



FACULTAD DE FARMACIA

CARRERA DE QUÍMICA Y FARMACIA

**OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS  
CROMATOGRÁFICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE  
WITHANÓLIDOS EN EXTRACTO SECO DE *Withania somnifera*.**

Internado para optar al Título de Químico Farmacéutico

**MARGARITA ISABEL HERRERA ARANCIBIA**

Director de Internado: Q.F Marcela Escobar P.

Co-director de Internado: Q.F Daniela Irrázabal V.

2014

## DEDICATORIA

A mis padres y hermana  
por el apoyo entregado  
en este proceso.

## AGRADECIMIENTOS

A mi mamá Rosa, porque desde siempre ha estado conmigo, por su apoyo y cuidados entregados. Porque nunca se rindió a pesar de las dificultades.

A mi papá Juan Carlos, por el apoyo, comprensión y cariño entregado a través de todas las decisiones tomadas. Por siempre escuchar mis reclamos y entregar buenas vibras.

A Valentina, mi hermana que sin ella todo sería más difícil, la razón por la que no me rendí en este largo camino, te adoro. Porque es la mejor hermana que pude tener, porque simplemente es todo para mí.

A mis abuelos, por que estuvieron ahí con palabras de apoyo, preocupación y cariño.

A mis tías, Luzmira y Amelia, que fueron a lo largo de estos años y son, fundamentales en este proceso.

A mi prima, Emma, que me soportó durante todo este tiempo, que aunque no lo digamos siempre estaremos ahí una para la otra. También a Cristal, que escuchó y entendió todos los momentos difíciles de este periodo.

A mi amiga Hilda, la pieza fundamental de todos estos años de carrera, sin sus palabras y consejos, sin duda esto habría sido más difícil. Simplemente gracias por entenderme, escucharme, enseñarme y acompañarme. También a su familia que me apoyaron y recibieron en su casa con todo el cariño.

A mi directora de internado Marcela Escobar, por la preocupación y conocimientos entregados, desde sus clases hasta el último momento de este trabajo.

A Daniela Irarrázabal, mi co-directora de internado, por todo lo entregado en este proceso, por entenderme y preocuparse por mí en cada momento. También por las experiencias y amistad entregada.

Al laboratorio de Farmacopea Chilena, porque fue la mejor decisión llegar a este lugar, donde el ambiente es el mejor que pude encontrar, principalmente a Daniela y Don Denis ( "Mi Desi"), que son los que logran que cada persona que llegue al laboratorio se sienta cómodo y pueda compartir más experiencias que solo las educacionales. Gracias Mi Desi por los conocimientos, cariño, canciones, bailes, chistes y todo lo que nos entregas.

A Pía, porque en un corto tiempo logramos generar una gran amistad y siempre estas presente con tu cariño, buena vibra y preocupación.

A Víctor, por entregarme su amistad, conocimientos y apoyo desde el primer año. Porque siempre se dio el tiempo de contestar mis preguntas, escuchar mis reclamos, revisar hoja a hoja y apoyar todo el trabajo practico y escrito. Porque simplemente "Una cosa, es una cosa y otra cosa, es otra cosa".

A la profesora Luján Flores, porque me entregó sus conocimientos y cariño. Además de su preocupación constante a pesar de la distancia.

A Susan, la mejor secretaria, porque siempre estuvo dispuesta a ayudar y responder mis consultas. Y por soportar mis excesivas preguntas durante el último tiempo.

A la profesores Jacqueline Concha y Rodrigo Díaz por sus comentarios y sugerencias para mejorar este trabajo.

## ÍNDICE

Índice general .....	i-ii
Índice de Figuras .....	iii
Índice de tablas .....	iv-vi
Resumen .....	vii
Abstract .....	viii
<b>1. Introducción</b> .....	<b>1- 17</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>18-19</b>
2.1 Objetivo general.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	19
<b>3. Parte experimental</b> .....	<b>20-36</b>
3.1 Materiales y métodos.....	20
3.1.1 Reactivos.....	20
3.1.2 Materiales.....	21
3.1.3 Equipos.....	22
3.1 Metodología .....	23-36
3.2.1 Método de identificación de withanólidos .....	23
3.2.2 Método de cuantificación de withanólidos .....	24
3.2.3 Preparación de estándar y muestras.....	25
3.2.3.1 Soluciones estándar .....	25
3.2.3.2 Cromatografía en capa fina .....	25
3.2.3.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia.....	25
3.2.4 Optimización de parámetros cromatográficos .....	26
3.2.4.1 Cromatografía en capa fina .....	27

3.2.4.2	Cromatografía líquida de alta eficiencia.....	28
3.2.5	Criterios de aceptación de los parámetros cromatográficos .....	29
3.2.6	Validación del método de identificación CCF .....	30
3.2.7	Validación del método de cuantificación HPLC .....	31
<b>4.</b>	<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>37-75</b>
4.1	Optimización de parámetros cromatográficos .....	37
4.1.1	Cromatografía en capa fina .....	37
4.1.2	Cromatografía líquida de alta eficiencia .....	39
4.2	Validación del método de identificación CCF .....	43
4.3	Validación del método de cuantificación HPLC .....	47
<b>5.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>75</b>
<b>6.</b>	<b>Referencias bibliográficas .....</b>	<b>76</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1: <i>Withania Somnifera</i> .....	3
Figura N°2: Estructura básica de los withanólidos.....	5
Figura N°3: Estructura química de los withanólidos .....	7
Figura N°4: Proceso de un método analítico .....	17
Figura N°5: Cromatografía en capa fina de los estándar de WTF y WTN A.....	37
Figura N°6: Cromatograma de una solución estándar.....	40
Figura N°7: Cromatografía en capa fina de la muestra de <i>W. Somnifera</i> .....	44
Figura N°8: Curva de calibrado para WTF .....	47
Figura N°9: Curva de calibrado para WTN A.....	48
Figura N°10: Cromatogramas y pureza de la señal cromatográfica en muestras después de procesos de degradación artificial para WTF .....	55
Figura N°11: Cromatogramas y pureza de la señal cromatográfica en muestras después de procesos de degradación artificial para WTN A .....	56
Figura N°12: Comparación entre las concentraciones estándar y su respuesta para WTF en la evaluación de la robustez. ....	61
Figura N°13: Comparación entre las concentraciones estándar y su respuesta para WTN A en la evaluación de la robustez.....	62
Figura N°14: Comparación entre la concentración obtenida para cada analito en las variaciones de temperatura analizadas a velocidad de flujo 1,0 mL/min.	72
Figura N°15: Comparación entre la concentración obtenida para cada analito en las variaciones de flujo analizadas a temperatura del horno de 50°C. ....	72

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1: Datos requeridos para la validación .....	13
Tabla N°2: Parámetros instrumentales utilizados en HPLC para la cuantificación de WTF y WTN A.....	24
Tabla N°3: Gradiente fase móvil método HPLC para WTF y WTN A .....	25
Tabla N°4: Criterios de aceptación del método de cuantificación HPLC para WTF y WTN A .....	29
Tabla N°5: Variación de los factores en la evaluación de la robustez del método.....	36
Tabla N°6: Rf de estándares de WTF y WTN A .....	38
Tabla N°7: Parámetros cromatográficos de optimización la CCF .....	39
Tabla N°8: Valores promedio de los parámetros cromatográficos de optimización del método de cuantificación de withanólidos por HPLC .....	41
Tabla N°9: Valores de Rf de estándares de withanólidos y muestras de selectividad.....	45
Tabla N°10: Parámetros cromatográficos de optimización para la validación de la selectividad en HPLC .....	45
Tabla N°11: Parámetros estadísticos de la relación lineal y $t_{cal}$ entre la concentración estándar y la respuesta para WTF y WTN A .....	48
Tabla N°12: Parámetros estadísticos de las curvas de calibrado de WTF y WTN A en límite de detección y cuantificación.....	50

Tabla N°13: Límites de detección y cuantificación para WTF y WTN A .....	50
Tabla N°14: Valor promedio del área cromatográfica (n=6), desviación estándar y coeficiente de variación para WTF y WTN A .....	51
Tabla N°15: Área cromatográfica promedio (n=12), desviación estándar y coeficiente de variación para la repetibilidad del método en WTF y WTN A ....	51
Tabla N°16: Área y concentración para WTF de muestras sometidas a degradación artificial.....	53
Tabla N°17: Área y concentración para WTN A de muestras sometidas a degradación artificial.....	53
Tabla N°18: Resultados obtenidos para exactitud del método de cuantificación de WTF.....	58
Tabla N°19: Resultados obtenidos para exactitud del método de cuantificación de WTN A.....	58
Tabla N°20: Parámetros estadísticos de la relación lineal y $t_{cal}$ entre la concentración estándar y la respuesta para WTF .....	60
Tabla N°21: Parámetros estadísticos de la relación lineal y $t_{cal}$ entre la concentración estándar y la respuesta para WTN A .....	60
Tabla N°22: Resultados obtenidos para exactitud del método a 45°C y velocidad de flujo 1,0 mL/min para WTF .....	63
Tabla N°23: Resultados obtenidos para exactitud del método a 55°C y velocidad de flujo 1,0 mL/min para WTF .....	64
Tabla N°24: Resultados obtenidos para exactitud del método con velocidad de flujo 0,8 mL/min a 50°C para WTF .....	65

Tabla N°25: Resultados obtenidos para exactitud del método con velocidad de flujo 1,2 mL/min a 50°C para WTF .....	66
Tabla N°26: Resultados obtenidos para exactitud del método a 45°C y velocidad de flujo 1,0 mL/min para WTN A.....	67
Tabla N°27: Resultados obtenidos para exactitud del método a 55°C y velocidad de flujo 1,0 mL/min para WTN A.....	68
Tabla N°28: Resultados obtenidos para exactitud del método con velocidad de flujo 0,8 mL/min a 50°C para WTN A.....	69
Tabla N°29: Resultados obtenidos para exactitud del método con velocidad de flujo 1,2 mL/min a 50°C para WTN A.....	70
Tabla N°30: Valores obtenidos de $t_{cal}$ para WTF y WTN A.....	71

## **Resumen**

Las plantas medicinales son considerablemente utilizadas en distintos países para satisfacer los problemas de salud de la población. Una de las plantas con mayor popularidad en el sistema de medicina Ayurvédico que ha despertado gran interés es *Withania somnifera*. Esta planta medicinal, ha sido ampliamente utilizada en el mundo y la creciente investigación de sus propiedades benéficas ha permitido encontrar sus componentes biológicamente activos y con efectos positivos para la salud en las hojas y raíz, siendo los de esta última los más utilizada en suplementos alimenticios. Sus compuestos principales son conocidos como withanólidos, donde destacan la Withaferina y el Withanólido A.

En el presente internado se optimizó y validó una metodología analítica tanto de identificación como de cuantificación de dichos componentes presentes en extractos secos de la raíz de *Withania somnifera*, a través de cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alta eficiencia. En la primera metodología se validó la resolución; en la segunda, se validaron los parámetros de linealidad, repetibilidad, exactitud del sistema y del método, límite de detección, cuantificación, selectividad y robustez. Los resultados obtenidos cumplieron con los criterios de aceptación, destacando que las variaciones de temperatura no influyen en la cuantificación de ambos analitos, pero si las variaciones en la velocidad de flujo. Por tanto, las metodologías desarrolladas son de calidad y aptas para su utilización en el análisis de Withaferina y Withanólido A presentes en extractos secos de la raíz de *Withania somnifera*.

## **Abstract**

Medicinal plants are considerably used in different countries to meet the health problems of the population. One of the plants with major popularity in the Ayurvedic medicine system which has aroused great interest is *Withania somnifera*. This medicinal herb, has been widely used in the world and the growing research of its beneficial properties has enable to find its biologically active compounds with positive health effects in leaves and root, the latter being the most used in Food additives. Its major compounds are known as withanolides, which include the withaferin and withanolide A.

In this internship was optimized and validated an analytical methodology for the identifying and quantization of this components in dry extracts of the roots of *Withania somnifera*, through thin layer chromatography and high performance liquid chromatography. In the first methodology, the resolution was validated; in the second, the parameters of linearity, repeatability, accuracy of the system and the method were validated, limit of detection, quantification, selectivity and robustness. The results obtained met the acceptance criteria, noting that the temperature variations do not affect the quantification of both analytes but variations in the flow rate do it. Therefore, the developed methodologies are quality and suitable for its use in analysis of withaferin and withanolide A present in dry root extracts of *Withania somnifera*.

## **1. Introducción**

En la actualidad, las enfermedades denominadas no transmisibles dentro de las que se incluyen patologías cardiovasculares, respiratorias, metabólicas y neoplásicas han ido en un aumento gradual, siendo las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Estas patologías podrían ser reducidas dramáticamente, con un consecuente descenso de la mortalidad, por medio de la reducción de los factores de riesgo, detección oportuna y tratamientos adecuados (WHO, 2010).

Es en este último caso, donde las plantas toman un lugar preponderante, ya que desde tiempos remotos han sido incorporadas en la medicina como coadyuvante en el tratamiento de las enfermedades por parte de la población. Se estima que existen alrededor de 250.000 especies de plantas en el mundo, en las cuales sólo un pequeño porcentaje ha sido estudiada por su actividad biológica o caracterización fitoquímica. En general, el objetivo de estudiar y analizar la gran diversidad química que aportan los metabolitos secundarios de las plantas es aislar o producir compuestos bioactivos con utilidad farmacológica, ya sea por su utilización directa como droga o como herramienta farmacológica para generar posibles tratamientos a las enfermedades que se presentan en la sociedad actual (Fabricant y Farnsworth, 2001).

La Organización Mundial de la Salud (WHO), indica que en la actualidad el 80% de la población mundial utiliza extractos de plantas o sus principios activos

para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud (WHO, 1993). Esto se hace más notorio en países en vías de desarrollo o de bajos ingresos como por ejemplo India, en donde existe un sistema de medicina llamada Ayurvédica, la que tiene sus orígenes en la filosofía y conocimiento de la cultura India, y se fundamenta en lograr un equilibrio entre la dieta y las actividades diarias, incluyendo como pilar fundamental las plantas medicinales (Gennaro, 2003).

Una planta que ha despertado gran interés en el estudio de sus metabolitos secundarios y de gran popularidad en el sistema de medicina Ayurvédico por sus efectos sobre la salud es *Withania somnifera* Dunal (*W. Somnifera*) (Rasool y Varalakshimip, 2005), la cual ha sido utilizada por la cultura India y asiática desde más de 2000 años (Sharma et al., 2011).

*W. somnifera* es un arbusto perenne, pequeño (0,5-2 m), erguido y leñoso que pertenece a la familia de las Solanáceas (Sharma et al., 2011), sus hojas son simples, pecioladas y ovaladas; mientras que sus frutos son bayas globosas encerradas de color rojo anaranjado en un cáliz verde membranoso (Kurian y Sankar, 2007) (Figura N°1(A)). Las raíces de esta planta son carnosas y cuando se encuentran secas tienen forma cilíndrica de color marrón y blanco en el interior (Figura N°1(B)), siendo ésta parte la utilizada por sus propiedades medicinales (Sharma et al., 2011). En la medicina Ayurvédica se considera como Rasayana, es decir, que funciona de manera no específica para incrementar la salud y la longevidad. Esta planta crece y se extiende desde las Islas Canarias y la región mediterránea a través de África, Medio Oriente, India hasta China y se produce de

manera silvestre o bajo cultivos en las partes más secas de las zonas antes mencionadas (Schmelzer et al., 2008).

Los nombres comunes con que se conoce este arbusto son ashwagandha, cereza de invierno, oroal, búfera, hierba mora mayor o ginseng indio, este último nombre debido a que sus constituyentes son similares a los de *Panax ginseng* (ginseng asiático) y por ende, sus efectos son similares y sólo se diferencian por el lugar de origen (Sharma et al., 2011).



Figura N°1: *Withania somnifera*: (A) fase frutal; (B) raíz.

Esta planta es de alta complejidad química, ejemplo de esto es que se conocen más de 80 compuestos (Sharma et al., 2011), se encuentra incluida en el sistema de medicina Indio y presenta una monografía en la Farmacopea India. Se han utilizado y estudiado las distintas partes que componen la planta, pero la parte que ha presentado una mayor concentración de metabolitos activos es la raíz

(Rasool y Varalakshimip, 2005). Estos, en general, son metabolitos secundarios sintetizados por las distintas partes de la planta a partir de aminoácidos (Singh et al., 2010). Dichos compuestos se clasifican en:

- Alcaloides, los principales alcaloides de *W. Somnifera* son withanina, somniferina, somnina, withananina, tropina, pseudo-tropina, entre otros (Singh et al., 2010).
- Saponinas con grupo acilo adicional, en la raíz de esta planta se han aislado los sitoindósidos VII y VIII (Singh et al., 2010).
- Withanólidos glicosilados, contienen una estructura glicosídica adicional a la estructura química que se ubica en el carbono número 27, dentro de los que se han estudiado están los sitoindósido X y XI (Singh et al., 2010).
- Lactonas esteroidales, reconocidos por el nombre de withanólidos. Estos compuestos muestran grandes semejanzas, tanto en acción como en estructura con los ginsenósidos, compuestos activos del *Panax ginseng* (Misico et al., 2011).
- Otros compuestos, entre los que se encuentran el almidón, azúcares reductores, diversos aminoácidos como alanina, glicina, ácido glutámico y una alta concentración de hierro, entre otros (Sharma et al., 2011).

En general, gran parte de los estudios presentes en la literatura asocian las propiedades medicinales de la planta a los withanólidos. Estos son un grupo de origen esteroidal, naturalmente sintetizados como metabolitos secundarios,

compuestos por 28 carbonos construidos sobre un grupo ergostano el que puede encontrarse intacto o reorganizado (Mirjalili et al., 2009).

De los 28 carbonos que lo constituyen, 9 forman parte de la cadena lateral que incluyen un anillo lactónico de 6 miembros, que se forman por la oxidación de los carbonos 22 y 26 (Figura N° 2) (Tursunova et al., 1977) o 23 y 26 (Chen et al., 2011). Estos compuestos son usualmente polioxigenados y se supone que *W. Somnifera* y las otras especies que contienen withanólidos como metabolitos, poseen un sistema enzimático con la capacidad de oxidar todos los átomos de carbono en los núcleos esteroidales (Mirjalili et al., 2009).

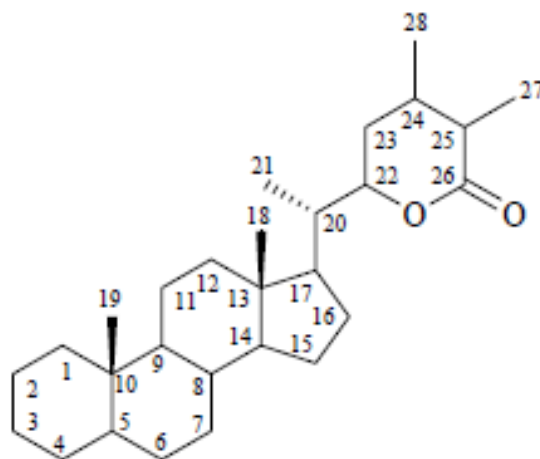


Figura N°2: Estructura básica de los withanólidos (Mirjalili et al., 2009).

Debido a las distintas posibilidades de modificación del esqueleto básico de los withanólidos, se han descubierto y aislado gran cantidad de ellos, los que se han clasificado a grandes rasgos en glicosilados y no glicosilados (Mirjalili et al., 2009). La mayoría de los withanólidos se han encontrado en su forma no glicosilada (aglicona) y solo en pocos casos como glicósidos (Glotter, 1991).

Gran parte de la actividad farmacológica de *Withania* se le atribuye a un withanólido en específico, la Withaferina (WTF) (Singh et al., 2010), siendo el primero en ser aislado y estudiado. A pesar de ello, tanto al Withanólido A (WTN A) como a otros compuestos se le han atribuido propiedades farmacológicas importantes (Rahman, 2005).

Ambos withanólidos poseen un esqueleto base igual  $C_{28}H_{38}O_6$ , que se diferencian en la distribución estructural en la molécula de los elementos químicos, lo que se puede observar en la Figura N°3.

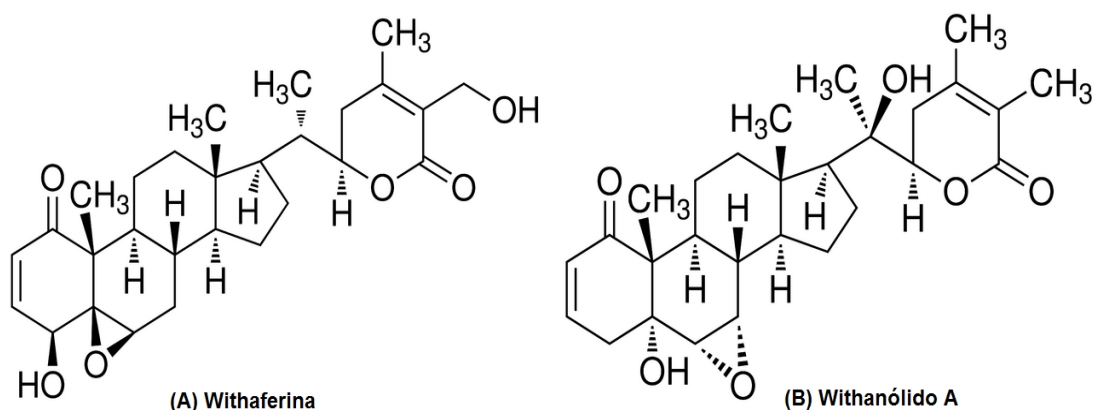


Figura N°3.: Estructura química de los withanólidos: **(A)** Withaferina; **(B)** Withanolido A (Sigma Aldrich, 2013).

Los withanólidos no solo están presentes en *W. somnifera* sino que también en otras plantas de la familia de las Solanáceas, Leguminosas y Lamiaceas (Mirjalili et al., 2009).

La vía de biosíntesis de los withanólidos no está totalmente dilucidada, pero se cree que al ser un componente esteroidal deriva del colesterol, por lo que a partir de la activación del acetato y su conversión a acetil coenzima A, se iniciaría el proceso de síntesis del colesterol que finalmente, luego de procesos como la oxidación, hidroxilación y lactonización daría origen a los distintos withanólidos de la planta (Mirjalili et al., 2009).

Los usos de *W. somnifera* son diversos en la medicina Ayurvédica y han adquirido gran notoriedad en otros países como por ejemplo Estados Unidos, lo que ha generado que se lleven a cabo gran cantidad de estudios sobre sus múltiples beneficios. Entre las propiedades que se le atribuyen están: la actividad

anticancerígena (Winters, 2006), antiinflamatoria, adaptógena (Singh et al., 2010), hormono-modulador (Panda y Kar, 1998), inmunomodulador (Rasool y Varalakshmi, 2005), antibacteriana (Owais et al., 2005), ansiolítica (Kulkarni et al., 2008), cardioprotectora y antioxidante (Mishra et al., 2000).

Gran parte de las acciones que se han estudiado para las distintas partes de la planta pueden ser explicadas principalmente por la acción sobre GABA y la acción antioxidante. En base a una gran cantidad de investigaciones sobre esta planta y sus componentes se ha determinado que podría ser una buena fuente de compuestos naturales frente a un gran número de patologías, es por ello que no es extraño encontrarla formando parte de las formulaciones de diferentes suplementos alimenticios tanto en India como en otros países.

En Chile, el gasto por persona en suplementos alimenticios y vitaminas ha aumentado considerablemente en los últimos años, pero aún no logra compararse con las altas ventas en países como Estados Unidos, Brasil o India, a pesar de ello la tendencia del país es incorporar cada vez más los suplementos alimenticios a la vida cotidiana (Parada, 2012) entre ellos los que posean *W. Somnifera*. Es por esto que se hace necesaria una estandarización de los productos que se expenden al público y asimismo una caracterización de la planta, en este caso *W. Somnifera* para que de esta manera pueda permitirse la identificación y normalización de las distintas formulaciones que existen en el mercado. Además, estos compuestos de origen vegetal son fácilmente adulterables por otros compuestos con características físicas similares.

Para asegurar y mantener el control sobre la calidad que debe tener un suplemento alimenticio que se expende al público, debe ser analizado por métodos analíticos de identificación y cuantificación generalmente de separación cromatográfica, en los que una muestra determinada se distribuirá entre dos fases, una móvil y otra estacionaria (USP XXXVI, 2013). Existen distintos métodos cromatográficos, el más simple y fácil de utilizar para la identificación de compuestos es la cromatografía en capa fina (CCF).

La CCF consiste en aplicar una cantidad pequeña de la muestra en una placa absorbente (usualmente silicagel) y la fase móvil se moverá a través de la fase estacionaria por medio de la acción capilar, entregando como resultado diferentes distancias de migración (Fried y Sherma, 1999) estas distancias pueden observarse a simple vista o por algún método de derivatización, como la luz ultravioleta o soluciones reveladoras. La identificación de los compuestos se puede llevar a cabo bajo la observación de las señales o por las distancias obtenidas eluyendo la muestra de interés y un estándar en la misma placa a iguales condiciones (USPXXXVI, 2013).

En cuanto a la cuantificación de metabolitos en una muestra por métodos analíticos se utiliza la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Esta consiste en separar los componentes de una muestra por medio de distintas interacciones químicas entre la muestra, la fase estacionaria y la fase móvil. Existen cuatro técnicas de HPLC según el tipo de interacción molecular utilizada (Kazakevich y Lobrutto, 2007):

1. HPLC de fase normal (NP-HPLC), donde predominan las fuerzas polares.
2. HPLC de intercambio iónico, donde se utilizan fuerzas iónicas.
3. HPLC por tamaño de exclusión, la que se basa en la ausencia de cualquier interacción entre el analito de interés y la fase estacionaria.
4. HPLC de fase reversa (RP-HPLC), donde se utilizan las fuerzas dispersivas (interacciones de Van der Waals o hidrofóbicas).

Este último método es el más utilizado, debido principalmente a la capacidad de discriminar estrechamente entre compuestos relacionados (Kazakevich y Lobrutto, 2007). RP-HPLC utiliza la fase estacionaria con características apolares y una fase móvil con moderada polaridad, este método entrega como resultado un cromatograma, el que se define como una representación gráfica de la respuesta del detector frente a la concentración del analito de interés en la muestra a analizar asociada a un tiempo de retención ( $t_r$ ) que se define como “el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición de la respuesta máxima” (USP XXXVI, 2013).

Para obtener el método de identificación y cuantificación más adecuado para el analito que se desea examinar, el método debe pasar por un proceso de optimización. En CCF, la optimización se realiza por medio de la determinación de la resolución, que es la capacidad de separación de dos analitos que se deseen encontrar en una muestra determinada, mientras que el caso de la optimización de

un método HPLC es necesario determinar los parámetros de resolución, número de platos teóricos de la columna, factor de capacidad y la selectividad a partir de los cromatogramas obtenidos al analizar las muestras deseadas. Con la optimización del método se busca obtener una mejor separación, en el menor tiempo y con el menor costo posible para el análisis de la muestra. (Skoog et al., 2001).

Como se mencionó anteriormente el primer paso para obtener un método de identificación y cuantificación de un analito es la optimización, pero también estos deben ser capaces de entregar resultados confiables y verdaderos. Todas las mediciones o procedimientos analíticos que estén involucrados en la metodología de análisis traerán consigo errores, tanto aleatorios como sistemáticos, los que pueden alterar los resultados finales, disminuyendo la calidad de la información analítica entregada (Harris, 2003).

La industria farmacéutica y de suplementos alimenticios ha generado a lo largo del tiempo diversas recomendaciones y requerimientos hasta llegar en la actualidad a una reglamentación bien definida sobre la calidad de los productos (Cañigüeral et al., 2003), es por esto que distintos organismos de regulación como la FDA (Food and Drug Administration), y la EPA (Environmental Protection Agency) recomiendan que los métodos analíticos utilizados sean validados (Sierra et al., 2010). El término validación, es un concepto que genera ambigüedad en la comunidad científica. La Farmacopea de los Estados Unidos (USP XXXVI, 2013) lo ha definido como “el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio,

que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas”, mientras que la FDA (1994) lo ha definido como “establecer por medio de evidencia objetiva que un proceso produce consistentemente un resultado o un producto que cumple con sus especificaciones predeterminadas”. Por tanto, la validación permite conocer tanto la imprecisión (error aleatorio), como la inexactitud del método (error sistemático), conociendo de esta manera el error total de éste y si su valor afecta la interpretación del resultado (Valcárcel y Rios, 2002). Los laboratorios de ensayo y calibración deben cumplir con una normativa internacional, la norma ISO 17025 en la que se regula la calidad de los resultados entregados, esta norma también define el concepto de validación como la confirmación mediante examinación y la presentación de pruebas objetivas de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico (ISO 17025, 2005).

La ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use), FDA y las Farmacopeas Europea (Ph. Eur) y Norteamericana (USP) han desarrollado guías de validación que permiten la orientación y determinación de los parámetros que deben ser analizados en el método para cumplir con el concepto de validación.

La USP XXXVI (2013) clasifica la metodología analítica en cuatro categorías de valoración e indica los parámetros que deben determinarse según el tipo de método a validar, los que se pueden observar en la Tabla N°1.

Tabla N°1: Datos requeridos para la validación.

Características de desempeño analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis cuantitativos	Pruebas de Límite		
Exactitud	Sí	Sí	*	*	No
Precisión	Sí	Sí	No	Sí	No
Especificidad	Sí	Sí	Sí	*	Sí
Límite de detección	No	No	Sí	*	No
Límite de cuantificación	No	Sí	No	*	No
Linealidad	Sí	Sí	No	*	No
Intervalo	Sí	Sí	*	*	No

Fuente: USP XXXVI, 2013. Nota: (\*) Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

Las pruebas de identificación por CCF se clasifican en la categoría IV (pruebas de identificación) por tanto el único dato requerido para la validación es la especificidad. En el caso de métodos de cuantificación por HPLC, se clasifican en la categoría II de valoración subdivisión cuantitativa por lo que los parámetros a especificar son los descritos a continuación (USP XXXVI, 2013):

- **Exactitud:** este parámetro revela la proximidad que existe entre el resultado obtenido con la metodología a validar y un valor aceptado como verdadero, el que puede ser un material de referencia interno del laboratorio, uno de referencia certificada o un estándar farmacopeico. Permite determinar el error sistemático del método analítico y este puede

evaluarse tanto para la metodología como para el sistema que se utilizará para llevar a cabo el método.

- **Precisión:** es una medida que refleja el nivel de concordancia o dispersión de una sucesión de ensayos particulares a partir de una misma muestra homogénea, cuando el método es aplicado en reiteradas ocasiones. La determinación de este valor proporcionará la estimación del error aleatorio que se generará al utilizar el método analítico. Este parámetro debe especificarse tanto para el sistema, evaluando un estándar de referencia como para el método, determinando la dispersión en una muestra a analizar homogénea.

Esto permite tener claridad sobre todos los procesos que incorporan errores aleatorios al resultado final entregado por el método, ya que se evalúan todos los pasos del método, desde la preparación de la muestra pasando por las diluciones hasta la medición del analito.

- **Especificidad o selectividad:** determina la capacidad que posee el método de producir una señal de medición que solo sea propia del analito sin que interfieran otros componentes como productos de degradación, otros analitos que contenga la muestra o impurezas. Este parámetro en el caso de análisis por HPLC, debe acompañarse de un análisis de la pureza de la señal cromatográfica.

- **Límite de cuantificación:** es la menor medida de analito en una muestra determinada con valores adecuados de exactitud y precisión en los requisitos planteados por el método a validar. En conjunto con el límite de detección del método son una medida de la sensibilidad, es decir, la mínima cantidad de analito que se podría determinar con resultados fiables y consistentes. Generalmente no se determinan estos parámetros por el gran trabajo que significan y habitualmente se determinan los parámetros de exactitud y precisión a la concentración más baja posible para el o los analitos en estudio.
- **Linealidad e intervalo:** es la habilidad que posee el método para entregar resultados dentro de un rango o intervalo determinado, resultados proporcionales entre la concentración del analito de análisis y la respuesta, ya sea directamente proporcional o por medio de conversiones matemáticas. Simultáneamente a este parámetro se determina el intervalo o rango lineal, es decir, el valor entre el mínimo y el máximo de la concentración de analito para el que está diseñado el método y en el cual se ha estudiado que se puede realizar la interpolación de datos en una curva de calibrado, determinado por medio de la linealidad.
- **Robustez:** mide la habilidad que posee el método para no verse afectado por cambios o variaciones ligeras en los requisitos que se han descrito para el método. En palabras simples, es la capacidad de reproducir un resultado frente a cambios, ya sea básicos como cambio de analista o mayores como

modificaciones en las columnas, reactivos o condiciones del método como pH, temperatura, flujo, entre otros. Un método analítico presentará una mayor robustez al verse en menor medida afectado en sus resultados por las modificaciones que ocurran en cualquiera de las condiciones analíticas estipuladas para la entrega de valores confiables y acertados.

Para la utilización de una metodología analítica, debe pasar primero por el desarrollo de la misma, una posterior optimización y finalmente el proceso de validación para que de esta manera los resultados obtenidos y utilizados para la fabricación de suplementos alimenticios de venta al público sean fiables y consistentes. El procedimiento analítico a medida que es utilizado rutinariamente puede requerir cambios, los que se pueden traducir en una revalidación o en un redesarrollo de este mismo (McPolin, 2009) (Figura N° 4):

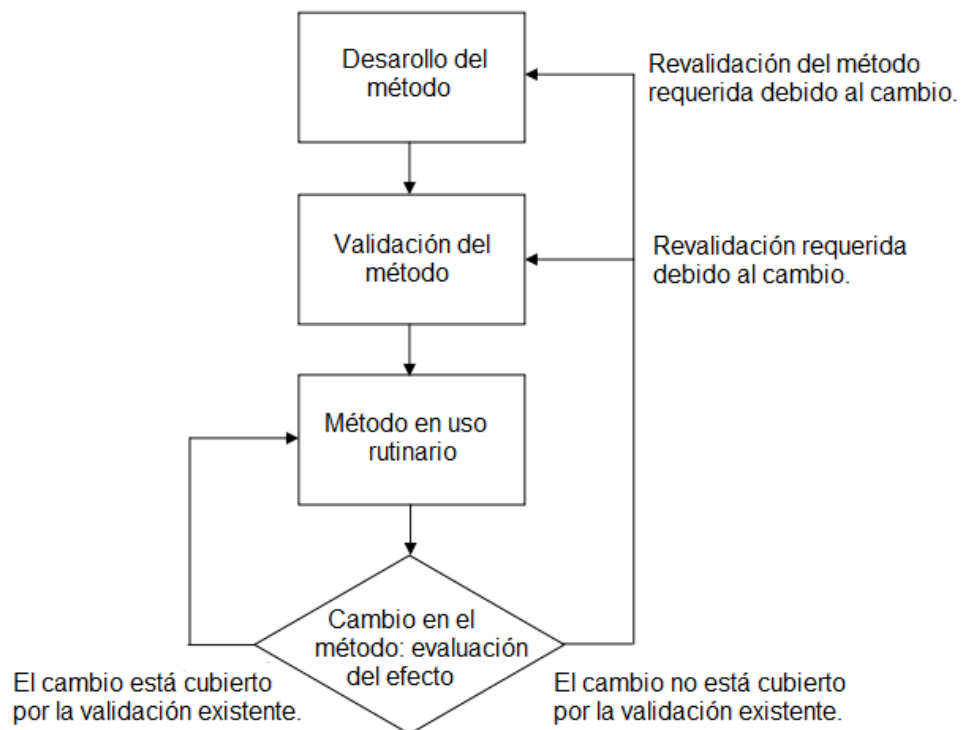


Figura N° 4: Proceso de un método analítico. Traducido de McPolín, 2009.

En este trabajo se desarrollará una metodología analítica para optimizar y validar la identificación y cuantificación de WTF y WTN A que permita analizar el extracto seco de la raíz de *W. somnifera*, para asegurar que se disponga de un método de calidad, adecuado para la utilización por parte de Farmacopea Chilena en el análisis de los metabolitos mencionados anteriormente.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo general

Desarrollar, optimizar y validar un método cromatográfico de identificación por cromatografía en capa fina y de cuantificación por cromatografía líquida de alta eficiencia para withanólidos en un extracto seco de la raíz de *Withania somnifera*.

## 2.2 **Objetivos específicos**

1. Implementar y optimizar un método de identificación de withanólidos por cromatografía en capa fina.
2. Implementar y optimizar un método de identificación y cuantificación de withanólidos por cromatografía líquida de alta eficiencia.
3. Validar las metodologías cromatográficas de identificación y cuantificación de withanólidos.
4. Identificar y cuantificar los withanólidos: Withaferina y Withanólido A, mediante los métodos optimizados y validados en extractos secos de la raíz de *Withania somnifera*.

### **3. Parte experimental**

#### **3.1 Materiales y métodos**

##### **3.1.1 Reactivos**

- 1- butanol grado HPLC Loba Chemie, 99,7% de pureza
- Acetato de etilo técnico Lab-tec
- Ácido acético glacial p.a Merck, 100% de pureza
- Ácido sulfúrico p.a Sigma Aldrich, 95-97% de pureza
- Anisaldehído purísimo, Fluka
- Agua ultrapura
- Cloroformo J.T.Baker, 99,98% de pureza
- Etanol grado HPLC Merck, 99,9% de pureza
- Metanol para HPLC Merck, 99,9% de pureza
- Metanol p.a. Merck
- Withanólido A (HPLC) Sigma- Aldrich, 99,8% de pureza.
- Withaferina A (HPLC) Sigma- Aldrich, 99,8% de pureza

### 3.1.2 **Materiales**

- Cámara cromatográfica
- Desecador
- Filtro jeringa 0,45  $\mu\text{m}$  PTFE MS, diámetro 13 mm
- Jeringas BD 3 mL
- Material fungible de laboratorio
- Membrana PVDF 0,45  $\mu\text{m}$  Chromtech
- Micropipeta HTL 100  $\mu\text{L}$  - 1000  $\mu\text{L}$
- Micropipeta P10 Gilson 1  $\mu\text{L}$  - 10  $\mu\text{L}$
- Micropipeta P100 Gilson 10  $\mu\text{L}$  - 100  $\mu\text{L}$
- Papel filtro lento
- Placas cromatográficas Silicagel G/UV254 20 x 20 cm Macherey-Nagel
- Tubos centrifuga 15 mL
- Tubos de ensayo
- Viales de vidrio 2 mL National Scientific

### 3.1.2 Equipos

- Agitador Vortex maxi mix II Thermo Scientific
- Balanza analítica Radwag AS220/CL2
- Balanza de precisión Radwag PS360/CL2
- Baño de ultrasonido DS-DHWUCD10H
- Centrifuga 5702R Eppendorf
- Cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC) Shimadzu
  - Modelo: LC-20AD
  - Autoamplifier SIL-20ACh
  - Bomba cuaternaria LC-20AD
  - Compartimiento de la columna CTO-20AC
  - Detector de arreglo de diodo SPD-M20A
  - Interface CBM-20<sup>a</sup>
  - Columna C18 Inertsil ODS3 (250 mm x 4,6 µm x 5 µm)
- Estufa Binder
- Purificador de agua ultrapura ELGA Purelab Classic
- Refrigerador LG

## 3.2 Metodología

### 3.2.1 Método de identificación de Withanólidos

Se implementó el método desarrollado por Sumithradevi et al (2011) para la identificación de WTF y WTN A, el cual fue modificado para permitir la identificación adecuada de ambos metabolitos en el extracto seco de la raíz de *W. Somnifera*.

Este método consiste en la detección de los analitos por medio de la CCF, bajo las siguientes condiciones cromatográficas:

- Placa cromatográfica: Gel de sílice G<sub>254</sub>
- Fase móvil: acetato de etilo: cloroformo: metanol (6:3:1)
- Temperatura: ambiente (25 °C aproximadamente)
- Revelador: Anisaldehído sulfúrico
- Detección: visible

Se sembraron las muestras y los estándar de WTF y WTN A, se desarrolló la placa hasta 8 centímetros con la fase móvil. Posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente por 10 min y luego se pulverizó la placa con el revelador. Finalmente se secó la placa en una estufa a 105°C por 15 min y se observaron las señales a luz visible.

### 3.2.2 Método de cuantificación de Withanólidos

Se implementó el método desarrollado por Ganzera et al. (2003) para la cuantificación de withanólidos, descrito para WTF, el que se modificó para posibilitar la cuantificación de ambos withanólidos.

El método consiste en la cuantificación directa de los analitos por medio de R<sup>o</sup>P-HPLC, bajo las siguientes condiciones cromatográficas:

Tabla N°2: Parámetros instrumentales utilizados en HPLC para la cuantificación de WTF y WTN A.

Parámetro	Condición
Columna	C <sub>18</sub> Inertsil (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)
Fase móvil	Gradiente
Detector	UV- Visible con arreglo de diodos
Temperatura del horno	50°C
Detección	227 nm
Velocidad de flujo	1,0 mL/min
Volumen de inyección	20 µL

La gradiente utilizada, se detalla en la Tabla N°3, utilizando como solventes: agua ultrapura, metanol grado HPLC y reactivo de alcohol. Este reactivo está formado por etanol, metanol y butanol todos grados HPLC en proporción 90,6: 4,5: 4,9.

Tabla N°3: Gradiente fase móvil método HPLC para WTF y WTN A.

Tiempo (Min)	Solvente A (Agua)	Solvente B (Metanol)	Solvente C (Reactivo de alcohol)
0 → 45	65 → 45	17,5 → 27,5	17,5 → 27,5
45 → 50	45 → 65	27,5 → 17,5	27,5 → 17,5
50 - 60	65	17,5	17,5

### **3.2.3 Preparación de estándar y muestras**

#### **3.2.3.1 Soluciones estándar**

Se pesaron 1,9 mg de WTF y se llevó a un matraz de aforo de 5 mL con metanol y se pesaron 1,0 mg del WTN A y se llevó a un matraz de aforo de 5 mL con metanol.

#### **3.2.3.2 Cromatografía en capa fina**

Se pesaron 500 mg de muestra, se le adicionó 3 mL de metanol, se agitó por alrededor de 1 min, se sonicó por 10 min y se centrifugó por 5 min a 3000 rpm. Se separó el residuo del líquido sobrenadante la que se utilizó para CCF.

#### **3.2.3.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia**

Se pesaron 500 mg de muestra, se adicionaron 3 mL de metanol, se agitó por alrededor de 1 min, se sonicó por 10 min y se centrifugó por 5 min a 3000 rpm, el líquido sobrenadante de las 3 repeticiones se llevó a un matraz de aforo de 10 mL con metanol grado HPLC.

### 3.2.4 Optimización de parámetros cromatográficos

#### 3.2.4.1 Cromatografía en capa fina

Se preparó una solución estándar a una concentración de 380 µg/mL para WTF y 200 µg/mL para el WTN A. Se sembraron 20 µL de cada una de las soluciones en una placa cromatográfica con las condiciones descritas anteriormente.

El desarrollo cromatográfico se efectuó por triplicado. A partir de los datos obtenidos se calculó la resolución entre ambos analitos, mediante la siguiente fórmula (Costanzo 1997):

$$R = \frac{2 \cdot \Delta R_f \cdot DD}{(w_1 + w_2)}$$

Dónde:

DD = distancia desarrollada de la fase móvil en cm, medida desde el punto de origen hasta el frente de solvente.

( $w_1 + w_2$ ) = Suma del ancho de las señales cromatográficas en cm.

$\Delta R_f$  = Es la diferencia entre la relación de frentes (Rf) de ambos analitos

El Rf para cada analito se calcula por medio de la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida en cm por la muestra desde el origen}}{\text{distancia recorrida en cm por la fase móvil desde el origen}}$$

### 3.2.4.2 Cromatografía líquida de alta resolución

Se preparó una solución estándar con una concentración de 13,7 µg/mL y 17,6 µg/mL de WTF y WTN A respectivamente. Esta solución se analizó mediante los parámetros instrumentales señalados previamente, inyectándose la muestra en 6 repeticiones.

A partir de los cromatogramas obtenidos se calcularon los siguientes parámetros cromatográficos que permiten la optimización del método de cuantificación (Quattrochi et al., 1992; Ahuja et al. 2005; USP XXXVI, 2013):

**a) Número de platos teóricos (N):** Es una medida de la eficiencia de una columna de cromatografía. Los platos teóricos son una zona hipotética o etapa donde el soluto se equilibra entre la fase móvil y la fase estacionaria, mientras pasa a través de la columna. Los platos teóricos fueron calculados para ambos analitos, utilizando la fórmula a continuación:

$$N = 16 \cdot \left( \frac{t_r}{W} \right)^2$$

Donde:

$t_r$  = Tiempo de retención de la señal del analito (min).

$W$  = Ancho de la señal medido sobre la línea base (min).

- b) **Factor de capacidad ( $k'$ ):** Mide cuantas veces el analito de interés es retenido respecto de un componente no retenido por la columna. Debe calcularse para cada una de las señales cromatográficas de interés, mediante la siguiente fórmula:

$$k' = \frac{(t_r - t_0)}{t_0}$$

Donde:

$t_r$  = Tiempo de retención de la señal del analito (min).

$t_0$  = Tiempo de elución del volumen muerto o de los compontes no retenidos (min).

- c) **Factor de selectividad ( $\alpha$ ):** es una medida de la retención diferencial entre dos analitos y corresponde al cociente entre el factor de capacidad de dos señales de interés. Este factor se obtiene a partir de la siguiente formula:

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$$

Donde:

$k'_1$  y  $k'_2$ , corresponden al factor de capacidad de cada analito.

d) **Resolución (R):** Es una medida de la separación que existe entre dos señales cromatográficas. Se obtiene por medio del cálculo a continuación:

$$R = \frac{(tr_2 - tr_1)}{\frac{1}{2}(w_2 + w_1)}$$

Donde:

$tr_1$  y  $tr_2$  = tiempos de retención de los analitos a analizar (min)

$w_1$  y  $w_2$  = ancho de la señal para cada analito medido sobre la línea base.

### 3.2.5 Criterios de aceptación de los parámetros cromatográficos:

A continuación, se describen los criterios con que debe cumplir el método de cuantificación para los parámetros cromatográficos (USP XXXVI, 2013):

Tabla N°4: Criterios de aceptación del método de cuantificación HPLC para WTF y WTN A.

Parámetro	Valor
Número de platos teóricos (N)	$\geq 2000$
Factor de capacidad ( $k'$ )	2-7
Factor de selectividad ( $\alpha$ )	$< 1,5$
Resolución (R)	$> 1,0$

### 3.2.6 Validación del método de identificación CCF

a) **Selectividad:** Se desarrolló una placa cromatográfica con las condiciones descritas con anterioridad. Para ello, se sembraron las soluciones estándar, la muestra en condiciones normales y las que se describen a continuación:

- **Termólisis en solución:** la solución de la muestra ya preparada se sometió a 80°C en un baño termostático durante dos horas.
- **Fotólisis en solución:** la muestra se preparó normalmente y luego se expuso por 24 horas a la luz natural directa.
- **Fotólisis y humedad muestra seca:** previo a la preparación de la muestra, el extracto seco de *W. Somnifera* fue expuesto a la luz natural y a condiciones de humedad ambiental (50% HR) por dos horas. Después de este período la muestra se preparó de manera normal.

A partir del cromatograma, se obtuvo los valores de  $R_f$  y  $R$  a partir de cada siembra tanto para WTF como para el WTN A, las cuales se compararon con la muestra preparada sin tratamiento. Las soluciones estándares se sembraron para comprobar la presencia de los analitos en las muestras.

### 3.2.7 Validación del método de cuantificación HPLC

#### a) Linealidad del sistema

Se construyó una curva de calibrado de respuesta versus concentración a partir de 5 diluciones de una solución estándar que comprendía un rango de concentración entre 7,6 - 20,5 µg/mL para WTF y entre 8,8 – 27,2 µg/mL para WTN A. Cada nivel de concentración fue analizado por triplicado.

Con los datos obtenidos se determinó la ecuación de la recta del modelo de regresión lineal por el método de los mínimos cuadrados. La concentración para WTF y WTN A se obtuvo por la siguiente ecuación:

$$y = mx + b$$

Donde

m = el estimador de la pendiente de la recta

b = estimador de la ordenada en el origen

Para demostrar la linealidad del método analítico en el rango de trabajo se determinó la constante de Student experimental ( $t_{cal}$ ):

$$t_{cal} = \frac{|r\sqrt{n-2}|}{\sqrt{1-r^2}}$$

Donde

$r$  = coeficiente de correlación de la curva

$n$  = número de niveles de concentración de la curva

$r^2$  = coeficiente de correlación de Pearson

El valor de  $t_{cal}$  calculado para la curva de calibrado de cada withanólido se comparó con la constante de Student tabulada ( $t_{tab}$ ) al 99,95 % de probabilidad para  $n-2$  grados de libertad. Si el valor obtenido para  $t_{cal}$  es mayor a  $t_{tab}$  se concluye que existe una correlación lineal significativa entre ambas variables (Quattrochi et al., 1992).

#### **b) Límites de detección y cuantificación:**

Se construyó una curva de calibración en concentraciones inferiores a la curva de linealidad, utilizando 5 diluciones preparadas a partir de la solución estándar de WTF ( 380  $\mu\text{g/mL}$ ) y WTN A (200  $\mu\text{g/mL}$ ) entre el 10 y el 40% de la concentración de interés para cada analito, cada solución fue inyectada por triplicado.

El cálculo del límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) se realizó por el programa Origin 4.0.

**c) Repetibilidad del sistema:**

Se realizó el análisis de una solución estándar de 13,7 µg/mL para WTF y 17,6 µg/mL para WTN A, inyectándose 6 veces la misma solución.

A partir de los datos obtenidos se determinó el coeficiente de variación (CV) por:

$$CV : \frac{DS}{\bar{X}} \cdot 100$$

Donde:

DS = desviación estándar de las áreas promedio obtenida

$\bar{X}$  = Promedio de las áreas promedio obtenidas

Luego de obtener el CV, se comparó con el valor indicado como criterio de aceptación (USP XXXVI, 2013):

$$CV \leq 1,27 \%$$

**d) Repetibilidad del método:**

Se prepararon 6 muestras distintas en la mañana por un mismo analista, según lo descrito previamente y luego 6 muestras distintas en la tarde.

Cada una de las soluciones para cada withanólido se inyectó una vez obteniendo los datos de  $t_r$  y área. Para el análisis de los resultados, se calculó

el % CV del área promedio obtenida y se comparó con el criterio de aceptación calculado por la ecuación de Horwitz (Quattrochi et al, 1992):

$$\%CV = 2^{(1-0,5\log C)}$$

Donde

C = concentración del analito expresada en g/mL

e) **Selectividad:**

Se analizó la muestra en condiciones normales y la muestra en las condiciones extremas que se describen a continuación:

- **Termólisis en solución:** la solución de la muestra ya se sometió a 80°C en un baño termorregulado durante dos horas.
- **Fotólisis en solución:** la muestra fue preparada normalmente y luego se expuso por 24 horas a la luz natural directa.
- **Fotólisis y humedad muestra seca:** previo a la preparación de la muestra, el polvo del extracto seco de *W. Somnifera* fue expuesto a la luz natural y a condiciones de humedad ambiental (50% HR) por dos horas. Después de este período la muestra se preparó de manera normal.

Las soluciones para cada withanólido fueron preparadas cuidando que las concentraciones fueran las mismas en todos los ensayos y se inyectaron por triplicado. Obteniéndose los datos de  $t_r$ , área y la concentración del analito en la muestra, también se analizó la pureza de la señal cromatográfica.

**f) Exactitud del método:**

Se preparó una muestra de polvo del extracto seco de *W. somnifera* mediante la metodología descrita y se analizó por triplicado. A partir de esto se obtuvo el área y la concentración de cada uno de los withanólidos en la muestra extrapolada a partir de la curva de calibrado.

Posteriormente se prepararon 3 muestra, a cada una de ellas se le adicionó 50, 100 y 150  $\mu\text{L}$  de la solución estándar de WTF (380  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); 25, 50 y 75  $\mu\text{L}$  de la solución estándar de WTN A (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Las muestras cargadas se analizaron por la metodología indicada inyectándose también por triplicado.

Con los datos obtenidos a partir de los cromatogramas se calculó el porcentaje de recuperación (%R) para las mediciones individuales y sus respectivos promedios, DS y CV. El análisis estadístico de las cifras calculadas se realizó por medio del test T- Student obteniéndose el valor de  $t_{\text{cal}}$  y se comparó con el  $t_{\text{tab}}$  obtenido teóricamente. No existirán diferencias significativas y la exactitud del sistema será la adecuada si  $t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}}$ .

El criterio de aceptación para la validación de la exactitud del método es de 90-100 % para el %R con un  $\text{CV} \leq 2\%$  (USP XXXVI, 2013).

**g) Robustez:**

Se evaluó el efecto de pequeñas variaciones del método en los parámetros de validación. Los cambios en las condiciones cromatográficas fueron los que se presentan en la Tabla N° 5:

Tabla N°5: Variación de los factores en la evaluación de la robustez del método.

<b>Factor</b>	<b>Condición de trabajo</b>	<b>Variación 1</b>	<b>Variación 2</b>
<b>Temperatura del horno (°C)</b>	50	45	55
<b>Velocidad de flujo (mL/min)</b>	1,0	0,8	1,2

Se construyeron curvas de calibrado respuesta versus concentración para cada variación de las condiciones experimentales del método original. Con 5 niveles de concentración que comprendieron un rango entre 7,6 - 20,5 µg/mL para WTF y 8,8 – 27,2 µg/mL para WTN A, cada solución se analizó por triplicado y se determinó la linealidad de cada variación.

También se determinó la exactitud del método para cada una de las variaciones utilizando la misma metodología anterior, calculando el %R, DS y CV, además de la prueba estadística T-Student. Finalmente se compararon las concentraciones obtenidas de ambos withanolidos a partir de las variaciones analizadas.

#### 4. Resultados y discusión

##### 4.1 Optimización de parámetros cromatográficos

##### 4.1.1 Cromatografía en capa fina

En la Figura N° 5 se observa el cromatograma obtenido para las soluciones estándar de WTF (380 µg/mL) y WTN A (200 µg/mL). Los valores de los R<sub>f</sub> para cada analito y sus repeticiones se observan en la tabla N°6.

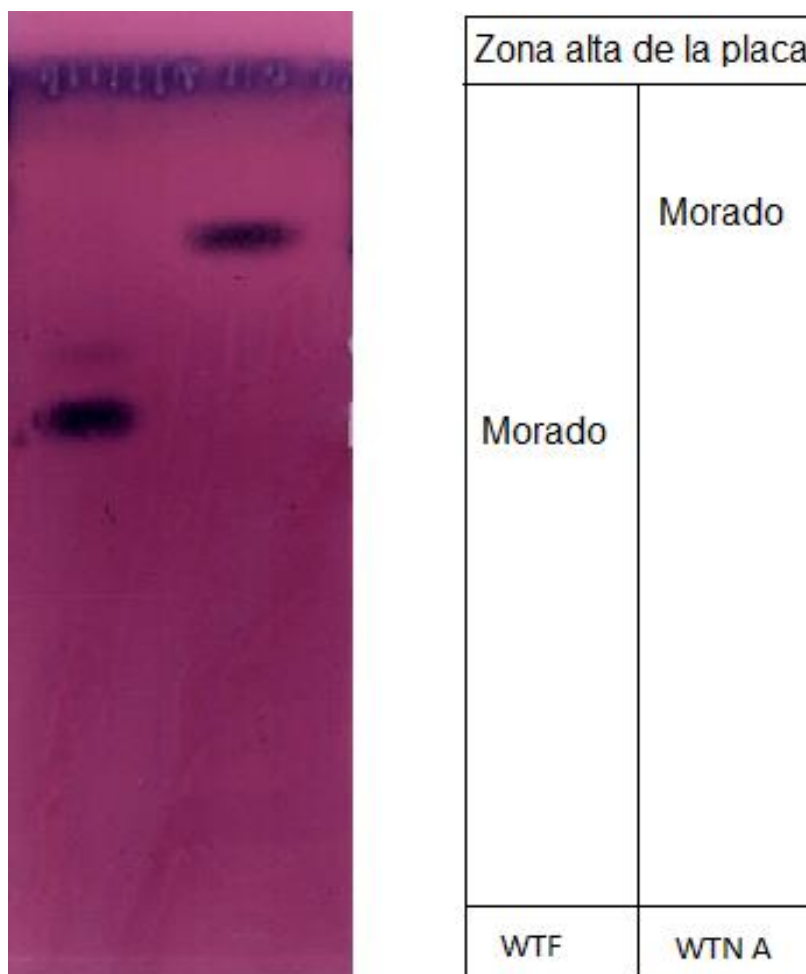


Figura N° 5: Cromatografía en capa fina de los estándares de WTF y WTN A.

Tabla N°6: Rf de estándares de WTF y WTN A.

N° repetición	Rf	
	WTF	WTN A
1	0,60	0,80
2	0,59	0,80
3	0,61	0,80
<b>Promedio ± DS</b>	0,60 ± 0,01	0,80 ± 0,01

Para la identificación de analitos en muestras de interés de una manera rápida, fácil y económica se utiliza la CCF como técnica de análisis (Ortuño, 2006). La preparación de la muestra también debe ser fácil de realizar para mantener las ventajas de este método, por lo que un baño de ultrasonido a través de un efecto mecánico permite la penetración del solvente de extracción en la muestra (Wagner y Bladt, 2009), en este caso la WTF y el WTN A y se utilizó metanol como solvente, ya que al ser un compuesto orgánico de alta polaridad permite que ambos withanolidos se solubilizan.

En esta metodología, ambos withanolidos son compuestos con estructuras complejas de polaridad media y se presentan en forma de agliconas. Sumithradevi et al. (2011), realizaron un estudio en el que obtuvieron una CCF, en donde se muestran los Rf obtenidos para WTF y WTN A con un sistema de solvente cloroformo: metanol (90:10). Ambos withanolidos estudiados presentaron Rf muy cercanos 0,6 y 0,65, por lo que no existe una óptima resolución al momento de analizarlos conjuntamente. Es por esto que se modificó la fase móvil, incorporando etilacetato a la fase móvil (EA:C:M; 6:3:1) ya que aporta mayor

polaridad al sistema (Johll, 2008), permitiendo que los compuestos de menor polaridad, en este caso el WTN A quede menos retenido por la fase estacionaria, avanzando más a través de la placa de silicagel y así aumentar la resolución entre ambos analitos.

En la tabla N°7 se presentan los resultados para determinar la resolución entre las señales cromatográficas para ambos withanólidos. Se obtiene una resolución promedio de 6,07 para las condiciones cromatográficas descritas.

Tabla N°7: Parámetros cromatográficos de optimización la CCF.

	$\Delta R_f$	DD (cm)	$w_1+w_2$ (cm)	R
<b>1</b>	0,20	15,00	1,10	5,50
<b>2</b>	0,21	15,00	0,90	7,00
<b>3</b>	0,19	15,00	1,00	5,70
<b>Promedio <math>\pm</math> DS</b>	0,20 $\pm$ 0,01	15,00	1,00 $\pm$ 0,10	6,07 $\pm$ 0,81

#### **4.1.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia**

Para lograr el método definitivo, con el cromatograma adecuado, se realizaron una serie de análisis y variaciones al método de Ganzera et al. (2003), debido a que solo estaba descrito para WTF y no para la cuantificación de ambos analitos. En la Figura N°6 se observa el cromatograma para las dos señales cromatográficas de las soluciones estándares, la primera corresponde a WTF y la segunda a WTN A.

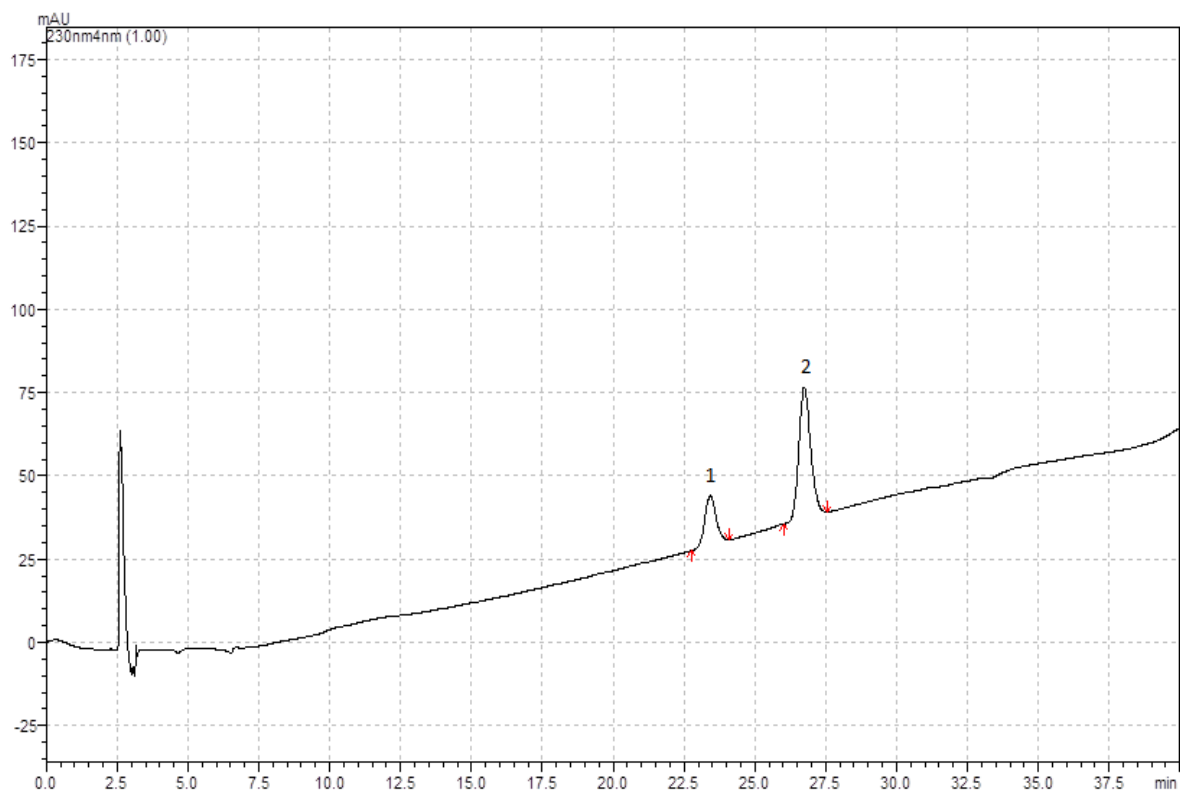


Fig. N° 6: Cromatograma de una solución estándar: longitud de onda de detección 227 nm. 1, WTF (13,7  $\mu\text{g/mL}$ ); 2, WTN A (17,6  $\mu\text{g/mL}$ ).

Al reproducir la metodología descrita por Ganzera et al. (2003), para el análisis de WTF y WTN A, ambas señales cromatográficas se detectan durante los primero 20 min, lo que permite un menor tiempo de análisis pero con una resolución poco adecuada. Además la gradiente utilizada por el autor no permite en este caso el análisis de estos withanólidos en conjunto, ya que la señal emitida por el WTN A se superpone a la de WTF, debido a sus características estructurales similares (Awasthi et al., 2007). Debido a esto se desarrolló una

metodología con gradiente de fase móvil de mayor tiempo, con variaciones que permiten la separación de los withanólidos estudiados, además de la limpieza correcta de la columna, evitando que queden especies retenidas y aparezcan en las eluciones posteriores.

En la tabla N°8 se presentan los parámetros cromatográficos del método de cuantificación obtenido a partir de las seis inyecciones de la solución estándar de WTF y WTN A en las condiciones cromatográficas finales.

Tabla N°8: Valores promedio de los parámetros cromatográficos de optimización del método de cuantificación de withanólidos por HPLC.

<b>Parámetro</b>	<b>WTF</b>	<b>WTN A</b>
<b>N</b>	16331	19450
<b>k'</b>	9,293	10,765
<b><math>\alpha</math></b>	1,158	
<b>R</b>	4,462	

El número de platos teóricos, es indicativo de la eficacia de separación de la columna, los valores obtenidos para ambos withanolidos supera ampliamente el criterio de aceptación de este parámetro, a medida que aumenta el N, mejor será la eficacia del método para la separación existente entre la WTF y el WTN A (González, 2010). Otro parámetro que permite determinar la separación que existe entre ambos analitos es el factor de selectividad, su valor puede ser modificado por variaciones principalmente en la fase móvil o en última instancia por cambios en la columna cromatográfica. Las modificaciones realizadas en la gradiente de la

fase móvil del método de cuantificación permitieron que el parámetro  $\alpha$  este dentro del criterio de aceptación y por ende, la separación también.

El factor de capacidad ( $k'$ ) debe estar en un rango entre 2 y 7, ya que en valores cercanos a 1, el tiempo de elución será muy rápido y no permitirá la determinación con exactitud del tiempo de retención. En el caso contrario, valores demasiado altos, indicarían un tiempo de retención excesivo para los analitos por lo que el método dejaría de ser eficiente.

El  $k'$  obtenido para WTF y WTN A cercanos a 10, indican que el tiempo de retención para ambos analitos es mayor al valor aceptado, por lo que es posible generar modificaciones en la metodología de cuantificación descrita, para que este valor se encuentre en el rango adecuado. Si bien la resolución entre ambos analitos es buena, podría mejorarse con modificaciones en la fase móvil, o generar cambios en las proporciones de los mismos solventes.

La resolución es una medida del grado de separación que se presenta entre dos analitos, en este caso el valor obtenido cumple con el criterio de aceptación, por lo que la metodología de análisis cuenta con una resolución adecuada. Este parámetro se ve afectado por los otros parámetros de optimización mencionados anteriormente, es decir, todos contribuyen al objetivo principal que es la separación de los componentes de la muestra (Quattrochi et al., 1992).

## 4.2 Validación del método de identificación CCF

### a) **Selectividad:**

La Figura N°7 muestra el cromatograma de la muestra en condiciones normales y bajo las condiciones de termólisis, fotólisis y luz-humedad, junto con los estándares. En la tabla N°9 se observan los Rf para WTF y WTN A..

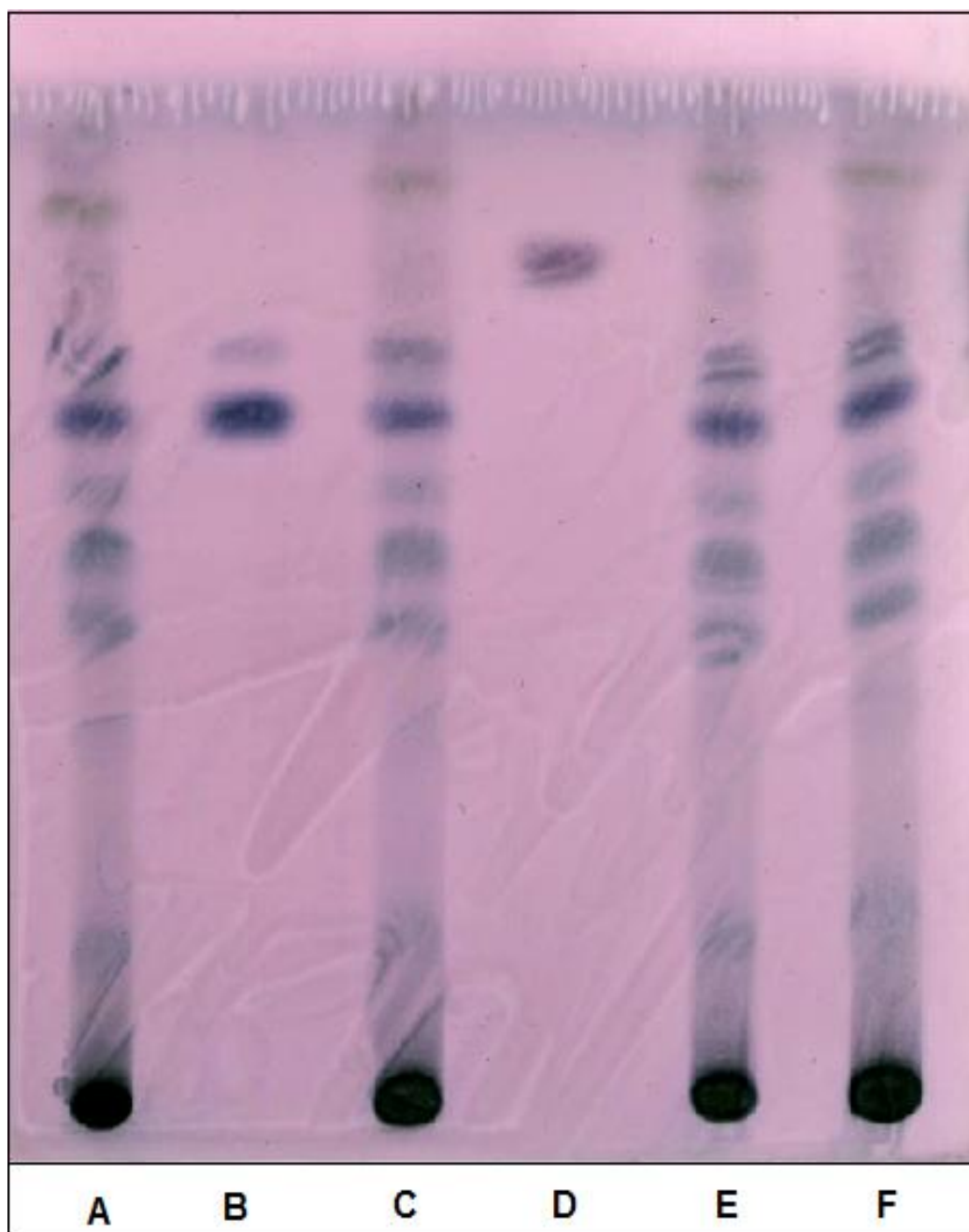


Figura N° 7: CCF de la muestra de *Withania somnifera*. **(A)** Muestra en condiciones normales; **(B)** Estándar WTF; **(C)** Muestra con termólisis en solución; **(D)** Estándar WTN A; **(E)** Muestra con fotólisis en solución; **(F)** Muestra fotólisis – humedad (polvo).

Tabla N°9: Valores de Rf de estándares de withanólidos y muestras de selectividad.

	Rf	
	WTF	WTN A
<b>Solución estándar WTF</b>	0,66	-
<b>Solución estándar WTN A</b>	-	0,82
<b>Muestra condiciones normales</b>	0,67	0,81
<b>Muestra con termólisis en solución</b>	0,66	0,81
<b>Muestra con fotólisis en solución</b>	0,65	0,83
<b>Muestra fotólisis-humedad (polvo)</b>	0,67	0,82

En la tabla N°10 se presentan los resultados de la resolución obtenida entre ambos withanólidos al someter la muestra a distintas condiciones de estrés, sin generar cambios significativos en este parámetro. Es importante destacar que la señal correspondiente al WTN A no se observa nítida ni definida como ocurre en el caso de WTF, esto puede deberse a que la cantidad sembrada en la placa no era la indicada para obtener una coloración mayor en este analito, por lo que se pudo utilizar muestras más concentradas o sembrar más  $\mu\text{L}$  en la placa cromatográfica.

Tabla N°10: Parámetros cromatográficos de optimización para la validación de la selectividad en HPLC.

	$\Delta\text{Rf}$	DD (cm)	$w_1+w_2$ (cm)	R
<b>Muestra condiciones normales</b>	0,14	11,50	0,80	4,03
<b>Muestra con termólisis en solución</b>	0,15	11,50	0,60	5,75
<b>Muestra con fotólisis en solución</b>	0,18	11,50	0,80	5,18
<b>Muestra fotólisis-humedad (polvo)</b>	0,15	11,50	0,70	4,93

Los datos obtenidos en la Tabla N° 10 indican que la resolución esta aumentada por estos procesos de estrés físico ya que este valor aumenta en cada uno de los casos. Se puede establecer que las condiciones estudiadas de estrés físico no generan interferencias, por lo menos en la identificación de ambos withanolidos. Si bien, al observar la placa no es posible determinar el real efecto que tienen estas condiciones de estrés en la muestra, pues no afectan de manera estadística el cálculo de la resolución, los problemas de intensidad del color de la señal si son observables, a pesar de ello si es aceptable como un método simple y rápido de identificación para los withanolidos estudiados. Si se quisiera aumentar la resolución obtenida, deberían generarse cambios principalmente en la fase móvil o en la fase estacionaria, ya sea con el tipo de placa o con el tamaño de poro utilizado (Durst y Gokel, 2007). Los problemas con la intensidad de la señal cromatográfica se pueden mejorar con la siembra de muestras más concentradas o con mayor volumen inyectado en la placa. No se encontró bibliografía en la que se estudiará el efecto de estas condiciones.

### 4.3 Validación del método de cuantificación HPLC

#### a) Linealidad del sistema:

En la Figura N° 8 y 9 se presentan los gráficos de las curvas de calibrado para WTF y WTN A, respectivamente con un n=3 para cada punto. Adicionalmente en la tabla N°11 se muestran los parámetros estadísticos calculados a partir del método de los mínimos cuadrados con los datos obtenidos de las curvas de calibración de cada withanólido.

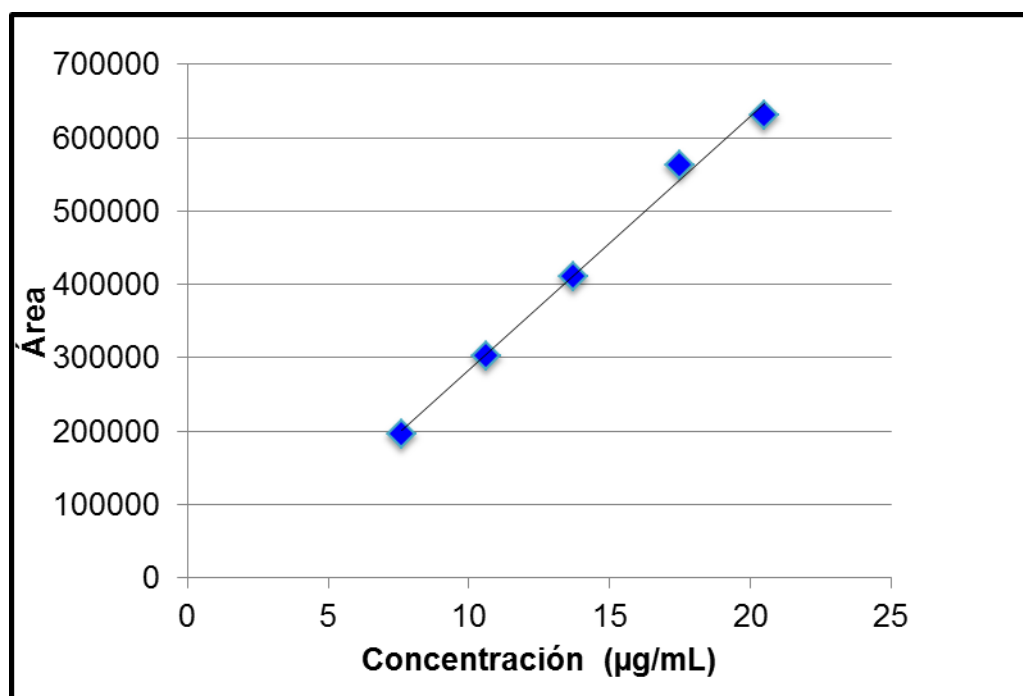


Figura N° 8: Curva de calibrado para WTF

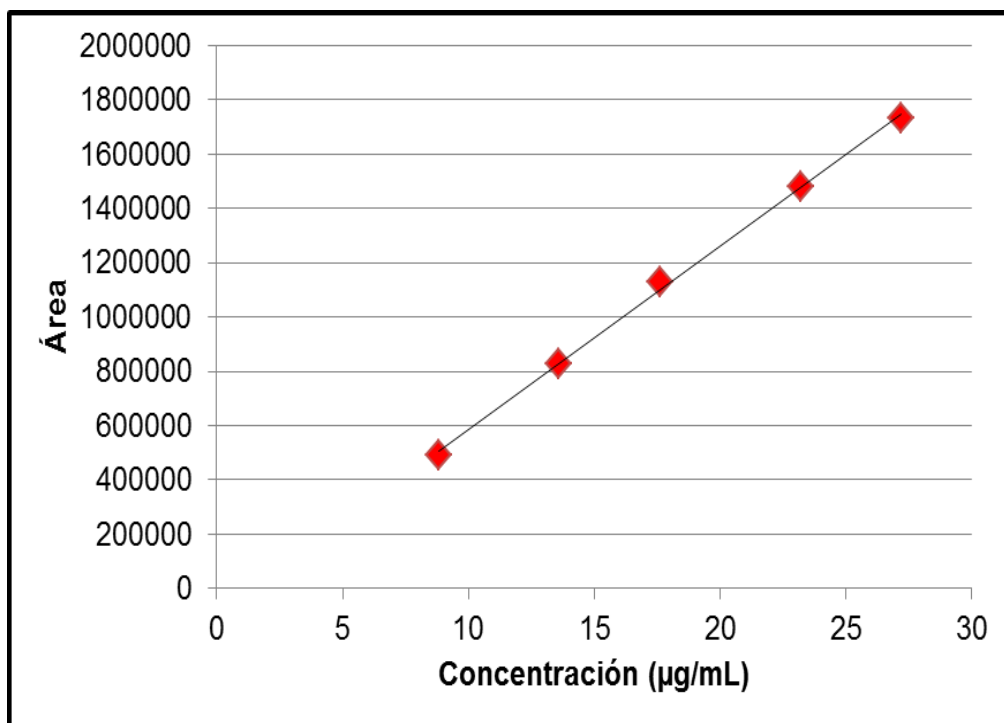


Figura N° 9: Curva de calibrado para WTN A

Tabla N°11: Parámetros estadísticos de la relación lineal y  $t_{cal}$  entre la concentración estándar y la respuesta para WTF y WTN A.

Parámetro	WTF	WTN A
<b>m</b>	34507	67612
<b>b</b>	-61526	-90614
<b>R</b>	0,9973	0,9994
<b>r<sup>2</sup></b>	0,9945	0,9987
<b>t<sub>cal</sub></b>	23,3470	48,3011

Los valores obtenidos para  $t_{cal}$ , 23,3470 y 48,3011 para WTF y WTN A, respectivamente, se compararon con  $t_{tab}$  que para ambos analitos es 2,1318 con un 99,95% de probabilidad para n-2 grados de libertad. A partir de estos datos se

determinó que existe una relación lineal significativa entre la concentración de estándar y la respuesta cromatográfica (área) dentro del rango de trabajo para WTF de 7,6 – 20,5  $\mu\text{g/mL}$  y para el WTN A de 8,8 – 27,2  $\mu\text{g/mL}$ .

Ganzera et al. (2003) también describió en su metodología, la linealidad obtenida para su método entre 1,6 – 400  $\mu\text{g/mL}$ , si bien este rango es mayor al obtenido por el método utilizado, ellos trabajaron con otro tipo de columna y en otras condiciones cromatográficas, en donde no incorporaron el WTN A a su análisis. Ali et al. (2010) también desarrollaron una metodología de cuantificación de WTF en donde determinaron linealidad entre 1,2 – 720  $\mu\text{g/mL}$ , por lo que a partir de estos datos es posible suponer que se obtendrán parámetros similares al aumentar el rango de análisis de la curva de calibrado. Se decidió realizar la curva de calibrado y evaluar la linealidad en este rango para el análisis de ambos withanólidos, ya que permite trabajar en las condiciones apropiadas, con las concentraciones de trabajo que presentan las muestras que analizamos, pero se podría evaluar la linealidad en concentraciones mayores y así de esta manera aumentar el rango de trabajo para muestras futuras.

#### **b) Límites de detección y cuantificación:**

En la tabla N° 12 se muestran los resultados obtenidos de los parámetros estadísticos de las curvas de calibrado en concentraciones menores al rango de linealidad evaluado para WTF y WTN A. Además se muestran los valores de desviación estándar de la pendiente ( $DS_m$ ) y del intercepto ( $DS_b$ ).

Tabla N°12: Parámetros estadísticos de las curvas de calibrado de WTF y WTN A en límite de detección y cuantificación.

<b>Analito</b>	<b>m</b>	<b>B</b>	<b>DS<sub>m</sub></b>	<b>DS<sub>b</sub></b>	<b>S<sub>y/x</sub></b>
<b>WTF</b>	55600	-42126	2910	12640	11609
<b>WTN A</b>	109713	-35922	3906	19041	17556

A partir de estos datos obtenidos, se obtuvieron los LD y LC para cada analito y se presentan en la Tabla N° 13.

Tabla N°13: Límites de detección y cuantificación para WTF y WTN A.

<b>Analito</b>	<b>Límite de detección (µg/mL)</b>	<b>Límite de cuantificación (µg/mL)</b>
<b>WTF</b>	0,63	2,09
<b>WTN A</b>	0,49	1,60

El método es útil para detectar y cuantificar adecuadamente concentraciones de WTF y WTN A inferiores al rango de trabajo, por lo que se asegura que la metodología permite el análisis correcto de los withanólidos.

### **c) Repetibilidad del sistema:**

La tabla N°14 presenta los resultados conseguidos para el área promedio de las señales cromatográficas de los analitos estudiados, DS y CV a partir de la repetición de 6 veces de una solución estándar que contenía 13,7 µg/mL para WTF y 17,6 µg/mL para WTN A.

Tabla N°14: Valor promedio del área cromatográfica (n=6), desviación estándar y coeficiente de variación para WTF y WTN A.

<b>Analito</b>	<b>Área promedio</b>	<b>DS</b>	<b>CV (%)</b>
<b>WTF</b>	408293	3195	0,78
<b>WTN A</b>	1129554	6239	0,55

Se obtuvo un CV de 0,78 % para WTF y 0,55% para el WTN A, ambos inferiores al criterio de aceptación  $CV \leq 1,27\%$ , indicado en la USP XXXVI (2013), por lo que se valida la repetibilidad del método de cuantificación.

**d) Repetibilidad del método:**

Los resultados para la validación de la repetibilidad del método se observan en la tabla N° 15. Se presenta el promedio de las 12 muestras analizadas, tanto para la WTF como para el WTN A.

Tabla N°15: Área cromatográfica promedio (n=12), desviación estándar y coeficiente de variación para la repetibilidad del método en WTF y WTN A.

<b>Analito</b>	<b>C Promedio (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>DS</b>	<b>CV (%)</b>
<b>WTF</b>	8,03	0,55	6,81
<b>WTN A</b>	9,35	0,68	7,32

Además se calculó el CV según la ecuación de Horwitz, a partir de la concentración del analito (8,0  $\mu\text{g/mL}$  para WTF y 9,3  $\mu\text{g/mL}$  para WTN A), obteniéndose un valor de 11,70 y 11,44 para WTF y WTN A. Estos valores se

compararon con los obtenidos para el método, determinando que es repetible en las condiciones cromatográficas descritas previamente.

Si bien la repetibilidad del método está validada, podría mejorarse tratando de reducir el CV obtenido, así de esta manera los resultados tendrán una mayor precisión. La disminución del CV se traduce en una mayor concordancia entre los resultados sucesivos que se realicen a partir de este método en condiciones idénticas y con poca diferencia de tiempo entre las eluciones (Valcárcel y Ríos, 2002).

**e) Selectividad:**

Al comparar la muestra en condiciones normales con las muestras sometidas a condiciones de estrés físico se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla N°16 para WTF y en la tabla N° 17 para el WTN A.

Tabla N°16: Área y concentración para WTF de muestras sometidas a degradación artificial.

Tratamiento	Área	C (µg/mL)	C promedio (µg/mL)	% muestra
<b>Muestra sin tratar</b>	294835	10,3	10,4	100
	299251	10,5		
	297043	10,4		
<b>Termólisis en solución muestra</b>	172935	6,8	6,8	65,5
	172070	6,8		
	174869	6,9		
<b>Fotólisis en solución muestra</b>	193154	7,4	7,4	71,0
	192951	7,4		
	193179	7,4		
<b>Muestra con fotólisis-humedad</b>	210655	7,9	7,8	75,5
	208363	7,8		
	208858	7,8		

Tabla N°17: Área y concentración para WTN A de muestras sometidas a degradación artificial.

Tratamiento	Área	C (µg/mL)	C Promedio (µg/mL)	% muestra
<b>Muestra sin tratar</b>	747963	12,4	12,5	100
	759524	12,6		
	753744	12,5		
<b>Termólisis en solución muestra</b>	451000	8,0	8,0	64,1
	459113	8,1		
	440975	7,9		
<b>Fotólisis en solución muestra</b>	500542	8,7	8,5	68,3
	503396	8,8		
	454202	8,1		
<b>Muestra con fotólisis-humedad</b>	518047	9,0	9,0	72,4
	519882	9,0		
	524091	9,1		

Además de comparar los datos obtenidos, se analizaron los cromatogramas y la pureza de la señal cromatográfica obtenida, los que se presentan en las Figuras N° 10 y 11 para ambos analitos.

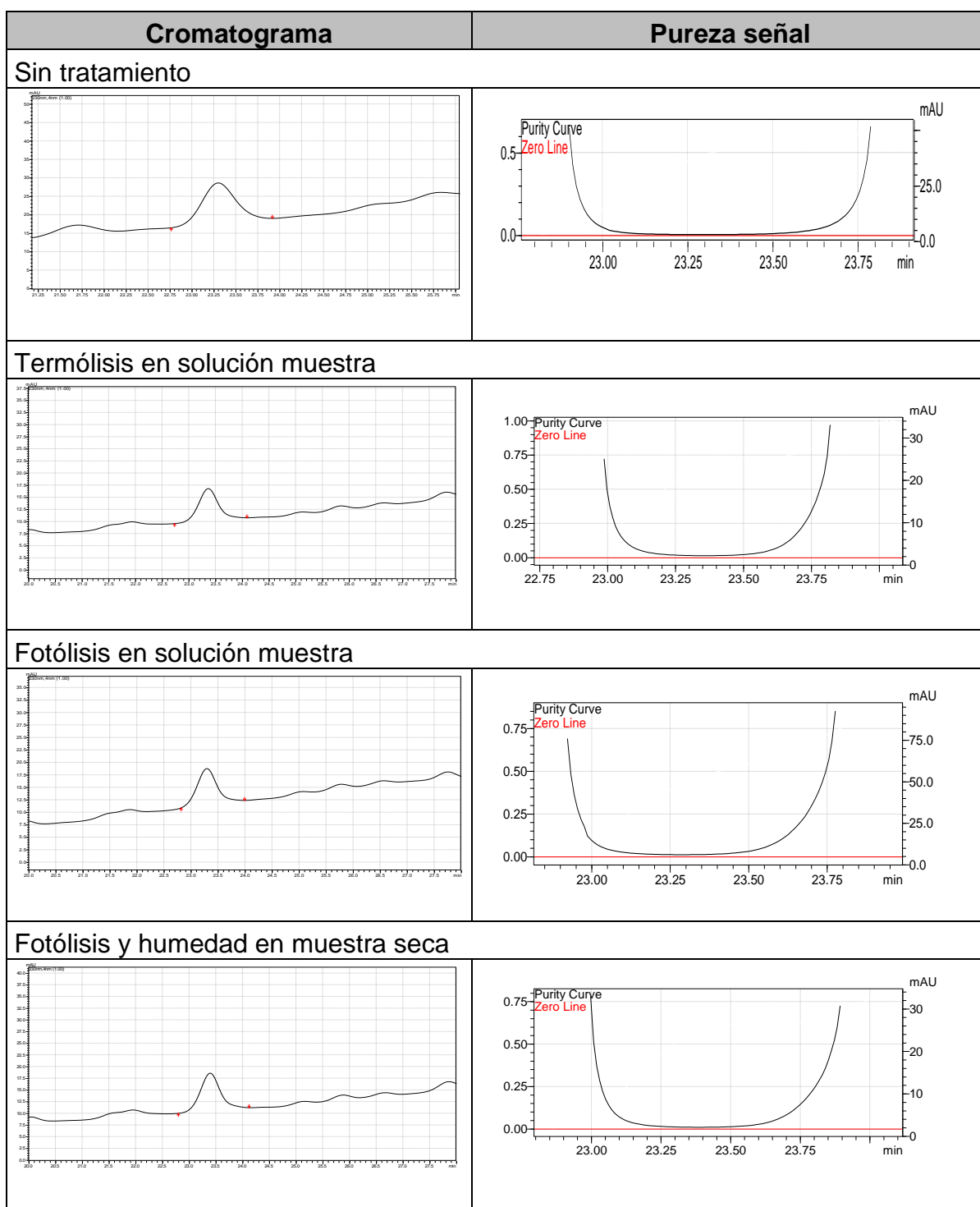


Figura N° 10: Cromatogramas y pureza de la señal cromatográfica en muestras después de procesos de degradación artificial para WTF.

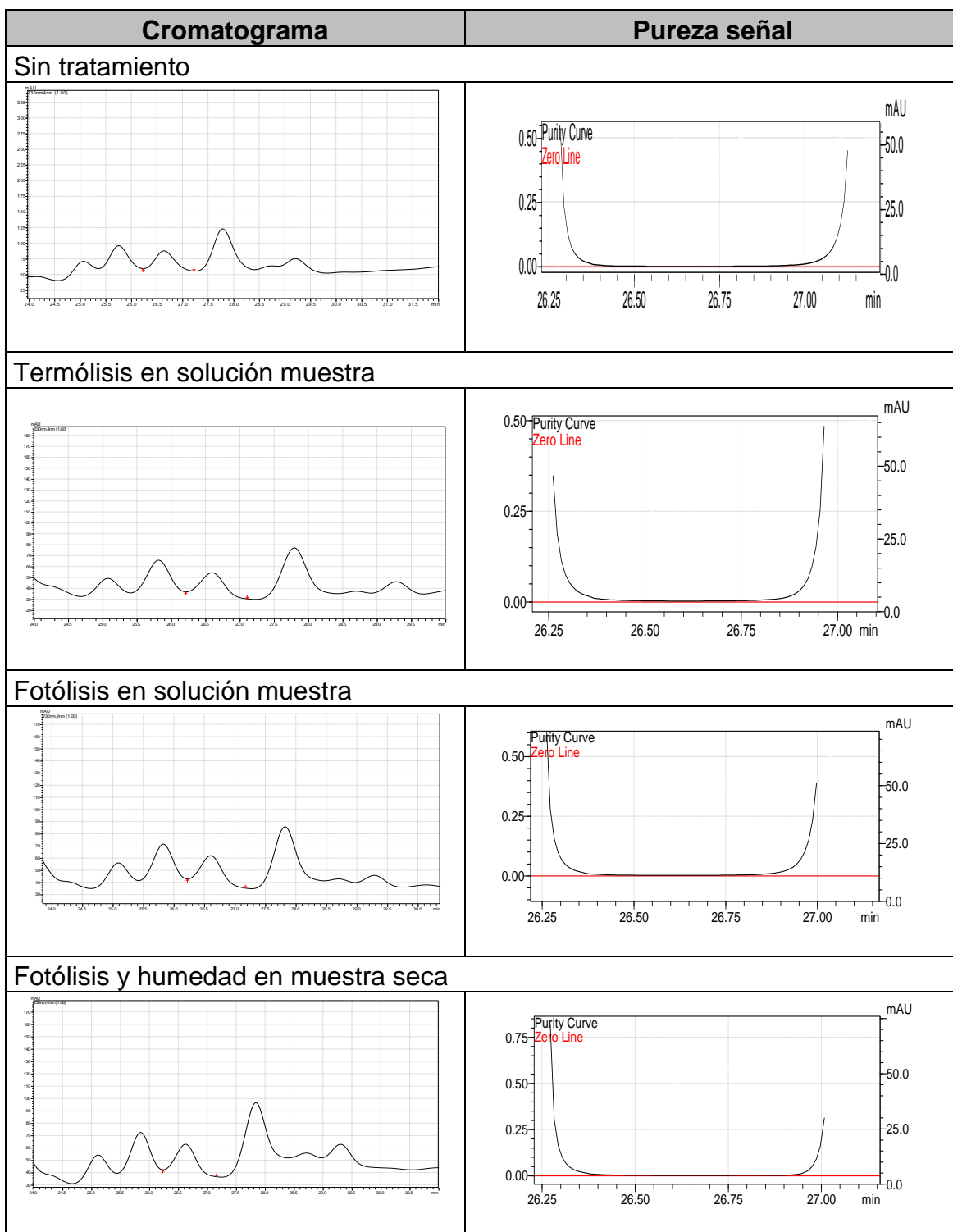


Figura N° 11: Cromatogramas y pureza de la señal cromatográfica en muestras después de procesos de degradación artificial para WTN A.

Se determinó que las condiciones de degradación artificiales no interfieren con la cuantificación de WTF y WTN A, ya que la señal cromatográfica se mantiene con una pureza adecuada y no se observan interferencias en los cromatogramas obtenidos. Si es importante resaltar, que en todos los casos de degradación se produce una disminución de la concentración detectada de cada analito, por lo que la muestra debe ser tratada en las condiciones descritas para el método y no debe someterse a la exposición de luz directa, humedad o altas temperaturas.

Patil et al. (2009), realizaron un estudio sobre la estabilidad fisicoquímica de un extracto de *W. Somnifera* bajo condiciones reales y aceleradas obteniendo que en ambos analitos deben asegurarse las condiciones de almacenamiento, como evitar la exposición a la luz, humedad y temperatura. Durante este estudio se utilizó metodología similar a la utilizada en este caso particular, por lo que lo descrito por Patil et al. confirma los resultados obtenidos.

**f) Exactitud del método:**

En la tabla N° 18 se muestran los datos obtenidos para la validación de la exactitud del método de cuantificación HPLC para WTF y en la tabla N° 19 para el WTN A.

Tabla N°18: Resultados obtenidos para exactitud del método de cuantificación de WTF.

Vol. Agregado (µL)	C estimada (µg/mL)	Área Obtenida	C Obtenida (µg/mL)	%R
25	12,3	322658	11,1	90,5
		320947	11,1	90,1
		321478	11,1	90,2
50	14,2	386292	13,0	91,4
		383943	12,9	90,9
		383035	12,9	90,7
75	16,1	457263	15,0	93,4
		460163	15,1	93,9
		459845	15,1	93,8
<b>Promedio (%) (n=9)</b>				<b>91,7</b>
<b>DS</b>				<b>1,58</b>
<b>t<sub>cal</sub></b>				<b>1,76</b>

Tabla N°19: Resultados obtenidos para exactitud del método de cuantificación de WTN A.

Vol. agregado (µL)	C estimada (µg/mL)	Área obtenida	C Obtenida (µg/mL)	%R
50	14,5	827547	13,6	93,8
		837073	13,7	94,5
		792000	13,1	90,3
100	16,5	903166	14,7	89,1
		944141	15,3	92,7
		943832	15,3	92,7
150	18,5	1044331	16,8	90,8
		1033196	16,6	89,7
		1046379	16,8	90,8
<b>Promedio (%) (n=9)</b>				<b>91,6</b>
<b>S</b>				<b>1,88</b>
<b>t<sub>cal</sub></b>				<b>1,49</b>

Las tablas presentan las cantidades adicionadas de estándar de WTF y WTN A a una muestra y la concentración encontrada promedio. Se determinó que el porcentaje de recuperación promedio para WTF es de 91,7% y para el WTN A es de 91,6%. Este valor de %R está dentro del rango aceptado (90-110 %) para analitos que se encuentran en concentraciones muy bajas (USP XXXVI, 2013).

En ambos casos se calculó el  $t_{cal}$ , obteniéndose un valor de 1,76 y 1,49 para la WTF y el WTN A, respectivamente. Estos valores fueron comparados con el  $t_{tab}$  (3,355) para  $n=9$  con un 99,5% de probabilidad y se determinó que no existen diferencias estadísticas significativas entre el porcentaje de recuperación y el 100%, por lo que se valida la exactitud del método de cuantificación para ambos analitos.

**g) Robustez:**

Se evaluaron los efectos de pequeñas variaciones en la metodología de cuantificación de ambos analitos y los resultados de los parámetros estadísticos de linealidad se muestran en las tablas N° 20 y 21. En las Figuras N° 12 y 13 se presentan los gráficos de regresión lineal entre concentración y la respuesta cromatográfica para cada una de las modificaciones al método.

Tabla N°20: Parámetros estadísticos de la relación lineal y  $t_{cal}$  entre la concentración estándar y la respuesta para WTF.

Factor	Variación	m	B	R	$r^2$	$t_{cal}$
Temperatura del horno (°C) con velocidad flujo de 1,0 mL/min	45	70061	-93176	0,9984	0,9968	30,57
	55	68983	-83328	0,9990	0,9979	37,76
Velocidad de flujo (mL/min) con temperatura del horno de 50°C	0,8	83977	-86387	0,9986	0,9972	32,69
	1,2	56548	-72178	0,9987	0,9974	33,92

Tabla N°21: Parámetros estadísticos de la relación lineal y  $t_{cal}$  entre la concentración estándar y la respuesta para WTN A.

Factor	Variación	m	B	R	$r^2$	$t_{cal}$
Temperatura del horno (°C) con velocidad flujo de 1,0 mL/min	45	34350	-57308	0,9952	0,9905	17,69
	55	34376	-58369	0,9957	0,9910	18,18
Velocidad de flujo (mL/min) con temperatura del horno de 50°C	0,8	41853	-66995	0,9959	0,9905	17,70
	1,2	28513	-51815	0,9955	0,9915	18,70

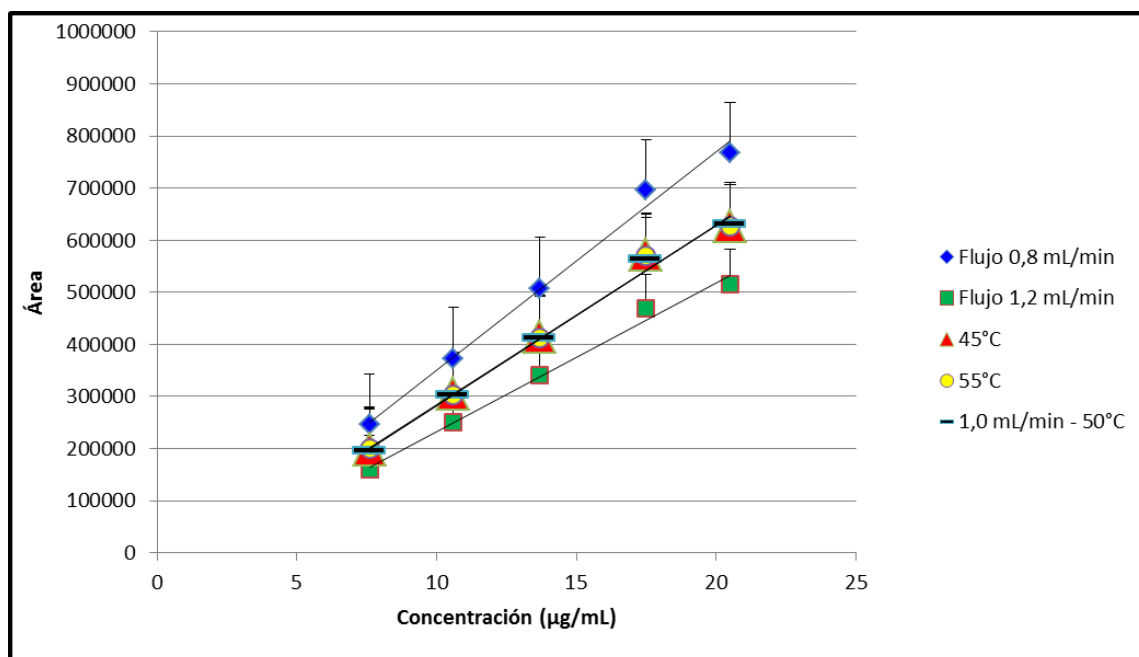


Figura N° 12: Comparación entre las concentraciones estándar y su respuesta para WTF en la evaluación de la robustez. Barras de error: Del tipo superior y determinan DS.

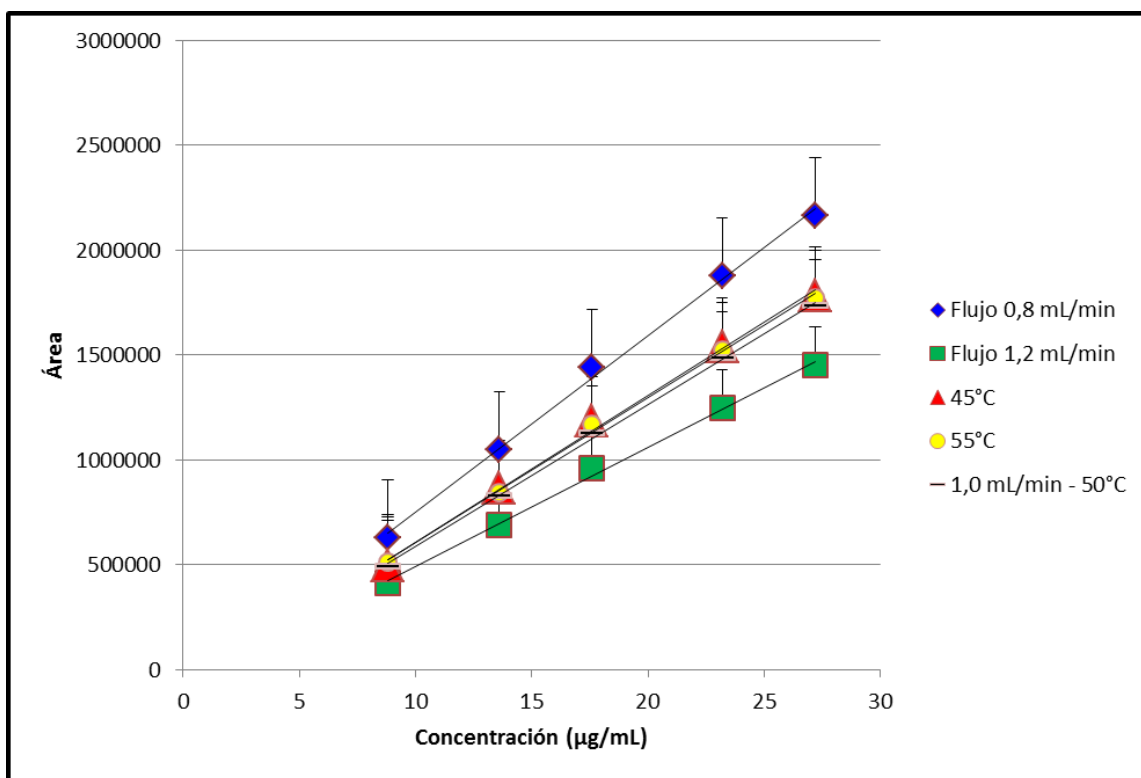


Figura N° 13: Comparación entre las concentraciones estándar y su respuesta para WTN A en la evaluación de la robustez. Barras de error: Del tipo superior y determinan DS.

Al observar los datos, es posible determinar que las variaciones de temperatura estudiadas se comportan de manera muy similar en el rango de linealidad analizado, por lo que modificaciones en la temperatura no generarían cambios significativos en la curva de calibrado de la metodología en cuestión, ya que estas temperaturas no provocarían degradación de los withanólidos. Si se pueden observar cambios en las áreas obtenidas para la curva de calibración en las variaciones de flujo implementadas, siendo mayores a un flujo mayor y

menores en el caso contrario. Esto puede deberse a que a menor velocidad de flujo, la fase móvil tiene más tiempo para estar en contacto con la muestra y con la fase estacionaria, generando que se produzcan mayores interacciones entre las fases y de esta manera la respuesta cromatográfica frente a una misma concentración evaluada sea mayor. En el caso contrario, es posible que la fase móvil no cuente con el tiempo suficiente para que las interacciones químicas sean las adecuadas subestimando la respuesta que se entrega frente a iguales concentraciones y por ende iguales respuestas (Quattrochi, 1992).

Se determinó la exactitud del método en cada una de las variaciones del método en la validación de la robustez. Los datos obtenidos se presentan en las tablas N° 22-25 para WTF y N° 26-29 para el WTN A.

Tabla N°22: Resultados obtenidos para exactitud del método a 45°C y velocidad de flujo 1,0 mL/min para WTF.

<b>Vol. Agregado (<math>\mu</math>L)</b>	<b>C<sub>estimada</sub> (<math>\mu</math>g/mL)</b>	<b>Área Obtenida</b>	<b>C<sub>obtenida</sub> (<math>\mu</math>g/mL)</b>	<b>%R</b>
25	12,1	827547	10,9	90,1
		837073	11,0	90,9
		792000	10,8	89,3
50	14,0	903166	12,6	90,0
		944141	12,7	90,7
		943832	12,5	89,3
75	15,9	1044331	14,7	92,5
		1033196	14,8	93,1
		1046379	14,8	93,1
<b>Promedio (%) (n=9)</b>				<b>91,0</b>
<b>DS</b>				<b>1,53</b>
<b>CV</b>				<b>1,68</b>
<b>t<sub>cal</sub></b>				<b>1,97</b>

Tabla N°23: Resultados obtenidos para exactitud del método a 55°C y velocidad de flujo 1,0 mL/min para WTF.

<b>Vol. agregado (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>C estimada (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Área Obtenida</b>	<b>C obtenida (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>%R</b>
25	12,1	325356	11,2	92,6
		325172	11,2	92,6
		325629	11,2	92,6
50	14,0	386146	12,9	92,1
		387500	13,0	92,9
		384877	12,9	92,1
75	15,9	478283	15,6	98,1
		466309	15,3	96,2
		464749	15,2	95,6
			<b>Promedio (%) (n=9)</b>	<b>93,9</b>
			<b>DS</b>	<b>2,20</b>
			<b>CV</b>	<b>2,34</b>
			<b>t<sub>cal</sub></b>	<b>0,93</b>

Tabla N°24: Resultados obtenidos para exactitud del método con velocidad de flujo 0,8 mL/min a 50°C para WTF.

<b>Vol. agregado (<math>\mu</math>L)</b>	<b>C estimada (<math>\mu</math>g/mL)</b>	<b>Área Obtenida</b>	<b>C obtenida (<math>\mu</math>g/mL)</b>	<b>%R</b>
25	12,5	403336	8,4	67,2
		402229	8,4	67,2
		400762	8,4	67,2
50	14,4	477079	9,7	67,4
		482521	9,8	68,1
		480088	9,8	68,1
75	16,3	574658	11,4	69,9
		576728	11,5	70,6
		574930	11,4	69,9
			<b>Promedio (%) (n=9)</b>	<b>68,4</b>
			<b>DS</b>	<b>1,37</b>
			<b>CV</b>	<b>2,00</b>
			<b>t<sub>cal</sub></b>	<b>7,69</b>

Tabla N°25: Resultados obtenidos para exactitud del método con velocidad de flujo 1,2 mL/min a 50°C para WTF.

<b>Vol. agregado (<math>\mu</math>L)</b>	<b>C estimada (<math>\mu</math>g/mL)</b>	<b>Área Obtenida</b>	<b>C obtenida (<math>\mu</math>g/mL)</b>	<b>%R</b>
25	12,7	285090	11,8	92,9
		262775	11,0	86,6
		247022	10,5	82,7
50	14,6	322287	13,1	89,7
		309516	12,7	87,0
		325288	13,2	90,4
75	16,5	403186	16,0	97,0
		387101	15,4	93,3
		381431	15,2	92,1
<b>Promedio (%) (n=9)</b>				<b>90,2</b>
<b>DS</b>				<b>4,28</b>
<b>CV</b>				<b>4,75</b>
<b>t<sub>cal</sub></b>				<b>0,76</b>

Tabla N°26: Resultados obtenidos para exactitud del método a 45°C y velocidad de flujo 1,0 mL/min para WTN A.

<b>Vol. Agregado (<math>\mu</math>L)</b>	<b>C estimada (<math>\mu</math>g/mL)</b>	<b>Área Obtenida</b>	<b>C obtenida (<math>\mu</math>g/mL)</b>	<b>%R</b>
50	8,0	395708	7,0	87,5
		449280	7,7	96,3
		468019	8,8	110,0
100	10,0	394656	7,0	70,0
		624634	10,2	102,0
		609481	10,0	100,0
150	12,0	763737	12,2	101,7
		641705	10,5	87,5
		519623	8,7	72,5
<b>Promedio (%) (n=9)</b>				<b>91,9</b>
<b>DS</b>				<b>13,71</b>
<b>CV</b>				<b>14,92</b>
<b>t<sub>cal</sub></b>				<b>0,20</b>

Tabla N°27: Resultados obtenidos para exactitud del método a 55°C y velocidad de flujo 1,0 mL/min para WTN A.

<b>Vol. Agregado (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>C estimada (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Área Obtenida</b>	<b>C obtenida (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>%R</b>
50	12,5	395708	11,2	89,6
		449280	11,2	89,6
		468019	11,2	89,6
100	14,4	394656	12,9	89,6
		624634	13,0	90,3
		609481	12,9	89,6
150	16,3	763737	15,6	95,7
		641705	15,3	93,9
		519623	15,2	93,3
<b>Promedio (%) (n=9)</b>				<b>91,2</b>
<b>DS</b>				<b>2,38</b>
<b>CV</b>				<b>2,61</b>
<b>t<sub>cal</sub></b>				<b>1,23</b>

Tabla N°28: Resultados obtenidos para exactitud del método con velocidad de flujo 0,8 mL/min a 50°C para WTN A.

<b>Vol. Agregado (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>C estimada (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Área Obtenida</b>	<b>C obtenida (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>%R</b>
50	11,9	669986	9,0	75,6
		707334	9,5	79,8
		596570	8,1	68,1
100	13,9	755316	10,0	71,9
		796488	10,5	75,5
		689720	9,2	66,2
150	15,9	802211	10,6	66,7
		848743	11,1	69,8
		764232	10,1	63,5
			<b>Promedio (%) (n=9)</b>	<b>70,8</b>
			<b>DS</b>	<b>5,34</b>
			<b>CV</b>	<b>7,55</b>
			<b>t<sub>cal</sub></b>	<b>1,82</b>

Tabla N°29: Resultados obtenidos para exactitud del método con velocidad de flujo 1,2 mL/min a 50°C para WTN A.

<b>Vol. Agregado (<math>\mu</math>L)</b>	<b>C estimada (<math>\mu</math>g/mL)</b>	<b>Área Obtenida</b>	<b>C obtenida (<math>\mu</math>g/mL)</b>	<b>%R</b>
50	8,9	346942	7,4	83,1
		338132	7,3	82,0
		352765	7,5	84,3
100	10,9	458823	9,4	86,2
		474167	9,7	89,0
		442617	9,1	83,5
150	12,9	507411	10,2	79,1
		527413	10,6	82,2
		587950	11,7	90,7
<b>Promedio (%) (n=9)</b>				<b>84,5</b>
<b>DS</b>				<b>3,63</b>
<b>CV</b>				<b>4,30</b>
<b>t<sub>cal</sub></b>				<b>1,43</b>

En la tabla N° 30 se muestran los valores de  $t_{cal}$  para cada una de las modificaciones al método por cada analito. Estos valores se compararon con  $t_{tab} = 3,355$  con un 99,5% de probabilidad (n=9) y se determinó que el método cumple con los criterios de aceptación para la exactitud en todas las variaciones estudiadas excepto para la cuantificación de WTF con una velocidad de flujo de 0,8 mL/min.

Tabla N°30: Valores obtenidos de  $t_{cal}$  para WTF y WTN A

Variación	WTF	WTN A
Temperatura del horno 45 °C; Velocidad de flujo 1,0 mL/min	1,97	0,20
Temperatura del horno: 55 °C; Velocidad de flujo 1,0 mL/min	0,93	1,23
Velocidad de flujo: 0,8 mL/min; Temperatura del horno 50 °C	7,69	1,82
Velocidad de flujo: 1,2 mL/min; Temperatura del horno 50 °C	0,76	1,43

Al momento de analizar la exactitud de los resultados frente a cada una de las variaciones obtenidas, se vuelve a confirmar que la velocidad de flujo con la que se trabaje si interfiere en los resultados obtenidos, en esta situación solo destaca la diferencia en el caso de la WTF, el analito que presenta un tiempo de retención menor, por lo que es posible que al momento de su elución la fase móvil no haya logrado el equilibrio requerido en la columna (Quattrochi et al., 1992) y por esto, la exactitud sea menor a la esperada, esto también tiene relación con los datos de linealidad, en que a una velocidad de flujo menor, el área obtenida es mayor, por tanto no es recomendable trabajar en dicha condición, ya que entregara resultados poco exactos.

Se muestra en la Figura N°14, la comparación de la concentración obtenida para cada variación de temperatura analizada en ambos analitos. En la Figura N°15 se muestran los datos de concentración calculados para la variación de flujo del método. A partir de ambos gráficos se desprende como resultado que la variación en la cuantificación es más significativa en el caso de la WTF y que en el caso del WTN A las concentraciones cuantificadas son similares. Estos datos se complementan con los presentados anteriormente.

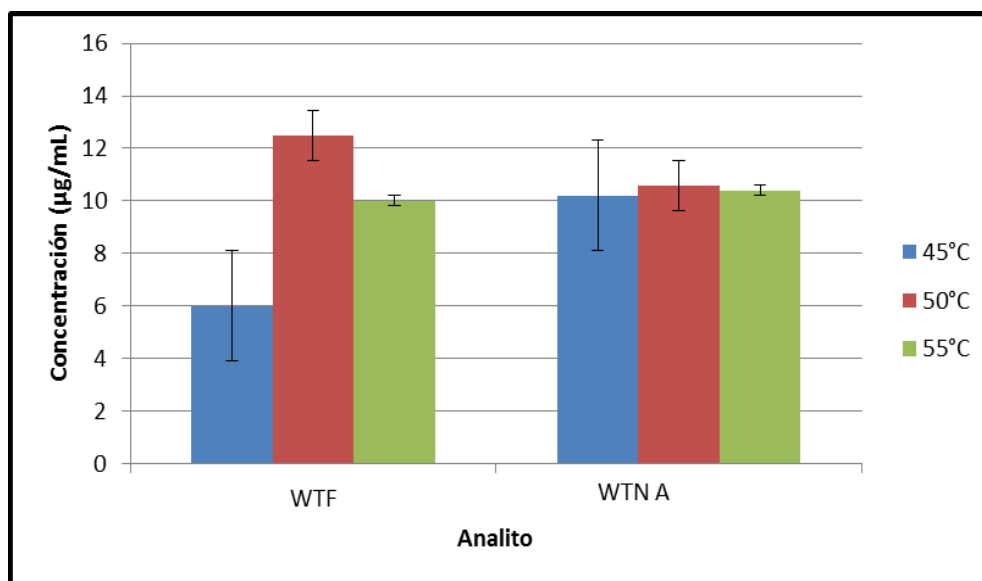


Figura N° 14: Comparación entre la concentración obtenida para cada analito en las variaciones de temperatura analizadas a velocidad de flujo 1,0 mL/min. Barras de error: Del tipo superior y determinan DS.

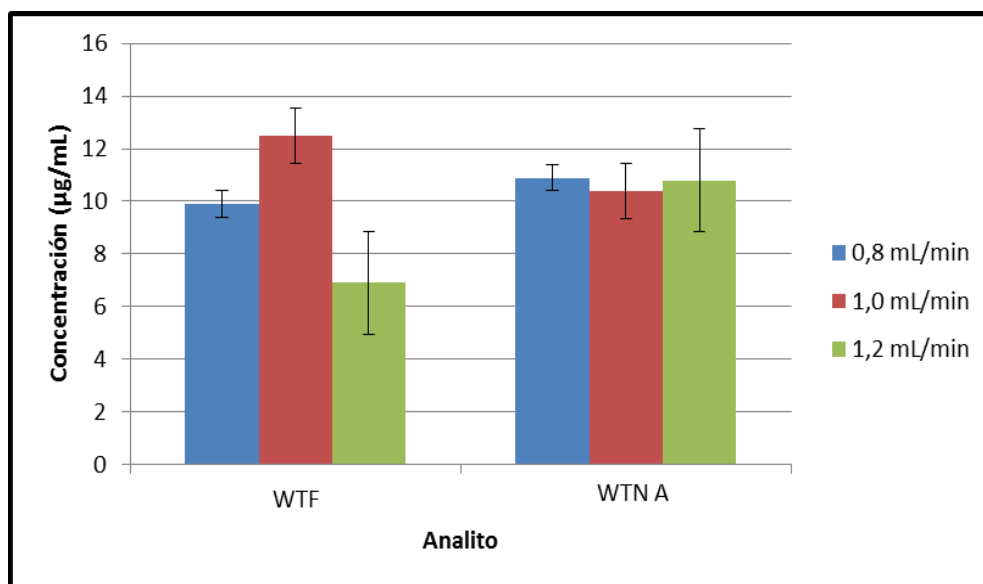


Figura N° 15: Comparación entre la concentración obtenida para cada analito en las variaciones de flujo analizadas a temperatura del horno de 50°C. Barras de error: Del tipo superior y determinan DS.

Al momento de analizar las variaciones de la metodología en las muestras, es posible notar que afectan la cuantificación confiable de los analitos, pero principalmente a WTF, por lo que se debe tener especial cuidado en sus análisis. Ambos withanólidos presentan una composición química igual, pero su estructura y grupos funcionales varían, es por esto que WTF tiene un tiempo de retención levemente menor que el WTN A, estas diferencias químicas pueden ser las causantes de que tanto la temperatura del horno a la que se trabaje o la velocidad de flujo de la fase móvil interfieran en su cuantificación. La WTF podría ser degradada u otros analitos que están presentes en la muestras pueden estar sobreestimando o subestimando el resultado obtenido (Dalavayi et al, 2006), es

probable que se requiera realizar estudios específicos para conocer más la fisicoquímica y comportamiento de estos analitos en una matriz específica, además de como pueda esta última interferir en su cuantificación.

Al analizar en conjunto todos los resultados obtenidos para la validación de esta metodología, es importante mencionar que una de las fases limitantes es la preparación de la muestra, debe ser realizada por un analista preparado y que conozca los procesos a los que se debe someter la muestra, que si bien no son de alta complejidad, en su conjunto son de real importancia para la correcta valoración de los withanólidos. También es importante mencionar que no se obtiene iguales resultados si la muestra no es sonicada durante el proceso extractivo o si este proceso no es el adecuado, ya que es necesario que el extracto seco sea totalmente disuelto en metanol y que se cumplan los tiempos de extracción.

Otra de las recomendaciones que se deben tener en cuenta al momento de implementar esta metodología analítica es la proporción de la fase móvil y la preparación del reactivo de alcohol , ya que su variación probablemente no genera cambios en la cuantificación pero si en los tiempos de retención que se obtienen para WTF y el WTN A, que al analizar soluciones estándar no es un problema importante, pero si cuando se están estudiando estos analitos en una muestra que contiene otros compuestos que puedan interferir o causar confusión al momento de la cuantificación.

## 5. Conclusiones

- Se implementó y optimizó una metodología de identificación y cuantificación para Withaferina y Withanólido A por cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alta eficiencia, respetivamente.
- Se validaron ambas metodología de análisis de Withaferina y Withanólido A, para el caso de la identificación se determinó el parámetro de resolución y en el caso de la cuantificación se evaluaron los parámetros de linealidad, límite de cuantificación y detección, repetibilidad, exactitud, selectividad y robustez, cumpliendo con los criterios de aceptación.
- Se identificaron y cuantificaron los withanólidos: Withaferina y Withanólido A en extractos secos de *Withania Somnifera* con los métodos optimizados y validados.
- Se determinó que variaciones de temperatura del horno, 45 y 55 °C, no afectan la cuantificación de Withaferina y Withanólido A. Sin embargo, variaciones en la velocidad de flujo, 0,8 y 1,2 mL/min si alteran la cuantificación de los analitos.

## 6. Referencias bibliográficas

Ahuja S y Dong M, (ed.). 2005. Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC. 1° ed, Editorial Elsevier, Gran Bretaña, 23 – 33 pp.

Ali N, Abouzid S, Nasib A, Khan S, Qureshi J y Choudhary M. 2010. Rp-HPLC analysis of withanolides in the flowers, leaves, and roots of *Withania somnifera*. *AChrom*. 22(2010)3, 473–480.

Awasthi D, Ram HK, Misra R y Sharma NC. 2007. Evaluation of withanolide-A and withaferin-A in *Withania somnifera* (L.) dunal (*Ashwagandha*) roots from different climatic zones of Madhya Pradesh. *Indian J.Trop. Bioviv*. 15(2) : 152-154.

Cañigueral S, Dellacassa E y Bandoni A. 2003. Plantas medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de dependencia o factores de desarrollo?. *Acta Farm. Bonaerense* 22 (3): 265-78.

Castillo E y Martínez I. Manual de fitoterapia. Elsevier Masson. Barcelona. 2007. 39 pp.

Costanzo SJ. 2007. Optimization of mobile phase conditions for TLC methods used in pharmaceutical analyses. *J. Chromatogr. Sci*. 35: 156-160.

Chen L, He H y Qiu F, 2011. Natural withanolides: an overview. *Nat. Prod. Rep.*, 2011, 28, 705.

Dalavayi S, Kulkarni S M, Itikala RL, Itikala S. 2006. Determination of Withaferin-A in two *Withania* Species by RP-HPLC method. *Indian J Pharm Sci* ; 68:253-256.

Durst HD y Gokel GW. 2007. Química orgánica experimental. Ed. Digital. Editorial Reverté, Barcelona, 79 – 91 pp.

Fabricant DS y Farnsworth NR. 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. Environmental health perspectives, 109 (Suppl 1), 69.

FDA. 1994. Reviewer Guidance. Validation of chromatographic methods. Rockville.

Fried B y Sherma J, editores. 2003. Handbook of thin-layer chromatography. 3° ed. Editorial Marcel dekker, Basel.

Ganzera M, Choudhary MI y Khan IA, 2003. Quantitative HPLC analysis of withanolides in *Withania somnifera*. Fitoterapia, 74(1-2): 68-76.

Gennaro AR (ed.).2003. Remington Farmacia. 20a ed.. Médica Panamericana. Buenos Aires. Vol. 1. 477 pp.

Gennaro AR (ed.).2003. Remington Farmacia. 20a ed.. Médica Panamericana. Buenos Aires. Vol. 2. 2118 pp.

Glatter E. 1991. Withanolides and related ergostane-type steroids. Nat. Prod. Rep., 1991,8, 415-440

González A. 2010. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. 1° ed. Editorial Elsevier, Barcelona, 23- 27 pp.

Harris DC. 2003. Análisis químico cuantitativo. 3° ed. Editorial Reverté, Barcelona, 49 – 52 pp.

ICH Harmonised tripartite guideline. 2005. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). International conference on harmonization.

ISO/IEC 17025. 2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 2° ed. Suiza.

Jamal SA, Qureshi S, Ali SN, Choudhary MI and Rahman AU. 1995. Bioactivities and Structural studies of Withanolides from *Withania somnifera*. Chemistry of Heterocyclic Compounds, 31(9): 1047-1059.

Johll ME. 2008. Química e investigación criminal: una perspectiva de la ciencia forense. 1° Ed. Editorial Reverté, Barcelona. 254 pp.

Kazakevich YV y Lobrutto R, editores. 2007. HPLC for pharmaceutical scientists. 1° ed. Editorial Wiley, New jersey, 10 – 15 pp.

Kulkarni SK and Dhir A. 2008. *Withania somnifera*: an Indian ginseng. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 32(5): 1093-1105.

Kurian A and Sankar MA. 2007. Medicinal plants. New India Publishing Agency. New Delhi. 60-61 pp.

McPolin O. 2009. Validation of analytical methods for pharmaceutical analysis. 1° ed. Editorial Mourn training services, Irlanda. 1-12 pp.

Mirjalili MH, Moyano E, Bonfill M, Cusido RM and Palazón J. 2009. Steroidal lactones from *Withania somnifera*, an ancient plant for novel medicine. Molecules 14(7): 2373-2393.

Misico RI, Nicotra VE, Oberti JC, Barboza G, Gil RR, y Burton G. 2011. Withanolides and related steroids. In Progress in the Chemistry of Organic Natural Products Vol. 94 (pp. 127-229).

Mishra LC, Singh BB and Dagenais S. 2000. Scientific basis for the therapeutic use of *Withania somnifera* (Ashwagandha): a review. *Altern Med Rev* 5(4): 334-346.

Ortuño MF. 2006. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes, 1º Ed, Editorial Aiyana, Barcelona, 104 – 108 pp.

Owais M, Sharad MS, Shehbaz A and Saleemuddin M. 2005. Antibacterial efficacy of *Withania somnifera* (Ashwagandha) an indigenous medicinal plant against experimental murine salmonellosis. *Phytomedicine* 12(3): 229-235.

Panda S and Kar A. 1998. Changes in Thyroid Hormone Concentrations after Administration of Ashwagandha Root Extract to Adult Male Mice. *J. of Pharm and Pharmacol*, 50: 1065–1068.

Patil D, Gautam M, Jadhav U, Mishra S, Karupothula D, Gairola S, Jadhav S y Patwardhan B. 2009. Physicochemical stability and biological activity of *Withania somnifera* extract under real-time and accelerated storage conditions. *Planta Med*; 76:481-488.

Parada M. 2012. Legislación en Chile sobre fitofármacos y plantas medicinales. *Rev. Farmacol*, 5(2): 7

Quattrochi O, Abelaira S y Laba R. 1992. Introducción a la HPLC, aplicación y práctica. 1° ed. Editorial Artes gráficas farro SA, Buenos Aires.

Rahman AU, (ed). 2005. Studies in natural products chemistry. 1°ed. Editorial Elsevier, Amsterdam, Vol. 32,1019 – 1023 pp.

Rasool M and Varalakshmi P. 2006. Immunomodulatory role of *Withania somnifera* root powder on experimental induced inflammation: an in vivo and in vitro study. *Vascul. Pharmacol.*, 44, 406–410.

Schmelzer GH, Gurib-Fakim A, Arroo R, Bosch CH, Ruijter A, Simmonds MSJ, Lemmens RH and Oyen LP, editores. 2008. Plants resources of tropical Africa: medicinal plants. Prota Foundation. Netherlands. 629-633 pp.

Sharma V, Sharma S, Pracheta and Paliwal R. 2011. *Withania somnifera*: A rejuvenating ayurvedic medicinal herb for the treatment of various human ailments. *Int J Pharm Tech Res*, 3(1):187-192.

Sierra I. 2010. Fundamentos de cromatografía. Aplicaciones de la cromatografía en columna. En: Sierra I, Pérez D, Gómez S y Morante S. *Análisis instrumental*. Editorial Netbiblio, Barcelona, 137-201 pp.

Sigma Aldrich. 2003. Analytical standards: Chromatography <http://www.sigmaaldrich.com> (página visitada 25 de septiembre del 2013).

Singh G, Sharma PK, Dudhe R and Singh S. 2010. Biological activities of *Withania somnifera*. *Annals of Biological Research*. 1 (3): 56-63.

Skoog DA, West DM y Holler FJ. 2001. Fundamentos de química analítica. 2° ed. Editorial Reverté, Barcelona, 666 – 670 pp.

Sumithradevi S, Pradeepa D and Senthil K.2011. A simple method to purify Withanolide a from the roots of *Withania somnifera* Dunal. IJPBS, Vol.2 (2):231.

Swartz ME and Krull IS. 2012. Handbook of analytical validation. CRC Press, Florida, 38-47 pp.

Tursunova RN, Malennikova VA y Abubakirov NK. 1977. Withanolides in the vegetable kingdom. Chem. Nat. Comp. 13, 131-138.

United States Pharmacopoeial Convention and National Formulary 25st. USP XXXVI. United States Pharmacopoeia Convention. Rockville: Staff Liaison; 2013.

Valcárcel M y Ríos A. 2002. La calidad en los laboratorios analíticos. 1° ed. Editorial Reverté, Barcelona. 279 – 281 pp.

Wagner H y Bladt S. 2009. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2nd ed. Editorial Springer, Londres, 195 - 209 pp.

Winters M. 2006. Ancient medicine, modern use: *Withania somnifera* and its potential role in integrative oncology. Altern Med Rev 11(4): 269-277.

WHO. 1993. Guidelines on the Conservation of Medicinal Plants. IUCN, Gland, Suiza.

WHO. 2010. Global status report on noncommunicable diseases. Italia.