



50524
281

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

PRESENTA

María de Jesús Chávez Carpinteyro

PROYECTO

Propuesta de un método por cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación del fitofármaco β -escina en solución acuosa.

PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIATURA EN
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGICA

ASESOR

M. en C. Vicente Jesús Hernández Abad

2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

* FARMACIA

ASESOR

M. en C. Vicente Jesús Hernández Abad

PROYECTO

Propuesta de un método por cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación del fitofármaco β -escina en solución acuosa.

PRESENTA

María de Jesús Chávez Carpinteyro



Número de cuenta: 9753841-3

Folio: 127779

2003

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE

INTRODUCCION	1
I. ANTECEDENTES.	2
A. Calidad de medicamentos herbolarios	2
1. Dificultades en el proceso de control de calidad	4
2. Criterios de calidad	4
B. Castaño de Indias (Aesculus hippocastanum)	8
1. Propiedades químicas de la escina	11
2. Farmacología de la escina	13
3. Farmacocinética de la escina	14
4. Toxicología de la escina	14
5. Métodos de análisis de la escina	15
C. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)	16
1. Tipos de CLAR	16
2. Soportes de sílica gel	18
3. Aparatos	19
4. Estándar de referencia	21
5. Fase móvil	22
D. Validación de métodos analíticos	23
1. Parámetros de validación de métodos analíticos	24
2. Validación de un método analítico para prueba de disolución.	31
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
III. OBJETIVO	34
IV. HIPÓTESIS	35
V. DESARROLLO DE LA INVESTIGACION	36
A. Materiales	36
1. Reactivos	36
2. Material	36
3. Equipo	37

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

B. Diagrama de bloques	38
C. Metodología	39
VI. RESULTADOS	41
A. Selección de la longitud de onda	41
B. Selección de la fase móvil	44
C. Adecuación del sistema	54
D. Precisión de método y sistema	56
E. Linealidad de método y sistema	62
F. Reproducibilidad	68
G. Límite de detección y cuantificación	69
H. Estabilidad de la muestra	70
VII. ANALISIS DE RESULTADOS	72
VIII. CONCLUSIONES	76
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	77

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCION

Los productos herbolarios se han utilizado como tales desde tiempos inmemoriales. Actualmente se están realizando numerosos esfuerzos por identificar los principios activos de las plantas, caracterizarlos e incorporarlos como parte de las formulaciones farmacéuticas.

El uso confiable y seguro de los medicamentos herbolarios, se puede llevar a cabo sólo si se realizan estudios farmacológicos, toxicológicos y biofarmacéuticos de los mismos, además del control de calidad del fitofármaco y la forma farmacéutica como tal.

El extracto de castaño de indias es uno de los componentes de los medicamentos herbolarios utilizados en México. Las formulaciones que contienen este extracto se encaminan al tratamiento de la insuficiencia venosa crónica, mejor conocida como varices. Aunque existen reportes de sus propiedades farmacológicas y farmacocinéticas, no los hay de la disolución intrínseca. Para llevar a cabo este tipo de estudios se requiere del desarrollo de un método analítico que permita determinar la cantidad del componente activo en un medio acuoso, en primera instancia.

La escina es una mezcla de sustancias, por lo que se requiere una técnica de análisis que, además de separar, permita la cuantificación de los principales componentes de la misma; la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), acoplada con la espectrofotometría ultravioleta-visible (UV), se presenta como una opción adecuada, ya que permite la separación de componentes en una mezcla compleja, además de que no requiere la derivación a compuestos volátiles, como en el caso de la cromatografía de gases.

La funcionalidad del método analítico debe garantizarse; para ello, se requiere la validación del mismo. En este caso, se seguirán los parámetros estipulados por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, así como los indicados en la norma oficial mexicana NOM-177-SSA1-1998 para métodos empleados en la construcción de perfiles de disolución, ya que se pretende sea utilizado en la disolución intrínseca del fitofármaco escina. Los parámetros complementarios de la validación se tomarán de las guías de la Food and Drug Administration de los Estados Unidos para métodos cromatográficos y bioanalíticos.

I. ANTECEDENTES.

A. Calidad de medicamentos herbolarios

Antes de abordar el problema de la calidad de los fármacos de origen natural, es conveniente aclarar algunas definiciones. De acuerdo con la Ley General de Salud, los medicamentos se clasifican, con respecto a su naturaleza como:

- a. *Alopáticos*: toda sustancia o mezcla de sustancias de origen natural o sintético que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica y se identifique como tal por su actividad farmacológica, características físicas, químicas y biológicas, y se encuentre registrado en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos para medicamentos alopáticos.
- b. *Homeopáticos*: toda sustancia o mezcla de sustancias de origen natural o sintético que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio y que sea elaborado de acuerdo con los procedimientos de fabricación descritos en la Farmacopea Homeopática de los Estados Unidos Mexicanos, en las de otros países u otras fuentes de información científica nacional e internacional.
- c. *Herbolarios*: los productos elaborados con material vegetal o algún derivado de éste, cuyo ingrediente principal es la parte aérea o subterránea de una planta o extractos y tinturas, así como jugos, resinas, aceites grasos y esenciales, presentados en forma farmacéutica, cuya eficacia terapéutica y seguridad ha sido confirmada científicamente en la literatura nacional o internacional.¹

La Organización Mundial de la Salud (OMS), menciona que, por materiales vegetales, se entienden jugos, resinas, aceites grasos, aceites esenciales y cualesquiera otras sustancias de esta naturaleza. Los medicamentos herbolarios pueden contener excipientes, además de los principios activos. No se consideran medicamentos herbolarios los que contienen material vegetal combinado con sustancias activas químicamente definidas, incluidos constituyentes de plantas aislados y químicamente definidos.²

Por otra parte, en la farmacopea de los Estados Unidos se define a los extractos como preparaciones concentradas de fármacos animales o vegetales, obtenidos por remoción de los constituyentes activos, por evaporación de todo o casi todo el disolvente, y por ajuste de la masa residual o polvos a los estándares preescritos.³

La calidad de un fármaco está definida como el estatus del mismo, el cual está determinado por la identidad, pureza, contenido y otras propiedades físicas, químicas y biológicas. Esta definición puede aplicarse también a fitofarmacéuticos.⁴

Virtualmente todas las culturas han utilizado una variedad de plantas o materiales derivados de las mismas para la prevención y el tratamiento de enfermedades. La evidencia de los efectos terapéuticos benéficos de estas plantas medicinales se observa en su uso continuo. Adicionalmente, el desarrollo de la química moderna permite la separación de sustancias que han servido como fármacos o como materias primas para la síntesis de éstos. Varios de los principios activos modernos han sido sintetizados como resultado del conocimiento obtenido de estudios de los mecanismos de acción de sustancias químicas, primeramente separadas de las plantas medicinales. Por tanto, los productos herbolarios han jugado un rol importante en el desarrollo de la medicina moderna y continúan siendo ampliamente usados en su forma original.

La fitoterapia debe ser entendida para ser integrada como una farmacoterapia razonable. Actualmente se están probando los efectos benéficos de los fitoterapéuticos con estudios clínicos y farmacológicos.⁵

Desde 1980, en Alemania, se han llevado a cabo más de 300 estudios clínicos con fitofármacos estandarizados, incluyendo *Crataegus sp.*, *Silybum sp.*, *Ginkgo sp.*, *Hypericum sp.*, *Sabal sp.*, *Urtica sp.*, *Kava-Kava*, *Alim sativum*, *Valeriana sp.*, *Aesculus sp.*, *Echinaceae sp.* y *Viscum sp.* Estos estudios aseguran la eficacia de los fitofármacos en el tratamiento y prevención de enfermedades moderadas a severas; además, varios estudios comparativos muestran una completa equivalencia terapéutica con los quimioterapéuticos y la ventaja de no provocar efectos adversos. El mecanismo de acción de los medicamentos herbolarios y sus preparaciones, los cuales difieren en varios aspectos de los fármacos sintéticos o mono sustancias, puede ser caracterizado como una acción polivalente e interpretado como aditivo o, en algunos casos, potenciado.

No obstante que la mayoría de las plantas medicinales sean seguras, algunas son tóxicas y deben ser evitadas. Se han realizado pocos esfuerzos por estudiar los efectos adversos potenciales que pueden ser asociados con el uso extendido y las dosis altas de plantas medicinales.⁶

La eficacia y seguridad de los fitofármacos están basadas en una calidad reproducible. Por lo tanto, si se quiere usar el fitofármaco de forma racional, debe ser estandarizado y su calidad farmacéutica aprobada. Los estudios farmacológicos, toxicológicos y clínicos de las plantas medicinales necesitan estar bien documentados para poder obtener resultados

consistentes. Este concepto debe ser seguido no sólo en investigación, sino en la producción y la aplicación terapéutica de los fitofarmacéuticos.

La OMS ha reconocido este problema y ha publicado guías para asegurar la confiabilidad y repetibilidad de las investigaciones en medicina herbolaria.⁽⁴⁾

1. Dificultades en el proceso de control de calidad

Comparados con los fármacos sintéticos, los criterios de aprobación de los fármacos derivados de plantas medicinales son más complejos. La calidad se ve influenciada por aspectos que no afectan a los fármacos sintéticos.

Los fitofarmacos son siempre mezclas de varios constituyentes y es más difícil caracterizar una mezcla que una sustancia pura. De acuerdo con lo anterior los compuestos separados y los productos naturales puros no son considerados como fitofarmacéuticos. Los principios activos no son siempre conocidos. Aún más, éstos pueden ser mezclas de compuestos de diferentes clases.

Por otra parte, la calidad de las colecciones de las diferentes localidades, o aún de plantas individuales, puede ser variable. El cultivo es una de las estrategias para mantener pequeña esta variación. Algunas veces, no obstante, las quimiovariedades pueden existir y originar productos de diferente calidad.

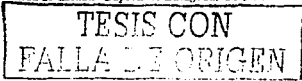
La cosecha, el secado y las condiciones de almacenamiento pueden influenciar la calidad del material crudo. Por lo tanto, estos procesos requieren de estandarización. Más aún, el proceso del material crudo hasta el producto final puede afectar a los constituyentes; por consiguiente, la calidad de la preparación. La diferente polaridad de los disolventes y el modo de extracción origina extractos con concentraciones inconsistentes de sustancias. La inestabilidad de algunos constituyentes también influye.

Como consecuencia, un proceso de manufactura estandarizado es el requisito básico del establecimiento de calidad reproducible y confiable de las preparaciones herbares.⁽⁴⁾

2. Criterios de calidad

Para un manejo serio de la calidad, es necesario definir criterios y especificaciones para cada fitofármaco en la forma de una monografía.

Las especificaciones comienzan con una definición científica clara del material crudo. También, detalles del origen de las plantas (país o región, lugar del cultivo), tiempo de cosecha y recolección, además de especificar el tiempo de secado. Para una identificación positiva del material, las técnicas cromatográficas, tales como la cromatografía de capa fina, la



cromatografía de líquidos de alta resolución o la cromatografía de gases, son los métodos de elección. A través de ellas se puede establecer un cromatograma de huellas digitales basado en un principio activo o marcador y usarse con fines comparativos.

Dependiendo del tipo de preparación, se deben especificar las características organolépticas, humedad, cenizas y constantes físicas. En extractos secos, semisólidos y en las propias plantas, se monitorean los residuos de disolventes. Dado que los fitofarmacéuticos son de origen natural, la contaminación microbiológica es un factor importante.

En adición, los materiales extraños, como los metales pesados, residuos de pesticidas y aflatoxinas deben ser considerados.

Para comprobar la calidad de las preparaciones herbolarias, se requiere aplicar métodos analíticos apropiados en la determinación cuantitativa de los constituyentes de actividad terapéutica conocida o de los marcadores. Si no existe un método químico disponible, es aceptable un ensayo biológico de los compuestos activos.⁴

En el caso del diseño de formas de dosificación oral, la prueba de disolución forma parte de las herramientas de control de calidad.

Al diseñar una forma farmacéutica, es necesario considerar una amplia variedad de factores con relación a la forma de dosificación y a la prueba de disolución. Estos incluyen la relación entre la dosis y la solubilidad del fitofármaco; la influencia de factores físicos tales como la formación de sales, hidratos y polimorfos; la velocidad de disolución intrínseca en el intervalo de pH de 1 a 7, que cubre predominantemente al tracto gastrointestinal, donde normalmente se absorbe una significativa proporción de fármacos.

Existe cierto número de señales de alerta que indican problemas potenciales de absorción y biodisponibilidad, que requieren del control de algunas propiedades fisicoquímicas del fármaco como tal. Las señales de alerta son: cuando la cantidad de la dosis predicha para humanos dividida entre la solubilidad en agua del fármaco (valor de solubilidad mínima en el intervalo de pH de 1 a 7) excede los 100 ml, o cuando la velocidad de disolución intrínseca es menor que 0.1 mg*minuto/cm² o el porcentaje de dosis oral que es absorbido no excede el 60% en ninguna de las especies animales en estudios preclínicos.⁷

Dependiendo de los conocimientos disponibles acerca del principio o principios activos de la planta, se deben seguir diferentes conceptos para establecer un criterio cuantitativo de calidad. De acuerdo con lo anterior, las fitopreparaciones pueden ser divididas en dos categorías:

- Extractos o preparaciones en las cuales el principio activo es químicamente conocido y aceptado.
- Extractos o preparaciones en los que el principio activo no está definido.

Cada grupo debe ser manejado de diferente forma para caracterizar la preparación de una manera clara.

De acuerdo con guías europeas, los extractos o preparaciones en que los constituyentes terapéuticos son conocidos pueden estandarizarse. En este caso, el contenido de principio o principios activos puede ajustarse a un cierto nivel por adición de material inerte o por el mezclado con un lote altamente concentrado. Como consecuencia, la concentración del principio activo es constante y las cantidades del extracto nativo y el adicionado son variables. Las pruebas de estabilidad basadas en los compuestos activos son obligatorias. Las pruebas de disolución *in vitro* son razonables (perfil y cinética) y las pruebas de biodisponibilidad son posibles.

Si se deben considerar varios constituyentes, la estandarización parece ser más complicada, debido a la variación de las concentraciones de los componentes en diferentes lotes. En este caso, la dilución o concentración puede llevarse a cabo sólo por mezclado con lotes de mayor o menor concentración.

Cuando los componentes activos no son conocidos, el extracto completo debe tratarse como el principio activo. En este caso, se deben utilizar compuestos marcados como control de calidad. Estos extractos o preparaciones no pueden ser estandarizados sobre la base de este compuesto, ya que las sustancias marcadas no están necesariamente relacionadas con la actividad terapéutica. El análisis de las huellas digitales es la opción más adecuada.⁴

En el presente, no obstante, existen grandes diferencias en el ámbito internacional con referencia al estatus regulatorio de los productos herbolarios. En los Estados Unidos, por ejemplo, los productos herbolarios son introducidos como complementos dietéticos con pocos datos acerca de su calidad. En contraste, una aprobación premercado que implica el cumplimiento de datos de calidad, seguridad y acción terapéutica, es obligatoria para la autorización de estos productos en varios países europeos. Alemania, Francia, Suiza, Dinamarca y Suecia han establecido regulaciones nacionales específicas concernientes a la evaluación de productos herbolarios. Otros países (los países bajos, el Reino Unido y Portugal), los consideran legalmente como productos farmacéuticos ordinarios.

En el mercado de suplementos dietéticos, como en los Estados Unidos, los productos herbolarios se encuentran fácilmente disponibles al público en general. El mayor problema que

origina la falta de un control premercadeo es que estos productos pueden contener plantas potencialmente inseguras o contaminantes tóxicos no declarados, además de no contener las cantidades indicadas de constituyentes.

Desde el punto de vista terapéutico, son de interés tres tipos de constituyentes, si se conocen: principio activo, marcadores activos y marcadores negativos.

El o los principios activos son aquellas sustancias químicamente definidas y aceptadas, que contribuyen substancialmente a la actividad terapéutica. En este caso, se puede asumir que la eficacia de un producto herbolario está basada en el principio activo, y el ajuste con respecto a este constituyente está justificado. Ejemplos de estos productos herbolarios son las preparaciones del castaño de indias o del kava-kava (Tabla I). Sólo una cantidad limitada de plantas se encuentra en este grupo.

Tabla I. Categorización de productos medicinales herbolarios.	
Productos herbolarios con principios activos clínicamente conocidos	
Follaje de sena	Senósidos
Semilla de castaño de indias	Escinas
Fruta del cardo	Silibinina
Rizoma del Kava	Kava lactonas
Aloe	Aloína
Productos herbolarios con marcadores activos farmacológicamente	
Follaje del espino con flores	Procianidinas oligoméricas
Follaje del Ginkgo	Gluco-síidos flavonoides, lactonas terpénicas
Bulbo del ajo	Alíinas, alicinas
St. John's Wort	Hiperforina, hipericína
Ginseng asiático	Ginsenosídes
Saw palmetto fruit	Ácidos grasos y ésteres
Productos herbolarios con marcadores analíticos	
Raíz de Valeriana	Ácidos valerénicos
Planta Equinácea	Ácidos caféicos
Ginseng siberiano	Gluco-síido lignano
Follaje del bálsamo	Ácidos rosmarínicos
Raíz de la ortiga	Escopoletina

Desde décadas pasadas, el uso de preparaciones farmacopéicas clásicas como las tinturas o extractos líquidos, ha disminuido en productos preparados industrialmente. Las tinturas representan el 7% del mercado de los productos herbolarios en Estados Unidos, comparado con el 68% de las formulaciones sólidas.

Solamente cuando los ingredientes sean liberados de la forma de dosificación sólida, la disolución en los fluidos biológicos y la subsiguiente absorción será posible. La desintegración *in vitro* (para preparaciones con marcadores analíticos) o la prueba de disolución (para preparaciones con marcadores activos o principios activos) son, por lo tanto, requeridas para demostrar la funcionalidad de la formulación. Recientemente, la Farmacopea de los Estados

Unidos invitó a todos los interesados en dar a conocer resultados acerca de la disolución de varias formas sólidas de dosificación herbolarias.⁸

Como se aprecia en la tabla 1, el extracto del castaño de Indias posee un principio activo reconocido que es la escina. Los preparados de este fitofármaco han sido utilizados satisfactoriamente en el tratamiento de la insuficiencia venosa crónica.

B. Castaño de Indias (*Aesculus hippocastanum*)

Insuficiencia venosa crónica es un término aplicado a un síndrome, resultante de la obstrucción o incompetencia persistente de las venas profundas en las extremidades inferiores. Los síntomas abarcan desde el edema, cianosis o dermatosclerosis, hasta cambios atróficos en piel y ulceración. La sensación de pesadez, cansancio, tensión o ardor y dolor, son los síntomas de mayor importancia patológica. La insuficiencia venosa crónica está dividida en tres estados dependiendo del grado de severidad.

La terapia en forma de cirugía vascular es posible sólo en un pequeño porcentaje de los pacientes. Las opciones en el tratamiento de control consisten en el uso de soportes de compresión elásticos y en la farmacoterapia sintomática.

Varios de los estudios farmacológicos y clínicos de medicamentos herbolarios usados en el tratamiento de los desórdenes venosos, se han efectuado con extractos de castaño de Indias y sus constituyentes, las escinas. Estos agentes actúan menos sobre las venas y vénulas que a nivel capilar, donde ejercen efectos antiinflamatorios y antiexudativos.⁹

La escina se extrae de un árbol denominado castaño de Indias, cuyo nombre científico es *Aesculus hippocastanum*¹, que se muestra en la figura 1; originario de Grecia, Irán, norte de la India y los Balcanes, aunque se cultiva en el oeste de Europa, sobre todo en Gran Bretaña y Escandinavia y en amplias zonas de Norteamérica. En el siglo XVI, en la Europa occidental se importaban semillas desde Turquía y, creyendo que el país de origen era la India, recibió el sobrenombre "de Indias". En el sur de Estados Unidos y norte de México se encuentran cinco especies emparentadas, de las cuales la más conocida es *Aesculus pavia*, con la cual se han obtenido muchos híbridos para su uso en jardinería.¹⁰

¹ Hippocastanum es una palabra griega que podría traducirse por "castaña de los caballos". Hace referencia a la costumbre existente en Asia Menor, desde tiempos inmemoriales, de dar a los caballos las semillas de esta planta para curarles la tos.



Figura 1. Castaño de indias

Es un árbol caducifolio de unos 25 m y hasta 35 m de altura, porte ovoide y proyección de copa de 12 a 14 m de diámetro, tronco único con corteza marrón-rojiza, con estrías longitudinales y ligeramente espiralizadas y con gran número de ramas que terminan en péndulas. Las hojas son alternas, palmato-compuestas de color verde obscuro. La floración se lleva a cabo en un largo panículo piramidal de color blanco, en abril. Su fructificación es de tipo cápsula, a finales de verano-otoño. Las semillas pierden rápidamente la germinabilidad.¹¹ En la figura 2 se muestra una foto de las castañas abiertas.



Figura 2 Semillas abiertas del castaño de indias

En las industrias farmacéutica y cosmética existe interés por la producción del castaño de indias debido a su alto contenido en saponinas, utilizadas en la elaboración de emulsiones para acompañar el aceite de hígado de bacalao, o como suavizante de la piel, para preparar

cremas y jabones. El aceite que se extrae de las semillas puede utilizarse con fines alimenticios. Como remedio casero, la decocción se prepara a partir de 50 gramos de corteza o semillas en un litro de agua, de la cual se tomará una o dos tazas al día como antihemorroidal o contra los sabañones y las varices. También puede prepararse una tintura con 250 gramos de semillas frescas trituradas en un litro de alcohol, dejándolas en maceración durante dos semanas por los menos. Se toma una cucharada sopera una vez al día.¹⁰ Se ha reportado la utilización del *A. hippocastanum* contra los parásitos de otras plantas.¹²

Los medicamentos que contienen extracto de castaño de indias son usualmente derivados de las semillas de este árbol; se han presentado en diferentes formas farmacéuticas, tales como cápsulas de gelatina blanda, ungüentos, formulaciones líquidas, ampollitas o viales para inyección, e incluso supositorios.¹³

En la tabla II se muestran los componentes químicos de la corteza, follaje y semillas del castaño de indias.¹⁴

Tabla II. Composición química del castaño de indias.		
CORTEZA	FOLLAJE	SEMILLA
Glucósidos cumarínicos	Glucósidos cumarínicos	Escinas (saponinas)
> Aesculina	> Aesculina	Componentes fenólicos
> Fraxina	> Fraxina	> (+) catequina B-1
> Escopolina	> Escopolina	> Epicatequinas B-2, B-5
• Agliconas	Glucósidos flavonólicos	Taninos
>> Aesculetina	(quercetin)	> Procianidinas B1, B2, A2
>> Fraxetina	> 3-rhamnosido	Flavonoides
>> Escopoletina	(quetetrina)	> Quercetina
Glucósidos flavonoides	> 3-rhamnosidoglucosido	> Kaempferol
> Quercetrina	(rutina)	
• Aglicona	> 3-glucósido	
> Quercetina	(isoquercitrina)	
Mezcla heterogénea de saponinas (Escina)	> 3 arabinósido	
> Protascigenina y barringtonol	• [1,2] glucósidos de	
C, un residuo ácido 3-glucorónico	kaempferol	
substituido en la posición 2' o 4'	correspondientes	
con glucosa, xilosa o galactosa	Taninos; trazas de escina [3,4].	
Alantoina; esteroides; leucocianidina;	cis,trans-polifenoles;	
leucodelfinidina; catecoltaninos; alcanos	aminosúidos; ácidos grasos;	
(serie homóloga de C ₁₅ a C ₃₀)	leucoantocianos	
	Esteroides [5]	
	> sitosterol	
	> estigmasterol	
	> campesterol	

La Farmacopea Alemana de 1996, describe el extracto obtenido a partir de las semillas secas del castaño de indias. Las preparaciones elaboradas de otras partes, como la corteza, han sido utilizadas como remedio, sin embargo no ha sido comprobada su eficacia.

Para secarse, las semillas se extienden formando una capa delgada en un área con buena ventilación. Después, se separan de su cubierta y se secan a una temperatura de 60 °C, con lo que se obtiene un polvo con 3% de saponinas. Para obtener el extracto se utilizan mezclas de agua en etanol, después se ajusta con dextrina hasta un contenido de 16-20% de glucósidos triterpénicos, calculados como escina.⁹

1. Propiedades químicas de la escina

Las saponinas son glucósidos presentes comúnmente en las plantas superiores, muestran una gran variedad de actividades biológicas y son ampliamente usadas en alimentos, medicinas y cosméticos. Se encuentran clasificadas en dos grupos, de acuerdo con su aglicona (sapogenina): el grupo triterpeno y el grupo esteroide. Los azúcares más comunes encontrados en las saponinas son hexosas (glucosa, galactosa), 6-deoxihexosas (ramnosa), pentosas (arabinosa, xilosa), ácidos urónicos (ácido glucurónico) o aminoazúcares (glucosamina). Los azúcares pueden estar unidos a la sapogenina en uno o dos sitios de glucosilación.

Las saponinas pueden detectarse en un estrecho intervalo de longitud de onda (200-210 nm) usando un detector UV, por lo que un detector de espectrometría de masas es preferible y confiable.

La escina, considerada el componente activo del castaño de indias, es una mezcla compleja de saponinas triterpenoides glucosiladas que puede dividirse en dos grupos, β -escina (tiende a cristalizar) y α -escina. En la figura 3 se presenta la estructura del constituyente principal de la escina.¹⁵

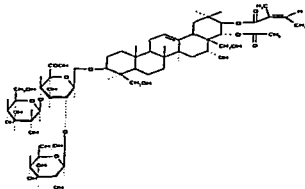


Figura 3. Estructura del componente principal de la escina.

Al menos un 3% de la mezcla contiene derivados de la protoescigenina y barringtonogen C. Ambas sapogeninas están ligadas a 1 mol de ácido glucurónico y a 2 moles

de glucosa, se encuentran esterificadas con ácido angélico, tiglico, α -butírico o isobutílico y acético.¹⁶ La estructura de estas saponinas se muestra en la figura 4.¹⁷

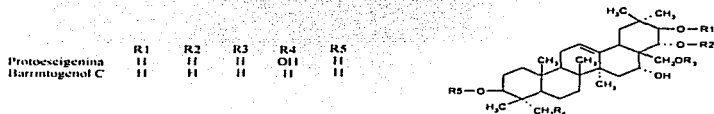


Figura 4. Estructura de la protoescigenina y barringtonol

La β -escina es una mezcla compleja compuesta por más de treinta saponinas triterpénicas pentacíclicas, que poseen un esqueleto 12-oleaneno, con funciones oxigenadas en las posiciones C-3, C-16, C-21, C-22, C-24 y C-28. Una cadena de trisacáridos (R1) compuesta de una unidad 1-2 y 1-4 de ácido glucurónico (Glu) ligada a dos residuos glucosídicos o a glucosa (Glc) y xilosa, o a glucosa y galactosa (Gal), está localizada en la posición 3. El C-21-OH esta esterificado con ácido angélico, tiglico, isobutírico o α -metil- β -hidroxibutírico, mientras que el C-22-OH está esterificado con ácido acético.¹⁸ En la figura 5 se muestra la estructura química de algunas saponinas componentes de la β -escina.¹⁹

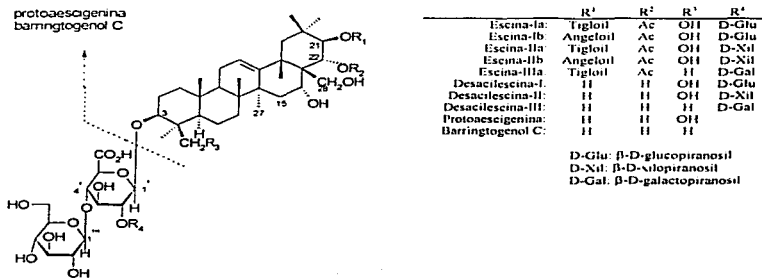


Figura 5. Estructura de algunas saponinas de la β -escina

Se han reportado diversos estudios de algunos de los componentes de la β -escina, en la tabla III se presentan parte de ellos.²⁰

Tabla III. Características de algunas escinas.			
	Cristales	p. f. (°C)	Fórmula molecular
Escina Ia	Transparentes, ortorómbicos	224.9-226.7	$C_{55}H_{86}O_{24} \cdot (H_2O)_{1.5}$
Escina IIa	Finos, incoloros	206.5-208.5	$C_{41}H_{64}O_{21}$ ¹⁹
Escina IIb	Finos, incoloros	197.3-199.0	Igual a la anterior ²¹
Escina IIIb	Finos, incoloros	194.1-196.5 °C	$C_{43}H_{68}O_{23}$
Escina IV	Finos, incoloros	226.9-228.1	$C_{41}H_{62}O_{21}$
Escina V	Finos, incoloros	215.8-217.1	$C_{41}H_{66}O_{21}$
Isoescina V	Finos, incoloros	198.8-200.7	Igual a la anterior
Escina VI	Finos, incoloros	220.5-222.3	$C_{41}H_{64}O_{21}$ ²²

2. Farmacología de la escina

Los extractos comerciales del castaño de indias han sido evaluados en el tratamiento de varios estados patológicos, primeramente por investigadores europeos. El extracto de la planta, que contiene 50 mg de glucósidos triterpénicos, disminuye la permeabilidad capilar de las venas y parece tener un efecto "tónico" en el sistema circulatorio. Se ha observado que los constituyentes de la planta, en particular la escina, inhiben el incremento (inducido) de la permeabilidad vascular en ratones y ratas. Un extracto comercial de castaño de indias, con 70% de escina, ha probado tener una serie de propiedades farmacológicas *in vitro* e *in vivo*, incluyendo la capacidad de contraer una vena del perro y potenciar la respuesta contráctil de la norepinefrina.

La aesculina producida en la corteza mejora la resistencia vascular y auxilla a tonificar las paredes de las venas. Esto es deseable para el caso de algunas enfermedades como las hemorroides, varices, úlceras en las piernas o congelación.²³

La escina reduce la actividad de la enzima lisosomal, en un 30%, estabilizando el contenido de colesterol en las membranas de los lisosomas y limitando la liberación del mismo. Además, restringe la formación de edema disminuyendo la filtración transcápilar de agua y proteínas. En años recientes, se ha encontrado aplicación en el área cosmética, principalmente para la prevención y tratamiento de la paniculopatía edemato-fibroesclerótica, también conocida como celulitis.²⁴

Se ha encontrado que la escina provee efectos protectores sobre la actividad de la respiración mitocondrial, lo que puede explicar su acción protectora sobre los contenidos de ATP celular en condiciones isquémicas y algunos de sus efectos terapéuticos benéficos en enfermedades vasculares crónicas.²⁵

En un estudio realizado para observar el efecto de las escinas Ia, Ib, IIb y las desacilescinas I y II, sobre la inflamación aguda en animales, se encontró que las escinas Ia,

Ib, IIa y IIb (50-200 mg/kg) inhiben el incremento de la permeabilidad vascular inducida tanto por el ácido acético en ratones, como por la histamina en ratas. Las escinas Ia, Ib, IIa y IIb (50-200 mg/kg) también inhiben el efecto de la serotonina, no así la escina Ia. Las escinas Ia, Ib, IIa y IIb (200 mg/kg) inhiben el edema de la pata posterior inducido por la carragenina en ratas. La Escina Ia (200 mg/kg) y las escinas Ib, IIa, y IIb (50-200 mg/kg) inhiben la comezón inducida por el compuesto 48/80 en ratones, pero la escina Ia es más débil. Las desacillescinas I y II (200 mg/kg) no mostraron efecto. Con respecto a la relación estructura actividad, los grupos acilo son esenciales en las escinas. Las escinas Ib, IIa, y IIb con un grupo 21-angeloil o con el 2-o-xilopiranosil, mostraron más potencia que la escina Ia, que contiene ambos grupos.²⁶

3. Farmacocinética de la escina

La escina administrada oralmente es escasamente absorbida o sufre un substancial efecto del primer paso. Su biodisponibilidad relativa comparada con la administración intravenosa es menor al 1%. Tiene una vida media de absorción de aproximadamente 1 hora y una vida media de eliminación de 20 horas. En sujetos que tomaron 50 mg de escina en cápsulas (Venostasin®), se obtuvieron niveles plasmáticos máximos de aproximadamente 20-30 ng/mL, después de 2-3 horas.⁹

4. Toxicología de la escina

El *Aesculus* (castaño de indias) está clasificado por la FDA como una planta insegura; todos los miembros de este género deben considerarse potencialmente tóxicos. Se han atribuido estas propiedades a ciertos componentes, incluidos los glucósidos y las saponinas. Las potenciales toxinas identificadas en este género incluyen nicotina, quercetina, quercetrina, rutina, saponinas y ácido shikímico.

El activo tóxico más significativo es la esculina. El envenenamiento está caracterizado por la tetanización de los músculos, debilidad, falta de coordinación, pupilas dilatadas, vómito, diarrea, depresión, parálisis y estupor.²³

El extracto del castaño de indias y la escina, han sido evaluados para toxicidad aguda en varias especies animales (ratón, rata, cerdo, conejo, perro). Se ha encontrado que la dosis límite es 8 veces mayor a la recomendada para uso terapéutico en pacientes. Las pruebas de toxicidad crónica (34 semanas en ratas y perros) no han mostrado efectos tóxicos por acumulación y no existe evidencia de teratogénesis o embriotoxicidad.⁹

La escina puede ocasionar irritación gástrica. Por vía intravenosa puede tener efectos tóxicos en hígado y riñones, también puede provocar reacciones anafilácticas.²⁴

5. Métodos de análisis de la escina

La separación de las saponinas se ha llevado a cabo por técnicas que consumen mucho tiempo, como la cromatografía de capa delgada (CCD) y la cromatografía de columna abierta a baja presión. La cromatografía de gases puede ser utilizada, pero requiere derivatización y altas temperaturas. En contraste, la cromatografía de líquidos de alta resolución generalmente tiene alto poder de resolución y velocidad, y puede ser usada para la separación de saponinas sin derivar a temperatura ambiente.²⁷

Para el análisis de la β -escina, se han desarrollado métodos de análisis colorimétricos, por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y CCD acoplada a densitometría. Se han realizado estudios comparando CLAR y CCD-densitometría, obteniéndose que con ambos las respuestas son satisfactorias.¹⁵

En el desarrollo de métodos por CLAR para la determinación de β -escinas en extractos y preparaciones de *Aesculus hippocastanum*, se han evaluado cuatro columnas:

- Hibar Lichrospher[®] 100CH-18/2, 5 μ m, 100 Å (125 x 4 mm) (Merck)
- Ultrasphere[™] ODS RP-18, 5 μ m, 100 Å (250 x 4.6 mm) (Altex)
- Supercosil[™] LC-318, 5 μ m, 300 Å (50 x 4.6 mm) (Supelco)
- Vydac[™] 218TP54, 5 μ m, 300 Å (250 x 4.6 mm) (Sigma)

Los resultados sugieren que columnas con un tamaño de poro de 300 Å presentan la mejor separación para las saponinas, debido a la gran capacidad intrínseca de presión de la columna y las fuertes interacciones entre las moléculas y la fase estacionaria.²⁸

A pesar de su amplia utilización, han habido pocos reportes de análisis por CLAR de la β -escina y, debido a la falta de un estándar, los ensayos descritos están basados en la determinación de la aglicona después de hidrólisis alcalinas o en las áreas bajo los picos. Por lo tanto, ninguno de los métodos reportados ofrece una separación satisfactoria de los componentes, que permitan caracterizarla.

Se ha descrito un método por CLAR isocrático para la separación de las saponinas principales 3-[2''-(β -D-glucopiranosido)-4'-(β -D-glucopiranosido)- β -D-glucoronopiranosido]-21- β -glitoll-22- α -acetilprotoescigenina (I) y su análogo 21- β -angelol (II). En este método, la fase móvil fue llevada a pH 3.2 para evitar la adición de los picos debida a la presencia de los grupos carboxilo de la escina. Se utilizaron diferentes porcentajes de acetonitrilo y velocidades de flujo. Utilizando 33.5% de acetonitrilo en agua (pH 3.2) durante 20 minutos a una

velocidad de flujo de 1.0 ml/min, fue observada una buena separación de los picos. El pico principal, relacionado a la saponina I y el pico secundario, relacionado a la saponina II, fueron eluidos a tiempos de retención de 14.8 y 18.1 min, respectivamente.¹⁷

Se ha reportado que, debido a la naturaleza ácida de los grupos glucorónicos de la β -escina, fue necesaria la adición de un reactivo de interacción iónica, en este caso el ácido trifluoroacético (ATF) a la fase móvil. Se utilizó una columna C_{18} con un gradiente de 20 a 80% de acetonitrilo en agua con 0.1% de ATF, durante 25 minutos, a una velocidad de flujo de 1 ml/min. También se reporta que el tiempo de retención de la β -escina aumentó de 1.5 a 17.5 min en presencia de ATF.²⁷

Para la determinación de concentraciones séricas de β -escina, se han desarrollado radioinmunoensayos altamente específicos.²⁹

C. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

Históricamente, la cromatografía de líquidos de alta resolución se utilizó inicialmente para el análisis de aminoácidos al principio de los años 60's. En 1975, se describió esta técnica en la Farmacopea de los Estados Unidos. Desde entonces, la CLAR ha llegado a ser la técnica más popular en el laboratorio farmacéutico.³⁰

La CLAR es una técnica de separación que se fundamenta en la interacción de un soluto con una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. La separación se lleva a cabo por partición, adsorción o procesos de intercambio iónico, dependiendo del tipo de fase estacionaria usada. Esta técnica tiene distintas ventajas sobre la cromatografía de gases para el análisis de compuestos orgánicos. Los compuestos a ser analizados son disueltos en un líquido orgánico, y la mayor parte de las separaciones se llevan a cabo a temperatura ambiente. Dado que la mayoría de los fármacos son compuestos no volátiles o térmicamente estables, pueden ser separados sin descomposición o sin la necesidad de sintetizar derivados volátiles. La mayor parte de los análisis farmacéuticos están basados en cromatografía de partición y son completados en un tiempo menor a 30 minutos.

El tiempo de elución de un compuesto puede ser descrito por el factor de capacidad, K' , que depende de la naturaleza química del analito, la composición y la velocidad de flujo de la fase móvil, además de la composición y el área de la superficie de la fase estacionaria. La longitud de la columna es determinante de la resolución. Sólo compuestos con diferentes factores de capacidad pueden ser separados por CLAR.³

1. Tipos de CLAR

Los métodos cromatográficos comúnmente utilizados pueden ser divididos como sigue:

a. Cromatografía quiral. La separación de enantiómeros puede hacerse sobre una fase estacionaria quiral, por formación de diastereómeros vía agentes derivativos o aditivos de la fase móvil que actúan sobre la fase estacionaria. Cuando se usa como un método de prueba de impurezas, la sensibilidad es mejorada si la impureza enantiomérica eluye antes que el fármaco enantiómero.

b. Cromatografía de intercambio iónico. La separación está basada en la carga de los grupos funcionales, intercambio aniónico para una muestra con carga negativa o intercambio catiónico para una muestra con iones positivos. El gradiente de elución por pH es común.

c. Cromatografía de afinidad. La separación está basada en la interacción química específica de las especies destino. La modalidad más popular usa un amortiguador y una cantidad adicionada de carga positiva a la muestra con separación influenciada por pH, fuerza iónica, temperatura, concentración y tipo de disolvente orgánico. La cromatografía de afinidad, común para macromoléculas, emplea un ligando (molécula biológicamente activa unida covalentemente a la matriz sólida), la cual interactúa con su antígeno (analito) homólogo como un complejo reversible que puede ser eluido por cambios en las condiciones del amortiguador.

d. Cromatografía de fase normal. Es una técnica cromatográfica que usa solventes orgánicos para la fase móvil y una fase estacionaria polar. Aquí, los componentes menos polares eluyen más rápido que los componentes más polares.

e. Cromatografía de fase reversa. La cromatografía de fase reversa, una técnica cromatográfica de fase ligada, utiliza agua como el solvente base. La separación está basada en la fuerza y selectividad del solvente, también puede ser afectada por la temperatura de la columna y el pH. En general, el componente más polar eluye más rápido que los componentes menos polares.

f. Cromatografía de exclusión molecular. También conocida como filtración o permeación en gel, la separación está basada en el tamaño de las moléculas o el volumen hidrodinámico de los componentes. Las moléculas que son más grandes que los poros del material de empaque de la columna, eluyen primero, las moléculas pequeñas que entran en los poros eluyen al final y la velocidad de elución de el resto depende de sus tamaños relativos.¹²

2. Soportes de sílica gel

La sílica gel y sus fases unidas son los materiales de empaque de columnas más comunes. La sílica gel optimizada para cromatografía debe tener las características listadas en la tabla IV.

Tabla IV. Características de la sílica gel optimizada.		
	Valores típicos	Valor ideal
Área superficial específica (m ² /g)	150-400	200
Diámetro de poro (nm)	6-10 ó 30	<10
Volumen específico de poro (ml/g)	0.2-1	0.7
Contenido de metales traza (ppm)	<1000	<1000
pH de la superficie	Ácido a básico	Neutral
Tamaño de partícula (µm)	3.5 ó 10	-
Densidad aparente	0.4-0.6	0.45
Suavidad de la partícula	-	Suave

El hierro y otros óxidos metálicos son comúnmente encontrados en relativamente grandes cantidades (0.3% por peso) en la sílica gel de grado comercial. A estas impurezas metálicas se les atribuye la pobre ejecución cromatográfica. Afortunadamente, la mayor parte de estas impurezas pueden ser removidas por lavados ácidos.

Las propiedades ácidas y básicas de la sílica ejercen influencia en las características de las fases ligadas preparadas para ella.

Las partículas de 3 µm son las de mayor calidad disponibles comercialmente. Se han notado varios efectos adversos para partículas menores a este tamaño. Para adsorbentes usados en procedimientos preparativos, son comunes partículas mayores a los 10 µm. Las partículas de 15 µm presentan problemas de resolución y de capacidad de retención para procedimientos preparativos.

La densidad aparente se encuentra relacionada con el volumen específico de poro y puede ser medida con facilidad. La sílica gel con densidad aparente baja no tiene la fuerza estructural necesaria para soportar las altas presiones generadas durante el empaque de la columna. Las partículas caracterizadas como suaves son importantes para una compresión estable al empacar.

Fase reversa. Muchas de las fases unidas son preparadas por la reacción de un organoalcoxisilano o un organoclorosilano con el grupo silanol de la sílica gel. Debido a la estabilidad limitada del pH de la sílica y los absorbentes ligados a ella, los eluentes con pH cercano a 7 no son recomendados. A pH menor a 2, las uniones de siloxano son separadas. La degradación de la columna ocurre con altas concentraciones de sales y en la presencia de algunos reactivos con pares iónicos.

Se han usado numerosas alternativas para minimizar la degradación del soporte. Una de las primeras propuestas fue el reaccionar los grupos silanol libres con silanos más pequeños, como el trimetilclorosilano. Se han reportado mejoras en la estabilidad de estos empaques a pH 10. Un desarrollo reciente ha sido la capa polimérica de polimetiloctadecilsiloxano en sílica gel con rayos gama o generadores de radicales libres. La estabilidad de estos empaques en varios disolventes y a pH alto, se ha comprobado.

La tercera propuesta es usar una fase polimérica sin sílica. Una de éstas, el oil(estireno-divinilbenceno), es estable en un intervalo de pH de 1 a 13 y se comporta como una columna C-18 con alto contenido de carbono. Estos geles son la base de muchos otros absorbentes, sobre todo de intercambio iónico. La más reciente de las propuestas ha sido la derivación de empaque de fase reversa poliméricos con C-18 para dar un adsorbente que es químicamente estable en un amplio intervalo de pH y tiene características similares a la C-18.

3. Aparatos

El cromatógrafo de líquidos consiste principalmente en un recipiente que contiene la fase móvil, una bomba que empuja la fase móvil a través del sistema a alta presión, un inyector que introduce la muestra en la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un aparato para recolectar datos, como una computadora o integrador.³

a. **Sistema de bombeo.** Las micropartículas de las columnas comunes desarrollan una alta resistencia a la presión durante la operación. Esto requiere de una bomba capaz de operar a altas presiones para hacer pasar la fase móvil a través de la columna. Un límite de presión superior de 6000 psi es usualmente adecuado para las columnas disponibles comercialmente. En la tabla V se presentan las características requeridas para una ejecución satisfactoria de la bomba.

Tabla V. Características de uso de la bomba.
Liberación de flujo constante (0.1-45 ml/min)
Presión máxima alta
Liberación de flujo poco variable
Mínimas fluctuaciones de presión
Bajo nivel de ruido
Simplicidad de operación
Químicamente inerte a los solventes usados comúnmente

Para el análisis de fármacos, se prefieren los métodos isocráticos a los de gradiente. La instrumentación de un método isocrático es tecnológicamente más simple, dado que no requiere una bomba múltiple y la reproducibilidad de laboratorio en laboratorio es mayor. No obstante, la elución por gradientes es preferida en el caso de análisis de mezclas potencialmente complejas.

b. Inyectores. Existen dos diseños de inyectores: los de desplazamiento y los de aguja. Ambos pueden ser incorporados a un sistema de inyección manual o automático. Los inyectores de desplazamiento fuerzan la muestra hasta un loop pero presentan baja reproducibilidad cuando están parcialmente llenos. En consecuencia, es necesario cambiar físicamente el loop para cambiar los volúmenes de inyección. Los inyectores de tipo aguja conducen la muestra a través del loop. Este mecanismo puede operar con precisión con un loop parcialmente lleno y es, por lo tanto, más versátil. Puede ser más difícil mantener inyecciones reproducibles con un inyector de aguja que con uno de desplazamiento. Bajo la mayoría de las circunstancias, la reproducibilidad no es un problema.³²

c. Columnas. Para la mayoría de los análisis farmacéuticos, la separación de los compuestos se lleva a cabo por partición. Los sistemas contienen una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar, el arreglo opuesto es conocido como cromatografía de fase reversa. La cromatografía de partición es usada casi siempre para los hidrocarburos solubles con peso molecular menor a 1000. La afinidad de un compuesto por la fase estacionaria y el tiempo de retención de la columna, está controlada por la polaridad de la fase móvil. La polaridad de la fase móvil puede ser modificada por la adición de un segundo y algunas veces, tercer o cuarto componente.³

El acero inoxidable ha llegado a ser el material estándar de las columnas y otros componentes del cromatografo, debido que es inerte, su relativo bajo costo y su capacidad de soportar altas presiones. No obstante, bajo ciertas circunstancias, el acero inoxidable presenta interacciones con la muestra y con la fase móvil.³⁰

Las columnas usadas para separaciones analíticas usualmente tienen diámetros internos de 2 a 5 mm; las columnas de diámetro mayor son usadas para cromatografía preparativa. Las columnas pueden ser calentadas para dar separaciones más eficientes, pero raramente son usadas a temperaturas mayores a 60°C, debido a la degradación potencial de la fase estacionaria o la volatilización de la fase móvil.³

d. Detectores. El sistema de detección empleado para CLAR está basado en un diseño instrumental que responde a una propiedad física o química particular del componente de la muestra a eluir.³⁰

La mayoría de los análisis por CLAR se han diseñado para usar detectores espectrofotométricos. Tales detectores consisten de una celda, montada al final de la columna. Un haz de radiación ultravioleta pasa a través de la celda perpendicular a la dirección de flujo y dentro del detector. Después de que el compuesto eluye a través de la columna, pasa hacia la celda y absorbe la radiación, resultando en cambios de niveles de energía medibles.

4. Estándar de referencia

Un estándar de referencia es un compuesto altamente purificado que está bien caracterizado. Los métodos cromatográficos se basan en los estándares para proveer datos precisos. Por lo tanto, la calidad y pureza de los mismos son importantes.

Los métodos de prueba cromatográficos utilizan estándares externos e internos para la cuantificación.

a. **Método del estándar externo.** Se utiliza cuando el estándar es analizado en un cromatograma por separado de la muestra. La cuantificación está basada en una comparación del área bajo la curva o de las alturas de los picos de la muestra con respecto al estándar del analito de interés.

Este método es adecuado en los siguientes casos:

- Muestra con una sola concentración y estrecho intervalo de concentraciones.
- Procedimiento simple de preparación de la muestra.
- Tiempo de línea base largo para la detección de potenciales picos extraños.
- Cuando hay repetibilidad en los sistemas de medición e inyección.

b. **Método del estándar interno.** Se utiliza un compuesto de pureza conocida y de estructura semejante a la del analito, de esta forma, al adicionarse a la mezcla de la muestra, no causa interferencia en el análisis. La cuantificación está basada en la relación de la respuesta del compuesto de interés con respecto al estándar interno en comparación con la respuesta de una preparación similar del estándar de referencia.

Se utiliza en los siguientes casos:

- Procedimientos de preparación de muestra complejos.
- Baja concentración de la muestra.
- Amplio intervalo de concentraciones esperados en la muestra de análisis.
- Cuando no hay repetibilidad en el sistema de medición.³¹

5. Fase móvil

En todas las formas de cromatografía, la calidad y manipulación de la fase móvil es tan crítica como cualquier parte del sistema cromatográfico. Existe una serie de factores que deben tomarse en cuenta a fin de evitar problemas durante la ejecución de la técnica.

a. **Compatibilidad del sistema.** Es necesario considerar las necesidades del equipo de CLAR cuando se selecciona la fase móvil. Se recomienda que la mezcla de disolventes sea miscible con la usada previamente en el equipo, de lo contrario, es necesario usar un disolvente intermediario que sea miscible en la fase previa y en la nueva. Esto requerirá purgar el sistema e introducir el nuevo disolvente, lo cual tomará alrededor de 30 minutos. Si las fases son miscibles, se necesitará de un tiempo de enjuague, pero significativamente menor, de 5 a 15 minutos.

b. **Solubilidad de la muestra.** Cuando los componentes de la muestra son insolubles en la fase móvil puede ocurrir precipitación, bloqueo de la jeringa o de la válvula. Dependiendo del tipo de muestra, puede actuar como un grano de arena y rayar el sistema. Estas partículas pueden bloquear la cabeza de la columna, restringir el flujo de la fase móvil e incrementar la presión interna. La muestra debe ser soluble en la fase móvil, en el rango de concentración de trabajo.

c. **Calidad del disolvente.** La diferencia en el contenido de agua e impurezas orgánicas son los problemas más comunes. El conocer el tipo y cantidad de estabilizadores es muy importante. El uso de un disolvente con estabilizador contra uno sin él puede revertir el orden de elución de dos solutos. Todos los disolventes utilizados deben ser grado CLAR, incluyendo el agua.

d. **Agua.** La necesidad de monitorear la calidad del agua es más notoria en el caso de la cromatografía de fase reversa, donde se efectúan análisis sensibles y los contaminantes orgánicos provocan variación de la línea base.

Regularmente el agua para cromatografía se obtiene de destiladores de los laboratorios de trabajo. Uno de los problemas con este tipo de agua es la contaminación microbiológica que se genera en los contenedores. Las colonias de bacterias, mohos y levaduras bloquean los espacios intersticiales de las columnas de los sistemas de fase reversa, exclusión molecular e intercambio iónico.

c. **Preparación de la fase móvil.** La primera rutina que se debe llevar a cabo con la fase móvil es la filtración de sus constituyentes. Los solventes comerciales para CLAR pueden contener partículas. No obstante, éstas no son visibles debido al índice de refracción del disolvente, o bien, a su tamaño. Tal contaminación ocasiona varios problemas debido a la acumulación en la cabeza de la columna:

- Cambios en la velocidad de elución.
- Cambios en el factor de capacidad.
- Disminución de la selectividad.
- Picos fantasma.
- Absorción irreversible y disminución de la vida de la columna.

Es posible que las partículas se queden en el sistema de bombeo dañándolo y provocando fluctuaciones en la velocidad de flujo. Este tipo de contaminación también invade las válvulas afectando el tiempo de vida de ellas.

La forma más fácil de evitar los problemas anteriores es filtrar el disolvente. Se utilizan comúnmente filtros de ésteres de celulosa con tamaño de poro de 0.22 micras para medios acuosos, y de politetrafluoroetileno con 0.2 micras para medios orgánicos.

f. **Desgasificación.** Es importante en el caso de los disolventes acuosos y no siempre esencial con los orgánicos, sin embargo es una buena práctica de laboratorio. Si el procedimiento no se realiza, se pueden producir burbujas debido a la desgasificación en la salida del sistema. Bajo presión, la solubilidad del oxígeno y el nitrógeno aumenta. Esto causa frecuentes problemas en el detector, donde la presión baja dramáticamente hasta 100 psi o a condiciones atmosféricas, por lo que el gas se libera y forma burbujas que causan resultados erróneos y daños en el detector.³²

Una cuestión altamente importante es el grado de sofisticación de la metodología necesaria en la ejecución de un procedimiento analítico para constituyentes de productos herbolarios. Un método apropiadamente validado que utilice instrumentos ampliamente disponibles es preferible para el control de calidad diario de los fitofarmacéuticos.³³

D. Validación de métodos analíticos

El término método analítico se refiere a la forma de ejecutar un análisis. Este debe describir en detalle los pasos necesarios para desarrollar cada prueba analítica. Puede incluir, pero no se limita, a la muestra, el estándar de referencia y la preparación de reactivos, el uso

del aparato, generación de la curva de calibración, uso de fórmulas para el cálculo. En la tabla VI se muestran algunos de los métodos analíticos más utilizados.³⁴

Tabla VI. Métodos analíticos comunes.
Pruebas de identificación
Pruebas para cuantificar el contenido de impurezas
Pruebas límite de control de impurezas
Pruebas cuantitativas del grupo activo en muestras de fármacos o productos u otros componentes seleccionados del mismo.
Prueba de disolución

Se entiende por validación a la evidencia documentada establecida que provee un alto grado de aseguramiento que de un proceso específico se obtendrá consistentemente un producto con las especificaciones y atributos de calidad predeterminados.³⁵

El objetivo principal de la validación de un método analítico es demostrar que el procedimiento es adecuado para su propósito principal. Se deben utilizar, en el estudio de validación, materiales de referencia bien caracterizados, con pureza documentada.³⁶

1. Parámetros de validación de métodos analíticos

ii. **Especificidad.** Una investigación de la especificidad se debe llevar a cabo durante la validación de una prueba de identificación, la determinación de impurezas y el ensayo. Los procedimientos usados para determinar la especificidad dependerán del objetivo que se pretenda alcanzar con el método analítico.

No siempre es posible demostrar que un procedimiento analítico es específico para un analito en particular (completa discriminación). En este caso, una combinación de dos o más procedimientos analíticos es recomendada para alcanzar el nivel necesario de discriminación.

b. **Linealidad.** La relación lineal debe ser evaluada a través del intervalo del método analítico. Esta puede ser demostrada directamente con el fármaco (por dilución de una solución stock) o por pesadas separadas de mezclas sintéticas de los componentes del producto, usando el procedimiento propuesto. Este aspecto puede ser estudiado junto con la investigación del rango.

La linealidad debe ser evaluada por inspección visual de la gráfica de las señales como función de la concentración o contenido del analito. Si existe una relación lineal, los resultados de la prueba deben ser evaluados por un método estadístico apropiado, por ejemplo, por el cálculo de la regresión lineal por mínimos cuadrados. En algunos casos, para obtener la regresión lineal entre los ensayos y la concentración de la muestra, los datos deben ser sometidos a transformaciones matemáticas.

Algunos métodos analíticos, como los inmunoensayos, no demuestran linealidad después de alguna transformación. En este caso, la respuesta debe ser descrita por una función apropiada de la concentración o cantidad del analito en la muestra.

Se recomienda un mínimo de cinco concentraciones de trabajo para establecer la linealidad.

c. **Intervalo.** El intervalo especificado se deriva normalmente de los estudios de linealidad y depende del objetivo del procedimiento. Se establece para confirmar que el método analítico provee un grado aceptable de linealidad, precisión y exactitud, cuando se aplica a muestras que contengan cantidades de analito comprendidas en los extremos del método analítico.

d. **Exactitud.** Esta se debe demostrar en todo el rango especificado para el procedimiento analítico. En el caso de las pruebas de ensayo de una sustancia, existen diferentes formas de llevarse a cabo.

- > Por aplicación del método analítico a un analito de concentración conocida.
- > Por comparación de los resultados de un método analítico propuesto con los de un segundo método bien caracterizado.
- > Por inferencia cuando la precisión, linealidad y especificidad han sido establecidas.

e. **Precisión.** La validación de pruebas de ensayo y determinación cuantitativa de impurezas incluyen una investigación de la precisión.

Repetibilidad. Este parámetro puede ser evaluado usando:

- > Un mínimo de 9 determinaciones cubriendo el rango especificado para el procedimiento analítico.
- > Un mínimo de 6 determinaciones al 100 % de la concentración de prueba.

Precisión intermedia. La extensión en la cual debe establecerse la precisión intermedia, depende de las circunstancias bajo las cuales se intenta usar el procedimiento. La aplicación debe establecer los efectos de los eventos azarosos sobre la precisión del procedimiento analítico. Las variaciones típicas a estudiar incluyen los días, analistas, equipo, etc. No es necesario estudiar estos efectos individualmente. Es necesario el uso de un diseño experimental.

Reproducibilidad. La reproducibilidad se evalúa por medio de un estudio de prueba. La reproducibilidad debe ser considerada en el caso de la estandarización de un método analítico, por ejemplo, para inclusión de procedimientos en farmacopeas.

f. Límite de detección. Existen varias opciones para determinar el límite de detección, dependiendo de si el procedimiento es o no instrumental. Algunas son las siguientes.

Basado en una evaluación visual. El límite de detección está determinado por el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito y por el establecimiento de los niveles mínimos a los cuales el analito puede ser detectado confiablemente.

Basado en la relación de la señal con respecto al ruido. Se puede aplicar solamente a procedimientos analíticos que exhiben ruido en la línea base. La determinación de la relación de la señal de ruido se ejecuta por comparación de las señales medidas de las muestras con concentraciones bajas conocidas de analito con los blancos y estableciendo la concentración mínima a la cual el analito puede ser detectado confiablemente. Una relación de señal de ruido entre 3 o 2:1 es generalmente considerada aceptable para estimar el límite de detección.

Basado en la desviación estándar de la respuesta y de la pendiente.

El límite de detección (LD) puede ser expresado como sigue:

$$LD = \frac{3.3\sigma}{m}$$

donde: σ = la desviación estándar de la respuesta
 m = la pendiente de la curva de calibración

La pendiente m puede ser estimada a partir de la curva de calibración del analito. La estimación de la desviación estándar puede ser llevada a cabo por una variedad de formas, por ejemplo:

- > Basada en la desviación estándar del blanco. La medida de la magnitud de la variación de la respuesta se efectúa por el análisis de un número apropiado de muestras blanco y calculando la desviación estándar de estas respuestas.
- > Basada en la curva de calibración. Debe estudiarse una curva de calibración específica usando muestras que contengan al analito en el rango del LD. La desviación estándar de la línea de regresión o la desviación estándar del intercepto puede ser usada como la desviación estándar del LD.

g. Límite de cuantificación. Al igual que con el límite de detección existen diferentes formas para su cálculo.

Basado en una evaluación visual. El límite de cuantificación es generalmente determinado por el análisis de las muestras con concentraciones conocidas de analito y por establecimiento del nivel mínimo al cual el analito puede ser cuantificado con precisión y exactitud aceptables.

Basado en la relación de la señal con respecto al ruido. Se puede aplicar sóicamente a procedimientos analíticos que exhiben ruido en la línea base. La determinación de la relación de la señal de ruido se ejecuta por comparación de las señales medidas de las muestras con concentraciones bajas conocidas de analito con los blancos y estableciendo la concentración mínima a la cual el analito puede ser detectado con fiabilidad. Una relación de señal de ruido típica es de 10:1

Basado en la desviación estándar de la respuesta y de la pendiente.

El límite de cuantificación (LQ) puede ser expresado como sigue:

$$LQ = \frac{10\sigma}{m}$$

donde: σ = la desviación estándar de la respuesta
 m = la pendiente de la curva de calibración

La pendiente m puede ser estimada de la curva de calibración del analito. La estimación de la desviación estándar puede ser llevada a cabo por una variedad de formas, por ejemplo:

- > Basada en la desviación estándar del blanco. La medida de la magnitud de la variación de la respuesta se efectúa por el análisis de un número apropiado de muestras blanco y calculando la desviación estándar de estas respuestas.
- > Basada en la curva de calibración. Debe estudiarse una curva de calibración específica usando muestras que contengan al analito en el rango del LQ. La desviación estándar de la línea de regresión o la desviación estándar del intercepto puede ser usada como la desviación estándar del LQ.

h. Robustez. La evaluación de la robustez debe ser considerada durante la fase de desarrollo y depende del tipo de procedimiento bajo estudio. Ésta muestra la confiabilidad de un análisis con respecto a variaciones deliberadas de los parámetros del método.

Si las mediciones son susceptibles de variación en condiciones analíticas, éstas deben ser controladas convenientemente o se deben incluir las precauciones en el procedimiento. Una consecuencia de la evaluación de la robustez debe ser que se establecen una serie de parámetros para asegurar que la validez del método es mantenida en cualquier modo que se use.

Algunos ejemplos de variaciones típicas son:

- Estabilidad de soluciones analíticas.
- Tiempo de extracción.

En el caso de la cromatografía de líquidos, las variaciones típicas son:

- Influencia de las variaciones del pH de la fase móvil.
- Influencia de las variaciones de la composición de la fase móvil.
- Columnas diferentes (lotes o proveedores).
- Temperatura.
- Velocidad de flujo.

En el caso de la cromatografía de gases, los ejemplos de variaciones típicas son:

- Columnas diferentes (lotes o proveedores).
- Temperatura.
- Velocidad de flujo.

i. Adecuación del sistema (System suitability). Esta prueba es una parte integral de muchos procedimientos analíticos. Está basada en el concepto de que el equipo, operaciones analíticas y muestras a ser analizadas, constituyen un sistema integral que puede ser evaluado como tal. Los parámetros a ser validados para un procedimiento en particular, dependen del tipo de éste.³⁵

En el caso de los métodos cromatográficos, los parámetros a ser evaluados son los siguientes:

Factor de capacidad (k'). Es una medida de dónde se localiza el pico del compuesto de interés (t_R), con respecto al tiempo de elución de los componentes no retenidos (t_0).

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

Precisión o repetibilidad de la inyección (DER). La precisión de la inyección está expresada como DER (desviación estándar relativa) indica la ejecución del cromatograma, que incluye el bombeo, la columna y las condiciones ambientales, en el tiempo que las muestras son analizadas. Debe recalcar que las variaciones en la preparación de muestra y la manufactura no están consideradas. Es deseable una DER $\leq 1\%$ para $n \geq 5$.

Retención relativa (α). La retención relativa es una medida de la localización relativa de dos picos. No es un parámetro menos esencial entre más alta sea la resolución (R_s).

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

Resolución (R_s). Es una medida de qué tan bien están separados dos picos. Para una cuantificación confiable, son esenciales picos bien separados. Este es un parámetro muy usado si se considera un potencial de interferencia en un pico. Se debe elegir el pico potencial más cercano al del analito.

$$R_s = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{(W_1 + W_2)}$$

En la fórmula se requiere el tiempo de retención (t_R) y el ancho del pico (W) del componente que eluye en primer lugar (1) y del componente que eluye después (2).

Factor de coileo (T). La exactitud de la cuantificación decrece con el incremento de la cola del pico, debido a las dificultades encontradas por el integrador en la determinación de donde y cuando termina el pico y entonces el cálculo del área bajo el mismo.

$$T = \frac{w_s}{2f}$$

Donde f se refiere a la altura del pico y W al ancho del mismo.

Número de platos teóricos (N). Es una medida de la eficiencia de la columna, que es, cuántos picos pueden ser localizados por unidad de tiempo de la corrida de un cromatograma.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 = \frac{L}{H}$$

N, es equivalente a una constante para cada pico de un cromatograma con una serie de condiciones de operación compuestas. H, o HETP por sus siglas en inglés, la altura equivalente a un plato teórico, mide la eficiencia de la columna por unidad de longitud (L) de la columna. Los parámetros que pueden afectar N o H incluyen la posición del pico, el tamaño de partícula de la columna, la velocidad de flujo de la fase móvil, la temperatura de la columna, la viscosidad de la fase móvil y el peso molecular del analito.

j. Recobro. Está expresado como la cantidad o peso del compuesto analizado como un porcentaje de la cantidad teórica presente en el medio. En general, el procedimiento de preparación de muestra más simple resultará en una menor variación del recobro.

k. Estabilidad de la solución de la muestra. La estabilidad de la preparación de la solución de la muestra después de la preparación de acuerdo al método debe ser evaluada con el método. Esto concierne a fármacos que pueden sufrir degradación por hidrólisis, fotólisis o adhesión al material de vidrio.³⁰

En la tabla VII se presentan los parámetros a evaluar dependiendo del tipo de procedimiento analítico que se trate.³⁴

Parámetro	Identificación	Tipo de método		Ensayo: disolución, contenido: potencia
		Prueba de impurezas	Límite	
		Cuantificación	Límite	
Exactitud	-	+	-	+
Precisión	Repetibilidad	-	-	+
	Precisión intermedia	-	-	+
		-	-	+
Especificidad	+	+	+	+
Límite de detección	-	+	+	-
Límite de cuantificación	-	+	-	-
Linealidad	-	+	-	+
Rango	-	+	-	+

2. Validación de un método analítico para prueba de disolución.

De acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, la validación del método analítico se justifica en virtud de que, al realizar las pruebas de perfil de disolución, se deben cuantificar concentraciones menores que el valor de Q, además de que hay que evaluar que no haya interferencias debido a los aditivos. Por lo tanto:

- La validación del método para perfil de disolución comienza a partir de la filtración.
- La validación del método analítico debe realizarse con una muestra pulverizada homogénea y representativa del producto. Esta misma muestra debe utilizarse durante toda la validación del método.¹

Los parámetros de la validación del sistema son:

a. **Linealidad.** Se debe demostrar una linealidad del sistema con al menos cinco puntos (excepto el cero) por duplicado, con un coeficiente de regresión mayor o igual que 0.99 y un error relativo debido a la regresión no mayor que el 2%.

b. **Precisión.** De los datos de linealidad se debe demostrar que el coeficiente de variación del factor de respuesta no debe ser mayor que el 2%.

Los parámetros de validación del método son:

a. **Linealidad.** El método debe demostrar una linealidad con al menos 5 puntos (que incluya puntos extremos excepto el cero) por triplicado, con un coeficiente de regresión mayor o igual que 0.99 y un error relativo debido a la regresión no mayor que el 3%.

b. **Exactitud.** El promedio del porcentaje de la recuperación de los datos de linealidad no debe variar con respecto a la cantidad nominal en más de 3% en cada punto.

c. **Precisión.**

Repetibilidad. El coeficiente de variación del porcentaje de recuperación de los datos de linealidad no debe ser mayor que el 3%.

Reproducibilidad. Evaluar el efecto de los eventos aleatorios en la precisión del método analítico, tales como los días, los analistas o los equipos. El coeficiente de variación global no debe ser mayor que el 3%.

Facultad de Ciencias Químicas y Biomédicas, UNAM

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

d. Estabilidad de la muestra. Se refiere a la estabilidad de la solución preparada para su análisis. Determinar las condiciones de temperatura y tiempo, entre otros, en las que el compuesto permanezca estable.

e. Selectividad. Se debe demostrar la selectividad del método para el fármaco ante otros componentes de la muestra, cualquier interferencia no debe producir un error mayor al aceptado en precisión y exactitud.³⁷

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, las plantas medicinales son explotadas, como fuente de fitofármacos para las formulaciones farmacéuticas; también se dispensan de manera común en el mercado, sin embargo, requieren de garantías de seguridad y eficacia para ser integradas como parte de la terapia convencional.

Dichas garantías están constituidas por estudios farmacocinéticos, biofarmacéuticos y de control de calidad del o de los principios activos de las plantas, así como de la forma farmacéutica en que se presente. Esto garantiza que el principio activo se encuentre en la cantidad suficiente para que desencadene el efecto terapéutico y reduzca al mínimo el riesgo de reacciones adversas o toxicidad.

Dentro de los fitomedicamentos que se expenden en México, están aquellos que contienen β -escina, como son el Reparil®, Venostasin® y Flebocaps®, utilizados en el tratamiento de la obstrucción venosa crónica o varices. Existen reportados varios estudios acerca de este fitofármaco, no obstante, no los hay de su disolución intrínseca, propiedad particular para cada sustancia y que constituiría parte de las pruebas de control necesarias para asegurar que el fitofármaco cumpla con especificaciones que garanticen la calidad del medicamento.

Uno de los requisitos para realizar la prueba de disolución intrínseca, es contar con un método analítico de cuantificación de β -escina validado, por lo que este proyecto se encuentra orientado al desarrollo del método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución, así como a la validación del mismo, el cual será utilizado en el laboratorio de Farmacia Industrial de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

III. OBJETIVO

- Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de β -escina en solución acuosa.

IV. HIPÓTESIS

El manejo correcto de los parámetros cromatográficos permitirá contar con un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución, que cumpla con los parámetros de validación para cuantificar la β -escina.

Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Tucumán

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V. DESARROLLO DE LA INVESTIGACION

A. Materiales

1. Reactivos

- Agua desionizada
- Acetato de sodio trihidratado, lote 3460, J. T. Baker.
- Acetonitrilo grado HPLC, J. T. Baker.
- Metanol grado HPLC, Burdick and Jackson.
- Ácido acético glacial, lote A 1240, Técnica química.
- β -escina, Lote 109H0964, Sigma Aldrich.
- Fosfato monobásico de potasio, lote 3246-32, J. T. Baker.
- Fosfato dibásico de potasio, lote 3252-20, J. T. Baker.

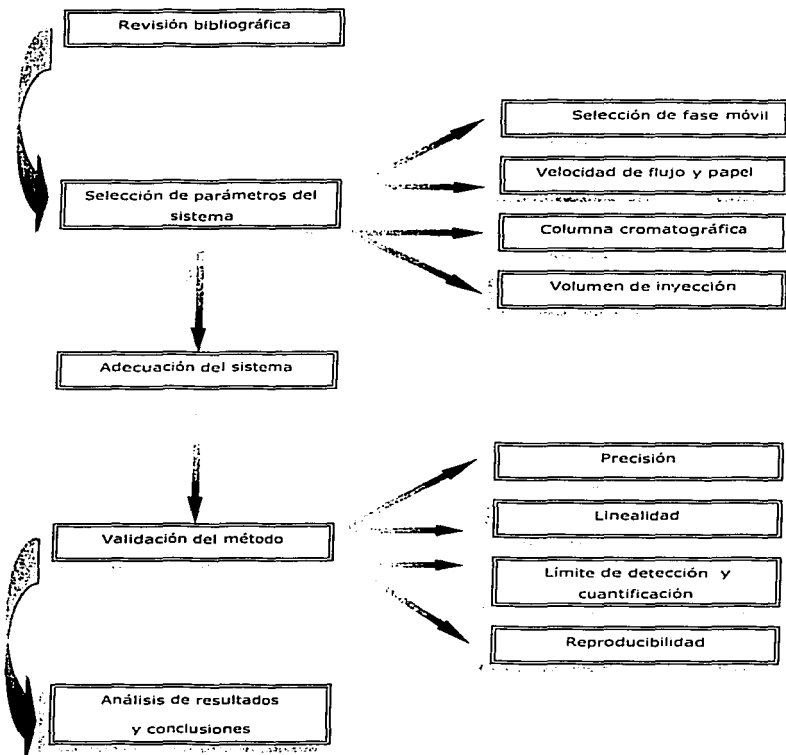
2. Material

- Matraz kitazato de 1000 mL
- Probetas graduadas de 1000, 500, 200 y 100 mL
- Tapón de hule
- Manguera de hule
- Vasos de precipitados de 100 mL
- Matraces aforados de 10 mL
- Pipetas graduadas de 1 mL
- Bureta de 10 mL

3. Equipo

- **Cromatografo de líquidos**
 - Integrador: Waters 742, Millipore.
 - Inyector: Waters 712, Wisp.
 - Detector: Spectroflow 783, ABI Analytical Kratos Division.
 - Bomba: Liquid chromatograph 655A-11, Hitachi.
 - Gas: Nitrogeno ONU1066.
 - Columna 1: Symmetry @ C₁₈ 3.5 μm; 4.6 x 75 mm. Waters.
 - Columna 2: Spherisorb @ S5 ODS2 5μm, 4.6 x 250 mm, Waters.
- **Microbalanza: METTLER Toledo PM400.**
- **Equipo de filtración: Gelman Laboratoy Pall. Membrana de 0.45 μm, lote 11367.**
- **Parrilla de agitación: Barnstead/thermolyne, modelo No. HP46825.**
- **Potenciómetro: Cole-Parmer, pH/mV/°Cmeter.**
- **Barra magnética: una pulgada.**

B. Diagrama de bloques



C. Metodología

La metodología que se siguió durante el desarrollo del proyecto, fue la siguiente:

1. Selección de longitud de onda, se realizó bajo los siguientes parámetros cromatográficos: columna Symmetry® 15 x 4.6 cm, volumen de inyección 10 μ L, velocidad de flujo 1 mL/min, velocidad del papel 0.5 cm/min, atenuación 256. La fase móvil empleada fue metanol-amortiguador de acetatos 0.01M, 80:20. La concentración de la solución de β -escina fue de 0.1 mg/mL. La longitudes a probar fueron: 205, 210 y 254 nm.
2. Selección de la fase móvil, la composición de las fases estudiadas se presenta a continuación.

Acetonitrilo	Amortiguador de acetatos (0.01 M)
60	40
70	30
75	25

Metanol	Amortiguador de acetatos (0.01 M)
60	40
65	35
70	30
80	20

El diseño experimental tiene como objetivo la obtención de cromatogramas con picos más separados en el menor tiempo de retención.

Preparación de amortiguador de acetatos 0.01 M. Se pesaron 0.0266 g de acetato de sodio, se disolvieron en 200 mL de agua desionizada. Se adicionan 0.6 mL de ácido acético glacial y se llevaron a 1000 mL. Se ajusto el pH a 3.0 con ácido acético. Se filtró a través de membrana de 0.45 μ m.

La preparación del estándar, se llevo a cabo a partir de 1 mg de escina aforado a 10 mL con la fase móvil en estudio.

3. Adecuación del sistema. Este se llevó a cabo utilizando la columna Symmetry®, con una velocidad de flujo de 1.8 mL/min, volumen de inyección de 3 μ L, longitud de onda de 254 nm, tiempo de corrida 5 minutos, rango de 0.100.

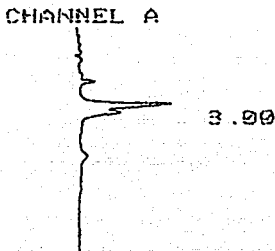
4. A partir de esto se eligió el mejor método para la cuantificación, con base en los parámetros:

- Preparación del amortiguador de fosfatos 0.01 M. Se pesaron 0.0062 g de fosfato de potasio monobásico y 0.0038 g de fosfato dibásico de potasio, se disolvieron en 250 mL de agua desionizada, se llevaron a 1000 mL. Se ajustó el pH a 7.0 con hidróxido de sodio al 50%.
- Preparación de la fase móvil. Se miden 300 mL de amortiguador de acetatos y se aforo a 1000 mL con metanol HPLC. Se desgasifico con agitación y vacío, durante 15 minutos.
- Preparación de la curva estándar. Se pesaron 12.5 μg de escina estándar, se disolvieron en 15 mL de amortiguador de fosfatos. Se adicionaron 0.5 mL de fase móvil y se aforo a 25 mL. Se tomaron 0.8, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 mL, se aforo con fase móvil a 10 mL, respectivamente.
- Parámetros del sistema cromatográfico: Velocidad del papel 0.25, velocidad de flujo 1 mL/min, atenuación 256, umbral de pico 100-200, volumen de inyección 10 μL , tiempo de corrida 12 minutos, longitud de onda 210 nm, rango 0.100, presión de la bomba 140 kg/cm², fase móvil metanol-amortiguador de acetatos pH 3, 70:30, columna Symmetry ω , 4.6 x 75 mm, partícula de 3.5 μm de diámetro.
- Linealidad de método y sistema. Se determinó a partir de seis curvas de calibración preparadas pesando 12.5 mg de escina estándar, que se disolvieron en 15 mL de amortiguador de fosfatos pH 7, se adicionó 0.5 mL de fase móvil y se aforo a 25 mL. Se tomaron 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 mL, aforándose a 10 mL, obteniéndose las siguientes concentraciones: 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de β -escina, respectivamente.
- Precisión de método (repetibilidad y reproducibilidad) y sistema. Cada uno de los puntos de la curva de calibración se preparó por sextuplicado, de forma independiente, con estos resultados se calculó el coeficiente de variación.
- Exactitud de método y del sistema, límite de detección y cuantificación. Se calcularon a partir de la curva de calibración.

VI. RESULTADOS

A. Selección de la longitud de onda

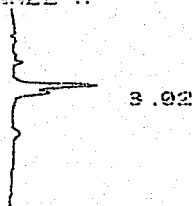
En este apartado se presentan los cromatogramas correspondientes a la selección de la longitud de onda.



PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	100.	3.	248973 01
TOTAL	100.		248973

Cromatograma 1. Selección de longitud de onda, 205 nm.


CHANNEL A



PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	100.	3.02	237580 01
TOTAL	100.		237580

Cromatograma 2. Selección de longitud de onda, 210 nm.

CHANNEL A

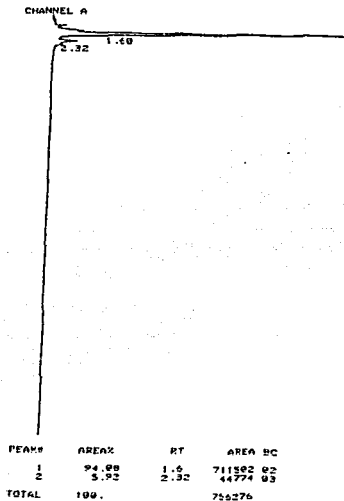


NO DATA, CHANNEL A

Cromatogram 3. Selección de longitud de onda. 254 nm.

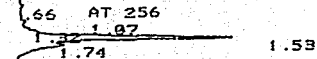
B. Selección de la fase móvil

A continuación se presentan los cromatogramas correspondientes a la selección de la fase móvil. Los parámetros del equipo son: velocidad del papel 0.5, atenuación 256, umbral del pico 150-200, volumen de inyección 10 μ L, longitud de onda 210 nm, rango 0.500, velocidad de flujo 1 mL/min.



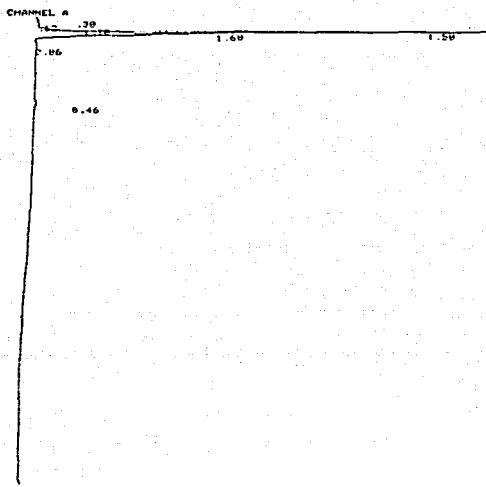
Cromatograma 4. Fase móvil acetanitrilo-amortiguador 60:40, columna Symmetry® 4.6 x 75 mm.

CHANNEL A



PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.437	0.66	5524	01
2	1.012	1.07	22925	02
3	1.831	1.32	23157	02
4	73.995	1.53	936293	02
5	21.926	1.74	277433	03
TOTAL	100.		1265342	

Cromatograma 5. Fase móvil acetronitrilo-amortiguador 70-30, columna Symmetry 30 4.6 x 75 mm



PEAK#	AREA#	RT	AREA %
1	0.242	0.2	3244.02
2	0.177	0.62	2376.03
3	1.277	7.1	17102.02
4	62.271	1.35	82396.3
5	33.074	1.69	422726.03
6	0.969	2.75	12761.01
7	1.255	0.45	16022.01
TOTAL	100		1339046

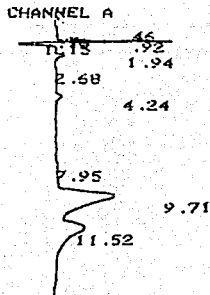
Crromatograma 6. Fase móvil acetoniitrilo-amonioglicol 75:25, columna Symmetry-B 4.6 x 75 mm

CHANNEL A
2.92

PEAK#	AREA%	RT	AREA BC
1	100.	2.92	851000 01
TOTAL	100.		851000

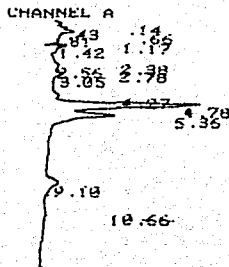
Cromatograma 7. Fase móvil acetanitrilo-amortiguador 70:30, columna Spherisorb 4 6 x 250 mm

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



FILE	2.	METHOD	0.	RUN	4	INDEX	4
PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC			
1	0.061	0.46	2202	01			
2	1.112	0.76	40321	02			
3	3.666	0.92	132907	02			
4	10.903	1.15	395234	03			
5	1.158	1.94	41980	01			
6	1.144	2.68	41454	02			
7	1.591	4.24	61291	03			
8	2.799	7.95	101452	02			
9	47.844	9.71	1734801	02			
10	29.622	11.52	1073771	03			
TOTAL	100.		3624913				

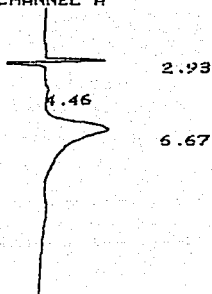
Crromatograma 8. Fase móvil metanol-amortiguador 70:30, columna Symmetry® 8-4.6 x 75 mm



PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.68	0.43	5144	02
2	1.671	0.43	12645	02
3	2.781	0.66	21044	02
4	0.164	0.81	1244	03
5	1.479	1.17	11188	02
6	2.807	1.42	21235	03
7	0.829	2.38	6275	02
8	1.81	2.56	13696	02
9	0.716	2.78	5420	02
10	2.181	3.05	16498	03
11	1.754	4.27	13270	02
12	50.498	4.78	381372	02
13	24.586	5.36	186008	03
14	7.575	9.1	57313	01
15	0.558	10.66	4221	01
TOTAL	100.		756578	

Chromatograma 9 Fase móvil metanol-amortiguador 80:20, columna Symmetry®R, 4.6 x 75 mm

CHANNEL A

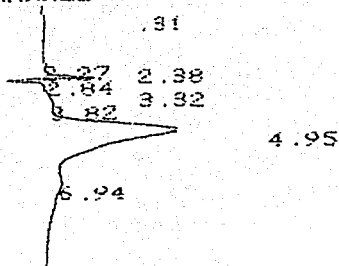


PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	11.654	2.93	394628	01
2	0.817	4.46	27677	01
3	87.528	6.67	2963797	01
TOTAL	100.		3386102	

Cromatograma 10. Fase móvil metanol-amortiguador 70:30, columna Spherisorb®; 4.6 x 250 mm

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CHANNEL A

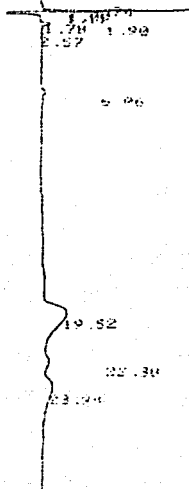


PEAK#	AREA%	RT	AREA	BC
1	0.011	0.31	838	01
2	0.602	2.27	43860	02
3	1.461	2.38	106514	02
4	5.14	2.84	374636	02
5	3.582	3.32	261067	02
6	6.327	3.82	684859	02
7	50.156	4.95	4211356	02
8	20.65	6.94	1504958	02
TOTAL	100		7288088	

Chromatogram 11 Fase móvil metanol-amoniaco 80:20, columna Spherisorb K 2.6 x 250 mm

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CHANNEL A



PEAK#	AREA	RI	AREA UC
1	0.202	0.74	5227 01
2	1.099	1.11	46160 00
3	15.667	1.11	452390 00
4	13.379	1.79	457440 00
5	4.714	1.79	134380 00
6	9.154	2.02	3456 01
7	1.045	2.02	2670 01
8	12.094	2.02	11412 0 00
9	5.041	2.02	103940 00
10	14.060	2.179	47423 00
Total	100		47423 00

Cromatograma 12. Fase móvil metanol-amortiguador 65:35, columna Symmetry® 4.6 x 75 mm

En la tabla VIII, se muestra una comparación del tiempo de retención y factor de resolución de los picos 1 y 2, usando la columna Symmetry® 4.6 x 75 mm. La fórmula usada para el cálculo de la resolución fue:

$$R_s = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{(W_1 + W_2)}$$

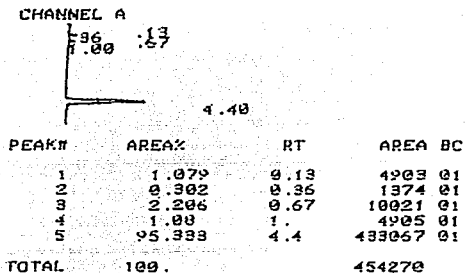
Tabla VIII. Resolución y tiempo de retención, columna Symmetry®			
Composición de la fase móvil	Tiempo de retención		Resolución
	Pico 1	Pico 2	
Cromatograma 1. Acetonitrilo:acetato 60:40	1.60	2.32	0.4
Cromatograma 2. Acetonitrilo:acetato 70:30	1.32	1.53	0.2
Cromatograma 3. Acetonitrilo:acetato 75:25	1.50	1.68	0.1
Cromatograma 5. Metanol:acetato 70:30	9.71	11.52	2.0
Cromatograma 6. Metanol:acetato 80:20	4.78	5.36	1.1
Cromatograma 9. Metanol:acetato 65:35	19.52	22.38	2.0

En la tabla IX se muestra una comparación del tiempo de retención de los picos 1 y 2, usando la columna Spherisorb® 4.6 x 250 mm.

Tabla IX. Tiempo de retención, columna Spherisorb®		
Composición de a fase móvil	Tiempo de retención	
	Pico 1	Pico 2
Cromatograma 4. Acetonitrilo:acetato 70:30	2.92	-
Cromatograma 7. Metanol:acetato 70:30	6.67	-
Cromatograma 8. Metanol:acetato 80:20	4.95	-

C. Adecuación del sistema

El cromatograma 10 corresponde al estándar de acenafteno, con el que se determinó la adecuación del sistema cromatográfico. Velocidad de flujo 1.8 mL/min, volumen de inyección 3 μ L, longitud de onda 254 nm, tiempo de corrida 5 minutos, rango 0.100.



Cromatograma 13. Acenafteno estándar, fase móvil acetoniitrilo-agua 60:40, columna symmetry[®] 30 4.6 x 75 mm

En la tabla X, se muestra el cálculo de la determinación del factor de capacidad para el pico de acenafteno. La fórmula para el cálculo fue:

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

Tabla X. Factor de capacidad			
Cromatograma	t_R (min)	t_0 (min)	K
1	4.40	0.12	35.67
2	4.32	0.19	21.74
3	4.37	0.16	26.31
4	4.40	0.13	32.85
5	4.40	0.14	30.43
Promedio del factor de capacidad			29.40
Precisión de la inyección			0.7978

En la tabla XI, se muestra el cálculo de la determinación del factor de coileo para el pico de acenafteno. La fórmula para el cálculo fue:

$$T = \frac{W_s}{2f}$$

Tabla XI. Factor de coileo			
Cromatograma	W (cm)	f (cm)	T
1	0.90	15.6	0.0288
2	1.00	15.2	0.0329
3	0.90	15.5	0.0290
4	1.00	15.8	0.0316
5	1.00	15.5	0.0323
Promedio			0.0309

En la tabla XII, se muestra el cálculo del número de platos teóricos del pico de acafeneno. La fórmula para el cálculo fue:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 = \frac{L}{H}$$

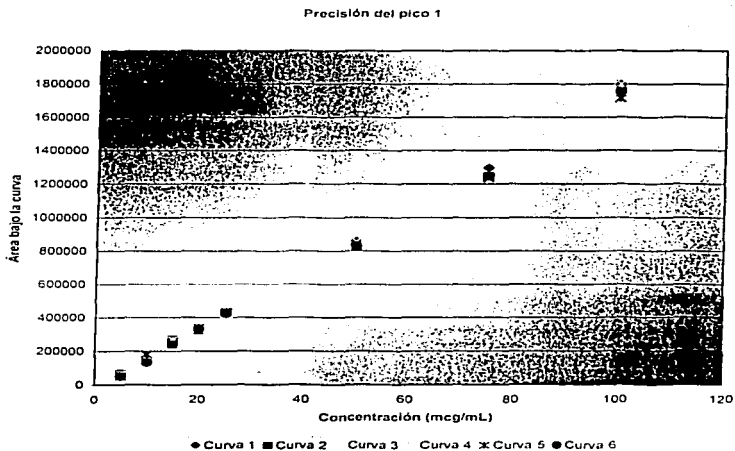
Cromatograma	tR	W _{1/2}	N
1	4.4	0.0180	956049
2	4.3	0.0200	746496
3	4.4	0.0180	943057
4	4.4	0.0200	774400
5	4.4	0.0200	774400
Promedio			838880

D. Precisión de método y sistema

En la tabla XIII, se presentan los datos de precisión de método y sistema para el pico 1.

Concentración µg/ml.	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	% CV
5	53334	66755	61349	65245	50033	50688	11.8
10	147496	137979	135233	146694	181537	132108	11.2
15	269287	271061	259215	269048	243063	239805	4.9
20	333029	325043	336758	331008	341385	332202	1.5
25	433089	434285	433457	432755	432492	424773	0.7
50	860835	827654	837192	857133	823218	829216	1.7
75	1296602	1236789	1248573	1223003	1246260	1248046	1.8
100	1799107	1766460	1771396	1800145	1711833	1752623	1.7

En la gráfica 1, se presenta la dispersión de los datos de precisión de método y sistema del pico 1.

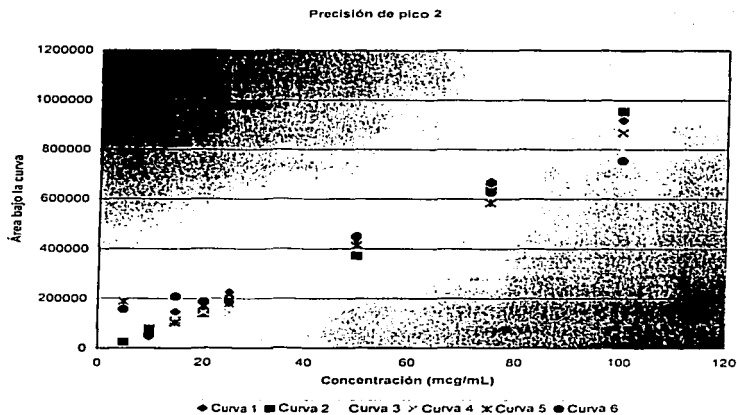


Gráfica 1. Datos de precisión de sistema y método del pico 1

En la tabla XIV, se presentan los datos de precisión de método y sistema para el pico 2.

Tabla XIV. Datos de precisión para el pico 2							
Concentración $\mu\text{g/ml}$.	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	% CV
5	24276	24276	196461	195329	187481	157016	58.4
10	47814	75284	54661	46424	81374	51286	23.0
15	147064	112083	120947	106929	103613	208121	27.4
20	157865	137922	193261	145119	168006	185983	12.2
25	225581	198636	192582	142970	180287	186297	13.1
50	424638	371393	331040	418628	414387	449346	9.7
75	670889	649980	627460	642872	584736	627126	4.2
100	918200	953742	794172	867984	956828	754511	8.8

En la gráfica 2, se presenta la dispersión de los datos de precisión de sistema y método del pico 2.

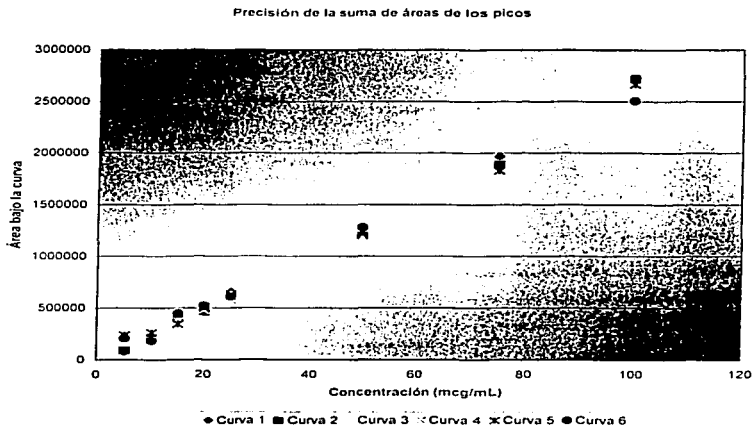


Gráfica 2 Datos de precisión de sistema y método del pico 2

En la tabla XV, se presentan los datos de precisión de método y sistema para la suma de las áreas del pico 1 y 2.

Tabla XV. Datos de precisión para la suma de las áreas							
Concentración $\mu\text{g/ml}$.	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	% CV
5	77610	91031	257810	260574	237514	207704	40.2
10	195310	213263	189894	193118	262911	183394	13.0
15	416351	383144	380162	375977	346676	447926	8.2
20	490894	462965	530019	476127	509391	518185	4.7
25	658670	632921	626039	575725	612779	611070	4.1
50	1285473	1199047	1168232	1275761	1237605	1278562	3.6
75	1967491	1886769	1876033	1865875	1830996	1875172	2.2
100	2717307	2720202	2565568	2668129	2668661	2507134	3.0

En la gráfica 3, se presentan la dispersión de los datos de precisión de sistema y método de la suma de áreas de los picos 1 y 2.



Gráfica 3. Datos de precisión de método y sistema para la suma del área del pico 1 y 2.

E. Linealidad de método y sistema

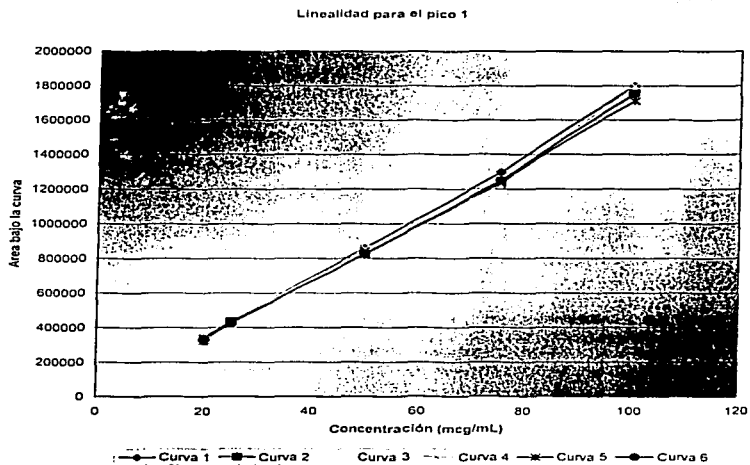
En la tabla XVI, se presenta el cálculo de los coeficientes de determinación y correlación para las áreas del pico 1.

Tabla XVI. Datos de linealidad para el pico 1						
Concentración $\mu\text{g/mL}$	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6
20	333029	325043	336758	331008	341385	332202
25	433089	434285	433457	432755	432492	424773
50	860835	827654	837192	857133	823218	829216
75	1296602	1236789	1248573	1223003	1246260	1248046
100	1799107	1766460	1771396	1800145	1711833	1752623
Pendiente	18087.9	17565.3	17578.9	17780.5	16952.4	17483.5
Ordenada al origen	-32217	-30480	-23784	-31340	-4404	-26735
r	0.9995	0.9982	0.9985	0.9967	0.9994	0.9990
r ²	0.9989	0.9963	0.9970	0.9934	0.9989	0.9979

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, C.U.S.A.M.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

En la gráfica 4, se presentan los datos de linealidad del pico 1.

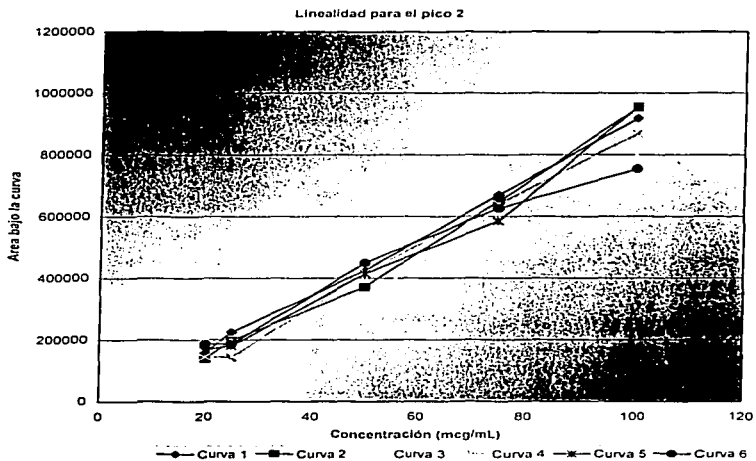


Gráfica 4. Datos de linealidad del pico 1.

En la tabla XVII, se presenta el cálculo de los coeficientes de determinación y correlación para las áreas del pico 2.

Tabla XVII. Datos de linealidad para el pico 2						
Concentración µg/mL	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6
20	157865	137922	193261	145119	168006	185983
25	225581	198636	192582	142970	180287	186297
50	424638	371393	331040	418628	414387	449346
75	670889	649980	627460	642872	584736	627126
100	918200	953742	794172	867984	956828	754311
Pendiente	9347.5	9975.1	7927.5	9337.6	9561.4	7517.2
Ordenada al origen	-25330	-76322	-382	-60716	-55465	34722
r	0.9991	0.9945	0.9887	0.9982	0.9880	0.9911
r ²	0.9982	0.9891	0.9776	0.9964	0.9762	0.9823

En la gráfica 5, se presentan los datos de linealidad del pico 2.

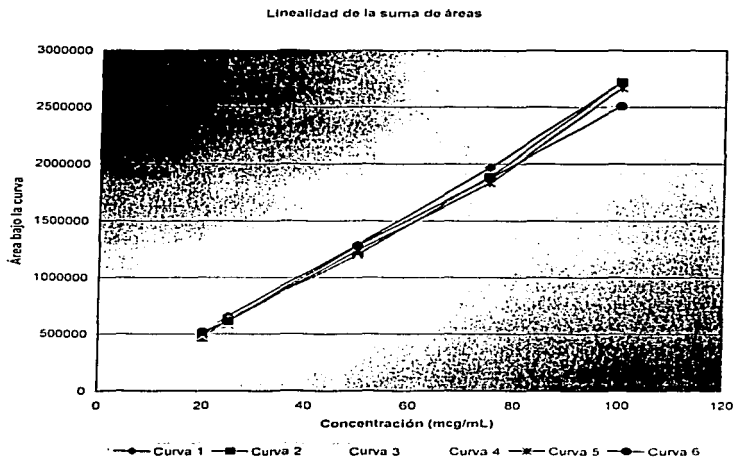


Gráfica 5. Datos de linealidad del pico 2.

En la tabla XVIII, se presenta el cálculo de los coeficientes de correlación y determinación de la suma de áreas de los picos 1 y 2.

Tabla XVIII. Linealidad de la suma de áreas						
Concentración $\mu\text{g/mL}$	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6
20	490894	462965	530019	476127	509391	518185
25	658670	632921	626039	575725	612779	611070
50	1285473	1199047	1168232	1275761	1237605	1278562
75	1967491	1886769	1876033	1865875	1830996	1875172
100	2717307	2720202	2565568	2668129	2668661	2507134
Pendiente	27435.4	27540.4	25506.4	27118.1	26514.0	25000.7
Ordenada al origen	-57544	-106802	-24166	-92056	-59870	-7987
r	0.9994	0.9973	0.9982	0.9987	0.9972	0.9998
r ²	0.9989	0.9947	0.9964	0.9973	0.9945	0.9996

En la gráfica 6, se presentan los datos de linealidad de la suma de áreas de los picos 1 y 2



Gráfica 6. Datos de linealidad de la suma de áreas de los picos 1 y 2

F. Reproducibilidad

En la tabla XIX, se presentan los datos correspondientes a la precisión de los analistas 1 y 2, para los picos 1, 2 y la sumatoria de la respuesta de los mismos. La concentración considerada fue de 20 µg/mL. Las condiciones cromatográficas utilizadas corresponden a las reportadas en el método analítico.

Tabla XIX. Reproducibilidad						
Analista 1			Analista 2			
Area bajo la curva			Area bajo la curva			
Pico 1	Pico 2	Suma	Pico 1	Pico 2	Suma	
433089	225581	658670	415831	216067	631898	
434285	198636	632921	420937	263731	684668	
433457	192582	626039	420712	215022	635734	
432755	142970	575725	413326	204440	617766	
432492	180287	612779	420951	215112	636063	
424773	186297	611070	415395	214188	629583	
%CV	0.7	13.1	4.1	0.7	8.7	3.3

En la tabla XX, se muestra los datos globales de la reproducibilidad del método analítico.

Tabla XX. Reproducibilidad	
	%CV
Pico 1	1.9
Pico 2	14.2
Suma	4.2

G. Límite de detección y cuantificación

En la tabla XXI, se presenta el cálculo para el límite de detección y cuantificación del pico 1.

Tabla XXI. Límite de detección y cuantificación del pico 1

Concentración $\mu\text{g/mL}$	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	%CV
5	53334	66755	61349	65245	50033	50688	13
10	147496	137979	135233	146694	181537	132108	12
15	269287	271061	259215	269048	243063	239805	5
20	333029	325043	336758	331008	341385	332202	2
25	433089	434285	433457	432755	432492	424773	1
50	860835	827654	837192	857133	823218	829216	2
75	1296602	1236789	1248573	1223003	1246260	1248046	2
100	1799107	1766460	1771396	1800145	1711833	1752623	2

En la tabla XXII, se presentan los datos de la determinación del límite de detección y cuantificación para el pico 2.

Tabla XXII. Límite de detección y cuantificación para el pico 2

Concentración $\mu\text{g/mL}$	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	%CV
5	24276	24276	196461	195329	187481	157016	64
10	47814	75284	54661	46424	81374	51286	25
15	147064	112083	120947	106929	103613	208121	30
20	157865	137922	193261	145119	168006	185983	13
25	225581	198636	192582	142970	180287	186297	14
50	424638	371393	331040	418628	414387	449346	11
75	670889	649980	627460	642872	584736	627126	5
100	918200	953742	794172	867984	956828	754511	10

En la tabla XXIII, se presentan los datos de la determinación del límite de detección y cuantificación para la suma de áreas de los picos 1 y 2.

Concentración $\mu\text{g/mL}$	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	$\%CV$
5	77610	91031	257810	260574	237514	207704	44
10	195310	213263	189894	193118	262911	183394	14
15	416351	383144	380162	375977	346676	447926	9
20	490894	462965	530019	476127	509391	518185	5
25	658670	632921	626039	575725	612779	611070	4
50	1285473	1199047	1168232	1275761	1237605	1278562	4
75	1967491	1886769	1876033	1865875	1830996	1875172	2
100	2717307	2720202	2565568	2668129	2668661	2507134	3

H. Estabilidad de la muestra

En la tabla XXIV, se presentan los datos de la estabilidad de una muestra de 100 $\mu\text{g/mL}$ de β -escina, que fue almacenada junto al cromatógrafo durante el estudio.

Día	Área bajo la curva		Diferencia relativa (%)	
	Pico 1	Pico 2	Pico 1	Pico 2
0	1947853	919655		
1	1890364	1099104	3.0	19.5
7	2277820	1085440	20.5	1.2
9	2014394	721686	11.6	33.5
24	1712909	198149	15.0	72.5

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la tabla XXV, se presentan los datos de la estabilidad de una muestra de 100 µg/mL de β-escina, que fue expuesta a la luz durante el estudio.

Tabla XXV. Estabilidad de la muestra, luz				
Día	Área bajo la curva		Diferencia relativa (%)	
	Pico 1	Pico 2	Pico 1	Pico 2
0	2963315	1686480		
1	1927918	1125422	34.9	33.3
7	2181431	913272	13.1	18.9
9	2090093	400361	4.2	56.2
24	4053250	1977830	93.9	394.0

En la tabla XXV, se presentan los datos de la estabilidad de una muestra de 100 µg/mL de β-escina, que fue almacenada en refrigeración a 4°C durante el estudio.

Tabla XVI. Estabilidad de la muestra, 4°C				
Día	Área bajo la curva		Diferencia relativa (%)	
	Pico 1	Pico 2	Pico 1	Pico 2
0	2943619	1510475		
1	1750374	846968	40.5	43.9
7	2082405	843509	19.0	0.4
9	2265344	1033445	8.8	22.5
24	428460	0	81.1	100.0

VII. ANALISIS DE RESULTADOS

Los análisis del punto de fusión, que se reportan en la bibliografía, para algunos componentes de la escina, indican que es estable a temperatura ambiente, por lo que es factible su análisis bajo estas condiciones.

Por otro lado, se reporta que, debido a los grupos carboxilos presentes en la estructura química de los compuestos de la escina, no se obtiene una separación satisfactoria de los componentes, es decir, se presentan como adición de picos en los cromatogramas. También se indica que si el pH de la fase móvil es cercano a 3.0 se minimiza este problema.

Por esta razón, el amortiguador de acetatos empleado en la fase móvil se llevó a 3.0.

Entre las propiedades de las saponinas, se encuentra la de absorber en el rango del ultravioleta, es por ello que el detector UV es idóneo para estas sustancias.

La elección de la longitud de onda se bajo en la respuesta del estándar al ser detectado a 205, 210 y 254 nm.

En el cromatograma 3, no se aprecia ningún pico, por ello se descarta como posible elección. Por otro lado, en el caso de los 205 y 210 nm, no se presenta diferencia en el número y forma de los picos; sin embargo, tomando en consideración que la longitud de onda de corte del metanol y acetonitrilo, se encuentra alrededor de los 210 nm, se elige esta última para evitar alguna interferencia del disolvente durante el análisis.

Para elegir la columna cromatográfica se realizaron corridas de la preparación del estándar, usando como fase móvil acetonitrilo-amortiguador 70:30. En el cromatograma 5, se observa que al utilizar la columna Symmetry @ , se presentan dos picos principales en 1.53 y 1.74 minutos, a los cuales se les nombra pico 1 y pico 2, por orden de elusión.

Al utilizar la columna Spherisorb@, con fase móvil acetonitrilo-amortiguador 70:30, se obtuvo el cromatograma 7, en este se presenta un pico único, asimétrico, con un ligero coileo hacia la derecha, ocasionado por la adición del segundo pico mencionado para el cromatograma 2.

Utilizando la fase móvil metanol-amortiguador 70:30, se obtuvo la separación de dos picos principales con la columna Symmetry @, como se muestra en el cromatograma 8, y adición para el caso de la columna Spherisorb @, cromatograma 10.

En el cromatograma 11, usando una mayor proporción de metanol en la fase (80), también se observa adición de los picos, para la columna Spherisorb® y separación de picos para la columna Symmetry®.

La diferencia en la separación obtenida con las columnas, esta directamente relacionada con los platos teóricos de cada una ellas. No obstante, que la columna Spherisorb® posea una mayor longitud, el tamaño de partícula menor de la Symmetry® le otorga una mayor cantidad de platos teóricos, por lo tanto una mejor separación de los compuestos de la escina.

En la tabla IX, quedan condensados los tiempos de retención del pico 1, correspondientes a las pruebas con la columna Spherisorb®, al presentarse coelusión de picos con las fases probadas, se eligió la columna Symmetry®, para continuar el desarrollo del método analítico.

Utilizando acetonitrilo-amortiguador como fase móvil, se observa en los cromatogramas 4, 5 y 6, la separación de los dos picos principales, sin embargo la resolución no llega a ser satisfactoria, como se muestra en la tabla VIII. No obstante, se logra constatar, que al disminuir la polaridad de la fase móvil, aumentando la proporción de acetonitrilo disminuye la resolución y el tiempo de retención de los componentes.

Al sustituir la fase orgánica por metanol en lugar de acetonitrilo, en la misma proporción, los picos eluyen en un tiempo de retención mayor, y la resolución obtenida es mayor, cromatogramas 5 y 8, tablas VIII y XIX. Esto ocurre porque la polaridad del metanol es mayor a la del acetonitrilo.

En los cromatogramas 8, 9 y 12, se utilizó metanol, en diferentes proporciones, se observa que como en el caso del acetonitrilo, el aumento de la polaridad de la fase, produce tiempos de retención mayores. Aunque la resolución aumenta cuando disminuye la proporción de fase orgánica de 80 a 70, al disminuir de 70 a 65 se mantiene, y el tiempo de retención se incrementa en más de diez minutos.

En el cromatograma 12, se observa la presencia de un tercer pico, estos aparecen más coaleados que en el cromatograma 9, y para la misma resolución, tabla VIII, aumenta considerablemente el tiempo de corrida, por lo que las condiciones cromatográficas de elección para la validación del método analítico son las de este último.

Ya que la identificación de los compuestos que forman los dos picos principales no es el objetivo del presente estudio, solo se puede hacer hincapié en que, dentro de las condiciones cromatográficas manejadas, se identifican dos grupos de compuestos afines por su polaridad,

a los que se les llama, en orden de elusión: pico 1 y pico 2. Cabe señalar que pueden ser considerados como indicadores biológicamente activos del fitofármaco escina.

Antes de comenzar la validación del método analítico se observó la formación de espuma al disolver la escina en amortiguador de fosfatos, por lo que se adiciona 0.5 mL de fase móvil antes de llevar al aforo el estándar.

El acenafteno es utilizado como estándar en la determinación de la adecuación del sistema debido a su naturaleza hidrofóbica, lo que ocasionara que si los grupos silanos libres incrementan, es decir, si existe un desgaste de la columna, este se vea reflejado claramente en parámetros como el tiempo de retención y el factor de coleeo del mismo, principalmente. En el cromatograma 13 se observa el pico característico del acenafteno.

El factor de capacidad es de 29.4, la precisión de la inyección es de 0.8 %, valor que se encuentra dentro de los límites especificados por la guía de validación de métodos cromatográficos del Center for Drug Evaluation and Research (CEDER). El límite para el factor de coleeo es 2, por lo que el valor mostrado en la tabla XI, se encuentra dentro de especificaciones. En la tabla XII, se presentan los platos teóricos, es decir, la eficiencia de la columna, que servirán para determinar, cuando se requiera, si la columna puede seguir siendo usada.

De acuerdo con la guía de métodos bioanalíticos del CEDER, la precisión para cada nivel de concentración de la curva no debe exceder de 15%. En la tabla XIII, se observa que la precisión de método y sistema para el pico 1 es menor al valor antes mencionado. Sin embargo, para el pico 2, tabla XIV, el coeficiente de variación para las concentraciones de 5, 10 y 15 $\mu\text{g/mL}$, no cumplen la especificación. No obstante, al sumar las áreas de los picos 1 y 2, se observa que el coeficiente de variación disminuye significativamente, quedando fuera la concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, se eligen los 5 puntos con el coeficiente de variación más bajo, para el análisis de linealidad.

En el caso de un método analítico para perfil de disolución se requiere de un coeficiente de regresión mayor o igual que 0.99, ocurre de este modo con las respuestas del pico 1 y de la suma de los picos 1 y 2, no así para la respuesta del pico 2, cuyo coeficiente de correlación llega a ser hasta de 0.976, con lo cual ya no se cumple con la especificación.

Para el caso de la reproducibilidad, el valor más alto de coeficiente de variación de la respuesta para cada analista, que se muestra en la tabla XIX, es de 13.1%. Si bien, el porcentaje de CV para los datos globales, tabla XX, se eleva en el caso del pico 2, no llega a ser mayor de 15%, por lo que se cumple satisfactoriamente con la guía de validación de métodos bioanalíticos.



En la guía de validación de métodos bioanalíticos, se considera que el porcentaje de coeficiente de variación de al menos cinco repeticiones de una concentración dada, deberá ser no mayor del 20% para ser considerada como límite de cuantificación. En la tabla XXI, se observa que la respuesta del pico 1, para cada concentración, no rebasa este límite. No obstante, para el caso del pico 2 se considera como límite de cuantificación la concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$, como puede observarse en la tabla XXII.

Considerando la suma de áreas, el límite de cuantificación corresponde a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, tabla XXIII.

En las tablas XXIV, XXV y XXVI, se muestran los datos de estabilidad de preparaciones del estándar sometidos a diferentes condiciones, se puede observar que bajo ninguna condición se obtienen áreas bajo la curva consistentes del día de preparación al siguiente, como tampoco para los demás. Esto ocurre tanto para la respuesta del pico 1, como para la del pico 2, por lo que se recomienda el análisis de las muestras el mismo día de la preparación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VIII. CONCLUSIONES

De acuerdo con el análisis, los parámetros cromatográficos del método analítico son: velocidad del papel 0.25, volumen de inyección 10 μ L, tiempo de corrida 12 minutos, longitud de onda 210 nm, rango 0.100, presión de la bomba 140 kg/cm², Fase móvil metanol-amortiguador de acetatos pH 3.0, 70:30, columna Symmetry®, 4.6 x 75 mm, partícula de 3.5 μ m de diámetro.

El método analítico ha quedado validado en el rango de concentración de escina que va de 20 a 100 μ g/mL, usando como factor respuesta, el área de los picos 1 y 2, o bien, la sumatoria.

La elección de parámetros cromatográficos, como son: columna cromatográfica, longitud de onda del detector, fase móvil, velocidad de flujo y volumen de inyección, han permitido desarrollar un método por cromatografía de líquidos de alta resolución, destinado a la cuantificación de la escina en solución acuosa, que además cumple con parámetros de validación tales como: linealidad de método y sistema, límite de cuantificación y detección, precisión de sistema y método, además de repetibilidad.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2000). 7ª ed. México. SSA: 22-23, 1721-1722
2. Comité de expertos de la OMS en especificaciones para las preparaciones farmacéuticas. (1996). Serie de Informes técnicos 863: 203.
3. USP 23 The United States Pharmacopeia. NF 18 The national Formulary. (1995). United States Pharmacopelial Convention. Unites States. Rand Macnally: 1944
4. Bauer R. (1998). Quality criteria and standarization of phytopharmaceuticals: can acceptable drug standards be achieved? *Drug Information Journal*. 32: 101-110.
5. Matthews HB. Lucier GW. Fisher KD. (1999). Medicinal herbs in the United States: research needs. *Environ Health Perspect*. 107: 10, 778.
6. Wagner H. (1999). Phytomedicine research in Germany. *Environ. Health Perspect*. 107: 10, 779-781.
7. Storey D. E. (1996). The role of dissolution testing in the design of immediate release dosage forms. *Drug Information Journal*. 30: 1039-1044.
8. Busse W. (2000). The significance of quality for efficacy and safety of herbal medicinal products. *Drug information Journal*. 34: 15-23.
9. Schulz V. Hansel R. Tyler V. E. (1998). Rational Phytotherapy. A physician's guide to herbal medicine. 3th ed. Berlin. Springer: 128-131.
10. Ballus P. (1997). Atlas de las plantas medicinales y curativas. La salud a través de las plantas. España. Ed. Cultural: 35
11. García SM, http://www.agarboricultura.com/agsculus_hippocastanum.htm, 03/05/2001, 15:34
12. Guarrera PM. (1999). Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. *Journal of Ethnopharmacology*. 68: 183-192.
13. Tobin, Heese, Hames, Ulfert F. Production of pharmaceutical formulations for treatment of edema and venous disorders. USA 6, 007, 534 Jun. 20, 2000 Appl. 921, 694 Sept 2, 1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

14. Bisset NG. (1994). *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals. A Handbook for Practice on a Scientific Basis*. Boca Raton, FL. CRC Press. 268-272.
15. Kara M, Kara S, Kockar M. (1994). Quantitative determination of escin. A comparative study of HPLC and TLC-densitometry. *Fitoterapia*. **65**: 5, 439-443.
16. Wagner H. (1996). *Bladt S. Plant Drug Analysis*. 2nd edition. Berlin: Springer-verlag. 227.
17. Pieta P, Mauri P, Facino MR, Carini M. (1989). High-performance liquid chromatographic analysis of β -escin. *J. Chromatogr. A*. **478**: 259-263.
18. Xian-Guo H. (2000) On-line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic-diode array detection-mass spectrometric techniques. *J. Chromatogr. A*. **880**: 203-232.
19. Yoshikawa M, Harada E, Murakami T, Matsuda H, Wariishi N, Yamahara J, Murakami N, Kitagawa I. (1994). Escins-Ia, Ib, IIa, IIb, and IIIa, bioactive triterpene oligoglycosides from the seeds of *Aesculus hippocastanum* L.: their inhibitory effects on ethanol absorption and hypoglycemic activity on glucose tolerance test. *Chem. Pharm. Bull.* **42**: 6, 1357-1359.
20. Yang X, Zhao J, Cui Y, Liu X, Ma C, Hattori M, Zhang L. (1999) Anti-HIV-1 protease triterpenoid saponins from the seed of *Aesculus chinensis*. *J. Nat. Prod.* **62**: 1510-1513.
21. Yoshikawa M, Harada E, Murakami T, Matsuda H, Wariishi N, Yamahara J, Murakami N, Kitagawa I. (1996). Bioactive saponins and glycosides. III. Horse Chestnut. (1): the structures, inhibitory effects on ethanol absorption, and hypoglycemic activity of escins Ia, Ib, IIa, IIb, and IIIa from the seed of *Aesculus hippocastanum* L. *Chem. Pharm. Bull.* **44**: 8, 1454-1464.
22. Yoshikawa M, Murakami T, Yamahara J, Matsuda H. (1998). Bioactive saponins and glycosides. XII. Horse Chestnut (2): structures of escins IIIb, IV, V, and VI and Isoescins Ia, Ib and V, acylated polyhydroxyoleanene triterpene oligoglycosides, from the seeds of horse chestnut tree (*Aesculus hippocastanum* L., Hippocastanaceae) *Chem. Pharm. Bull.* **46**: 11, 1764-1769.
23. Horse Chestnut. (1998). The review of natural products. Facts and comparisons³. 1-2.
24. Tyler VE. (1994). *Herbs of Choice. The therapeutic use of phytomedicinals*. New York. Pharmaceutical products press. 112-114.

25. Janssens D, Delaive E, Houbion A, Ellaers F, Remacle J, Michiels C. (2000). Effect of venotropic drugs on the respiratory activity of isolated mitochondria and in endothelial cells. *British Journal of Pharmacology*. 130: 1513-1524.
26. Matsuda H, Li Y, Murakami T, Ninomiya K, Yamahara J, Yoshikawa M. (1997). Effects of escins Ia, Ib, IIa and IIb from horse chestnut, the seeds of *Aesculus hippocastanum* L., on acute inflammation in animals. *Biol. Pharm. Bull.* 20: 10, 1092-1095.
27. Delfel NE, Radosevch MB. (1986). High-performance liquid chromatography of triterpene saponins. *J. Chromatogr. A*. 368: 433-438.
28. Apers S, Foriers A, Sindambiwe JB, Vlietinck A, Pieters L. (1998). Separation of a triterpenoid saponin mixture from *Maesa lanceolata*: semipreparative reversed-phase wide pore high performance liquid chromatography with temperature control. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18: 737-743.
29. Kunz K, Lorkowski G, Petersen G, Samcova E, Schaffler K, Wauschkuhn C. (1998). Bioavailability of escin after administration of two oral formulations. *Arzneimittelforschung*. 48: 822-825.
30. Center for Drug Evaluation and Research. Reviewer Guidance. Validation of Chromatographic Methods. (1994). United States. CMC: 2-4, 6, 16-17, 22-23, 26.
31. Adamovics J A. (1990). High-performance liquid chromatography. En: Adamovics J A. Chromatographic analysis of Pharmaceuticals. New York. Marcel Dekker. 167.
32. Runser D. J. (1981). Maintaining and troubleshooting HPLC systems. New York. John Wiley & Sons: 7-16.
33. Kinghorn A. d. Chromatographic/chromatographic spectroscopic combination methods for the analysis of botanical drugs. *Drug information journal*. 32: 487-495.
34. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. (1995). Guideline for Industry. Text on Validation of Analytical procedures. Unites States. ICH: 2, 4, A-1.
35. Guidance for industry. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. (1996). United States. ICH: 1-7.
36. Guideline on general principles of process validation. (1993). United States. FDA: 2.



37. SSA. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. 1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN