



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**APLICACIONES DE LA ELECTROFORESIS
CAPILAR PARA LA DETERMINACIÓN DE
COMPUESTOS QUÍMICOS A PARTIR DE
DIFERENTES MATRICES**

T É S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

VICTOR HUGO ABREGO REYES

**ASESORES: Dra. GABRIELA VARGAS MARTÍNEZ
Dr. ENRIQUE ANGELES ANGUIANO**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*A mis padres por inventarme y hacerme crecer, además porque puedo decir que me siento orgulloso de ustedes.
Gracias Sra. **Yoyis** y Sr. **Camelito**.*

*A mi familia por hacer que entienda muchas de las cosas que no se aprenden en la escuela. Y en especial por ser...**mi familia**.*

*Gracias hermano! por dejarme la televisión encendida
Inés y **Costa**, gracias por sus consejos y por ser mi refugio*

*A ti, sólo te puedo decir ya **acana tu!**
Lo logramos...*

*A **la madre** y a **la güera**, todo fue más fácil gracias a ustedes.*

*Dr Enrique, ahora sé cómo se hace “**el hielo seco**”, gracias por ser mi amigo.*

*La electroforesis no es lo mejor del mundo, pero me permitió conocerte y hacernos buenos amigos. Gracias por todo **Gaby**.*

*A los que no escribo, pero que no se me olvidan
Gracias compadre.*

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
RELEVANCIA DEL ESTUDIO	2
GENERALIDADES	3
Electroforesis capilar	3
Electroósmosis	4
Tipos de electroforesis capilar	7
Electroforesis capilar de zona	7
Cromatografía capilar electrocinética micelar	8
Electroforesis capilar en gel	10
Enfoque isoelectrico	10
Isotacoforesis	11
Electrocromatografía	12
COMPUESTOS QUÍMICOS ESTUDIADOS	13
LUTEÍNA	14
Características fisicoquímicas	14
Estructura química	14
Usos de la luteína	14
LQM 938	16
Características fisicoquímicas	16
Estructura química	16
Aplicaciones	16
RIMANTADINA	17
Características fisicoquímicas	17
Estructura química	17
MATERIAL Y EQUIPO	19
Reactivos	19
Muestras	19
Preparación de soluciones	19
METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DE LUTEÍNA A PARTIR DE PÉTALOS DE GIRASOL	21
Método 1	21
Método 2	21
Método 3 (proceso de Tyczkowski)	22
METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE LUTEÍNA POR ELECTROFORESIS CAPILAR	23

Preparación de las muestras	23
Muestras analíticas	23
Condiciones de análisis	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
DESARROLLO DE DOS METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE RIMANTADINA EN TABLETAS ANTIGRIPALES	31
DETERMINACIÓN INDIRECTA	32
Determinación de la longitud de onda óptima de análisis	32
Comportamiento de los compuestos	34
Estudio de la influencia del pH en la separación	36
Estudio de especificidad del método	37
Efecto de la concentración del electrolito soporte	38
Resumen de las condiciones óptimas de análisis	39
Evaluación de la linealidad del método	39
DETERMINACIÓN DE DIRECTA DE RIMANTADINA	42
Selección del tipo y concentración del electrolito soporte	43
CONCLUSIONES	44
REFERENCIAS	46

INTRODUCCIÓN

En nuestros días existe una gran demanda por el desarrollo de métodos analíticos sensibles, rápidos, confiables y de bajo costo para la determinación de los principios activos, excipientes y sus respectivas impurezas para la producción y control de calidad de medicamentos y/o productos farmacéuticos. Durante la síntesis, obtención y en el proceso de desarrollo de un nuevo fármaco, así como en todas las etapas subsecuentes de control de calidad del medicamento deben analizarse diariamente una gran cantidad de muestras antes de poder liberar un producto al mercado, por lo que el generar métodos analíticos confiables se convierte en imprescindible. Esto sucede también durante la etapa de estudios clínicos, farmacológicos y toxicológicos de los nuevos fármacos (o candidatos a ser comercializados), donde deben realizarse un sin número de análisis en fluidos biológicos como sangre, suero, orina, tejidos etc.

Tradicionalmente estos análisis se han llevado a cabo usando métodos como la espectrofotometría, la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) o la cromatografía de gases (CG), sin embargo han surgido otros métodos analíticos como la electroforesis capilar (EC), que cubren con todos los requerimientos mencionados anteriormente y que además ofrecen otras cualidades ventajosas que han generado un gran interés para ser incorporados en todas las etapas del análisis de medicamentos.

En el área de trabajo de un Químico Farmacéutico Biólogo es fundamental tener un buen conocimiento de las técnicas modernas para el control de calidad de los medicamentos, mucho más si estas técnicas son de bajo costo y con gran calidad en los datos obtenidos.

De la misma manera se ha hecho una práctica común el análisis de extractos de plantas, para encontrar los compuestos que pueden tener actividad farmacológica en los seres vivos. Por tratarse de productos naturales se debe contar con técnicas de separación muy eficientes para poder identificar al analito deseado. Para elegir una técnica de separación, además de tener en cuenta los criterios económicos y de accesibilidad, hay que atender a dos tipos de consideraciones: unas tienen que ver con las propiedades físicas y estructurales de las moléculas que se pretende separar e identificar, o de las características de la matriz en que se encuentran; otras se derivan de los objetivos del análisis (sensibilidad, resolución, tiempo de análisis, necesidad de una detección específica además de técnicas baratas).[1-4]

Las técnicas analíticas más empleadas en la actualidad pueden englobarse en dos grandes grupos: técnicas de separación y técnicas espectroscópicas. Las técnicas espectroscópicas proporcionan, para cada compuesto analizado, una información compleja, relacionada con sus características estructurales específicas, por otro lado las técnicas de separación se utilizan para resolver los componentes de una mezcla y la señal obtenida puede utilizarse con fines analíticos cuantitativos o cualitativos.

Es precisamente en la electroforesis capilar en la técnica donde basaremos en el presente trabajo, debido a su amplio uso en el campo de la biotecnología, biología molecular y bioquímica entre otras ramas de la investigación.

RELEVANCIA DEL ESTUDIO

Debido a que los métodos analíticos de identificación de luteína y otros carotenoides, generalmente implican espacios de tiempo prolongados además de tener un costo elevado por análisis. [15-37] Su estudio por medio de electroforesis capilar pretende hacer un análisis de identificación rápido y relativamente económico, además de ayudar a la preservación del ambiente por tratarse de una técnica no destructiva ya que emplea soluciones acuosas con compuestos inocuos a la naturaleza. [20-35]

Por otro lado se propone el desarrollo y validación de dos metodologías para la determinación de Rimantadina en tabletas por medio de electroforesis capilar de zona, ya que de acuerdo con la revisión bibliográfica realizada, [6, 10, 13] se sabe que los métodos existentes evaluados por HPLC requieren de un tratamiento previo de la muestra, éste consiste en derivatizar al analito para que así desarrolle un color y presente absorbancia en la región del visible, aumentando de esta manera el gasto por análisis de la muestra; en cambio por el método desarrollado en el presente trabajo se hace una lectura con un arreglo de diodos a un bajo UV y con un tratamiento mínimo de la muestra. Además, como ya se ha mencionado la electroforesis capilar es una técnica no agresiva al medio ambiente.



GENERALIDADES

ELECTROFORESIS CAPILAR

La electroforesis capilar es una técnica alternativa de la electroforesis convencional (tradicional) y surge debido a que la velocidad de separación y resolución de los compuestos mejora al realizar las medidas en capilares, debido a la facilidad del aumento del campo eléctrico aplicado. Lo anterior se debe a que al realizar la separación en capilares el calor generado al aplicar el campo eléctrico, puede ser disipado más rápidamente con la consecuente facilidad de la utilización de voltajes mayores. Por esta razón la electroforesis se realiza en general en tubos capilares con un diámetro interno inferior a 0.1 mm y una longitud de 50 cm a 1 m. La figura G1 muestra los componentes básicos de un sistema de EC.

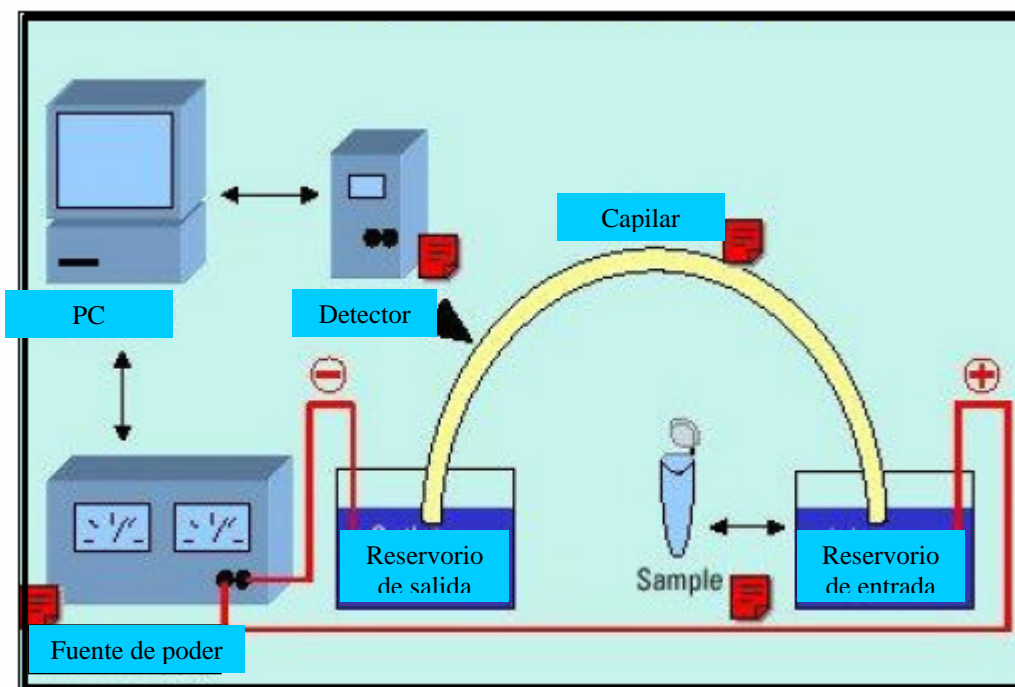


Fig G1. Componentes básicos de un sistema de electroforesis capilar

El mecanismo de separación está basado en las relaciones carga/masa de los analitos, cuando se encuentran bajo un campo eléctrico generado en un medio conductor.

En general, toda separación vía electroforesis se realiza mediante la migración diferencial de solutos cargados sometidos a la acción de un campo eléctrico. En el caso de la técnica de EC, la separación se hace en capilares generalmente de sílice fundida, los cuales son llenados con solución buffer.

Los extremos de un capilar de sílice fundida son sumergidos en el buffer contenido en dos viales, y el interior del capilar es llenado con ese buffer. Cada vial contiene un electrodo de



platino que sirve para establecer contacto eléctrico entre una fuente de poder de alto voltaje y la columna capilar. La introducción de la muestra se realiza reemplazando uno de los viales con buffer por un vial que contiene la muestra (disuelta en agua o en buffer) y luego aplicando por unos segundos una presión externa con ayuda de una bomba (inyección hidrodinámica), o bien un campo eléctrico (inyección electrocinética). Hecho lo anterior, se aplica el campo eléctrico para llevar a cabo la separación. La detección se realiza en el otro extremo de la columna ya sea en línea (a través de la pared del capilar) con un detector UV-VIS, arreglo de diodos o fluorescencia, o fuera del capilar con detectores como índice de refracción, conductimetría, amperometría, e inclusive espectrometría de masas.

Algunas de las áreas en donde la EC ha tenido un mayor impacto resolviendo problemas analíticos son: la química forense, farmacia, química de los alimentos, bioquímica, química clínica, neurociencia, biología molecular y ciencias del medio ambiente. [4-17] Su aplicación ha obtenido grandes logros en la separación y análisis de una variedad de moléculas simples y complejas que van desde iones, vitaminas, medicamentos, fármacos, aminoácidos, nucleótidos, péptidos, oligonucleótidos, glicoproteínas hasta incluyendo partículas subcelulares y virus. [4-17] Más recientemente, la EC ha sido utilizada en el diagnóstico genético y en el proyecto del genoma humano, jugando un papel muy importante en el éxito de dicho esfuerzo. [18, 19]

ELECTROOSMOSIS

El movimiento o flujo de solvente dentro del capilar, el cual a su vez influye en la separación de las moléculas está determinada por la acción de un campo eléctrico que produce dentro del capilar un fenómeno llamado electroósmosis y está caracterizado por un término denominado Flujo Electrosmótico (FEO)

Dentro del capilar de sílice fundida, la superficie sólida se carga negativamente debido a la ionización de los grupos silanol. Los contra-iones de estos aniones forman una doble capa (éstos están presentes en el buffer), estos contra-iones son atraídos por las paredes del capilar, pero al mismo tiempo migran hacia el cátodo al generarse un campo eléctrico en la solución, y dada su solvatación 'acarrear' en su movimiento al electrolito soporte y a los diferentes compuestos con ellos (Fig. G2). Este flujo de líquido que se origina bajo la presencia de un campo eléctrico, cuando una solución iónica está en contacto con una superficie sólida cargada, se denomina flujo electro-osmótico. [6-17]



Fig G2. Separación de las moléculas por el flujo electro osmótico con base en su carga y masa.



Debido a que las condiciones de corrida exigen que el capilar así como los viales en cada uno de sus extremos se llenen con un buffer, que sirve de medio conductor para el flujo de la corriente eléctrica, la diferencia de potencial impuesta entre los dos electrodos que generalmente son de platino permite la separación de los analitos cargados. La muestra que esta formada por un conjunto de aniones y cationes es introducida dentro de este sistema, ocupando así una sola franja o zona. Al someter este sistema a la acción de un campo eléctrico, las especies iónicas del electrolito y de la muestra migran hacia el electrodo correspondiente, es decir, se establece un movimiento de los iones que forman el sistema. A causa de la alta concentración del electrolito comparada con la de la muestra, algunas propiedades físicas como la conductancia serán influenciadas por el electrolito, pues la influencia de la muestra se hace despreciable. Cuando se aplica una diferencia de potencial entre los dos electrodos de platino separados por un medio conductor que es el buffer, el equilibrio de las velocidades electroforéticas de los iones de la muestra se alcanza en un periodo muy corto (10^{-6} s), con lo que se puede afirmar que las velocidades con las que se mueve cada molécula son constantes durante prácticamente todo el tiempo de análisis. Entonces la separación se da por las diferentes movilidades de los analitos, ya que cada ion tiene su propia constante de movilidad (μ_{efectiva}). [10-19]

El FEO puede modificar la migración de los compuestos, por lo tanto, si se mueven a la misma dirección que los analitos, la velocidad de éstos será mayor, si por otro lado, se mueven en contra del FEO su velocidad será disminuida. Las moléculas neutras se moverán a la misma velocidad que el FEO y este hecho permite determinar experimentalmente la velocidad del FEO, mediante la adición de un marcador neutro. Debido a que el FEO posee un perfil de flujo plano (Fig. G3), éste no contribuye de una forma significativa a la dispersión de las zonas de los componentes de la muestra. Ésta es una diferencia muy importante cuando se compara con el perfil de flujo parabólico causado por la introducción de líquido a la columna por una bomba, como se observa en HPLC. Por lo tanto, por EC siempre se obtendrán mayores eficiencias que por el método tradicional utilizado de HPLC.

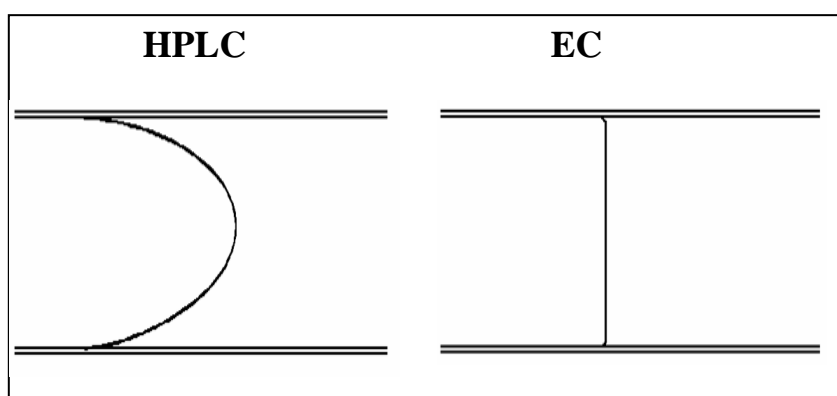


Fig G3. Comparación del tipo de flujo producido en HPLC y Electroforesis capilar de zonas

Existen varios factores que pueden afectar al flujo electroosmótico como son la adición de disolventes orgánicos, pero principalmente se verá afectado por el pH de trabajo y el campo



eléctrico aplicado, también se ve afectado por la fuerza iónica del buffer, y es influenciado por la viscosidad y la temperatura, también afectan al FEO la adición de polímeros hidrofílicos al buffer, así como los surfactantes y la derivatización del capilar con moléculas adheridas covalentemente a su pared. [7-15]

Debido a que el FEO se ve afectado por diferentes factores, podemos hacer un a manipulación efectiva del mismo, por lo que se pueden hacer varios cambios en las condiciones experimentales obteniendo así varios fenómenos como:

- Controlar al FEO
- Disminuir al FEO
- Eliminar al FEO
- Invertir el FEO

Los fenómenos que suceden dentro del capilar se explican en las siguientes figuras.

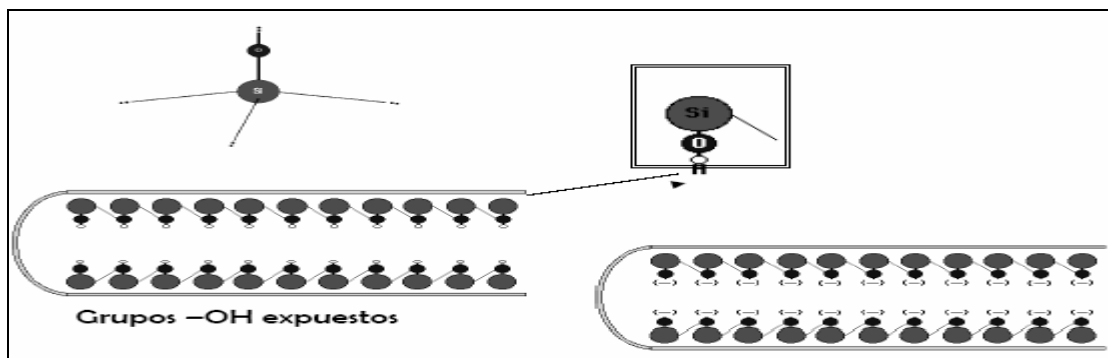


Fig G4. Esquema representativo de los capilares de sílice fundida donde se observan los grupos silanol ionizables.



Fig G5. Representación de la introducción del buffer al capilar, se observa también la adsorción de cationes a los grupos silanol ionizados ubicados en la pared del capilar.

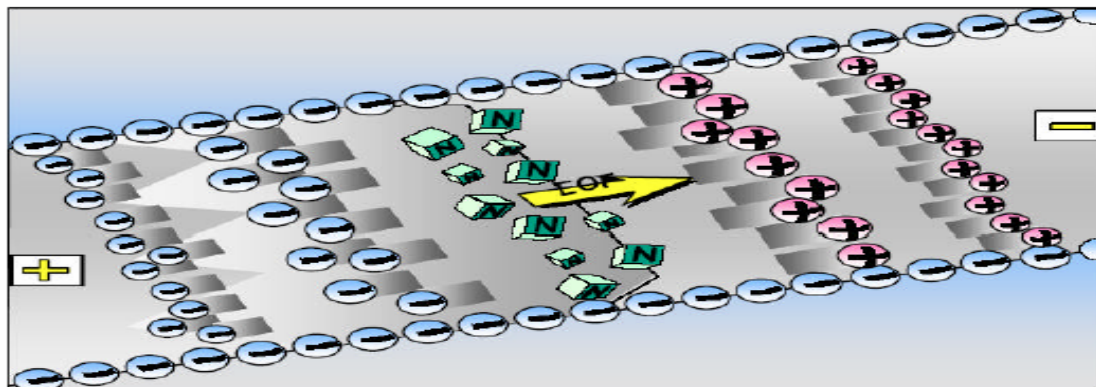


Fig G6. Aplicación de alto voltaje en el capilar y separación de los compuestos cargados mediante la migración de los cationes hacia el cátodo (-)

Entre las ventajas que ofrece la electroforesis capilar se puede apuntar que da lugar a separaciones con volúmenes de muestra extraordinariamente pequeños (de 0,1 a 10 nL), en contraste con la electroforesis convencional en la cual se emplean volúmenes de muestra en el orden de los μL , con una elevada resolución y rapidez. Ofrece además mayor facilidad y velocidad que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Esta técnica elimina el problema de los solventes de HPLC, la toxicidad de los mismos y su costo, pues emplea soluciones acuosas en su gran mayoría con muy baja concentración iónica, incorpora los principios de la automatización a través de un hardware creado especialmente con un software altamente optimizado.

Como las especies separadas eluyen de uno de los extremos del capilar, se pueden utilizar detectores cuantitativos como los empleados en HPLC. Como resultado se obtiene un electroferograma con picos característicos de cada compuesto separado. En realidad ambas técnicas son complementarias al basarse en mecanismos de separación diferentes. [15-20]

TIPOS DE ELECTROFORESIS CAPILAR: [14-16, 38]

ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA (ECZ): es una de las técnicas más importantes y más utilizada debido, probablemente a su simplicidad y elevado poder de separación. Está basada en la separación de los analitos según la relación carga/tamaño.

En esta técnica la composición del buffer es constante en toda la zona de separación. El potencial aplicado hace que los diferentes componentes iónicos de la mezcla migren cada uno según su propia movilidad y se separen en zonas que puedan estar completamente resueltas o parcialmente solapadas. Entre las zonas completamente resueltas hay huecos ocupados por el buffer. Su principal inconveniente es que no permite separar los compuestos neutros.

Entre las ventajas fundamentales que ofrece esta técnica se encuentran su alto poder resolutivo y sensibilidad, rapidez, simplicidad de manejo, requerimiento mínimo de preparación de muestras y un consumo de muestra del orden de los nanolitros. [4-8, 38] El mecanismo de separación se observa en la Fig. G7.



Fig G7. Mecanismo de la separación en la electroforesis capilar de zona.

En resumen la cromatografía y la electroforesis son en la actualidad técnicas ampliamente utilizadas en la resolución de macromoléculas de interés en la industria biotecnológica, biológica y bioquímica. Muestra de ello son el numeroso grupo de estudios realizados que se encuentran en la literatura especializada.[1, 2, 23-32]

Se destaca en las últimas décadas un mayor uso de la electroforesis capilar. Esta versión instrumental de la electroforesis convencional resulta más ventajosa debido a los pequeñísimos volúmenes que se necesitan para el estudio en cuestión y los resultados se obtienen en un tiempo mínimo. Estos aspectos la hacen preferida entre las técnicas de separación.

CROMATOGRAFÍA CAPILAR ELECTROKINÉTICA MICELAR (MEKC): Esta técnica requiere la utilización de un tensoactivo en un nivel de concentración en el cual se formen micelas. Estas micelas son capaces de alojar compuestos no polares en su interior. La interacción de las micelas y los solutos es la que produce la separación (Fig G8). [6-16, 38]

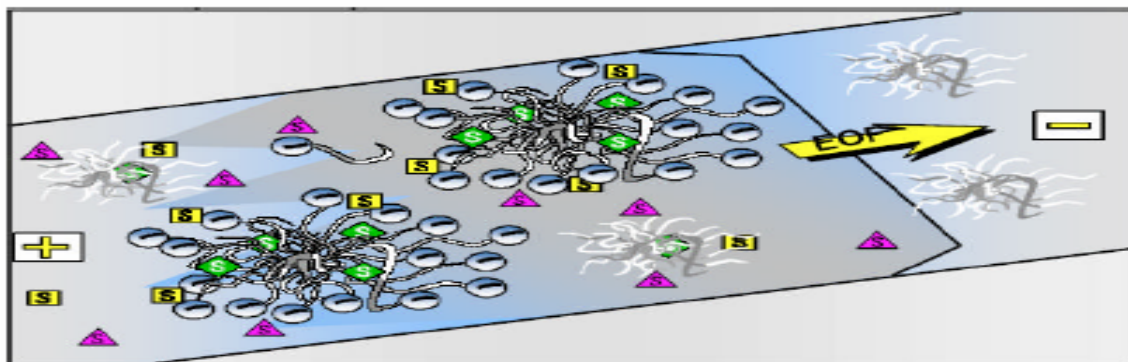


Fig G8. Esquema representativo de la separación de compuestos por cromatografía micelar electrocinética.

Esta técnica está aplicada principalmente a la separación de compuestos neutros, aunque también se separan iones.



En el caso de sustancias neutras, la separación esta basada en las diferencias de interacción de los solutos entre una fase acuosa y una fase micelar (pseudostacionaria).

En esta técnica la fase móvil o acuosa es transportada por el flujo electrosmótico. La fase micelar es transportada por una combinación entre el FEO y la migración electroforética.

Para el caso de las sustancias cargadas se basa en la interacción de los solutos con la fase acuosa y micelar, pero, también se basa en las diferencias de movilidades electroforéticas.

La eficiencia de la separación estará determinada por las diferencias de interacción de los analitos con las dos fases, es decir, entre mayor diferencia de interacción exista entre los analitos la separación será mejor.

La eficiencia de la separación está influenciada por el tipo de tensoactivo (agente formador de micelas) agregado al buffer de corrida, pues cada surfactante tiene un número de agregación micelar diferente, lo que hace que algunos analitos interaccionen mejor con algún tipo de micelas que con otras.

De esta manera podemos agregar al buffer de corrida diferentes tipos de agentes de superficie estos tipos pueden ser:

- Agentes aniónicos como el SDS (dodecil sulfato de sodio) y las sales biliares como el colato de sodio.
- Agentes catiónicos como el bromuro de trimetil cetil amonio.
- Agentes zwitteriónicos (anfólitos).
- Agentes no iónicos.

Tabla G1. Tipos de surfactantes y algunas propiedades de los mismos. (CMC= concentración micelar critica)

CLASES DE SURFACTANTES Y PROPIEDADES.				
Surfactante	Tipo	CMC	Agregación	
SDS	Aniónico	$8,1 \times 10^{-3}$	62	SDS: dodecil sulfato de sodio
CTAB	Catiónico	$9,2 \times 10^{-4}$	170	CTAB: bromuro de cetilmetil amonio
BRIJ-25	No iónico	$1,0 \times 10^{-4}$	40	BRU 25: polioxetileno - 23 - lauril éter
Sulfobetaina	Zwitteriónico	$3,3 \times 10^{-3}$	55	Sulfobetaina: N - dodecil - N-N dimetil amonio 3-propano 1-sulfónico ácido



ELECTROFORESIS CAPILAR EN GEL (ECG): En ésta la separación se basa en la forma y tamaño de los compuestos cuando están inmersos en una red polimérica que es el gel. Este gel hará que las movilidades electroforéticas de los analitos sean diferentes cuando estos difieren en su forma espacial y su peso molecular. Se lleva a cabo en una matriz polimérica con estructura de gel poroso, cuyos poros contienen una mezcla buffer donde ocurre la separación. Estos geles están contenidos en un tubo capilar. Los geles utilizados son por ejemplo agarosa, poliacrilamida, celulosa, etc.

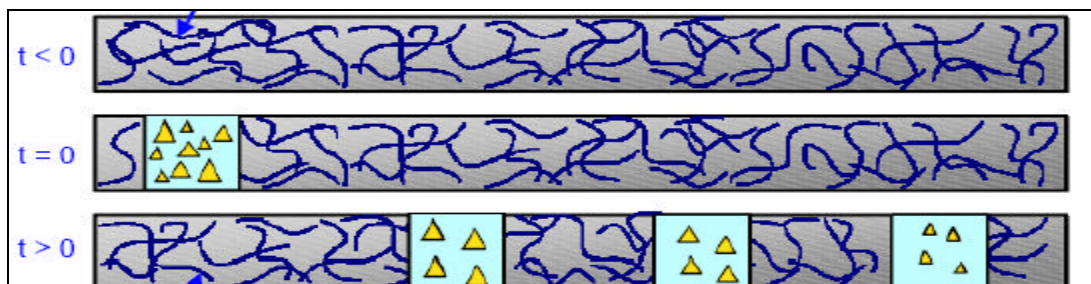


Fig G9. Esquema representativo de la separación de compuestos por electroforesis capilar en gel; $t < 0$ representa al capilar relleno del polimero usado como tamiz para la separación, $t = 0$ indica el momento de la introducción de la muestra, $t > 0$ representa la separación de los compuestos en base a su tamaño, peso molecular y forma.

ENFOQUE ISOELÉCTRICO (IEF): En esta técnica la diferencia de los puntos isoeléctricos de las moléculas anfotéricas (o zwitteriones) como las proteínas, péptidos o aminoácidos, se aprovecha para separarlas por el método de isoelectroenfoque. Este método se basa en establecer un gradiente de pH estable en una disolución o gel. Este gradiente se establece por un conjunto de buffers especiales llamados anfólitos, que migran por sí mismos hasta que alcanzan sus puntos isoeléctricos. Cuando la molécula anfotérica se encuentra dentro del medio con gradiente de pH, esta poseerá carga, es decir tendrá una movilidad hasta que alcance la zona de pH en donde encuentre su punto isoeléctrico (carga neta de cero) Figs. G10-G11. Los analitos así separados se movilizan al detector aplicando una presión para poder llevarlos al detector. [5-17, 38]

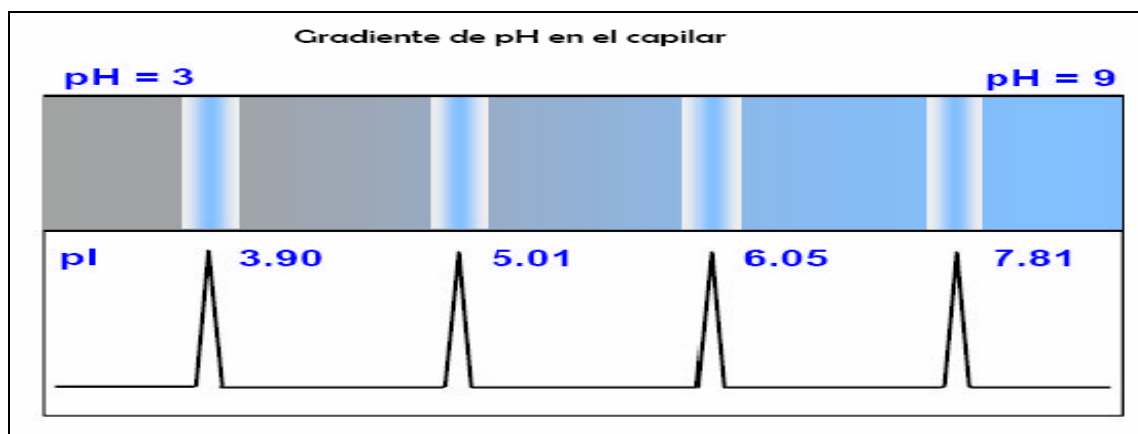


Fig G10. Representación de compuestos con diferentes puntos isoeléctricos, usando la técnica de isoelectroenfoque.

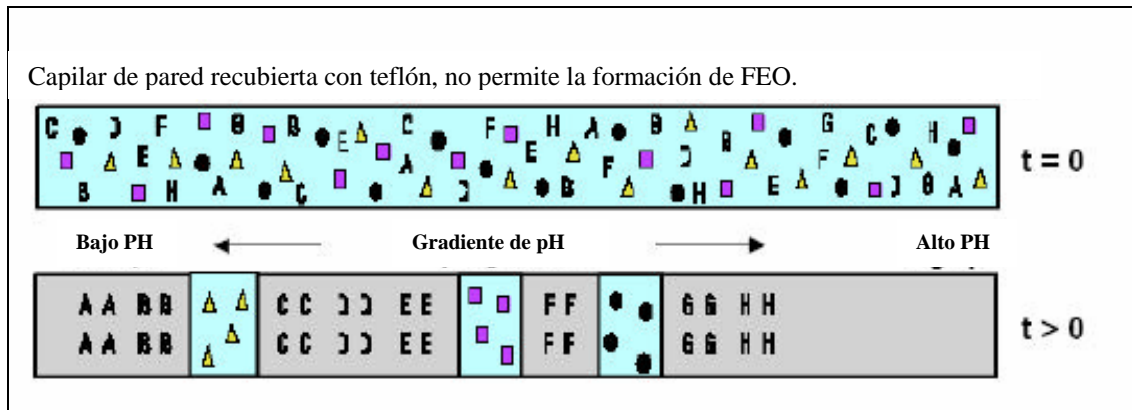


Fig G11. Esquema representativo de la separación de compuestos por isoelectroenfoque capilar; $t=0$ indica la introducción de la muestra al capilar relleno de una mezcla de anfólitos, $t>0$ indica la separación de los compuestos usando como base las diferencias entre sus puntos isoeléctricos.

LA ISOTACOFORESIS: significa electroforesis a velocidad uniforme. Esto significa que el tiempo de recorrido en el capilar bajo condiciones isotacofóricas es independiente de la velocidad. Es una técnica de separación por desplazamiento.

Antes de iniciar la corrida, el capilar se debe llenar con un electrolito líder o guía en un extremo. Éste debe tener una gran movilidad y debe ser mayor que la de los componentes a separar. Luego se introduce la muestra seguida del electrolito terminal o cola, cuya movilidad debe ser menor que cualquiera de los componentes de la muestra. La selección de los electrolitos guías y terminales depende del conocimiento de los valores de las movilidades y del pK_a para todos los componentes de la muestra.

En la isotacoforesis las bandas siempre están en contacto con la zona adyacente. Esta característica es necesaria para mantener la continuidad eléctrica a lo largo del sistema, dado que no hay un electrolito de soporte que separe las bandas Fig G12.

Esta técnica puede ser utilizada para determinar cationes y aniones. Se requiere usualmente corridas separadas para determinar cada forma iónica. [4-19, 39]

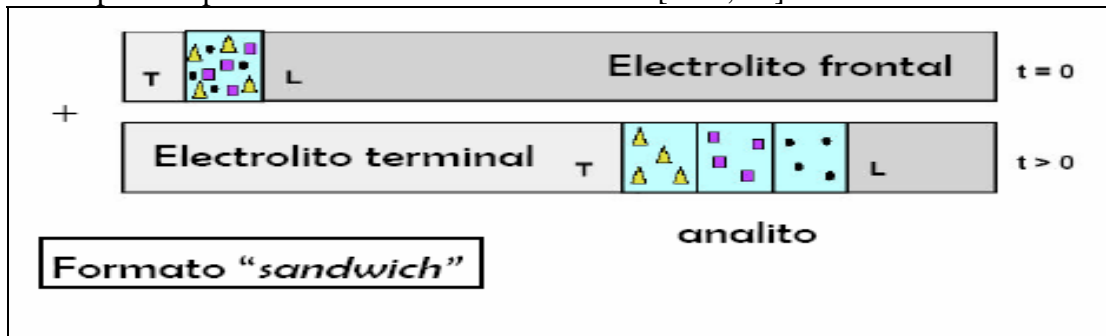


Fig. G12. Esquema representativo de la separación de compuestos por isotacoforesis.



LA ELECTROCROMATOGRAFÍA CAPILAR (ECC): Es un híbrido entre la HPLC y la EC donde se reúnen algunas de las mejores características de cada técnica por separado, por lo que tiene ventajas sobre ellas. De esta manera la electrocromatografía capilar puede usarse para la separación de especies no cargadas. Proporciona una elevada eficacia en las separaciones de microvolúmenes de disolución de muestra, sin necesidad de aplicar un bombeo de alta presión.

En la electrocromatografía capilar la fase móvil se transporta a través de la fase estacionaria por el bombeo ejercido por el flujo electrosmótico y no por un bombeo mecánico, lo que simplifica significativamente el equipo.



Compuestos Químicos Estudiados



LUTEÍNA

CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS [39]

Nombre químico: β,ϵ -caroteno-3,3'-diol.

Sinónimos: Luteína, Xantofila, luteína vegetal, luteol vegetal.

Formula molecular: $C_{40}H_{56}O_2$

Peso molecular: 568.85

Punto de fusión: 183 °C

pKa: No reportado

Cristales amarillos lustrosos, insolubles en agua, solubles en grasas y en disolventes de grasas. Muy soluble en metanol hirviente. Sensible a la luz y fácilmente oxidable.

ESTRUCTURA QUÍMICA

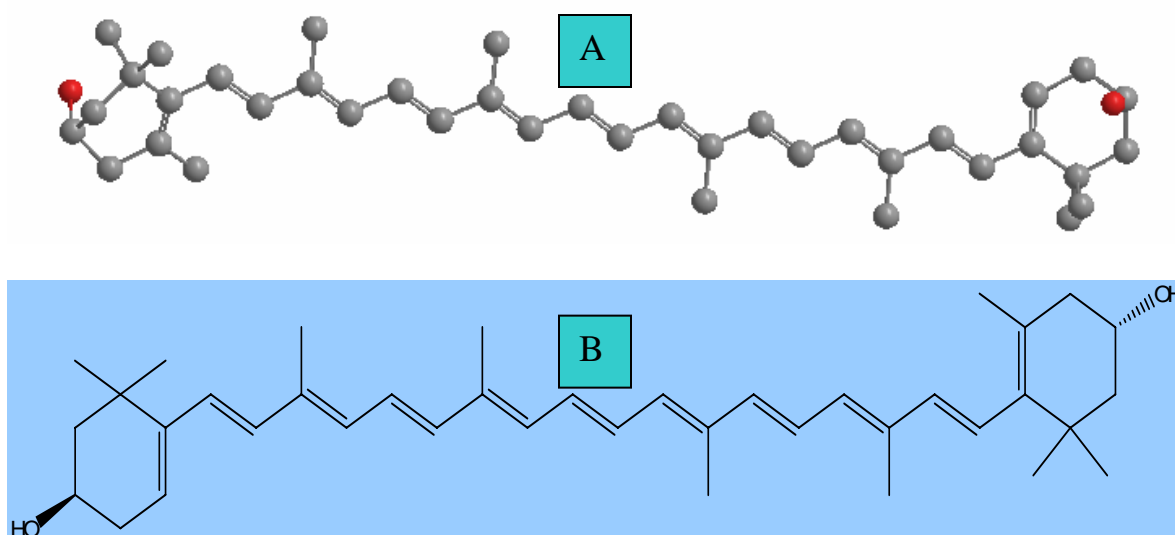


Fig G13. Estructuras de la luteína (A) frente y (B) en barras

USOS DE LA LUTEÍNA

La luteína es un pigmento vegetal, una xantofila, que se encuentra en frutas y hortalizas. Es un carotenoide que presenta actividad antioxidante in vitro, pero que no posee actividad provitamínica A, es decir, no es precursor de retinol.

La luteína, no puede ser sintetizada por nuestro organismo y ha de ser incorporada por la dieta, es transportada en la sangre unida a lipoproteínas de alta densidad y es captada sobre todo por la retina y el cristalino; allí se metaboliza a zeaxantina. La luteína y la zeaxantina se conocen con el nombre de "pigmentos maculares", por ser los pigmentos que se encuentran en la mácula. Su función es proteger esta zona de la retina y el cristalino de la acción oxidante de la luz. Luteína y zeaxantina reducen el daño oxidativo provocado por la luz azul, como han demostrado algunos estudios y proteger al ojo frente a reacciones fotoquímicas debido a la capacidad antioxidante que ambas poseen.



Podemos encontrar en nuestra dieta alimentos que son fuente de luteína (espinacas, lechuga, acelgas, brócoli, apio, espárragos, etc).

Diversos estudios han demostrado que el consumo de productos que contienen luteína esta asociado con un menor riesgo de cataratas y degeneración macular senil, debido a la actividad antioxidante que presentan.

En las cataratas el cristalino pierde transparencia por el depósito de moléculas oxidativas en su superficie. En la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) se degradan las células de la mácula por la acción de radicales libres. El papel fundamental de la luteína y la zeaxantina es evitar la formación de radicales libres y de moléculas oxidativas, que son las causantes de los daños en las membranas de las células de los tejidos oculares.

Varios estudios confirman que la concentración de pigmentos maculares (luteína y zeaxantina) en la retina está directamente relacionada con la sensibilidad visual en sujetos mayores de 64 años, observándose una disminución simultánea de estos pigmentos a medida que aumenta la edad de los sujetos. La suplementación con luteína durante un periodo de tiempo de 3 meses produjo una reducción del 30 %-40 % en el daño producido por la luz azul en los fotorreceptores y en otros tejidos afectados en la DMAE. [42-43]

Otras investigaciones están permitiendo establecer relación entre la ingesta de estos antioxidantes y las cataratas, llegando a la conclusión de que las dietas ricas en carotenoides, concretamente en luteína y zeaxantina, ofrecen una influencia protectora contra el desarrollo de cataratas. [44]

La luteína a su vez tiene diferentes distribuciones espaciales es decir, tiene varias formas isoméricas

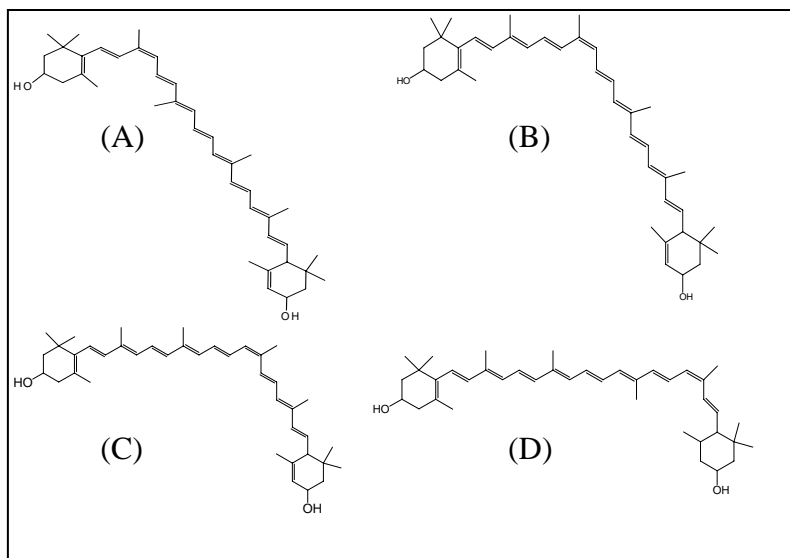


Fig G14. Formas isoméricas de la luteína: 9-Z luteína (A); 13-Z luteína (B); 9'-Z luteína (C) y 13'-Z luteína (D).



LQM 938

CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS^{3R}.

Nombre químico: 5-nitrotiazol-2-il- carbamato de etilo

Sinónimos: Carbamato del 2-amino-5 nitrotiazol, LQM 938

Formula Molecular: C₆H₇N₃O₄S

Peso molecular: 201.204

Punto de fusión: 196-198 °C

pKa_{teórico}: 8.04(N)^{*}

Cristales amarillo tenue insolubles en agua y acetona, solubles en metanol y cloroformo.

ESTRUCTURA QUÍMICA

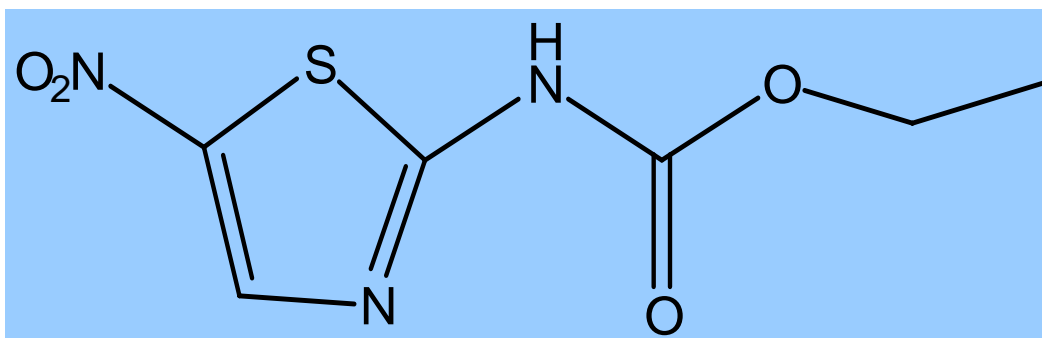


Fig G15. Estructura química del LQM 938

APLICACIONES

Se encuentra en fase de estudio

^{3R} Laboratorio de Química Medicinal Libreta 3 pp132-134

* Obtenidos por medio del programa ACD/LABS pKa DEMO versión 2.0



RIMANTADINA

PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS[39]

Nombre Químico: α -metilciclo [3.3.1.1]decano-1-metanamina.

Sinónimos: Rimantadina

Formula Molecular: $C_{12}H_{21}N$

Peso molecular: 179.31

Punto de fusión: $373^{\circ} - 375^{\circ}C$

$pK_{a_{teorico}} = 11.17 (NH_3^+)^*$

Cristales blancos, solubles en agua.

ESTRUCTURA QUÍMICA

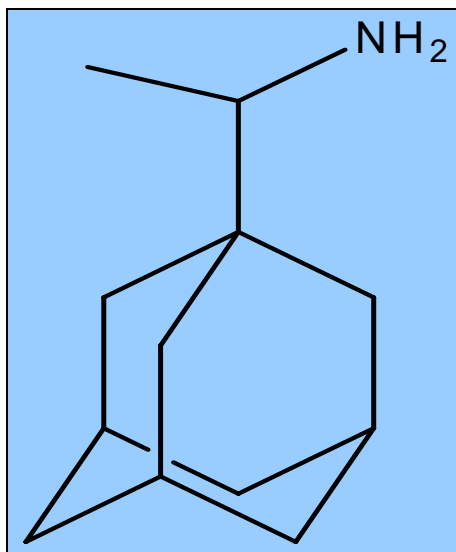


Fig G15. Estructura química de la Rimantadina

USOS DE LA RIMANTADINA.

La rimantadina se usa para prevenir y tratar las infecciones causadas por el virus de la influenza A principalmente.

La rimantadina viene envasada en forma de tabletas y solución líquida para ser administrada por vía oral. Generalmente se toma 1 ó 2 veces al día de 2 a 12 semanas.

FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA [40]

La rimantadina se absorbe ampliamente por vía oral y sus concentraciones máximas en plasma son directamente relacionadas con la dosis. Dosis por abajo de 200 mg al día, son suficientes para alcanzar la concentración máxima plasmática a nivel inhibitorio. Se elimina principalmente por vía urinaria por filtración glomerular y secreción tubular, se

* Obtenidos por medio del programa ACD/LABS pKa DEMO versión 2.0



puede eliminar sin cambios o en forma de cualquiera de sus 8 metabolitos; el compuesto N-acetilado es el metabolito más abundante. En pruebas farmacocinéticas en individuos voluntarios normales, el tiempo de concentración máxima en el plasma es de 6 ± 1 hora. La vida media de eliminación después de una dosis única es de 25.4 ± 6.3 horas. Y en individuos de 70 años o mayores la vida media de eliminación es de 32 ± 6 horas. [40]

La rimantadina inhibe la replicación del virus de la influenza A, en todos sus subtipos H1N1, H2N2, H3N2. Tiene muy poca o casi nula actividad contra el virus de la influenza B. Las pruebas de sensibilidad expresan que la concentración de rimantadina requerida para inhibir el 50% de los cultivos de virus (ED 50), en cultivos de tejidos, es variable de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ a 25 $\mu\text{g/ml}$. Habiéndose demostrado que las células del tejido del huésped toleran sin modificación la rimantadina a concentraciones de 100 $\mu\text{g/ml}$. [40]

El clorhidrato de rimantadina (1- adamantanamina clorhidrato), ejerce su mecanismo de acción antiviral, principalmente por alteración en la liberación del ácido nucleico viral en la célula huésped, interfiriendo con la función transmembrana en el canal iónico de la proteína viral M2. También, ha sido reconocido que previene el ensamble viral durante la replicación del virus e interfiere importantemente con la hemaglutinina imposibilitando la replicación. No interfiere con la inmunogenicidad de la vacuna virus A de la influenza.



MATERIAL Y EQUIPO

- Capilares de sílice fundida de 59 cm de longitud total y 50 cm de longitud efectiva, 75 μm de diámetro interno y 325 μm de diámetro externo. (Beckman Coulter, Fullerton, CA)
- Capilares de sílice fundida con 60 cm longitud total y 46 cm de longitud efectiva, 75 μm de diámetro interno y 125 μm de diámetro externo. (Beckman Coulter, Fullerton, CA)
- Matrazes volumétricos de 100, 50, 25, 10 y 5 ml.
- Bomba de Vacío
- PACE MDQ sistema de electroforesis capilar Beckman Coulter, (Fullerton, CA) con detector de arreglo de diodos y Ultravioleta Visible.
- Balanza analítica Sartorius BP221S

REACTIVOS

- Etanol HPLC; ensayo 99.8 (TECSIQUIM México)
- Hexano HPLC; ensayo 99.5 (Química Meyer México)
- Tolueno; ensayo 99.5 (Química Meyer México)
- Acetona; ensayo 98.9 (Química Meyer México)
- Tetraborato de sodio Decahidratado (JT Baker SA. de CV)
- NaOH (Productos Químicos Monterrey)
- KOH (JT Baker SA. de CV)
- Colato de sodio (agente micelar) [Aldrich. Chem. Co. Inc]
- Luteína (Sigma ensayo 70%)
- Propilenglicol (JT Baker SA. de CV)
- 4-metilbecilamina. (Sigma)
- Pseudoefedrina (Productos Farmacéuticos Chinoin, México D.F.)
- Paracetamol (Productos Farmacéuticos Chinoin, México D.F.)
- Rimantadina (Productos Farmacéuticos Chinoin, México D.F.)

MUESTRAS

- Extracto de pétalos de girasol (*Tagetes erecta*)
- Resina oleosa de pétalos de girasol
- Tabletas de Rimantadina (Productos Farmacéuticos Chinoin, México D.F.)

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Solución de NaOH 0.1m (100ml)

- Se pesan exactamente 400 mg de NaOH grado reactivo en un vaso de precipitados y se adicionan 80ml de agua desionizada.
- Se agita con ayuda de un agitador magnético hasta completa disolución.
- Una vez disuelta se transfiere la solución a un matraz volumétrico de 100 ml y se enjuaga el vaso de precipitados con 5 ml de agua desionizada 3 veces.
- Finalmente se lleva a la marca de aforo con agua desionizada



Buffer de boratos 20 mM + 50 mM de Colato de sodio pH= 9.5 (500ml)

- Se pesan 3.814 g de tetraborato de sodio decahidratado y se disuelven con aproximadamente 430 ml de agua desionizada en un vaso de precipitados de 500 ml.
- Una vez disuelto se ajusta el pH a 9.5 si es necesario con una solución de NaOH (sol saturada o diluida), una vez obtenido el pH deseado se adicionan lentamente a la solución 10.98g de colato de sodio y agitar hasta disolución total. (agitar de forma moderada para evitar la formación de espuma)
- Después de que se haya disuelto completamente el colato de sodio y la espuma que se pudiera haber formado haya desaparecido, la solución se transfiere a un matraz volumétrico de 500 ml y se lleva al aforo.

Solución Hexano Etanol Acetona Tolueno (HEAT)

- Para la preparación de esta solución se mezclan Hexano, Etanol, Acetona y Tolueno en la siguiente proporción: 10:7:7:6.

Solución Estándar de Luteína. (1µg/ml) (EL)

- Se pesan 3.571 mg de estándar de luteína (pureza 70%) y se disuelven en 2.5 ml de sol HEAT. Se deja reposar durante 5 hrs protegida de la luz y en refrigeración.

Solución de estándar interno LQM 938 (EI)

- Se pesan 15 mg de estándar LQM 938 y se disuelven en 8 ml de solución HEAT. Una vez disuelto por completo transfiere a un matraz volumétrico de 10 ml y se lleva a la marca de aforo con la solución HEAT.



METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DE LA LUTEÍNA A PARTIR DE LOS PÉTALOS DE GIRASOL

MÉTODO 1 [20]

Extracción

- 1) Se pesan 1000 g de pétalos de girasol, se extraen con 400mL de hexano durante una hora de agitación, se repite éste proceso de 8 a 10 veces. Se obtiene aproximadamente el 100 g de oleorresina.
- 2) Se evapora el disolvente de cada extracción y se obtiene el extracto oleoso.

Reacción de saponificación

- 3) 51.7 g de extracto oleoso se mezcla con 51.7 g de propilenglicol y se calienta la mezcla hasta 55 °C, homogenizando con agitación.
- 4) Se adicionan 24.5 g de una solución acuosa de KOH al 45 %, la adición se hace lentamente en un periodo de 30 minutos, y a una temperatura máxima de 70 °C. Se mantiene en agitación durante 10 horas. Se aprecia la formación de cristales después del tiempo mencionado.

Obtención de la luteína

- 5) Se suspenden los cristales formados con aproximadamente 120 ml de agua desionizada (lavado) y se calienta la mezcla a 70°C, agitando la mezcla hasta homogenizar.
- 6) Se filtra la mezcla a vacío con ayuda de un papel filtro con tamaño de poro entre 35-40 µm y se lavan los cristales retenidos con 100 ml de agua desionizada a 85 °C.
- 7) Después de esto los cristales se colocan en un desecador con atmósfera de N₂, durante 48 horas para eliminar la humedad.

MÉTODO 2 [24]

- 1) 200 g de oleorresina se sometieron a saponificación con una solución acuosa de KOH al 45 % a una temperatura de 65 a 70°C.
- 2) Una vez completada la reacción de saponificación (35 minutos). La mezcla se homogenizó con una mezcla de agua destilada-etanol 7:3 a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 3) La mezcla se filtró a vacío con un papel filtro con tamaño de poro entre 35-40 µm.
- 4) El precipitado obtenido se lavó con agua destilada hasta que el filtrado perdió totalmente la coloración naranja, y el pH del mismo fue prácticamente neutro.
- 5) En seguida el precipitado fue lavado con 200 ml de etanol frío y 200 ml de hexano frío.
- 6) Los cristales obtenidos se introdujeron a un desecador.



MÉTODO 3. PROCESO DE TYCZKOWSKI

- 1) Se pesan 100 g de resina de pétalos de girasol.
- 2) Se agregan 1L de solución HEAT
- 3) Se colocan 70 ml de solución acuosa de Na_2SO_4 al 10% agitando constantemente.
- 4) Después de 1 hora la solución clara que se observa en la parte superior de la mezcla se separa y se condensa hasta $\frac{1}{3}$ de su volumen inicial con nitrógeno.
- 5) Se refrigera a 4°C hasta la formación de cristales.
- 6) Los cristales formados se filtran con un papel filtro de poro mediano
- 7) Después son lavados con hexano frío y se redisuelven en la mínima cantidad de una mezcla de hexano-acetona 80:20 para que recristalicen.
- 8) Una vez frío el sistema se almacena en la oscuridad y bajo atmósfera de nitrógeno, para evitar la degradación de la luteína por acción del O_2 del aire y la luz.



METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE LUTEINA POR ELECTROFORESIS CAPILAR.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

- 1) Se tomaron 5 mg de los cristales obtenidos en cada método y se disolvieron en 4 ml de la solución HEAT calentando a 50 °C durante 5 minutos.
- 2) Una vez disueltos los cristales se dejó enfriar la solución hasta temperatura ambiente y se aforaron a 5 ml con la solución HEAT (sol A)
- 3) Se dejó en refrigeración durante 5 horas y protegido de la luz.

MUESTRAS ANALÍTICAS.

1. Se mezclaron 100 µl de sol A con 100 µl de sol de estándar interno (EI) en 1.3 ml de buffer de boratos-colato y se agitó de forma moderada, todo esto en un vial de corrida con capacidad de 2 ml (muestras problema).
2. Mezcla de estándares: Se colocaron 100 µL de solución de estándar interno y 100 µL de solución de estándar de luteína.

CONDICIONES DE ANÁLISIS

Inicialmente se acondicionó el capilar nuevo de la siguiente manera.

- 1) Agua desionizada durante 10 minutos a 20 psi de presión
- 2) HCl 0.1 M durante 10 minutos a 20 psi de presión
- 3) Agua deionizada durante 10 minutos a 20 psi de presión

Una vez acondicionado el capilar nuevo se “activa” con NaOH durante 10 o 20 minutos a 20 psi de presión.

El método seguido para las corridas es el siguiente.

- 1) Lavar el capilar con agua durante 5 minutos a 20 psi.
- 2) Acondicionar el capilar con buffer de borato-colato a 20 psi por 5 minutos.
- 3) Inyección hidrodinámica de la muestra con 0.5 psi de presión y 5 segundos
- 4) Separación aplicando un voltaje de 15 kV, con polaridad normal (del ánodo al cátodo) durante 15 minutos con detección a una longitud de onda (λ) de 470 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En la Fig. 1 podemos observar los espectros de absorción de luteína y LQM 938, los cuales fueron medidos con la finalidad de encontrar la longitud de onda óptima para la identificación de ambos compuestos.

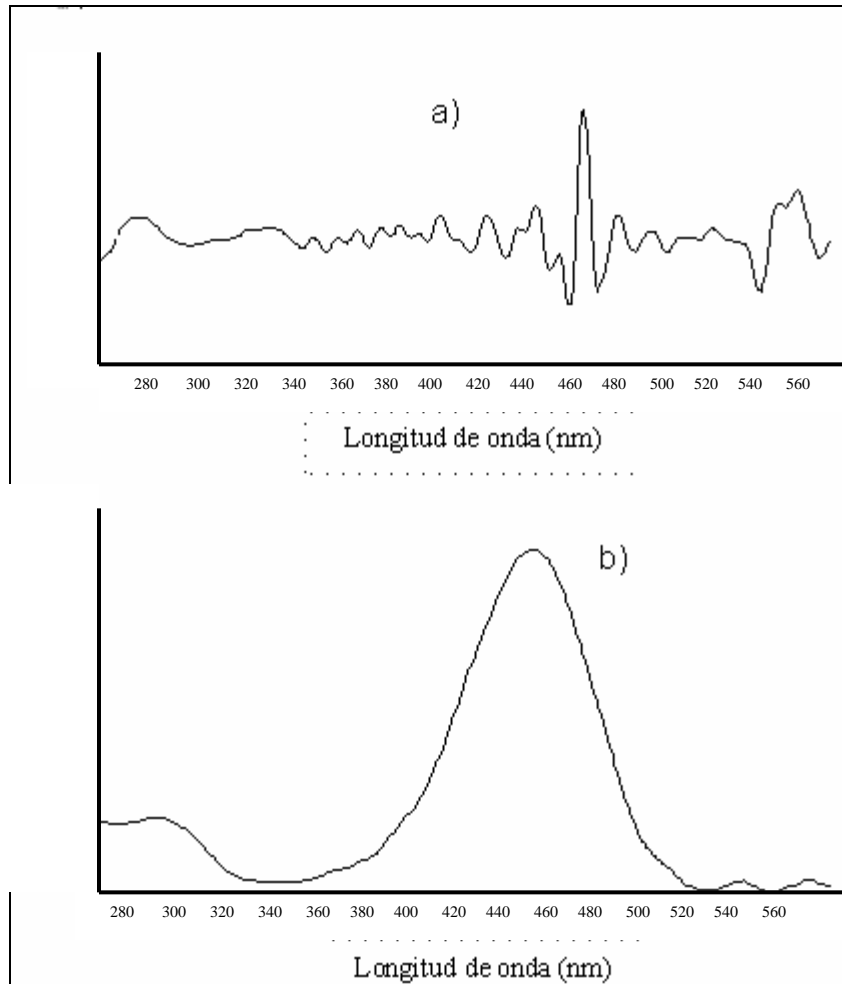


Fig 1. Espectros de absorción de a) luteína (estándar) y b) LQM 938 como estándar interno (EI), frecuencia de adquisición de datos 4Hz, rango de lectura 280-580nm.

A partir de estos datos obtenidos de los estándares de luteína y el estándar interno LQM 938, se determinó que la longitud de onda mas adecuada para maximizar la señal de la luteína con una señal considerable de LQM 938 era 470 nm, Podemos ver en la Fig. 1 que ésta es la longitud de onda donde la luteína da una respuesta máxima, aunque no es la longitud óptima del estándar interno, pero a esa longitud de onda aún presenta una buena absorción conveniente para su lectura.

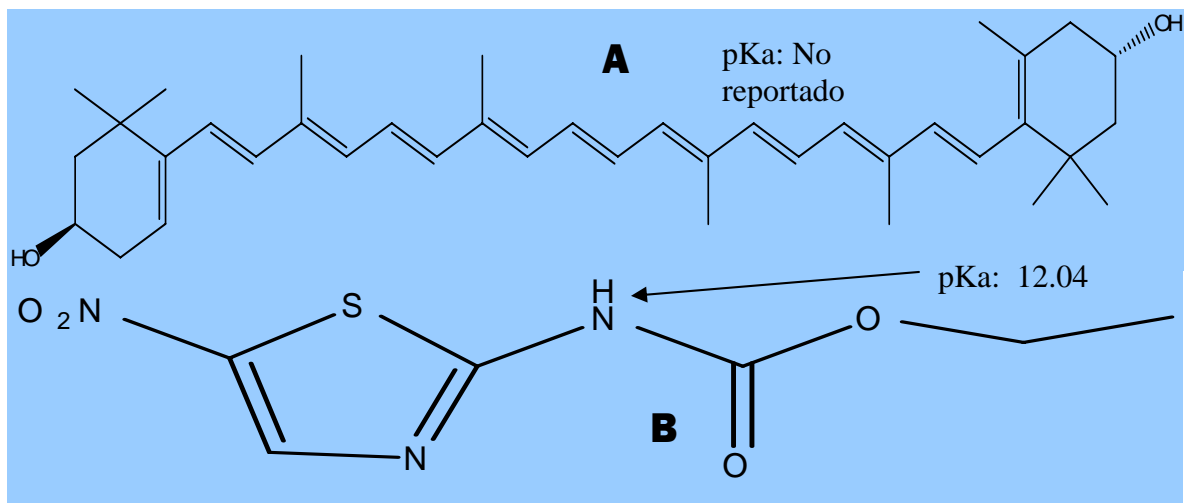


Fig 2. Estructuras moleculares de la α - Luteína y el LQM 996.

De acuerdo con las Fig. 2 y la Fig. 3a se observa que la Luteína y el LQM 938 son compuestos neutros a pH= 9.2. Debido a que tienen cero movilidad ellos migran junto con el flujo electroosmótico cuando se usa una solución buffer para realizar electroforesis capilar de zona. (Fig. 3a) es por este motivo que se usó una técnica como MEKC para separar los compuestos; es bien sabido que compuestos neutros pueden ser separados adicionando surfactantes al buffer de corrida para llevar a cabo la llamada cromatografía micelar electrocinética capilar (MECK) Aplicando ésta técnica los analitos pueden ser separados por las interacciones de éstos con la micelas cargadas de forma negativa (llamada fase pseudoestacionaria) resultando en un gran cambio en las movilidades netas de los analitos eluyendo cada uno a diferente tiempo.

En suma la luteína y el LQM 938 presentan un tiempo de migración cercano cuando son corridos usando MECK, pero presentan picos separados pudiéndose llevar a cabo una integración para su cuantificación. Esto es una ventaja pues la detección del estándar interno en las muestras no incrementa significativamente el tiempo total de análisis (aproximadamente 10 minutos, Fig. 3c)

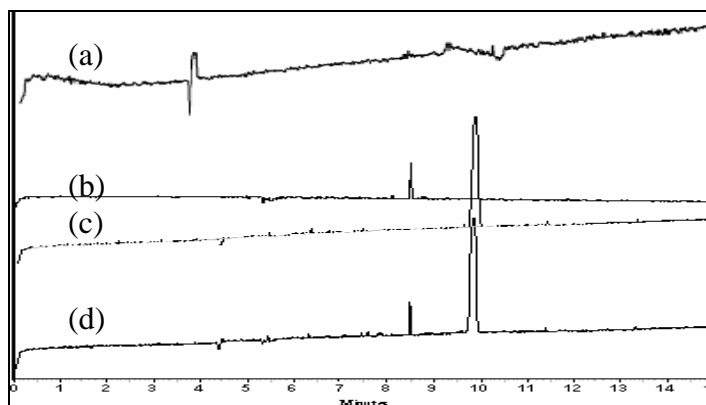


Fig 3. Electroferogramas de los compuestos estudiados, (a) estándar de luteína con buffer de boratos pH9.5 sin micelas, (b) estándar de luteína, (c) estándar interno LQM 938 y (d) estándar de luteína + estándar interno.

Condiciones de corrida: capilar de sílice fundida de 59 cm longitud total y 50 cm longitud efectiva, 20 mM buffer de boratos con la adición de 50 mM de colato de sodio pH 9.5 -excepto en electroferograma (a), 15kV de voltaje aplicado durante 15 minutos, con detección a 470 nm.

Tabla 1 Resultados del estándar de luteína y el estándar interno obtenidos de la Fig 3.

	Tiempo de migración (min)	Área	Concentración (mg/ml)	Factor de Respuesta
Estd Luteína	8.552	9240	0.0666	0.4210967
Estd. Interno	9.896	32947	0.1	

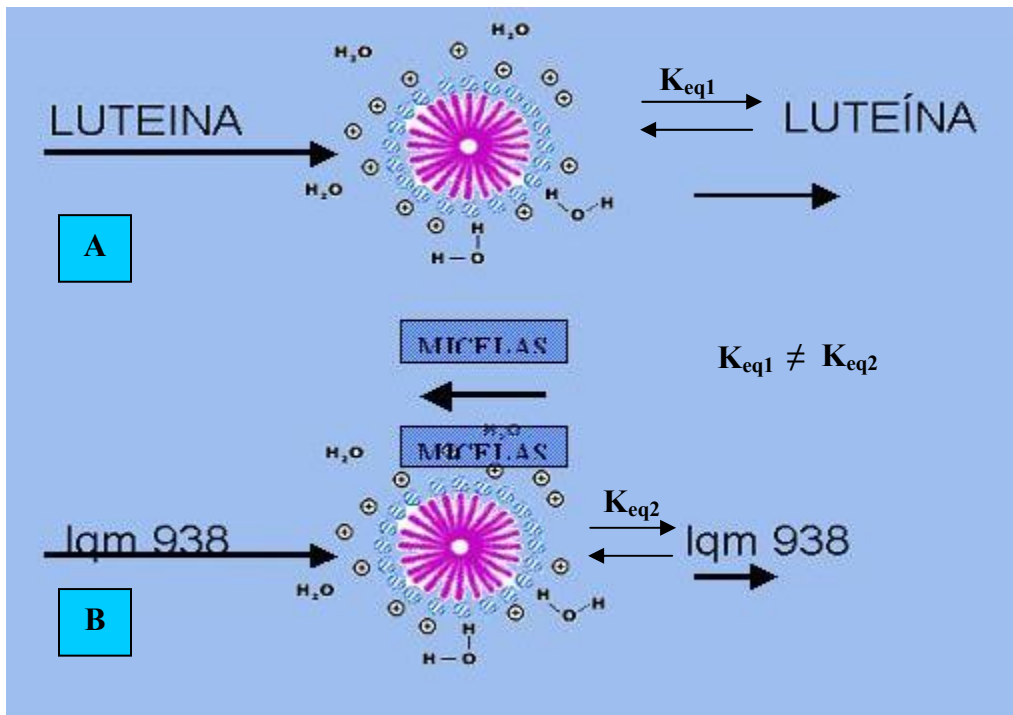


Fig 4. Diagrama que ejemplifica las interacciones de los compuestos involucrados en la separación en el medio micelar: A) interacción de la luteína con la micela; B) interacción del LQM 938 con la micela.

El orden de migración de cada uno de los analitos está dado por la interacción con las micelas, en este caso se puede observar que la luteína interacciona en menor grado con las micelas debido a que el tiempo de migración es menor que el estándar interno, y aunque los dos compuestos son neutros al pH de corrida se separan ambos por la diferente interacción de las moléculas con las micelas. (Fig 4)

De los datos reportados en la Tabla 1 se obtienen los valores de área y concentración de los estándares y se hace el cálculo del factor de respuesta con la siguiente relación.

$$FR = \frac{A_{ESTÁNDAR-LUTEINA} \times C_{ESTANDAR-INTERNO}}{C_{ESTÁNDAR-LUTEINA} \times A_{ESTANDAR-INTERNO}} \dots\dots(I)$$

Donde:

FR; Factor de respuesta

A_{STD LUTEINA}; Área del estándar de luteína

C_{ESTÁNDAR-INTERNO}; Concentración del estándar interno

Concentración_{STD LUTEINA}; Concentración del estándar de luteína

A_{ESTÁNDAR INTERNO}; Área del estándar interno

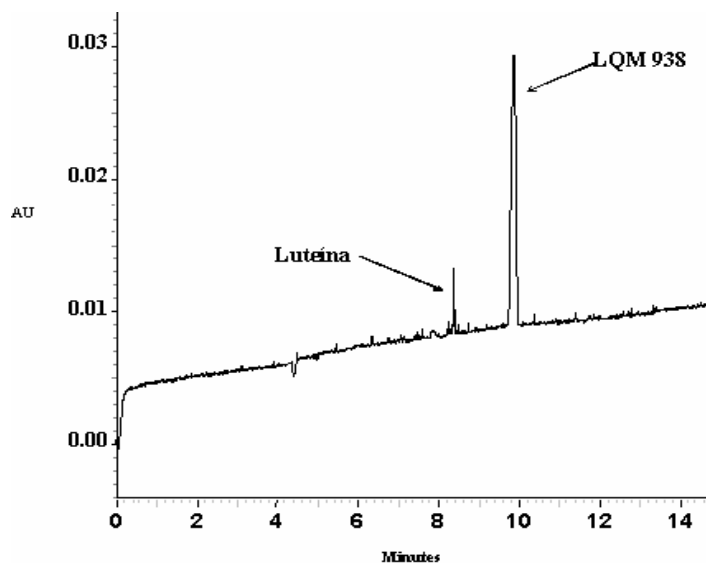


Fig.5 Electroferograma de la muestra obtenida a partir del método 1a las mismas condiciones de la figura 3.

Tabla 2. Resultados de los parámetros del electroferograma de la Fig 5 para el método 1.

	Tiempo de retención (min)	Área	Concentracion (mg/ml)	% relativo de luteína
Luteína	8.488	7898	0.05701	85.6
Estd. Interno	9.908	32898	0.1	

El factor de respuesta obtenido anteriormente está relacionado directamente con la concentración de la luteína y del estándar interno, por lo que se puede usar este valor calculado, para estimar así la concentración de la luteína en las muestras analíticas.

Para calcular la relación existente de luteína obtenida en cada uno de los métodos de extracción, así como de la muestra comercial se despeja entonces de la formula I la

concentración del estándar de luteína que ahora se convertirá en la Concentración de la luteína en la muestra problema

Resultando así la siguiente formula.

$$C_{LUTEINA-PROBLEMA} = \frac{A_{PICO-LUTEINA} \times C_{ESTANDAR-INTERNO}}{FR \times A_{ESTANDAR-INTERNO}} \dots\dots(II)$$

Donde:

Concentración LUTEÍNA PROBLEMA ; Concentración del Estándar de Luteína

A PICO LUTEÍNA; Área del Pico de Luteína

Concentración ESTÁNDAR INTERNO ; Concentración del Estándar Interno

FR; Factor de Respuesta

A ESTÁNDAR INTERNO; Área del estándar interno

El porcentaje relativo del pico de luteína problema se obtuvo de acuerdo con la siguiente formula:

$$\% \text{ RELATIVO DE LUTEÍNA} = (\text{Conc. PICO LUTEÍNA PROBLEMA} / \text{Conc. STD LUTEÍNA}) \times 100 \dots\dots(III)$$

Como se observa en la tabla 2 y en la figura 3 las concentraciones de luteína obtenidas a partir de la extracción realizada por el método 1 están relativamente elevadas y por tanto se establece que este método lleva una carga del 85.6% de luteína extraída.

En la Fig. 6 se muestra el electroferograma obtenido para el análisis de luteína por el método II. Podemos observar que no hay presencia de un pico con tiempo de migración característico de la luteína y en cambio se perciben la presencia de otros 2 picos que eluyen a otros tiempos posiblemente otro tipo de carotenoides. En la Tabla 3 se muestra un resumen de los parámetros encontrados para cada pico.

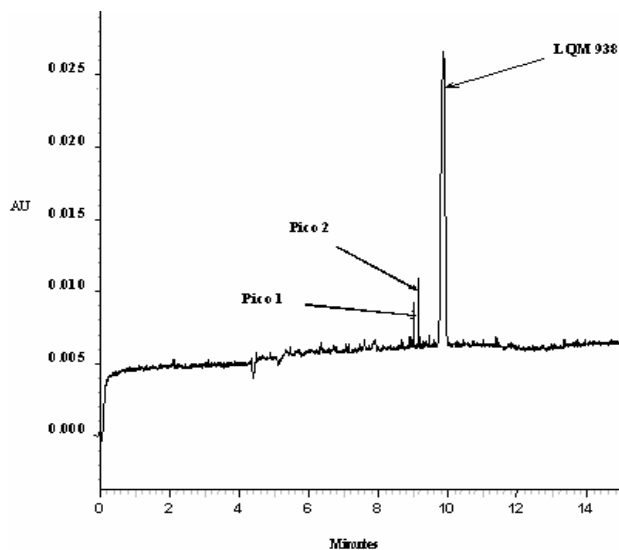


Fig. 6 Electroferograma de la muestra obtenida a partir del método 2 a las condiciones de la figura 3

Tabla 3. Resultados de los parámetros del electroferograma de la Fig 6 para el método 2.

	Tiempo de retención (min)	Área	Concentración (mg/ml)	% relativo luteína
Pico 1	9.05	3083		
Pico 2	9.188	4751		
Estd. Interno	9.891	32960	0.1	

En el caso del método 3 de saponificación y extracción de la resina, la figura 7 hace ver las señales obtenidas para esta muestra y en la tabla 4 observamos los parámetros obtenidos para estos picos. Se identificó el pico con tiempo de migración de 8.736 como el de luteína cuya fluctuación en su tiempo de migración es más que nada debida a los cambios de viscosidad de la muestra inyectada.

Por otro lado se observan picos que absorben a una longitud de onda similar a la de la luteína (Pico 2 y Pico 3) lo que nos hace pensar que se extraen de esta manera algunos otros carotenoides.

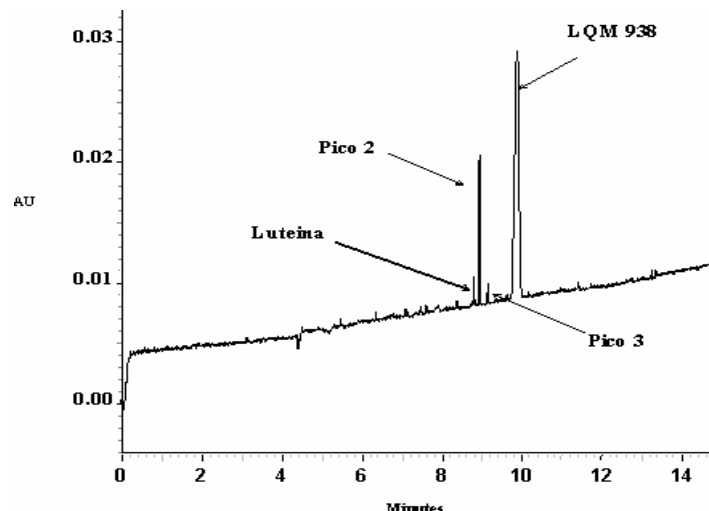


Fig. 7. Electroferograma de la muestra obtenida a partir del método 3 a las condiciones de la figura 3.

Tabla 4. Resultados de los parámetros del electroferograma de la Fig 7 para el método 3.

	Tiempo de retención (min)	Área	Concentración (mg/ml)	% luteína
Luteína	8.736	1369	0.0098	14.7045775
Pico2	8.95	6976		
Pico3	9.167	725		
Estd. Interno	9.955	32943	0.1	

Como se alcanza a observar en el electroferograma de la Fig. 7 la luteína esta presente en una baja proporción y se puede decir que se esta extrayendo algún otro carotenoide o bien que se extrae una forma isomérica diferente a la α -luteína que es el estándar con el que se esta trabajando; estos picos también pueden tratarse de carotenoides extraídos de la muestra oleosa y que por tener una estructura muy semejante a la de la luteína migran casi al mismo tiempo que ella.

En el caso de la medición de la muestra comercial, el electroferograma obtenido se presenta en la Fig. 8 y los parámetros para cada una de las señales obtenidas en la Tabla 5.

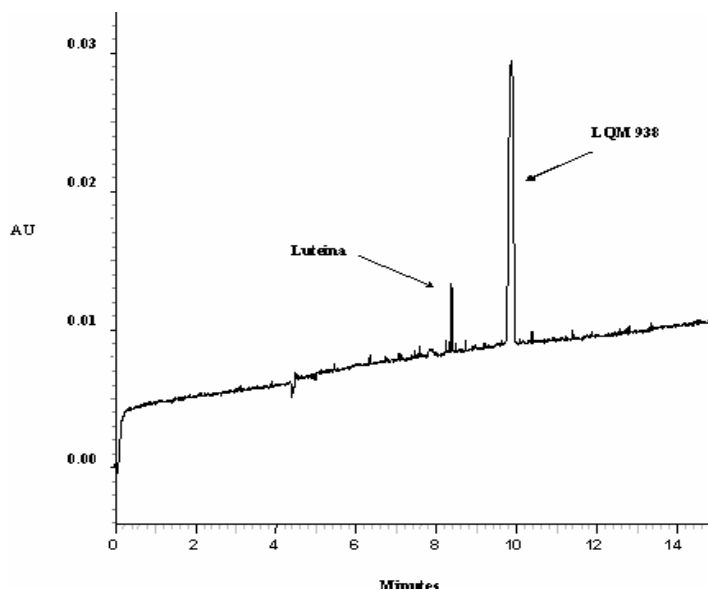


Fig. 8. Electroferograma de la luteína de una muestra comercial a las condiciones de la figura 3.

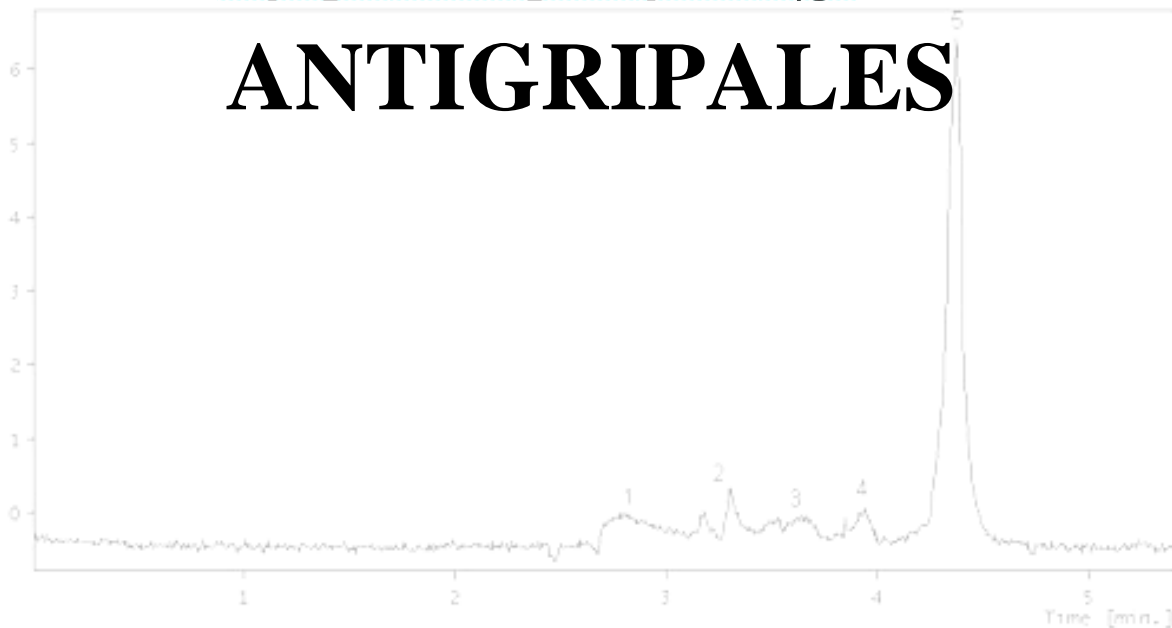
Tabla 5 Resultados de los parámetros del electroferograma de la Fig 8 para la muestra comercial.

	Tiempo de Migración (min)	Area	Concentración (mg/ml)	% luteína
Luteína	8.547	8547	0.06165	92.5702
Estd. Interno	9.824	32922	0.1	

La muestra comercial analizada presenta un porcentaje alto de luteína con respecto al estándar de SIGMA y presenta una movilidad aparente muy semejante a la que presenta el estándar. En el electroferograma se presentan algunos picos muy delgados que no corresponden más que a sólidos insolubles del electrolito soporte.



DESARROLLO DE DOS METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE RIMANTIDINA EN TABLETAS ANTIGRIPALES





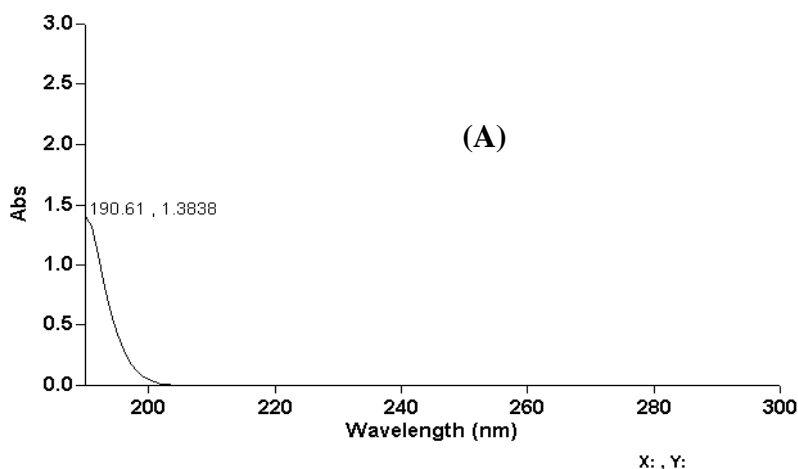
METODO 1. DETERMINACIÓN INDIRECTA DE RIMANTADINA

Durante el desarrollo del método 1 para determinación de Rimantadina, inicialmente se propuso llevarla a cabo utilizando una detección indirecta, utilizando un buffer que nos proporcionara la absorbancia, ya que la Rimantadina no absorbe a lo largo de la zona del UV-VIS (200 a 700 nm). El electrolito soporte utilizado fue la 4-metilbencilamina a una concentración inicial de 50 mM. Debido a que este compuesto tiene una alta absorbancia a las longitudes de onda donde el analito de interés (Rimantadina) no tiene absorbancia, es posible obtener de esta manera lecturas negativas (representada por un pico invertido) cuando la Rimantadina pasa por el detector (Figs 9, 10 y 11)

Para la determinación de las condiciones óptimas para la separación y cuantificación de la rimantadina en tabletas comerciales, se llevaron a cabo estudios de la influencia de los parámetros más importantes para la obtención de una alta señal con poco ruido, buena eficiencia de los picos y un tiempo de análisis corto. La optimización de los parámetros estudiados se describe a continuación.

DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA ÓPTIMA DE ANÁLISIS.

Para obtener la longitud de onda óptima para las mediciones de rimantadina, paracetamol, pseudoefedrina, y el placebo (tabletas sin recubrimiento) se midieron los espectros de absorción de cada uno de estos componentes en agua. (Fig. 9)



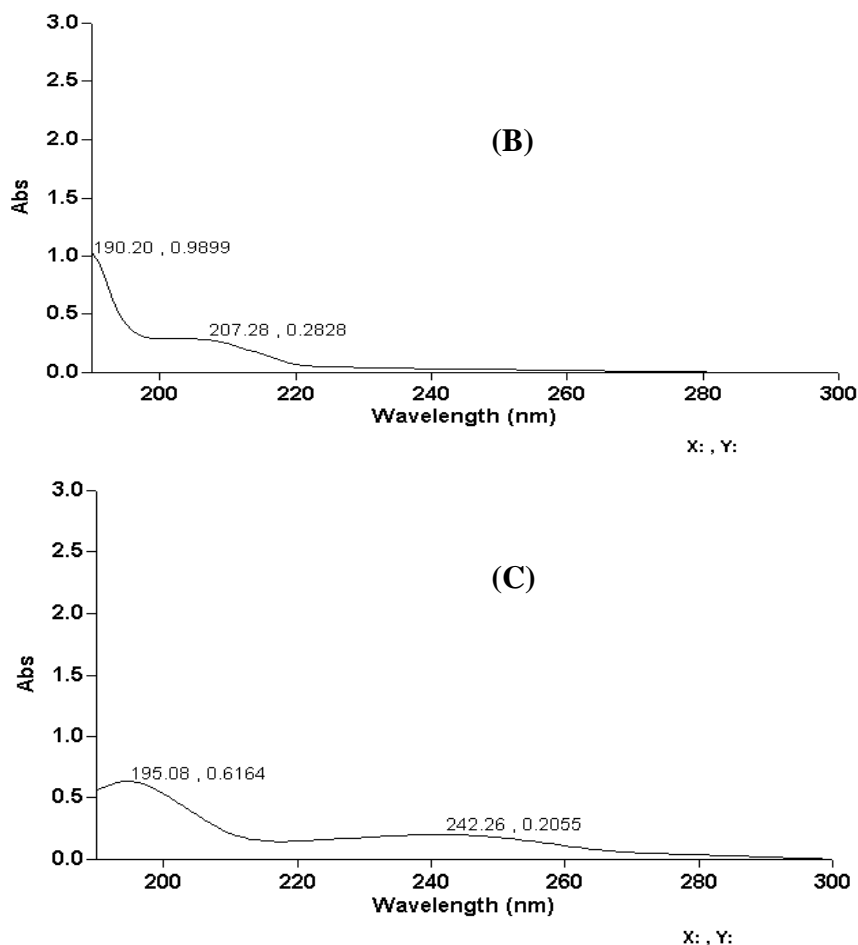


Fig. 9 Espectros de absorción de los analitos en agua.
(A) Rimantadina, (B) Pseudoefedrina y (C) Paracetamol.

Como se observa en la Fig. 9 (A), el analito de interés “Rimantadina” no presenta absorbancia a longitudes de onda mayores a 200 nm, Por otra parte el paracetamol (Fig 9C) presenta 2 máximos de absorción a 195.08 y 242.26 nm, mientras que la pseudoefedrina (Fig 9B) presenta dos máximos a 190.2 y 207.28 nm. Con lo que podemos afirmar que ninguno de los compuestos interferirá con la medición, ya que no absorben en el máximo del compuesto usado como electrolito soporte. (Fig 10)

Para hacer la determinación indirecta de rimantadina se determinó el espectro de absorción de un electrolito soporte que tuviera una absorción alta. De ésta manera se determinó el espectro de absorción de la 4-metilbencilamina.

El espectro de absorción se muestra en la figura siguiente.

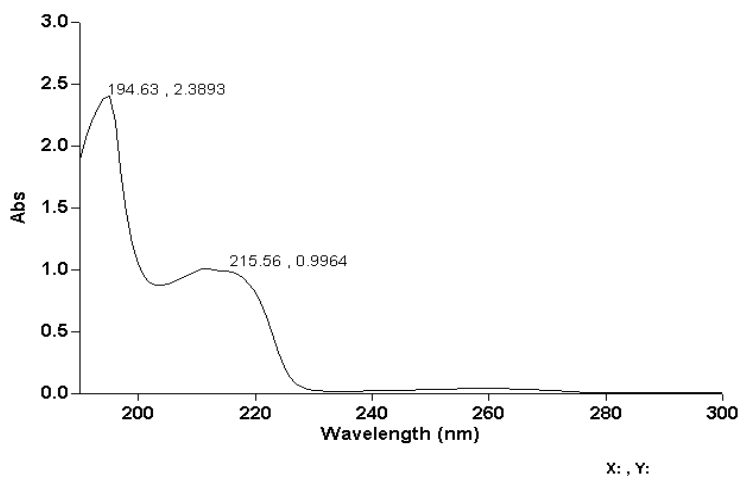


Fig. 10. Espectro de absorción de la 4-metilbencilamina

Como se observa en la Fig. 10 el buffer de 4-metilbencilamina presenta dos máximos uno a 194.63nm y otro a 215.56 nm.

En base a lo anterior y considerando que los 3 principios activos se encuentran en mezcla en las tabletas, se selecciono la longitud de onda de 216 nm donde se presenta uno de los máximos de absorbancia de la 4-metilbencilamina, mientras que el paracetamol y la pseudoefedrina presentan poca absorbancia, además de que el analito de interés no presenta ninguna absorbancia con lo que aseguramos que se podrá observar una señal negativa cuando cada uno de los componentes pasen por el detector.

COMPORTAMIENTO DE LOS COMPUESTOS

De acuerdo a la estructura molecular y a la información de los pKa's calculados (software ACD/Labs), en solución acuosa podemos predecir teóricamente que la molécula de Rimantadina se comporta como un catión en un intervalo de pH's de 0 a 11.17. La pseudoefedrina también se comporta como catión a pH's de 0 a 9.38, y el Paracetamol se comporta como una especie neutra a pH's menores de 10.82.

Por lo anterior podemos deducir que si utilizamos un buffer de 4-metilbencilamina a pH 9.0¹ (Fig. 11) la Rimantadina al ser un compuesto básico por contener una amina primaria, se encontrara en su forma protonada y por lo tanto migrará al cátodo cuando le sea aplicado un campo eléctrico.

¹ Este pH es el que se propuso inicialmente de acuerdo a las características de cada uno de los analitos.

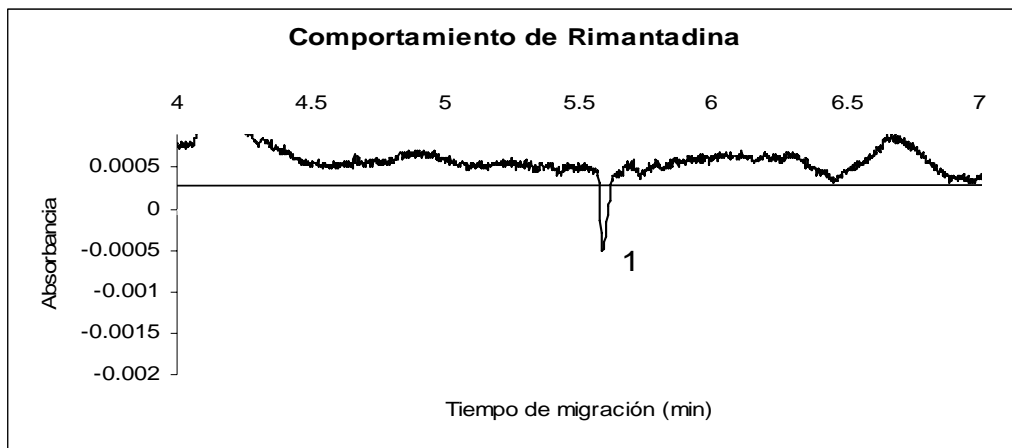
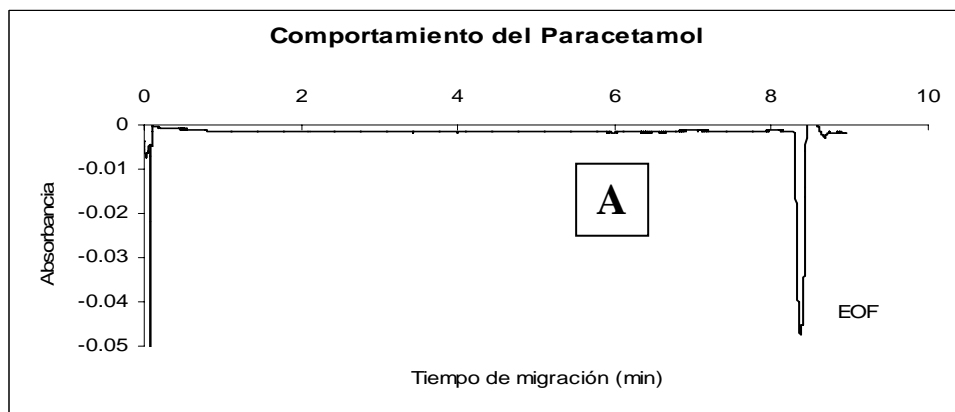


Fig. 11 Electroferograma de la solución estándar de Rimantadina. Condiciones: 50 mM buffer de 4-metilbencilamina, pH 9.0, 30 kV, 25 °C, inyección hidrodinámica 0.5 psi, 10 s. Capilar de Sílice fundida 75 μm de diámetro interno, 125 cm de longitud total (46 cm de long. al detector), detección a 216 nm.

Así mismo se evaluaron por separado al paracetamol como la Pseudoefedrina, bajo las mismas condiciones. El comportamiento de estos se muestra en la Fig. 12

En esta se puede observar que el paracetamol al comportarse como una especie neutra a ese pH de 9 (pK_a 10.82), migra junto con el EOF (Fig. 12A), mientras que la pseudoefedrina bajo estas condiciones se encuentra en forma de catión, con un tiempo de migración de aproximadamente 5.5 min (Fig12B)



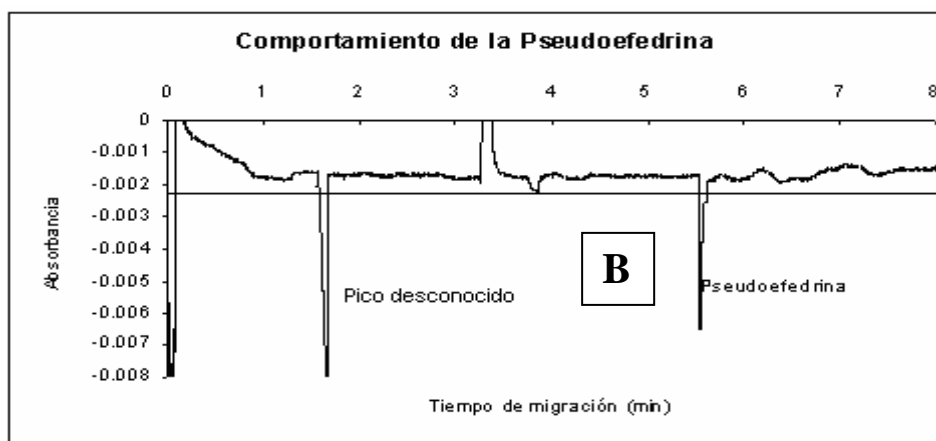


Fig 12. Electroferograma de la solución estándar de Paracetamol (A) y Pseudoefedrina (B) en placebo. Mismas condiciones que la Fig11.

Una vez analizado el comportamiento de los analitos presentes en la tableta, y de acuerdo al comportamiento de cada uno de ellos, bajo las condiciones impuestas al análisis, se procedió a medir la mezcla de los analitos junto con el placebo, esto a fin de corroborar que ninguno de los compuestos presentes interfiere en la determinación de nuestro principio activo Rimantadina (Fig13)

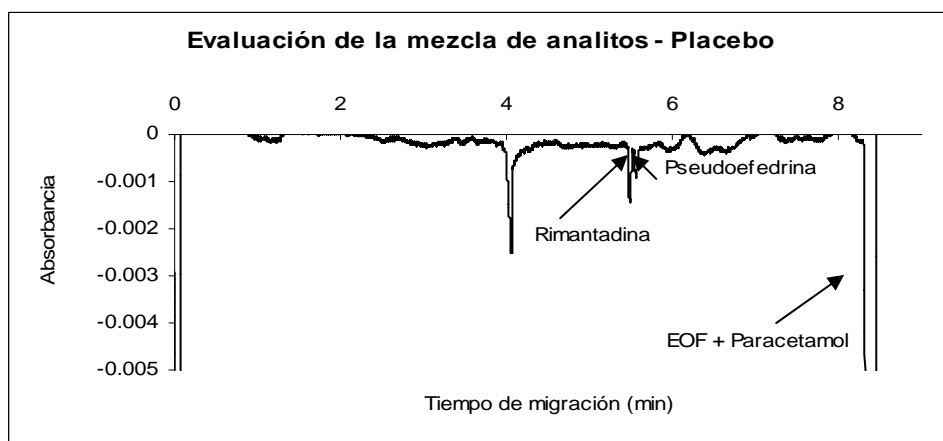


Fig 13 Electroferograma de la mezcla de los analitos junto con el placebo. Mismas condiciones que Fig11.

Dentro de la figura anterior (Fig.13), puede observarse que no existe interferencia por parte de algún componente ni del placebo, ni de la pseudoefedrina o el paracetamol para la determinación de la Rimantadina. El tiempo de migración de la Pseudoefedrina es muy semejante al de la Rimantadina, al comportarse también como un catión por lo que se realizó el estudio de algunos factores de influencia a fin de mejorar la resolución entre estos dos compuestos.

ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL pH EN LA SEPARACIÓN.

Se realizó el estudio el efecto del pH en el tiempo de migración de los picos de la Rimantadina y la pseudoefedrina (Fig14). Se puede observar que la resolución entre ambos compuestos aumenta al incrementarse el pH.



El tiempo de migración de la Rimantadina varía desde aproximadamente 6.0 para disminuir hasta 5 min. lo cual nos indica que la contribución del flujo electrosmótico (EOF) a la movilidad total de la Rimantadina aumenta con el pH.

La Pseudoefedrina es un componente catiónico a pH menores de 9.38 pero sobrepasando dicho pH la proporción de especie neutra de pseudoefedrina empieza a aumentar considerablemente por lo que la movilidad efectiva de este compuesto disminuye. El comportamiento del paracetamol fue siempre poseer una movilidad efectiva nula, ya que al presentarse como una especie neutra en los pH's estudiados (8 a 11) solo hubo influencia en el tiempo de migración debido a la variación del EOF, con el cambio de pH.

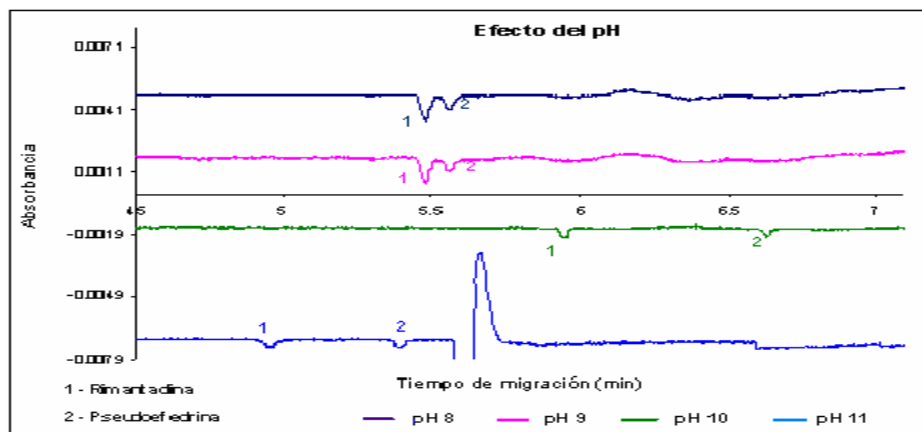


Fig. 14 Electroferograma del efecto del pH sobre los analitos estudiados. Mismas condiciones de la Fig. 11 excepto el pH.

Con base a los electroferogramas de la Fig. 14 se selecciono como óptimo el pH 10.0 debido a que es donde la Rimantadina presenta una máxima eficiencia, una mayor altura con poca contribución del ruido del buffer y una resolución suficientemente grande para la realización del análisis, con respecto a la Pseudoefedrina.



ESTUDIO DE ESPECIFICIDAD DE MÉTODO.

Así mismo se estudio la posible interferencia de componentes del recubrimiento de las tabletas en la determinación de Rimantadina. Para lo cual se realizaron las medidas del placebo de tableta con la adición del recubrimiento de la tableta, adicionando además pseudoefedrina y paracetamol (100 ppm c/uno), que también forman parte del placebo real de la forma farmacéutica (llamado Placebo Plus). El comportamiento se muestra en la Fig.15



Fig. 15 Electroferograma del comportamiento del placebo plus. Condiciones: 50 mM buffer de 4-metilbencilamina, pH 10.0, 30 kV, 25 °C, inyección hidrodinámica 0.5 psi, 10 s. Capilar de Sílice fundida 75 μ m de diámetro interno, 125 cm de longitud total (46 cm de long. al detector), detección a 216 nm.

En la Fig. 15 puede apreciarse claramente que no existe respuesta por parte de alguno de los componentes del recubrimiento de la tableta al tiempo de migración que corresponde a la Rimantadina.

Un último experimento consistió en adicionar el estándar de Rimantadina al placebo plus y los resultados pueden observarse en la Fig16.

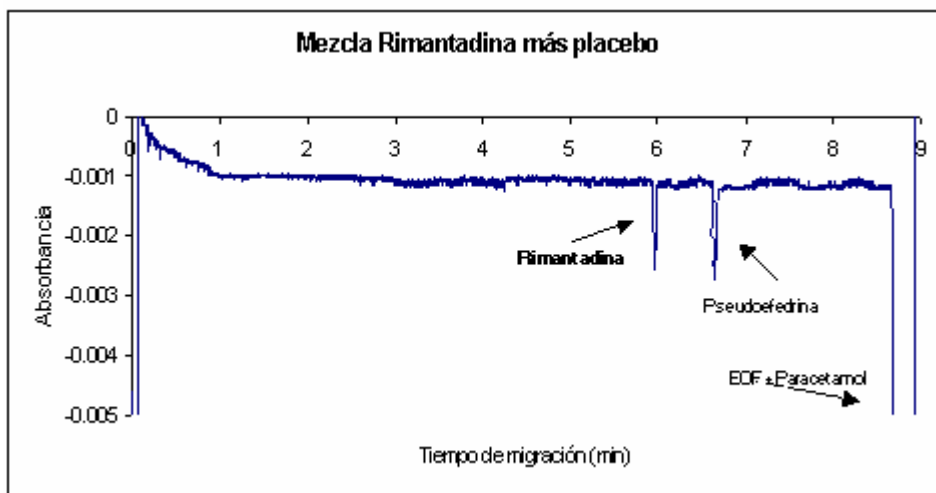


Fig16 Electroferograma del comportamiento del placebo plus mas la adición de Rimantadina 100 ppm. Mismas condiciones que Fig. 15



El límite de detección encontrado ($S/N = 2$) fue de 10 ppm, por lo que a estas condiciones se puede realizar perfectamente el control de calidad del contenido de Rimantadina en la tableta recubierta.

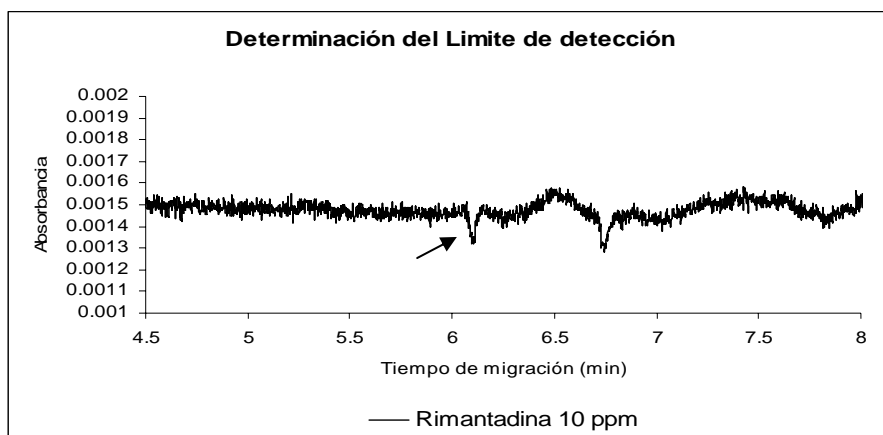


Fig17 Electroferograma de la determinación del límite de detección para el análisis de Rimantadina en placebo. Mismas condiciones Fig15

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ELECTROLITO SOPORTE

El efecto de la concentración de la 4-metilbencilamina fue estudiado y los resultados pueden ser vistos en la Fig18. La señal más alta de la rimantadina se observó usando un buffer de 50mM.

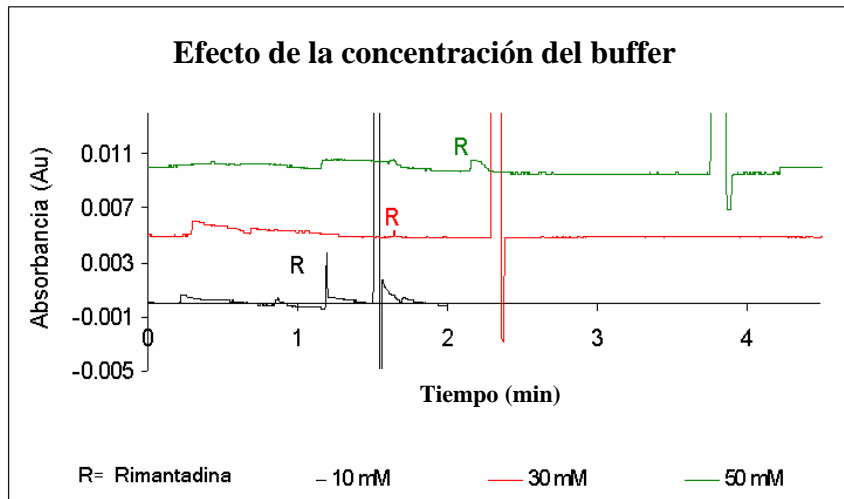


Fig18 Electroferograma de la determinación del efecto de la concentración del buffer. Mismas condiciones Fig15. Los picos se observan hacia arriba debido a que el buffer tiene una herramienta para hacer lecturas negativas y de ésta manera invertir los picos que originalmente serían hacia abajo.

Se observó que la inyección hidrodinámica fue la más apropiada vía para introducir la muestra (0.5 psi por 5 segundos), debido a que la inyección electrocinética produce picos pequeños y asimétricos.



RESUMEN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS.

Podemos observar (Fig. 14) que la Rimantadina tiene un tiempo de migración de 5.97 min. y la pseudoefedrina de 6.65 min, lo cual garantiza una buena resolución entre estos dos componentes a el pH utilizado de 10.

En la Tabla 6 se muestra un resumen de las condiciones óptimas determinadas hasta el momento, para la detección indirecta de Rimantadina.

Tabla 6 Condiciones óptimas de los parámetros estudiados.

PARÁMETRO	CONDICIÓN ÓPTIMA
Pretratamiento de muestra	Ninguno (inyección directa de la solución)
Tipo de Buffer	4 – metilbencilamina
Concentración del Buffer	50 Mm
pH del buffer	pH 10.0
Límite de detección	10 ppm (sin preconcentración)

EVALUACIÓN DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO

Se realizo el estudio para la linealidad del método ocupándose para ello diferentes factores que anteriormente ya se habían estudiado estos factores y condiciones se resumen en la tabla 7.

Tabla 7. Condiciones óptimas para la determinación de Rimantadina por EC

PARÁMETRO	CONDICIÓN ÓPTIMA
Tipo de Buffer de corrida	Buffer de 4-metilbencilamina
Concentración del Buffer	50 mM
pH del buffer	pH 10
Voltaje de separación	20 kV
Lavado entre corridas	3 min NaOH 0.1M 2 min Agua desionizada 2 min Buffer de corrida
Longitud de onda	214 nm
Tipo de detección	Indirecta
Tipo de Inyección	Hidrodinámica 0.5 psi, 5 s



La linealidad de un sistema es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o mediante una transformación matemática, son directamente proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado. Es decir, mide el grado en que la respuesta del método se aproxima a una función lineal del tipo:

$$y = b_1x + b_0$$

al trabajar con diferentes concentraciones.

La linealidad del sistema se determinó mediante la construcción de una curva de calibración (concentración-respuesta) utilizando cinco diferentes niveles de concentraciones de Rimantadina estándar en buffer por triplicado (80, 90, 100, 110 y 120 % de la concentración nominal), preparadas por dilución a partir de la misma solución patrón en agua. Estas soluciones se analizaron por electroforesis capilar bajo las condiciones óptimas descritas en la Tabla 7. La descripción de los sistemas analizados, las áreas, tiempos de migración (T.M.) y alturas obtenidas, se observan en la Tabla 8.

La concentración nominal 100% se considera como la disolución de 1 tableta (50 mg P:A.) en 500 ml de buffer, es decir de una concentración de 100 ppm.

Tabla 8. Descripción de la curva de calibración de Rimantadina estándar medida por EC

% Concentración nominal	Area	T.M.	Altura
80	113874	3.64	29409
80	120833	3.64	30811
80	116973	3.66	32326
90	132845	3.66	32475
90	136535	3.66	34057
90	132882	3.67	35233
100	149484	3.66	35544
100	149371	3.66	36045
100	148130	3.66	36111
110	166583	3.65	39490
110	166377	3.65	40124
110	168861	3.65	41298
120	180099	3.65	42724
120	187105	3.65	43997
120	184693	3.65	45623



La Fig. 19 muestra los resultados del ajuste a un modelo lineal del Área vs. % concentración nominal de Rimantadina. La ecuación que describe el modelo es la siguiente:

$$\text{Área} = 1666.64 * \text{Conc. nominal de Rimantadina} - 16354.7$$

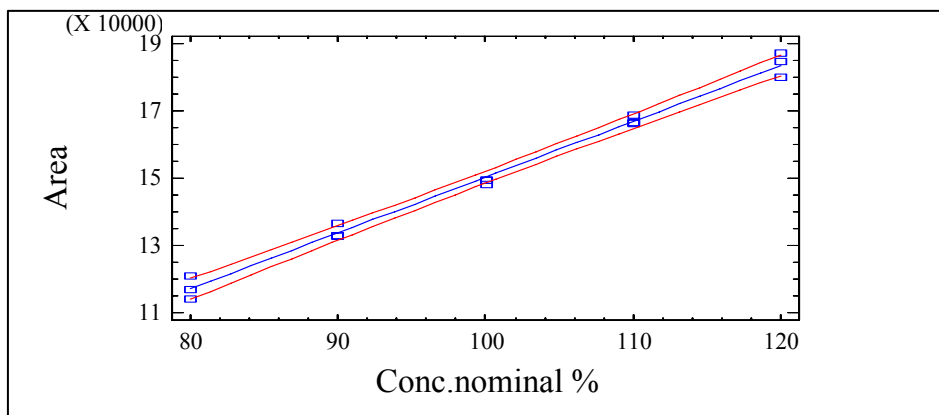


Fig 19. Ajuste del modelo lineal del sistema.

Como se puede ver en la Tabla 9. ANOVA el valor de P es menor a 0.01, podemos concluir que existe una relación significativa (con 99% de confianza) entre el Área y el % Conc. nominal de Rimantadina.

El valor del coeficiente de determinación r^2 indica que el modelo puede explicar 99.1657% de la variabilidad en el Área. El coeficiente de correlación ($r = 0.99582$) indica una fuerte relación entre las variables.

Tabla 9. ANOVA para la relación Área vs. % Concentración nominal de Rimantadina, obtenida con ayuda del programa Statgraphics.

Variable dependiente: Area					
Variable Independente: Conc.nominal %					
Parámetro	Estimado	Error Estándar	Estadístico T	Probabilidad	
Intercepto	-16354.7	4281.97	-3.81942	0.0021	
Pendiente	1666.64	42.3978	39.3096	0.0000	
Análisis of Varianza					
	Suma de cuadrados	gl	cuadrados medios	valor de F	P
Modelo	8.3331E9	1	8.3331E9	1545.25	.0001
Residual	7.01055E7	13	5.39273E6		
Total (Corr.)	8.40321E9	14			
r= 0.99582					
R ² = 99.1657 percent					
Error estándar= 2322.22					

El intervalo de confianza para la pendiente es: $t_{0.975,4} = 2.776$ $IC(\beta_1) = 738.73 \leq \beta_1 \leq 963.68$, NO incluye a cero



METODO 2. DETERMINACIÓN DIRECTA DE RIMANTADINA CON DETECCIÓN A BAJO ULTRAVIOLETA

Se estudio la posibilidad de determinar a la Rimantadina de manera directa, basándose en los espectros de absorción del analito. El cual absorbe a una longitud de 190 nm, y esto nos permite su posible determinación.

Se utilizo la mezcla placebo plus más la adición de Rimantadina, bajo las condiciones establecidas en la tabla II.

Tabla 10 Condiciones impuestas para la determinación de Rimantadina por Detección Directa

PARÁMETRO	Condición
Pretratamiento de muestra	Ninguno (inyección directa de la solución)
Tipo de Buffer	Fosfatos
Concentración del Buffer	50 mM
pH del buffer	pH 10.0
Tipo de Inyección	Hidrodinámica 0.5 psi, 10s
Longitud de onda	190 nm
Capilar	Sílice fundida 75 μ m de diámetro interno, 125 cm de longitud total (46 cm de long. al detector)

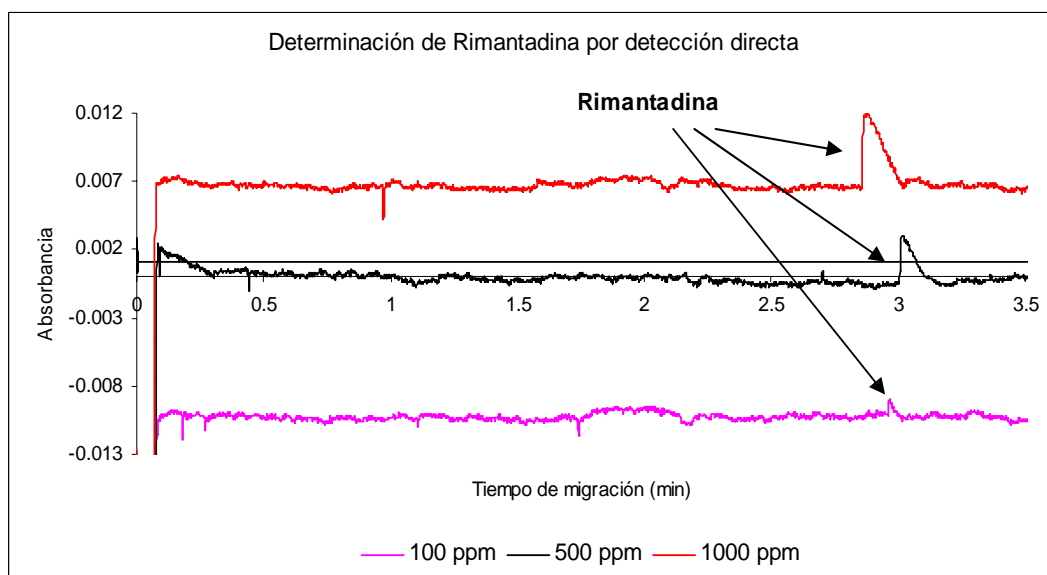


Fig. 20. Electroferograma de la determinación de Rimantadina en tabletas recubiertas por Detección directa. Condiciones impuestas en la Tabla 9.

La figura anterior muestra los electroferogramas de la Rimantadina con detección directa a 190 nm a diferentes concentraciones. Esto representa una segunda opción para



determinar la Rimantadina en tabletas es por detección directa, ya que este analito presenta un máximo de absorción a 190.06 nm, lo que nos permite determinar este principio activo en formas farmacéuticas que lo contienen en una alta concentración. Puede observarse que el tiempo de migración de la rimantadina en estas condiciones es menor (aprox. 3 min), aunque los picos presentan asimetría, lo cual puede corregirse con estudios posteriores del tipo de buffer utilizado.

SELECCIÓN DEL TIPO Y CONCENTRACIÓN DEL ELECTROLITO SOPORTE.

La Fig. 21 muestra la respuesta de la rimantadina bajo diferentes condiciones del buffer usando detección directa. Para la identificación de la rimantadina se puede utilizar este procedimiento de detección directa ya que el tiempo de análisis está alrededor de 1.0 min.

Diferentes tipos de electrolito soporte se probaron, todos a 30mM y pH 10 (borato, fosfato y CHES) por detección directa de rimantadina a 190nm.

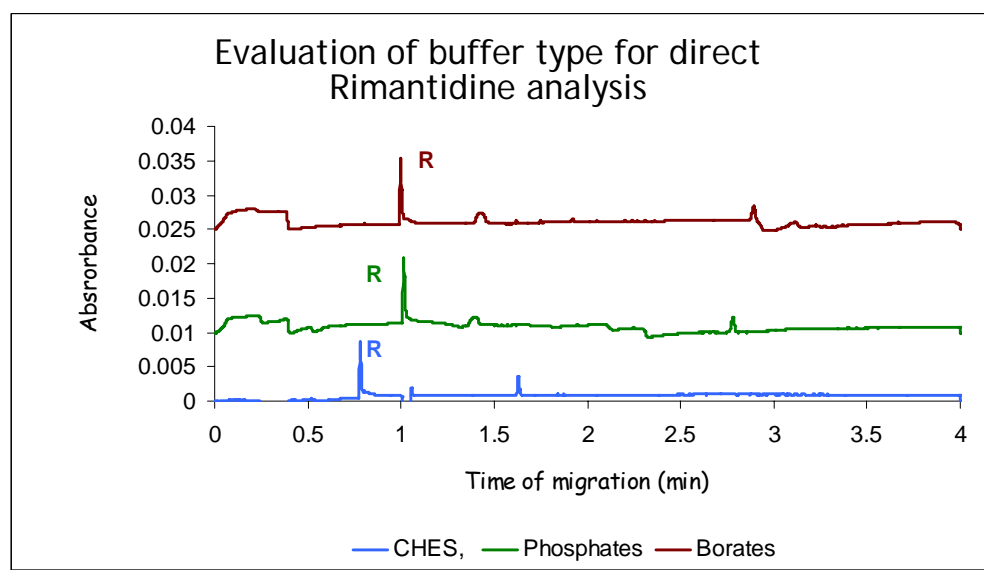


Fig. 21. Electroferograma de la evaluación de diferentes buffers para la determinación directa de rimantadina.

Se detectaron tiempos de migración más cortos con CHES pero se obtuvieron picos simétricos y de absorbancia más alta usando un buffer de boratos.



CONCLUSIONES

- Se logró identificar a la α -luteína en muestras de resina oleosa extraída a partir de pétalos de girasol a una longitud de onda óptima de 470 nm.
- De acuerdo con los resultados obtenidos en cada uno de los métodos de extracción de la luteína se concluye que el método 1 es el mejor para obtener α -luteína, ya que se obtiene un 85.6% de luteína en la muestra.
- El método de MEKC utilizado es una metodología analítica útil para el monitoreo y cuantificación aproximada del contenido de luteína en extractos herbales y en muestras comerciales.
- Se pudieron desarrollar exitosamente dos metodologías para la determinación de rimantadina en formas farmacéuticas comerciales por electroforesis capilar de zona.
- Se realizó exitosamente el estudio de los parámetros de mayor influencia en la determinación de rimantadina. Las condiciones óptimas de trabajo para la su determinación utilizando el método indirecto fueron las siguientes:

Tipo de Buffer	4 – metilbencilamina
Concentración del Buffer	50 mM
pH del buffer	pH 10.0
Capilar	Sílice fundida Longitud total 125cm. 46 cm al detector, 75 μ m de diámetro interno.
λ óptima	216nm
Tipo de detección	Indirecta.
Voltaje aplicado	30kV
Tipo de inyección	Hidrodinámica (presión)

- Utilizando el método directo las condiciones óptimas encontradas fueron las siguientes:

PARÁMETRO	Condición
Pretratamiento de muestra	Ninguno (inyección directa de la solución)
Tipo de Buffer	Boratos
Concentración del Buffer	50 mM
pH del buffer	pH 10.0
Tipo de Inyección	Hidrodinámica 0.5 psi, 10s
Longitud de onda	190 nm
Capilar	Sílice fundida 75 μ m de diámetro interno, 125 cm de longitud total (46 cm de long. al detector)

- La separación de luteína por EC es una alternativa analítica más para el análisis de los extractos que se trabajan en algunas empresas mexicanas, ya que cada vez este compuesto es usado más como suplemento alimenticio para las gallinas y pollos,



debido a que la Luteína es un compuestos que hace ver la carne de los pollos más roja y con mejor aspecto, además proporciona color al cascaron del huevo.

- Por otro lado el análisis de Rimantadina proporciona una nueva opción de análisis para la industria que prepara medicamentos con este principio activo. Pues tiene la ventaja de ser barato, sencillo y rápido.
- La electroforesis capilar es una alternativa para la reducción de costos antes del análisis, durante el análisis y postanálisis, ya que las muestras solo algunas veces necesitan algún tratamientos pretatamiento muy complicado y costoso en tiempo y dinero; así mismo los reactivos usados para las corridas son baratos, además que las cantidades usadas son muy pequeñas. Por otro lado el desecho de los reactivos rara vez necesita un tratamiento especial para ser inactivados.
- La electroforesis capilar es complementaría de las técnicas de cromatografía en especial de HPLC, ya que algunos compuestos son mucho más fáciles de separar e identificar con HPLC que con EC.

REFERENCIAS

- 1) Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. Landrum, John T.; Bone, Richard A. Department of Chemistry, Florida International University, Miami, FL, USA. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (2001), 385(1), 28-40.
- 2) Lutein and Zeaxanthin as Protectors of Lipid Membranes against Oxidative Damage: The Structural Aspects. Sujak, Agnieszka; Gabrielska, Janina; Grudzinski, Wojciech; Borc, Robert; Mazurek, Piotr; Gruszecki, Wieslaw I. Department of Biophysics, Institute of Physics, Maria Curie-Skłodowska University, Lublin, Pol. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (1999), 371(2), 301-307.
- 3) Riley, C. M., Ault Jr., J. M., *J. Chromatogr.* 1990, 531, 295.
- 4) Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D., *Anal. Chem.*, 1981, (53) : 1298-1302
- 5) Electrokinetic separation whit micellar solution and open-tubular-capillaries. Terabe, S. et. al. *Anal. Chem.* 1984 (56), 111-113.
- 6) Handbook of capillary electrophoresis. Landers, J. P. et, al, 1994. Edit. CRC Press, Boca Ratón. pp. 147-206.
- 7) Capillary electrophoresis principles, practice and applications. Li, S. F. Y. *Journal of Chromatography Library*. 1992 (52), 1-608
- 8) Capillary zone electrophoresis. Foret, F., et. al. VCH Weinheim, 1993, pp 1-395.
- 9) Capillary electrophoresis technology. Guzman, N. A. Edit. Marcel Dekker. NY. pp 1-83.
- 10) Capillary zone electrophoresis of small molecules and ions. Jandik, T., et. al. VCH Publishers, Cambridge, 1993. pp 1-425.
- 11) Practical capillary electrophoresis. Weinberger, R. 2a. Ed., Academic press, San Diego, Sea. 2000 pp. 1-462.
- 12) Capillary electrophoresis: theory and practice. Camillery, P. 2da. Ed. CRC Press, Boca Ratón. Fl. 1997. 1-576.
- 13) Capillary electrophoresis: Principles and practices. Kuhn, R., Edit. Springer-Verlag. Berlín. pp. 1-439.
- 14) High performance capillary electrophoresis: Theory, techniques and applications. Khaledi, M. G., Chemical analysis series. Wiley and Sons, NY. Vol. 146. 1998 pp 1-878.
- 15) Capillary electrophoresis guidebook: Principles, operations, and applications. Altria, K. D., Chapman and Hall, Londres. 1996. pp. 1-349
- 16) Capillary electrophoresis in analytical biotechnology. Righetti, P. G., William, H. CRC Press, Boca Raton. 1996. pp. 1-576.
- 17) Analysis of Pharmaceuticals by capillary electrophoresis. Altria, K. D., Vieweg Publishing, Wiesbaden, 1998. pp. 1-176.

- 18) DNA sequencing by capillary electrophoresis. Dobichi, N. J., *Electrophoresis*, 1997, 18(12/13), 23-93.
- 19) Multiple capillary DNA sequencer that uses fiber-optic illumination and detection. Quesada, M. A., Zang, S., *Electrophoresis* 1996, 17(12), 1841.
- 20) Differentiation between Lutein Monoester Regioisomers and Detection of Lutein Diesters from Marigold Flowers (*Tagetes erecta* L.) and Several Fruits by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. Breithaupt, Dietmar E.; Wirt, Ursula; Bamedi, Ameneh. Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hohenheim, Stuttgart, Germany. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2002), 50(1), 66-70
- 21) Carotenoid Composition of Marigold (*Tagetes erecta*) Flower Extract Used as Nutritional Supplement. Hadden, W. Leigh; Watkins, Ruth H.; Levy, Luis W.; Regalado, Edmundo; Rivadeneira, Diana M.; Van Breemen, Richard B.; Schwartz, Steven J. Department of Food Science, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1999), 47(10), 4189-4194
- 22) HPLC and MS analyses of lutein esters from *Tagetes patula* L. Karawya, M. S.; Hammouda, F. M.; Ismail, S. I.; Zaki, A. K.; Nazif, N. M. Pharmacogn. Dept., Faculty of Pharmacy, Cairo University, Egypt. *Qatar University Science Journal* (1996), 16(2), 251-255.
- 23) Correlation of HPLC and AOAC methods to assess the all-trans-lutein content in marigold flowers. Delgado-Vargas, Francisco; Paredes-Lopez, Octavio. Depto Biotecnol. Bioquímica, Cent. Invest. Estud. Avanzados IPN, Unidad Irapuato, Irapuato, Mex. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (1996), 72(3), 283-290
- 24) Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of lutein and lutein fatty acid esters from marigold flower petal powder. Rivas, Javier D. L. Fac. Sci., Univ. Basque Country, Bilbao, Spain. *Journal of Chromatography* (1989), 464(2), 442-7
- 25) Differentiation between lutein monoester regioisomers and detection of lutein diesters from marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and several fruits by liquid chromatography-mass spectrometry. Breithaupt Dietmar E; Wirt Ursula; Bamedi Ameneh Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hohenheim, Garbenstrasse 28, D-70599 Stuttgart, Germany. breithau@uni-hohenheim.de *JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY* (2002 Jan 2), 50(1), 66-70
- 26) Combined HPLC-MS and HPLC-NMR on-line coupling for the separation and determination of lutein and zeaxanthin stereoisomers in spinach and in retina. Dachtler M; Glaser T; Kohler K; Albert K Institute of Organic Chemistry, University of Tübingen, Germany *ANALYTICAL CHEMISTRY* (2001 Feb 1), 73(3), 667-74
- 27) Development and evaluation of a new method for the determination of the carotenoid content in selected vegetables by HPLC and HPLC-MS-MS. Huck, Christian W.; Popp, Michael; Scherz, Heimo; Bonn, G. K. Institute of Analytical Chemistry and Radiochemistry, Leopold-Franzens University Innsbruck, Innsbruck, Austria. *Journal of Chromatographic Science* (2000), 38(10), 441-449.
- 28) High-performance liquid chromatography for the characterization of carotenoids in the new sweet orange (Earlygold) grown in Florida, USA. Lee, H. S.; Castle, W. S.; Coates, G. A. Florida Department of Citrus, Citrus Research and Education Center, Lake Alfred, FL, USA. *Journal of Chromatography, A* (2001), 913(1-2), 371-377.

- 29) Analysis of carotenoids by combined HPLC, UV-Vis absorption spectrometry and APCI mass spectrometry. Maoka, Takashi. Research Institute for Production Development, Kyoto, Japan. *Lipid Technology* (2003), 15(2), 39-42.
- 30) Simultaneous detection of tocopherols, carotenoids, and chlorophylls in vegetable oils by direct injection C30 RP-HPLC with coulometric electrochemical array detection. Puspitasari-Nienaber, Ni Luh; Ferruzzi, Mario G.; Schwartz, Steven J. Department of Food Science and Technology, The Ohio State University, Columbus, OH, USA. *Journal of the American Oil Chemists' Society* (2002), 79(7), 633-640.
- 31) Carotenoid determination in biological microsamples using liquid chromatography with a coulometric electrochemical array detector. Ferruzzi, Mario G.; Sander, Lane C.; Rock, Cheryl L.; Schwartz, Steven J. Department of Food Science and Technology, The Ohio State University, Columbus, OH, USA. *Analytical Biochemistry* (1998), 256(1), 74-81.
- 32) Isolation and Structural Elucidation of (13Z,13'Z,3R,3'R,6'R)-Lutein from Marigold Flowers, Kale, and Human Plasma. Khachik, Frederick; Steck, Andrea; Pfander, Hanspeter. Department of Chemistry and Biochemistry Joint Institute for Food Safety and Applied Nutrition (JIFSAN), University of Maryland, College Park, MD, USA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1999), 47(2), 455-461
- 33) Concentrations of carotenoids, retinol and α -tocopherol in plasma and follicular fluid of women undergoing IVF. Schweigert, Florian J.; Steinhagen, Beate; Raila, Jens; Siemann, Anette; Peet, David; Buscher, Ulrich. Institute of Nutritional Science, Human Reproduction (2003), 18(6), 1259-1264.
- 34) Quantification of carotenoids in chicken plasma after feeding free or esterified lutein and capsanthin using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry analysis. Breithaupt, D. E.; Weller, P.; Grashorn, M. A. Universitat Hohenheim, Institut fur Lebensmittelchemie, Stuttgart, Germany. *Poultry Science* (2003), 82(3), 395-401
- 35) Lutein and zeaxanthin dietary supplements raise macular pigment density and serum concentrations of these carotenoids in humans. Bone, Richard A.; Landrum, John T.; Guerra, Luis H.; Ruiz, Camilo A. Department of Physics, Florida International University, Miami, FL, USA. *Journal of Nutrition* (2003), 133(4), 992-998.
- 36) Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. Burns, Jennifer; Fraser, Paul D.; Bramley, Peter M. School of Biological Sciences, University of London, Egham, Surrey, UK. *Phytochemistry (Elsevier)* (2003), 62(6), 939-947
- 37) Lutein and zeaxanthin dietary supplements raise macular pigment density and serum concentrations of these carotenoids in humans. Erratum in: *J Nutr.* 2003 Jun;133(6):1953 Bone Richard A; Landrum John T; Guerra Luis H; Ruiz Camilo A Department of Physics, Florida International University, Miami 33199, USA. bone@fiu.du *JOURNAL OF NUTRITION* (2003 Apr), 133(4), 992-8.
- 38) Analysis of Xanthophylls in Corn by HPLC. Moros, E. E.; Darnoko, D.; Cheryan, M.; Perkins, E. G.; Jerrell, J. Agricultural Bioprocess Laboratory, Department of Food Science and Human Nutrition, University of Illinois, Urbana, IL, USA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2002), 50(21),
- 39) <http://www.ilustrados.com/publicaciones/EpypAyyFIVAJkfHhvv.php>

40) *(MERCCK INDEX pp 9974 11th edition)*

41) <http://www.facmed.unam.mx/bmnd/plm/mex/productos/8431.htm>

42) (Bone y cols, 1985

43) Handelman et al, 1988

44) Bates et al, 1996)