

00524
30



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DESARROLLO Y VALIDACION DE LA TECNICA
ANALITICA ACOPLADA CROMATOGRAFIA DE
GASES-ESPECTROMETRIA DE MASAS PARA LA
CUANTIFICACION DEL PRINCIPIO ACTIVO
XANTORRIZOL, CONTENIDO EN LA RAIZ DE
lostephane heterophylla.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ROBERTO CASTRO HERNANDEZ



MEXICO, D. F.

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2003.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACIÓN DISCONTINUA

JURADO ASIGNADO


PRESIDENTE : María Isabel Aguilar Laurents
VOCAL: Gabriel René Guzmán Martínez
SECRETARIO: Rachel Mata Essayag
PRIMER SUPLENTE: Norma Trinidad González Monzón
SEGUNDO SUPLENTE: José de Jesús Alvarado Pérez

Sitio de elaboración de la tesis:

LABORATORIO 125 CONJUNTO "E" DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA,
UNIDAD DE POSGRADO Y LABORATORIO DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS
DE LA UNIDAD DE SERVICIOS DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN DE LA
FACULTAD DE QUÍMICA, CD. UNIVERSITARIA, UNAM.

ASESOR:

ASESOR TÉCNICO:


Dra. María Isabel Aguilar Laurents


Q. Georgina Duarte Lisci

SUSTENTANTE:


Roberto Castro Hernández

El trabajo experimental de esta tesis de licenciatura se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través del proyecto DGAPA (Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM) IN206900.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, que han estado conmigo y me han dado su apoyo incondicional en todo momento, impulsándome para continuar adelante.

A mis hermanos, Verónica, Miguel Ángel y Sonia, que aun no han dejado de reír y me siguen haciendo reír con todas sus ocurrencias a pesar de todos los problemas que han surgido en el camino, además, de la pequeña miniatura (gusabio) que es un pequeño ángel caído del cielo para enseñarnos a ver la vida de otra forma.

A mi abuela Chonita y mi tío Laurencio que me ha consentido tanto y siempre han estado con nosotros.

A mis tíos, Alfredo e Irene que a pesar de todo, continúan aconsejándome y dándome su aliento para seguir adelante.

A mis primos, Yulibet, María de los Ángeles, Cesar y Alfredo, con los que me he desvelado algunas veces por estar de pachangueros.

A esa pequeña mujer (solo de tamaño) que ha estado conmigo en todo momento desde el momento que la conocí, y que me ha dado todo su tiempo y cariño (además de otras cosas y no deja ni un momento de motivarme para continuar adelante y seguir superándome en todos los aspectos, y que ahora es mi mujer JUANITA. Sin olvidar a mis suegros que me han dado toda su confianza y apoyo incondicional en todo momento.

Mi más grande agradecimiento para mi asesora de Tesis, la Dra. Isabel Aguilar que durante todo este tiempo me ha estado apoyando y se ha preocupado en darme todos los medios necesarios para terminar este trabajo sin importar el tiempo que para ello le dedicara, y su invaluable valor como persona.

A la profesora Georgina Duarte y su compañera de trabajo Margarita de la USAI, que me estuvieron auxiliando durante el trabajo experimental.

A mis más grandes amigos y compañeros de la vida Luis Pedraza y Víctor Andrade, con los que he compartido muchas aventuras y seguiremos compartiendo. Además de todos aquellos con los que compartido muchas cosas y me han acompañado durante toda la carrera que por motivos de espacio no alcanzaría a nombrarlos.

A

INDICE GENERAL

Lista de Abreviaturas	V
Lista de Cuadros	VII
Lista de Figuras	VIII
Lista de Gráficas	X
Lista de Esquemas	X
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Antecedentes de <i>Iostephane heterophylla</i>	3
3. JUSTIFICACIÓN	9
4. OBJETIVOS	10
5. METODOLOGÍA	12
5.1 Material y equipo utilizado	12
5.2 Material vegetal	12
5.3 Obtención del extracto de la raíz	13
5.4 Identificación del xantorrizol	13
5.5 Aislamiento y purificación del xantorrizol	13
5.6 Selección del estándar interno	15
5.7 Determinación de la concentración de la solución de trabajo	15
5.8 Plan de trabajo para realizar la validación de la técnica analítica CG-EM	15
5.9 Especificidad	16
5.10 Adecuabilidad del sistema	17
5.11 Linealidad del sistema	18
5.12 Precisión del sistema	19
5.13 Estabilidad de la solución de la muestra	19
5.14 Linealidad del método	19

5.15	Rango	20
5.16	Precisión del método	20
5.17	Exactitud y recobro	21
5.18	Sensibilidad	21
5.19	Robustez	21
5.20	Determinación del contenido de xantorizol en la raíz de la planta	22
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
6.1	Estudios de prevalidación	23
6.1.1	Obtención de las condiciones de trabajo óptimas para el estudio	23
6.1.2	Identificación, aislamiento y purificación del xantorizol	26
6.1.3	Obtención del compuesto utilizado como estándar interno	29
6.1.4	Obtención de las concentraciones de trabajo para preparar las soluciones estándar.	31
6.2	Especificidad	32
6.3	Adecuabilidad del sistema	38
6.4	Linealidad del sistema	39
6.5	Precisión del sistema	41
6.6	Estabilidad de la muestra en disolución	41
6.7	Linealidad del método	43
6.8	Precisión del método	44
6.9	Rango	46
6.10	Exactitud y recobro	47
6.11	Sensibilidad	47
6.12	Determinación del contenido de xantorizol en la raíz de la planta	48
7.	CONCLUSIONES	50
8.	BIBLIOGRAFÍA	54
9.	ANEXO (Procedimiento analítico y validación)	59
9.1	Especificidad	60

9.1.1	Identificación	60
9.1.2	Ensayo y prueba de impurezas	61
9.1.3	Impurezas disponibles	61
9.1.4	Impurezas no disponibles	62
9.2	Adecuabilidad del sistema	63
9.2.1	Factor de capacidad (k')	64
9.2.2	Resolución (R_s)	65
9.2.3	Retención relativa (α)	65
9.2.4	factor de coleo (T)	66
9.2.5	Número de platos teóricos (N)	67
9.2.6	Repetibilidad de inyección (precisión)	67
9.3.	Linealidad	68
9.3.1	Linealidad del sistema	69
9.3.2	Linealidad del método	69
9.4	Rango	70
9.4.1	Ensayo	70
9.4.2	Uniformidad de contenido	71
9.4.3	Disolución	71
9.4.4	Impurezas	71
9.5	Precisión	72
9.5.1	Repetibilidad	72
9.5.1.1	Repetibilidad de inyección (precisión)	73
9.5.1.2	Repetibilidad de análisis	73
9.5.2	Precisión intermedia	73
9.5.3	Reproducibilidad	74
9.6	Exactitud	74
9.6.1	Ensayos	75
9.6.1.1	Sustancia farmacéutica	75
9.6.1.2	Producto farmacéutico	75
9.6.2	Impurezas (cuantificación)	76

9.7	Estabilidad de la muestra en solución	77
9.8	Sensibilidad	78
9.8.1	Límite de detección	78
9.8.1.1	Con base en la evaluación visual	79
9.8.1.2	Con base en la relación Señal : Ruido	79
9.8.1.3	Con base en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente	79
9.8.1.3.1	Con base en la desviación estándar del blanco	80
9.8.1.3.2	Con base en la curva de calibración	80
9.8.2	Límite de cuantificación (LC)	80
9.8.2.1	Con base en la evaluación visual	80
9.8.2.2	Con base en la relación Señal : Ruido	81
9.8.2.3	Con base en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente	81
9.8.2.3.1	Con base en la desviación estándar del blanco	81
9.8.2.3.2	Con base en la curva de calibración	82
9.9	Robustez	82
9.10	Comatografía de gases	85
9.10.1	Columnas	86
9.10.2	Soporte sólido	87
9.10.3	Fase estacionaria	87
9.10.4	Programa de temperatura	88
9.10.5	Gas acarreador	88
9.10.6	Inyección de la muestra	88
9.10.7	Detectores	90
9.11	Espectrometría de masas	90
9.11.1	Ionización por impacto electrónico	91
9.11.2	Deflexión magnética	92

Lista de abreviaturas

a.c.	Antes de cristo
α	Retención relativa
b	Ordenada al origen
°C	Grados Celsius
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CG	Cromatografía de gases
C. V.	Coefficiente de variación
d.c.	Después de cristo
e ⁻	Electrón
EM	Espectrometría de masas
<i>f</i>	Distancia máxima del centro al final del pico
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramo
H, h	Hidrógeno, Altura
He	Helio
HTEP	Height Equivalent to a Theoretical Plate (Altura Equivalente de Plato Teórico: AEPT)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Resolución: CLAR)
IE	Ionización electrónica o impacto electrónico
IR	Infrarrojo
IC	Intervalo de confianza
<i>K'</i>	Factor de capacidad
L	Longitud de la columna
LC	Límite de cuantificación

LD	Límite de detección
<i>m</i>	Masa del ión en u (unidad de masa atómica), pendiente
mg	Miligramo
Min.	Minutos
mL	Mililitro
mm	milímetro
M	Molécula
M*	Ión molecular
<i>n</i>	Número de datos
N, N	Número de platos teóricos, Nitrogeno
pH	Concentración de hidrógeno
P ₁ , P ₂	Prueba
<i>r</i>	Coefficiente de regresión
<i>r</i> ²	Coefficiente de correlación
Rs	Resolución
RSD	Relative standard deviation (Desviación estándar relativa- DER)
Rf	Distancia recorrida de la muestra entre la distancia recorrida por el disolvente
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
σ	Desviación estándar
<i>t</i> ₀	Tiempo de elusión del volumen vacío
<i>t</i> _r	Tiempo de retención de la muestra
<i>t</i> _w	Ancho del pico extrapolado a la línea base
T	Factor de coelo
USP	United States Pharmacopoeia
μ L	Microlitro
UV	Ultravioleta
W _{1/2}	Ancho del pico medido al 50% de la altura total

$W_{x(0.05)}$	Ancho del pico medido al 5% de la altura total
\bar{x}	Valor promedio
z	Carga de la molécula en unidades de carga electrónica
\leq	Menor o igual
\geq	Mayor o igual
\pm	Mayor o menor al valor central
%	Porcentaje

Lista de cuadros

Cuadro 1. Separación del xantorrizol del extracto metanólico mediante cromatografía en columna.	14
Cuadro 2. Condiciones de estrés para degradar al xantorrizol.	17
Cuadro 3. Variables requeridas para determinar Adecuabilidad del sistema.	17
Cuadro 4. Diluciones para elaborar la curva estándar del xantorrizol.	18
Cuadro 5. Diferentes tratamientos realizados a la muestra de xantorrizol.	32
Cuadro 6. Resultados de las variables requeridas para determinar los parámetros de adecuabilidad del sistema.	39
Cuadro 7. Resultados para la Adecuabilidad del sistema.	39
Cuadro 8. Curva de calibración para determinar linealidad del sistema.	40
Cuadro 9. Resultados para precisión del sistema.	41
Cuadro 10. Resultados para estabilidad de la muestra en disolución.	42
Cuadro 11. Resultados del análisis estadístico realizado a cada solución muestra.	42
Cuadro 12. Curva de calibración para determinar linealidad del método.	43
Cuadro 13. Resultados para Repetibilidad del análisis.	44

Cuadro 14. Resultados para repetibilidad de inyección.	45
Cuadro 15. Resultados para reproducibilidad del método.	45
Cuadro 16. Resultados del análisis estadístico realizado a las muestras de linealidad del método.	46
Cuadro 17. Resultados para exactitud.	47
Cuadro 18. Resultados de la determinación de la cantidad de xantorrizol contenido en la raíz de la planta <i>Iostephane heterophylla</i> .	48
Cuadro A1. Criterios de aceptación para el % de Recobro y Coeficiente de variación	77

Lista de figuras

Figura 1. estructura química del xantorrizol	5
Figura 2. <i>Iostephane heterophylla</i> (Cav.) Hemsl.	8
Figura 3. Cuadro sinóptico que muestra el procedimiento a seguir para la validación.	16
Figura 4. Cromatograma iónico del extracto clorofórmico obtenido mediante CG-EM.	25
Figura 5. Cromatograma iónico del extracto metanólico obtenido mediante CG-EM.	26
Figura 6. Cromatograma iónico del xantorrizol obtenido de la raíz de <i>Iostephane heterophylla</i> una vez purificado.	27
Figura 7. Espectro de masas por IE del xantorrizol obtenido mediante EM.	27
Figura 8. Espectro de IR del xantorrizol, obtenido mediante CC para su identificación.	28
Figura 9. Espectro de RMN- ¹ H del xantorrizol obtenido mediante CC para su identificación.	29
Figura 10. Cromatograma iónico del 2,6-diterbutil-4-metil fenol.	30
Figura 11. Espectro de masas por IE del 2,6-diterbutil-4-metil fenol obtenido	

mediante EM.	30
Figura 12. Cromatograma iónico del xantorrozil y estándar interno; 1-estándar interno, 2-xantorrozil.	31
Figura 13a. Cromatograma iónico obtenido del blanco de reactivo.	33
Figura 13b. Cromatograma iónico del extracto sometido al tratamiento de alta temperatura.	33
Figura 14a. Cromatograma iónico obtenido del blanco de reactivo.	34
Figura 14b. Cromatograma iónico del extracto sometido a condiciones de acidez.	34
Figura 15a. Cromatograma iónico obtenido del blanco de reactivo.	35
Figura 15b. Cromatograma iónico del extracto sometido a condiciones de basicidad.	36
Figura 16a. Cromatograma iónico obtenido del blanco de reactivo.	36
Figura 16b. Cromatograma iónico del extracto sometido a condiciones medioambientales.	37
Figura 17a. Cromatograma iónico obtenido del blanco de reactivo.	37
Figura 17b. Cromatograma iónico del extracto sometido a condiciones oxidantes.	38
Figura 18. Cromatograma iónico obtenido para el límite de cuantificación.	48
Figura A1. Separación cromatográfica de dos sustancias	64
Figura A2. Pico cromatográfico asimétrico.	66
Figura A3. Diagrama esquemático de un cromatógrafo de gases	86
Figura A4. Cámara o puerto para la inyección dividida o sin división en una columna tubular abierta.	89
Figura A5. Espectro de masas por IE del 2,4-dimetilpentano, dado como gráfica de barras y en forma tabular.	93

Lista de gráficas

Gráfica 1. Resultados de linealidad del sistema.	40
Grafica 2. Resultados de linealidad del método.	43

Lista de esquemas

Esquema 1. Metabolitos secundarios aislados de <i>Iostephane heterophylla</i>	5
Esquema A1. Relación entre equipo, método, técnica y muestra en un análisis típico.	84

1. INTRODUCCIÓN

La importancia de las plantas medicinales en la atención a la salud se reconoce desde los tiempos más remotos. El empleo documentado de las plantas medicinales, está descrito en una serie de tratados entre los que resaltan el de los sumerios, cuyas inscripciones, plasmadas en tablillas de arcilla datan de hace 4000 años. Tenían conocimientos sobre las propiedades analgésicas del opio y el uso de otras plantas medicinales. Otro documento antiguo es el papiro de Eber, 1500 a. c. descubierto en Tebas, en el que se encuentran descripciones de por lo menos 800 recetas médicas provenientes de extractos de plantas, animales e insectos. Contiene una colección de 800 recetas médicas y menciona alrededor de 700 fármacos.

A partir de nuestra era, la descripción de plantas medicinales se encuentra inscrita dentro de tratados tales como el de Dioscórides (50- 70 años a.c.) en Grecia, que describe cerca de 600 plantas con uso terapéutico, y que se conoce como "De Materia Médica". Posteriormente, la información relacionada con la descripción y usos de las plantas se encuentra en documentos que datan de diferentes épocas y países del mundo. Esta información es de fundamental importancia para un uso terapéutico adecuado de las mismas y es producto de una serie de evaluaciones que permiten asegurar la calidad de la materia prima vegetal empleada.

El trabajo que se presenta propone el uso de la técnica analítica acoplada Cromatografía de gases – Espectrometría de masas (CG-EM) como la metodología adecuada a la naturaleza del o los principios activos contenidos en la raíz de la planta *Iostephane heterophylla*, como materia prima empleada en la medicina tradicional mexicana, la cual debe cumplir con ciertas especificaciones.

2. ANTECEDENTES

El uso de plantas medicinales para la atención de la salud es una práctica de casi todos los países del mundo, sin embargo, esta costumbre en países con gran diversidad botánica y en aquellos en los que la medicina tradicional basada en plantas es la primera alternativa para los problemas de salud. En este caso se encuentran los países en vías de desarrollo.

En años recientes, el consumo de fitofármacos ha sido muy notable, por ejemplo, en Europa en donde muchas compañías farmacéuticas elaboran presentaciones con plantas medicinales o extractos de plantas que posteriormente son exportados y consumidos en países como el nuestro¹. Sin embargo, en el mercado nacional mexicano, podemos encontrar varias presentaciones de diferentes productos en donde no se ha especificado la calidad de éstos.

Las descripciones de las plantas son de fundamental importancia para un uso terapéutico adecuado de las mismas y estas descripciones son producto de una serie de evaluaciones que permitirán asegurar la calidad de la materia prima vegetal empleada, al generar datos confiables y exactos para su aceptación. Los datos son obtenidos mediante pruebas cualitativas y cuantitativas durante el desarrollo y posterior aprobación de productos vegetales.

Un primer paso en el estudio de las plantas medicinales involucra su recolección, la cual requiere de cuidados especiales. Ante todo es preciso estar siempre seguros de que la especie colectada sea exactamente la deseada. Es conveniente saber qué parte (o partes) de la planta es la que contiene él o los principios activos, cuál es el período de recolección más favorable (que es conocido como "período balsámico") y que por lo general, aunque con muchas excepciones, corresponde al momento en que los órganos de la planta contienen una cantidad mayor de principios activos, son más turgentes y han alcanzado su máximo esplendor¹.

La época balsámica de las raíces de las plantas anuales, precede al período de floración correspondiente a otoño e invierno. La recolección se realiza cuando el tiempo es seco y cálido, y las plantas no están cubiertas de rocío. Las raíces y las demás partes subterráneas deben quedar inmediatamente limpias de tierra y proceder a realizar un cuidadoso secado. Después de esto, se cuida su conservación ya que las causas principales de la alteración de los metabolitos contenidos son: la luz, la humedad, los insectos y algunos roedores. De hecho, la eficacia de los principios activos que se encuentran contenidos en la planta, se pierde con el tiempo, pues en muchos casos éstos son más o menos volátiles¹.

El estudio fitoquímico que se realiza en una planta con uso terapéutico, de la cual se desean conocer sus compuestos activos deberá ser biodirigido para detectar desde un inicio el extracto y fracciones donde está contenido el compuesto activo que se desea conocer, y que en un momento dado, podría corresponder a la sustancia marcadora de la calidad de la planta.

Una vez aislada esta sustancia y de acuerdo a sus propiedades y estructura, se buscará el método analítico adecuado para su valoración dentro de la planta. Actualmente, existen esquemas de evaluación de fármacos que podrían ser adecuados al estudio de compuestos químicos provenientes de plantas. Una vez determinado el método idóneo para el análisis de un compuesto o mezcla de ellos en una planta, es conveniente realizar la validación del método seleccionado.

2.1 Antecedentes de *Iostephane heterophylla*.

Iostephane heterophylla (Cav.) Hemsl pertenece a la familia Asteraceae (figura 2). Se conoce con los nombres vulgares de "escorzonera", "escorcionera"², "raíz del manso", "hierba del oso"³ y "tlalpopolotl"⁴. Es originaria de México y su delimitación geográfica abarca el Valle de México y los estados de Puebla, Jalisco, Chihuahua, San Luis Potosí, Hidalgo y Durango. Es una planta herbácea perenne de 60 cm de largo, de raíz tuberosa, las hojas radicales, lobuladas, ásperas; flores en cabezuelas lilas, con pedúnculo largo y florece en septiembre. Habita en climas

semiseco y templado, está asociada a matorrales, xerófilo, bosques de encino y de pino.

Iostephane heterophylla es una planta que está botánicamente muy relacionada con *Iostephane madrensis* del complejo botánico medicinal denominado "cachana" e inclusive se le ha llegado a incluir dentro de ése complejo¹. Dentro de la medicina tradicional mexicana, *I. heterophylla* es muy apreciada y empleada para el tratamiento de afecciones cutáneas, para heridas y llagas en forma de emplastos; para aliviar el reumatismo y artritis por frotación de una tintura alcohólica o del extracto acuoso en las articulaciones y como té para tratamientos como la diabetes, desórdenes gastrointestinales y padecimientos del hígado y finalmente para la esterilidad, como componente del complejo "cachana"⁵.

Por otra parte, la raíz seca de la "escorcionera", junto con el cuachalalate, el árnica, la yerba mora y la siricua, constituyen los ingredientes del té "úlcerico" el cual es muy popular en la ciudad de Chihuahua para curar úlceras estomacales². También es utilizada en combinación con flor de tila, hierba de teñir (*Dydimaea alsinoides*) para los dolores musculares; para el dolor de huesos sólo se emplea la maceración de la raíz untada por todo el cuerpo³. El cocimiento de la planta suele utilizarse en el estado de Morelos, para baños posparto en un temascal³. Francisco Hernández en el siglo XVI, relató los usos de la raíz para padecimientos renales, así como alcalinizante y antipalúdico, además para la inflamación de la garganta y como tónico aromático. Ya en el siglo XX, la Sociedad Farmacéutica Mexicana las señaló como agente antidisentérico y pectoral³.

Estudios químicos biodirigidos enfocados a la búsqueda de componentes antimicrobianos o activos en la tonicidad del músculo liso realizados a los extractos de la raíz de *I. heterophylla* han confirmado la presencia de diterpenos, cromenos, cumarinas glicósidos y sesquiterpenos derivados del bisaboleno, de los cuales el 2-metil-5-(5-hidroxi-1,5-dimetil-3-hexenil)-fenol (xantorrizol) fue mayoritario^{5,6}, encontrándose en un 0.428 % de los componentes totales del extracto clorofórmico. En ese estudio, el xantorrizol también se aisló de los extractos metanólico y en

menor proporción del hexánico, sin ser cuantificado. La estructura química del xantorizol se muestra a continuación:

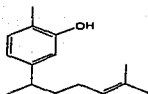
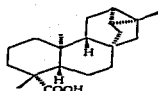


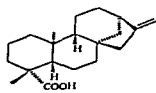
Figura 1.- Estructura química del Xantorizol

Las estructuras de los metabolitos adicionales que se han aislado de la raíz de la planta, se muestran en el esquema 1⁵.

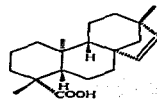
Esquema 1.- METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE *Iostephane heterophylla*⁵



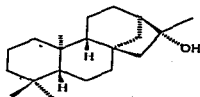
Acido tranquiloban-19-oico



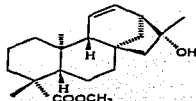
Acido *ent*-kaur-16-en-19-oico



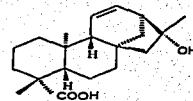
Acido *ent*-beyer-15-en-19-oico



16α-hidroxi-*ent*-kaurano

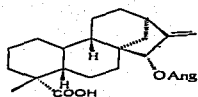


Ester metílico del ácido
16α-hidroxi-*ent*-kaur-11-en-19-oico

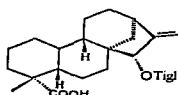


Acido 16α-hidroxi-*ent*-kaur-11-en-19-oico

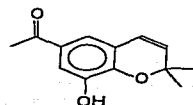
Esquema 1.- METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE *Iostephane heterophylla*⁵ (continuación)



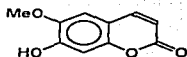
Acido 15α-angeliloixi-ent-kaur-16-en-19-oico



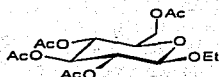
Acido 15α-ligililoixi-ent-kaur-16-en-19-oico



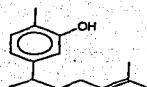
8-hidroxi-6-acetil-2,2-dimetilcromeno



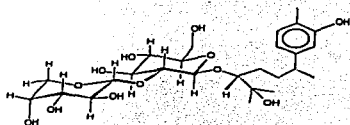
Escopoletina



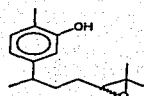
Etil-2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosido



Xantorrizol

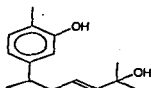


1'-O-[(12R)-12,13-dihidro-12,13-dihidroxi-xantorrizol]-β-L-arabinopiranosil-(1→2)-β-D-glucopiranosido

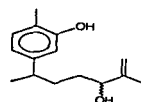


12,13-Dihidro-12,13-epoxi-xantorrizol

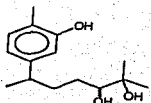
Esquema 1.- METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE *Iostephane heterophylla*⁵ (continuación)



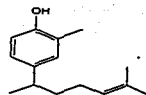
12,13-Dihidro-13-hidroxi-11-en-xantorizol



12,13-Dihidro-12-hidroxi-13-en-xantorizol



12,13-Dihidro-12,13-dihidroxi-xantorizol



4-(1',5'-dimetil-hex-4'-enil)-2-metilfenol⁶

De los compuestos mostrados en el esquema 1, salvo el xantorizol¹¹ los demás sesquiterpenos derivados del bisabolenos fueron aislados por primera vez por Aguilar et al.^{5,8,12} y Mata et al.⁶, y los demás componentes ya habían sido aislados de otras plantas^{13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24}.

Estudios previos a éste, sobre las actividades antimicrobianas de la raíz de *I. heterophylla*, mostraron resultados de actividad medianamente significativa por parte de los extractos etanólico y clorofórmico, detectándose al xantorizol como el responsable de la actividad antimicótica sobre cultivos de los hongos dermatofitos *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporium gypseum* y *Trichophyton rubrum* y con actividad moderada sobre la levadura *Candida albicans*^{7,8}.

Por último, el xantorrizol mostró actividad de inhibición de la tonicidad del músculo liso de útero de rata inducida por una solución despolarizante y asimismo en aorta torácica de rata^{9,10}.

Dada la importancia de la raíz de *I. heterophylla* dentro de la medicina tradicional mexicana y después de habersele realizado los estudios fitoquímico y biológico que culminaron en la obtención de resultados promisorios para el desarrollo de esta droga como un fitomedicamento, fue llevado a cabo un estudio para conocer la concentración real del xantorrizol en la raíz y además establecer algunos parámetros calculados con las especificaciones generales establecidas por algunas farmacopeas y por los métodos de Control de la Calidad de Materiales de Plantas Medicinales de la Organización Mundial de la Salud de 1987. Esto se llevó a cabo mediante la cuantificación espectrofotométrica por el método de Price y Butler, la cual dio como resultado un contenido de 13.8 mg de fenoles totales por gramo de raíz. También se realizaron pruebas de identidad a la raíz (pruebas histoquímicas e histológicas), así como evaluación de sus contenidos (cenizas, humedad, elementos extraños, determinaciones microbiológicas, etc.)¹. Todo lo anterior fue efectuado para establecer las bases para un estudio orientado a la obtención de una monografía de la materia prima vegetal (raíz de *Iostephane heterophylla*).



Figura 2. *Iostephane heterophylla* (Cav.) Hemsl.

3. JUSTIFICACIÓN

El uso y consumo de plantas medicinales para el cuidado de la salud, refleja la importancia que tienen para ser utilizadas como auxiliares en el tratamiento de diversos padecimientos. Aunque tienen una gran popularidad y presentan un mercado de crecimiento muy alto, no tienen una completa aceptación en el área de la salud, debido a la falta de un control en la calidad de las mismas, además de que los conocimientos registrados acerca de su actividad terapéutica no están en la mayoría de los casos completamente comprobados.

Por ello, se requiere que muchas de las plantas a las cuales se les atribuyen ciertas actividades biológicas, sean caracterizadas biológica y químicamente, y de ser posible establecer el o los compuestos responsables de dicha actividad.

Por lo anterior, es necesario promover la investigación y el uso de fitofármacos para elaborar y preparar monografías sobre las diversas plantas medicinales, y por lo tanto apoyar a la fitoterapia dentro del estatus regulatorio.

Aunque existen muchos trabajos en la literatura donde se hace mención de los parámetros que deben considerarse para llevar a cabo la validación de un método analítico, existe poca información de la aplicación de dichos métodos para los compuestos de origen natural.

En este trabajo se propone el empleo de una metodología analítica para cuantificar al analito principal de la raíz de la planta *Iostephane heterophylla*, y se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros requeridos por la validación. Aunque no se determinaron todos los parámetros, si se muestran los principales y aceptados como mínimos para considerar una técnica validada.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar la validación de la metodología analítica acoplada Cromatografía de gases – Espectrometría de masas como procedimiento útil para cuantificar al xantorrizol, un compuesto activo y mayoritario con actividad biológica presente en la raíz de la planta *Iostephane heterophylla*.

Para cumplir con este objetivo se contemplaron los siguientes objetivos específicos:

- Investigación bibliográfica acerca de otros trabajos realizados al respecto con compuestos de origen natural.
- Recopilación de la información requerida para establecer el programa de trabajo.
- Purificación del xantorrizol para ser utilizado como estándar.
- Determinar experimentalmente el compuesto adecuado para emplearse como estándar interno.
- Determinar las condiciones cromatográficas óptimas para llevar a cabo la validación de la metodología analítica propuesta.
- Determinación del rango de concentraciones a ser utilizadas para el xantorrizol y el estándar interno para preparar la curva de calibración y soluciones de trabajo.

- Y Establecer la concentración de xantorrizol que servirá de referencia y será considerada como el 100 % para llevar a cabo la validación.
- Y Determinar cada uno de los parámetros requeridos por la validación como son: especificidad, adecuabilidad del sistema, estabilidad de la solución muestra, linealidad del sistema y método, precisión del sistema y método, rango y exactitud.
- Y Determinar la cantidad de xantorrizol presente en el extracto metanólico de la raíz de la planta *Iostephane heterophylla*.

5. METODOLOGÍA

5.1 *Material y Equipo utilizado.*

El análisis de cromatografía en capa fina analítica se realizó en cromatofolios Merck- Nagel COM sil C-200 UV₂₅₀ . Como reveladores se emplearon una lámpara de luz UV Spectroline modelo CM10 fluorescencia análisis con longitudes de onda a 254 y 365 nm, y como agente cromogénico una solución de sulfato cérico amoniacal al 1 % en ácido sulfúrico 2 N²⁵.

Los espectros en el IR se determinaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 238-B.

Los espectros de RMN-H se determinaron a 300 MHz en un espectrofotómetro analítico Varian XR 300; como disolvente se empleó CDCl₃ y como referencia interna TMS.

Para la cromatografía de gases se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard (Modelo 5890, serie II; equipado con una columna Capilar HP-5MS de 30 m, d.i. 0.25 mm con espesor de película de 0.25 µm, y como gas acarreador helio de alta pureza) acoplado a un espectrómetro de masas JEOL (Modelo JMS-SX102A de doble sector).

5.2 *Material vegetal.*

El material vegetal fue colectado en el estado de Puebla en el mes de septiembre de 1998 e identificado por los Dres. Robert Bye y E Linares (No. de colecta 26535). Una muestra de referencia se encuentra depositada en la colección etnobotánica del Jardín Botánico del instituto de Biología, UNAM y en el Herbario Nacional (MEXU).

5.3 Obtención del extracto de la raíz.

4 gramos de material vegetal molido se dejaron reposando una muestra en cloroformo y otra en metanol durante 24 horas a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó por destilación al vacío, obteniéndose una cierta cantidad de cada extracto. Los cromatogramas obtenidos mediante CG se muestran en la Figura 4 y 5 (Pags. 25 y 26).

5.4 Identificación del Xantorrizol.

Se llevó a cabo por cromatografía en placa fina empleándose diclorometano al 100 % como disolvente de elución y comparándose con una muestra analítica obtenida en nuestro laboratorio ($R_f = 0.54$), a la cual se le realizaron los estudios pertinentes para confirmar la estructura.

5.5 Aislamiento y purificación del xantorrizol.

En un matraz Erlenmeyer de 125 ml, se introdujeron exactamente 4 g de raíz de *Iostephane heterophylla* seca y pulverizada. Se agregaron 100 mL de metanol y se agitó constantemente durante las primeras 6 horas; se dejó en reposo hasta que transcurrieron 24 horas. Se filtró y evaporó el metanol a sequedad hasta obtener un residuo siruposo de color café oscuro que pesó 0.258 g (6.45 %).

0.500 g del extracto metanólico de la raíz de *Iostephane heterophylla* se fraccionaron mediante columna preparativa utilizando como fase estacionaria sílica gel (0.63–0.200 mm) y hexano:diclorometano como fase móvil en diferentes proporciones de polaridad creciente. El cuadro 2 presenta las diferentes proporciones de las mezclas de elución utilizadas y las fracciones obtenidas. Las fracciones que

por CCF mostraban el contenido de xantorrizol se colectaron y evaporaron en un mismo recipiente (II y III). El xantorrizol se purificó por medio de cromatografía preparativa en placas finas de sílica gel sin activar preparadas con una emulsión conteniendo 20 g de gel de sílice y 40 mL de agua purificada; se aplicaron 100 mg de fracción por cada placa y como disolvente de elución se empleo diclorometano al 100 %.

La posición del xantorrizol dentro de la cromatoplaça se visualizó con luz ultravioleta de onda corta y al revelar un extremo de la placa con solución de sulfato cérico amónico. La banda correspondiente al compuesto requerido se raspó, filtró y lavó con diclorometano. El disolvente se eliminó por destilación al vacío obteniéndose aprox. 20 mg de xantorrizol.

Eluyente	Proporción	Fracciones reunidas		Peso (mg)
Hexano	100 %	1-70	I	---
Hexano-CH ₂ Cl ₂	95:5	71- 129	II	41.02
Hexano-CH ₂ Cl ₂	90:10	130 - 150	III	2.76
Hexano-CH ₂ Cl ₂	80:20	151	IV	150.6

Cuadro 1. Separación del xantorrizol del extracto metanólico mediante cromatografía en columna.

El xantorrizol se purificó mediante dos cromatografías sucesivas en CCF preparativa y la identificación de su estructura se comprobó por comparación de sus características espectroscópicas en el IR y de RMN-¹H con las de una muestra de referencia obtenida en nuestro laboratorio, Figuras 8, 9, 10 y 11 (en resultados). La pureza del compuesto se comprobó por CG-EM.

5.6 Selección del estándar interno.

Se ensayaron los siguientes compuestos mediante CG-EM, bajo las condiciones establecidas anteriormente, para determinar cuál serviría como estándar interno. A continuación se mencionan los compuestos utilizados durante el estudio.

- a) 2,5-dimetil-fenol
- b) 3,5-dimetil-fenol
- c) 2,4,6-trimetil-fenol
- d) 2,6-diterbutil-4-metil-fenol

De acuerdo a la relación entre los tiempos de retención de cada uno de los compuestos y el xantorizol, se seleccionó como estándar interno al que tuviera un tiempo de retención más cercano a él.

5.7 Determinación de la concentración de la solución de trabajo.

Se prepararon soluciones de xantorizol y estándar interno a distintas concentraciones, cada una se inyectó al cromatografo y se verificaron las respuestas; tomando en cuenta su respuesta y la relación entre el xantorizol y el estándar interno, se determinó la solución de trabajo, que se muestra en la figura 12 (Pág. 31)

5.8 Plan de trabajo para realizar la validación de la Técnica Analítica CG - EM

La figura 3, presenta en forma de diagrama de flujo el plan de trabajo propuesto para realizar la validación de la técnica analítica CG-EM para determinar la

cantidad de xantorrozol presente en la raíz de *I. heterophylla*. El diagrama fue propuesto en base a la importancia de cada parámetro requerido por la validación.

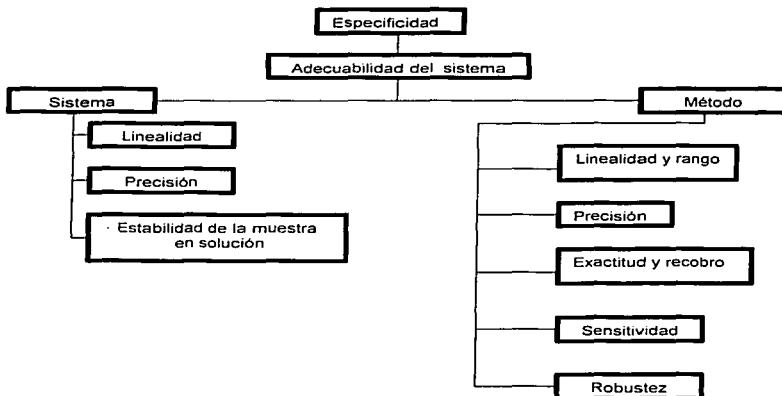


Figura 3.- Cuadro sinóptico que muestra el procedimiento a seguir para la validación.

5.9 Especificidad.

Se preparó una solución de 3 mg/mL (30 mg/ 10 mL) de xantorrozol, de la cual se tomaron alícuotas de 1 mL, las cuales fueron colocadas en 5 frascos, y a cada uno se le agregó 1 mL de metanol. Después, cada vial fue sometido a condiciones de estrés de acuerdo con el cuadro 2, esto con el fin de determinar si existe interferencia de compuestos de degradación con el analito principal.

Vial No.	Tratamiento	Tiempo de tratamiento
1	Temp. 70° - 120°C	Todos los viales se mantuvieron a temperatura ambiente y expuestos a la luz durante 1 mes. Con toma de muestra cada 7 días para monitorear su comportamiento.
2	Con ácido pH = 1-2	
3	Con álcali pH = 10-12	
4	Condiciones mediambientales (dentro del laboratorio)	
5	Condiciones oxidantes	

Cuadro 2.- Condiciones de estrés para degradar al xantorrizol.

5.10 Adecuabilidad del Sistema.

Se realizaron inyecciones repetidas en el cromatógrafo de gases de la solución de trabajo (3 mg / mL) de xantorrizol, durante un día. A partir de los cromatogramas obtenidos, se establecieron posteriormente las variables requeridas para ésta parte de la metodología, mostradas en el cuadro 3.

Parámetro	Límite
Factor de capacidad (k')	$k' > 2$
Resolución (R_s)	$R_s > 2$
Retención relativa (α)	---
Número de platos teóricos (N)	$N > 2000$
Factor de coileo o asimetría del pico (T)	$T \leq 2$
Repetibilidad de inyección	$n \geq 5, C.V. \leq 2\%$

Cuadro 3.-Variables requeridas para determinar Adecuabilidad del sistema.

5.11 Linealidad del sistema.

Solución estándar de Xantorizol.

Se pesaron 500 mg de xantorizol en un matraz aforado de 50 mL, y se llevó a volumen con metanol.

De la solución Stock se midieron alícuotas de 1, 2, 3, 4 y 5 mL; cada una se colocó en un matraz volumétrico 10 mL, por duplicado, para preparar las diferentes soluciones estándar. Los aforos se hicieron con metanol. Las concentraciones finales se presentan en el cuadro 4.

Solución estándar No.	Conc. xant (mg / mL)	Conc. std int (mg / mL)	Relación de conc. (xant / std int)
1	1	0.5	2
2	2	0.5	4
3	3	0.5	6
4	4	0.5	8
5	5	0.5	10

Cuadro 4. Diluciones para elaborar la curva estándar del xantorizol

Solución Stock de Estándar interno.

Se pesaron 125 mg de estándar interno en un matraz aforado de 25 mL, y se llevó a volumen con metanol.

De la solución Stock se tomaron alícuotas de 1 mL y se colocaron en cada uno de los matraces preparados para la curva estándar. Los aforos se hicieron con metanol. La concentración final de estándar interno en cada matraz se presenta en el cuadro 4.

La solución considerada como 100 % o solución de trabajo, es la solución central de la curva de calibración (3mg / mL).

Para esta parte se determinaron los siguientes parámetros:

- * Coeficiente de correlación $r^2 \geq 0.98$
- * Coeficiente de variación C.V. $\leq 2 \%$

5.12 Precisión del sistema.

La solución de trabajo de xantorrizol, se preparó por sextuplicado partiendo de la misma solución Stock y se determinó el coeficiente de variación (C.V. $\leq 2 \%$).

5.13 Estabilidad de la solución de la muestra.

Para determinar esta parte de la validación, la solución de trabajo se preparó tres veces, la primera disolución se dejó a temperatura ambiente durante 24 horas; la segunda disolución se refrigeró durante 24 horas a una temperatura de 8 °C; y por último la tercera disolución, se guardó en el refrigerador durante 48 horas, a la misma temperatura. Cada disolución se preparó por triplicado.

5.14 Linealidad del método

Se prepararon 3 soluciones de concentración 2, 3 y 4 mg / mL de xantorrizol, las cuales correspondieron al 70, 100 y 130 % de la concentración. Cada una de manera independiente y por triplicado.

Para esta parte se determinaron los siguientes parámetros:

- * Coeficiente de correlación $r^2 \geq 0.98$

*Coeficiente de regresión	$r^2 \geq 0.99$
*Coeficiente de variación	C.V. $\leq 2\%$
*Pendiente	$m \approx 1.0$
*Ordenada al origen	$b \approx 0$

5.15 Rango.

Este parámetro fue obtenido de la curva de la linealidad del método. Se realizó un análisis estadístico de cada concentración para determinar si cumplen con los requisitos de linealidad, precisión y exactitud.

5.16 Precisión del método.

Este parámetro involucra dos partes:

1 Repetibilidad.

1a).- De inyección: Se realizaron 10 inyecciones de la solución de trabajo.

1b).- Del análisis: Se tomaron los resultados obtenidos de diversas inyecciones realizadas de la disolución de la muestra.

2 Reproducibilidad.

2a).- Distinto día.

2b).- Distinto analista.

Para los dos apartados, se realizaron inyecciones repetidas de la solución de trabajo, y se efectuó el análisis estadístico correspondiente para determinar los resultados.

5.17 Exactitud y Recobro.

Para determinar este parámetro de acuerdo con los antecedentes, existe una sección que menciona lo siguiente: la exactitud puede ser inferida de la precisión, cuando la linealidad y la especificidad han sido establecidas, por ello, se toman los datos de precisión para justificar este apartado.

5.18 Sensibilidad.

Esta parte de la validación involucra dos parámetros:

I.- Límite de detección

II.- Límite de cuantificación

Solamente se hizo un estudio preliminar para el Límite de cuantificación, sin llegar a validar el resultado obtenido. Los resultados se muestran en la figura 18 (Pag. 48).

5.19 Robustez.

No se determinó, debido a que era necesario utilizar otro instrumento en el que fuera posible realizar las determinaciones. Además de que este tipo de pruebas requiere de un modelo multifactorial, en el cual el método se encuentra

completamente validado y es posible determinar algunos de los posibles factores que pueden modificar el análisis.

5.20 Determinación del contenido de xantorrizol en la raíz de la planta.

Para determinar el contenido de xantorrizol en la raíz de la planta se pesaron aproximadamente 3 g de material vegetal (raíz de la planta molida), los cuales se colocaron en un matraz erlenmeyer de 50 mL, se adicionaron 5 mL de metanol y se agitó la muestra en un sonicador durante 2 minutos. La mezcla se filtró directamente a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevó a volumen. Se tomaron 3 mL de la disolución anterior utilizando una pipeta volumétrica de 2 mL y una de 1 mL y se colocaron en un matraz volumétrico de 5 mL, después se le agregó al matraz de la muestra 1 mL de la solución de estándar interno y se llevó a volumen con metanol, se agitó para homogenizar y se inyectó al cromatógrafo de gases. La prueba se realizó 7 veces y con los resultados obtenidos se calculó el contenido de xantorrizol en la raíz vegetal.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1.- Estudios de prevalidación.

Los estudios de prevalidación nos permiten determinar y establecer todas aquellas condiciones necesarias para poder llevar a cabo un estudio de validación de manera confiable, y evitar en lo posible variaciones inesperadas durante el estudio. Estos estudios incluyen los puntos 6.1.1 al 6.1.4.

6.1.1.- Obtención de las condiciones de trabajo óptimas para el estudio.

De acuerdo con resultados obtenidos mediante cromatografía comparativa en placa fina de los extractos provenientes de la raíz (hexánico, clorofórmico y metanólico) se determinó que el extracto a utilizar para realizar la separación del compuesto de interés fue el metanólico, ya que en éste se logra obtener una mejor y mayor separación del xantorizol de los distintos componentes de la mezcla mediante cromatografía de gases (Figuras 4 y 5).

Se realizaron inyecciones del extracto metanólico en el cromatógrafo de gases y se verificó el comportamiento de separación, modificando las condiciones de temperatura y tiempo. El programa y las condiciones fueron ajustadas hasta lograr que los compuestos contenidos en la mezcla se separaran lo mejor posible, y así, lograr cuantificar al xantorizol.

El programa y las condiciones de los equipos se ajustaron de la siguiente manera:

a).-Para el cromatógrafo de gases:

- Temperatura del inyector: 300 °C
- Temperatura inicial del horno: 150 °C (durante 3 min.)
- Temperatura de la línea de transferencia: 300 °C
- Velocidad lineal del gas: 30 cm / s
- Relación split: 1 : 30
- Velocidad lineal de la columna: 0.92 mL / min

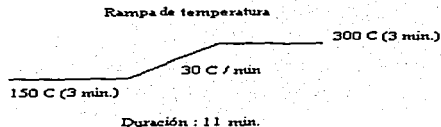
b).-Para el espectrómetro de masas:

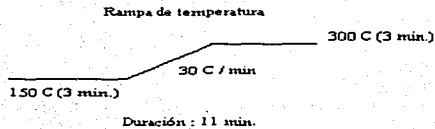
- Ionización electrónica (70 eV)
- Temperatura de la cámara de ionización: 300 °C
- Rango de masas: 33 a 800 u
- Estándar de calibración: Perfluorokeroseno
- Tiempo de encendido del filamento: 3 min

El programa de trabajo para el extracto y soluciones estándar fueron los siguientes:

a).-Para el extracto (tiempo de análisis: 11 min)

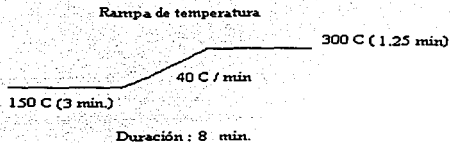
- Inicio : 150 °C / 3 min
- Calentamiento: 30 °C / min
- Término: 300 °C / 3 min





b).- Para las soluciones estándar (tiempo de análisis: 8 min)

- Inicio: 150 °C / 3 min
- Calentamiento: 40 °C / min
- Término: 300 °C / 1.25 min



La Figura 4 y 5 muestran los cromatogramas de los extractos clorofórmico y metanólico obtenidos mediante la técnica acoplada CG-EM, bajo las condiciones establecidas en los estudios previos.

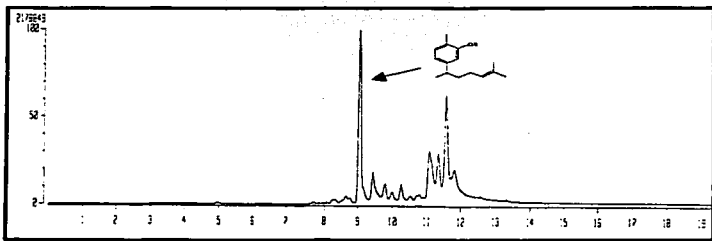


Figura 4.- Cromatograma iónico del extracto cloroformico obtenido mediante CG-EM.

Como se observa en la figura 4, el xantorrizol no se logra separa de los demás compuestos presentes en la mezcla, bajo las condiciones cromatográficas de trabajo.

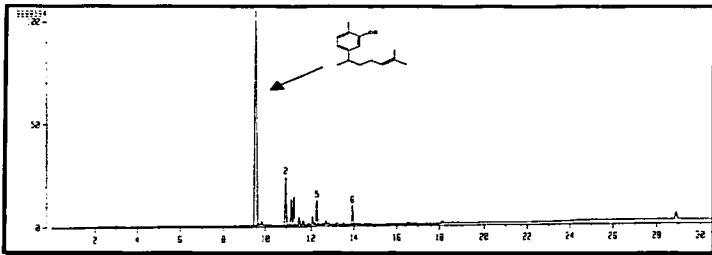


Figura 5.- Cromatograma iónico del extracto metanólico obtenido mediante CG-EM.

Como se observa en la figura 5, el xantorrizol aparece en mayor cantidad y separado en gran medida de los demás compuestos presentes en la mezcla. Por ello se eligió el extracto metanólico para determinar la cantidad del xantorrizol.

TESTS CON
FALLA DE ORIGEN

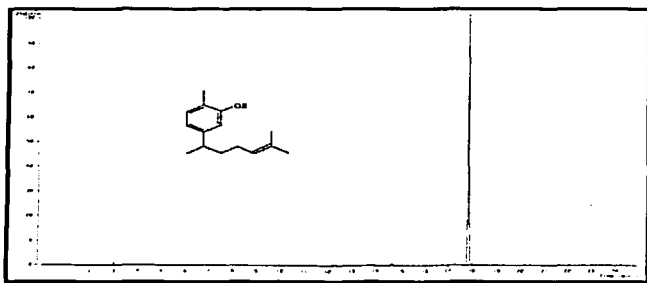


Figura 6. Cromatograma iónico del xantorrizol obtenido de la raíz de *Iostephane heterophylla* una vez purificado.

En la Figura 6, se observa únicamente el pico correspondiente al xantorrizol, el cual es obtenido mediante cromatografía de gases una vez purificado.

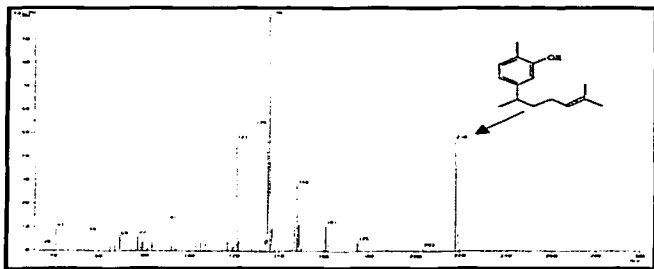


Figura 7. Espectro de masas por IE del xantorrizol (PM 218) obtenido mediante EM.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

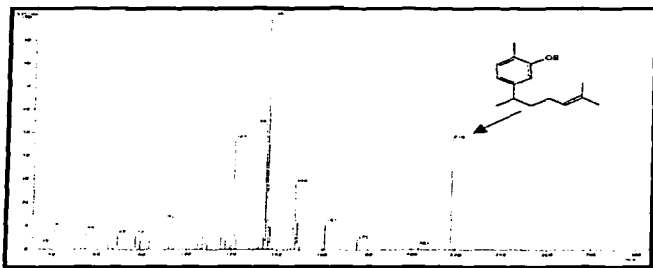


Figura 7. Espectro de masas por IE del xantorrizol (PM 218) obtenido mediante EM.

En la Figura 7, se observa el espectro de masas del mismo compuesto. La señal que se presenta con el más alto porcentaje en la figura, corresponde al fragmento de la molécula que se encuentra en mayor cantidad y el ión molecular es la señal con $m/z = 218$, con una intensidad del 45 % aproximadamente.

Para determinar y verificar la estructura del compuesto, se realizaron estudios posteriores de infrarrojo y resonancia magnética nuclear al xantorrizol una vez purificado. Los resultados de estos estudios se muestran a continuación.

La comparación de los datos de los espectros de las figuras 7, 8 y 9 con los reportados en la literatura¹ confirmaron que la identidad de este compuesto en estudio es la correcta, y que sirve como referencia para cuantificar al xantorrizol en la raíz de la materia vegetal dentro del estudio de validación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

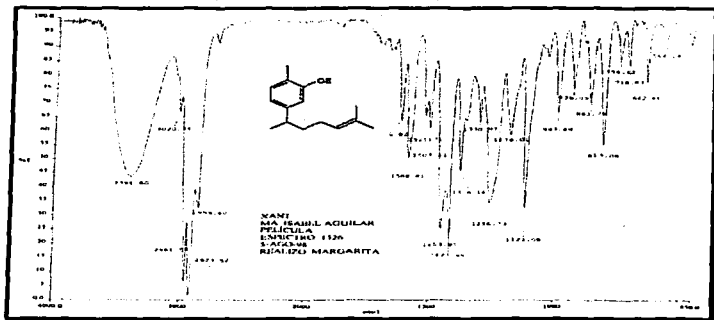


Figura 8. Espectro de IR del xantrozol obtenido mediante CC para su identificación.

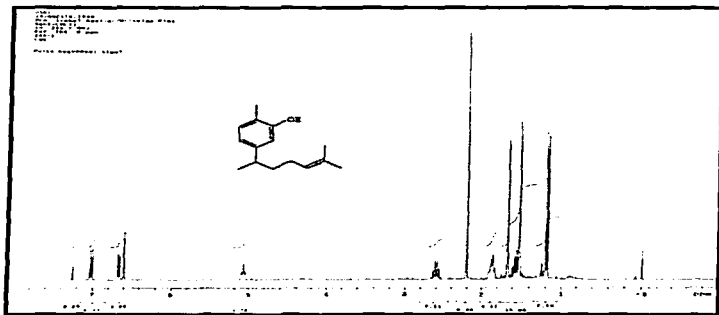


Figura 9. Espectro de RMN-¹H del xantorrozol obtenido mediante CC para su identificación.

6.1.3.- Selección del compuesto utilizado como estándar interno.

Una vez ensayados los diferentes compuestos para determinar el que sería utilizado como estándar interno, se determinó en base a su respuesta cromatográfica y tiempo de retención, que el compuesto a utilizar como tal, es el 2,6-diterbutil-4-metil fenol.

En seguida se muestran los resultados obtenidos mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas del 2,6-diterbutil-4-metil fenol (Figuras 10 y 11)

De igual manera, en la figura 10, se observa únicamente un pico, el cual corresponde al compuesto en cuestión. En la figura 11, se observa el espectro de masas del compuesto analizado, donde el ión molecular es la señal con $m/z = 220$, con una intensidad del 80 % aproximadamente.

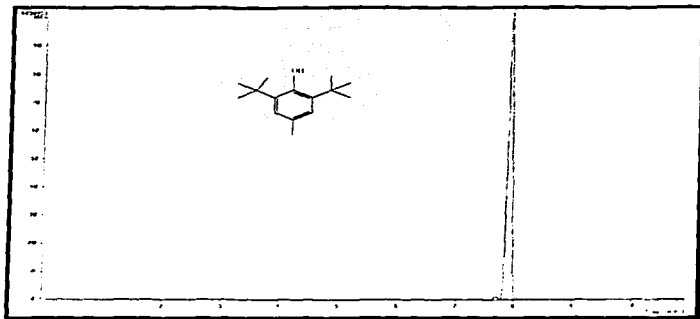


Figura 10. Cromatograma iónico del 2,6-ditebutil-4-metil fenol.

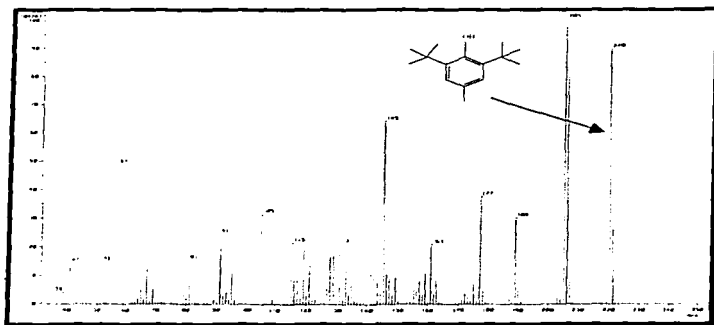


Figura 11. Espectro de masas por IE del 2,6-ditebutil-4-metil fenol (PM 220) obtenido mediante EM.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.1.4.- Obtención de las concentraciones de trabajo para preparar las soluciones estándar.

Se prepararon diversas soluciones conteniendo distintas concentraciones de xantorizol y de estándar interno, las cuales fueron estudiadas y revisadas para determinar en base a su respuesta y forma del espectro obtenidas mediante cromatografía de gases, cuál de ellas sería la mejor para poder trabajar durante el estudio.

En la figura 12 se muestra un espectro de la solución de trabajo obtenido mediante CG-EM.

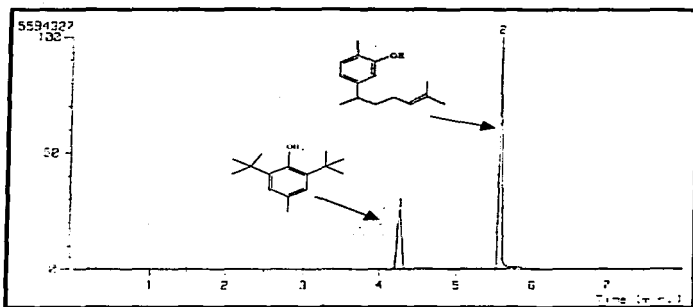


Figura 12. Cromatograma iónico del xantorizol y estándar interno; 1-estándar interno, 2-xantorizol.

6.2 Especificidad.

La especificidad es la capacidad de evaluar inequívocamente al analito en presencia de otros componentes, que se espera estén presentes en la muestra. Para ello, se trataron de distinta manera alícuotas de una muestra del xantorizol, para determinar la presencia de otros componentes que posiblemente se encontraran en la muestra por degradación del compuesto.

A continuación el cuadro 6, muestra los diferentes tratamientos a los cuales fue sometida la muestra de xantorizol, para determinar la influencia de diferentes condiciones y verificar la formación de compuestos de degradación.

Muestra No.	Alícuota (mL)	Condiciones de estrés	Duración del tratamiento
1	1	En una estufa a temp. de 70-120°C	Todos los viales se mantuvieron en tratamiento durante 1 mes, con toma de muestras cada 7 días
2	1	Con HCl pH = 1-2	
3	1	Con NaOH pH 10-12	
4	1	A temperatura ambiente	
5	1	Con H ₂ O ₂ al 30%	

Cuadro 5.- Diferentes tratamientos realizados a la muestra de xantorizol

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos de los diferentes tratamientos se presentan en las figuras 13a y 13b, por medio de los cromatogramas obtenidos de la muestra sometida a condiciones de alta temperatura, esto es, la muestra fue colocada en una estufa de control de temperatura y se mantuvo aproximadamente a 100 °C durante todo el tiempo que duró el tratamiento. El disolvente del frasco de la muestra se eliminó previamente al análisis cromatográfico.

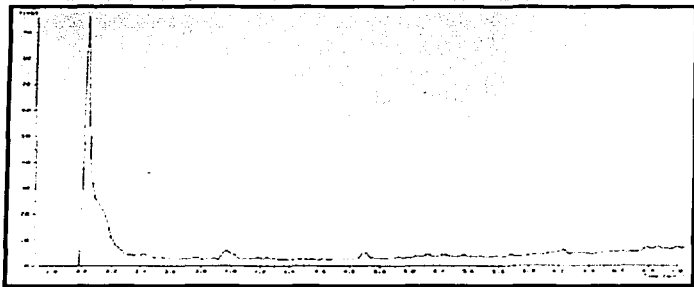


Figura 13a. Cromatograma iónico obtenido del blanco de reactivo.

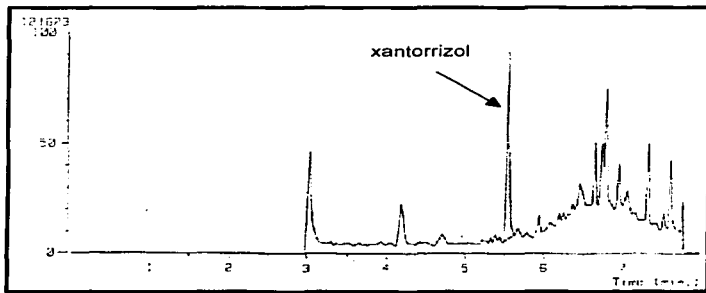


Figura 13b. Cromatograma iónico del extracto sometido al tratamiento de alta temperatura.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Aunque en la Figura 13b se observa una serie de picos, el pico principal aparece separado de los demás (t_r aprox. 5.5 min), dado que se tuvieron problemas para redissolver la muestra, aparecen todos los picos muy cerca de la línea basal, pero comparado este cromatograma con el del blanco de reactivo, comprobamos que todos estos picos pertenecen al extracto.

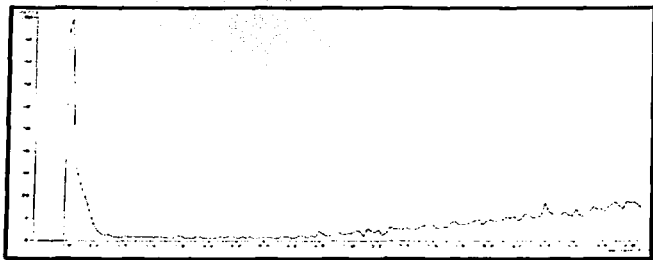


Figura 14a. Cromatograma iónico obtenido del blanco de reactivo.

En las figuras 14a y 14b se presentan los cromatogramas obtenidos de la muestra sometida a condiciones de acidez, esto es, a la muestra disuelta en metanol

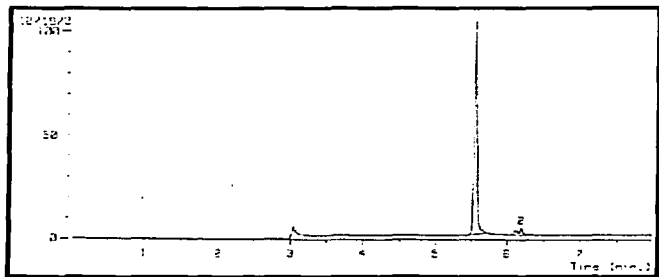


Figura 14b. Cromatograma iónico del extracto sometido a condiciones de acidez.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resultados y discusión

se agregó una alícuota de ácido clorhídrico para obtener un pH entre 1 y 2, dejando reposar la mezcla durante el tiempo de tratamiento y agitando esporádicamente. En el cromatograma anterior se observan dos picos pequeños, que probablemente correspondan a compuestos de degradación del xantorrizol, pero no se consideraron de importancia, ya que aparecen muy separados del pico principal y por lo tanto no presentan interferencia, al momento de realizar el análisis de masas del pico principal, además de que su cantidad es muy pequeña.

En las figuras 15a y 15b se presentan los cromatogramas obtenidos de la muestra sometida a condiciones de basicidad, esto es, a la muestra disuelta en metanol se le agregó una alícuota de hidróxido de sodio para obtener un pH entre 11 y 12, dejando reposar la mezcla durante el tiempo de tratamiento y agitando esporádicamente.

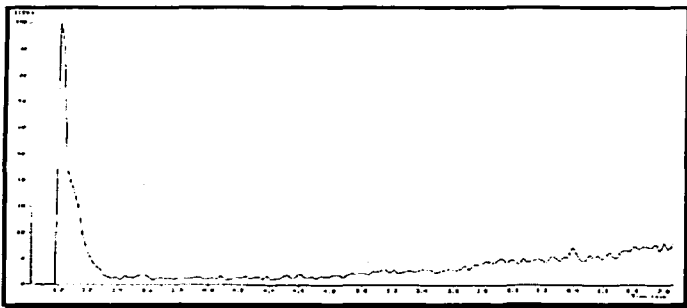


Figura 15a. Cromatograma iónico obtenido del blanco de reactivo.

En la figura 15b, se observa que al final del pico principal aparece un pico muy pequeño, cuya identidad no fue posible determinar por ser tan pequeño y aparecer casi encimado con el pico principal.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

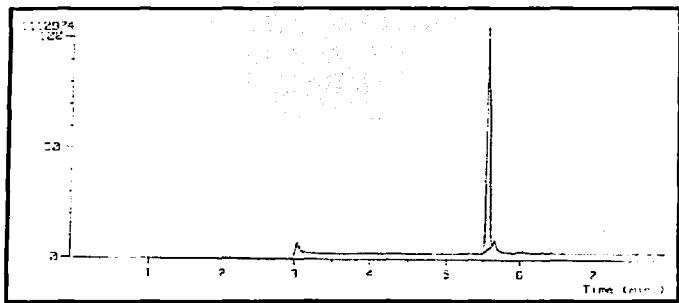


Figura 15b. Cromatograma iónico del extracto sometido a condiciones de basicidad.

En las figuras 16a y 16b se presentan los cromatogramas obtenidos de muestra sometida a condiciones medioambientales, esto es, la muestra solamente disuelta en metanol

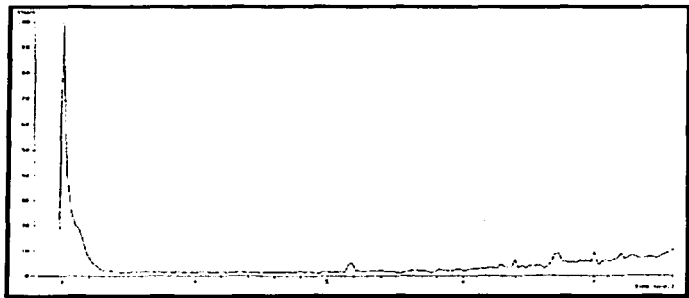


Figura 16a. Cromatograma iónico obtenido del blanco de reactivo.

Resultados y discusión

se deja reposando sobre una mesa dentro del laboratorio procurando que se exponga a la luz natural, dejándola reposar durante el tiempo de tratamiento y agitando esporádicamente.

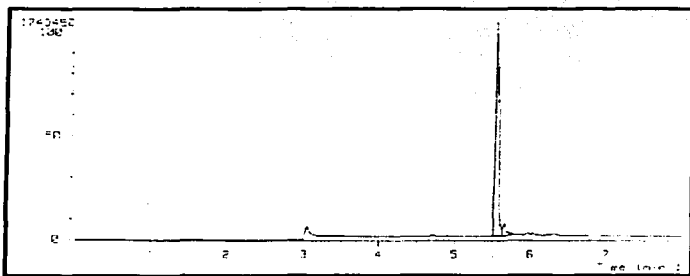


Figura 16b. Cromatograma iónico del extracto sometido a condiciones medioambientales.

En la figura anterior de igual manera se observa un pico muy pequeño, casi encimado con el pico principal, debido a esto, tampoco fue posible determinar con seguridad la identidad de este pico.

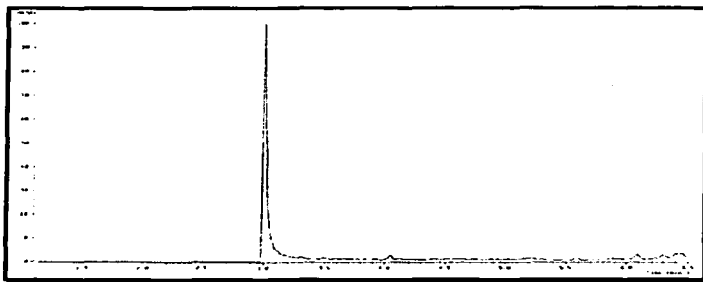


Figura 17a. Cromatograma iónico obtenido del blanco de reactivo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En las figuras 17a y 17b se presentan los cromatogramas obtenidos de muestra sometida a condiciones de oxidación, esto es, a la muestra disuelta en metanol se le agrega una alícuota de agua oxigenada al 30 % y es expuesta a la luz natural, dejando reposar la mezcla durante el tiempo de tratamiento y agitando esporádicamente.

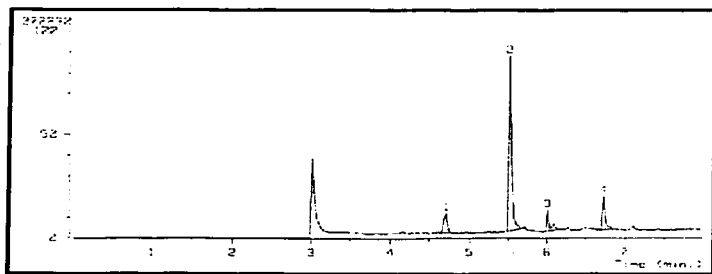


Figura 17b. Cromatograma iónico del extracto sometido a condiciones oxidantes.

En la figura 17b, se puede observar que la muestra se ve afectada considerablemente por condiciones oxidantes, lo que se comprueba al observar la presencia de diferentes picos en el cromatograma (el No.2 es el xantorizol).

6.3 Adecuabilidad del Sistema.

A partir de los cromatogramas obtenidos de la solución la cual contiene al xantorizol y al estándar interno, y de diferentes inyecciones realizadas durante un día se calcularon todos los parámetros requeridos en este apartado, ya que se muestran en los cuadros 6 y 7.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resultados y discusión

Variable requerida	Resultado	Variable requerida	Resultado
t_0	1.34 min.	w_1 (Est. Int)	3.48 seg.
t_1 (Est Int)	4.25 min.	w_2 (Xant)	2.34 seg.
t_2 (Xant)	5.57 min	$W_{0.05}$ (Xant)	1.17 seg.
f (Xant)	1.17 seg.		

Cuadro 6. Resultados de las variables requeridas para determinar los parámetros de adecuabilidad del sistema.

Parámetro	Resultado	Limite
Factor de capacidad (k')	3.16 (Xant)	$k' > 2$
	2.17 (Est. Int)	
Resolución (R_s)	4.54	$R_s > 2$
Retención relativa (α)	0.69	---
Número de platos teóricos (N)	9066	$N > 2000$
Factor de coleo o asimetría del pico (T)	0.5	$T \leq 2$
Repetibilidad de inyección	$n = 10$	$n \geq 5$
	C.V. = 1.5 %	C.V. ≤ 2 %

* Todos los resultados obtenidos de los parámetros presentados en la tabla, se refieren a la señal del Xantrozol.

Cuadro 7.-Resultados para la adecuabilidad del sistema

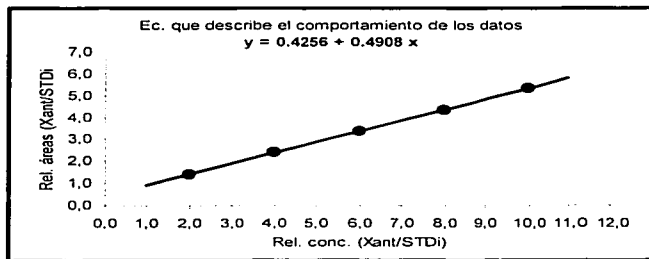
6.4 Linealidad del sistema.

Para determinar este parámetro se realizó una curva de calibración a partir de soluciones de distinta concentración, preparadas a partir de una solución Stock, y realizadas cada una por triplicado.

Rel. conc. (Xant /STDint)	Rel. Areas (Xant / STD int)		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
2	1.38	1.48	1.24
4	2.46	2.60	2.39
6	3.34	3.38	3.46
8	4.18	4.18	4.20
10	5.40	5.45	5.42

Cuadro 8. Curva de calibración para determinar linealidad del sistema.

En el Cuadro 8, se muestran los resultados obtenidos de las tres curvas realizadas. Se realizó el análisis estadístico de acuerdo con la Guía del Colegio de QFB's utilizando el programa de Microsoft Excel para realizar los cálculos, del cual obtuvimos los siguientes resultados: $r = 0.9966$ y $r^2 = 0.9931$, donde $b = 0.4256$ y $m = 0.4908$. Además se muestra el comportamiento de los datos obtenidos para determinar la linealidad del sistema en la grafica 1. También se determinaron los parámetros estadísticos como: desviación estándar y coeficiente de variación, mostrando los siguientes resultados: $d. s. = 0.0655$ y un $C.V. = 11.1400 \%$.



Grafica 1. Resultados de Linealidad del sistema

6.5 Precisión del sistema.

La precisión del sistema es el grado de concordancia entre un grupo de resultados y el valor esperado. El ensayo se realiza por sextuplicado y se calculan las variables estadísticas mencionadas en la metodología. Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 9.

Solución No.	Rel. Áreas (Xant / STD int)	Resultados	Límites
1	3.77	$\bar{x} = 3.68$ $\sigma = 0.05$ C.V. = 1.4 %	n = 6 C.V. \leq 2 %
2	3.65		
3	3.63		
4	3.68		
5	3.70		
6	3.65		

Cuadro 9. Resultados para precisión del sistema.

Los cálculos para este apartado también se realizaron de acuerdo a la Guía del Colegio de QFB's, y utilizando el mismo programa de Microsoft Excel para obtener los resultados mostrados en el Cuadro 9.

Los datos anteriores muestran que los resultados cumplen con los criterios para la precisión.

6.6 Estabilidad de la muestra en disolución.

Esta prueba debe ser evaluada después de la preparación de la muestra para tomar en cuenta posibles cambios que pueda sufrir la solución durante determinado tiempo.

Resultados y discusión

En el Cuadro 10, se presentan los resultados obtenidos para esta prueba.

Solución No.	Conc. Xant (%)	Inicio Durante el análisis (Xant/Std int)	P1 24 Horas / Refrig. (Xant/Std int)	P2 48 Horas / Refrig. (Xant/Std int)	Límites
1	100	2.40	2.42	2.49	La diferencia de los promedios debe pasar por cero. El promedio debe estar dentro del intervalo de 95 – 105 %
2	100	2.18	2.17	2.15	
3	100	2.64	2.67	2.69	

P= prueba

Cuadro 10. Resultados para estabilidad de la muestra en disolución.

De acuerdo con los resultados obtenidos la prueba cumple con las especificaciones requeridas para este parámetro.

El Cuadro 11, muestra los resultados obtenidos del análisis estadístico realizado a cada una de las muestras.

Solución No.	P1	P2	Resultados
1	100.8	103.8	I.C. _{P1} = 0.0133 ± 0.4582 \bar{x} = 100.5
2	99.5	98.6	I.C. _{P2} = 0.0366 ± 0.4814
3	101.1	101.9	\bar{x} = 101.42

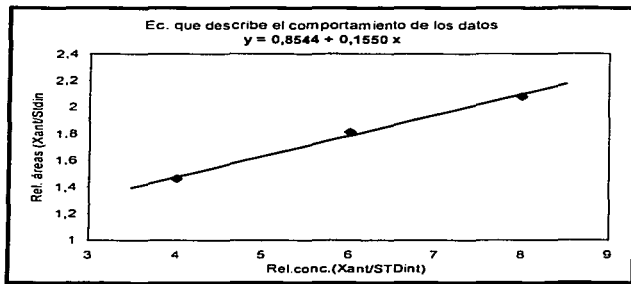
Cuadro 11. Resultados del análisis estadístico realizado a cada solución muestra.

6.7 Linealidad del método.

La linealidad de un método analítico, es la habilidad de asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directa o indirectamente por transformaciones matemáticas bien definidas, son proporcionales a la concentración de la sustancia (analito de interés) dentro de un intervalo determinado. Para ello, se prepararon tres soluciones correspondientes al 80, 100 y 115% de la concentración del xantorrizol. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 12, y su comportamiento se muestra en la grafica 2.

Rel. conc. (Xant /STDint)	Rel. Areas (Xant / STD int)		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
4	1.48	1.46	1.44
6	1.82	1.82	1.80
8	2.08	2.08	2.08

Cuadro 12. Curva de calibración para determinar linealidad del método.



Gráfica 2. Resultados de linealidad del método

En el cuadro anterior se muestran los resultados obtenidos de las tres curvas realizadas. Se realizó el análisis estadístico de acuerdo con la Guía del Colegio de QFB's utilizando el programa de Microsoft Excel para realizar los cálculos, del cual obtuvimos los siguientes resultados: $r = 0.9958$ y $r^2 = 0.9917$, donde $b = 0.0.8544$ y $m = 0.1550$. También se determinaron los parámetros estadísticos como: desviación estándar y coeficiente de variación, mostrando los siguientes resultados: $d. s. = 0.0529$ y un $C.V. = 17.1166 \%$.

6.8 Precisión del método.

La determinación de esta parte de la validación se realizó a dos niveles:

1. Repetibilidad de

- Análisis
- Inyección

2. Reproducibilidad

- Distinto analista
- Distinto día

Los resultados obtenidos para estos dos niveles cumplen con los límites establecidos y se muestran en los siguientes cuadros.

En el Cuadro 13, se observa que los resultados para Repetibilidad del análisis cumplen con las especificaciones.

Inyección No.	Rel. Areas (Xant / STD int)	Resultado	Límites
1	1.87	$\bar{x} = 1.83$	n = 6
2	1.82		
3	1.82	$\sigma = 0.03$ C.V. = 1.8 %	C.V. $\leq 2 \%$
4	1.80		
5	1.81		
6	1.88		

Cuadro 13. Resultados para repetibilidad del análisis.

Resultados y discusión

En el Cuadro 14, se observa que la repetibilidad de inyección. De igual manera cumple con las especificaciones.

Inyección No.	Rel. Áreas (Xant / STD int)	Resultado	Límites
1	2.05	$\bar{x} = 2.04$ $\sigma = 0.03$ C.V. = 1.51 %	$n \geq 5$ C.V. $\leq 2\%$
2	2.05		
3	2.06		
4	2.00		
5	2.09		
6	2.06		
7	2.07		
8	2.01		
9	2.03		
10	2.00		

Cuadro 14. Resultados para repetibilidad de inyección.

Los resultados que se muestran en el Cuadro 15 corresponden a la reproducibilidad. De igual manera se observa que cumplen con las especificaciones.

	Analista I	Analista II	Resultados	Límites
Día I	2.30	2.32	$\bar{x} = 2.35$ $\sigma = 0.0302$ C.V. = 1.3 %	C.V. $\leq 2\%$
	2.36	2.36		
	2.36	2.37		
Día II	2.39	2.37		
	2.35	2.38		
	2.30	2.34		

Cuadro 15. Resultados para reproducibilidad del método.

6.9 Rango.

Este parámetro analiza los resultados realizados a tres niveles, los cuales deben estar dentro del intervalo de linealidad. En este caso se analizaron las concentraciones correspondientes al 66, 100 y 133 %, debido a que no era posible preparar las soluciones al 70 y 130 %, como se indica en los antecedentes.

Cada concentración debe cumplir con los parámetros de linealidad, precisión y exactitud. Los resultados se muestran en el Cuadro 16.

Rel. conc. (Xant / STD int)	Concentración (%)	Resultados entre replic.	Límites
4	66	$x = 1.46$ $\sigma = 0.0200$ C.V. = 1.37 %	Cada concentración debe cumplir con Linealidad, precisión y exactitud C.V. ≤ 2 % 70 – 130 %
6	100	$x = 1.81$ $\sigma = 0.0115$ C.V. = 0.64 %	
8	133	$x = 2.08$ $\sigma = 0$ C.V. = 0 %	

Cuadro 16. Resultados del análisis estadístico realizado a las muestras de linealidad del método.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el cuadro anterior, podemos ver que cada nivel cumple con las especificaciones.

6.10 Exactitud y Recobro.

De acuerdo con uno de los apartados en la descripción de exactitud (Anexo): La exactitud puede ser inferida de la precisión, cuando la linealidad y la especificidad han sido establecidas. Decimos que el método cumple con este parámetro y utilizamos los resultados de precisión para demostrarlo, los cuales se presentan en el Cuadro 17.

Inyección No.	Concentración (%)	Resultado	Límites
1	102.2	$\bar{x} = 100.2$	$n = 6$
2	99.5		C.V. $\leq 2 \%$
3	99.5	$\sigma = 1.7978$	El promedio debe estar
4	98.4		dentro del
5	98.9	C.V. = 1.8 %	intervalo
6	102.7		98 - 102 %

Cuadro 17.- Resultados para exactitud.

6.11 Sensibilidad.

Para esta prueba solo se realizó una estimación aproximada del límite de cuantificación, sin ser validado. A continuación en la Figura 18, se muestra el cromatograma obtenido, en el que se aprecia como número 1 al estándar interno y número 2 al xantorizol.

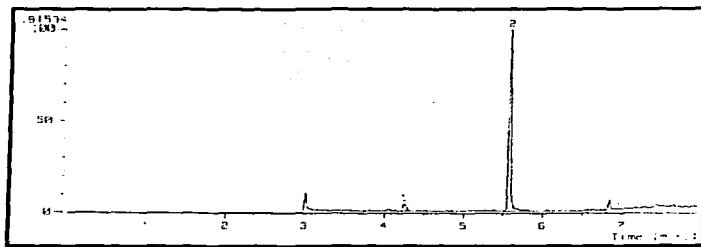


Figura 18. Cromatograma iónico obtenido para límite de cuantificación.

6.12 Determinación del contenido de Xantorrizol en la Raíz de la planta.

Después de haber realizado algunas pruebas para validar la metodología empleada, se determinó la cantidad del compuesto contenido en la raíz de la planta. Para ello se procedió como se menciona en la metodología y los resultados se muestran en el Cuadro 18.

Muestra No.	Peso (g) de Raíz	Rel. Prom. áreas (Xant / STD int)	C_{Xant} (mg Xant / g Raíz)	Resultados
1	3.0037	3.24	15.8299	$\bar{x} = 15.5501$ $I.C. = \pm 0.5012$ $\sigma = 0.5419$ $C.V. = 3.4850 \%$
2	3.0027	3.05	14.7623	
3	3.0035	3.18	15.5487	
4	3.0039	3.16	15.4338	
5	3.0032	3.34	16.4536	
6	3.0025	3.21	15.7233	
7	3.0031	3.10	15.0991	

Cuadro 18. Resultados de la determinación de la cantidad de xantorrizol contenido en la raíz de la planta medicinal *Iostephane heterophylla*.

Para determinar la cantidad de Xantorizol contenido en la muestra de raíz utilizada para el estudio, se utilizó la siguiente ecuación:

$$C_{xant} = \frac{((A_{xant} / A_{std \text{ int}}) - a) (C_{std \text{ int}})}{(F_{rr})} \times \frac{F_{dil}}{g(Raíz)}$$

Esta expresión responde a la ecuación de la línea recta obtenida en la linealidad del sistema e involucra el factor de dilución y la cantidad de muestra utilizada en el ensayo. Donde A_{xant} y $A_{std \text{ int}}$ son las áreas del xantorizol y estándar interno obtenidas de los espectros, C_{xant} y $C_{std \text{ int}}$ son las concentraciones del

xantorizol y estándar interno en la solución, a es la ordenada al origen (distinta de cero), F_{rr} es la pendiente de la curva de calibración, F_{dil} es el factor de dilución de la muestra y g es la cantidad en gramos de raíz utilizada.

7. CONCLUSIONES

➤ Después de haber realizado las pruebas necesarias para validar la metodología analítica acoplada Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas como procedimiento útil para cuantificar al xantorrizol contenido en el extracto metanólico de *Iostephane heterophylla*, se pudo observar que cada una de esas pruebas cumple con las especificaciones que son requeridas. Sin embargo, se observaron algunas diferencias en los resultados de precisión y exactitud en cuanto al valor considerado como central del estudio (3 mg/mL de xantorrizol); posiblemente una de las causas por las cuales se presentan estas variaciones, es que la materia prima utilizada como estándar para llevar a cabo el estudio (xantorrizol), se tenía que obtener al momento del ensayo, debido a que no era posible purificar una gran cantidad de xantorrizol, por la degradación natural que sufre. Esta situación podría resolverse si se extrae una cantidad suficiente del compuesto, para realizar todo el estudio de cuantificación.

➤ En la prueba de Especificidad se observó que a las condiciones a las que fue sometido el compuesto por altas temperaturas y de oxidación, causan gran degradación del xantorrizol, mientras que éste se encuentra más estable frente a los tratamientos con medio ácido y básico, así como en las condiciones medioambientales, a pesar de que en los cromatogramas de estas tres últimas pruebas se pueden observar pequeños picos, los cuales aparecen muy pegados al pico principal correspondiente al xantorrizol.

➤ En la prueba de Adecuabilidad del sistema se pudieron determinar todos los parámetros requeridos, cumpliendo cada uno con los límites establecidos por la metodología.

- Las pruebas de Linealidad del Sistema y Linealidad del Método, cumplen con todos los parámetros requeridos por la metodología, excepto con el Coeficiente de Variación. Existe una variación muy grande en los dos resultados, que salen del límite establecido. Es necesario realizar más pruebas, para determinar la causa de esta variación.
- Para las pruebas de Precisión del Sistema y Precisión del Método con sus respectivas pruebas como son Repetibilidad y Reproducibilidad, además de la Exactitud del Método, los resultados de los cálculos muestran que cumplen con los criterios considerados aceptables.
- En la prueba de Estabilidad de la Muestra en Solución, los resultados obtenidos indican que cumple con los límites establecidos, por lo que podemos considerar que la solución de la muestra puede mantenerse en refrigeración para su conservación durante un tiempo máximo de 48 horas.
- Los resultados obtenidos para determinar el Rango muestran que éstos se encuentran dentro de los límites requeridos, considerando como resultado final un Rango del 66 al 133%, el cual cumple con Linealidad, Precisión y Exactitud para este intervalo de valores.
- En el apartado de Sensibilidad, sólo se realizó una prueba para determinar el Límite de Cuantificación, sin llegar a validar este valor, debido a que no era indispensable realizar la determinación de este parámetro, ya que, las concentraciones manejadas son en gran medida mayores al ruido.
- Mediante el método validado CG-EM se calculó un promedio de **15.5501 ± 0.5012 mg** de xantorrizol por gramo de raíz de *Iostephane heterophylla*.

➤ La mayoría de los parámetros determinados para validar la técnica analítica acoplada Cromatografía de gases – Espectrometría de masas, cumplen con los límites establecidos por la metodología propuesta. Aunque en algunos casos existen ciertas discrepancias en algunos resultados, se puede concluir que la metodología propuesta es adecuada a la muestra en cuestión y nos permite determinar la cantidad del compuesto en estudio con la seguridad de obtener resultados confiables.

➤ Debido a que el xantorrizol es un compuesto de origen vegetal, es necesario seguir realizando pruebas con la materia prima de partida y considerar los diferentes factores que pueden influir en el análisis de este tipo de muestras, y lograr con ello impulsar este tipo de metodologías para que puedan ser útiles en estudios posteriores de muestras procedentes de fuentes naturales o de naturaleza química similar.

➤ El método empleado para cuantificar al xantorrizol contenido en la raíz de *Iostephane heterophylla* mediante la técnica CG-EM, es más selectivo, comparado con el método espectrofotométrico ensayado en trabajos previos, ya que en nuestro caso se determinó un solo compuesto. Por otra parte, la precisión de los resultados es mayor, al emplearse en este método un estándar interno.

➤ Puede considerarse este estudio como un complemento para las pruebas y estudios previamente realizados a la planta. Considerando que el trabajo está enfocado a la cuantificación de un solo compuesto, el cual, es el mayoritario y responsable de la actividad biológica.

➤ El uso de la Cromatografía de Líquidos de alta resolución (HPLC) podría representar otro método alternativo para la cuantificación del xantorrizol en la raíz de *Iostephane heterophylla* y poder estandarizar los preparados de la planta.

➤ El xantorizol constituye una sustancia químicamente definida, característica de la especie de su género, que en un estado aislado ejerce un efecto similar al efecto terapéutico del extracto total. Por lo anteriormente expuesto, puede considerarse como el "principio activo antiséptico y mayoritario" de la especie que podría utilizarse para estandarizar los preparados de la raíz y al mismo tiempo, considerarse como uno de los constituyentes terapéuticamente activos (Gaedck, 3003).

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Ríos López, G. Tesis de maestría "Control de calidad de una droga de origen vegetal: *Iostephane heterophylla* (Cav.) Hemsl." Facultad de Química, UNAM. 2000.
2. Bye, R. (1986) Medicinal Plants of the Sierra Madre: Comparative Study of Tarahumara and Mexican Market Plants. *Economic Botany*, **40(1)**, pp 103-124.
3. Argueta, V.A., Cano, A. L., y Rodarte M. E. Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Vol II, primera edición, INI México 1994, pp 772.
4. Martínez, M. Las plantas medicinales de México, sexta edición, Editorial Botas, 1989, pp 279.
5. Aguilar, M. I., Delgado, G., Bye, R. and Linares, E. (1993) Bisabolene, polycyclic diterpenoids and other constituents from the roots of *Iostephane heterophylla*. *Phytochemistry*, **33**, pp 1161-1163.
6. Mata, R., Martínez, E., Bye, R., Morales, G., P. Singh, M., E. Janso, J., M. Maiese, W., and Timmermann, B. (2001) Biological and Mechanistic Activities of Xantorrizol and 4-(1',5'-Dimethylhex-4'-enyl)-2-methylphenol Isolated from *Iostephane heterophylla*. *Journal of Natural Products*, **64**, pp 911-914.
7. Aguilar, M. L., Delgado, G. and Villareal, M. L. (2001) New Bioactive Derivatives of Xantorrizol. *Revista de la Sociedad Química de México*, **45** (2), pp 56-59.

8. Aguilar, M. L., Delgado, G., Hernández, M. L. and Villareal, M. L. (2001) Bioactive Compounds from *Iostephane heterophylla* (Asteraceae). *Natural Products Letters*, **15** (2), pp 93-101.
9. Ponce-Monter, H., Campos, M. G., Aguilar I. and Delgado, G. (1999) Effect of xanthorrhizol, xanthorrhizol glycoside and trachylobanoic acid isolated from the cachani complex plants upon the contractile activity of uterine smooth muscle. *Phytotherapy Research*, **13**, pp 1-4.
10. Campos, M. G., Oropeza, M. V., Villanueva, T., Aguilar, M. I., Delgado, G. and Ponce-Monter, H. (2000) Xanthorrhizol induces endothelium-independent relaxation of rat thoracic aorta. *Life Sciences*, **67**, pp 327-333.
11. Rimpler, H., Hansel, R., Kochendoerffer, L. (1970) Xanthorizol, ein neues sesquiterpens aus *Curcuma Xanthorrhiza*. *Naturforsch*, **25B**, pp 995.
12. Aguilar, M. I., Delgado, G. (1995) Novel bisabolene glycoside and other constituents from the medicinal plant *Iostephane heterophylla* (Asteraceae). *Journal of Natural Products*, **7**, pp 155-162.
13. Shafizadeh, F. and Melnikoff, A. B. (1970) Coumarins of *Artemisia tridentata* ssp. *Vaseyana*. *Phytochemistry*, **9**, 1311-1316.
14. Ballantyne, M., McCabe, P. H. and Murray, D. H. (1971) Claisen Rearrangements-II. Synthesis of six natural Coumarins. *Tetrahedron* **27** 871.
15. Dean, F. M. and Parton, B. (1969) The Structure and Synthesis of (+)-Obliquin. *J. Chem. Soc. (c)*, 526.

16. Bohlmann, F. and Jakupovic, J. (1978) Über neue Chromene und andere Inhaltsstoffe von *Lagascea rigida*. *Phytochemistry* **17**, 1677-1678.
17. Pyrek, J. (1970) New Pentacyclic Diterpene Acid. Trachyloban-19-oic from Sunflower. *Tetrahedron* **26** 5029-5032.
18. Herz, W. Kulanthaivel, P. and Watanabe, K. (1983) *Ent*-kauranes and other constituents of three *Helianthus* species. *Phytochemistry*, **22**, 2021-5.
19. Bohlmann und Le Van Ngo. (1977) Neuen Kaurensäure-derivative aus *Wedelia*-arten. *Phytochemistry* **16**, 579-81.
20. Henrick, C. K and Jefferies, P. R. (1964) The Diterpenes of *Ricinocarpus stylosus* Diels. *Australian Journal of Chemistry* **17**, 915-33
21. Herz, W. and Sharma R. P. (1976) New Hydroxilated *ent*-Kauranoic Acids from *Eupatorium album*. *Journal of Organic Chemistry* **41**, 1021-6.
22. Hertz, W., Govindan, S. V. and Watanabe, K. (1982) Diterpenes of *Helianthus rigidus* and *H. salicifolius*. *Phytochemistry* **21**, 946-947.
23. Oberti, J. C.; Pomilio, B. and Gros, E. (1980) Diterpenes and Sterols from *Wedelia glauca*. *Phytochemistry* **19**, 1051-2.
24. Ohno, N. Gershenzon, J., Neuman, P. and Mabry, T. J. (1981) Diterpene Carboxylic Acids and a Heliangolide. *Phytochemistry* **20**, 2393.
25. Stahl, E. (1969) Thin Layer Chromatography. Academic Press Inc., New York.

26. Validation of Analytical Procedures: Definition and Terminology. Guidance for Industry # 63, July 1999.
27. Validation of Analytical Procedures: Methodology. Guidance for Industry # 64, July 1999.
28. Validation of Chromatographic Methods. Reviewer Guidance, CDER, November 1994.
29. Guía Oficial de validación del Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos. DGIS, SSA. 1992.
30. USP 23, 1995; « 1255», « 621».
31. Bressolle, F., Bromet- Detit, M., Audran, M., Validation of liquid Chromatographic and Gas Chromatographic Methods, Applications to Pharmacokinetics. *Journal of Chromatography B*, 686 (1996): 3-10.
32. Guideline for Submitting Samples and analytical Data for Methods Validation, FDA. February, 1987.
33. FEUM , 7ª ed. 2000: 1721-1745.
34. European Pharmacopoeia, 3th ed. 1997; 2.2.28.
35. The Validation of Analytical Procedures Used in the Examination of Pharmaceutical Materials. WHO / PHARM / 89.541 / Rev. 2.

36. Jenke Dennis R., Development and Validation of an Ion-Exclusion Chromatographic Methods for the Quantitative of Organic Acids in Complex Pharmaceuticals Products. *Journal of Chromatographic Science*, 36 (1998).
37. Hokanson, G. C. A life Cycle Approach to the Validation of Analytical Methods during Pharmaceutical Product Development, Part I: The Initial Method Validation Process. *Pharmaceutical Technology*, 118-130 (September, 1994).
38. Hokanson, G. C. A life Cycle Approach to the Validation of Analytical Methods during Pharmaceutical Product Development, Part II: Changes and the Need for Additional Validation. *Pharmaceutical Technology*, 92-100 (October, 1994)
39. Harris, D. C. *Análisis Químico Cuantitativo*. Grupo Editorial Interamericana S. A. de C. V., México D.F., 1992.
40. Wade, Jr. L. G. *Química Orgánica*, 2ª edic. Prentice Hall Hispanoamericana, S. A. México D.F., 1992.

9. ANEXO

PROCEDIMIENTO ANALÍTICO Y VALIDACIÓN²⁷

Un procedimiento analítico se refiere al camino elegido para realizar un análisis. Este debe describir en detalle los pasos necesarios para realizar cada una de las pruebas analíticas, puede incluir pero no limitarse a la muestra, la referencia estándar y la preparación de los reactivos, uso de instrumentación analítica, generación de curvas de calibración, uso de formulas de cálculo, etc²⁶.

Para poder utilizar un procedimiento analítico dado, es necesario que éste se encuentre avalado por un organismo oficial encargado de emitir los procedimientos analíticos como la USP, la FEUM, la FDA, etc., pero en caso de no contar con un procedimiento analítico oficial, es posible realizar la validación del método que se propone para analizar una muestra.

El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que éste es adecuado para el propósito deseado. Aunque existen diversos tipos de procedimientos analíticos para analizar una muestra, los más comunes son^{26,27}:

- Pruebas de identificación
- Pruebas cuantitativas para el contenido de impurezas
- Pruebas de límites para el control de impurezas
- Pruebas cuantitativas para el compuesto principal en muestras de fármacos, medicamentos u otros componentes seleccionados en un producto farmacéutico.

A continuación se mencionarán los parámetros necesarios que se deben considerar para la validación de un método analítico.

9.1.- Especificidad^{26,27,28,33,37,38}

Es la capacidad de evaluar inequívocamente al analito en presencia de otros componentes, los cuales, se espera que estén presentes en la muestra.

La especificidad, es una medida del grado de interferencias (o ausencia de éstas) que pueden existir durante el análisis de una muestra compleja. Este parámetro verifica que los productos de degradación y/o sustancias relacionadas no interfieran con la cuantificación de las sustancias de interés utilizando el método desarrollado.

Debe aclararse que los términos *especificidad* y *selectividad* no significan lo mismo. La *selectividad* se refiere a la capacidad de separar al analito de los demás componentes presentes en la muestra; y la *especificidad*, se refiere a la capacidad de analizar solamente al analito de interés. En otras palabras, el método que es perfectamente selectivo para un analito de un grupo de compuestos, se dice que es específico.

El procedimiento utilizado para demostrar la especificidad, depende del objetivo buscado por el método analítico. No siempre es posible demostrar que un método analítico es específico para un analito en particular (discriminación completa). La falta de especificidad de un procedimiento puede ser compensada por el respaldo de otros procedimientos analíticos.

9.1.1.- Identificación (para asegurar la identidad del analito).

Las pruebas de identificación deben ser capaces de discriminar entre compuestos con estructuras cercanamente relacionadas, las cuales pudieran estar presentes. La discriminación por un procedimiento puede ser confirmada por la obtención de resultados positivos de muestras que contengan al analito (quizá por comparación con el material de referencia), comparado con un resultado negativo de muestras, las cuales no incluyen al analito.

La elección de tales materiales potencialmente interferentes se debe basar en un completo juicio científico, con la consideración de las interferencias que se puedan presentar.

9.1.2.- Ensayo y prueba de impurezas.

Se realiza con el fin de asegurar que todos los procedimientos analíticos realizados, permitan una declaración exacta del contenido de impurezas de la muestra.

Para procedimientos cromatográficos, se deben utilizar los cromatogramas representativos para demostrar la especificidad, y los componentes individuales deben ser apropiadamente identificados.

En las separaciones cromatográficas críticas, se debe investigar a un nivel apropiado el grado de impurezas. La especificidad puede ser demostrada por la resolución de dos componentes los cuales eluyen uno muy cerca del otro.

En los casos donde un ensayo no es específico, se pueden utilizar otros procedimientos analíticos para demostrar la especificidad en general. El método es similar para ambos ensayos y prueba de impurezas:

1.3.- Impurezas disponibles.

Para el ensayo, se debe involucrar una demostración de la discriminación del analito en la presencia de impurezas. Prácticamente, esto puede ser hecho por monitoreo de la sustancia pura, con los niveles apropiados de impurezas para demostrar que el ensayo resulta inafectado por la presencia de estos materiales.

9.1.4.- Impurezas no disponibles.

Si las impurezas o productos de degradación no están disponibles, la especificidad puede ser demostrada por la comparación de los resultados de muestras que contienen impurezas o productos de degradación, por un procedimiento secundario bien caracterizado, como por ejemplo, con los métodos farmacopéicos u otros procedimientos analíticos validados²⁹. También, se podrían comparar los resultados de muestras que contienen impurezas o productos de degradación, con los resultados obtenidos de ensayos de pureza adicional. El grado de concordancia entre estos resultados es una medida de la especificidad³⁰.

Los productos de degradación pueden ser establecidos por sometimiento de la muestra a condiciones de estrés utilizando ácidos, bases agentes oxidantes, condiciones de luz intensa (fotólisis) y de temperatura. Se sugieren algunos métodos para degradar al analito²⁹:

- Colocar el analito en un horno o estufa a una temperatura entre 70-120 °C.
- Preparar soluciones entre 1-2 y 10-12 unidades de pH, mezclarlas con el analito para monitorear su comportamiento.
- Puede utilizarse un agente oxidante como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o el oxígeno ambiental para degradarlo.
- Exponer el analito a luz ultravioleta o luz fluorescente.
- Exponer el analito a condiciones medio ambientales para verificar que es estable bajo condiciones normales de trabajo.

Las muestras sometidas a estrés se deben analizar a diferentes intervalos de tiempo para monitorear la posible degradación que vayan sufriendo. Se recomienda obtener una degradación del 25% para confirmar la especificidad del método³¹.

Algunas recomendaciones para métodos cromatográficos se enlistan a continuación³²:

- Obtener un cromatograma de la fase móvil antes de iniciar el análisis.
- Generar y representar un cromatograma representativo o perfil de la muestra para mostrar que cada uno de los picos extraños son resueltos en la línea base del analito principal.
- Las pruebas ó los "tests" de pureza del pico pueden ser utilizadas para mostrar que el pico cromatográfico del analito no es atribuible a más de un componente

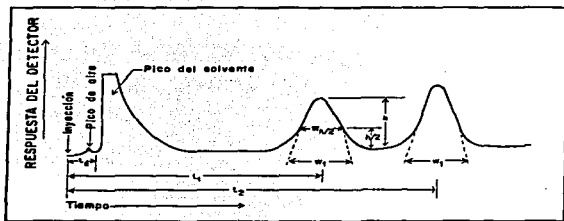
(por ejemplo: arreglo de diodos y espectrometría de masas). Además, los cromatogramas deben ser legibles, con los picos identificados y el tiempo de atenuación indicado.

9.2.- Adecuabilidad del sistema^{26,27,28,33,37,38}

Es una parte integral de muchos procedimientos analíticos. Las pruebas se basan en el concepto de que el equipo, componentes electrónicos, operaciones analíticas y muestras por ser analizadas, constituyen un sistema integral que puede ser evaluado como tal.

Los parámetros por ser determinados para un procedimiento en particular, dependen del método que se pretende validar²⁷. La Figura A1, muestra la separación de dos sustancias en una mezcla, además de indicar las variables que son requeridas para determinar la adecuabilidad del sistema.

Esta prueba es utilizada para verificar que la reproducibilidad y resolución del sistema son los adecuados para el análisis que se está realizando; es decir, asegura la ejecución del sistema cromatográfico.

Figura A1. Separación cromatográfica de dos sustancias³³

9.2.1.- Factor de capacidad ($k' > 2$)

Es una medida del lugar donde están localizados los picos de interés, con respecto al volumen de vacío.

Los picos deben estar resueltos uno de otro y del volumen de vacío. La siguiente ecuación permite calcular el factor de capacidad:

$$k' = \frac{t_r}{t_0} - 1 = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

Donde t_r es el tiempo de retención de la muestra medido desde el momento de la inyección al momento en que eluye el máximo pico y t_0 es el tiempo de retención del volumen vacío o componentes no retenidos en la columna al momento de inyectar. La ecuación anterior se interpreta de la siguiente manera:

$$k' = \frac{\text{Tiempo de elución del soluto en la fase estacionaria}}{\text{Tiempo de elución del soluto en la fase móvil}}$$

Tiempo de elución del soluto en la fase móvil

También puede ser expresada como:

$$k' = \frac{\text{Concentración de sustancia en la fase estacionaria}}{\text{Concentración de sustancia en la fase móvil}}$$

9.2.2.- Resolución

Es una medida de qué tanto dos picos son separados. Para una cuantificación confiable, es esencial que los picos estén separados en gran medida uno de otro ($R_s > 2$).

La resolución es influenciada de manera mínima por la relación de dos compuestos que están siendo medidos, y puede calcularse mediante la siguiente ecuación:

$$R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{\frac{1}{2}(t_{w1} + t_{w2})} = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{(t_{w1} + t_{w2})}$$

Donde t_w es el ancho del pico extrapolado a la línea basal, medido en segundos; correspondiente a los componentes de la disolución.

9.2.3.- Retención relativa (α)

Es una medida de la localización relativa de dos picos.

No es un parámetro tan esencial como la resolución. La siguiente ecuación permite el cálculo de la Retención relativa:

$$\alpha = \frac{k_1}{k_2} = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0}$$

9.2.4.- Factor de coleo ($T \leq 2$)

La dificultad encontrada por el integrador en la determinación dónde y cuándo el pico termina, ocasiona una disminución de la exactitud de la cuantificación, así como del cálculo del área bajo la curva. Esto es debido a que los picos son asimétricos.

$$T = \frac{W_{x(0.05)}}{2f}$$

La ecuación anterior permite el cálculo del factor de coleo, donde $W_{x(0.05)}$ es el ancho del pico medido al 5 % de la altura total del pico principal, tomada del centro del pico al final del pico, y f es la distancia máxima del pico, tomada del centro al inicio del pico, a la distancia correspondiente al 5 % de la altura del pico.

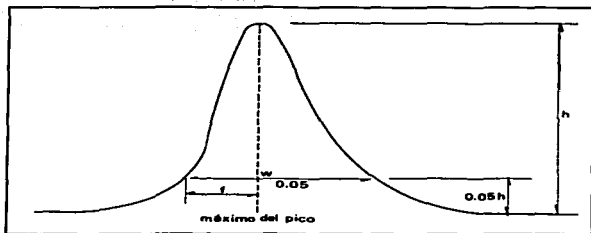


Figura A2. Pico cromatográfico asimétrico ³³

9.2.5.- Número de Platos Teóricos ($N > 2000$)

Es una medida de la eficiencia de la columna, esto es, cuántos picos pueden ser localizados por unidad de tiempo en el cromatograma.

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{t_w} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2 = \frac{L}{H}$$

La ecuación anterior, permite calcular el Número de platos teóricos, donde $w_{1/2}$ es el ancho del pico medido a la mitad de la altura total del pico. N es constante para cada pico de un cromatograma, bajo las condiciones de operación establecidas para una sustancia. H o **HETP** es la altura equivalente de un plato teórico, mide la eficiencia de la columna por unidad de longitud de la columna L . Los parámetros que pueden afectar a N o H incluyen, la posición del pico; tamaño de partícula de la columna, velocidad de flujo de la fase móvil, temperatura de la columna, viscosidad de la fase móvil y peso molecular del analito.

9.2.6.- Repetibilidad de inyección (precisión)

La precisión de la inyección expresada como **RSD** (relative standard deviation) indica la ejecución del análisis cromatográfico, la cual incluye a la bomba, columna y condiciones ambientales, al tiempo en el que se está realizando el análisis.

$$RSD \leq 2 \% \quad \text{para} \quad n \geq 5$$

La cantidad de pruebas requeridas dependerá del propósito del método, pero, es importante considerar algunos puntos:

- La muestra y el estándar deben estar disueltos en la fase móvil. Si esto no es posible, se debe evitar el uso de altas cantidades de disolventes orgánicos cuando se comparan con cantidades en la fase móvil.
- La concentración de analito muestra y de estándar deben estar a las mismas concentraciones ó muy parecidas.
- La concentración de la muestra debe estar respaldada por un estándar durante el procedimiento analítico^{28,34}.

9.3.- Linealidad^{26,27,28,33,37,38}

La linealidad de un sistema o método analítico es la habilidad (dentro de un intervalo) de obtener resultados analíticos, los cuales son directa o indirectamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra.

Durante el desarrollo de métodos es necesario determinar la linealidad del sistema y del método. La primera nos indica que el instrumento en el cual se pretende realizar el análisis, nos da una respuesta adecuada para determinar la presencia del analito; la segunda, verifica que el método propuesto por el cual se pretende determinar la presencia del analito arroja resultados confiables para determinar al analito de interés.

El intervalo lineal de detectabilidad que obedece a la Ley de Lambert - Beer, es dependiente del compuesto analizado y del detector utilizado. Además, depende del propósito del método.

9.3.1.- Linealidad del sistema.

La linealidad del sistema se determina construyendo una curva de calibración (concentración vs. respuesta medida) utilizando cuando menos 5 diluciones, preparadas a partir de una misma solución patrón (solución Stock) y realizando el análisis cuando menos por triplicado para cada dilución.

El intervalo de las concentraciones a analizar depende del propósito del método; para control de calidad y seguimiento de estabilidad, debe de estar incluida la concentración correspondiente al 100 %^{28,29}.

Criterios de validación:

- $r \geq 0.99$
- C. V. $\leq 1.5\%$

9.3.2.- Linealidad del método.

La linealidad del método se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos 3 diferentes cantidades de la sustancia de interés (placebos cargados) cada uno de manera independiente, haciendo el análisis por triplicado de cada concentración. Incluyendo siempre la concentración correspondiente al 100 %.

La linealidad es generalmente reportada como la varianza de la pendiente de la línea de regresión, calculada de acuerdo a un método matemático establecido para los resultados obtenidos^{28,30}.

Criterios de validación:

- $r \geq 0.99$
- $r^2 \geq 0.98$
- C. V. $\leq 1.5\%$

- Pendiente (m) \cong 1
- Ordenada al origen (b) \cong 0

9.4.- Rango^{26,27,28,37,38}

El rango de un procedimiento analítico es el intervalo entre el valor bajo y el valor alto de concentración (cantidad) de analito en la muestra (incluyendo estas concentraciones), para el cual se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad.

El rango es normalmente expresado en las mismas unidades (por ejemplo, por ciento, ppm, etc.) obtenidas en los resultados, según las cantidades utilizadas en el método analítico³⁰.

Se deriva normalmente de los estudios de linealidad y depende de la aplicación del procedimiento. Es establecido conforme el procedimiento analítico suministra un grado aceptable de linealidad, exactitud y precisión, cuando es aplicado a muestras conteniendo cantidades de analito dentro o en los extremos del rango especificado por el procedimiento analítico.

Se deben considerar los siguientes rangos mínimos:

9.4.1.-Ensayo.

Para el ensayo de un fármaco o producto terminado: normalmente de 80 % a 120 % de la concentración de prueba.

9.4.2.- Uniformidad de contenido.

Para calcular la uniformidad de contenido se debe cubrir un mínimo del 70 % al 130 % de la concentración de prueba; solo para un intervalo más amplio, en base a la naturaleza de la forma de dosificación, debe ser justificado.

9.4.3.- Disolución.

Para pruebas de disolución, un intervalo de ± 20 % sobre el rango especificado; por ejemplo, si las especificaciones para un producto de liberación controlada, cubre la región de 20 % después de 1 hora, y arriba del 90 % después de 24 horas, el intervalo validado debe ser de 0 – 110 % de lo indicado en la etiqueta.

9.4.4.- Impurezas.

Para la determinación de una impureza, del nivel reportado de la impureza, a 120 % de la especificación.

Para las impurezas conocidas con inusuales efectos farmacológicos que producen inesperada y elevada toxicidad, el LD y LC deben ser conmesurados con el nivel al cual la impureza debe ser controlada.

Para la validación de pruebas de impurezas realizadas durante el desarrollo de un método, puede ser necesario considerar el rango alrededor del límite (probable) sugerido.

Si el ensayo y determinación de pureza son realizados juntos como una prueba, solo un 100 % de estándar debe ser utilizado, la linealidad debe cubrir el intervalo del nivel reportado para impurezas al 120 % del especificado en el ensayo.

9.5.- Precisión^{26,27,28,29,33,37,38}

La precisión de un sistema o método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos realizados en una muestra homogénea³³.

La precisión se expresa en términos de la desviación estándar, coeficiente de variación o varianza de una serie de mediciones, y se refiere a la distribución de los resultados individuales del análisis alrededor de su valor promedio.

Como primera parte, es necesario determinar la precisión del sistema, independientemente del proceso de preparación de la muestra. Esta determinación suministra la base de otra evaluación, la reproducibilidad; una pobre precisión del sistema, puede inevitablemente producir una pobre reproducibilidad en el análisis de la muestra.

Como segundo paso, se debe evaluar la precisión del método. La precisión alrededor del valor medio no debe exceder el 2 % del coeficiente de variación, y el valor medio debe estar dentro del $\pm 2\%$ de la desviación estándar del valor nominal para exactitud.

La precisión puede ser considerada a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

9.5.1.- Repetibilidad.

Expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación dentro de un corto intervalo de tiempo.

Es también, denominada precisión intra-ensayo. Puede ser determinada como se indica a continuación:

- Un mínimo de 9 determinaciones cubriendo el intervalo especificado para el procedimiento (por ejemplo, 3 concentraciones con 3 réplicas cada una).
- Un mínimo de 6 determinaciones correspondientes al 100 % de la concentración a medir.

Para los métodos cromatográficos se determina:

9.5.1.1.- Repetibilidad de inyección

Esta se mide por inyecciones múltiples de una muestra homogénea (solución preparada), bajo las condiciones cromatográficas establecidas. Se recomienda con

parte de la validación de métodos, un mínimo de 10 inyecciones con un RSD de ≤ 2 % (algunas guías recomiendan el 1.5 % y otras el 1 %) ^{28,29}.

9.5.1.2.- Repetibilidad del análisis

Consiste de múltiples medidas de una muestra, por el mismo analista bajo las mismas condiciones.

9.5.2.- Precisión intermedia.

Anteriormente conocida como parte de la robustez, es expresada como variaciones intra-laboratorio, como diferente día, diferente analista, diferente equipo, etc., dependiendo del tiempo y recursos.

La extensión de la precisión intermedia puede ser establecida dependiendo de las circunstancias bajo las cuales el procedimiento pretende ser utilizado. No es considerada necesaria para estudiar los efectos individualmente. Es recomendado el uso de un diseño experimental. El objetivo es asegurar que el método genera los

mismos resultados cuando muestras similares son analizadas al mismo tiempo que se está llevando el desarrollo del método.

Se determina de una muestra homogénea del producto, cercana al 100 % de la concentración teórica por triplicado, y para métodos cromatográficos se recomienda un C. V. $\leq 2\%$.

9.5.3.- Reproducibilidad.

Expresa la precisión entre laboratorios y es evaluada por medio de una prueba inter-laboratorio. Normalmente se evalúa, si la precisión intermedia es evaluada.

La reproducibilidad debe ser considerada en el caso de realizar una estandarización del procedimiento analítico; por ejemplo, para inclusión como procedimiento en farmacoformas²⁸.

9.6.- Exactitud^{26,27,28,33,37,38}

La exactitud de un procedimiento analítico es el grado de cercanía entre el valor el cual es aceptado como valor referencia y el valor experimental encontrado.

Debe ser claro que la evaluación de la exactitud nos permite medir la efectividad del procedimiento de preparación.

La exactitud puede ser establecida a través del rango especificado en el procedimiento analítico.

9.6.1.- Ensayos.

Pueden ser realizados varios métodos para determinar la exactitud:

9.6.1.1.- Sustancia farmacéutica³².

- Aplicación de un procedimiento analítico para un analito de pureza conocida; por ejemplo, material de referencia (estándar).
- La comparación de resultados del procedimiento analítico propuesto con un segundo método caracterizado, cuya exactitud está establecida o definida.
- La exactitud puede ser inferida de la precisión, cuando la linealidad y la especificidad han sido establecidas.

9.6.1.2.- Producto farmacéutico³².

- La aplicación de un procedimiento analítico para mezclas sintéticas de los componentes del producto farmacéutico, cuyas cantidades conocidas del principio activo por ser analizado, han sido adicionadas.
- En los casos donde es posible obtener muestras de todos los componentes del producto farmacéutico, es aceptable adicionar cantidades conocidas del analito a cada producto farmacéutico, y comparar los resultados obtenidos mediante un procedimiento caracterizado, cuya exactitud está establecida o definida.
- La exactitud puede ser inferida de la precisión, siempre y cuando la linealidad y la especificidad han sido establecidas.

9.6.2.- Impurezas (cuantificación).

La exactitud debe ser evaluada en muestras (sustancias o productos farmacéuticos) individuales con cantidades conocidas de impurezas. En los casos donde es posible obtener muestras de impurezas y/o productos de degradación, se considera aceptable comparar los resultados obtenidos por un procedimiento independiente. El factor de respuesta de la sustancia farmacéutica puede ser utilizado.

Debe ser claro que las impurezas totales o individuales deben ser determinadas, por ejemplo, por ciento de peso en peso, en todos los casos con respecto al analito original.

La exactitud puede ser evaluada utilizando un mínimo de 9 determinaciones dentro de un mínimo de 3 niveles de concentración, cubriendo el intervalo especificado; por ejemplo, 3 concentraciones con 3 réplicas de cada una.

La exactitud debe ser reportada como % de recobro para el ensayo, mediante cantidades adicionadas del analito en la muestra o como la diferencia entre el valor promedio aceptado como referencia junto con los intervalos de confianza.¹⁹

Es recomendable que se realice a niveles del 80, 100, y 120 % del valor considerado como el 100 %.

Otra forma de determinar la exactitud es preparando 6 placebos cargados de manera independiente, con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración correspondiente al 100 %. El % de recobro y el C.V. debe estar de acuerdo con los datos del cuadro A1.

La precisión y la exactitud juntas, determinan el error de una medida analítica y son los criterios primarios utilizados cuando uno juzga la "calidad" del método³¹.

Método	Prom. de Recobro %	C. V.
Cromatográfico	98 - 102	≤ 2 %
Titulométrico	98 - 102	≤ 2 %
Químico y		
Espectrofotométrico	97 - 103	≤ 3 %
Microbiológico	95 - 105	≤ 5 %

Cuadro A1.- Criterios de aceptación para el % de Recobro y el Coeficiente de variación²⁹.

9.7.- Estabilidad de la muestra en solución²⁸.

Es concerniente especialmente, para muestras que pueden sufrir alguna degradación por hidrólisis, fotólisis o adhesión al material de vidrio. La estabilidad de la solución muestra, después de su preparación, debe ser evaluada de acuerdo al método propuesto. Esto puede realizarse mediante la determinación de duplicados o triplicados de muestras a un nivel (medio) o distintos niveles (bajo, medio, alto) en múltiples puntos después de comenzar su conservación para tener en cuenta posibles cambios en su concentración.

También puede determinarse por comparación de los resultados de las mismas muestras, después de permanecer bajo diferentes condiciones de temperatura ambiente, refrigeración, protegidos de la luz, durante el tiempo que dura el análisis, durante 24 o 48 h, en días distintos, etc. Lo anterior será determinado por el analista y dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia.

Se realiza bajo las mismas condiciones de operación, utilizando una solución referencia recientemente preparada para cada tiempo, y el valor medio obtenido después de su conservación debe estar dentro del $\pm 5\%$ del valor nominal.

La muestra es estable si el intervalo de confianza (IC) para la diferencia de la media de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto no exceda el porcentaje indicado anteriormente^{29,30,32}.

9.8.- Sensibilidad^{26,27,28,35,37,38}

Se dice que un método es sensible, si pequeños cambios en la concentración, causa grandes cambios en la respuesta analítica.

Existe una gran confusión sobre el término relacionado a la capacidad de determinar bajas concentraciones. El término frecuentemente utilizado para ello es la sensibilidad.

La capacidad de detectar pequeñas concentraciones es expresada como *límite de detección (LD)* y *Límite de cuantificación (LC)*.

9.8.1.-Límite de detección (LD).

El LD de un procedimiento analítico individual es la cantidad más baja del analito en la muestra la cual puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto.

Dependiendo del procedimiento instrumental o no instrumental será posible determinar éste parámetro.

9.8.1.1.-Con base en la evaluación visual.

Puede ser utilizada por métodos no instrumentales e instrumentales.

Es determinado por el análisis de muestras con cantidades conocidas del analito y por el establecimiento del nivel mínimo al cual el analito puede ser realmente detectado. La presentación de los gráficos relevantes es considerado aceptable para su justificación.

9.8.1.2.- Con base en la relación Señal : Ruido.

Se aplica para procedimientos analíticos que exhiben línea basal de ruido.

La determinación de la relación señal : ruido se realiza al comparar las señales medidas de muestras, con bajas concentraciones conocidas del analito, y muestras blanco. Se debe establecer la concentración mínima a la cual el analito puede ser realmente detectado.

Una relación señal : ruido entre 3 ó 2 veces a 1 es generalmente considerada aceptable para estimar el LD.

9.8.1.3.- Con base en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente.

Se puede expresar de la siguiente forma,

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

En donde σ es la desviación estándar de la respuesta y s es la pendiente de la curva de calibración.

La determinación de σ se puede lograr mediante una variedad de caminos:

9.8.1.3.1.- Con base en la desviación estándar del blanco.

La medición de la magnitud de la respuesta basal analítica, es realizada por el análisis de un número apropiado de muestras blanco y se calcula la desviación estándar de estas respuestas.

9.8.1.3.2.- Con base en la curva de calibración.

Una curva de calibración debe ser estudiada utilizando muestras con el analito, en el intervalo de LD. La desviación estándar del intercepto de "y" de las líneas de regresión, puede ser utilizada como la desviación estándar.

En los casos en donde el valor estimado para el LD es obtenido por cálculo o extrapolación, el estimado puede ser subsecuentemente validado por el análisis independiente de un adecuado número de muestras conocidas, preparadas a una concentración determinada o cercana al valor de LD.

9.8.2.- Límite de Cuantificación (LC) .

El límite de cuantificación de un procedimiento analítico es la cantidad más baja del analito en una muestra la cual puede ser cuantitativamente determinada con adecuada precisión y exactitud.

El LC es un parámetro de ensayos cuantitativos para niveles bajos de compuestos en una matriz muestra. Es utilizado particularmente para la determinación de impurezas y/o productos de degradación.

9.8.2.1.- Con base en la evaluación visual.

Puede ser utilizada por métodos no instrumentales e instrumentales.

Es generalmente determinado por el análisis de muestras con cantidades conocidas del analito y por el establecimiento del nivel mínimo al cual el analito puede ser realmente cuantificado con aceptable precisión y exactitud.

9.8.2.2.- Con base en la aproximación Señal : Ruido.

Se aplica para procedimientos analíticos que exhiben línea basal de ruido.

La determinación de la relación señal : ruido es realizada por la comparación de señales medidas de muestras, con bajas concentraciones conocidas del analito y muestras blanco, estableciendo la concentración mínima a la cual el analito puede ser realmente cuantificado.

Una relación señal : ruido de 10 veces a 1 es generalmente considerada aceptable para estimar el LC.

9.8.2.3.- Con base en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente.

Se puede expresar de la siguiente forma,

$$LD = \frac{10\sigma}{s}$$

En donde σ es la desviación estándar de la respuesta y s es la pendiente de la curva de calibración.

La determinación de σ , se puede lograr mediante una variedad de caminos:

9.8.2.3.1.- Con base en la desviación estándar del blanco.

La medición de la magnitud de la respuesta basal analítica, es realizada por el análisis de un número apropiado de muestras blanco y se calcula la desviación estándar de estas respuestas.

9.8.2.3.2.-Con base en la curva de calibración.

Una curva de calibración debe ser estudiada utilizando muestras con el analito en el intervalo de LC. La desviación estándar residual de una regresión lineal, o la desviación estándar del intercepto de "y" de las líneas de regresión pueden ser utilizadas como la desviación estándar.

En los casos en donde el valor estimado para el LC es obtenido por cálculo o extrapolación, el estimado puede ser subsecuentemente validado por el análisis independiente de un adecuado número de muestras conocidas, preparadas a concentración determinada o cercana al valor de LC.

El valor medio debe estar dentro del límite predefinido, normalmente dentro del $\pm 20\%$ de la concentración nominal, con un coeficiente de variación $\leq 20\%$ ^{27,32}.

Se debe considerar que el LD y LC pueden verse afectados por la cromatografía, es decir, deben tomarse en cuenta para ambos parámetros el tipo y edad de la columna, ya que esto modifica la relación de valores al considerar su determinación mediante la relación señal : ruido²⁸.

9.9.- Robustez^{26,27,28,33,37,38}

La robustez de un procedimiento analítico, es una medida de la capacidad de mantenerse inafectado por pequeñas, pero deliberadas variaciones en los parámetros del método, y suministra un Índice de su confiabilidad durante el uso normal³³.

Es normalmente expresada como la falta de influencia en los resultados de variables operacionales y medio ambientales del método analítico²⁹.

La evaluación de la robustez debe ser considerada durante la fase de desarrollo, y depende del tipo de procedimiento en estudio. Aunque los datos

obtenidos no son usualmente mostrados, se recomienda que sean incluidos como parte del método de validación²⁸.

Los factores que tienen influencia sobre el método analítico, pueden ser determinados por el estudio de efectos eventuales de diferentes series de condiciones del método²¹. Las cuales pueden ser controladas adecuadamente.

Ejemplo de estas variaciones típicas son:

En el caso de HPLC:

- Influencia de variaciones de pH en la fase móvil
- Influencia de la fuerza iónica
- Estabilidad de la solución analítica
- Tiempo de extracción
- Variaciones en la composición de la fase móvil
- Diferencia en las columnas (lote y proveedor)
- Temperatura
- Velocidad de flujo

En el caso de CG:

- Diferencia en las columnas (lote y proveedor)
- Temperatura
- Velocidad de flujo
- Estabilidad de la solución muestra

Además de otros factores como distinto laboratorio, diferente analista, diferente instrumento, diferente lote de reactivos, diferentes tiempos de ensayo, diferente día, etc.

Para caracterizar las distintas variables del método, éste debe ser dividido en bloques y determinar cuál es el efecto de cada variable en cada bloque (Diagrama 1).

Se puede determinar la influencia de cada factor, por la variación de éste a un tiempo y manteniendo los demás factores fijos. Esto nos lleva a gastar menos tiempo y recursos, además de que es confiable el resultado, el método resulta eficaz y efectivo. También, es posible obtener información utilizando un experimento de diseño multifactorial (matriz).

El diseño de experimentos es muy lógico, racional y un camino científico conocido para coleccionar datos. Puede demostrar si los factores medio ambientales y del método tienen alguna influencia sobre los resultados.

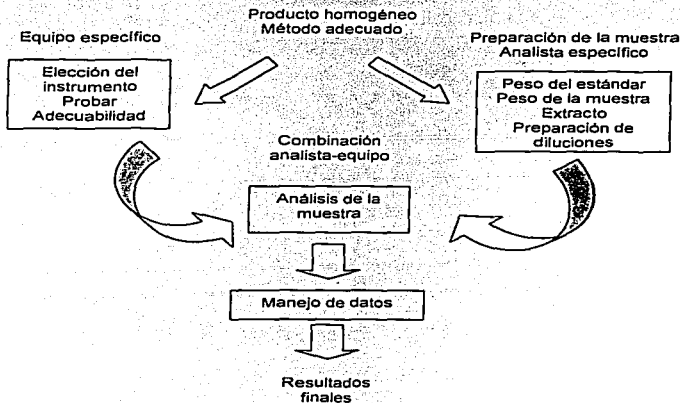


Diagrama A1. Relación entre equipo, método, técnica y muestra en un análisis típico^{37,38}

El diseño comúnmente utilizado es el de Plackett – Burman, que utiliza un diseño de 8 a 12 corridas, y permite investigar un número de 7 a 11 factores. Este

diseño tiene dos niveles, valores y se adapta a un factor. La variación de combinaciones de niveles es muy específica y muestra una alta simetría.

Esta aproximación también se puede utilizar para demostrar la transferencia de un nuevo método a otro laboratorio³¹.

9.10.- Cromatografía de gases³⁹

La cromatografía se define como un procedimiento analítico mediante el cual los solutos son separados por un proceso dinámico de migración diferencial en un sistema que consiste de dos o más fases, una de las cuales se mueve continuamente en una dirección dada (fase móvil) en la cual la sustancia individual exhibe diferente movilidad por motivos de diferencias en la adsorción, partición, solubilidad, presión de vapor, tamaño molecular, o densidad de carga iónica³⁰.

Esta técnica analítica tiene como función la separación de compuestos, con el propósito de identificar, cuantificar o purificar una muestra. Aunque existen diferentes tipos de cromatografía, solo se mencionarán las características de la cromatografía de gases, que es la técnica analítica utilizada en este trabajo.

La **cromatografía de gases** es un método de separación, en la cual, un soluto gaseoso (o el vapor de un líquido volátil) es transportado por una fase gaseosa o fase móvil. La fase estacionaria suele ser un líquido no volátil que recubre el interior de la columna (cromatografía de reparto gas-líquido) o un soporte sólido de grano fino (cromatografía de adsorción gas-sólido). La figura 1 muestra el esquema de un cromatógrafo de gases. Una muestra de líquido volátil se inyecta a través de un septo de goma (un disco delgado) en un puerto de inyección caliente, recubierto de vidrio o metal, donde se vaporiza la muestra. La muestra es arrastrada rápidamente hacia la columna por un gas portador inerte (que suele ser He, N₂, o H₂), que actúa como fase móvil. Después de pasar por la columna que contiene a la fase estacionaria, los solutos separados fluyen por un detector, cuya respuesta se visualiza en un registrador o una computadora. No es necesario que la temperatura

de la columna sea mayor que el punto de ebullición de todos los solutos, sólo debe ser lo bastante elevada para que cada soluto tenga suficiente presión de vapor a fin de ser eluido en un tiempo razonable.

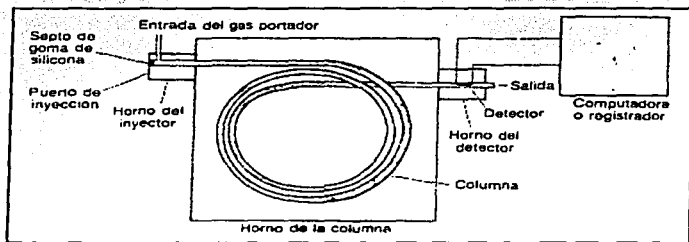


Figura A3. Diagrama esquemático de un cromatógrafo de gases³⁹

9.10.1.- Columnas

Las columnas pueden ser empacadas o tubulares abiertas. Las columnas empacadas son de acero inoxidable o vidrio y tienen típicamente un diámetro de 3 a 6 mm y 1 a 5 m de longitud. La columna se llena con un soporte sólido de grano fino recubierto de un líquido no volátil como fase estacionaria, aunque el sólido mismo puede ser la fase estacionaria. Las columnas tubulares abiertas (capilares) proporcionan mayor resolución, menor tiempo de análisis y mayor sensibilidad, debido a que la longitud de la columna es mayor y el diámetro menor, con lo que aumenta el número de platos teóricos por unidad de longitud. Las longitudes de las columnas capilares van desde 10 cm hasta 100 cm y los diámetros externos son del orden de 0.25 mm.

9.10.2.- Soporte sólido.

El soporte debe ser de un material resistente "inerte", en partículas pequeñas de forma regular y con gran área superficial. Idealmente no debe interactuar con los solutos, pero ninguno es inerte. La mayoría de los soportes son de diatomita (tierra de diatomeas) consistente en los esqueletos de sílice de las algas microscópicas denominadas diatomeas.

El tamaño reducido de la partícula reduce el tiempo requerido para el equilibrio de los solutos, lo que mejora la eficiencia de la columna. Sin embargo, a menor tamaño de la partícula, se requiere mayor presión para forzar a la fase móvil a través de la columna.

9.10.3.- Fase estacionaria

La elección de la fase líquida para un problema dado es esencialmente empírica; la regla de que "los semejantes se disuelven mutuamente" es muy útil. La cantidad de fase líquida utilizada se expresa como porcentaje en peso del soporte líquido. Las cargas más comunes están en el intervalo de 2 a 10%. En general, un gran porcentaje de fase líquida conduce a una mayor capacidad para el soluto, tiempos de retención mayores y mayor separación entre picos.

Tanto en las columnas empacadas como en las columnas tubulares abiertas se emplean una gran variedad de fases estacionarias sólidas. Las más comunes como la alúmina (Al_2O_3) o los tamices moleculares son una notable fase sólida ampliamente usada en cromatografía. Son materiales inorgánicos o polímeros orgánicos con grandes cavidades en las cuales pueden entrar moléculas pequeñas, que son parcialmente retenidas.

9.10.4.- Programa de temperatura

Al incrementarse la temperatura de una columna se reduce el tiempo de retención y la resolución, debido a que los compuestos eluyen más rápidamente. Cuando se separa una mezcla de compuestos con amplio intervalo de puntos de ebullición o polaridades, es muy útil poder modificar la temperatura de la columna durante la separación, ya que, los compuestos más volátiles emergen de la columna uno cerca del otro, mientras que los compuestos menos volátiles no pueden ni siquiera eluirse³⁹.

9.10.5.- Gas Acarreador

Los gases acarreadores más comunes son H₂, He y N₂. Los tres producen una altura de plato óptima similar (0.3 mm), pero gastos significativamente distintos. El He e H₂ requieren un gasto mayor que el N₂ lo que favorece la resolución, debido a que los gases del soluto difunden más rápido a través de H₂ y He que de N₂.

9.10.6.- Inyección de la muestra

Con el objeto de introducir una muestra líquida en una columna cromatográfica se requiere de un puerto para muestra, que usualmente contiene un tubo de vidrio silanizado (llamado inserto) dentro de un bloque metálico caliente. La muestra se inyecta con una jeringa a través de un septo de goma, y se vaporiza en el tubo de vidrio. El gas portador lleva la muestra vaporizada a lo largo de la columna de cromatografía. Por lo general las columnas analíticas requieren de 0.1 a 10 μL de muestra líquida, mientras que las columnas de trabajo preparativo pueden manejar de 200 a 1000 μL .

La **inyección dividida** es una forma de reducir el volumen de muestra para las columnas tubulares abiertas. Solo 0.1 a 10 % del volumen de 0.1 a 2 μL de muestra llega a la columna; el resto se elimina. En la figura No. A4, se muestra la

cámara de inyección, en donde la muestra se inyecta a través del septo en la zona de vaporización de la muestra. La válvula de aguja se cierra. El gas portador procedente del controlador de flujo transporta la muestra a través del inserto de vidrio silanizado, donde ocurren la vaporización y el mezclado completos. En el punto de división parte de la muestra entra a la columna de cromatografía y el resto pasa por la válvula de aguja 2 hacia una salida de desechos. La fracción que se descarta de la muestra es controlada por el regulador de presión conectado a la válvula de aguja 2. Durante la inyección, la muestra puede fraccionarse si alguno de los componentes no se vaporiza del todo, lo cual causa error en el análisis cualitativo. Si la temperatura del inyector es demasiado elevada, puede ocurrir descomposición, con pérdida de algunos componentes y la formación de otros.

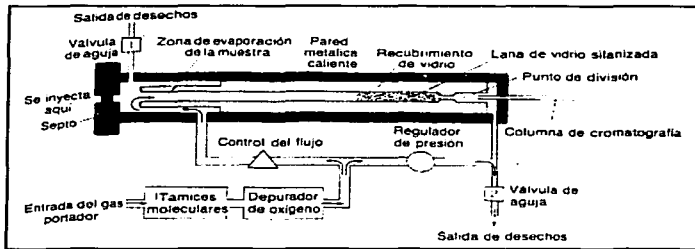


Figura A4. Cámara o puerto para la inyección dividida o sin división en una columna tubular abierta³⁹.

En la **inyección sin división** la mayor parte de la muestra se aplica a la columna, y durante la inyección ocurre poco fraccionamiento de solutos. Se utiliza en los casos donde se requiere el análisis de trazas de solutos.

Se utiliza **inyección sobre la columna** en el caso de muestras que podrían descomponerse al ser calentadas por encima de su punto de ebullición al inyectarlas. La solución de la muestra se inserta directamente al principio de la columna de cromatografía, sin pasar por un inyector caliente. La temperatura inicial de la

columna es cercana al punto de ebullición del disolvente. De este modo, el disolvente se condensa y atrapa solutos en una zona estrecha. La cromatografía ocurre al elevarse la temperatura de la columna.

9.10.7.- Detectores

Existen diversos detectores que pueden utilizarse para detectar los solutos a la salida de la columna cromatográfica, como el detector de conductividad térmica, de ionización de flama, de captura de electrones, detector fotométrico de flama, detector de álcalis de flama, y detector de emisión atómica, cada uno con distinta sensibilidad y útiles en distintos casos. Los *espectrómetros de masas* y los *espectrofotómetros de infrarrojo de transformada de Fourier* se utilizan ampliamente en combinación con la cromatografía de gases. Estos detectores proporcionan el espectro completo para cada componente conforme eluye de la columna, pudiendo realizar el análisis cualitativo.

9.11.- Espectrometría de masas⁴⁰

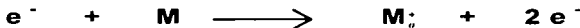
La *espectrometría de masas* es una técnica analítica que proporciona, además del peso molecular, información valiosa acerca de la estructura química de un compuesto. En el espectrómetro de masas, llegan electrones de alta energía a la muestra, rompiendo las moléculas en fragmentos, de los cuales se obtiene su masa, y esta información es utilizada para reconstruir la molécula.

El *espectrómetro de masas* ioniza las moléculas en un alto vacío, clasifica los iones de acuerdo a su masa, y registra la abundancia de los iones de cada una de las masas. Un *espectro de masas* es la gráfica que representa las masas en el eje de las *x* y el número relativo de iones (abundancia relativa en %) de cada una de las masas en el eje de las *y*. Se emplean varios métodos para ionizar las muestras, y también hay varios tipos de analizadores para separar los iones de acuerdo con su relación (masa/carga), pero solo se mencionará la *ionización por*

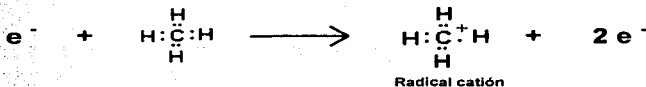
impacto electrónico y como analizador la *deflexión magnética* para separar los iones formados.

9.11.1.- Ionización por impacto electrónico.

Cuando un electrón choca con una molécula neutra, puede ionizarla eliminando otro electrón.



El tipo más común de molécula ionizada es el que carece de un electrón, y por lo tanto, tiene una carga positiva y un electrón no apareado. El ión es un **radical catión**. Por ejemplo:



El radical catión en la reacción anterior no es un carbocatión normal, el átomo de carbono tiene siete electrones alrededor de él, y los siete lo enlazan a otros cuatro átomos. Este catión excepcional se presenta por la fórmula $[\text{CH}_4]^{\bullet+}$, en donde + indica la carga positiva y \bullet indica el electrón no apareado.

Además de ionizar, el impacto de un electrón energético puede romper la molécula. Este proceso de fragmentación da una mezcla característica de diferentes iones. El catión radical que corresponde a la masa de la molécula original se llama **ión molecular**, y se abrevia $M^{\bullet+}$. Los iones de menor peso molecular se llaman fragmentos, y pueden ser positivos, negativos o neutros, pero en el espectrómetro de masas solo se detectan los fragmentos con carga (positiva ó negativa).

9.11.2.- Deflexión magnética.

Una vez que la ionización y la fragmentación han formado una mezcla de iones, estos deben separarse y detectarse, y se realiza en el analizador del instrumento.

En el caso de la **deflexión magnética**, las moléculas de la muestra se ionizan mediante un haz electrónico que pasa a través de una cámara de vacío. Los iones con carga positiva son atraídos por la placa cargada negativamente, que tiene una rendija angosta para permitir que algunos iones pasen a través de ella. El haz de iones entra a un tubo al vacío, con una parte curva colocada entre los polos de un imán grande. Cuando pasa una partícula cargada a través de un campo magnético, sufre una fuerza transversal y se curva su trayectoria. El radio exacto de curvatura del trayecto de un ión depende de su relación masa/carga (m/z) que se simboliza m/z . En esta expresión m es la masa del ión (en u) y z es su carga en unidades de carga electrónica.

Al final del tubo del vacío hay otra rendija, seguida de un detector de iones conectado con un amplificador. A un campo magnético dado, solo el trayecto de los iones de una masa determinada se curvará exactamente la cantidad correcta para que pasen a través de la rendija y entren al detector, el cual produce una señal que es proporcional al número de iones que llegan a él. Variando el campo magnético, el espectrómetro recorre todas las masas iónicas posibles y produce una gráfica del número de iones de cada masa. La información se tabula y se imprime el espectro como una gráfica de barras o como una tabla de intensidades relativas, como se muestra en la figura 3, todos los valores se redondean al entero más cercano en unidad de masa. A los picos se les asignan intensidades expresadas como porcentajes del pico más intenso al que se le llama **pico base**. No necesariamente debe corresponder al de la masa del ión molecular, simplemente es el más pronunciado. El valor de m/z para el ión molecular inmediatamente da el peso molecular del compuesto.

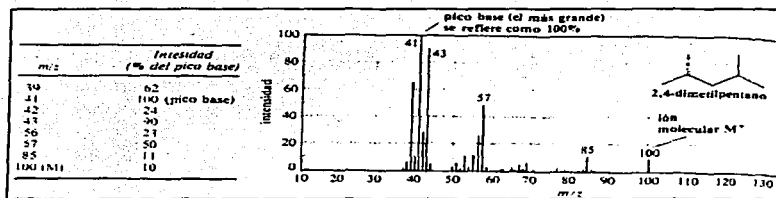


Figura A5. Espectro de masas por IE del 2,4-dimetilpentano dado como gráfica de barras y en forma tabular⁴⁰.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN