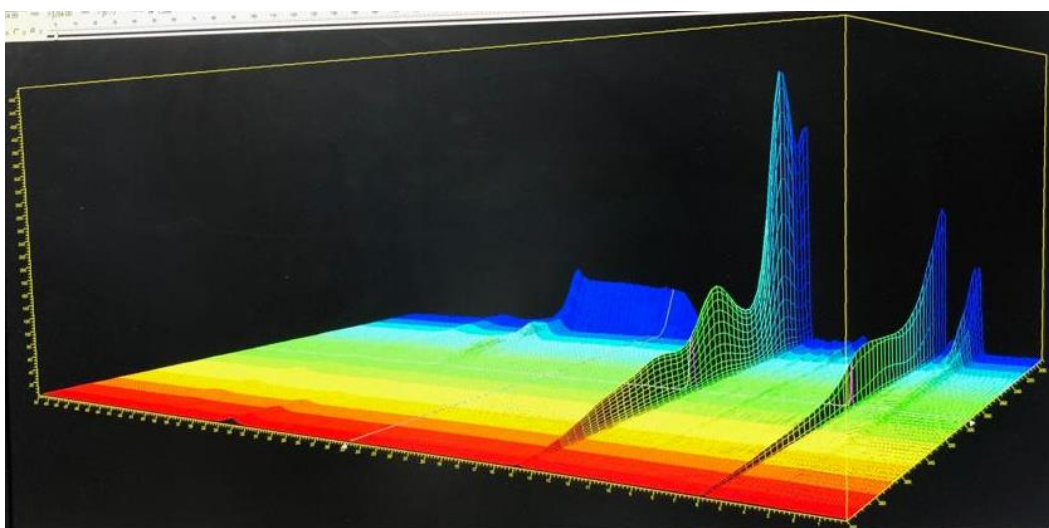
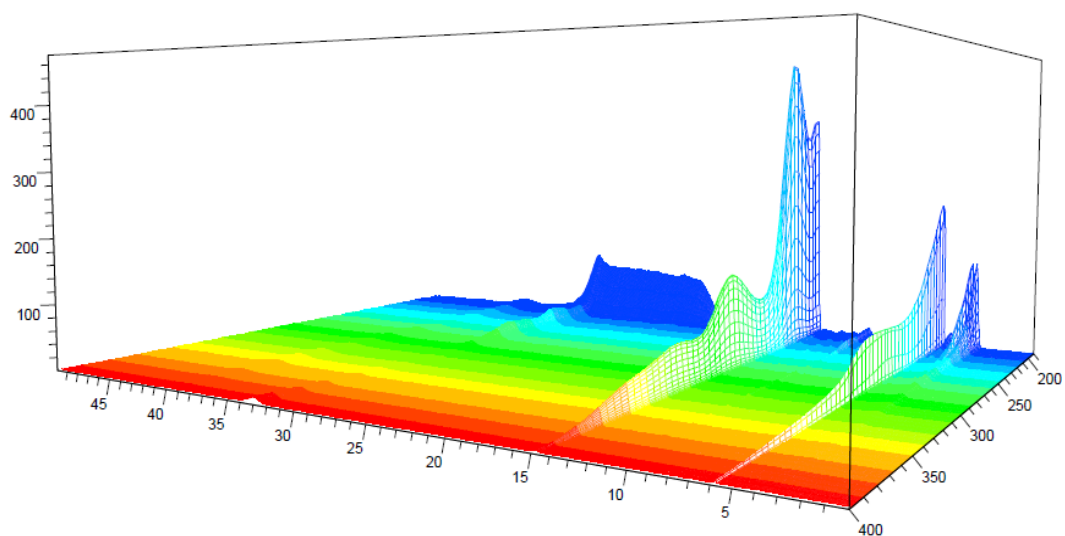
26. Mattos E, Alonso MT, Santos MT. Plantas medicinales españolas. Familia Leguminosae, Stud. Bot. 2009 May; 28: pp. 9-156
27. Taylor T. Aprovechando al máximo las fases estacionarias de fenilo para HPLC | LCGC [Internet]. [citado 10 de abril de 2019]. Disponible en: <http://www.chromatographyonline.com/getting-most-phenyl-stationary-phases-hplc>
28. Miller JN, Miller JC. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4^o ed. Madrid: Pearson Educación. S. A.; 2002.

ANEXOS

Anexo 1: Gráfica de ISOPLOT de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.



Anexo 2: Gráfica de isoabsorbancia tridimensional (3D) de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.



Anexo 3: Linealidad del sistema preparada con principio activo, de senósidos en tabletas de chocolate. Lima-2019

Concentración	Dato (n)	Peso (mg)	X Concentración de senósidos (mg/mL)	Áreas	Y Promedio de áreas	f
50%	M1	12,60	0,08	250,76938 250,80206	250,78572	3225,87173
	M2	12,69	0,08	244,44298 243,70079	244,07189	3117,24523
	M3	12,75	0,08	248,46661 248,51390	248,49026	3158,74097
75%	M1	18,79	0,12	366,71005 367,44910	367,07958	3166,27241
	M2	18,94	0,12	364,73813 364,53488	364,63651	3120,29034
	M3	18,92	0,12	371,68536 371,12875	371,40706	3181,58736
100%	M1	25,16	0,16	484,67529 484,25964	484,46747	3120,82069
	M2	25,18	0,16	491,61270 491,40396	491,50833	3163,66138
	M3	25,26	0,16	488,97385 485,84482	487,40934	3127,34168
125%	M1	31,44	0,19	600,37964 599,09760	599,73862	3091,67842
	M2	31,36	0,19	600,21130 603,42395	601,81763	3110,31006
	M3	31,26	0,19	601,90192 602,86090	602,38141	3123,18293
150%	M1	37,72	0,23	728,84650 727,03357	727,94004	3127,79843
	M2	37,52	0,23	733,63232 730,96436	732,29834	3163,29763
	M3	37,49	0,23	736,81360 737,07220	736,9429	3185,90803
					Coeficiente de correlación (r)	0,9996
					Coeficiente de determinación (r^2)	0,9991

Anexo 4: Linealidad del método preparada con principio activo cargado con placebo, de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.

Concentración	Dato (n)	Peso (mg)	X Concentración de senósidos (mg/mL)	Áreas	Y Promedio de áreas	f
75%	M1	18,72	0,12	218,47034	218,44310	1891,24295
				218,41586		
	M2	18,13	0,11	209,09924	210,04102	1877,67814
				210,98280		
	M3	18,23	0,11	211,24260	210,94611	1875,4249
				210,64961		
100%	M1	25,01	0,15	290,61160	291,31725	1887,84937
				292,02289		
	M2	25,05	0,15	292,82285	293,00649	1895,76429
				293,19012		
	M3	25,34	0,16	293,50171	293,40604	1876,62401
				293,31036		
125%	M1	31,51	0,19	368,90186	368,78809	1896,89512
				368,67432		
	M2	31,37	0,19	363,34592	363,30558	1877,03504
				363,26523		
	M3	31,28	0,19	361,77176	361,68517	1874,0397
				361,59857		
Coeficiente de correlación (r)						0,9997
Coeficiente de determinación (r^2)						0,9995

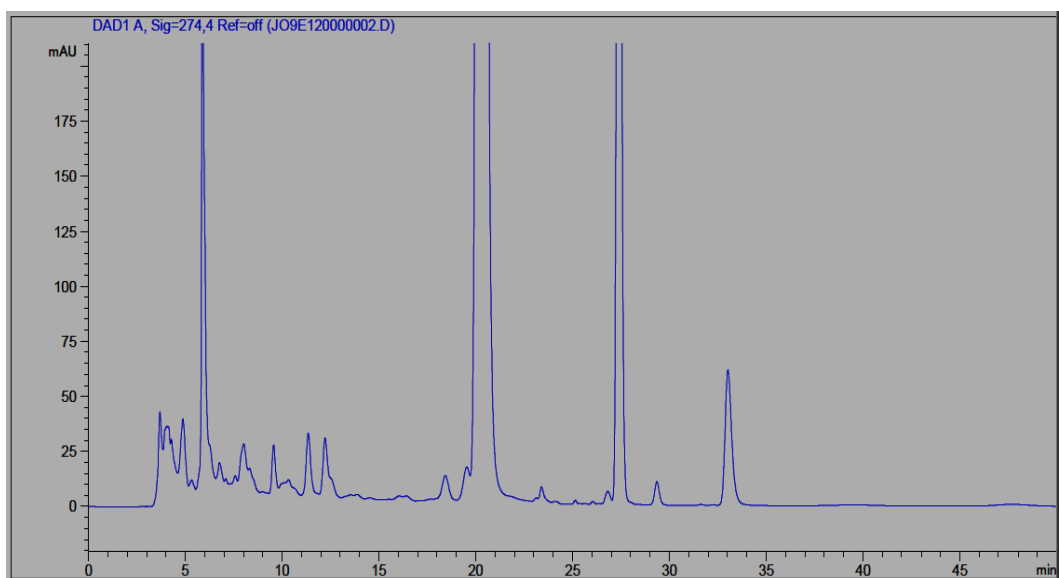
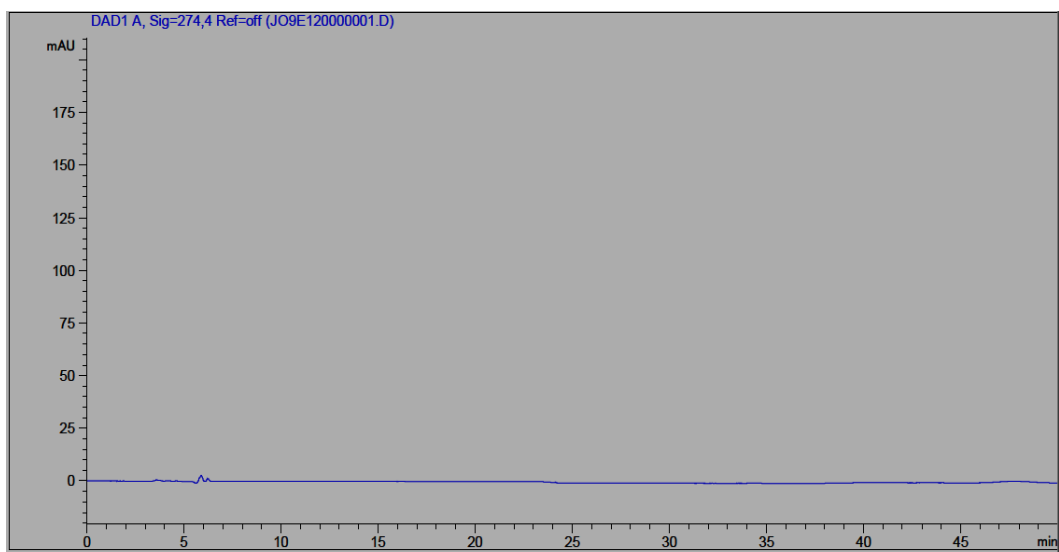
Anexo 5: Resumen de los resultados de especificidad y linealidad. Lima – 2019.

PARÁMETROS	LIMITES	RESULTADOS
Especificidad:		
Interferencia debido a excipientes y/o degradados	Ausencia de interferencia.	Conforme
Linealidad:		
a) Sistema		
Ecuación de la recta	$y = bx \pm a$	$y = 3130.6x + 1.8289$
Coefficiente de correlación	Mayor a 0.999	0.9996
Coefficiente de determinación	Mayor a 0.998	0.9991
Tes de ANOVA	$F_{exp} > F_{tabla}$	$14476.490 > 4.667$
Tes de Linealidad:		
Coefficiente de Variación de los Factores de Respuesta "f"	$RSD \leq 2\%$	1.14%
Intervalo de confianza de la pendiente "b"	$b \pm t_{tabla} \times S_b$ $t_{exp} > t_{tabla}$	3074.363 ± 3186.785 $120.318 > 2.160$
Tes de Proporcionalidad		
Intervalo de confianza del intercepto "a"	$a \pm t_{tabla} \times S_a$ $t_{exp} < t_{tabla}$	-7.409 ± 11.067 $0.428 < 2.160$
b) Método		
Ecuación de la recta	$y = bx \pm a$	$y = 1884.9x - 0.1833$
Coefficiente de correlación	Mayor a 0.999	0,9997
Coefficiente de determinación	Mayor a 0.998	0,9995
Tes de ANOVA	$F_{exp} > F_{tabla}$	$12\ 775,938 > 5.591$
Tes de Linealidad:		
Coefficiente de Variación de los Factores de Respuesta "f"	$RSD \leq 2\%$	0,49%
Intervalo de confianza de la pendiente "b"	$b \pm t_{tabla} \times S_b$ $t_{exp} > t_{tabla}$	1845.512 ± 1924.379 $113.031 > 2.365$
Tes de Proporcionalidad		
Intervalo de confianza del intercepto "a"	$a \pm t_{tabla} \times S_a$ $t_{exp} < t_{tabla}$	-6.393 ± 6.026 $0.070 < 2.365$

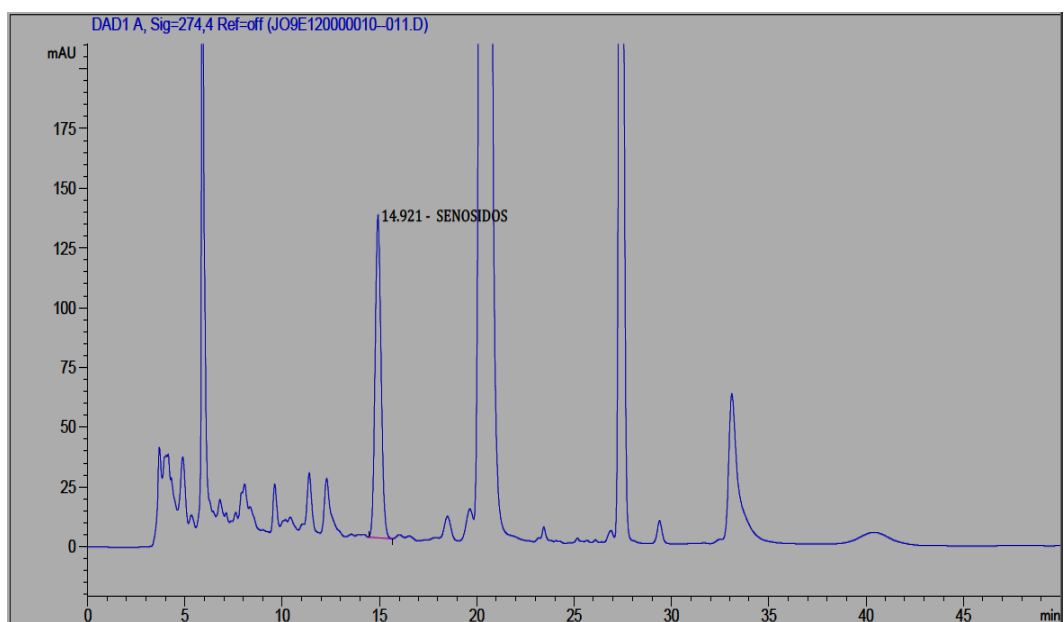
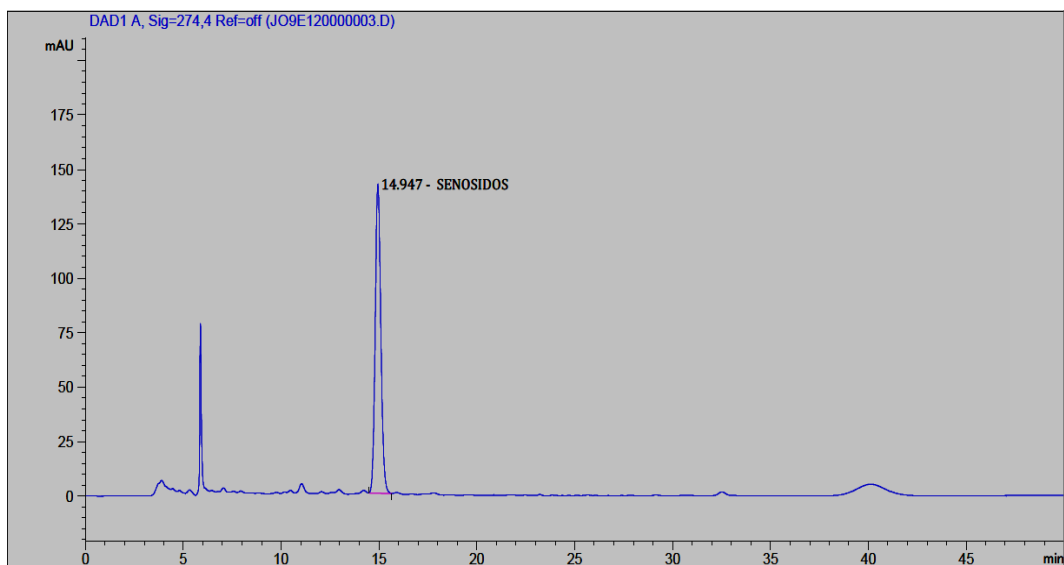
Anexo 6: Resumen de los resultados de exactitud, precisión y robustez. Lima – 2019.

PARÁMETROS	LÍMITES	RESULTADOS
Exactitud:		
Porcentaje de recuperación	98% - 102%	98.60%
Precisión:		
Precisión instrumental:		
De los tiempos de retención	RSD ≤ 2%	0.18%
De las áreas	RSD ≤ 2%	0.05%
Repetibilidad:	RSD ≤ 2%	0.82%
Intervalo de confianza del 95% Individual.	$\bar{X} \pm t_{\text{tabla}} \times S$	15.448 ± 0.326
Intervalo de confianza del 95% de la Media.	$\bar{X} \pm \frac{t_{\text{tabla}} \times S}{\sqrt{n}}$	15.448 ± 0.133
Precisión Intermedia:	RSD ≤ 2%	1.06%
Robustez:		
	RSD ≤ 2%	0.58%
	d ₁	0.08

Anexo 7: Cromatograma de diluyente y placebo de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.



Anexo 8: Cromatograma de estándar (principio activo) y muestra (principio activo más placebo) de senósidos en tabletas de chocolate. Lima – 2019.



Anexo 9. Matriz de consistencia

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	MARCO TEÓRICO	VARIABLE E INDICADORES	DISEÑO METODOLÓGICO
Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de senósidos en tabletas de chocolate, Lima - 2019	¿Será confiable el método analítico para la cuantificación de senósidos en tabletas de chocolate desarrollado por el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)?	<p>Objetivo general Desarrollar y validar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de senósidos en tabletas de chocolate y documentar los resultados obtenidos.</p> <p>Objetivos específicos: I. Desarrollar un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en la cuantificación de senósidos en tabletas de chocolate. II. Determinar los parámetros de validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como: especificidad, Linealidad e intervalo, exactitud, precisión y robustez en la cuantificación de senósidos en tabletas de chocolate.</p>	El desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de senósidos en tabletas de chocolate es confiable para obtener los resultados dentro de las especificaciones establecidas en el protocolo de validación.	<p>Validación La validación de un procedimiento analítico es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, donde tiene como objetivo principal asegurar y demostrar que un procedimiento analítico seleccionado dará resultados reproducibles y confiables que sean adecuados para el propósito previsto. Que debe entenderse claramente ya que este rige las características o parámetros de validación como: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, intervalo y robustez.</p> <p>Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) La cromatografía de líquida de alta resolución es un tipo de cromatografía de elución más versátil y ampliamente utilizado como una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida, que se emplean para separar y determinar mezclas complejas de diversos materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos. El gran poder de la cromatografía reside en la combinación de un amplio intervalo de posibles propiedades para la fase móvil, junto con la elección de numerosos tipos de fases estacionarias, significativamente diferentes, así como una amplia variedad de detectores.</p>	<p>Variable: Validación de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).</p> <p>Indicadores: Parámetros de validación:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Selectividad • Linealidad • Precisión • Exactitud • Robustez 	<p>Tipo de investigación. Descriptivo.</p> <p>Población Lote piloto de 20 kilos de tabletas de chocolate.</p> <p>Muestra 600 tabletas y 500 g de placebo de chocolate</p> <p>Procedimiento para la recolección de datos. Los datos se obtendrán al final del ensayo, que es emitido mediante cromatogramas en el equipo HPLC.</p> <p>Diseño de investigación, cuando corresponda Es diseño de tipo experimental y correlacional.</p> <p>Determinación de parámetros de validación Especificidad: se analizó el placebo, según el método desarrollado y se preparó una muestra de placebo con el principio activo al 100 % y se efectuó el análisis respectivo comparando la respuesta del análisis con la de un estándar. Linealidad: se preparó 5 concentraciones para linealidad de sistema al 50 %, 75 %, 100 %, 125 % y 150 % de la concentración nominal del trabajo, por pesadas independientes. Así mismo, para linealidad de método se preparó soluciones de placebo enriquecidas con el principio activo en tres niveles de concentración que cubran el intervalo de trabajo (75 %, 100 % y 125 %), por pesadas independientes. Simultáneamente con las muestras se analizó dos estándares de concentración conocida al 100%, para reportar los resultados de exactitud. Exactitud: se trabajó con las mismas muestras preparadas para la determinación de la linealidad de método. Precisión: Repetibilidad: se analizó independientemente 6 muestras. Precisión intermedia: un segundo analista realizó otro día, el análisis del mismo lote empleado en la repetibilidad usando el mismo método analítico y diferentes equipos. Robustez: Se consideró las tres primeras muestras de repetibilidad como análisis inicial y estas mismas muestras permanecieron aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente y se volvió a correr con un estándar recientemente preparado. Métodos instrumentales para la recolección de datos. Excel y parámetros estadísticos de ANOVA y t studen.</p>