



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Desarrollo y validación de un método analítico
por cromatografía de líquidos de alta eficiencia
para la valoración de los constituyentes
mayoritarios presentes en la infusión de *Prunus
serotina* Ehrenb. subsp. capuli (Cav.) McVaugh.”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

MARISOL ROSAS GUERRERO



MÉXICO, D.F.

2010



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROFESOR: **MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS**
VOCAL: PROFESOR: **INÉS FUENTES NORIEGA**
SECRETARIO: PROFESOR: **BLANCA ESTELA RIVERO CRUZ**
1er. SUPLENTE: PROFESOR: **ROGELIO GREGORIO PEREDA MIRANDA.**
2° SUPLENTE: PROFESOR: **MA. DE LOS DOLORES CAMPOS ECHEVERRÍA**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 111 EDIFICIO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
DIRECCIÓN: CIRCUITO DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA, CIUDAD UNIVERSITARIA,
COLONIA: COPILCO COYOACÁN, C.P. 04510, DELEGACIÓN COYOACÁN, D. F.

ASESOR DEL TEMA: _____
Dra. BLANCA ESTELA RIVERO CRUZ.

SUPERVISOR TÉCNICO: _____
Dr. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ.

SUSTENTANTE (S): _____
MARISOL ROSAS GUERRERO.



AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través de los proyectos PAIP 1960-12 y PAPIIT IN-205709.

A mi asesora la Doctora Blanca Estela Rivero Cruz por su excelente dirección, su gran apoyo, su infinito interés y constante asesoramiento durante la realización de este trabajo, gracias por permitirme trabajar con usted.

Al Doctor José Fausto Rivero por su loable ayuda durante el desarrollo del presente trabajo de tesis y por proporcionar los productos naturales puros utilizados en el presente proyecto.

A la M. en C. Georgina Duarte Lisci por su valiosa asesoría para la realización de la técnica de microextracción en fase sólida que se llevó a cabo en la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación USAI.

A las Doctoras. Inés Fuentes Noriega e Isabel Aguilar Laurents por la revisión del manuscrito de tesis.



DEDICATORIAS

A ti Dios porque jamás me has abandonado, has estado conmigo en todo momento, has sido mi amigo, mi cómplice y mi protector, porque cuando mas he necesitado de alguien te has presentado ante mi, me has consolado y me das fuerzas para seguir adelante. Para ti es todo lo que hago en esta vida.

A ti mamá y papá porque sin ustedes me hubiera costado mas estar donde me encuentro, por que me han apoyado, han luchado y nunca han desistido por las necesidades de mis hermanas y las mías, por que en los momentos mas difíciles continuaron apoyándome en mis estudios, por todo ese amor que nos tienen, esos sacrificios de siempre, yo quiero corresponderles ahora y esto es solo una pequeña muestra de lo que con su ayuda he logrado fructificar. Muchas gracias a ustedes y mis hermanas, los amo.

A ustedes abuelitos mamá Nico y papá Berna, por todo su cariño y dedicación, por que me han acogido y me han ofrecido su amor incondicional, un amor grande y puro, por que ustedes me han ofrecido a mi madre y se preocupan por mi bienestar, porque me han enseñado la importancia de ser una persona con nobleza, humildad y honestidad; a mi abuelita Julia por darme a mi padre, a pesar de que tengo pocos recuerdos, le agradezco por ser un ejemplo de mujer que supo valerse por sí misma y sacar adelante a la familia que ahora es mas grande; a los tres gracias por ser mis ejemplos vivientes y reales de superación, mis profesores de experiencia y sabiduría que les caracteriza, los amo abuelitos.

A Beatriz y Porfirio por ese aprecio, apoyo e interés que han tenido hacia mí desde que nos conocimos, son mi segundo nido, gracias por abrirme las puertas de su hogar e incluirme en su bella familia.

A la Dra. Teresa por todo este tiempo en que me ha estado conmigo, escuchando, atendiendo y ayudando a que yo pueda ver, he logrado con su ayuda llegar hasta donde me encuentro ahora, gracias por ayudarme a crecer.

A usted Doctora Blanca por todo el apoyo y aprecio que mostro hacia mí desde un inicio, le estoy muy agradecida por toda esa confianza que me ha



brindado, porque se ha convertido en mi confidente y amiga, y ha depositado su confianza en mí, todo esto ha significado bastante influyendo en mi crecimiento personal y en la rectificación de mis capacidades, es una persona excelente con un gran espíritu humano, es mi ejemplo a seguir, le quiero mucho.

A la Maestra Katia Solórzano, la Dra. Yolanda Caballero, al Dr. José Fausto Rivero, a la Maestra Beatriz King, el Maestro Lucas Bernardino y al Maestro Román Tejeda por su apoyo incondicional a lo largo de la carrera.

A mis amigos de toda la vida Jenny, Tania, Rocío, Consuelo, Erika, Jazmín Elizabeth, Claudia Bracamonte, Wendy, Gustavo (Gusgus) y Miriam por que a pesar de la distancia y el tiempo hemos logrado trascender nuestra amistad y se que seguirá así.

Lupita eres de mis mejores amigas, te has vuelto una hermana para mi, has estado conmigo en todo momento y te estoy infinitamente agradecida, jamás había compartido tanto con alguien, me has enseñado mucho y lo sabes, hemos pasado por tantos percances y míranos, seguimos juntas lo que me hace ver que ese hilo que nos juntaba ahora es un lazo fuerte y que seguirán viniendo obstáculos pero me tendrás ahí, espero que así sea siempre. También esto es para ti.

A mis mellizos: Elizabeth porque me has permitido conocerte mas y me has brindado tu bella amistad, por que compartimos experiencias y me siento identificada contigo, también eres de mis mejores amigas y esas diferencias que teníamos han servido para ir reforzando esta amistad, gracias por ser mi amiga; y Félix por todos tus consejos, por ser sincero conmigo, yo valoro mucho todo esto que haces por mí, y sabes que no me molesta tener un gemelo, te lo digo una vez mas, solo lo hago por molestarte aunque creo que no lo logro, algún día podremos leer la mente de los demás; a ambos gracias por ese gran apeo.

A tí Gaby por tu amistad sincera, por que has estado a mi lado en todo momento, aun recuerdo las épocas de la alberca, ha pasado tanto tiempo, es fantástico y toda una bendición que sigamos siendo amigas; Heysoldding tú me has enseñado que nunca hay que desistir a pesar de los obstáculos que se presenten, gracias por ello, por atenderme y prestarme tu atención amiga; a ti Fabián por la amistad incondicional que me has brindado, por escucharme, por



aconsejarme y sobre todo por tu sinceridad. Perlita por todo ese cariño, amistad y sobre todo por que me has enseñado a escuchar y ser mas tolerante con los demás.

A mis amigos consejeros Yaddyth, Claudia (QAk), Pablito, Jeanete, Ana Silvia, Elva, Eva, Miriam Marlene, Francisco (Paquito), Giselle, Erandi, Luz Adriana, Lizbeth, Lilian y Fernando, por decirme las cosas tal y como son, sin rodeos, sin adornos, por que me abren los ojos a la realidad, valoro todo ello por que sé que son sinceros conmigo.

A mis amigos de la facultad Mario, Alicia, Edith y Alejandra, Berenice, Delfino, Bryan, Jesús (Chuchonator), Maylett, José (Padrino), Isabel (Chabelita), Toño, Miguel, Perla Guzmán, Aideé, Salvador y Miriam, Margarita, Marcela, Mingyar, Carlos (carlitos), Berenice (Berecita), Javier, Ana Lydia, Astrid, Laura, Hugo Rivas, Luz Chacón y Blanquita por todos esos momentos que hemos vivido dentro y fuera del ambiente escolar.

A Miguel Ángel, a pesar de que no compartimos mucho tiempo, me enseñaste tanto, lo más importante fue a querer, a tu lado pase experiencias que no había tenido, de las mejores, volé muy alto a tu lado, aprendí a que después de caer hay que levantarse, sacudirse y continuar, gracias por haber aparecido en mi vida, te quiero.

A todos ustedes les quiero mucho, disculpen si se me fue alguno, son tantos, pero saben que los tengo presentes, gracias por todo este tiempo compartido.

A mi Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, por permitirme ser parte de tu legado, porque me has forjado y porque he vivido tantas experiencias a través de ti que me hacen ser la persona que actualmente soy, por que se que seré mejor, tu has continuado con la construcción sobre los cimientos y ahora me toca terminar la obra. Te amo UNAM.

**¡MÉXICO, PUMAS, UNIVERSIDAD, GOYA GOYA CACHUN CACHUN RA
RA CACHUN CACHUN RA RA GOYA UNIVERSIDAD!**



Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para la valoración de los constituyentes mayoritarios presentes en la infusión de *Prunus serotina* Ehrenb. subsp. *capuli* (Cav.) McVaugh.

| | Pág. |
|---|------|
| I. JUSTIFICACIÓN..... | 1 |
| II. ANTECEDENTES..... | 5 |
| ANTECEDENTES BOTÁNICOS Y ETNOBOTÁNICOS DE LA ESPECIE <i>Prunus serotina</i> Ehrenb. subsp. <i>capuli</i> (Cav.) McVaugh..... | 5 |
| 2.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA..... | 5 |
| 2.2 NOMBRES COMUNES..... | 6 |
| 2.3 DISTRIBUCIÓN..... | 6 |
| 2.4 ANTECEDENTES Y USOS ACTUALES DE <i>Prunus serotina</i> Ehrenb..... | 7 |
| 2.5 ANTECEDENTES FITOQUÍMICOS DE <i>Prunus serotina</i> Ehrenb..... | 9 |
| 2.6 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA..... | 14 |
| III. OBJETIVO..... | 17 |
| IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL..... | 18 |
| 4.1 MATERIAL VEGETAL..... | 18 |
| 4.2 CUANTIFICACIÓN DE ACIDO CLOROGÉNICO (ácido-5-O-cafeoilquínico), BENZALDEHÍDO E HIPERÓSIDO POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (CLAE)..... | 18 |
| 4.3 PREPARACIÓN DE LA INFUSIÓN DE TRABAJO DE <i>Prunus serotina</i> Ehrenb. subsp. <i>capuli</i> (Cav.) McVaugh..... | 19 |
| 4.4 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDO CLOROGÉNICO, HIPERÓSIDO Y BENZALDEHÍDO EN LA INFUSIÓN..... | 19 |
| 4.4.1 PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE HIPERÓSIDO, ÁCIDO CLOROGÉNICO Y BENZALDEHÍDO..... | 19 |



| | |
|--|-----------|
| 4.5 EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DEL MÉTODO ANALÍTICO..... | 22 |
| 4.5.1 ESPECIFICIDAD O ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA..... | 22 |
| 4.5.2 LINEALIDAD..... | 23 |
| 4.5.2.1 Linealidad del sistema. | 23 |
| 4.5.2.2 Linealidad del método. | 23 |
| 4.5.3 EXACTITUD. | 24 |
| 4.5.4 PRECISIÓN..... | 24 |
| 4.5.4.1 Precisión del sistema. | 24 |
| 4.5.4.2 Precisión del método (Repetibilidad)..... | 24 |
| 4.5.4.3 Precisión del método (Reproducibilidad)..... | 25 |
| 4.5.5 ROBUSTEZ..... | 25 |
| 4.6 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA..... | 26 |
| 4.7 PROCEDIMIENTOS CROMATOGRÁFICOS..... | 28 |
| 4.7.1 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA..... | 28 |
| 4.7.2 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO..... | 28 |
| V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 29 |
| 5.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO. | 31 |
| 5.1.1 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA..... | 32 |
| 5.1.2 ESPECIFICIDAD..... | 34 |
| 5.1.3 LINEALIDAD. | 38 |
| 5.1.3.1 Linealidad del sistema. | 39 |
| 5.1.3.2 Linealidad del Método y Exactitud..... | 46 |
| 5.1.4 PRECISIÓN. | 52 |
| 5.1.4.1 Precisión del sistema..... | 53 |
| 5.1.4.2 Precisión del método..... | 55 |
| 5.1.4.3 Precisión intermedia..... | 56 |
| 5.1.5 ROBUSTEZ..... | 57 |



| | |
|--|----|
| 5.2 COMPUESTOS OBTENIDOS POR MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME)..... | 69 |
| 5.3 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA..... | 70 |
| VI. CONCLUSIONES. | 71 |
| VII. PERSPECTIVAS. | 71 |
| VIII. REFERENCIAS. | 72 |
| GLOSARIO. | 78 |
| ANEXO A..... | 81 |
| ANEXO B..... | 84 |



| ÍNDICE DE FIGURAS | | Pág. |
|-------------------|--|------|
| Figura 1. | Flor y hojas de <i>Prunus serotina</i> Ehrenb..... | 5 |
| Figura 2. | Distribución de <i>P. serotina</i> | 6 |
| Figura 3. | Microextracción en fase sólida por el método de headspace..... | 16 |
| Figura 4. | Cromatograma de la infusión de <i>Prunus serotina</i> Ehrenb..... | 20 |
| Figura 5. | Infusión diluida 1:10 y co-elución de la infusión diluida con ácido clorogénico..... | 20 |
| Figura 6. | Co-elución de la infusión sin diluir con benzaldehído.... | 21 |
| Figura 7. | Co-elución de la infusión sin diluir con hiperósido..... | 21 |
| Figura 8. | Metabolismo de la amigdalina en <i>Prunus serotina</i> durante su crecimiento, liberación del benzaldehído; GT: glucosiltransferasa, β -CAS: β -cianoalanina sintasa, β -CAH: β -cianoalanina hidrolasa..... | 31 |
| Figura 9. | Cromatograma obtenido con una solución de 500 μ g/mL de ácido clorogénico..... | 32 |
| Figura 10. | Cromatograma obtenido con una solución de 300 μ g/mL de benzaldehído..... | 32 |
| Figura 11. | Cromatograma obtenido con una solución de 500 μ g/mL de hiperósido..... | 33 |
| Figura 12. | Cromatograma de la solución estándar de ácido clorogénico (800 μ g/mL) en condiciones normales..... | 35 |
| Figura 13. | Cromatograma de la solución estándar de ácido clorogénico (800 μ g/mL) sometido a reflujo durante media hora en una solución básica..... | 35 |
| Figura 14. | Cromatograma de la solución estándar de ácido clorogénico (800 mg/mL) sometido a reflujo durante media hora en una solución ácida..... | 35 |



| | | |
|-------------------|---|-----------|
| Figura 15. | Cromatograma de la solución estándar de ácido clorogénico (800 µg/mL) sometido a condiciones de oxidación a reflujo por media hora..... | 35 |
| Figura 16. | Cromatograma de la solución estándar de ácido clorogénico (800 µg/mL) expuesto a luz UV-visible por 10 minutos..... | 36 |
| Figura 17. | Cromatograma de la solución estándar de benzaldehído (800 µg/mL) a condición normal. | 36 |
| Figura 18. | Cromatograma de la solución estándar de benzaldehído (800 µg/mL) sometido a reflujo durante media hora en una solución básica..... | 36 |
| Figura 19. | Cromatograma de la solución estándar de benzaldehído (800 µg/mL) sometido a reflujo durante media hora en una solución ácida..... | 36 |
| Figura 20. | Cromatograma de la solución estándar de benzaldehído (800 µg/mL) sometido a condiciones de oxidación a reflujo por media hora..... | 37 |
| Figura 21. | Cromatograma de la solución estándar de benzaldehído (800 µg/mL) expuesto a luz UV-visible por 10 minutos.... | 37 |
| Figura 22. | a) Cromatograma del estándar de ácido clorogénico 500 µg/mL, y b) Cromatograma del estándar de benzaldehído 300 µg/mL..... | 52 |
| Figura 23. | Cromatograma del ácido clorogénico (500 µg/mL) en condiciones normales de operación ($\lambda=254$ nm; velocidad de flujo= 1 mL/min; temperatura=25°C; fase móvil MeOH:Buffer (35:65) y 10 µL de volumen de inyección)..... | 59 |
| Figura 24. | Cromatograma del ácido clorogénico (500 µg/mL) utilizando 259 nm como longitud de onda de detección..... | 59 |



| | |
|---|-----------|
| Figura 25. Cromatograma del ácido clorogénico (500 µg/mL) utilizando 249 nm como longitud de onda de detección..... | 60 |
| Figura 26. Cromatograma del ácido clorogénico (500 µg/mL) utilizando 5 µL de volumen de inyección..... | 60 |
| Figura 27. Cromatograma del ácido clorogénico (500 µg/mL) utilizando 15 µL de volumen de inyección..... | 60 |
| Figura 28. Cromatograma del ácido clorogénico (500 µg/mL) utilizando una velocidad de flujo de 1,5 mL/min..... | 61 |
| Figura 29. Cromatograma del ácido clorogénico (500 µg/mL) utilizando una velocidad de 0,5 mL/min..... | 61 |
| Figura 30. Cromatograma del ácido clorogénico (500 µg/mL) utilizando una fase móvil compuesta por MeOH:Buffer en una proporción 30:70..... | 61 |
| Figura 31. Cromatograma del ácido clorogénico (500 µg/mL) utilizando una fase móvil compuesta por MeOH:Buffer en una proporción 40:60..... | 62 |
| Figura 32. Cromatograma del ácido clorogénico (500 µg/mL) utilizando una temperatura de la columna de 45°C..... | 62 |
| Figura 33. Cromatograma del ácido clorogénico (500 µg/mL) utilizando una temperatura de la columna de 35°C..... | 62 |
| Figura 34. Cromatograma del benzaldehído (300 µg/mL) en condiciones normales de operación ($\lambda=254$ nm; velocidad de flujo= 1 mL/min; temperatura=25°C; fase móvil MeOH:Buffer (35:65) y 10 µL de volumen de inyección)..... | 64 |
| Figura 35. Cromatograma del benzaldehído (300 µg/mL) utilizando 259nm como longitud de onda de detección..... | 64 |
| Figura 36. Cromatograma del benzaldehído (300 µg/mL) utilizando 249nm como longitud de onda de detección..... | 65 |



| | |
|--|----|
| Figura 37. Cromatograma del benzaldehído (300 µg/mL) utilizando 5 µL de volumen de inyección..... | 65 |
| Figura 38. Cromatograma del benzaldehído (300 µg/mL) utilizando 15 µL de volumen de inyección..... | 65 |
| Figura 39. Cromatograma del benzaldehído (300 µg/mL) utilizando una velocidad de flujo de 1,5 mL/min..... | 66 |
| Figura 40. Cromatograma del benzaldehído (300 µg/mL) utilizando una velocidad de 0,5 mL/min..... | 66 |
| Figura 41. Cromatograma del benzaldehído (300 µg/mL) utilizando una fase móvil compuesta por MeOH:Buffer en una proporción 30:70..... | 66 |
| Figura 42. Cromatograma del benzaldehído (300 µg/mL) utilizando una fase móvil compuesta por MeOH:Buffer en una proporción 40:60..... | 67 |
| Figura 43. Cromatograma del benzaldehído (300 µg/mL) utilizando una temperatura de la columna de 45°C..... | 67 |
| Figura 44. Cromatograma del benzaldehído (300 µg/mL) utilizando una temperatura de la columna de 35°C..... | 67 |
| Figura 45. Análisis cromatográfico cualitativo en capa fina de los componentes mayoritarios en la infusión de hojas de <i>Prunus serotina</i> (E=extracto, I=Infusión, AC=ácido clorogénico, H=hiperósido y B=benzaldehído)..... | 70 |



| ÍNDICE DE TABLAS | | Pág. |
|-------------------------|--|-------------|
| Tabla 1. | Metabolitos aislados del género <i>P. serotina</i> Ehrenb..... | 9 |
| Tabla 2. | Preparación de las muestras a someter a diferentes condiciones..... | 22 |
| Tabla 3. | Condiciones de operación modificadas para evaluar la robustez del método..... | 25 |
| Tabla 4. | Condiciones cromatográficas utilizadas para realizar la elución del blanco..... | 26 |
| Tabla 5. | Condiciones utilizadas para realizar la microextracción en fase sólida..... | 27 |
| Tabla 6. | Condiciones cromatográficas utilizadas para realizar la elución las muestras..... | 27 |
| Tabla 7. | Condiciones de operación desarrolladas para realizar la validación del método..... | 30 |
| Tabla 8. | Resultados obtenidos durante la evaluación de la adecuabilidad del sistema..... | 33 |
| Tabla 9. | Resultados para especificidad del ácido clorogénico y del benzaldehído..... | 34 |
| Tabla 10. | Resultados obtenidos para evaluar la linealidad del sistema utilizando ácido clorogénico..... | 39 |
| Tabla 11. | Resultados obtenidos para evaluar la linealidad del sistema utilizando benzaldehído..... | 40 |
| Tabla 12. | Resultados obtenidos para evaluar la linealidad del sistema utilizando hiperósido..... | 41 |
| Tabla 13. | Parámetros determinados en la linealidad del sistema para el ácido clorogénico..... | 42 |
| Tabla 14. | Parámetros determinados en la linealidad del sistema para el benzaldehído..... | 43 |
| Tabla 15. | Parámetros determinados en la linealidad del sistema para el hiperósido..... | 43 |



| | | |
|-----------|--|----|
| Tabla 16. | Análisis de varianza de la regresión lineal simple para el modelo del ácido clorogénico (n=15, $\alpha = 0,05$, $F_{0,05, 1, 15}=4,54$)..... | 44 |
| Tabla 17. | Análisis de varianza de la regresión lineal simple para el modelo del benzaldehído (n=15, $\alpha = 0,05$, $F_{0, 05, 1, 15}=4,54$)..... | 44 |
| Tabla 18 | Análisis de varianza de la regresión lineal simple para linealidad del sistema del hiperósido (n=15, $\alpha = 0,05$, $F_{0,05, 1, 15}=4,54$)..... | 45 |
| Tabla 19. | Valores de F para cada compuesto..... | 45 |
| Tabla 20. | Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método utilizando ácido clorogénico..... | 46 |
| Tabla 21. | Cantidad adicionada y cantidad recuperada para el ácido clorogénico (linealidad del método)..... | 47 |
| Tabla 22. | Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método utilizando benzaldehído..... | 48 |
| Tabla 23. | Cantidad recuperada y cantidad adicionada para el benzaldehído (linealidad del método)..... | 48 |
| Tabla 24. | Parámetros estadísticos calculados para el modelo de linealidad del método (ácido clorogénico)..... | 49 |
| Tabla 25. | Parámetros estadísticos calculados para el modelo de linealidad del método (benzaldehído)..... | 50 |
| Tabla 26. | Análisis de varianza de la regresión lineal simple para linealidad del método del ácido clorogénico (n=12, $\alpha = 0,05$, $F_{0,05, 1, 12}=4,75$)..... | 51 |
| Tabla 27. | Análisis de varianza de la regresión lineal simple para linealidad del método del benzaldehído (n=12, $\alpha = 0,05$, $F_{0,05, 1, 12}=4,75$)..... | 51 |
| Tabla 28. | Datos experimentales para evaluar la precisión del sistema utilizando una solución de ácido clorogénico 500 $\mu\text{g/mL}$ | 53 |



| | | |
|-----------|--|----|
| Tabla 29. | Datos experimentales para evaluar la precisión del sistema utilizando una solución de benzaldehído 300 µg/mL..... | 54 |
| Tabla 30. | Resultados obtenidos para evaluar la precisión del método conducente a cuantificar ácido clorogénico y benzaldehído..... | 55 |
| Tabla 31. | Resultados obtenidos del ácido clorogénico para evaluar la precisión intermedia. | 56 |
| Tabla 32. | Resultados obtenidos del benzaldehído para evaluar la precisión intermedia. | 56 |
| Tabla 33. | Resultados obtenidos para el ácido clorogénico en robustez del método..... | 58 |
| Tabla 34. | Diferencia absoluta entre los valores de las condiciones de operación modificada y normal para el ácido clorogénico..... | 59 |
| Tabla 35. | Resultados obtenidos para el benzaldehído en robustez del método..... | 63 |
| Tabla 36. | Diferencia absoluta entre los valores de las condiciones de operación modificada y normal para el benzaldehído..... | 64 |
| Tabla 37. | Áreas de los tres componentes presentes en la infusión de <i>Prunus serotina</i> | 68 |
| Tabla 38. | Compuestos detectados en las hojas del capulín..... | 70 |



| ÍNDICE DE GRÁFICOS | | Pág. |
|--------------------|---|------|
| Gráfico 1. | Gráfica de linealidad para el ácido clorogénico..... | 39 |
| Gráfico 2. | Gráfica de linealidad para el benzaldehído..... | 40 |
| Gráfico 3. | Gráfica de linealidad para el hiperósido..... | 41 |
| Gráfico 4. | Gráfica de linealidad del método para el ácido clorogénico..... | 47 |
| Gráfico 5. | Gráfica de linealidad del método para el benzaldehído..... | 49 |



I. JUSTIFICACIÓN.

El estrecho contacto que ha mantenido el hombre, desde su origen hasta la época actual con las plantas y los animales, le ha permitido acumular un rico acervo sobre las especies que utilizan para procurar la salud (Martínez-Moreno, *et. al.*, 2006). Gran parte de los principios activos que forman parte de los medicamentos alopáticos de uso común constituyen prototipos estructurales de productos naturales que fueron descubiertos a través del estudio de la medicina tradicional considerando, para ello, los conocimientos populares de los pueblos indígenas. Algunos ejemplos de fármacos naturales que persisten en la terapéutica actual son: la aspirina, la atropina, la morfina y la quinina, entre otros (Wickramasinghe, 2006).

En los países en vías de desarrollo grandes sectores de la población indígena, rural y de bajos recursos dependen todavía de la medicina tradicional como única alternativa para restablecer la salud. La falta de instituciones médicas y el incremento en los costos de la medicina alopática son factores que convierten a las plantas medicinales en una alternativa accesible para el cuidado de la salud.

De acuerdo con la OMS, el auge en el consumo de productos herbolarios, a nivel mundial, se debe a la preocupación del público por los efectos secundarios, cada vez más frecuentes, de los medicamentos alopáticos; a la continua búsqueda de opciones terapéuticas alternativas para el tratamiento de enfermedades crónicas, como la artritis o el eczema y a los elevados costos de los tratamientos. De manera general los productos elaborados con las plantas medicinales tienen una amplia aceptación en los distintos sectores de la sociedad, tanto de las clases sociales más necesitadas como de las ricas. Este último sector encuentra a este tipo de medicina novedosa y eficaz (OMS, 2002; WHO, 2005). El incremento en el interés de la medicina herbolaria también se refleja en las altas ventas de estos productos y en la múltiples publicaciones de libros sobre plantas medicinales.



I. JUSTIFICACIÓN



Existe, además, un marcado interés por parte de los organismos regulatorios para regular el comercio y la calidad de estos productos a nivel mundial. Desafortunadamente la regulación de los productos herbolarios no ha evolucionado según un modelo estructurado de control. Existen diferentes maneras en las cuales los países definen las plantas medicinales o los productos derivados de ellas, también, los enfoques para la autorización, el expendio, la fabricación, la comercialización y los criterios para asegurar su calidad y eficacia varían en las distintas regiones del mundo. En la mayoría de los países, los medicamentos herbolarios son de venta libre (Wickramasinghe, 2006).

Por otra parte, la seguridad y la eficacia de los productos farmacéuticos dependen de la calidad de las materias primas utilizadas para su elaboración. Los estándares mínimos de calidad para los insumos son establecidos, de manera convencional, en las monografías farmacopéicas. Dichas monografías proporcionan un resumen de las especificaciones y los métodos de ensayo para determinar la identidad, la pureza y el contenido de principio activo. Es importante destacar que el término monografía se utiliza para designar dos tipos de especificaciones. El primer tipo de monografía es la farmacopeica y proporcionará únicamente las especificaciones y los ensayos para evaluar la calidad farmacopeica de los insumos. El segundo tipo de monografía reúne la información relacionada con los constituyentes químicos, la farmacología, la toxicología, los usos y los estudios clínicos de los materiales vegetales. Las primeras monografías de las plantas contenían exclusivamente ensayos macroscópicos y microscópicos para determinar la identidad botánica de la especie y en algunos casos, también se describían ensayos por cromatografía en capa fina para identificar el perfil de los componentes químicos. Actualmente las monografías farmacopéicas son el reflejo del notable desarrollo en las técnicas analíticas y del amplio conocimiento de sus componentes químicos y su relación con el efecto biológico y/o clínico.



I. JUSTIFICACIÓN



La investigación de las plantas medicinales implica el cultivo, la etnofarmacología, el uso, el aislamiento e identificación de los componentes activos, la evaluación de su eficacia, la farmacología, la seguridad (evaluación toxicológica para establecer posibles efectos adversos), la normalización, la formulación y la evaluación clínica (Birdi, 2006).

Así, los criterios de calidad de las plantas medicinales se basan en el establecimiento de la identidad de la especie (características macroscópicas y microscópicas); la parte de la planta que posee la actividad terapéutica; la susceptibilidad de las mismas a los factores de variación como: la ubicación geográfica, la hora y la época de cosecha, las diferencias en el crecimiento, el método de recolección, el proceso de secado, de almacenamiento, el transporte, el procesamiento y la contaminación biológica. Además, el contenido de los compuestos activos varía dependiendo de factores como la selección de las semillas, las condiciones de crecimiento, el uso de fertilizantes, la temperatura, la exposición a la luz y la disponibilidad de humedad. De ahí la importancia de contar con buenas prácticas agrícolas desde la siembra hasta la cosecha del material vegetal. En consecuencia, la eficacia de los productos elaborados con plantas depende del establecimiento de límites definidos de compuestos activos, así como, de las impurezas físicas, químicas y biológicas tales como humedad, residuos de plaguicidas, pesticidas, metales pesados y contaminación microbiana, entre otros (Birdi, 2006).

La búsqueda de los principios activos en la planta es de los trabajos de mayor trascendencia que se requieren para llevar a cabo el control de calidad de dichos insumos. En la mayor parte de los casos los principios activos no se conocen por ello, se realizan toda una serie de investigaciones y ensayos para aislarlos, purificarlos y evaluarlos biológicamente (Birdi, 2006).

Actualmente, la determinación cuantitativa de los componentes activos se ha facilitado por los avances en la instrumentación analítica y ha hecho posible el establecimiento de las estrategias adecuadas para su determinación, análisis de calidad y proceso de normalización de la planta medicinal.



I. JUSTIFICACIÓN



La cromatografía en capa fina (TLC), electroforesis capilar, resonancia magnética nuclear, cromatografía de gases (GC), cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), entre otros; constituyen las técnicas analíticas más utilizadas para el aislamiento e identificación de los principios activos presentes en los extractos de las plantas (Birdi, 2006). El HPLC es el método preferido para el análisis cuantitativo de los componentes de las plantas debido a su gran alcance ya que, permite determinar su homogeneidad e impurezas presentes con alto grado de reproducibilidad (Hylands, *et al.*, 2004).

El desarrollo de un método analítico que permita evaluar los componentes bioactivos del material vegetal es de suma importancia para asegurar la eficacia que tendrá dicho material. Un método analítico validado servirá para el análisis de los diferentes preparados herbolarios evitando su adulteración y falta de eficacia, esta metodología también es de utilidad para monitorear la estabilidad del producto terminado.

Finalmente, el proceso para estandarizar una planta medicinal comprende la preparación de una muestra a partir de un extracto o bien de una solución de prueba de la planta que tiene la actividad terapéutica. El análisis de dicha solución por dos o más métodos de análisis permitirá establecer una especificación para dicho material vegetal. Las futuras muestras podrán entonces analizarse con respecto a la referencia previamente establecida para saber si cumple o no con las especificaciones (Hylands, *et al.*, 2004).



II. ANTECEDENTES.

ANTECEDENTES BOTÁNICOS Y ETNOBOTÁNICOS DE LA ESPECIE *Prunus serotina* Ehrenb. subsp. *capuli* (Cav.) McVaugh

2.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

Prunus serotina Ehrenb, subespecie *capuli* (Cav.) McVaugh (Figura 1), es un árbol que mide entre 5,15 y 38,0 m de altura. Su tronco es largo y recto con ramas alternas; la corteza es café o grisácea casi lisa. Presenta hojas estipuladas, simples, alternas, ovadas a lanceoladas, de 5 a 16 cm de de largo por 2 a 5 cm de ancho. Las flores son numerosas, pequeñas y blancas, agrupadas en racimos axilares colgantes y largos, de 10 a 15 cm; de olor característico. El fruto es globuloso, de color negro rojizo de 2 a 20 mm de diámetro; su sabor es agridulce y ligeramente astringente; con una sola semilla esférica y sabor amargo. Fructifica entre los meses de mayo y agosto (McVaugh, 1949; Martínez, 1989).



Figura 1. Flor y hojas de *Prunus serotina* Ehrenb.



2.2 NOMBRES COMUNES.

En México, la especie se conoce con los nombres de capulín (Mesa Central), cerezo (Ario de Rosales, Michoacán), shencua, shengua, xengua (lengua tarasca, Michoacán), cusabi (lengua tarahumara, Chihuahua.), uasiqui, jeco (lengua guarigia, Chihuahua), pakshumk (lengua mixe, Oaxaca.), t-nundaya (lengua mixteca, Oaxaca), tzu'uri (lengua cora, Nayarit), paté, shimal-ma-lu (lengua chontal, Oaxaca.), capuli taunday (lengua zapoteco, Oaxaca), y detze, ghohto (lengua Otomí) (McVaugh, 1949).

2.3 DISTRIBUCIÓN.

La planta es originaria de América boreal y habita en clima cálido, semicálido, semiseco y templado (desde los 1000 hasta los 3900 msnm). La especie se cultiva en los huertos familiares y se encuentra asociada a los bosques tropicales caducifolios y subcaducifolios, al matorral xerófilo, a los bosques espinoso, mesófilo de montaña, de encino, de pino y mixto.

Se distribuye en las regiones montañosas del Valle de México, Guanajuato y de Jalisco a Chiapas, hasta una altitud de 2,500 m o más (Figura 2) (Hough, 1965).



Figura 2. Distribución de *P. serotina*.



2.4 ANTECEDENTES Y USOS ACTUALES DE *Prunus serotina* Ehrenb.

Prunus serotina Ehrenb es una planta originaria de América y se utiliza para tratar la tos, algunas infecciones del tracto urinario, la disentería, el resfriado, las cataratas y la fiebre. *Prunus serotina* se conoce con varios sinónimos como: *Prunus capuli* Cav., *Prunus salicifolia* Kunth y *Prunus serotina* var. *salicifolia* (Kunth) Koehne (McVaugh, 1949).

La palabra capulín tiene un origen meramente azteca y significa cerezo o cereza según lo indica Gabriel V. Alcocer (Velásquez, 1921).

Los indígenas de la época prehispánica describieron por primera vez que las ramas, las raíces y los frutos de la planta se utilizaban para tratar la diarrea, la congestión pulmonar, la tos y los resfriados. También describieron que el jugo de los frutos se empleaba para curar el dolor de garganta y, la infusión de la corteza era útil como purgante o para aliviar los dolores del parto (Alberti-Manzanares, 2006; Datos para la Materia Médica Mexicana, 1898).

En el siglo XVI, el médico indígena Martín de la Cruz señala, en el Códice Badiano, el uso de la especie para tratar la dispepsia, la dermatosis y su uso como agente antiprurítico. Mas adelante el Códice Florentino plantea su uso para los “ojos rojos”. Francisco Hernández, en su obra “Historia Natural de la Nueva España” señala como usos populares de la corteza: su decocción es útil para curar la disentería y el polvo para “disolver las nubes, aclarar la vista y aliviar las inflamaciones de los ojos”. También describe su utilidad para “suavizar la lengua reseca por exceso de calor”.

Bernabé Covo, en su “Historia del Nuevo Mundo” menciona la utilidad del fruto para hacer vino. Por su parte, Sessé y Mociño, en su obra “Plantas de la Nueva España” describen el *capoltamalli* como un preparado de harina de maíz con vino obtenido del fruto maduro (Hernández, 1946, Datos para la Materia Médica Mexicana, 1898).

Para el siglo XX, Maximino Martínez plantea en su obra “Las Plantas Medicinales de México” su uso en el tratamiento de la neumonía, la diarrea, la disentería, el paludismo y el dolor de estómago, también describe su uso para tratar las enfermedades del sistema respiratorio, la visión borrosa y como bebida refrescante (Martínez, 1928).



II. ANTECEDENTES



La tercera edición de La Farmacopea de Los Estados Unidos Mexicanos habla de las dosis empleadas para el uso de las hojas, la corteza y los frutos de *P. serotina* (Datos para la Materia Médica Mexicana, 1898).

La Sociedad Farmacéutica de México, en su publicación de la Nueva Farmacopea Mexicana en 1904, consigna como usos de esta planta los ya referidos y menciona además, su indicación como astringente, eupéptico y sedante (Sociedad Farmacéutica de México, 1904). Actualmente se emplea para el tratamiento de la tos y de algunas infecciones en el tracto urinario, también para el tratamiento de la disentería, el resfriado, las cataratas y las fiebres periódicas (*Natural Resourcer Concervation Service*). Por otra parte los frutos del capulín se consumen crudos, en dulce o en conserva y como una bebida alcohólica después de su fermentación (Cruces, 2006).

En la medicina tradicional los frutos se utilizan para algunos males cardíacos y para tratar la mastitis, los mareos, el dolor de dientes y como emenagogo. En la medicina tradicional coreana se utilizan como calmante nervioso y como antitusivo (Hernández, 1946; Kim, 2005; Kim, 2006).

Cabe mencionar que en los estados de Aguascalientes, Estado de México, Hidalgo, Michoacán y el Distrito federal la corteza, los frutos y las hojas se utilizan para elaborar jarabes de uso medicinal (Nueva Farmacopea Mexicana de la Sociedad Farmacéutica de México, 1884, 1896, 1904, Hernández, 1943). Además se emplea como antioxidante en la elaboración de cosméticos y fitomedicamentos (Olszewska 2005, 2008).



2.5 Antecedentes Fitoquímicos de *Prunus serotina* Ehrenb.

Desde el punto de vista fitoquímico la especie *P. serotina* posee una diversidad de constituyentes químicos. Los principales metabolitos secundarios aislados de esta planta pertenecen a las categorías de los triterpenoides, las antocianidinas, los aromáticos simples, los fenilpropanoides, los glicósidos cianogénicos y los flavonoides (Biessels *et al.*, 1974; Horsley y Meinwald, 1981; Nardini *et al.*, 1995; Haribal, *et al.*, 1996; Tanahashi, *et al.*, 1997; Santamour, 1998; Ordaz-Galindo *et al.*, 1999; Graefe EU, *et al.*, 2001; Kaweon, *et al.*, 2001; Sang *et al.*, 2002; Yoshikawa *et al.*, 2002; Mikuliè, *et al.*, 2003; Olthof, *et al.*, 2003; Kayano, *et al.*, 2004; Lv, *et al.*, 2005; Olszewska, 2005a y 2005b, 2006, 2007, 2008; Pieters, *et al.*, 2005; Amico, *et al.*, 2006; Prabu, *et al.*, 2006; Albuquerque, 2007; Chen, *et al.*, 2007; Camacho-Luis, *et al.*, 2008; Krasteva, *et al.* 2008; Vergara, *et al.*, 2009; Liu, *et al.*, 2010.).

En la Tabla 1 se resumen las estructuras de los metabolitos secundarios aislados de la especie.

Tabla 1. Metabolitos aislados del género *P. serotina* Ehrenb.

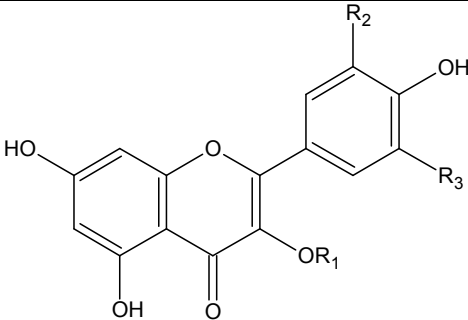
| GLUCOSIDOS CIANOGENICOS | | |
|-------------------------|--------------|--|
| NOMBRE | SUSTITUYENTE | REFERENCIA |
| | R1 | |
| prunasina (I) | OH | Horsley y Meinwald, 1981 |
| amigdalina (II) | glu | Santamour, 1998 Yoshikawa, <i>et al.</i> , 2002 Lv, <i>et al.</i> , 2005 |



II. ANTECEDENTES



Tabla 1. Metabolitos aislados del género *P. serotina* Ehrenb (Continuación).

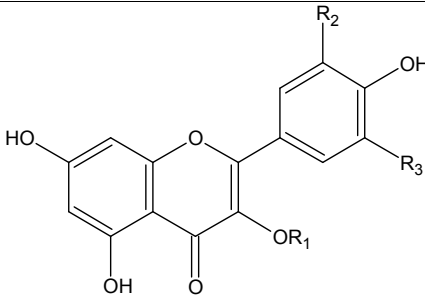
| FLAVONOIDES | | | | |
|--|--------------|----|----|---|
|  | | | | |
| NOMBRE | SUSTITUYENTE | | | REFERENCIA |
| | R1 | R2 | R3 | |
| hiperósido (III) | gal | OH | H | Olszewska, 2005 Olszewska, 2007 Krasteva, <i>et al.</i> 2008 Liu, <i>et al.</i> , 2010 |
| 3-O-(2-O- α -L-ramnopiranosil)- β -D-galactopiranosido de quercetina (IV) | ramno-gal | OH | H | Haribal, <i>et al.</i> , 1996 Olszewska, 2005 |
| rutina (V) | rut | H | OH | Graefe EU, <i>et al.</i> , 2001 Olthof, <i>et al.</i> , 2003 Olszewska, 2005 |
| guajaverina (VI) | ara | OH | H | Olszewska, 2005 Prabu, <i>et al.</i> , 2006 |
| isoquercitrina (VII) | glu | OH | H | Olszewska, 2005 Albuquerque, 2007 |
| avicularina (VIII) | arab | OH | H | Olszewska, 2005 Camacho-Luis, <i>et al.</i> , 2008 |
| reinoutrina (IX) | xylo | OH | H | Olszewska, 2005a Olszewska, 2005b Olszewska, 2007 |
| juglanina (X) | ara | H | H | Olszewska, <i>et al.</i> , 2001 Olszewska, 2005 Olszewska, 2007 |
| 3-O- β -D-xilopiranosido de camferol (XI) | xilo | H | H | Olszewska, <i>et al.</i> , 2001 Olszewska, 2005 |
| astragalina (XII) | Glu | H | H | Olszewska, 2005 Pieters, <i>et al.</i> , 2005 |

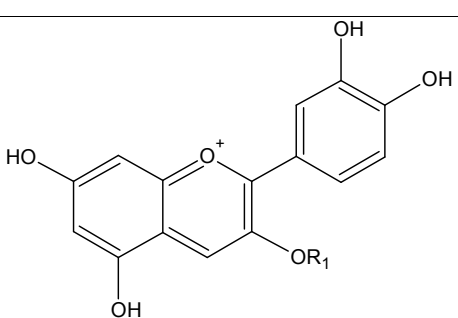


II. ANTECEDENTES



Tabla 1. Metabolitos aislados del género *P. serotina* Ehrenb (Continuación).

| FLAVONOIDES | | | | |
|--|--------------|------------------|----|--|
|  | | | | |
| NOMBRE | SUSTITUYENTE | | | REFERENCIA |
| | R1 | R2 | R3 | |
| 3-O-β-xilopiranosido de isoramnetina (XIII) | xil | OCH ₃ | H | Olszewska, 2005 |
| narcisino (XIV) | rut | OCH ₃ | H | Olszewska, 2005 Krasteva, <i>et al.</i> 2008 |
| 3-O-α-arabinofuranósido de isoramnetina (XV) | ara | OCH ₃ | H | Olszewska, 2005 |
| 3-O-(2''-O-α-L-ramnopiranosil)-β-D-galactopiranosido de quercetina (XVI) | ramno-gal | OH | H | Tanahashi, <i>et al.</i> , 1997 Olszewska, 2005 |

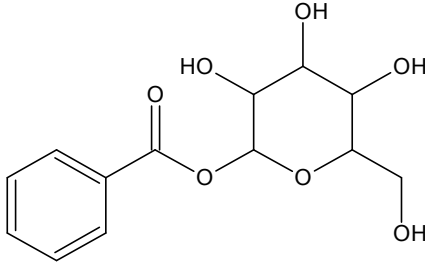
| ANTOCIANINAS | | | |
|--|--------------|--|---|
|  | | | |
| NOMBRE | SUSTITUYENTE | | REFERENCIA |
| | R1 | | |
| 3-glucósido de cianidina (XVII) | glu | | Ordaz-Galindo, <i>et al.</i> , 1999 Olszewska, 2005 Vergara, <i>et al.</i> , 2009 |
| 3-rutinósido de cianidina (XVIII) | rut | | Ordaz-Galindo, <i>et al.</i> , 1999 Olszewska, 2005 Vergara, <i>et al.</i> , 2009 |

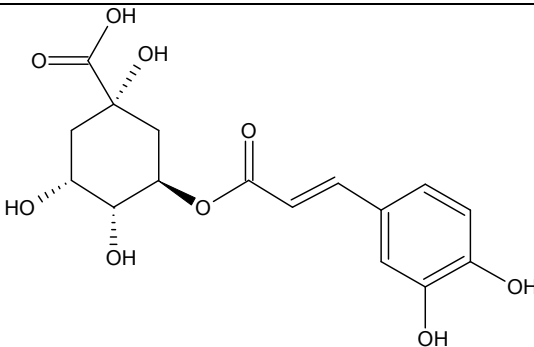


II. ANTECEDENTES



Tabla 1. Metabolitos aislados del género *P. serotina* Ehrenb (Continuación).

| AROMÁTICOS SIMPLES | |
|--|--------------------------|
|  | |
| NOMBRE | REFERENCIA |
| benzoato de β -D-glucopiranosilo (XXIII) | Horsley y Meinwald, 1981 |

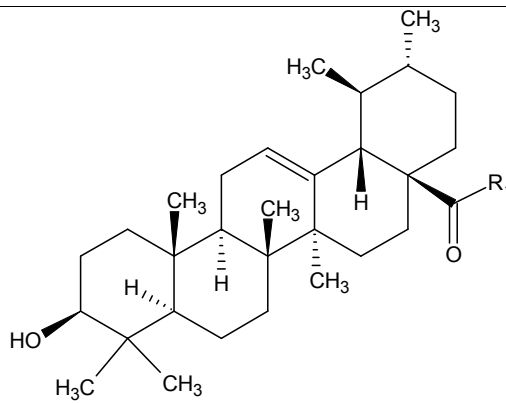
| FENILPROPANOIDES | |
|---|---|
|  | |
| NOMBRE | REFERENCIA |
| ácido-5-O-cafeoilquínico (ácido clorogénico) (XXII) | Nardini, <i>et al.</i> , 1995 Kaweon, <i>et al.</i> , 2001 Mikuliè, <i>et al.</i> , 2003 Kayano, <i>et al.</i> , 2004 Chen, <i>et al.</i> , 2007 Olszewska, 2007 |



II. ANTECEDENTES



Tabla 1. Metabolitos aislados del género *P. serotina* Ehrenb (Continuación).

| TRITERPENOS | | |
|--|-------------------|--|
|  | | |
| NOMBRE | SUSTITUYENTE | REFERENCIA |
| | R1 | |
| ácido ursólico (XIX) | -OH | Biessels <i>et al.</i> , 1974 Sang <i>et al.</i> , 2002 Amico <i>et al.</i> , 2006 |
| aldehído ursólico (XX) | -H | Biessels, <i>et al.</i> , 1974 Amico, <i>et al.</i> , 2006 |
| 2 α ,3 α -dihidroxi-urs-12-en 28-ato de metilo ácido 2 α ,3 α -dihidroxiuro-12-en 28-oico (XXI) | -OCH ₃ | Biessels, <i>et al.</i> , 1974 |



2.6 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La microextracción en fase sólida se basa en la extracción de solutos de una muestra a una pequeña fibra adsorbente. Después del periodo de extracción, en el que se ha alcanzado un equilibrio, los solutos adsorbidos son transferidos a la fase móvil líquida o gaseosa del sistema cromatográfico para ser analizados. El éxito de la técnica depende de las condiciones elegidas que favorezcan la adsorción de los solutos así como de las condiciones para que sean separados de la superficie sólida lo más completa y rápidamente posible para el análisis cromatográfico (Hinshaw, 2003).

Los métodos convencionales de análisis cuantitativo se basan en la extracción completa de los analitos de interés de la muestra, la SPME no funciona de esta forma ya que en ésta técnica la cantidad extraída de analito por la fibra es proporcional a la concentración del compuesto en la muestra (Vas y Vékey, 2004).

Para elegir el mejor sistema de extracción, es necesario identificar las variables que puedan influir en éste:

- **Características de la matriz:** puede ser gaseosa (v. gr. aire interior, atmósfera, insecticidas, etc.), líquida (v. gr. agua potable, jugo, sangre, vino, etc.) o sólida (v. gr. queso, tabaco, flores, frutas, medicamentos, etc.). Se debe definir si la matriz es simple o compleja, una matriz simple es aquella que tiene bajo contenido de compuestos orgánicos totales, por ejemplo agua para beber, y una matriz compleja es aquella que tiene una mayor variación en el contenido de compuestos orgánicos totales, pH, o que contenga lípidos ó proteínas, por ejemplo fluidos biológicos (Hinshaw, 2003; Vas, *et al.*, 2004).
- **Método de extracción:** como en esta técnica se emplean viales para contener la muestra a analizar, se debe elegir el método de extracción que se va a emplear, el cual puede ser por headspace, en el que el medio entre la fibra y la muestra es el aire, o por inmersión directa de la fibra. Para compuestos volátiles, el método recomendando es por headspace seguido de análisis por CG-EM. Por otro lado, los compuestos polares no volátiles, se deben extraer por inmersión directa



II. ANTECEDENTES



para analizarlos posteriormente por CG o CLAE (Hinshaw, 2003; Vas, *et al.*, 2004).

- **Tiempo:** éste parámetro es crítico para la SPME, si se varía el tiempo de exposición de la fibra durante la extracción, variará la concentración de los analitos adsorbidos en ésta, hasta que se alcanza un equilibrio (Hinshaw, 2003; Vas, *et al.*, 2004).
- **Temperatura:** éste parámetro también afecta el equilibrio durante la extracción. Si se incrementa la temperatura, se cambiará el equilibrio de distribución de los analitos entre la muestra y el headspace, resultando un cambio en la concentración de analitos en la fibra, por ello se debe establecer la temperatura óptima antes de exponer la fibra (Hinshaw, 2003; Vas, *et al.*, 2004).
- **Tipo de fibra:** Los materiales adsorbentes que se utilizan para recubrir las fibras son principalmente polidimetilsiloxano (PDMS), PDMS-divinilbenceno (PDMS-DVB), poliacrilato, carboxen-PDMS, carbowax, entre otros. Dependiendo del grosor de la película y de la composición de ésta, la fibra puede tener características polares, no polares o bipolares y puede ser utilizada en CG o CLAE o ambas. La fibra se debe limpiar antes de la extracción para remover cualquier contaminante presente (Hinshaw, 2003; Vas, *et al.*, 2004).
- **Agitación:** Por lo general la agitación de la muestra se hace por medio de agitadores magnéticos o por sonicación. Cuando la muestra es agitada, el equilibrio se alcanza más rápido (Hinshaw, 2003; Vas, *et al.*, 2004).
- **Otros parámetros:** para mantener la precisión y reproducibilidad en el análisis, los parámetros anteriores y otros como pH, fuerza iónica, volumen de muestra así como las condiciones para la desadsorción deben mantenerse constantes (Hinshaw, 2003; Vas, *et al.*, 2004).



II. ANTECEDENTES



En la Figura 3 se esquematiza una microextracción en fase sólida de volátiles en una muestra líquida o sólida por el método de headspace.

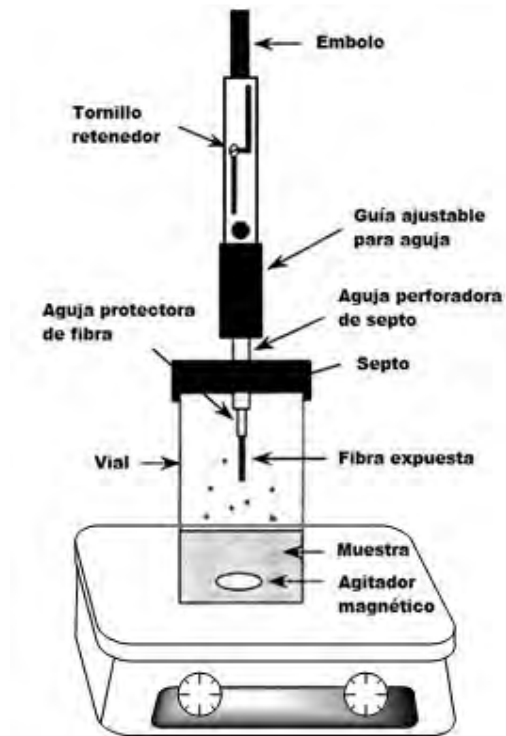


Figura 3. Microextracción en fase sólida por el método de headspace.



III. OBJETIVO.

Desarrollar un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE), para la identificación y la cuantificación de los componentes mayoritarios en la infusión de las hojas de *Prunus serotina* Ehrenb.



IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

4.1 MATERIAL VEGETAL.

Las hojas de *Prunus serotina* Ehrenb. subsp. *capuli* (Cav.) McVaugh fueron recolectadas en el municipio de La Soledad, Aculco, Estado de México, en el mes de octubre de 2009. El material vegetal fue identificado por comparación de sus características macroscópicas y su perfil cromatográfico en capa delgada con una muestra auténtica.

4.2 CUANTIFICACIÓN DEL ACIDO CLOROGÉNICO (ácido 5-O-cafeoilquínico), DEL BENZALDEHÍDO Y DEL HIPERÓSIDO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (CLAE).

El análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se realizó en un cromatógrafo de líquidos marca SHIMADZU (Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japón) equipado con un detector UV-visible dual SPD-10A; un inyector automático SIL-10AD (VP); una bomba LC-10AT (VP); un horno para columna CTO-10A; un desgasificador DGU14A y un sistema de control SCL-10A (VP) SHIMADZU acoplado a un equipo de cómputo. El control del equipo, la adquisición, el procesamiento y la manipulación de los datos se realizó utilizando el software LabSolution/LCsolution. La respuesta utilizada para evaluar los parámetros de validación fue el área bajo la curva (ABC).

Los análisis se realizaron en una columna Fortis C18 (Fortis™ Technologies Ltd.), con un tamaño de partícula de 5µm (150 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno). La concentración de las muestras oscila entre 1000-50 µg/mL para el ácido clorogénico y el hiperósido, y entre 800-100 µg/mL para el benzaldehído.



El volumen de inyección utilizada fue de 10 μ L. La elución se realizó con un sistema isocrático y la fase móvil consistió en una mezcla binaria constituida por MeOH:Buffer (Acetato de sodio 0.01M: Ácido acético (94:6); pH= 2,66) en la proporción 35:65. La velocidad de flujo utilizado fue de 1mL/min, la temperatura empleada para el análisis del ácido clorogénico, del benzaldehído y del hiperósido fue de 25 °C. La longitud de onda empleada para la detección de los compuestos fue de 254 nm.

Todos los disolventes empleados durante el análisis fueron grado HPLC.

4.3 PREPARACIÓN DE LA INFUSIÓN DE TRABAJO DE *Prunus serotina* Ehrenb. subsp. *capuli* (Cav.) McVaugh.

Para preparar la infusión de trabajo a partir de las hojas de capulín, 10 g de material vegetal fragmentado se extrajeron con 250 mL de agua en ebullición durante una hora en un matraz Erlenmeyer de 500 mL; la solución resultante se filtró para su posterior uso.

4.4 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDO CLOROGÉNICO, HIPERÓSIDO Y BENZALDEHÍDO EN LA INFUSIÓN.

4.4.1 PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE HIPERÓSIDO, ÁCIDO CLOROGÉNICO Y BENZALDEHÍDO.

Para evaluar los parámetros de calidad del método analítico 10 mg de ácido clorogénico o del hiperósido se trasvasaron por separado, a un matraz volumétrico de 10 mL, y se disolvieron con MeOH. A partir de esta solución se realizaron las diluciones necesarias para que un mL de la misma contenga 750, 500, 250 y 100 μ g/mL de ácido clorogénico o de hiperósido según sea el caso. La concentración seleccionada como 100% fue la de 500 μ g/mL para ambos compuestos.



IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL



Por último, la solución stock del benzaldehído se preparó pesando 30 mg del producto en un matraz volumétrico de 20 mL. Como disolvente se utilizó metanol y la concentración seleccionada como 100% fue 300 $\mu\text{g/mL}$.

La presencia de ácido clorogénico, benzaldehído e hiperósido en la infusión de las hojas de *Prunus serotina* Ehrenb., se corroboró por medio de la co-elución de una muestra de la matriz de trabajo con los estándares de referencia. Dichos estándares fueron aislados en forma pura durante la realización de estudios fitoquímicos previos (Ibarra, *et al.*, 2009). Los cromatogramas obtenidos se ilustran en las Figuras 4, 5, 6 y 7.

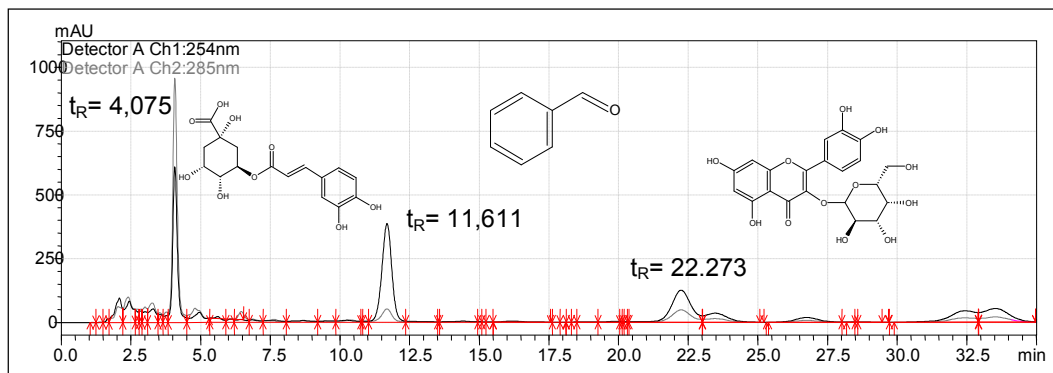


Figura 4. Cromatograma de la infusión de *Prunus serotina* Ehrenb.

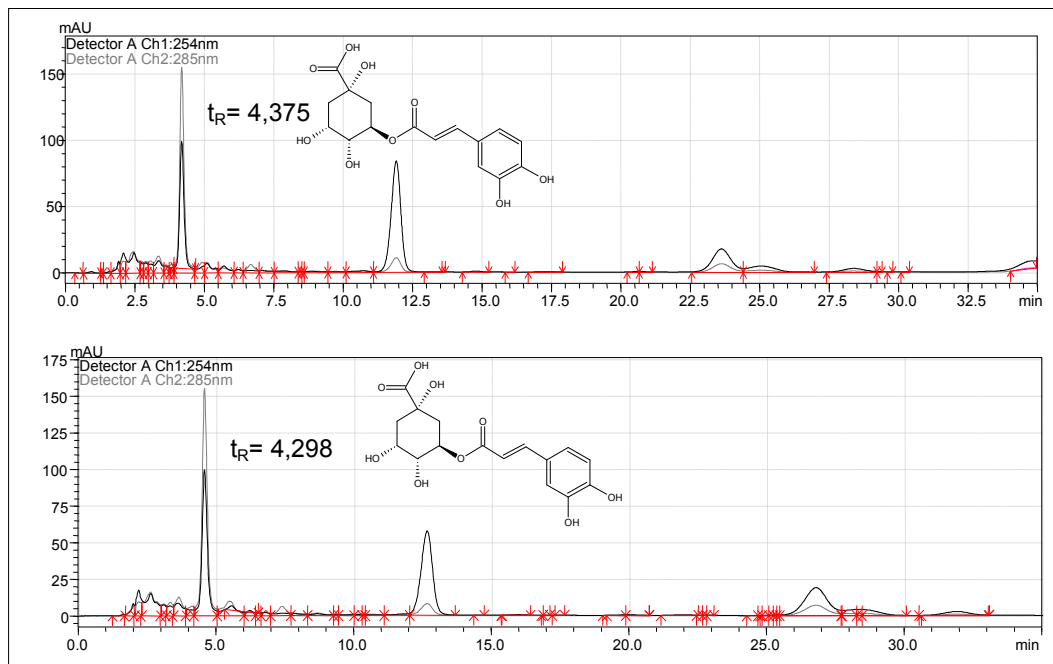


Figura 5. Infusión diluida 1:10 y co-elución de la infusión diluida con ácido clorogénico.



IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

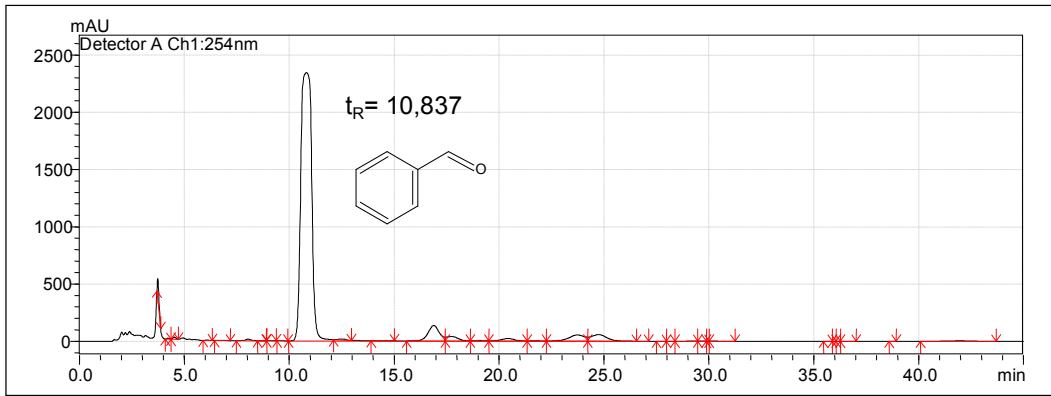


Figura 6. Co-elución de la infusión sin diluir con el benzaldehído.

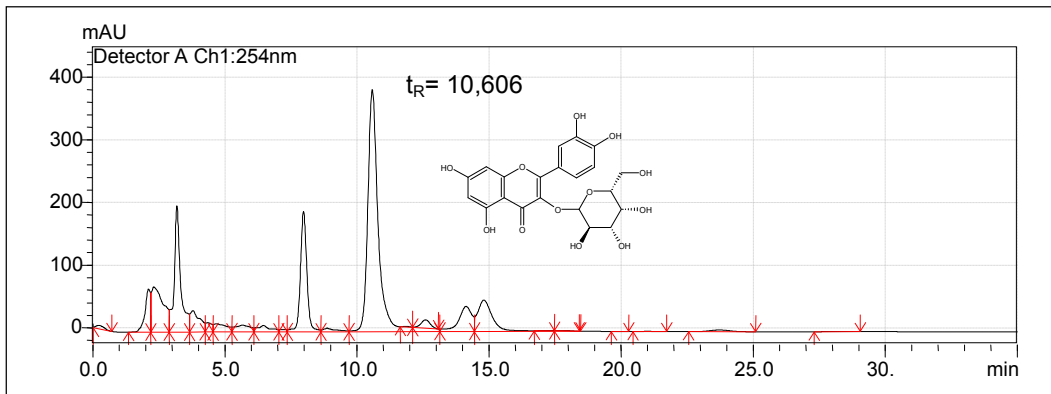


Figura 7. Co-elución de la infusión sin diluir con el hiperósido.



4.5 EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DEL MÉTODO ANALÍTICO

4.5.1 ESPECIFICIDAD O ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA.

Para evaluar la especificidad y la estabilidad del método analítico y de los productos naturales se registraron los cromatogramas de las soluciones estándar antes y después de someterlas a las condiciones experimentales descritas en la Tabla 2.

Para la preparación de los estándares 4 mg del ácido clorogénico o del benzaldehído se disolvieron en 5 ml de MeOH. Las soluciones resultantes contienen 800 µg/mL de los compuestos por analizar.

Tabla 2. Preparación de las muestras a someter a diferentes condiciones

| Factor a evaluar | Preparación | | | |
|------------------|-----------------------------|------------------------|------------------------------------|------------------------|
| | Ácido clorogénico 800 µg/mL | Benzaldehído 800 µg/mL | Reactivo | Condición |
| Basicidad | 1 mL | 1 mL | 2 mL NaOH 0,1 M | Reflujo por media hora |
| Acidez | 1 mL | 1 mL | 2 mL HCl 0,1M | Reflujo por media hora |
| Oxidación | 1 mL | 1 mL | 2 mL H ₂ O ₂ | Reflujo por media hora |
| Luz UV largo | 1 mL | 1 mL | UV visible largo | Exposición por 10 min |

Criterio de aceptación: la respuesta obtenida será únicamente debida al analito.



4.5.2 LINEALIDAD.

4.5.2.1 Linealidad del sistema.

Para evaluar la linealidad del sistema se preparó una curva de calibración (concentración vs. área bajo la curva) utilizando 5 niveles de concentración del analito. Para ello 10 mg del ácido clorogénico se disolvieron en 10 mL de MeOH. A partir de esta solución se prepararon las diluciones necesarias para que cada mililitro de la misma contenga entre 750 y 100 $\mu\text{g/mL}$.

El análisis del hiperósido se llevó a cabo empleando el mismo procedimiento descrito para el ácido clorogénico.

Para el caso del benzaldehído 25 mg del compuesto se disolvieron en 50 mL de MeOH. A partir de esta solución se tomaron las alícuotas necesarias para obtener concentraciones entre 500 y 100 $\mu\text{g/mL}$.

Para los tres compuestos se obtuvieron las respuestas analíticas correspondientes. El cálculo de la ordenada al origen (b_0), la pendiente de la recta (m), el coeficiente de determinación (r^2) y el coeficiente de correlación (r) se realizó utilizando un análisis de regresión lineal simple.

Los parámetros estadístico así obtenidos se compararon con los siguientes criterios: $r^2 > 0.999$; $r \geq 0.999$, $m \neq 0$ y $b = 0$.

4.5.2.2 Linealidad del método.

Para evaluar la linealidad del método se preparó una serie de soluciones estándar de los analitos de interés mediante la adición de diferentes concentraciones de los compuestos a un volumen constante de la matriz de trabajo (infusión). Los resultados obtenidos (cantidad adicionada vs cantidad recuperada) se realizaron mediante un análisis de regresión lineal simple y se calcularon los parámetros estadísticos b , m , r , r^2 y los intervalos de confianza para la pendiente y la ordenada al origen IC (β_1) e IC (β_0), respectivamente.

Los criterios estadísticos empleados son: $r^2 > 0.99$; $r \geq 0.99$, $m \neq 0$, $b = 0$, el IC (β_1) debe incluir la unidad y el IC (β_0) debe incluir el cero.



4.5.3 EXACTITUD.

La exactitud del método analítico para ambos compuestos se determinó utilizando la metodología descrita en el punto 4.5.2.2. Los resultados obtenidos se expresaron en términos de porcentaje de cantidad recuperada del analito (% de recobro).

Para que el método analítico sea exacto el porcentaje de recuperación deberá encontrarse entre el 98% y el 102%; el intervalo de confianza para la media poblacional deberá de incluir el 100% y la desviación estándar relativa del % de recobro (DER) deberá ser menor del 2%.

4.5.4 PRECISIÓN

4.5.4.1 Precisión del sistema.

Para la preparación del estándar, 10 mg de ácido clorogénico se disolvieron en 10 mL de metanol. A continuación en un matraz volumétrico de 5 mL se vertió una alícuota de 2,5 mL de la solución anterior y se llevó a volumen con metanol. Esta solución contiene 500 $\mu\text{g/mL}$ de ácido clorogénico. Se prepararon tres muestras independientes y se analizaron cada una de ellas por sextuplicado. En el caso del benzaldehído se preparó una solución que contenía 300 $\mu\text{g/mL}$ del analito de interés. Los resultados así obtenidos se expresaron en términos de desviación estándar relativa (DER). El criterio de aceptación para este parámetro de calidad establece que la DER deberá ser menor del 2% para considerar que el método es preciso.

4.5.4.2 Precisión del método (Repetibilidad).

La repetibilidad del método se evaluó mediante el análisis de seis réplicas de una misma solución estándar preparada como se describió en el punto 4.5.4.1.

Los resultados se expresaron en términos de desviación estándar (S) y coeficiente de variación (DER).

El criterio de aceptación indica que la DER deberá ser menor al 2,0%.



4.5.4.3 Precisión del método (Reproducibilidad).

La reproducibilidad del método se evaluó mediante el análisis de seis réplicas de una misma solución estándar preparada como se describió en el punto 4.5.1.1, por dos analistas diferentes en dos días diferentes. Los resultados obtenidos se reportaron en términos de DER.

El criterio de aceptación indica que la DER deberá ser menor al 2,0%

4.5.5 ROBUSTEZ

Para evaluar este parámetro de desempeño, se prepararon soluciones estándar del ácido clorogénico (500 µg/mL) y del benzaldehído (300 µg/mL), Los factores instrumentales y no instrumentales que se modificaron en las condiciones normales de operación se resumen en la Tabla 3. El efecto de cada factor se evaluó mediante el análisis por triplicado de las muestras. Con los resultados obtenidos se determinó la media aritmética de la condición normal de operación y de las condiciones modificadas.

Tabla 3. Condiciones de operación modificadas para evaluar la robustez del método.

| Condición modificada | Valor inicial | (+) 5 unidades | (-) 5 unidades |
|-----------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Velocidad de flujo | 1 mL | 1,5 mL | 0,5 mL |
| Longitud de onda | 285 | 290 | 280 |
| Proporción de la fase móvil | 35:65 (MeOH:Buffer) | 30:70 (MeOH:Buffer) | 40:60 (MeOH:Buffer) |
| Volumen de inyección | 10 µL | 15 | 5 |

El análisis de los resultados se llevó a cabo calculando la diferencia absoluta ($|di|$) entre la media aritmética de la condición normal de operación (\bar{y}_0) con respecto a la media aritmética de cada condición modificada (\bar{y}_i). Los resultados así obtenidos se compararon con el siguiente criterio: $|di| \leq 2\%$.



4.6 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

El análisis por cromatografía de gases se realizó en un cromatógrafo marca Agilent acoplado a un espectrómetro de masas, modelo 6890N equipado con un inserto Injection Sleeve 0,77 mm y un septo Supelco (Thermogreen TM LB-2) de 11 mm. Los análisis se realizaron utilizando una columna DB-5MS marca Agilent de 30 m de longitud y 0,25 mm de diámetro interno. El espesor de la película empleada fue 0.18 μm y como fase móvil se empleó fenil-metilsilicón al 5%. Para realizar el análisis se utilizó una fibra marca Supelco; fase adsorbente 50/30 μm DVB/Carboxen/PDMS.

Antes de realizar el proceso de microextracción la fibra se limpia durante 30 min y se registra su espectro de masas (blanco). Una vez que la fibra se encuentra libre de impurezas se realiza la microextracción de las muestras. Para ello, se preparó un vial conteniendo 10 mg de cloruro de sodio (NaCl), 1 g de material vegetal fresco y 2 mL de agua. El vial así preparado se colocó en una parrilla de calentamiento. Con la ayuda de un segundo vial que contenía únicamente 2 mL de agua y 10 mg de NaCl se monitoreo la temperatura.

Una vez que la temperatura alcanzó los 50°C se insertó la fibra recubierta de la fase estacionaria en el centro del vial. Así los compuestos volátiles se adsorben en dicha fase durante 1,5 h. Al término de este periodo la fibra se insertó en el inyector del cromatógrafo de gases. Finalmente, los componentes volátiles se separaron y los picos resultantes se analizaron en un espectrómetro de masas marca LECO Pegasus 4DETOF. Las condiciones para cada uno de los análisis se resumen en las Tablas 4, 5 y 6.

Tabla 4. Condiciones cromatográficas utilizadas para realizar la elución del blanco.

| Condiciones cromatográficas: | |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| Temperatura del inyector. | 300 °C |
| Temperatura inicial de la columna. | 150°C durante 0.2 min |
| Rampa de aumento de temperatura: | 50°C/min |
| Temperatura final | 300°C durante 5 min |
| Detector | Detector de ionizador de flama |
| Gas acarreador: | Helio |
| Modo | Splitless |
| Barrido de masas | 50 – 500 uma |



IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL



Tabla 5. Condiciones utilizadas para realizar la microextracción en fase sólida.

| Muestra | Cantidad | Temperatura | Agitación (rpm) | Tiempo |
|------------------|----------|-------------|-----------------|--------|
| Hojas de Capulín | 0.9228g | 50 -65°C | 360 | 1 hora |

Tabla 6. Condiciones cromatográficas utilizadas para realizar la elución las muestras.

| Condiciones cromatográficas: | |
|------------------------------------|--------------------------------|
| Temperatura del inyector: | 300°C |
| Temperatura inicial de la columna: | 50°C |
| Tasa de aumento de temperatura: | 20°C/ min |
| Temperatura final: | 300°C durante 5 min |
| Detector : | Detector de ionizador de flama |
| Gas acarreador: | Helio |
| Modo: | Splitless |
| Barrio de masas | 50 – 500 uma |



4.7 PROCEDIMIENTOS CROMATOGRÁFICOS

4.7.1 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Para el análisis cromatográfico cualitativo en capa fina se emplearon placas de aluminio recubiertas de gel de sílice (sílica gel 60 G₂₅₄ Merck). El proceso de elución se llevó a cabo con acetato de etilo: agua: ácido fórmico en proporciones (8.5:1.5:1). Antes de revelar el cromatofolio con el agente cromógeno se visualizó con luz UV (onda corta a 254 nm y onda larga a 365 nm). Como agente cromógeno se utilizó una solución de 2,2- difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).

4.7.2 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO

La muestra se preparó de acuerdo con el siguiente procedimiento: 10 g de material dividido se extrajeron con 380 mL de metanol durante 24 horas. Al cabo del proceso de extracción, la solución resultante se filtró y se concentró a presión reducida. El extracto resultante se reconstituyó en 10 mL de metanol.

La aplicación de la muestra se realizó en forma de banda con un capilar fino. Los estándares utilizados fueron el hiperósido, el ácido clorogénico y el benzaldehído.



V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Durante las últimas tres décadas se ha registrado un notable aumento en el consumo de productos naturales medicinales en todo el mundo. Dicho incremento no solo se refleja en sus altas ventas sino también, en las múltiples publicaciones internacionales sobre los aspectos clínicos y farmacológicos de plantas medicinales incluyendo la información química y botánica. Existe, además, un notable interés por parte de los organismos regulatorios para incluir formulaciones de medicina tradicional en los sistemas de atención primaria para la salud. Para ello, la OMS ha desarrollado guías para asistir a las agencias regulatorias con la información necesaria para promover el desarrollo sustentable de la medicina tradicional y/o complementaria en los diferentes países del mundo.

La carencia mundial de parámetros de calidad adecuados para evaluar los preparados herbolarios ha propiciado la amplia variabilidad en los niveles de calidad y en la eficacia de tales productos. Así, para garantizar la eficacia de la medicina herbolaria los preparados deberían estandarizarse a una concentración definida de compuestos activos en límites estrechos que garanticen la reproducibilidad lote a lote del insumo.

Con base en estas consideraciones y con la finalidad de desarrollar un método analítico para la valoración de los principios activos presentes en la infusión de la hoja de capulín se desarrolló un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución conducente a la cuantificación del contenido de los compuestos mayoritarios. Cabe mencionar que la infusión constituye la principal forma de consumo de las hojas del capulín.

El hiperósido, la amigdalina y el ácido 5-O-cafeiquinolico (ácido clorogénico) fueron previamente aislados y caracterizados en las hojas de *Prunus serotina* en estudios fitoquímicos previos y donados por el Dr. José Fausto Rivero Cruz.

Durante el desarrollo del método la composición del sistema de elución se ajustó hasta obtener una resolución entre los picos mayor a 2.8. El rango de concentraciones para las curvas de linealidad se establecieron mediante la realización de ensayos preliminares a la infusión de trabajo.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Así, los niveles de concentración para las curvas de calibración del ácido clorogénico y el hiperósido cubren el rango de 100 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (20 y 200% de la concentración encontrada como 100%). Sin embargo, la curva para el benzaldehído se ajustó de 100 a 500 $\mu\text{g/mL}$ debido a que a concentraciones mayores presenta un comportamiento no lineal. Las señales detectadas en la infusión se identificaron mediante la coelución de los estándares con la infusión recién preparada. Las condiciones del método analítico desarrollado para la cuantificación del hiperósido, el ácido clorogénico y el benzaldehído presentes en la infusión se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Condiciones de operación desarrolladas para realizar la validación del método

| Condiciones de operación | |
|--------------------------|-------------------------------------|
| Fase móvil | Buffer de acetatos: Metanol (65:35) |
| Flujo | 1 mL/min |
| Tiempo de análisis | 35 min |
| Columna | Fortis C18 |
| Temperatura de columna | 25 °C |
| Longitud de onda | 254 nm |

El ácido clorogénico (ácido 5-O-cafeoilquinico) es un producto natural polifenólico que se utiliza ampliamente en la industria de alimentos como aditivo. Las propiedades antioxidantes de este compuesto se atribuyen a su excelente capacidad para atrapar los radicales libres (Mikuliè, *et al.*, 2003).

Estudios *in vitro* han revelado que dicha propiedad biológica pudiera contribuir a la prevención de algunas enfermedades cardiovasculares (Ibarra, *et al.*, 2009). Algunas investigaciones señalan además, que cuando se incuba el ácido clorogénico en presencia de lipoproteínas de baja densidad (LDL) se incrementa la protección de estas lipoproteínas contra la oxidación (Nardini *et al.*, 1995). Este compuesto también ofrece grandes posibilidades como agente antibacterial, antiviral, antifúngico y anticancerígeno (Mikuliè, *et al.*, 2003, Chen, *et al.*, 2007). Por otra parte, el hiperósido es un flavonol que presenta actividad antioxidante, antifúngica, anti-inflamatoria y diurética (Zeliha, *et al.*, 2001, Li *et*



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



al., 2005, Olszewska, 2005 y 2007, Ekenseair, *et al.*, 2006). Recientemente, Wu y colaboradores describieron su notable actividad antiviral contra el virus de la hepatitis B utilizando como modelo patos infectados por VHB (Wu 2007).

Finalmente, la amigdalina (II) es un diglucósido cianogénico que se encuentra en forma natural en varias especies de la familia Rosaceae incluidas las del género *Prunus* (Santamour, 1998). La biotransformación de la amigdalina durante el desarrollo normal de la planta conlleva a la generación del benzaldehído como un producto de degradación (Figura 8). La degradación también se lleva a cabo durante el proceso de molienda de las hojas del capulín por acción de las enzimas amigdalina hidrolasa (AH), prunasina hidrolasa (PH) y mandelonitril-liasa (MDL) (Li, 1992; Swain, 1994).

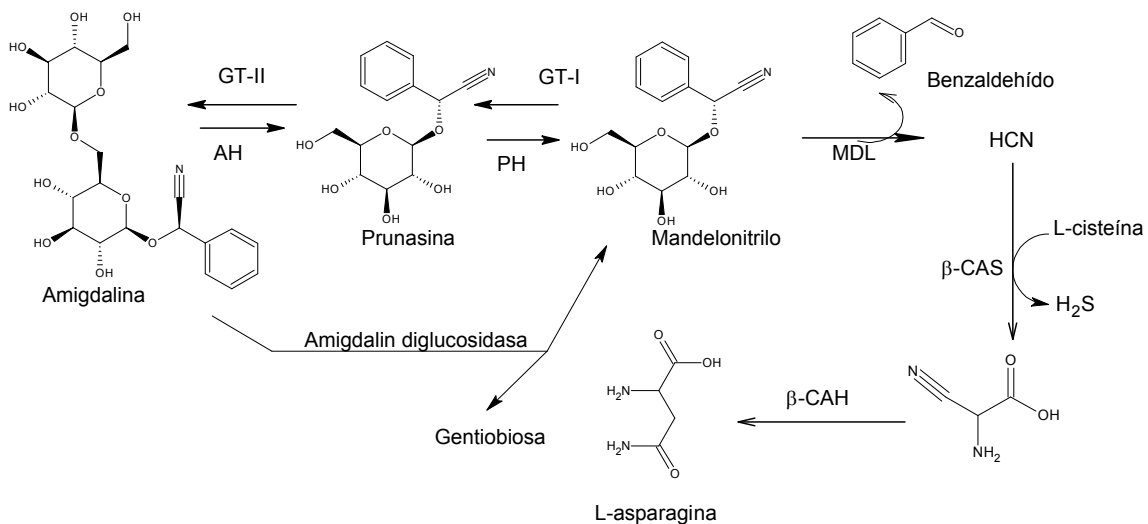


Figura 8. Metabolismo de la amigdalina en *Prunus serotina* durante su crecimiento y la liberación del benzaldehído. GT: glucosiltransferasa, beta-CAS: beta-cianoalanina sintasa, beta-CAH: beta-cianoalanina hidrolasa.

5.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

La validación de un método analítico se define como el proceso mediante el cual queda establecido por estudios experimentales, que las características de desempeño del método son adecuadas para la aplicación que se pretende.

Los parámetros de calidad que se evaluaron para validar el método analítico desarrollado son: adecuabilidad, especificidad, linealidad, exactitud, precisión, y robustez.



En las siguientes secciones se resumen los resultados obtenidos para cada característica de calidad evaluada.

5.1.1 ADECUABILIDAD DEL SISTEMA

La adecuabilidad consiste en la verificación del sistema establecido con la finalidad de obtener resultados confiables. Este parámetro de calidad se determinó mediante la inyección directa de las soluciones estándar, de cada uno de los compuestos evaluados en el cromatógrafo de líquidos de acuerdo con el protocolo experimental diseñado. Los resultados obtenidos mediante estos experimentos permitieron estimar que la resolución de los componentes es mayor a 2.8 (Tabla 8). En las Figuras 9, 10 y 11 se ilustran unos ejemplos de los cromatogramas obtenidos para el ácido clorogénico (500 $\mu\text{g/mL}$), el benzaldehído (300 $\mu\text{g/mL}$) y el hiperósido (500 $\mu\text{g/mL}$).

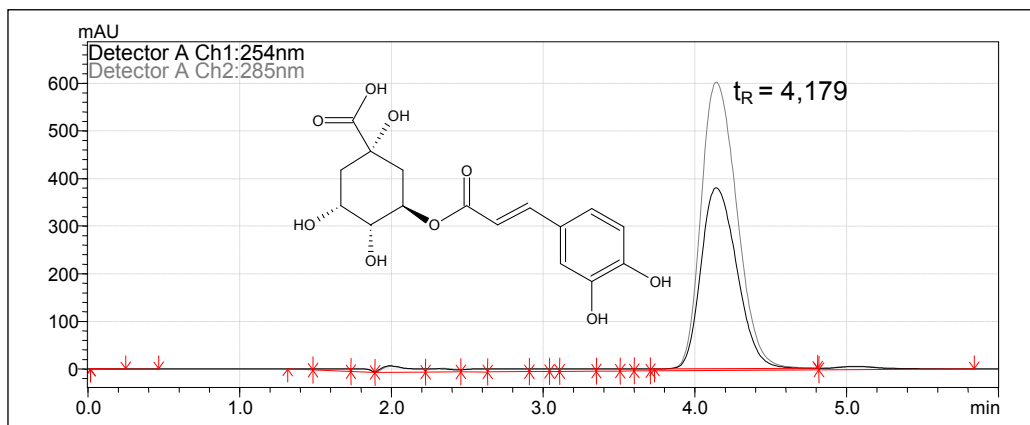


Figura 9. Cromatograma obtenido con una solución de 500 $\mu\text{g/mL}$ de ácido clorogénico.

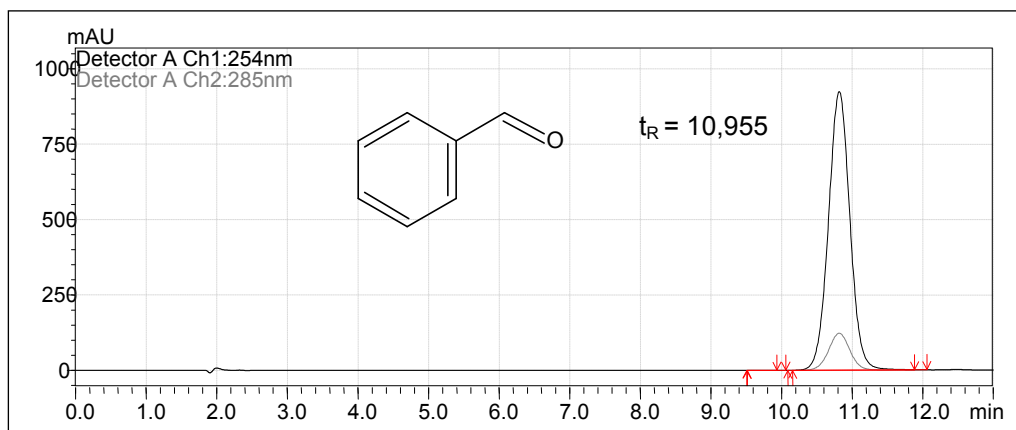


Figura 10. Cromatograma obtenido con una solución de 300 $\mu\text{g/mL}$ de benzaldehído.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

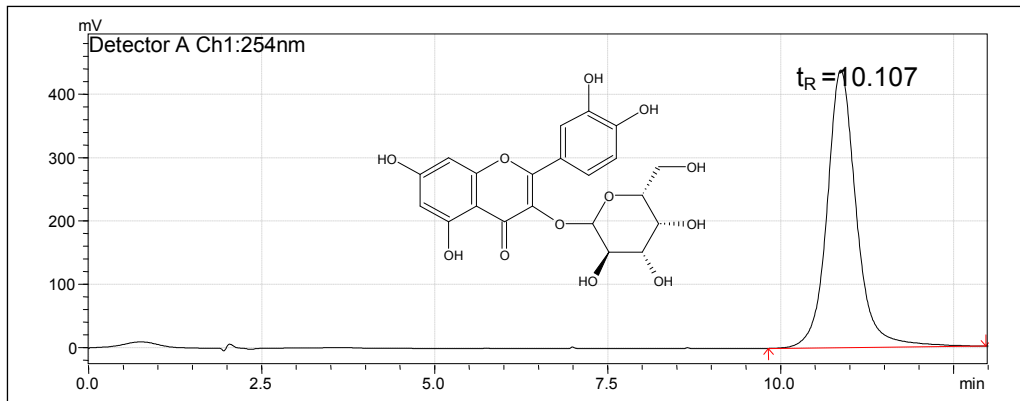


Figura 11. Cromatograma obtenido con una solución de 500 µg/mL de hiperósido.

Tabla 8. Resultados obtenidos durante la evaluación de la adecuabilidad del sistema.

| Muestra | Área | Muestra | Área | Muestra | Área |
|-------------------------------|------------|--------------------------|------------|------------------------|------------|
| Ácido clorogénico 500 µg/mL-1 | 11265127.7 | Benzaldehído 300 µg/mL-1 | 64587845.5 | Hiperósido 500 µg/mL 1 | 12991236.8 |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL-2 | 11196379.6 | Benzaldehído 300 µg/mL-2 | 65306521.1 | Hiperósido 500 µg/mL 2 | 12905318.0 |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL-3 | 11051643.2 | Benzaldehído 300 µg/mL-3 | 65807748.4 | Hiperósido 500 µg/mL 3 | 12920521.6 |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL-4 | 11039322.8 | Benzaldehído 300 µg/mL-4 | 64806236.6 | Hiperósido 500 µg/mL 4 | 12855661.0 |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL-5 | 11051880.3 | Benzaldehído 300 µg/mL-5 | 65725738.0 | Hiperósido 500 µg/mL 5 | 12788083.8 |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL-6 | 11075275.3 | Benzaldehído 300 µg/mL-6 | 65358180.7 | Hiperósido 500 µg/mL 6 | 12668046.3 |
| \bar{y} | 11113271.5 | \bar{y} | 65265378.4 | \bar{y} | 12854811.3 |
| S | 94282.8829 | S | 487085.863 | S | 113855.289 |
| DER | 0.84838099 | DER | 0.74631585 | DER | 0.88570175 |

Como se desprende de los resultados obtenidos en la Tabla 8, en todos los casos la DER es menor al 2% por lo tanto el sistema se encuentra en óptimas condiciones para llevar a cabo la validación del método.



5.1.2 ESPECIFICIDAD

La especificidad de un método analítico se define como su capacidad para medir con exactitud y de manera inequívoca un analito en presencia de interferencias como excipientes, enantiómeros y productos de degradación, entre otros. La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede compensarse usando procedimientos analíticos complementarios como: extracciones orgánicas, derivatizaciones y separaciones por cromatografía en columna o en capa fina, entre otros.

La especificidad del método propuesto y la estabilidad de los productos naturales se evaluó mediante el efecto de diferentes factores sobre la muestra como el grado de acidez, de basicidad, condiciones de oxidación y exposición a la luz UV. Los cromatogramas resultantes al inicio y al término de los experimentos se resumen en las Figuras 12 a 21 y en la Tabla 9.

Tabla 9: Resultados para especificidad del ácido clorogénico y del benzaldehído.

| Factor a evaluar | Muestra de Ácido clorogénico 800 µg/mL | Tiempo de retención (t _R) | Área Bajo la Curva (ABC) (uA) | Benzaldehído 800 µg/mL | t _R | ABC (uA) |
|---------------------|--|---------------------------------------|-------------------------------|------------------------|----------------|------------|
| Estándar | 1 | 8.201 | 20331663.8 | 1 | 10.332 | 64552072.8 |
| | 2 | 8.158 | 21335112.4 | 2 | 10.279 | 63904398.3 |
| | 3 | 8.168 | 20914279.3 | 3 | 10.231 | 63876762.8 |
| Basicidad | 1 | 8.263 | 465385.5 | 1 | 10.26 | 24569096.5 |
| | 2 | 8.274 | 307066.5 | 2 | 10.287 | 24459886 |
| Acidez | 1 | 8.267 | 6109268.4 | 1 | 10.32 | 23888740.1 |
| | 2 | 8.273 | 6019408.6 | 2 | 10.305 | 24240767.9 |
| Oxidación | 1 | 8.269 | 7621045.5 | 1 | 10.304 | 13251199.6 |
| | 2 | 8.219 | 7537674.7 | 2 | 10.314 | 13120714.7 |
| Luz UV largo | 1 | 8.165 | 17052029.9 | 1 | 10.327 | 63021644.5 |
| | 2 | 8.160 | 16324894.8 | 2 | 10.322 | 63443348.8 |



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

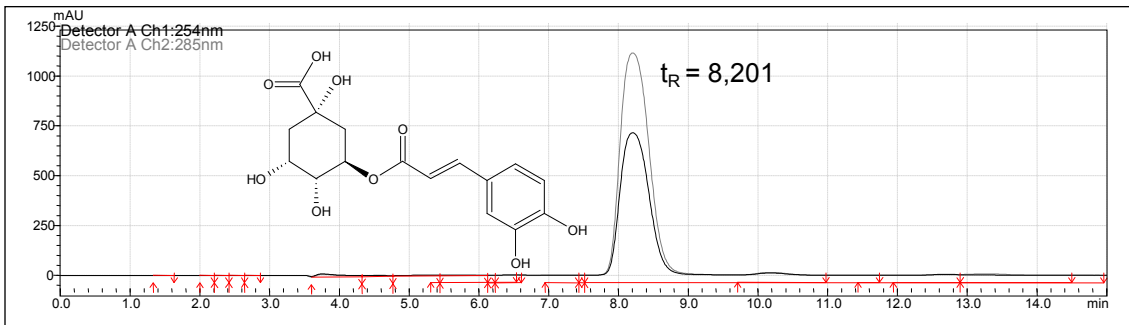


Figura 12. Cromatograma de la solución estándar de ácido clorogénico (800 µg/mL) en condiciones normales.

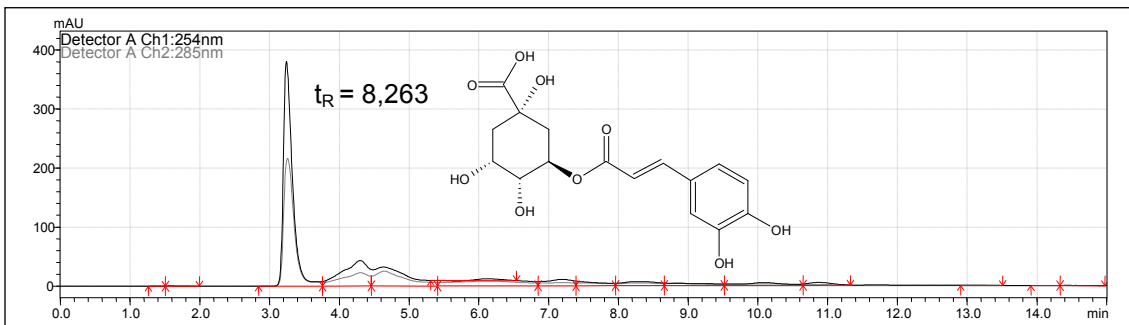


Figura 13. Cromatograma de la solución estándar de ácido clorogénico (800 µg/mL) sometido a reflujo durante media hora en una solución básica.

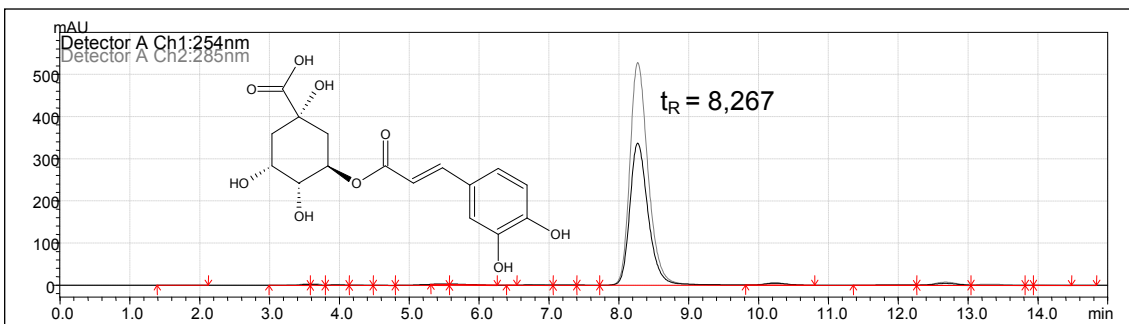


Figura 14. Cromatograma de la solución estándar de ácido clorogénico (800 µg/mL) sometido a reflujo durante media hora en una solución ácida.

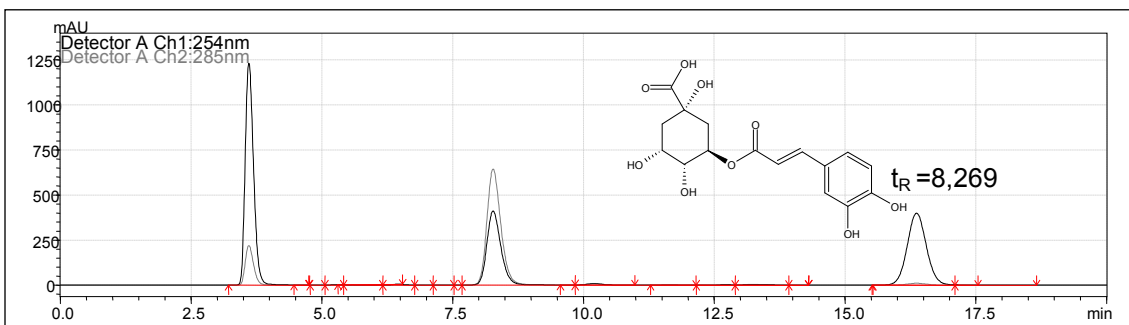


Figura 15. Cromatograma de la solución estándar de ácido clorogénico (800 µg/mL) sometido a condiciones de oxidación a reflujo por media hora.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

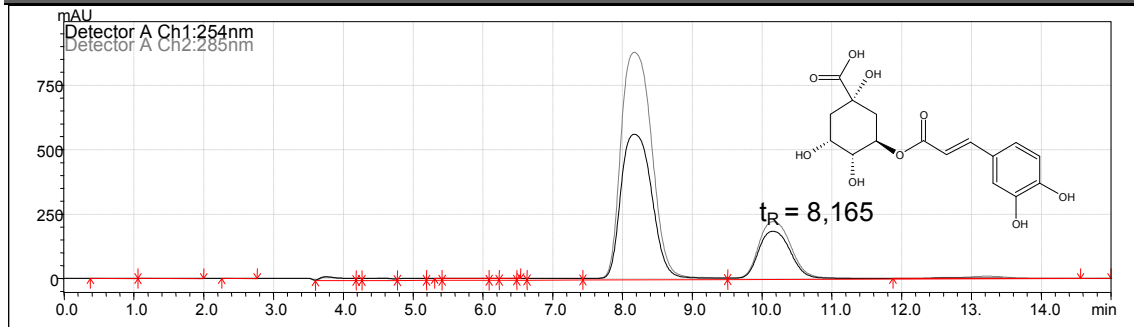


Figura 16. Cromatograma de la solución estándar de ácido clorogénico (800 µg/mL) expuesto a luz UV-visible por 10 minutos.

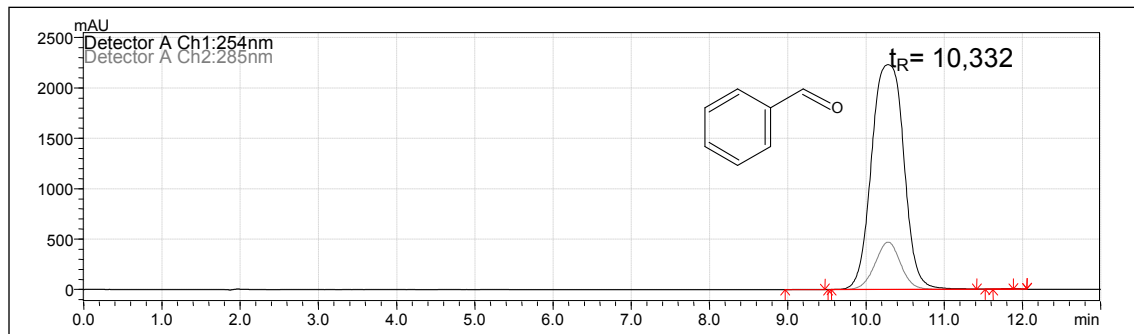


Figura 17. Cromatograma de la solución estándar de benzaldehído (800 µg/mL) a condición normal.

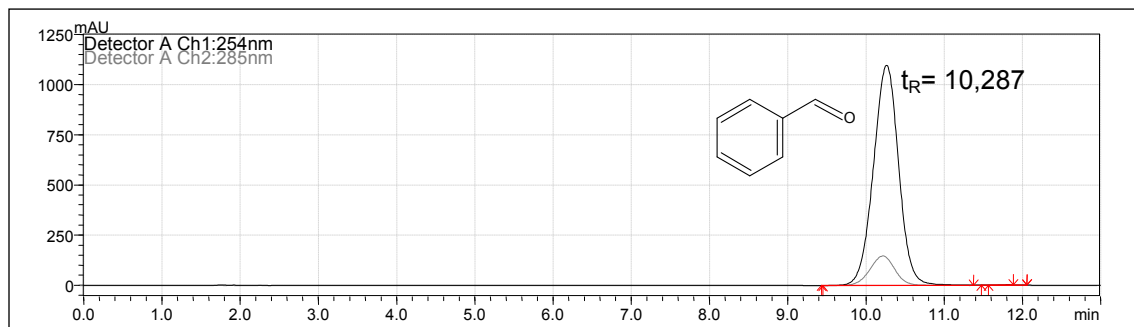


Figura 18. Cromatograma de la solución estándar de benzaldehído (800 µg/mL) sometido a reflujo durante media hora en una solución básica.

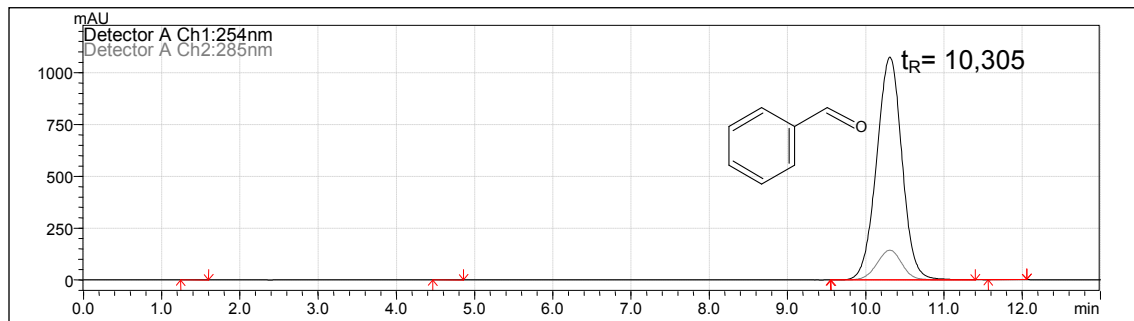


Figura 19. Cromatograma de la solución estándar de benzaldehído (800 µg/mL) sometido a reflujo durante media hora en una solución ácida.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

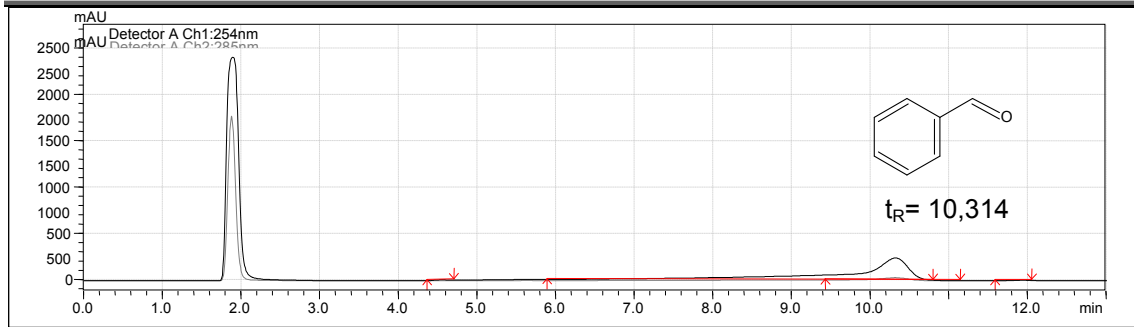


Figura 20. Cromatograma de la solución estándar de benzaldehído (800 µg/mL) sometido a condiciones de oxidación a reflujo por media hora.

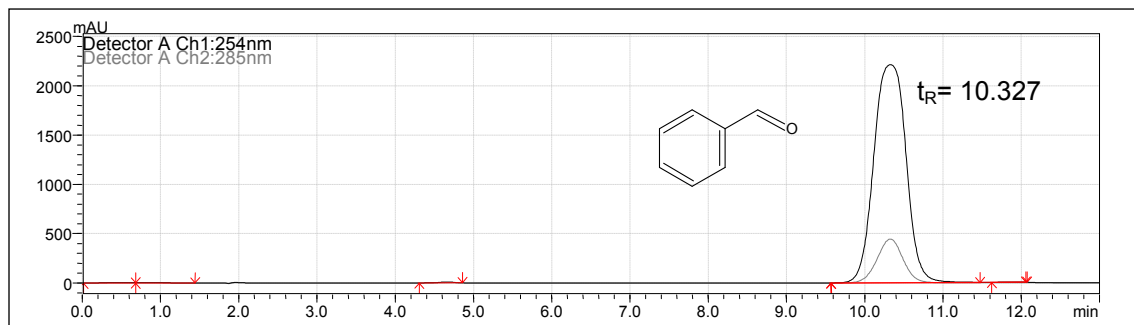


Figura 21. Cromatograma de la solución estándar de benzaldehído (800 µg/mL) expuesto a luz UV-visible por 10 minutos.

Como se desprende de las Figuras 12 a 21, el ácido clorogénico se degrada en condiciones básicas, de oxidación y por exposición a la luz UV. El benzaldehído, por su parte, solo se degrada en condiciones de oxidación.

En síntesis, las condiciones básicas provocaron un 98,12 % de degradación del ácido clorogénico y, las condiciones de oxidación provocaron un 63,7% y un 79,4% de degradación del ácido clorogénico y del benzaldehído, respectivamente.

Cabe mencionar que la especificidad y la estabilidad del hiperósido no se pudieron evaluar debido a la poca cantidad del producto natural obtenido en forma pura a partir de su fuente natural.



Los resultados obtenidos indican que los tiempos de retención de los productos de degradación generados no interfieren con las señales de los metabolitos de interés. Con base en estos resultados se concluye que la repuesta obtenida en la matriz de trabajo se debe exclusivamente a la presencia del compuesto **XXII** y del benzaldehído. Por lo tanto, el método analítico propuesto es específico.

5.1.3 LINEALIDAD.

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad de generar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un determinado rango. EL rango de trabajo comprende del 20 al 200 % de la concentración encontrada como 100% en ensayos preliminares con la infusión de trabajo. Los resultados de estos experimentos se resumen en las Tablas 10, 11 y 12, y en las Gráficas 1, 2 y 3.

El manejo de los datos se realizó por medio de una regresión lineal simple. Los parámetros estadísticos calculados fueron la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente [IC (β_1)]. Los coeficientes de regresión calculados mediante el análisis estadístico permitieron estimar las siguientes ecuaciones:

$$\text{Área bajo la curva (ABC)} = 304473 + 11128 \times (\text{concentración de ácido clorogénico})$$

$$ABC = 862067 + 64095 \times (\text{concentración de benzaldehído})$$

$$ABC = 174439 + 25446 \times (\text{concentración de hiperósido})$$



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



5.1.3.1 Linealidad del sistema.

Tabla 10. Resultados obtenidos para evaluar la linealidad del sistema utilizando ácido clorogénico.

| Muestra | Concentración del ácido clorogénico [µg/mL] | Área | Concentración real de ácido clorogénico [µg/mL] | Parámetros de adecuabilidad del sistema $\bar{y} = 6175351.28$ $S = 63175.7907$ $DER = 1.023$ |
|---------------------------------|---|------------|---|---|
| Acido clorogénico 500 µg/mL-1.1 | 500 | 6166669.8 | 526.7970 | |
| Acido clorogénico 500 µg/mL-1.2 | 500 | 6167622.5 | 526.8826 | |
| Acido clorogénico 500 µg/mL-1.3 | 500 | 6265842.3 | 535.7090 | |
| Acido clorogénico 500 µg/mL-1.4 | 500 | 6187793.3 | 528.6952 | |
| Acido clorogénico 500 µg/mL-1.5 | 500 | 6088828.5 | 519.8019 | |
| Acido clorogénico 1000 µg/mL-1 | 1000 | 11341068.9 | 991.7861 | |
| Acido clorogénico 1000 µg/mL-2 | 1000 | 11099315.7 | 970.0613 | |
| Acido clorogénico 1000 µg/mL-3 | 1000 | 11194508.4 | 978.6157 | |
| Acido clorogénico 750 µg/mL-1 | 750 | 8794841.1 | 762.9734 | |
| Acido clorogénico 750 µg/mL-2 | 750 | 8703203.0 | 754.7385 | |
| Acido clorogénico 750 µg/mL-3 | 750 | 8816221.9 | 764.8948 | |
| Acido clorogénico 500 µg/mL-1 | 500 | 6162780.3 | 526.4475 | |
| Acido clorogénico 500 µg/mL-2 | 500 | 6165355.6 | 526.6789 | |
| Acido clorogénico 500 µg/mL-3 | 500 | 6124993.1 | 523.0518 | |
| Acido clorogénico 250 µg/mL-1 | 250 | 3106886.0 | 251.8344 | |
| Acido clorogénico 250 µg/mL-2 | 250 | 3160685.1 | 256.6690 | |
| Acido clorogénico 250 µg/mL-3 | 250 | 3148859.2 | 255.6062 | |
| Acido clorogénico 100 µg/mL-1 | 100 | 1180596.7 | 78.7315 | |
| Acido clorogénico 100 µg/mL-2 | 100 | 1183819.6 | 79.0211 | |
| Acido clorogénico 100 µg/mL-3 | 100 | 1185898.7 | 79.2079 | |

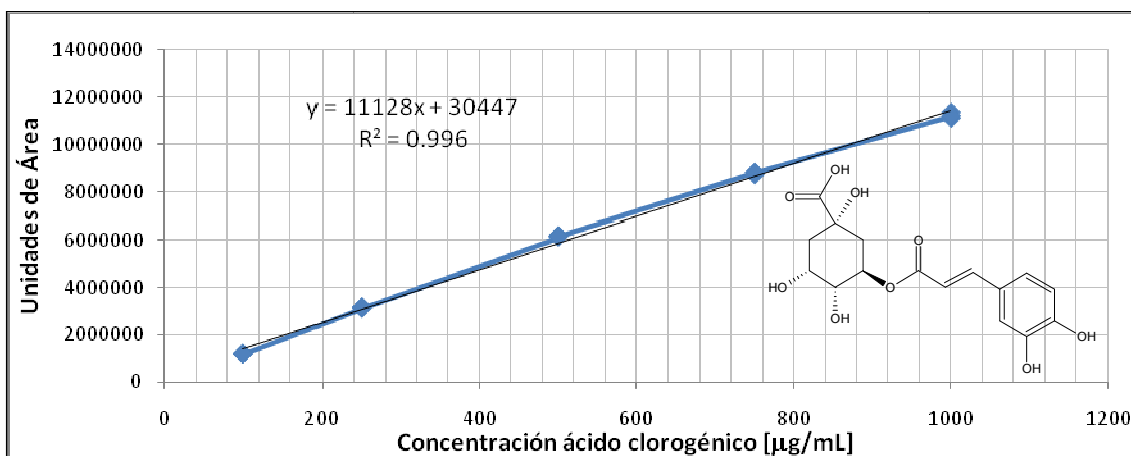


Gráfico 1: Gráfica de linealidad para el ácido clorogénico.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Tabla 11. Resultados obtenidos para evaluar la linealidad del sistema utilizando benzaldehído.

| Muestra | Concentración del benzaldehído [µg/mL] | Área | Concentración real del benzaldehído [µg/mL] | |
|--------------------------|--|------------|---|---|
| Benzaldehído 300 µg/mL-1 | 300 | 20130674.5 | 300.6258 | Parámetros de adecuabilidad del sistema = 19870305.45 S=203849.1684 DER=1.02 |
| Benzaldehído 300 µg/mL-2 | 300 | 20119814.3 | 300.4563 | |
| Benzaldehído 300 µg/mL-3 | 300 | 19804982.3 | 295.5444 | |
| Benzaldehído 300 µg/mL-4 | 300 | 19754448.7 | 294.7559 | |
| Benzaldehído 300 µg/mL-5 | 300 | 19760795.4 | 294.8550 | |
| Benzaldehído 300 µg/mL-6 | 300 | 19651117.5 | 293.1438 | |
| Benzaldehído 500 µg/mL-1 | 500 | 32747654.1 | 497.4739 | |
| Benzaldehído 500 µg/mL-2 | 500 | 32353713.8 | 491.3277 | |
| Benzaldehído 500 µg/mL-3 | 500 | 32636362.7 | 495.7375 | |
| Benzaldehído 400 µg/mL-1 | 400 | 26611315.1 | 401.7357 | |
| Benzaldehído 400 µg/mL-2 | 400 | 27001761.0 | 407.8274 | |
| Benzaldehído 400 µg/mL-3 | 400 | 26314971.3 | 397.1122 | |
| Benzaldehído 300 µg/mL_1 | 300 | 20262418.9 | 302.6812 | |
| Benzaldehído 300 µg/mL_2 | 300 | 20441529.2 | 305.4757 | |
| Benzaldehído 300 µg/mL_3 | 300 | 20407952.4 | 304.9518 | |
| Benzaldehído 200 µg/mL-1 | 200 | 14152852.2 | 207.3607 | |
| Benzaldehído 200 µg/mL-2 | 200 | 13854702.6 | 202.7090 | |
| Benzaldehído 200 µg/mL-3 | 200 | 14029696.7 | 205.4393 | |
| Benzaldehído 100 µg/mL-1 | 100 | 6821554.6 | 92.9790 | |
| Benzaldehído 100 µg/mL-2 | 100 | 6934411.1 | 94.7397 | |
| Benzaldehído 100 µg/mL-3 | 100 | 6785398.1 | 92.4149 | |

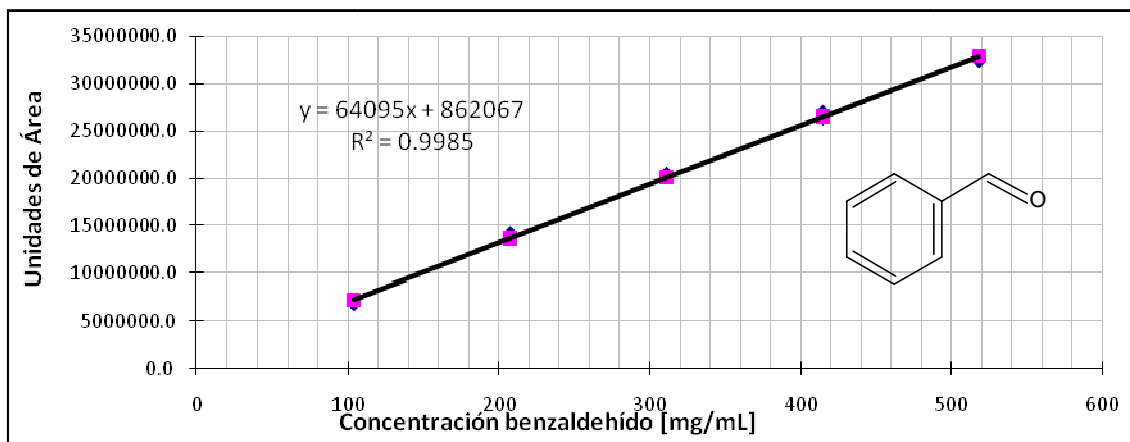


Gráfico 2: Gráfica de linealidad para el benzaldehído.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Tabla 12. Resultados obtenidos para evaluar la linealidad del sistema utilizando hiperósido.

| Muestra | Concentración del hiperósido [µg/mL] | Área | Concentración real del hiperósido [µg/mL] | Parámetros de adecuabilidad del sistema |
|--------------------------|--------------------------------------|------------|---|--|
| Hiperósido 500 µg/mL 1.1 | 500 | 12991236.8 | 503.6954 | $\bar{y} = 12854811.3$ $S = 113855.2890$ $DER = 0.8$ |
| Hiperósido 500 µg/mL 1.2 | 500 | 12905318.0 | 500.3189 | |
| Hiperósido 500 µg/mL 1.3 | 500 | 12920521.6 | 500.9164 | |
| Hiperósido 500 µg/mL 1.4 | 500 | 12855661.0 | 498.3674 | |
| Hiperósido 500 µg/mL 1.5 | 500 | 12788083.8 | 495.7116 | |
| Hiperósido 500 µg/mL 1.6 | 500 | 12668046.3 | 490.9942 | |
| Hiperósido 1000 µg/mL 1 | 1000 | 25252026.0 | 985.5400 | |
| Hiperósido 1000 µg/mL 2 | 1000 | 25202585.6 | 983.5970 | |
| Hiperósido 1000 µg/mL 3 | 1000 | 25178114.7 | 982.6353 | |
| Hiperósido 750 µg/mL 1 | 750 | 19759172.3 | 769.6728 | |
| Hiperósido 750 µg/mL 2 | 750 | 19892941.8 | 774.9299 | |
| Hiperósido 750 µg/mL 3 | 750 | 19715730.9 | | |
| Hiperósido 500 µg/mL 1 | 500 | 13034007.3 | 505.3763 | |
| Hiperósido 500 µg/mL 2 | 500 | 12876863.3 | 499.2006 | |
| Hiperósido 500 µg/mL 3 | 500 | 12936652.7 | 501.5503 | |
| Hiperósido 250 µg/mL 1 | 250 | 6599823.3 | | |
| Hiperósido 250 µg/mL 2 | 250 | 6523916.5 | 249.5321 | |
| Hiperósido 250 µg/mL 3 | 250 | 6532017.1 | 249.8505 | |
| Hiperósido 100 µg/mL 1 | 100 | 2522877.2 | 92.2928 | |
| Hiperósido 100 µg/mL 2 | 100 | 2524823.3 | 92.3692 | |
| Hiperósido 100 µg/mL 3 | 100 | 2540169.5 | 92.9723 | |

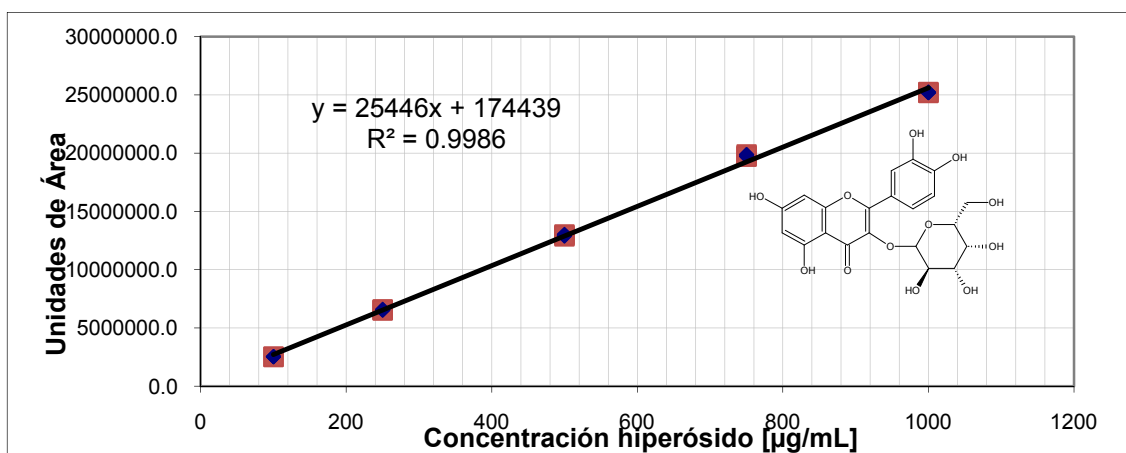


Gráfico 3: Gráfica de linealidad para el hiperósido.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Los parámetros determinados en la curva de regresión ajustada para los compuestos **III**, **XXII** y el benzaldehído se resumen Tablas 13, 14 y 15. Los intervalos de confianza IC (β_1) se determinaron utilizando los valores críticos de la distribución *t de student* con un 97,5% de confianza (ver anexo B).

Tabla 13. Parámetros determinados en la linealidad del sistema para el ácido clorogénico.

| Estadístico | Resultado |
|--|-----------------------|
| b_0 | 304472.5423 |
| b_1 | 11128.4545 |
| r | 0.9984 |
| r^2 | 0,9968 |
| IC (β_1) ($t_{0,975, 13} = 2.160$) | 10749.0045-11507.9045 |

| <i>Estadísticas de la regresión</i> | |
|---|-------------|
| Coefficiente de correlación (r) | 0.9984 |
| Coefficiente de determinación (r^2) | 0.9968 |
| r^2 ajustado | 0.9965 |
| Error típico | 222139.0420 |
| Observaciones | 15 |



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Tabla 14. Parámetros determinados en la linealidad del sistema para el benzaldehído.

| Estadístico | Resultado |
|---|-----------------------|
| b_0 | 862066.6366 |
| b_1 | 64094.5098 |
| r | 0.9992 |
| r^2 | 0.9985 |
| IC (β_1) ($t_{0,975,13}=2,160$) | 62591.4682-65597.5515 |

| <i>Estadísticas de la regresión</i> | |
|-------------------------------------|-------------|
| Coefficiente de correlación (r) | 0.9992 |
| Coefficiente de determinación r^2 | 0.9985 |
| R^2 ajustado | 0.9984 |
| Error típico | 381134.1320 |
| Observaciones | 15 |

Tabla 15. Parámetros determinados en la linealidad del sistema para el hiperósido.

| Estadístico | Resultado |
|--|-----------------------|
| b_0 | 174439.0772 |
| b_1 | 25445.5302 |
| r | 0.9993 |
| r^2 | 0.9984 |
| IC (β_1) ($t_{0,975,13}=2,16$) | 24865.3194-26025.7409 |

| <i>Estadísticas de la regresión</i> | |
|---|-------------|
| Coefficiente de correlación (r) | 0.9993 |
| Coefficiente de determinación (r^2) | 0.9986 |
| r^2 ajustado | 0.9984 |
| Error típico | 339669.2370 |
| Observaciones | 15 |



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Para evaluar si las ecuaciones de regresión describen adecuadamente la relación lineal entre las variables se realizó el análisis de varianza (ANDEVA) de los modelos. Las hipótesis planteadas para dicho análisis se plantearon de la siguiente manera:

Ho: el modelo estadístico propuesto no describe una relación lineal

H1: el modelo propuesto describe una relación lineal.

Los resultados se muestran a continuación en las Tablas 16, 17 y 18 (ver Anexo C para el cálculo de F de Fisher).

Tabla 16. Análisis de varianza de la regresión lineal simple para el modelo del ácido clorogénico (n=15, $\alpha=0,05$, $F_{0,05,1,15}=4,54$).

ANÁLISIS DE VARIANZA

| | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Promedio de los cuadrados | F | Valor crítico de F |
|-----------|--------------------|-------------------|---------------------------|-----------|--------------------|
| Regresión | 1 | 1.9802E+14 | 1.9802E+14 | 4012.9929 | 1.4002E-17 |
| Residuos | 13 | 6.4149E+11 | 4.9346E+10 | | |
| Total | 14 | 1.9867E+14 | | | |

| | Coeficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad Inferior 95% | Superior 95% | Inferior 95.0% | Superior 95.0% |
|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------------------|--------------|----------------|----------------|
| Intercepción | 304472.542 | 107862.712 | 2.82277847 | 0.01438827 | 71449.3197 | 537495.765 | 71449.3197 |
| Variable X 1 | 11128.4545 | 175.671238 | 63.3481874 | 1.4002E-17 | 10748.9399 | 11507.9691 | 10748.9399 |

Tabla 17. Análisis de varianza de la regresión lineal simple para el modelo del benzaldehído (n=15, $\alpha=0,05$, $F_{0,05,1,15}=4,54$).

ANÁLISIS DE VARIANZA

| | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Promedio de los cuadrados | F | Valor crítico de F |
|-----------|--------------------|-------------------|---------------------------|-----------|--------------------|
| Regresión | 1 | 1.2324E+15 | 1.2324E+15 | 8484.1283 | 1.0896E-19 |
| Residuos | 13 | 1.8884E+12 | 1.4526E+11 | | |
| Total | 14 | 1.2343E+15 | | | |

| | Coeficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad Inferior 95% | Superior 95% | Inferior 95.0% | Superior 95.0% |
|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------------------|--------------|----------------|----------------|
| Intercepción | 862066.637 | 230788.178 | 3.73531541 | 0.00249629 | 363479.092 | 1360654.18 | 363479.092 |
| Variable X 1 | 64094.5098 | 695.852538 | 92.1093282 | 1.0896E-19 | 62591.2118 | 65597.8078 | 62591.2118 |



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Tabla 18. Análisis de varianza de la regresión lineal simple para linealidad del sistema del hiperósido (n=15, a= 0,05, $F_{0,05, 1, 15}=4,54$).

ANÁLISIS DE VARIANZA

| | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Promedio de los cuadrados | F | Valor crítico de F |
|-----------|--------------------|-------------------|---------------------------|-----------|--------------------|
| Regresión | 1 | 1.0353E+15 | 1.0353E+15 | 8973.4416 | 7.57196E-20 |
| Residuos | 13 | 1.4999E+12 | 1.1538E+11 | | |
| Total | 14 | 1.0368E+15 | | | |

| | Coefficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad | Inferior 95% | Superior 95% | Inferior 95.0% | Superior 95.0% |
|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|----------------|----------------|
| Intercepción | 174439.077 | 164931.139 | 1.05764793 | 0.30947407 | -181872.9854 | 530751.14 | -181872.985 | 530751.14 |
| Variable X 1 | 25445.5302 | 268.616065 | 94.7282514 | 7.572E-20 | 24865.22044 | 26025.8399 | 24865.2204 | 26025.8399 |

En la Tabla 19 se resumen los valores de F obtenidos para los compuestos III, XXII y el benzaldehído.

Tabla 19. Valores de F para cada compuesto

| Compuesto | F |
|-------------------|-----------|
| Ácido clorogénico | 4012.9929 |
| Benzaldehído | 8484.1283 |
| Hiperósido | 8973.4416 |

Como se desprende de los resultados indicados en la Tabla 19, el valor estadístico de F calculado ($F_{0.05, 1, 15}$) para los tres modelos supera el valor crítico, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula (H_0) y se concluye que la variación en la respuesta se encuentra explicada por el modelo. Por otra parte, las pruebas de hipótesis relativas a los coeficientes de regresión demostraron que las pendientes de las rectas de regresión son diferentes de cero. Finalmente, los coeficientes de determinación calculados para ambos modelos indican que el 99% de la variación total de las variables se encuentra descrito por un modelo de regresión lineal, mientras que los intervalos de confianza para cada compuesto no incluyen el cero. Con base a estas evidencias se estableció que el método analítico desarrollado es lineal en el intervalo de concentraciones establecido para el ácido clorogénico, el benzaldehído y el hiperósido.



5.1.3.2 Linealidad del Método y Exactitud.

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les han adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

En las Tablas 20 y 21 y en la Gráfica 4 se muestran los resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método respecto al ácido clorogénico, mientras que en las Tablas 22 y 23 y en la Gráfica 5 se muestran los resultados correspondientes al benzaldehído.

Tabla 20. Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método utilizando ácido clorogénico.

| Muestra | t _R | Área | Concentración real µg/mL | % Recobro |
|------------------|----------------|-----------|--------------------------|---------------------|
| ÁC 750 µg/mL - 1 | 2.938 | 8825137.1 | 746.8627 | 99.58 |
| ÁC 750 µg/mL - 2 | 2.940 | 8861134.1 | 749.9091 | 99.99 |
| ÁC 750 µg/mL - 3 | 2.952 | 8804637.6 | 745.1279 | 99.35 |
| ÁC 500 µg/mL - 1 | 2.969 | 5818875.8 | 492.4458 | 98.49 |
| ÁC 500 µg/mL - 2 | 2.962 | 5795037.3 | 490.4283 | 98.09 |
| ÁC 500 µg/mL - 3 | 2.959 | 5774648.4 | 488.7028 | 97.74 |
| ÁC 250 µg/mL - 1 | 3.119 | 2922585.7 | 247.3356 | 98.93 |
| ÁC 250 µg/mL - 2 | 3.093 | 2909032.1 | 246.1885 | 98.48 |
| ÁC 250 µg/mL - 3 | 3.074 | 2931721.5 | 248.1087 | 99.24 |
| ÁC 100 µg/mL - 1 | 3.078 | 1166226.3 | 98.6966 | 98.70 |
| ÁC 100 µg/mL - 2 | 3.038 | 1170899.2 | 99.0921 | 99.09 |
| ÁC 100 µg/mL - 3 | 3.043 | 1165256.7 | 98.6145 | 98.61 |
| | | | \bar{y} | 98.8575 |
| | | | D. E. | 0.6363 |
| | | | DER | 0,64 |
| | | | t _{0.975, n-1} | 2.2010 |
| | | | IC (µ) | 98.4532- 99.2618 |



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Tabla 21. Cantidad adicionada y cantidad recuperada para el ácido clorogénico (linealidad del método).

| Muestra | X | Y |
|-----------------------------|---|---|
| | Cantidad recuperada Concentración ($\mu\text{g/mL}$) | Cantidad adicionada Concentración ($\mu\text{g/mL}$) |
| ÁC 750 $\mu\text{g/mL}$ - 1 | 746.8627 | 762.9734 |
| ÁC 750 $\mu\text{g/mL}$ - 2 | 749.9091 | 754.7385 |
| ÁC 750 $\mu\text{g/mL}$ - 3 | 745.1279 | 764.8948 |
| ÁC 500 $\mu\text{g/mL}$ - 1 | 492.4458 | 526.4475 |
| ÁC 500 $\mu\text{g/mL}$ - 2 | 490.4283 | 526.6789 |
| ÁC 500 $\mu\text{g/mL}$ - 3 | 488.7028 | 523.0518 |
| ÁC 250 $\mu\text{g/mL}$ - 1 | 247.3356 | 251.8344 |
| ÁC 250 $\mu\text{g/mL}$ - 2 | 246.1885 | 256.6690 |
| ÁC 250 $\mu\text{g/mL}$ - 3 | 248.1087 | 255.6062 |
| ÁC 100 $\mu\text{g/mL}$ - 1 | 98.6966 | 78.7315 |
| ÁC 100 $\mu\text{g/mL}$ - 2 | 99.0921 | 79.0211 |
| ÁC 100 $\mu\text{g/mL}$ - 3 | 98.6145 | 79.2079 |

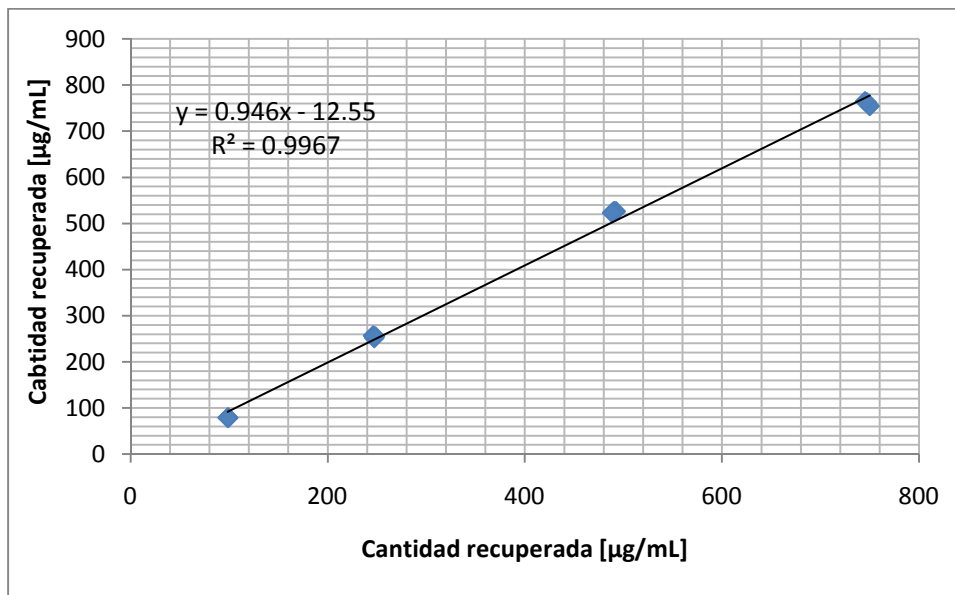


Gráfico 4: Gráfica de linealidad del método para el ácido clorogénico.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Tabla 22. Resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método utilizando benzaldehído.

| Muestra | t _R | Área | Concentración real µg/mL | % Recobro |
|------------------|----------------|------------|--------------------------|---------------|
| Bz 400 µg/mL - 1 | 8.092 | 25780782.9 | 380.4 | 95.1099 |
| Bz 400 µg/mL - 2 | 8.970 | 25835661.2 | 381.2 | 95.3124 |
| Bz 400 µg/mL - 3 | 8.093 | 25848146.1 | 381.4 | 95.3584 |
| Bz 300 µg/mL - 1 | 8.102 | 18692760.9 | 275.8 | 91.9479 |
| Bz 300 µg/mL - 2 | 8.130 | 18794046.1 | 277.3 | 92.4461 |
| Bz 300 µg/mL - 3 | 8.125 | 18766258.1 | 276.9 | 92.3094 |
| Bz 200 µg/mL - 1 | 8.153 | 12436025.3 | 183.5 | 91.7574 |
| Bz 200 µg/mL - 2 | 8.161 | 12420923.7 | 183.3 | 91.6460 |
| Bz 200 µg/mL - 3 | 8.106 | 12335565.8 | 182.0 | 91.0162 |
| Bz 100 µg/mL - 1 | 8.093 | 6142303.4 | 90.6 | 90.6402 |
| Bz 100 µg/mL - 2 | 8.095 | 6125834.3 | 90.4 | 90.3972 |
| Bz 100 µg/mL - 3 | 8.099 | 6111943.3 | 90.2 | 90.1922 |
| Bz 50 µg/mL - 1 | 8.096 | 3057795.5 | 45.1 | 90.2460 |
| Bz 50 µg/mL - 2 | 8.095 | 3029690.1 | 44.7 | 89.4165 |
| Bz 50 µg/mL - 3 | 8.094 | 3020428.3 | 44.6 | 89.1432 |
| | | | \bar{y} | 91.7959 |
| | | | S | 2.0414 |
| | | | DER | 2.22 |
| | | | $t_{0.975, n-1}$ | 2.145 |
| | | | IC (µ) | 90.6653-92.66 |

Tabla 23. Cantidad recuperada y cantidad adicionada para el benzaldehído (linealidad del método).

| Muestra | X | Y |
|------------------|--|--|
| | CANTIDAD RECUPERADA Concentración µg/mL | CANTIDAD ADICIONADA Concentración µg/mL |
| Bz 400 µg/mL - 1 | 414.40 | 380.4 |
| Bz 400 µg/mL - 2 | 414.40 | 381.2 |
| Bz 400 µg/mL - 3 | 414.40 | 381.4 |
| Bz 300 µg/mL - 1 | 310.80 | 275.8 |
| Bz 300 µg/mL - 2 | 310.80 | 277.3 |
| Bz 300 µg/mL - 3 | 310.80 | 276.9 |
| Bz 200 µg/mL - 1 | 207.20 | 183.5 |
| Bz 200 µg/mL - 2 | 207.20 | 183.3 |
| Bz 200 µg/mL - 3 | 207.20 | 182.0 |
| Bz 100 µg/mL - 1 | 103.60 | 90.6 |
| Bz 100 µg/mL - 2 | 103.60 | 90.4 |
| Bz 100 µg/mL - 3 | 103.60 | 90.2 |



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

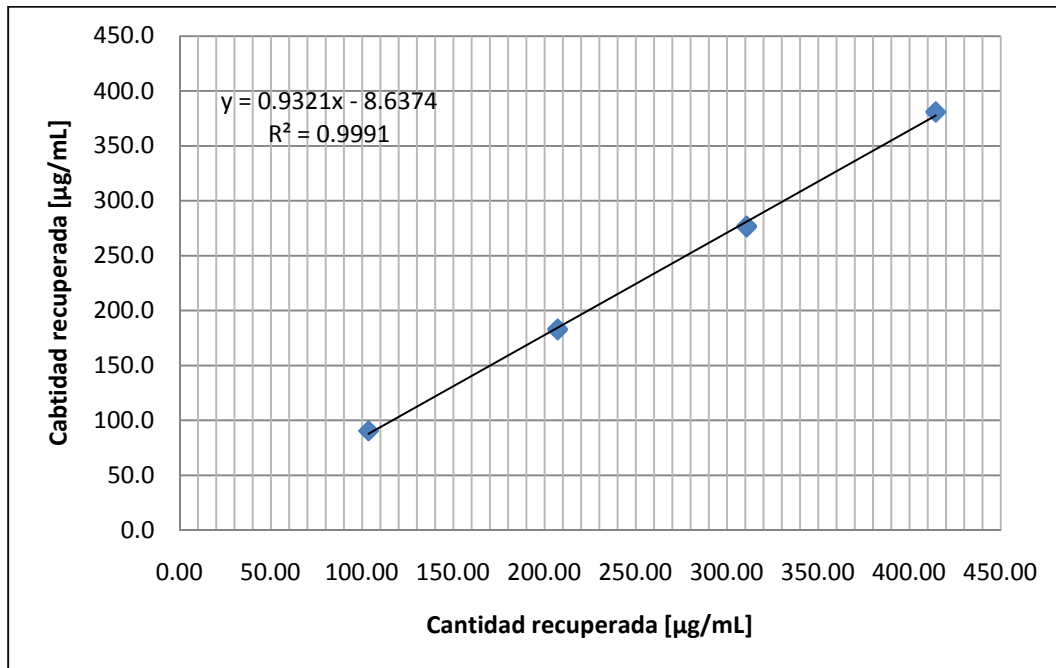


Gráfico 5: Gráfica de linealidad del método para el benzaldehído.

Los parámetros determinados en la curva de regresión ajustada para el ácido clorogénico se muestran en la Tabla 24, mientras que para el benzaldehído se resumen en la Tabla 25.

Tabla 24. Parámetros estadísticos calculados para el modelo de linealidad del método (ácido clorogénico).

| Estadístico | Resultado |
|--|--------------------|
| b_0 | 12.5590 |
| b_1 | 0.9467 |
| r | 0.9983 |
| r^2 | 0.9967 |
| IC (β_1) ($t_{0,975, 10}=2.228$) | 0.6069-1.2865 |
| IC (β_0) | -145.9211-171.0391 |

| <i>Estadísticas de la regresión</i> | |
|---|------------|
| Coefficiente de correlación (r) | 0.9983 |
| Coefficiente de determinación (r^2) | 0.9967 |
| r^2 ajustado | 0.99636373 |
| Error típico | 15.5179367 |
| Observaciones | 12 |



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Tabla 25. Parámetros estadísticos calculados para el modelo de linealidad del método (benzaldehído).

| Estadístico | Resultado |
|--|-------------------|
| b_0 | -8.6374 |
| b_1 | 0.9321 |
| r | 0.9996 |
| r^2 | 0.9991 |
| IC (β_1) ($t_{0,975, 10}=2.228$) | 0.4758-1.4176 |
| IC (β_0) | 121.0509-146.1689 |

| Estadísticas de la regresión | |
|---|------------|
| Coefficiente de correlación (r) | 0.99956815 |
| Coefficiente de determinación (r^2) | 0.99913648 |
| r^2 ajustado | 0.99905013 |
| Error típico | 3.47645413 |
| Observaciones | 12 |

De acuerdo con los resultados indicados en la Tabla 20 los porcentajes de recobro para el ácido clorogénico se encuentran dentro de los límites establecidos por las guías Q2A y Q2B de la *International Conference on Harmonisation (ICH)* para métodos cromatográficos (98-102%). El intervalo de confianza calculado para la pendiente y la ordenada al origen indican que incluyen la unidad y el cero, respectivamente.

Por otro lado, los porcentajes de recobro calculados para el benzaldehído (Tabla 22), revelan que el método analítico no es exacto para cuantificarlo en la infusión de trabajo. Una de las principales causas de esta variabilidad en la respuestas obtenidas es la volatilidad del producto, dificultando por tanto su manipulación durante las condiciones experimentales (el benzaldehído comienza a evaporarse a los 20°C).

Con respecto a los resultados mostrados en las Tablas 24 y 25 es importante mencionar que el método es lineal dentro del rango de concentraciones analizadas para el ácido clorogénico y para el benzaldehído. La pendiente calculada es diferente de cero y los coeficientes de determinación indican que el 99,8% y el 99,9% de los datos, respectivamente, se encuentran explicados por un modelo de regresión lineal.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Una vez más se realizó el análisis de varianza para evaluar el modelo de regresión. Los resultados derivados de estos análisis se resumen en las Tablas 26 y 27. Así, el ANDEVA para $n=12$ y $\alpha= 0,05\%$ permite calcular un valor para la distribución ($F_{0,05, 1, 12}$) de 3015.0739 y de 11570.5178 para el benzaldehído. Dichos valores son mayores que el valor crítico de $F_{0,05, 1, 12}=4,75$ (Anexo B). Por lo tanto, el modelo estadístico generado es adecuado.

Tabla 26. Análisis de varianza de la regresión lineal simple para linealidad del método del ácido clorogénico ($n=12$, $\alpha= 0,05$, $F_{0,05, 1, 12}=4,75$).

ANÁLISIS DE VARIANZA

| | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Promedio de los cuadrados | F | Valor crítico de F |
|-----------|--------------------|-------------------|---------------------------|-----------|--------------------|
| Regresión | 1 | 726048.991 | 726048.991 | 3015.0739 | 9.7279E-14 |
| Residuos | 10 | 2408.0636 | 240.80636 | | |
| Total | 11 | 728457.055 | | | |

| | Coeficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad | Inferior 95% | Superior 95% | Inferior 95.0% | Superior 95.0% |
|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|----------------|----------------|
| Intercepción | 12.5590329 | 8.29583255 | 1.51389663 | 0.16099823 | -5.92523381 | 31.0432997 | -5.92523381 | 31.0432997 |
| Variable X 1 | 0.94669583 | 0.01724096 | 54.9096893 | 9.7279E-14 | 0.90828058 | 0.98511109 | 0.90828058 | 0.98511109 |

Tabla 27. Análisis de varianza de la regresión lineal simple para linealidad del método del benzaldehído ($n=12$, $\alpha= 0,05$, $F_{0,05, 1, 12}=4,75$).

ANÁLISIS DE VARIANZA

| | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Promedio de los cuadrados | F | Valor crítico de F |
|-----------|--------------------|-------------------|---------------------------|------------|--------------------|
| Regresión | 1 | 139838.193 | 139838.193 | 11570.5178 | 1.182E-16 |
| Residuos | 10 | 120.857333 | 12.0857333 | | |
| Total | 11 | 139959.05 | | | |

| | Coeficientes | Error típico | Estadístico t | Probabilidad | Inferior 95% | Superior 95% | Inferior 95.0% | Superior 95.0% |
|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|----------------|----------------|
| Intercepción | -8.63333333 | 2.45822429 | -3.51202019 | 0.00561269 | -14.1105984 | -3.15606831 | -14.1105984 | -3.15606831 |
| Variable X 1 | 0.93198198 | 0.00866425 | 107.566341 | 1.182E-16 | 0.91267682 | 0.95128714 | 0.91267682 | 0.95128714 |



5.1.1 PRECISIÓN.

La precisión se define como el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales. Para determinar la precisión del método analítico se realizaron diferentes experimentos conducentes a evaluar la precisión del sistema (repetibilidad), la precisión del método y la precisión intermedia (reproducibilidad). En la Figura 22 se muestran ejemplos de los cromatogramas obtenidos para cada compuesto.

De manera general, estos resultados se expresan en términos de desviación estándar relativa (DER).

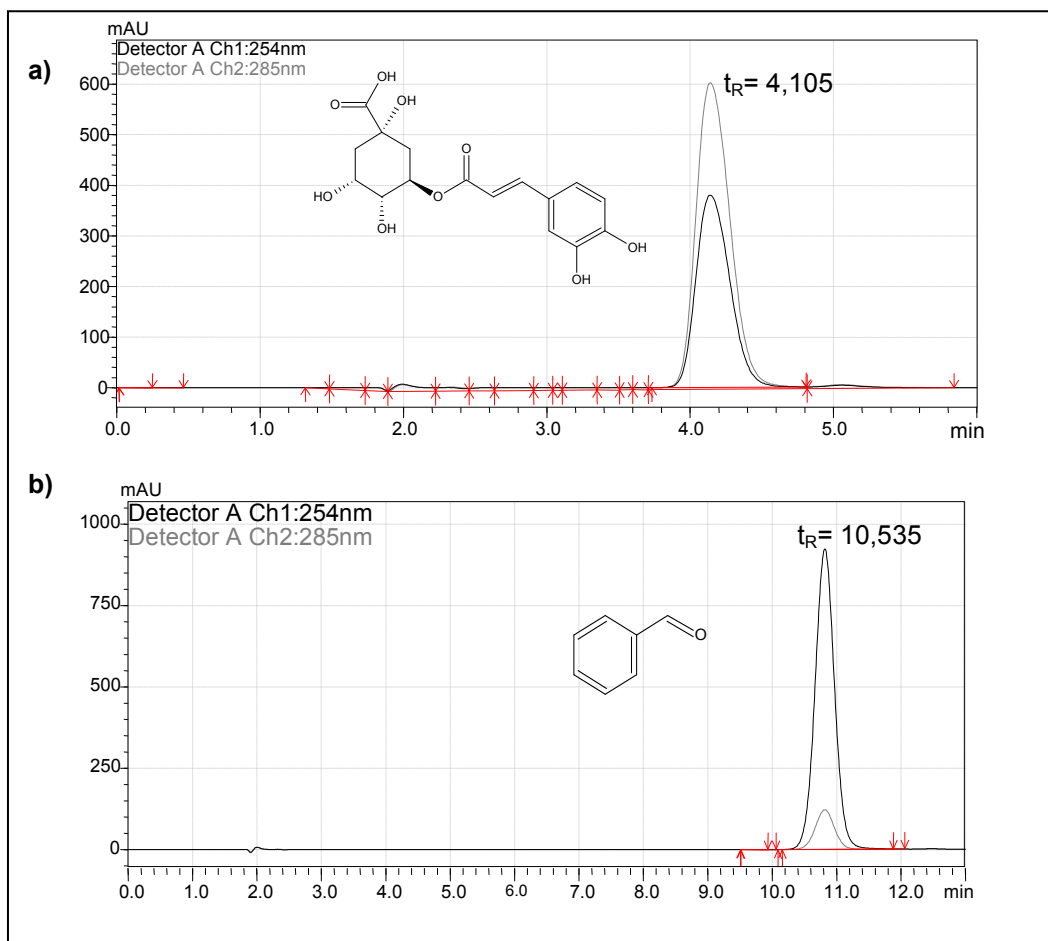


Figura 22. a) Cromatograma del estándar de ácido clorogénico 500 µg/mL, y b) Cromatograma del estándar de benzaldehído 300 µg/mL.



5.1.1.1 Precisión del sistema.

La precisión del sistema es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a una muestra. Los resultados de estas determinaciones se resumen en las Tablas 28 y 29.

Tabla 28. Datos experimentales para evaluar la precisión del sistema utilizando una solución de ácido clorogénico 500 µg/mL.

| Muestra | Área |
|--|-------------------|
| Ácido clorogénico 500 µg/mL 1.1 | 10629691.2 |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL 1.2 | 10470262.6 |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL 2.1 | 10401015.9 |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL 2.2 | 10691293.2 |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL 3.1 | 10491898.2 |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL 3.2 | 10460788.5 |
| Promedio (\bar{y}) | 10524158.3 |
| Desviación estándar (S) | 111531.619 |
| DER | 1.0597676 |



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Tabla 29. Datos experimentales para evaluar la precisión del sistema utilizando una solución de benzaldehído 300 µg/mL.

| Muestra | Área |
|----------------------------|------------|
| Benzaldehído 300 µg/mL 1.1 | 18977790.2 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 1.2 | 18879514.5 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 1.3 | 19066833.7 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 2.1 | 18722911.3 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 2.2 | 18857130.5 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 2.3 | 18590669.6 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 3.1 | 18842618.9 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 3.2 | 18734449.4 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 3.3 | 18978337.6 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 4.1 | 18553333.5 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 4.2 | 18856194.4 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 4.3 | 18282747.9 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 5.1 | 18859554.7 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 5.2 | 18921230.4 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 5.3 | 18881693.4 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 6.1 | 19357691.8 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 6.2 | 19177310.2 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 6.3 | 19801293.2 |
| \bar{y} | 18907850.3 |
| S | 325679.889 |
| DER | 0.01722459 |

Con base en los resultados obtenidos para ambos compuestos, la DER calculada para el ácido clorogénico es de 1,05%, mientras que para el benzaldehído fue de 0,02%, ambos resultados son menores que 2,0 % por lo tanto el sistema es reproducible.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



5.1.1.2 Precisión del método.

La precisión del método se evaluó mediante el análisis por sextuplicado de una solución que contenía 500 y 300 $\mu\text{g/mL}$ de ácido clorogénico y benzaldehído, respectivamente. Los resultados obtenidos para esta característica de calidad se resumen en la Tabla 30.

Tabla 30. Resultados obtenidos para evaluar la precisión del método conducente a cuantificar ácido clorogénico y benzaldehído.

| Muestra | Concentración de Ácido clorogénico [$\mu\text{g/mL}$] | Área | Muestra | Concentración de Benzaldehído [$\mu\text{g/mL}$] | Área |
|---------|---|-------------|---------|--|-------------|
| 1 | 500 | 10786615.3 | 1 | 300 | 20063600.1 |
| 2 | 500 | 10703631.3 | 2 | 300 | 19670991.6 |
| 3 | 500 | 10798920.1 | 3 | 300 | 19479883.0 |
| 4 | 500 | 10696885 | 4 | 300 | 19248086.1 |
| 5 | 500 | 10598482.6 | 5 | 300 | 19079152.6 |
| 6 | 500 | 10777371.9 | 6 | 300 | 19195511.4 |
| | \bar{y} | 10726984.4 | | \bar{y} | 10726984.4 |
| | S | 76463.7732 | | S | 76463.7732 |
| | DER | 0.712817047 | | DER | 0.712817047 |

De nueva cuenta, la DER para ambos compuestos es menor del 2 % consiguiendo el método analítico es preciso.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



5.1.1.3 Precisión intermedia.

Finalmente, la reproducibilidad del método se evaluó mediante el análisis por triplicado de una solución homogénea que contenía, por separado, 500 $\mu\text{g/mL}$ de ácido clorogénico y 300 $\mu\text{g/mL}$ de benzaldehído. El análisis se realizó por dos analistas en dos días diferentes. Los resultados obtenidos se resumen en las Tablas 31 y 32.

Tabla 31. Resultados obtenidos del ácido clorogénico para evaluar la precisión intermedia.

| Día | Analista | | DER Analista | |
|-----------|------------|------------|---------------------|------------|
| | 1 | 2 | 1 | 2 |
| | 1 | 6271158.3 | 6173204.8 | 0.17865399 |
| 6269823.3 | | 6165376.1 | | |
| 6251142.0 | | 6150034.9 | | |
| 2 | 6072854.9 | 6141725.7 | DER Analista | |
| | 6067278.2 | 6182684.8 | 1 | 2 |
| | 6073790.4 | 6064270 | 0.05799364 | 0.98110594 |
| | \bar{y} | 6156945.28 | | |
| | S | 77782.4851 | | |
| | DER | 1.26332916 | | |

Tabla 32. Resultados obtenidos del benzaldehído para evaluar la precisión intermedia.

| Día | Analista | | DER Analista | |
|------------|------------|------------|---------------------|------------|
| | 1 | 2 | 1 | 2 |
| | 1 | 18737287.9 | 18985227.7 | 0.56597453 |
| 18723140.9 | | 18943213.9 | | |
| 18914018.8 | | 18977704.0 | | |
| 2 | 18722309.4 | 18748316.9 | DER Analista | |
| | 18740180.5 | 18693924.6 | 1 | 2 |
| | 18744178.6 | 18739118.5 | 0.06215404 | 0.15546241 |
| | \bar{y} | 18805718.5 | | |
| | S | 112494.912 | | |
| | DER | 0.59819524 | | |

En todos los casos, la DER fue menor del 1,5% por lo tanto, se concluye que el método analítico propuesto es repetible y reproducible.



5.1.2 ROBUSTEZ.

La robustez de un método analítico es una medida del efecto de las variaciones pequeñas pero deliberadas de los parámetros de la metodología experimental. El objetivo de esta determinación es identificar las variables controlables que puedan contribuir a determinar cambios significativos.

En este marco de referencia las variables que se modificaron fueron: temperatura de la columna, proporción de la fase móvil, velocidad de flujo y longitud de onda de la detección. Con los resultados obtenidos se calculó la diferencia absoluta de la media aritmética entre la condición normal y la condición modificada para cada variable evaluada.

El criterio de aceptación indica que la diferencia absoluta debe ser menor o igual al 2% ($|di| \leq 2\%$). Los resultados obtenidos para este parámetro así como los cálculos estadísticos realizados se resumen en las Tablas 33 y 34 y en las Figuras 23-33 para el ácido clorogénico, y en las Tablas 35 y 36 y en las Figuras 34-44 para el benzaldehído.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Tabla 33. Resultados obtenidos para el ácido clorogénico en robustez del método.

| Muestra | t _R | Área | |
|---|----------------|-----------|--|
| Ácido clorogénico 500 µg/mL -1 | 4.392 | 6378056.4 | Parámetros de adecuabilidad del sistema \bar{y} = 6286703.0833 S=2400.2688 DER=1.15 |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL -2 | 4.397 | 6381974.1 | |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL -3 | 4.404 | 6232719.8 | |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL -4 | 4.394 | 6244724.5 | |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL -5 | 4.385 | 6240754.7 | |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL -6 | 4.371 | 6241989.0 | |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL 259nm-1 | 4.089 | 4579955.1 | |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL 259nm-2 | 4.082 | 4546409.6 | |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL 249nm-1 | 4.056 | 8237074.6 | |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL 249nm-2 | 4.062 | 8214827.9 | |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL 5µL-1 | 4.079 | 3244300.9 | |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL 5µL-2 | 4.071 | 3239549.8 | |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL 15µL-1 | 3.999 | 9273767.3 | |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL 15µL-2 | 3.984 | 9240212.6 | |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL 1.5mL-1 | 4.400 | 6176790.9 | |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL 1.5mL-2 | 4.402 | 6187350.1 | |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL 0.5mL-1 | 4.091 | 6344449.1 | |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL 0.5mL-2 | 4.058 | 6343930.6 | |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL 30:70 (MeOH:Buffer)-1 | 5.674 | 5249958.9 | |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL 30:70 (MeOH:Buffer)-2 | 5.614 | 5779542.7 | |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL 40:60 (MeOH:Buffer)-1 | 3.210 | 6398432.8 | |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL 40:60 (MeOH:Buffer)-2 | 3.196 | 6356453.3 | |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL 45°C-1 | 3.970 | 8143105.0 | |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL 45°C-2 | 3.922 | 7967996.8 | |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL 35°C-1 | 3.971 | 8121569.0 | |
| Ácido clorogénico 500 µg/mL 35°C-2 | 4.233 | 8108209.0 | |



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Tabla 34. Diferencia absoluta entre los valores de las condiciones de operación modificada y normal para el ácido clorogénico.

| Condición | \bar{y}_i | \bar{y}_0 | $ d_i = \bar{y}_i - \bar{y}_0 $ |
|--|-------------|--------------|-----------------------------------|
| Media aritmética de la condición normal de operación | | 6242489.4000 | |
| Media aritmética de 259 nm | 4563182.35 | - | 1679307.0500 |
| Media aritmética de 249 nm | 8225951.25 | - | 1983461.8500 |
| Media aritmética de 5 μ L inyección | 9256989.95 | - | 3014500.5500 |
| Media aritmética de 15 μ L inyección | 3241925.35 | - | 3000564.0500 |
| Media aritmética de 1.5 mL flujo | 6182070.5 | - | 60418.9000 |
| Media aritmética de 0.5 mL flujo | 6344189.85 | - | 101700.4500 |
| Media aritmética de proporción (30:70) MeOH-Buffer | 5514750.8 | - | 727738.6000 |
| Media aritmética de proporción (40:60) MeOH-Buffer | 6377443.05 | - | 134953.6500 |
| Media aritmética a 45°C | 8055550.9 | - | 1813061.5000 |
| Media aritmética a 35°C | 8114889.0 | - | 1872399.6000 |

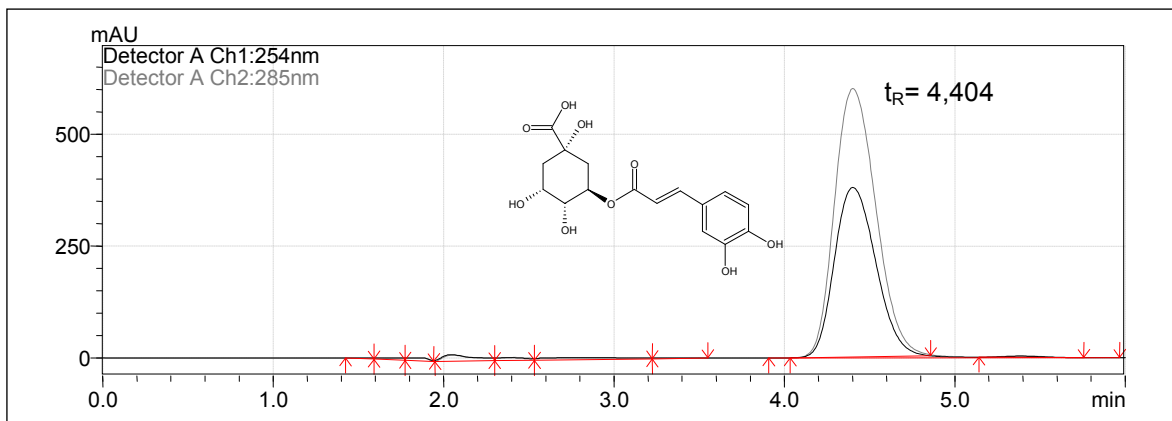


Figura 23. Cromatograma del ácido clorogénico (500 μ g/mL) en condiciones normales de operación ($\lambda=254$ nm; velocidad de flujo= 1 mL/min; temperatura=25°C; fase móvil MeOH:Buffer (35:65) y 10 μ L de volumen de inyección).

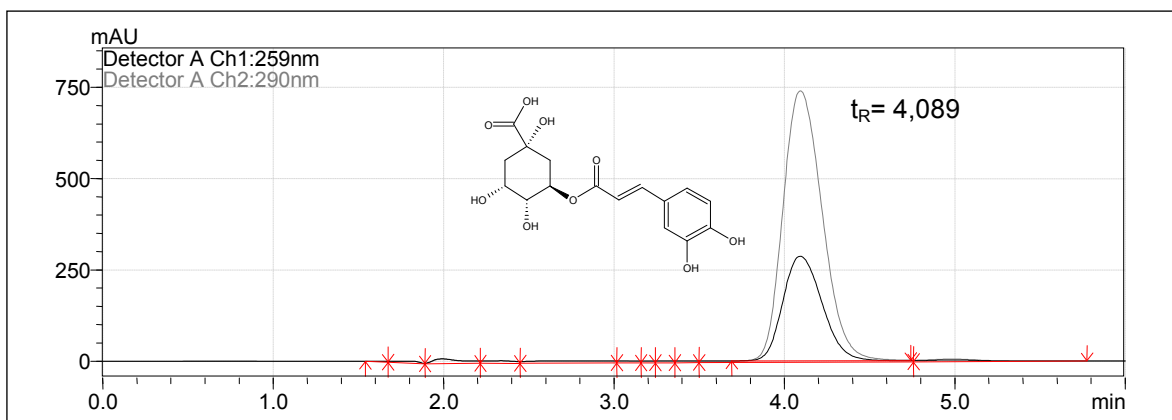


Figura 24. Cromatograma del ácido clorogénico (500 μ g/mL) utilizando 259 nm como longitud de onda de detección.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

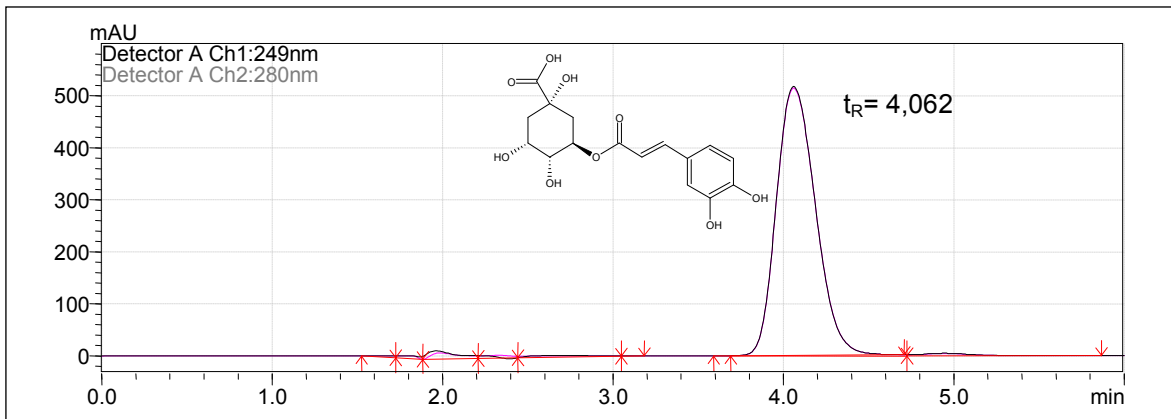


Figura 25. Cromatograma del ácido clorogénico (500 µg/mL) utilizando 249 nm como longitud de onda de detección.

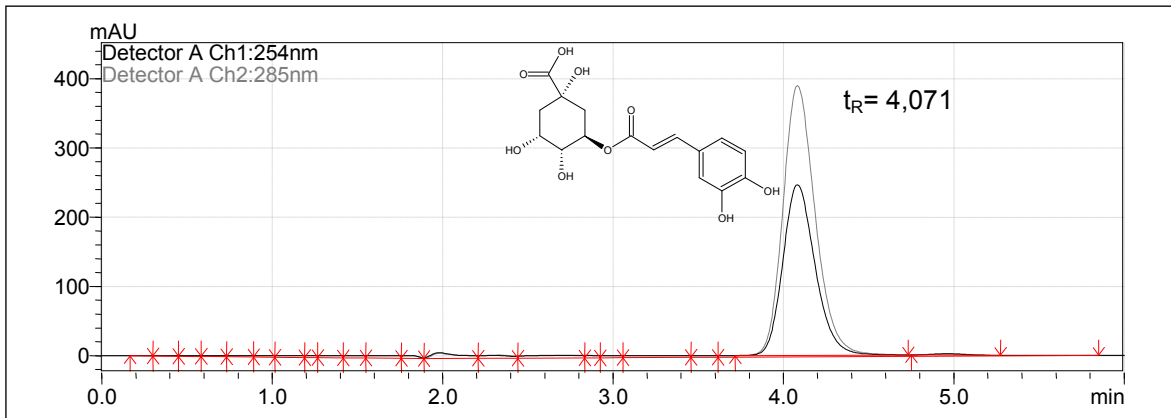


Figura 26. Cromatograma del ácido clorogénico (500 µg/mL) utilizando 5 µL de volumen de inyección.

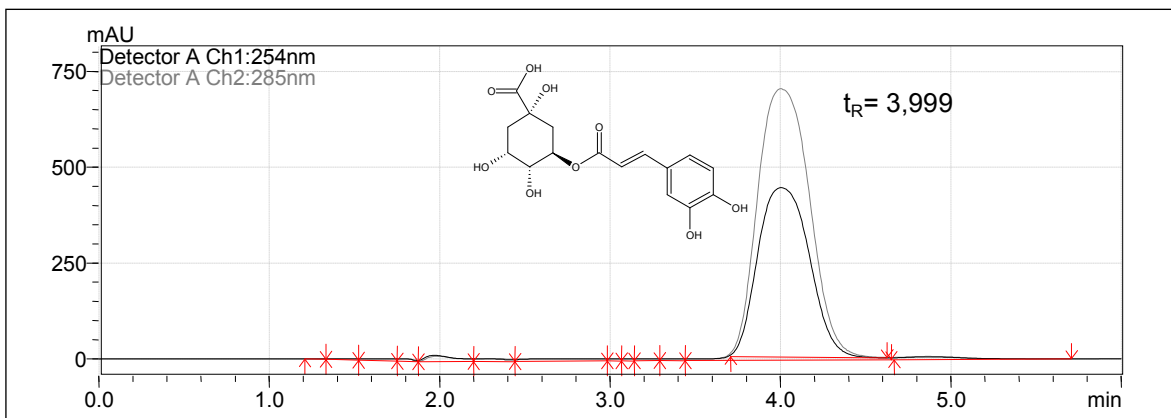


Figura 27. Cromatograma del ácido clorogénico (500 µg/mL) utilizando 15 µL de volumen de inyección.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

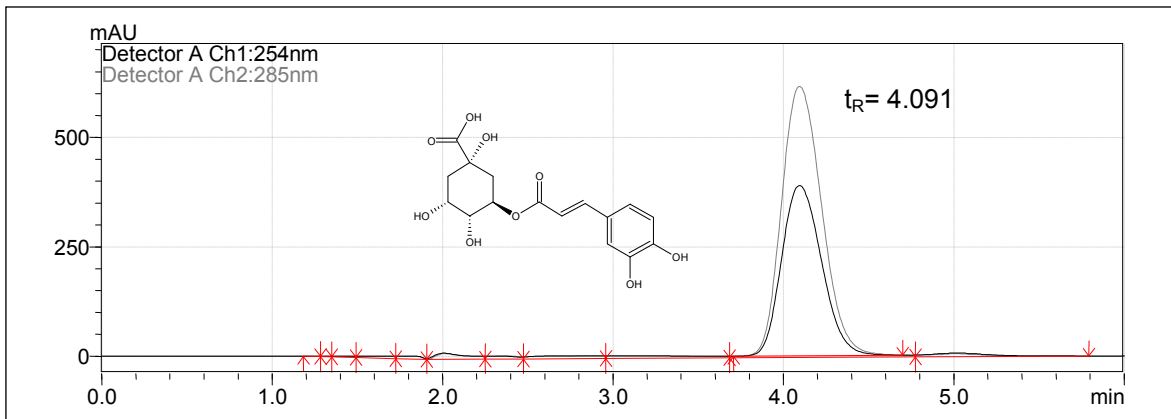


Figura 28. Cromatograma del ácido clorogénico (500 µg/mL) utilizando una velocidad de flujo de 1,5 mL/min.

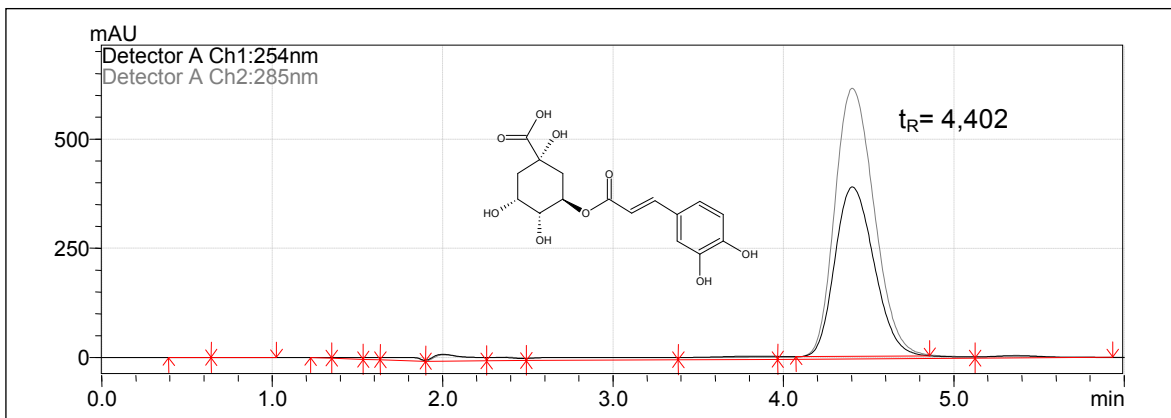


Figura 29. Cromatograma del ácido clorogénico (500 µg/mL) utilizando una velocidad de 0,5 mL/min.

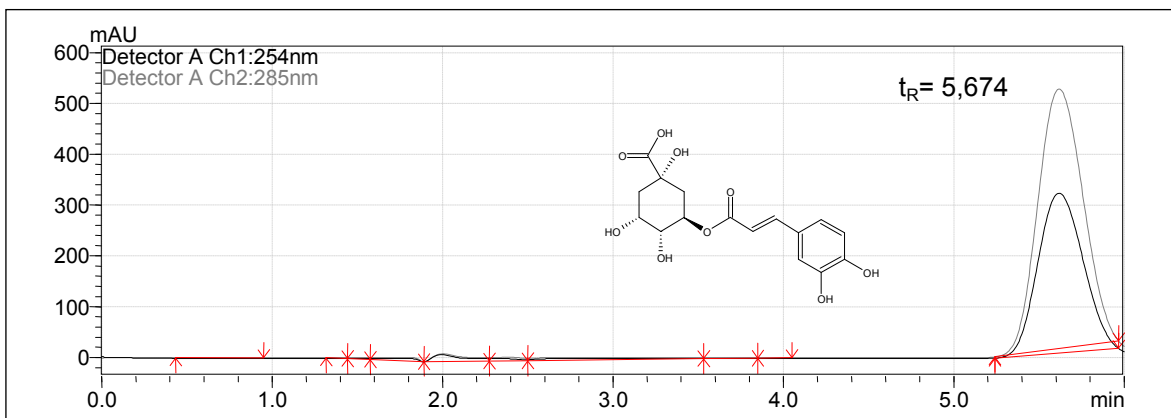


Figura 30. Cromatograma del ácido clorogénico (500 µg/mL) utilizando una fase móvil compuesta por MeOH:Buffer en una proporción 30:70.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

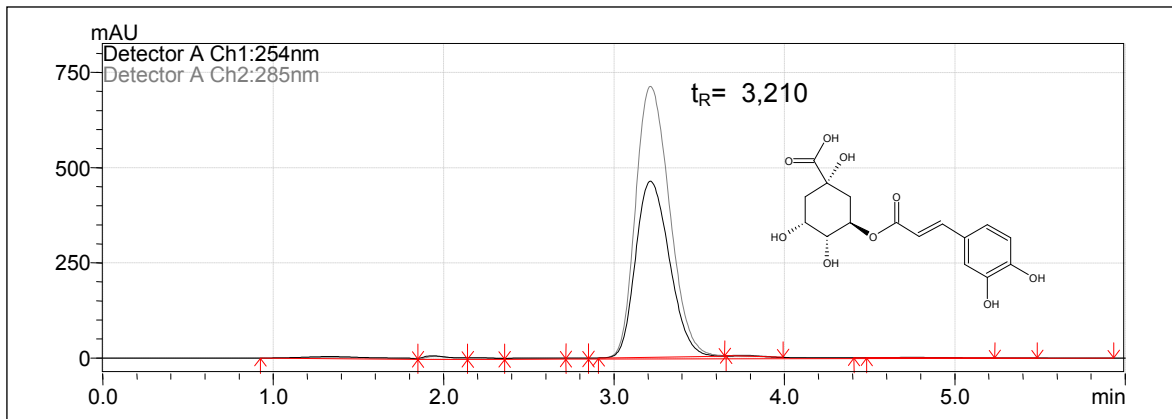


Figura 31. Cromatograma del ácido clorogénico (500 µg/mL) utilizando una fase móvil compuesta por MeOH:Buffer en una proporción 40:60.

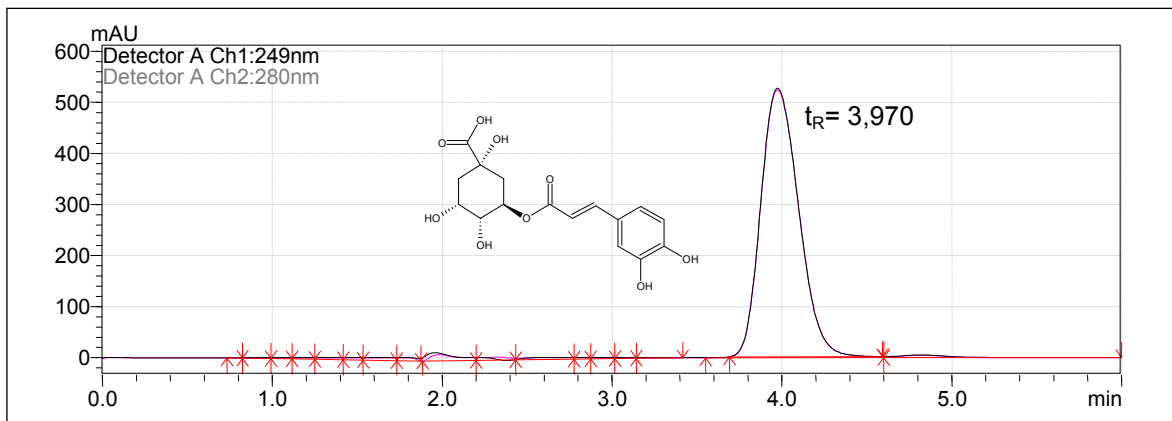


Figura 32. Cromatograma del ácido clorogénico (500 µg/mL) utilizando una temperatura de la columna de 45°C.

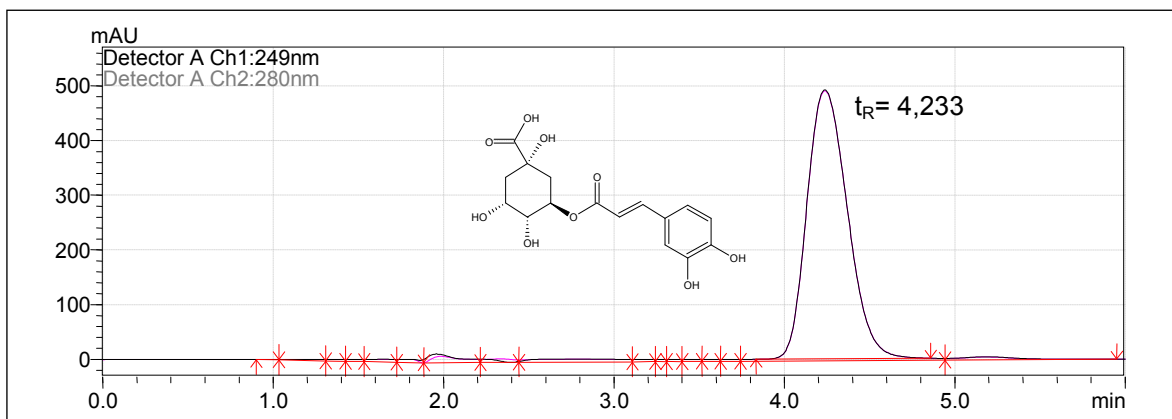


Figura 33. Cromatograma del ácido clorogénico (500 µg/mL) utilizando una temperatura de la columna de 35°C.

En las Tablas 35 y 36 se muestran los resultados obtenidos para el benzaldehído (Figuras 34-44).



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Tabla 35. Resultados obtenidos para el benzaldehído en robustez del método.

| Muestra | t _R | Área |
|--|----------------|------------|
| Benzaldehído 300 µg/mL-1 | 10.186 | 17477692.6 |
| Benzaldehído 300 µg/mL-2 | 10.313 | 17285827.3 |
| Benzaldehído 300 µg/mL-3 | 10.468 | 17326840.7 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 259nm-1 | 10.688 | 12084028.4 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 259nm-2 | 10.899 | 12213206.9 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 259nm-3 | 10.981 | 12222646.7 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 249nm-1 | 11.014 | 20027682.4 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 249nm-2 | 10.997 | 19830564.2 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 249nm-3 | 11.005 | 19925826.4 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 5µL-1 | 11.001 | 9191892.9 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 5µL-2 | 11.003 | 9110773.5 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 5µL-3 | 11.008 | 9037843.0 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 15µL-1 | 10.983 | 26371362.4 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 15µL-2 | 10.972 | 26147838.2 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 15µL-3 | 10.972 | 26361812.2 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 1.5mL-1 | 10.087 | 17254122.9 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 1.5mL-2 | 10.283 | 17377307.4 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 1.5mL-3 | 10.384 | 17537979.3 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 0.5mL-1 | 9.595 | 17281476.9 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 0.5mL-2 | 9.658 | 17256260.8 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 0.5mL-3 | 9.668 | 17212004.2 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 30:70 (MeOH:Buffer)-1 | 13.501 | 17380289.7 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 30:70 (MeOH:Buffer)-2 | 13.547 | 17580651.6 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 30:70 (MeOH:Buffer)-3 | 13.604 | 17713966.9 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 40:60 (MeOH:Buffer)-1 | 8.612 | 17190918.8 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 40:60 (MeOH:Buffer)-2 | 8.586 | 17476402.0 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 40:60 (MeOH:Buffer)-3 | 8.489 | 17685260.5 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 45°C-1 | 10.256 | 17785227.0 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 45°C-2 | 10.272 | 17890761.2 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 45°C-3 | 10.243 | 17792646.8 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 35°C-1 | 10.683 | 17406559.7 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 35°C-2 | 10.870 | 17483191.3 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 35°C-3 | 10.906 | 17364999.6 |
| Benzaldehído 300 µg/mL 35°C-4 | 10.906 | 17437468.3 |



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Tabla 36. Diferencia absoluta entre los valores de las condiciones de operación modificada y normal para el benzaldehído.

| Condición | y_i | y_0 | $d_i = y_i - y_0 $ | Concentración de cada muestra |
|--|---------------|---------------|---------------------|-------------------------------|
| Media aritmética de la condición normal de operación | - | 17363453.5333 | | 266.7235608 |
| Media aritmética de 259 nm | 12173294.0000 | - | 5190159.5333 | 182.8313479 |
| Media aritmética de 249 nm | 19928024.3333 | - | 2564570.8000 | 308.1765292 |
| Media aritmética de 5 μ L inyección | 9113503.1333 | - | 8249950.4000 | 133.3737879 |
| Media aritmética de 15 μ L inyección | 26293670.9333 | - | 8930217.4000 | 411.0689695 |
| Media aritmética de 1.5 mL flujo | 17389803.2000 | - | 26349.6667 | 267.149469 |
| Media aritmética de 0.5 mL flujo | 17249913.9667 | - | 113539.5667 | 264.8883406 |
| Media aritmética de proporción (30:70) MeOH-Buffer | 17558302.7333 | - | 194849.2000 | 269.8730459 |
| Media aritmética de proporción (40:60) MeOH-Buffer | 17450860.4333 | - | 87406.9000 | 268.1363802 |
| Media aritmética a 45°C | 17822878.3333 | - | 459424.8000 | 274.1495682 |
| Media aritmética a 35°C | 17442406.43 | - | 78952.9000 | 267.9997322 |

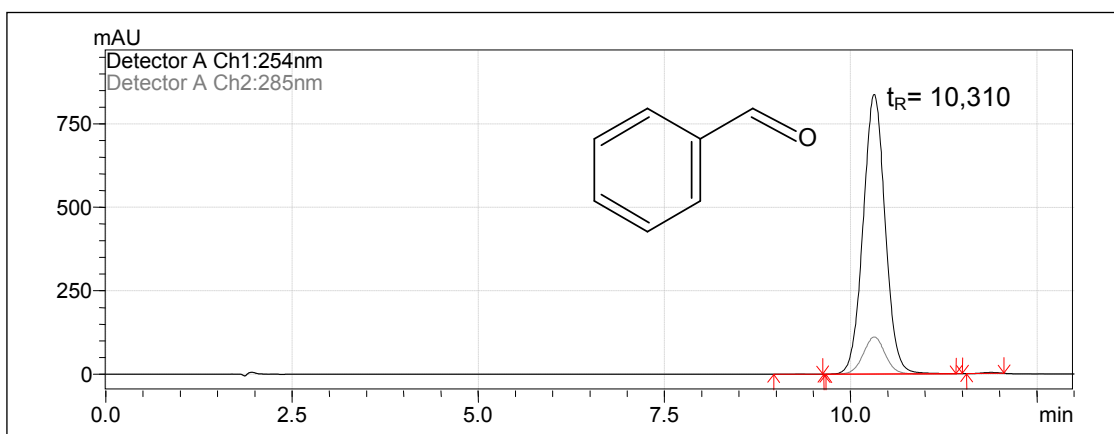


Figura 34. Cromatograma del benzaldehído (300 μ g/mL) en condiciones normales de operación (λ =254 nm; velocidad de flujo= 1 mL/min; temperatura=25°C; fase móvil MeOH:Buffer (35:65) y 10 μ L de volumen de inyección).

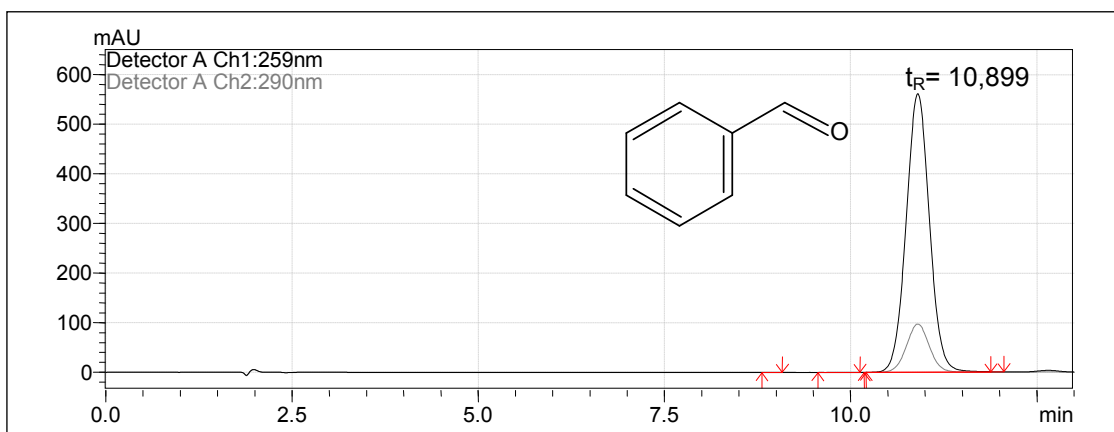


Figura 35. Cromatograma del benzaldehído (300 μ g/mL) utilizando 259nm como longitud de onda de detección.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

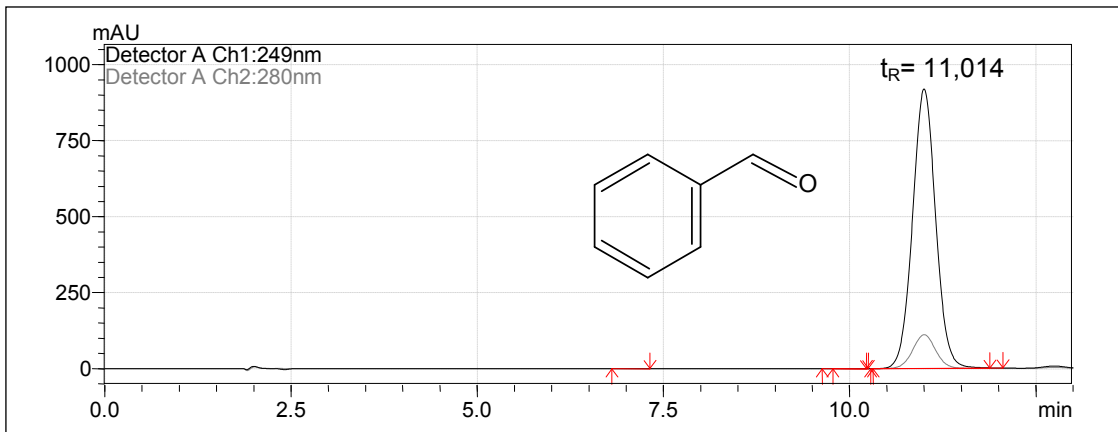


Figura 36. Cromatograma del benzaldehído (300 µg/mL) utilizando 249nm como longitud de onda de detección.

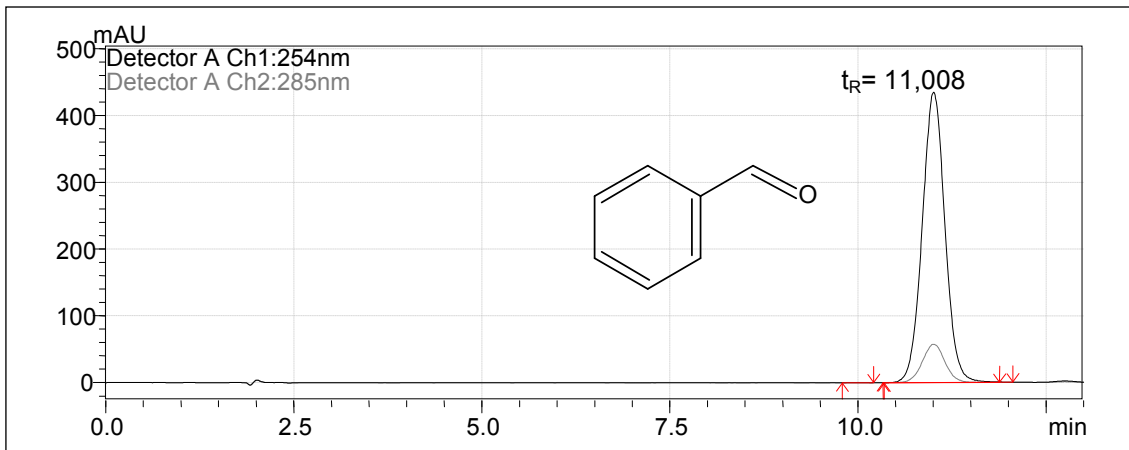


Figura 37. Cromatograma del benzaldehído (300 µg/mL) utilizando 5 µL de volumen de inyección.

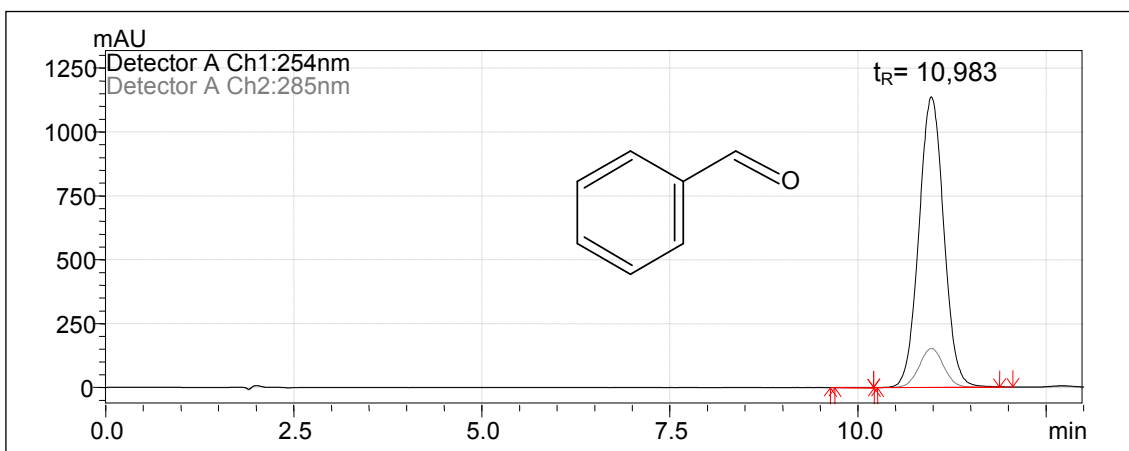


Figura 38. Cromatograma del benzaldehído (300 µg/mL) utilizando 15 µL de volumen de inyección.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

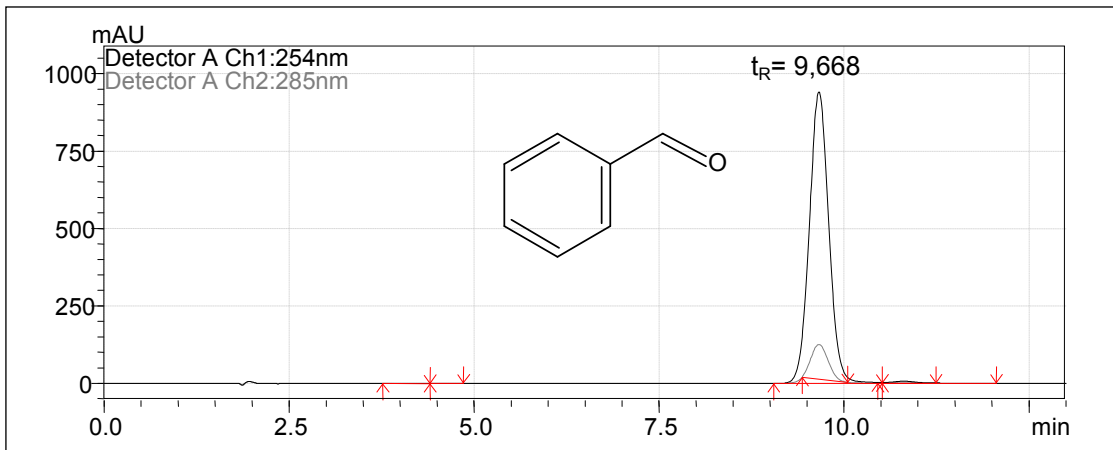


Figura 39. Cromatograma del benzaldehído (300 µg/mL) utilizando una velocidad de flujo de 1,5 mL/min.

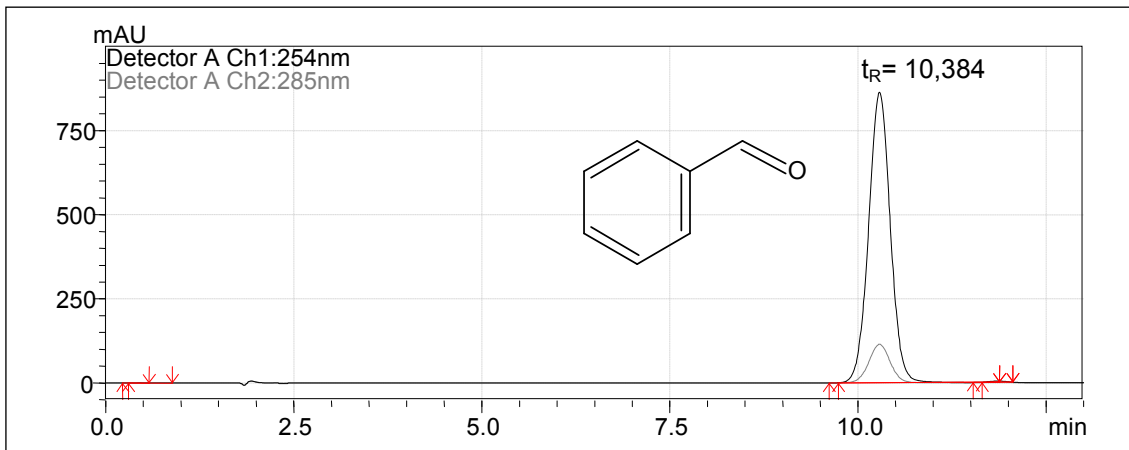


Figura 40. Cromatograma del benzaldehído (300 µg/mL) utilizando una velocidad de 0,5 mL/min.

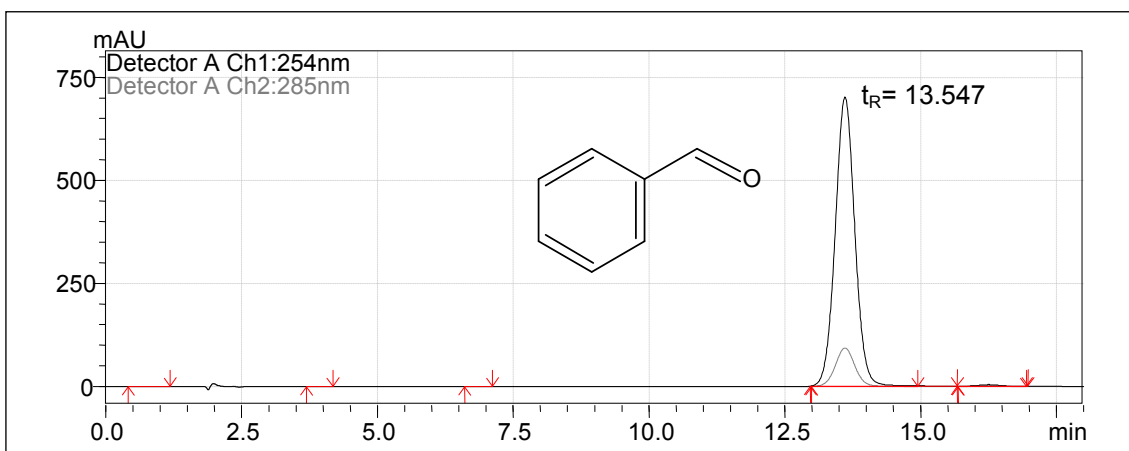


Figura 41. Cromatograma del benzaldehído (300 µg/mL) utilizando una fase móvil compuesta por MeOH:Buffer en una proporción 30:70.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

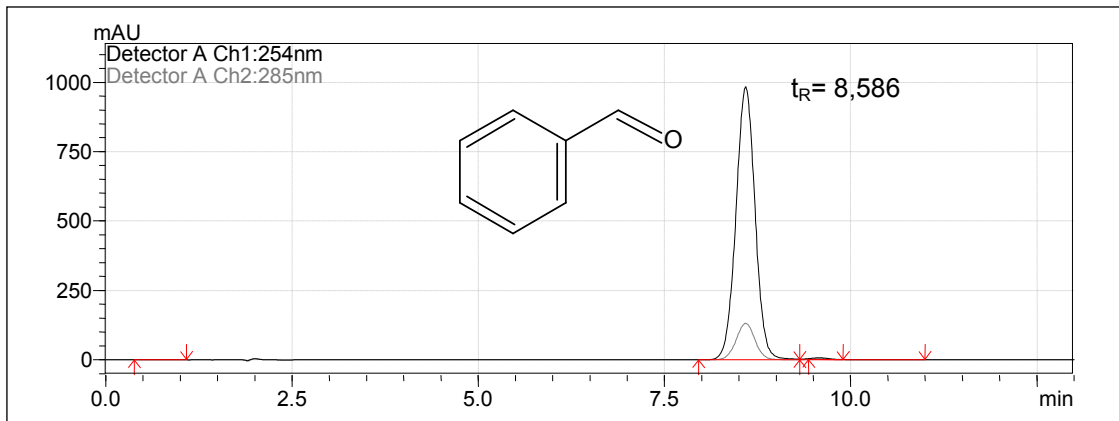


Figura 42. Cromatograma del benzaldehído (300 $\mu\text{g/mL}$) utilizando una fase móvil compuesta por MeOH:Buffer en una proporción 40:60.

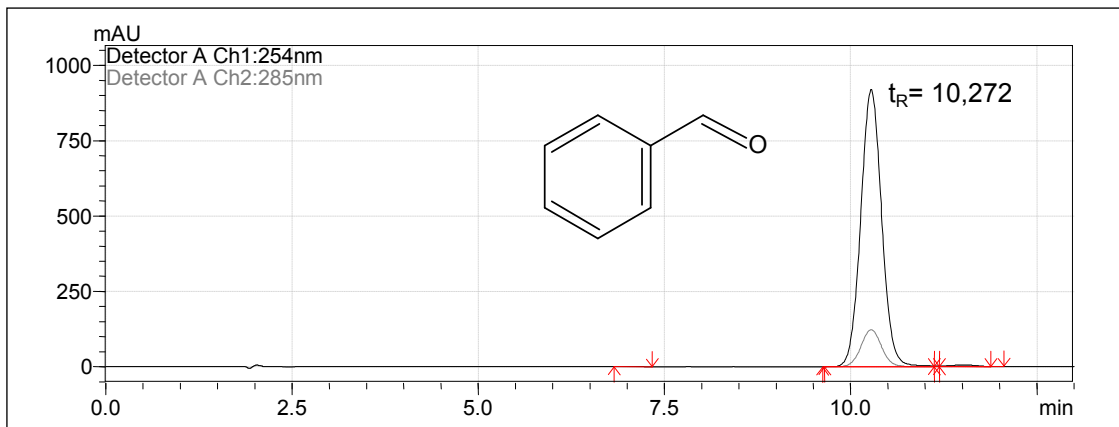


Figura 43. Cromatograma del benzaldehído (300 $\mu\text{g/mL}$) utilizando una temperatura de la columna de 45°C.

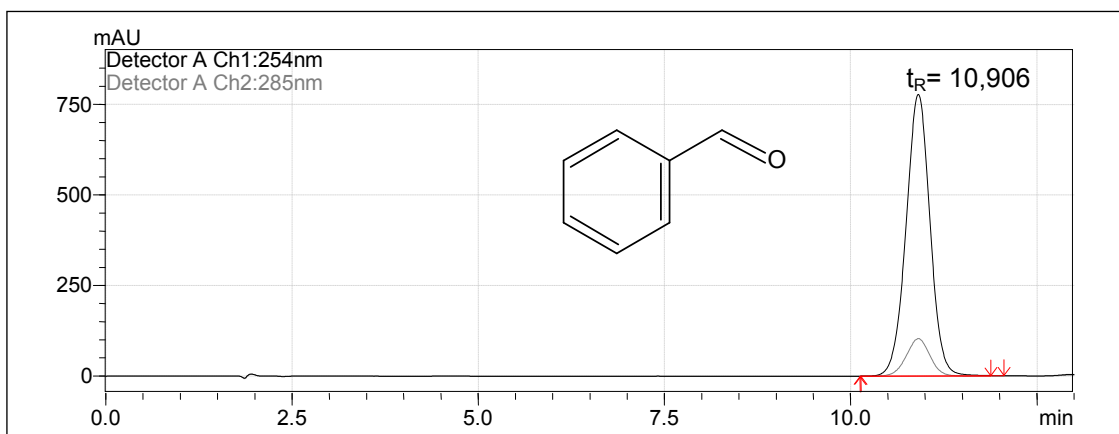


Figura 44. Cromatograma del benzaldehído (300 $\mu\text{g/mL}$) utilizando una temperatura de la columna de 35°C.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Respecto a los resultados obtenidos tanto para el ácido clorogénico como para el benzaldehído, ninguno de ellos cumple con el criterio de aceptación, por lo tanto, el método analítico no es robusto cuando se modifican las condiciones normales de operación.

Una vez validado el método analítico, se analizaron las concentraciones de los metabolitos presentes en la infusión, los resultados se resumen en la Tabla 37.

Tabla 37. Áreas de los tres componentes presentes en la infusión de *Prunus serotina*.

| Ácido clorogénico | | | | Benzaldehído | | | Hiperósido | | |
|-------------------|-----------|-----------|------------------------|--------------|-------------|------------------------|------------|-----------|------------------------|
| | t_R | Área | C [$\mu\text{g/mL}$] | t_R | Área | C [$\mu\text{g/mL}$] | t_R | Área | C [$\mu\text{g/mL}$] |
| 1 | 4.293 | 5874188.4 | 500.5136 | 11.973 | 8176294.2 | 114.1154 | 24.916 | 4421286.3 | 166.8965 |
| 2 | 4.224 | 5655192.1 | 480.8339 | 11.940 | 7630311.0 | 105.5971 | 24.650 | 4966731.8 | 188.3319 |
| 3 | 4.202 | 5825850.8 | 496.1698 | 11.886 | 7928975.1 | 110.2568 | 24.322 | 5572731.6 | 212.1470 |
| 4 | 4.210 | 5608325.8 | 476.6223 | 11.889 | 7680776.6 | 106.3844 | 24.292 | 5304695.9 | 201.6135 |
| 5 | 4.207 | 5885124.5 | 501.4964 | 11.883 | 8133478.6 | 113.4474 | 24.305 | 5708933.6 | 217.4996 |
| 6 | 4.278 | 5638713.5 | 479.3530 | 12.075 | 7982858.8 | 111.0975 | 24.949 | 5380198.2 | 204.5806 |
| 7 | 4.251 | 5131847.4 | 433.8043 | 11.959 | 7683321.1 | 106.4241 | 24.308 | 4298024.7 | 162.0524 |
| 8 | 4.549 | 5136618.6 | 434.2331 | 12.779 | 7884678.2 | 109.5657 | 27.436 | 3590116.8 | 134.2324 |
| 9 | 4.367 | 5447539.3 | 462.1735 | 12.418 | 7969165.1 | 110.8838 | 25.876 | 3590966.9 | 134.2658 |
| 10 | 4.297 | 5241023.4 | 443.6152 | 11.908 | 8845400.8 | 124.5547 | 24.963 | 3476842.7 | 129.7809 |
| 11 | 4.247 | 5175036.2 | 437.6854 | 11.778 | 8708333.4 | 122.4162 | 24.571 | 3402186.5 | 126.8470 |
| 12 | 4.145 | 5144419.2 | 434.9341 | 11.525 | 8508134.9 | 119.2927 | 23.452 | 3352887.1 | 124.9095 |
| 13 | 4.288 | 5256088.7 | 444.9691 | 12.237 | 9580194.6 | 136.0188 | 24.762 | 3501980.4 | 130.7687 |
| 14 | 4.053 | 6363623.4 | 544.4959 | 11.649 | 9438763.1 | 133.8122 | 22.221 | 5405453.1 | 205.5731 |
| 15 | 4.072 | 6331843.9 | 541.6401 | 11.687 | 9506575.6 | 134.8702 | 22.243 | 4568285.7 | 172.6734 |
| 16 | 4.052 | 6052280.0 | 516.5175 | 11.627 | 9049976.2 | 127.7465 | 22.261 | 4348586.8 | 164.0394 |
| 17 | 3.560 | 5365862.4 | 454.8337 | 10.242 | 9552796.0 | 135.5914 | 14.904 | 6767531.3 | 259.1013 |
| 18 | 4.222 | 5925480.9 | 505.1229 | 11.950 | 8134608.4 | 113.4650 | 24.077 | 5630521.1 | 214.4181 |
| 19 | 4.254 | 5925480.9 | 505.1229 | 12.163 | 8204503.2 | 114.5555 | 24.786 | 5632784.1 | 214.5070 |
| 20 | 3.910 | 5925440.0 | 505.1192 | 10.718 | 8282063.2 | 115.7656 | 15.106 | 7525658.1 | 288.8949 |
| 21 | 3.605 | 5902306.1 | 503.0404 | 10.566 | 8515314.9 | 119.4048 | 14.664 | 7527644.9 | 288.9730 |
| | \bar{y} | 481.0617 | | \bar{y} | 118.3 | | \bar{y} | 187.7193 | |
| | S | 34.9302 | | S | 10.13097603 | | S | 50.5683 | |
| | DER | 7.2611 | | DER | 8.5605 | | DER | 26.9382 | |

Esos resultados se encuentran expresados en μg y representan el promedio de 21 replicas.



En síntesis, las concentraciones promedio encontradas en las diferentes infusiones preparadas con las hojas de capulín son: 481.1 $\mu\text{g/mL}$ para el ácido clorogénico, 118,3 $\mu\text{g/mL}$ para el benzaldehído y 187.7 $\mu\text{g/mL}$ para el hiperósido.

5.2 COMPUESTOS OBTENIDOS POR MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME).

La microextracción en fase sólida (solid-phase microextraction SPME), es una técnica relativamente nueva que ofrece diversas ventajas en los análisis cromatográficos cualitativos y cuantitativos de los analitos inmersos en matrices complejas, ya sean sólidas, líquidas o gaseosas. La SPME consta de dos etapas: a) la adsorción de los compuestos presentes en la matriz en una capa gruesa de silicón o algún otro material adsorbente y, b) la transferencia de los analitos a un sistema cromatográfico ya sea de líquidos o de gases (Hinshaw, 2003).

La SPME ha tenido diversas aplicaciones entre las que destacan el análisis de las esencias florales, los agentes químicos tóxicos, las impurezas en productos farmacéuticos, los plaguicidas organoclorados en tés chinos, los compuestos volátiles en quesos, los componentes volátiles fenólicos en los vinos, los contaminantes ambientales en muestras de agua y las aminas alifáticas en el aire, entre otras (Hinshaw, 2003).

Esta innovadora técnica de análisis ofrece importantes ventajas como disminuir o eliminar el uso de disolventes, además de ser rápida, económica y versátil (Hinshaw, 2003; Vas y Vékey, 2004).

Mediante el empleo de esta técnica en las hojas frescas se identificaron los compuestos resumidos en la Tabla 38.



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Tabla 38. Compuestos detectados en las hojas del capulín.

| Pico | Nombre | R _{le} | R _{It} | Área % | Fórmula | Peso | Similitud | T _R (s) |
|------|------------------------|-----------------|-----------------|--------|-----------------------------------|------|-----------|--------------------|
| 1 | Benzaldehído | 976 | 985 | 61.433 | C ₇ H ₆ O | 106 | 984 | 179.597 |
| 2 | anisol | 1000 | 1004 | 4.9544 | C ₈ H ₁₀ O | 122 | 979 | 192.447 |
| 3 | 2,4-Octadieno | 1006 | | 3.2425 | C ₈ H ₁₄ | 110 | 825 | 194.897 |
| 4 | Octanal | 1008 | 1001 | 2.8459 | C ₈ H ₁₆ O | 128 | 979 | 196.247 |
| 5 | D-Limoneno | 1026 | 1028 | 6.3129 | C ₁₀ H ₁₆ | 136 | 909 | 204.597 |
| 6 | Bencen acetaldehído | 1047 | 1045 | 1.7415 | C ₈ H ₈ O | 120 | 901 | 214.647 |
| 7 | Nonanal | 1103 | 1096 | 6.6398 | C ₉ H ₁₈ O | 142 | 923 | 240.597 |
| 8 | Bencil propil ether | 1147 | | 12.83 | C ₁₁ H ₁₆ O | 164 | 873 | 261.697 |

Los resultados obtenidos mediante esta técnica se encuentran en armonía con los descritos por cromatografía de líquidos de alta resolución, Es decir, en ambas técnicas se determinó que el benzaldehído es uno de los componentes mayoritarios.

5.3 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Como se desprende de la Figura 45, se observa la presencia del ácido clorogénico en el extracto y en la infusión de las hojas del capulín.



Figura 45. Análisis cromatográfico cualitativo en capa fina de los componentes mayoritarios en la infusión de hojas de *Prunus serotina* (E=extracto, I=Infusión, AC=ácido clorogénico, H=hiperósido y B=benzaldehído).



VI. CONCLUSIONES.

- El método analítico desarrollado para evaluar el contenido del ácido clorogénico en la infusión de *Prunus serotina* es específico, lineal, exacto y preciso.
- Este método también es útil para cuantificar el benzaldehído presente en la infusión de trabajo. Sin embargo, debido a la naturaleza volátil del producto, el método solo demostró ser específico, lineal y preciso.
- La metodología analítica implementada en el presente trabajo de investigación es de utilidad para determinar los principios activos en la infusión elaborada con la planta. Por tanto, este método podría ser incorporado a la monografía farmacopeica de la especie *P. serotina*.
- La técnica de microextracción en fase sólida permitió demostrar que el benzaldehído es uno de los constituyentes mayoritarios en las hojas del capulín

VII. PERSPECTIVAS.

- Completar la validación de la metodología analítica para cuantificar al hiperósido como marcador químico de la especie.
- Demostrar con estudios de laboratorio que el método analítico propuesto es exacto para evaluar el benzaldehído.
- Aplicar el método analítico para cuantificar el ácido clorogénico y el hiperósido en diferentes lotes y preparados farmacéuticos elaborados con la especie.



VIII. REFERENCIAS.

1. Alberti-Manzanares, P. Los aportes de las mujeres rurales al conocimiento de plantas medicinales en México. Análisis de género *Agric. Soc. y Des.* 2006, pp. 139-153.
2. Albuquerque da Costa, D., Silva, D., Cavalcanti, A., Medeiros, M., Lima, J., Cavalcante, J., Silva, B., Agra, M., Souza, M. Chemical constituents from *Bakeridesia pickelii* Monteiro (Malvaceae) and the relaxant activity of kaempferol-3-O- β -D-(6"-E-p-coumaroyl) glucopyranoside on guinea-pig ileum. *Quim. Nova.* 2007, **30** (4), pp. 901-903.
3. Amico, V. Antiproliferative Terpenoids from Almond Hulls (*Prunus dulcis*): Identification and Structure-Activity Relationships. *J. Agric. Food Chem.* 2006, **54**, pp. 810-814.
4. Anales del Instituto Médico Nacional, Tomo III, 1897, Oficina Tipográfica de la Secretaría de Fomento, México.
5. Argueta, V., Cano, A. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista. México, DF. pp. 17-85.
6. Birdi, T. J., Brijesh S., Daswani, P. G. Approaches Towards The Preclinical Testing And Standardization Of Medicinal Plants; South Asian Regional Conference On Traditional Medicine Bangalore, India, 13-15 December 2006.
7. Biessel, H., Hoff, A., Bosch, J., Salemink, C. Triterpenes of *Prunus serotina* and *P lusitanica*, *Phytochem.*, 1974, **13**, pp 203-207.
8. Black Cherry *Prunus serotina* Ehrh., *Natural Resourcer Concervation Service*, United States Departament of Agriculture.
9. Camacho-Luis A. Antioxidant Constituents of *Geranium bellum* Rose. *J. Mex. Chem. Soc.* 2008, **52** (2), pp. 103-107.
10. Chen, Y., *et al.*, Yu, K., Li, X., Luo, Y., Liu, H. Extraction and HPLC Characterization of Chlorogenic Acid from Tobacco Residues, *Nor. Univ.*, Nanjing 2007.



VIII. REFERENCIAS



11. Cruces Carvajal, Ramón (2006) Lo que México aportó al mundo, EDIT Cuarzo. Méx., pp. 185.
12. Datos para la Materia Médica Mexicana, Segunda Parte; Editorial Oficina Tipográfica de la Secretaría de Fomento, México 1898.
13. Datos para la Materia Médica Mexicana, Tercera Parte; Editorial Oficina Tipográfica de la Secretaría de Fomento, México 1900.
14. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002–2005, OMS Ginebra 2002.
15. Ekenseair, A., Duan, L., Carrier, D., Bransby, D., Clausen, E. Extraction of Hyperoside and Quercitrin from Mimosa (*Albizia julibrissin*) Foliage. *Appl. Biochem. Biotech.* 2006, pp. 129–132.
16. Graefe EU, Witting, J., Mueller, S., Riethling, AK., Uehleke, B., Drewelow, B., Pforte, H., Jacobasch, G., Derendorf, H., Veit, M. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans, *J. Clin. Pharmacol.* 2001, **41**, pp. 492.
17. Hernández, Francisco (1943) Historia de las Plantas de Nueva España, Tomo II (Libros 3 y 4), Imprenta Universitaria.
18. Hernández, Francisco (1946) Historia de las Plantas de Nueva España, Tomo III, Imprenta Universitaria.
19. Hinshaw, J. V. Solid-Phase Microextraction, *LC•GC Europe*. 2003, pp. 1-5.
20. Horsley, S., Meinwald, J. Glucose-l-Benzoate and Prunasin from *Prunus serotina*. *Phytochem.* 1981, **20**(5), pp. 1127-1128.
21. Hough, Ashbel F. (1965). Black cherry (*Prunus serotina* Ehrh.). In *Silvics of forest trees of the United States*. p. 539-545. H. A. Fowells, comp. U.S. Department of Agriculture, *Agriculture Handbook 271*. Washington, DC.
22. Hylands, P. J., Nicholson, J. K., Holmes, E., Dunn, J. Process for Quality Control and Standardization of Medicinal Plant Products. United States Patent, 2004.
23. Ibarra, C., Rojas, A., Luna, F., Rojas, J., Rivero, B., Rivero, F. Vasorelaxant Constituents of the Leaves of *Prunus Serotina* “Capulín”. *Rev. Latino. Quím.* 2009, **37**(2), pp. 164-173.



VIII. REFERENCIAS



24. International Chemical Safety Cards ICSC: 0102 CEC 2005.
25. International Conference on Harmonisation (**ICH Q2B**) Guideline Validation of Analytical Procedures: Methodology. 1996. pp 71-76.
26. International Conference on Harmonisation (**ICH Q2A**). Guideline for Industry. Text on Validation of Analytical Procedures. 1995, pp. 1-7.
27. Kayano, S., Kikuzaki, H., Fukutsuka, N., Aoki, A., Kasamatsu, K., Yamasaki, Y., Ikami, T., Suzuki, T., Mitani, T., Nakatani, N. Antioxidant properties of prunes (*Prunus domestica* L.) and their constituents. *BioFactors*, 2004, **21**, pp. 309–313.
28. Kim, D., Heo, H., Kim, Y., Yang, H., Lee, C. Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, pp. 9921-9927.
29. Kim, M., Lee, J., Lee, H., Aryal, D., Kim, Y., Kim, S., Woo, E., Kang, K. Antioxidative effects of quercetin-glycosides isolated from the flower buds of *Tussilago farfara* L. *Food and Chem. Tox.* 2006, **44**, pp. 1299-1307.
30. Krasteva, I, Popov, I., Balanova, V., Nikolov, S. Phytochemical study of *Gypsophila trichotoma* wend. (*Caryophyllaceae*) *Quim. Nova* 2008, **31(5)**, pp. 1125-1126.
31. Li, Chun P.; Swain, E.; Poulton, J. *Prunus serotina* Amygdalin Hydrolase and Prunasin, *Plant Physiol.*, 1992, **100**, pp. 282-290.
32. Mee-Hyang K., Kweon, Han-Joon, H., Ha-Chin, S. Identification and Antioxidant Activity of Novel Chlorogenic Acid Derivatives from Bamboo (*Phyllostachys edulis*), *J. Agric. Food Chem.* 2001, **49**, pp. 4646-4655.
33. Shiyou, L., Zhang, Z., Cain, A., Wang, B., Long, M., Taylor, J. Antifungal Activity of Camptothecin, Trifolin, and Hyperoside Isolated from *Camptotheca acuminata*, *J. Agric. Food Chem.* 2005, **53**, pp. 32-37.
34. Liu, P., Yang, B., Kallio, H. Characterization of phenolic compounds in Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge. var. major) fruit by high performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry, *Food Chem.* 2010, **121**, pp. 1188–1197.
35. Martínez, M. (1989). Las plantas medicinales de México. México, 6ª Edición, Botas, 61-63.



VIII. REFERENCIAS



36. Martínez, M. (1928) Las plantas más útiles que existen en la República Mexicana. Talleres linotipográficos. de H. Barrales Sucs.
37. Martínez-Moreno, D., Alvarado, R. Mendoza, M. Basurto, F. Plantas medicinales de cuatro mercados del estado de Puebla, México. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 2006, **79**, pp 79-87.
38. McVaugh *Prunus serotina* subsp. *capuli* (Cav.) McVaugh. *Brittonia*, 1951, **7** (1), pp. 299.
39. Haribal, M., Renwick, A. Oviposition Stimulants for the Monarch Butterfly: Flavonol Glycosides from *Asclepias Curassavica* *Phytochem.* 1996, **41** (1), pp. 139-144.
40. Mikuliè Petkovsek, M., Usenik, V., Stampar, F. The Role of Chlorogenic Acid in the Resistance of Apples to Apple Scab (*Venturia Inaequalis* (Cooke) G. Wind. Aderh.) *Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljublj. Kmet.*, 2003, **81**, pp. 233 – 242.
41. Nardini, M., *et al.*, D'Aquino, M., Tomassi, G., Gentili, V., Di Felice, M., Scaccini, C. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Radical Biol. & Med.*, 1995, **19** (5), pp. 541-552.
42. Olszewska, M., Wolbis, M. Flavonoids from the Flowers of the *Prunus spinosa* L., *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2001, **58** (5), pp. 367-372.
43. Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-1993, Estabilidad de Medicamentos.
44. Olthof, M. R., Hollman, P.C.H., Buijsman, M., Van Amelsvoort, J., Katan, M. Chlorogenic Acid, Quercetin-3-Rutinoside and Black Tea Phenols Are Extensively Metabolized in Humans. *J. Nutr.*, 2003, **133**, pp. 1806–1814.
45. Ordaz-Galindo, A., Wesche-Ebeling, P., Wrolstad, R. E., Rodriguez-Saona, L., Argaiiz-Jamet, A. "Purification and identification of Capulin (*Prunus serotina* Ehrh) Anthocyanins" *Food Chemistry*, 1999, **65**, pp. 201-206.
46. Olszewska, M. Flavonoids from *Prunus Serotina* Ehrh. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 2005a, **62** (2), pp. 127-133.



VIII. REFERENCIAS



47. Olszewska, M. High-Performance Liquid Chromatographic Identification of Flavonoid Monoglycosides from *Prunus Serotina* Ehrh. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2005b, **62** (6), pp. 435-441.
48. Olszewska, M. Quantitative HPLC Analysis of Flavonoids and Chlorogenic Acid in the Leaves and Inflorescences of *Prunus Serotina* Ehrh, *Acta Chromatographica*, 2007, **19**, pp. 253-269.
49. Olszewska, M. Optimization and Validation of an HPLC–UV Method for Analysis of Corosolic, Oleanolic and Ursolic Acids in Plant Material: Application to *Prunus serotina* Ehrh. *Acta Chromatographica*, 2008, **20** (4), pp. 643–659.
50. O National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines Report of a WHO global survey, 2005.
51. Prabu, G. Guaijaverin a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*, *J. of App. Microb.* 2006, **101**, pp. 487–495.
52. Sang, S., Lapsley, K., Jeong, W., Lachance, P., Ho C., Rosen R. Antioxidative phenolics compounds isolated from almonds skins (*Prunus amygdalus* Batsch). *J. of Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, pp. 2459-2463.
53. Sang, S., Lapsley, K., Rosen, R., Ho, C. New Prenylated Benzoic Acid and Other Constituents from Almond Hulls (*Prunus amygdalus* Batsch), *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, pp. 607-609.
54. Santamour Jr., F. S., Amygdalin in *Prunus* Leaves *Phytochem.* 1998, **47** (8), pp. 1537-1538.
55. Shahat, A., Nazif, N., Abdel-Azim, N., Pieters, L., Vlietinck, A. Flavonoids from *Cressa cretica*. *Qatar Univ. Sci. J.*, 2005, **25**, pp. 72-77.
56. Swain, E., Poulton, J. Utilization of Amygdalin during Seedling Development of *Prunus serotina*, *Plant Physiol.* 1994, **106**, pp. 437-445.
57. Nueva Farmacopea Mexicana de la Sociedad Farmacéutica de México, 2 edición, Imprenta de Francisco Díaz de León, 1884.
58. Nueva Farmacopea Mexicana de la Sociedad Farmacéutica de México, 3 edición, Oficina tipográfica de la Secretaría de fomento, 1896.
59. Nueva Farmacopea Mexicana de la Sociedad Farmacéutica de México, 4° edición, Oficina tipográfica de la Secretaría de fomento, 1904, pp. 78.



VIII. REFERENCIAS



60. Tanahashi, T., *et al.*, Six Secoiridoid Glucosides from *Jasminum polyanthum*, *Chem. Pharm. Bull.* 1997, **45** (2), pp. 367-372.
61. Vas, G., Vekey, K., Solid-phase microextraction: A powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *J. of Mass Spectrom*, 2004, **39**, pp. 233–254.
62. Velásquez, M. A., Maldonado, Á. (1921) Contribución al Estudio de la Materia Médica Peruana, Sanmarti y Ca.- Lima Impresores, Lima.
63. Wickramasinghe M. Bandaranayake. Quality Control, Screening, Toxicity, and Regulation of Herbal Drugs. *Modern Phytom.. Turn. Med. Plants into Drugs*, pp. 25-59.
64. Vergara, C., Von Baer, D., Hermosín, I., Ruiz, A., Hirschfeld, M., Castillo, N., Mardones, C. Anthocyanins that Confer Characteristic Color to Red Copihue Flowers (*Lapageria Rosea*). *J. Chil. Chem. Soc.*, 2009, **54** (2), pp 194-197.
65. Wu, L.-L., Yang, X.-B., Huang, Z.-M., Liu, H.-Z., Wu, G.-X. In vivo and in vitro antiviral activity of hyperoside extracted from *Abelmoschus manihot* (L). *Medic. Acta Pharma. Sin.* 2007, **28** (3), pp. 404-409.
66. Yoshikawa, M., Murakami, T., Ishiwada, T., Morikawa, T., Kagawa, M., Higashi, Y., Matsuda, H. New Flavonol Oligoglycosides and Polyacylated Sucroses with Inhibitory Effects on Aldose Reductase and Platelet Aggregation from the Flowers of *Prunus mume*. *J. Nat. Prod.* 2002, **65**, pp. 1151-1155.
67. Zeliha, S., Akdemir, Irem Tatlı, Iclal Saracoglu, U. Burçin Ismailoglu, Inci Sahin-Erdemli, Ihsan Çalış. Polyphenolic compounds from *Geranium pratense* and their free radical scavenging activities. *Phytochem.*, 2001, **56** (2), pp. 189-193.
68. Fichas Técnicas elaboradas por el Sistema Nacional de Información Forestal, CONAFOR, SIRE.



GLOSARIO.

Adecuabilidad del sistema. Es la verificación de que un sistema (instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia, entre otros) opera con base a los criterios preestablecidos, de tal manera que, permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.

Analito. Es un componente específico en una muestra que se cuantifica durante un análisis.

Documentación. Conjunto de información que sustenta una actividad realizada.

Especificidad. Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a los otros componentes de la muestra.

Exactitud. Concordancia entre el valor de referencia y el valor obtenido utilizando un método analítico.

Estabilidad analítica de la muestra. Es la propiedad de una muestra, que fue preparada para su cuantificación de conservar la concentración del analito y su integridad fisicoquímica después de haber sido almacenada durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Intervalo del método analítico. Es la amplitud entre la concentración superior e inferior del analito, en el cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad de acuerdo con el método analítico propuesto.

Linealidad. Es la capacidad de un método analítico para obtener resultados de prueba que sean proporcionales ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática definida, a la concentración del analito en una muestra y en un intervalo dado.

Método analítico. Es una descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico en una muestra.

Muestra adicionada. Es una porción representativa del material a evaluar, a la cual se adicionan cantidades conocidas del analito de interés.



Precisión. Es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas analíticas individuales, cuando se aplica el procedimiento repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia.

Precisión intermedia. Es la precisión del método analítico, expresada como la concordancia entre las diferentes determinaciones realizadas de manera independiente en un mismo laboratorio por diferentes analistas y en distintos días.

Protocolo de validación. Es una descripción de las pruebas específicas para demostrar que un proceso da resultados que cumplen con los criterios preestablecidos de forma consistente.

Recobro. Es la cantidad del analito adicionado que se determina en una muestra placebo empleando el método analítico.

Repetibilidad. Es el grado de concordancia entre las determinaciones analíticas independientes realizadas durante un periodo de tiempo corto por un solo analista usando el mismo equipo.

Reproducibilidad. Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre las determinaciones analíticas independientes efectuadas por diferentes laboratorios.

Robustez. Es una medida de la capacidad del método analítico para mantener su desempeño cuando se presentan variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método.

Sustancia de referencia. Es una sustancia útil para comprobaciones analíticas de tipo físico, químico o microbiológico. Durante el transcurso del análisis sus propiedades son comparadas con la sustancia a evaluar.

Sustancia de referencia primaria. Es una sustancia que posee una elevada calidad metrológica y cuyas propiedades se aceptan sin hacer referencia a otras sustancias.

Sustancia de referencia secundaria. Es una sustancia cuyas propiedades se asignan por comparación con una sustancia de referencia primaria, o bien, cuando se certifica mediante un procedimiento científicamente reconocido.



Tolerancia. Es la reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de una misma muestra bajo diferentes condiciones de operación (equipos y columnas). La robustez y la tolerancia son conceptos diferentes ya que, el primero se refiere a la influencia de factores internos del método, mientras que el segundo se refiere a los factores externos al método analítico.

Validación de método analítico. Proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.



ANEXO A

Ecuaciones para determinar los parámetros estadísticos

| PARÁMETRO ESTADÍSTICO | ABREVIATURA | ECUACIÓN |
|--|------------------|---|
| Coeficiente de correlación | r | $r = \sqrt{\frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{((n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2))}}$ |
| Coeficiente de determinación r | r ² | $r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{((n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2))}$ |
| Desviación estándar relativa | DER | $DER = \frac{S}{\bar{y}} * 100$ |
| Desviación estándar | S | $S = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$ |
| Desviación estándar de la ordenada al origen | b ₀ | $S_{b_0} = S_{y/x} \sqrt{\left(\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}\right)}$ |
| Desviación estándar de la pendiente | S _{b1} | $S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\left(\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}\right)}$ |
| Desviación estándar de la regresión | S _{y/x} | $S_{y/x} = \sqrt{\left(\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}\right)}$ |
| Diferencia absoluta de las medias | d _i | $ d_i = \bar{y}_i - \bar{y}_0 $ |
| Intervalo de confianza para la media poblacional | IC(μ) | $IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0,975,n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$ |



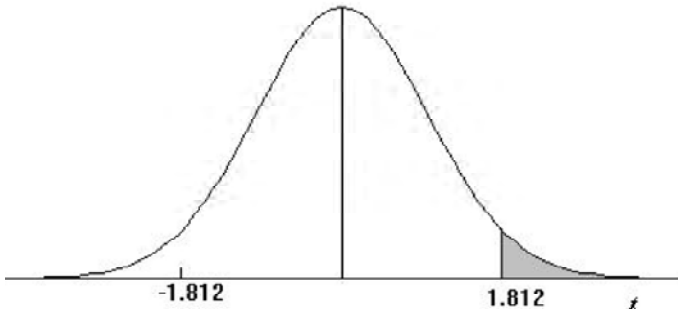
| PARÁMETRO ESTADÍSTICO | ABREVIATURA | ECUACIÓN |
|---|-------------------------------|--|
| Intervalo de confianza para la ordenada al origen poblacional | $IC(\beta_0)$ | $IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0,975,n-2} S b_0$ |
| Intervalo de confianza para la pendiente poblacional | $IC(\beta_1)$ | $IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0,975,n-2} S b_1$ |
| Media aritmética | $\bar{x}, \bar{y}, \bar{y}_i$ | $\bar{x} = \frac{\sum x}{n}, \bar{y} = \frac{\sum y}{n}, \bar{y}_i = \frac{\sum y_i}{n}$ |
| Ordenada al origen | b_0 | $b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$ |
| Pendiente | b_1 | $b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$ |
| Suma de x | $\sum x$ | $\sum x = \sum_{i=1}^n x_i$ |
| Suma de y | $\sum y$ | $\sum y = \sum_{i=1}^n y_i$ |
| Suma al cuadrado de x | $(\sum x)^2$ | $(\sum x)^2 = (\sum_{i=1}^n x_i)^2$ |
| Suma al cuadrado de y | $(\sum y)^2$ | $(\sum y)^2 = (\sum_{i=1}^n y_i)^2$ |
| Suma de x al cuadrado | $\sum x^2$ | $\sum x^2 = \sum_{i=1}^n x_i^2$ |
| Suma de y al cuadrado | $\sum y^2$ | $\sum y^2 = \sum_{i=1}^n y_i^2$ |



| PARÁMETRO ESTADÍSTICO | ABREVIATURA | ECUACIÓN |
|-------------------------|-----------------|--|
| Suma de x por y | $\sum xy$ | $\sum xy = \sum_{i=1}^n x_i y_i$ |
| Suma de x por suma de y | $\sum x \sum y$ | $\sum x \sum y = \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i$ |
| % de Recobro | %R | $\%R = \frac{\text{Cantidad recuperada}}{\text{Cantidad adicionada}} \times 100$ |



ANEXO B
TABLA DISTRIBUCIÓN t DE STUDENT



Ejemplo

Para r = 10 grados de libertad:

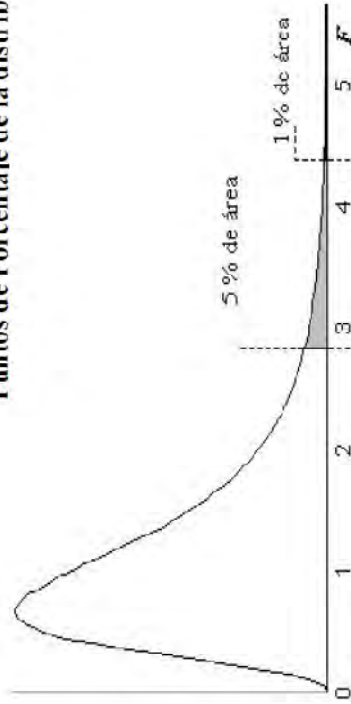
$P\{t > 1.812\} = 0.05$
 $P\{t < -1.812\} = 0.05$

| α r | t | | | | | | | | |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|
| | 0,25 | 0,2 | 0,15 | 0,1 | 0,05 | 0,025 | 0,01 | 0,005 | 0,0005 |
| 1 | 1,000 | 1,376 | 1,963 | 3,078 | 6,314 | 12,706 | 31,821 | 63,656 | 636,578 |
| 2 | 0,816 | 1,061 | 1,386 | 1,886 | 2,920 | 4,303 | 6,965 | 9,925 | 31,600 |
| 3 | 0,765 | 0,978 | 1,250 | 1,638 | 2,353 | 3,182 | 4,541 | 5,841 | 12,924 |
| 4 | 0,741 | 0,941 | 1,190 | 1,533 | 2,132 | 2,776 | 3,747 | 4,604 | 8,610 |
| 5 | 0,727 | 0,920 | 1,156 | 1,476 | 2,015 | 2,571 | 3,365 | 4,032 | 6,869 |
| 6 | 0,718 | 0,906 | 1,134 | 1,440 | 1,943 | 2,447 | 3,143 | 3,707 | 5,959 |
| 7 | 0,711 | 0,896 | 1,119 | 1,415 | 1,895 | 2,365 | 2,998 | 3,499 | 5,408 |
| 8 | 0,706 | 0,889 | 1,108 | 1,397 | 1,860 | 2,306 | 2,896 | 3,355 | 5,041 |
| 9 | 0,703 | 0,883 | 1,100 | 1,383 | 1,833 | 2,262 | 2,821 | 3,250 | 4,781 |
| 10 | 0,700 | 0,879 | 1,093 | 1,372 | 1,812 | 2,228 | 2,764 | 3,169 | 4,587 |
| 11 | 0,697 | 0,876 | 1,088 | 1,363 | 1,796 | 2,201 | 2,718 | 3,106 | 4,437 |
| 12 | 0,695 | 0,873 | 1,083 | 1,356 | 1,782 | 2,179 | 2,681 | 3,055 | 4,318 |
| 13 | 0,694 | 0,870 | 1,079 | 1,350 | 1,771 | 2,160 | 2,650 | 3,012 | 4,221 |
| 14 | 0,692 | 0,868 | 1,076 | 1,345 | 1,761 | 2,145 | 2,624 | 2,977 | 4,140 |
| 15 | 0,691 | 0,866 | 1,074 | 1,341 | 1,753 | 2,131 | 2,602 | 2,947 | 4,073 |
| 16 | 0,690 | 0,865 | 1,071 | 1,337 | 1,746 | 2,120 | 2,583 | 2,921 | 4,015 |
| 17 | 0,689 | 0,863 | 1,069 | 1,333 | 1,740 | 2,110 | 2,567 | 2,898 | 3,965 |
| 18 | 0,688 | 0,862 | 1,067 | 1,330 | 1,734 | 2,101 | 2,552 | 2,878 | 3,922 |
| 19 | 0,688 | 0,861 | 1,066 | 1,328 | 1,729 | 2,093 | 2,539 | 2,861 | 3,883 |
| 20 | 0,687 | 0,860 | 1,064 | 1,325 | 1,725 | 2,086 | 2,528 | 2,845 | 3,850 |
| 21 | 0,686 | 0,859 | 1,063 | 1,323 | 1,721 | 2,080 | 2,518 | 2,831 | 3,819 |
| 22 | 0,686 | 0,858 | 1,061 | 1,321 | 1,717 | 2,074 | 2,508 | 2,819 | 3,792 |
| 23 | 0,685 | 0,858 | 1,060 | 1,319 | 1,714 | 2,069 | 2,500 | 2,807 | 3,768 |
| 24 | 0,685 | 0,857 | 1,059 | 1,318 | 1,711 | 2,064 | 2,492 | 2,797 | 3,745 |
| 25 | 0,684 | 0,856 | 1,058 | 1,316 | 1,708 | 2,060 | 2,485 | 2,787 | 3,725 |
| 26 | 0,684 | 0,856 | 1,058 | 1,315 | 1,706 | 2,056 | 2,479 | 2,779 | 3,707 |
| 27 | 0,684 | 0,855 | 1,057 | 1,314 | 1,703 | 2,052 | 2,473 | 2,771 | 3,689 |
| 28 | 0,683 | 0,855 | 1,056 | 1,313 | 1,701 | 2,048 | 2,467 | 2,763 | 3,674 |
| 29 | 0,683 | 0,854 | 1,055 | 1,311 | 1,699 | 2,045 | 2,462 | 2,756 | 3,660 |
| 30 | 0,683 | 0,854 | 1,055 | 1,310 | 1,697 | 2,042 | 2,457 | 2,750 | 3,646 |
| 40 | 0,681 | 0,851 | 1,050 | 1,303 | 1,684 | 2,021 | 2,423 | 2,704 | 3,551 |
| 60 | 0,679 | 0,848 | 1,045 | 1,296 | 1,671 | 2,000 | 2,390 | 2,660 | 3,460 |
| 120 | 0,677 | 0,845 | 1,041 | 1,289 | 1,658 | 1,980 | 2,358 | 2,617 | 3,373 |
| ∞ | 0,674 | 0,842 | 1,036 | 1,282 | 1,645 | 1,960 | 2,326 | 2,576 | 3,290 |



Tabla II. Distribución F de Fisher

Puntos de Porcentaje de la distribución F



Ejemplo:

Para $n_1 = 9, n_2 = 12$ grados de libertad:
 $P[F > 2.80] = 0.05$
 $P[F > 4.39] = 0.01$

| n_2 | 5% (normal) y 1% (negritas) puntos para la distribución de F | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | n_1 | | | | | |
|-------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 14 | 16 | 20 | 24 | 30 | 40 | 50 | 75 | | 100 | 200 | 500 | ∞ | |
| 1 | 161 | 199 | 216 | 225 | 230 | 234 | 237 | 239 | 241 | 242 | 243 | 244 | 245 | 246 | 248 | 249 | 250 | 251 | 252 | 253 | 253 | 254 | 254 | 254 | 254 | 1 |
| 2 | 4052 | 4999 | 5404 | 5624 | 5764 | 5859 | 5928 | 5981 | 6022 | 6056 | 6083 | 6107 | 6143 | 6170 | 6209 | 6234 | 6260 | 6286 | 6302 | 6324 | 6334 | 6350 | 6360 | 6366 | 6366 | 2 |
| 3 | 9850 | 9900 | 9916 | 9925 | 9930 | 9933 | 9936 | 9938 | 9939 | 9940 | 9941 | 9942 | 9943 | 9945 | 9946 | 9947 | 9948 | 9948 | 9948 | 9948 | 9948 | 9949 | 9950 | 9950 | 9950 | 3 |
| 4 | 34.12 | 30.82 | 29.46 | 28.71 | 28.24 | 27.91 | 27.67 | 27.49 | 27.34 | 27.23 | 27.13 | 27.05 | 26.92 | 26.83 | 26.69 | 26.60 | 26.50 | 26.41 | 26.35 | 26.28 | 26.24 | 26.18 | 26.15 | 26.13 | 26.13 | 4 |
| 5 | 21.20 | 18.00 | 16.69 | 15.98 | 15.52 | 15.21 | 14.98 | 14.80 | 14.66 | 14.55 | 14.45 | 14.37 | 14.26 | 14.15 | 14.02 | 13.93 | 13.84 | 13.75 | 13.69 | 13.61 | 13.58 | 13.52 | 13.49 | 13.46 | 13.46 | 5 |
| 6 | 16.26 | 13.27 | 12.06 | 11.39 | 10.97 | 10.67 | 10.46 | 10.29 | 10.16 | 10.05 | 9.96 | 9.89 | 9.77 | 9.68 | 9.55 | 9.47 | 9.38 | 9.29 | 9.24 | 9.17 | 9.13 | 9.08 | 9.04 | 9.02 | 9.02 | 6 |
| 7 | 13.75 | 10.92 | 9.78 | 9.15 | 8.75 | 8.47 | 8.26 | 8.10 | 7.98 | 7.87 | 7.79 | 7.72 | 7.60 | 7.52 | 7.40 | 7.31 | 7.23 | 7.14 | 7.09 | 7.02 | 6.99 | 6.93 | 6.90 | 6.88 | 6.88 | 7 |
| 8 | 12.25 | 9.55 | 8.45 | 7.85 | 7.46 | 7.19 | 6.99 | 6.84 | 6.72 | 6.62 | 6.54 | 6.47 | 6.36 | 6.28 | 6.16 | 6.07 | 5.99 | 5.91 | 5.86 | 5.79 | 5.75 | 5.70 | 5.67 | 5.65 | 5.65 | 8 |
| 9 | 11.25 | 8.65 | 7.59 | 7.01 | 6.63 | 6.37 | 6.18 | 6.03 | 5.91 | 5.81 | 5.73 | 5.67 | 5.56 | 5.48 | 5.36 | 5.28 | 5.20 | 5.12 | 5.07 | 5.00 | 4.96 | 4.91 | 4.88 | 4.86 | 4.86 | 9 |
| 10 | 10.55 | 8.02 | 6.99 | 6.42 | 6.06 | 5.80 | 5.61 | 5.47 | 5.35 | 5.26 | 5.18 | 5.11 | 5.01 | 4.92 | 4.81 | 4.73 | 4.65 | 4.57 | 4.52 | 4.45 | 4.41 | 4.36 | 4.33 | 4.31 | 4.31 | 10 |
| | 10.04 | 7.55 | 6.55 | 5.99 | 5.64 | 5.39 | 5.20 | 5.06 | 4.94 | 4.85 | 4.77 | 4.71 | 4.60 | 4.52 | 4.41 | 4.33 | 4.25 | 4.17 | 4.12 | 4.05 | 4.01 | 3.95 | 3.93 | 3.91 | 3.91 | |



ANEXO B



5% (normal) y 1% (negritas) puntos para la distribución de F
n1 grados de libertad (para el mayor cuadrado medio)

| n ₂ | n ₁ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--|--|--|--|--|--|--|--|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 14 | 16 | 20 | 24 | 30 | 40 | 50 | 75 | 100 | 200 | 500 | ∞ | | | | | | | | |
| 11 | 4.84 | 3.98 | 3.59 | 3.36 | 3.20 | 3.09 | 3.01 | 2.95 | 2.90 | 2.85 | 2.82 | 2.79 | 2.74 | 2.70 | 2.65 | 2.61 | 2.57 | 2.53 | 2.51 | 2.47 | 2.46 | 2.43 | 2.42 | 2.40 | | | | | | | | |
| 12 | 9.65 | 7.21 | 6.22 | 5.67 | 5.32 | 5.07 | 4.89 | 4.74 | 4.63 | 4.54 | 4.46 | 4.40 | 4.29 | 4.21 | 4.10 | 4.02 | 3.94 | 3.86 | 3.81 | 3.74 | 3.71 | 3.66 | 3.62 | 3.60 | | | | | | | | |
| 13 | 4.75 | 3.89 | 3.49 | 3.26 | 3.11 | 3.00 | 2.91 | 2.85 | 2.80 | 2.75 | 2.72 | 2.69 | 2.64 | 2.60 | 2.54 | 2.51 | 2.47 | 2.43 | 2.40 | 2.37 | 2.35 | 2.32 | 2.31 | 2.30 | | | | | | | | |
| 14 | 9.33 | 6.93 | 5.95 | 5.41 | 5.06 | 4.82 | 4.64 | 4.50 | 4.39 | 4.30 | 4.22 | 4.16 | 4.05 | 3.97 | 3.86 | 3.78 | 3.70 | 3.62 | 3.57 | 3.50 | 3.47 | 3.41 | 3.38 | 3.36 | | | | | | | | |
| 15 | 4.67 | 3.81 | 3.41 | 3.18 | 3.03 | 2.92 | 2.83 | 2.77 | 2.71 | 2.67 | 2.63 | 2.60 | 2.55 | 2.51 | 2.46 | 2.42 | 2.38 | 2.34 | 2.31 | 2.28 | 2.26 | 2.23 | 2.22 | 2.21 | | | | | | | | |
| 16 | 9.07 | 6.70 | 5.74 | 5.21 | 4.86 | 4.62 | 4.44 | 4.30 | 4.19 | 4.10 | 4.02 | 3.96 | 3.86 | 3.78 | 3.66 | 3.59 | 3.51 | 3.43 | 3.38 | 3.31 | 3.27 | 3.22 | 3.19 | 3.17 | | | | | | | | |
| 17 | 4.60 | 3.74 | 3.34 | 3.11 | 2.96 | 2.85 | 2.76 | 2.70 | 2.65 | 2.60 | 2.57 | 2.53 | 2.48 | 2.44 | 2.39 | 2.35 | 2.31 | 2.27 | 2.24 | 2.21 | 2.19 | 2.16 | 2.14 | 2.13 | | | | | | | | |
| 18 | 8.86 | 6.51 | 5.56 | 5.04 | 4.69 | 4.46 | 4.28 | 4.14 | 4.03 | 3.94 | 3.86 | 3.80 | 3.70 | 3.62 | 3.51 | 3.43 | 3.35 | 3.27 | 3.22 | 3.15 | 3.11 | 3.06 | 3.03 | 3.00 | | | | | | | | |
| 19 | 4.54 | 3.68 | 3.29 | 3.06 | 2.90 | 2.79 | 2.71 | 2.64 | 2.59 | 2.54 | 2.51 | 2.48 | 2.42 | 2.38 | 2.33 | 2.29 | 2.25 | 2.20 | 2.18 | 2.14 | 2.12 | 2.10 | 2.08 | 2.07 | | | | | | | | |
| 20 | 8.68 | 6.36 | 5.42 | 4.89 | 4.56 | 4.32 | 4.14 | 4.00 | 3.89 | 3.80 | 3.73 | 3.67 | 3.56 | 3.49 | 3.37 | 3.29 | 3.21 | 3.13 | 3.08 | 3.01 | 2.98 | 2.92 | 2.89 | 2.87 | | | | | | | | |
| 21 | 4.49 | 3.63 | 3.24 | 3.01 | 2.85 | 2.74 | 2.66 | 2.59 | 2.54 | 2.49 | 2.46 | 2.42 | 2.37 | 2.33 | 2.28 | 2.24 | 2.19 | 2.15 | 2.12 | 2.09 | 2.07 | 2.04 | 2.02 | 2.01 | | | | | | | | |
| 22 | 8.53 | 6.23 | 5.29 | 4.77 | 4.44 | 4.20 | 4.03 | 3.89 | 3.78 | 3.69 | 3.62 | 3.55 | 3.45 | 3.37 | 3.26 | 3.18 | 3.10 | 3.02 | 2.97 | 2.90 | 2.86 | 2.81 | 2.78 | 2.75 | | | | | | | | |
| 23 | 4.45 | 3.59 | 3.20 | 2.96 | 2.81 | 2.70 | 2.61 | 2.55 | 2.49 | 2.45 | 2.41 | 2.38 | 2.33 | 2.29 | 2.23 | 2.19 | 2.15 | 2.10 | 2.08 | 2.04 | 2.02 | 1.99 | 1.97 | 1.96 | | | | | | | | |
| 24 | 8.40 | 6.11 | 5.19 | 4.67 | 4.34 | 4.10 | 3.93 | 3.79 | 3.68 | 3.59 | 3.52 | 3.46 | 3.35 | 3.27 | 3.16 | 3.08 | 3.00 | 2.92 | 2.87 | 2.80 | 2.76 | 2.71 | 2.68 | 2.65 | | | | | | | | |
| 25 | 4.41 | 3.55 | 3.16 | 2.93 | 2.77 | 2.66 | 2.58 | 2.51 | 2.46 | 2.41 | 2.37 | 2.34 | 2.29 | 2.25 | 2.19 | 2.15 | 2.11 | 2.06 | 2.04 | 2.00 | 1.98 | 1.95 | 1.93 | 1.92 | | | | | | | | |
| 26 | 8.29 | 6.01 | 5.09 | 4.58 | 4.25 | 4.01 | 3.84 | 3.71 | 3.60 | 3.51 | 3.43 | 3.37 | 3.27 | 3.19 | 3.08 | 3.00 | 2.92 | 2.84 | 2.78 | 2.71 | 2.68 | 2.62 | 2.59 | 2.57 | | | | | | | | |
| 27 | 4.38 | 3.52 | 3.13 | 2.90 | 2.74 | 2.63 | 2.54 | 2.48 | 2.42 | 2.38 | 2.34 | 2.31 | 2.26 | 2.21 | 2.16 | 2.11 | 2.07 | 2.03 | 1.98 | 1.94 | 1.91 | 1.89 | 1.88 | | | | | | | | | |
| 28 | 8.18 | 5.93 | 5.01 | 4.50 | 4.17 | 3.94 | 3.77 | 3.63 | 3.52 | 3.43 | 3.36 | 3.30 | 3.19 | 3.12 | 3.00 | 2.92 | 2.84 | 2.76 | 2.71 | 2.64 | 2.60 | 2.55 | 2.51 | 2.49 | | | | | | | | |
| 29 | 4.35 | 3.49 | 3.10 | 2.87 | 2.71 | 2.60 | 2.51 | 2.45 | 2.39 | 2.35 | 2.31 | 2.28 | 2.22 | 2.18 | 2.12 | 2.08 | 2.04 | 1.99 | 1.97 | 1.93 | 1.91 | 1.88 | 1.86 | 1.84 | | | | | | | | |
| 30 | 8.10 | 5.85 | 4.94 | 4.43 | 4.10 | 3.87 | 3.70 | 3.56 | 3.46 | 3.37 | 3.29 | 3.23 | 3.13 | 3.05 | 2.94 | 2.86 | 2.78 | 2.69 | 2.64 | 2.57 | 2.54 | 2.48 | 2.44 | 2.42 | | | | | | | | |
| 31 | 4.32 | 3.47 | 3.07 | 2.84 | 2.68 | 2.57 | 2.49 | 2.42 | 2.37 | 2.32 | 2.28 | 2.25 | 2.20 | 2.16 | 2.10 | 2.05 | 2.01 | 1.96 | 1.94 | 1.90 | 1.88 | 1.84 | 1.83 | 1.81 | | | | | | | | |
| 32 | 8.02 | 5.78 | 4.87 | 4.37 | 4.04 | 3.81 | 3.64 | 3.51 | 3.40 | 3.31 | 3.24 | 3.17 | 3.07 | 2.99 | 2.88 | 2.80 | 2.72 | 2.64 | 2.58 | 2.51 | 2.48 | 2.42 | 2.38 | 2.36 | | | | | | | | |
| 33 | 4.30 | 3.44 | 3.05 | 2.82 | 2.66 | 2.55 | 2.46 | 2.40 | 2.34 | 2.30 | 2.26 | 2.23 | 2.17 | 2.13 | 2.07 | 2.03 | 1.98 | 1.94 | 1.91 | 1.87 | 1.85 | 1.82 | 1.80 | 1.78 | | | | | | | | |
| 34 | 7.95 | 5.72 | 4.82 | 4.31 | 3.99 | 3.76 | 3.59 | 3.45 | 3.35 | 3.26 | 3.18 | 3.12 | 3.02 | 2.94 | 2.83 | 2.75 | 2.67 | 2.58 | 2.53 | 2.46 | 2.42 | 2.36 | 2.33 | 2.31 | | | | | | | | |
| 35 | 4.28 | 3.42 | 3.03 | 2.80 | 2.64 | 2.53 | 2.44 | 2.37 | 2.32 | 2.27 | 2.24 | 2.20 | 2.15 | 2.11 | 2.05 | 2.01 | 1.96 | 1.91 | 1.88 | 1.84 | 1.82 | 1.79 | 1.77 | 1.76 | | | | | | | | |
| 36 | 7.88 | 5.66 | 4.76 | 4.26 | 3.94 | 3.71 | 3.54 | 3.41 | 3.30 | 3.21 | 3.14 | 3.07 | 2.97 | 2.89 | 2.78 | 2.70 | 2.62 | 2.54 | 2.48 | 2.41 | 2.37 | 2.32 | 2.28 | 2.26 | | | | | | | | |
| 37 | 4.26 | 3.40 | 3.01 | 2.78 | 2.62 | 2.51 | 2.42 | 2.36 | 2.30 | 2.25 | 2.22 | 2.18 | 2.13 | 2.09 | 2.03 | 1.98 | 1.94 | 1.89 | 1.86 | 1.82 | 1.80 | 1.77 | 1.75 | 1.73 | | | | | | | | |
| 38 | 7.82 | 5.61 | 4.72 | 4.22 | 3.90 | 3.67 | 3.50 | 3.36 | 3.26 | 3.17 | 3.09 | 3.03 | 2.93 | 2.85 | 2.74 | 2.66 | 2.58 | 2.49 | 2.44 | 2.37 | 2.33 | 2.27 | 2.24 | 2.21 | | | | | | | | |
| 39 | 4.24 | 3.39 | 2.99 | 2.76 | 2.60 | 2.49 | 2.40 | 2.34 | 2.28 | 2.24 | 2.20 | 2.16 | 2.11 | 2.07 | 2.01 | 1.96 | 1.92 | 1.87 | 1.84 | 1.80 | 1.78 | 1.75 | 1.73 | 1.71 | | | | | | | | |
| 40 | 7.77 | 5.57 | 4.68 | 4.18 | 3.85 | 3.63 | 3.46 | 3.32 | 3.22 | 3.13 | 3.06 | 2.99 | 2.89 | 2.81 | 2.70 | 2.62 | 2.54 | 2.45 | 2.40 | 2.33 | 2.29 | 2.23 | 2.19 | 2.17 | | | | | | | | |
| 41 | 4.23 | 3.37 | 2.98 | 2.74 | 2.59 | 2.47 | 2.39 | 2.32 | 2.27 | 2.22 | 2.18 | 2.15 | 2.09 | 2.05 | 1.99 | 1.95 | 1.90 | 1.85 | 1.82 | 1.78 | 1.76 | 1.73 | 1.71 | 1.69 | | | | | | | | |
| 42 | 7.72 | 5.53 | 4.64 | 4.14 | 3.82 | 3.59 | 3.42 | 3.29 | 3.18 | 3.09 | 3.02 | 2.96 | 2.86 | 2.78 | 2.66 | 2.58 | 2.50 | 2.42 | 2.36 | 2.29 | 2.25 | 2.19 | 2.16 | 2.13 | | | | | | | | |
| 43 | 4.21 | 3.35 | 2.96 | 2.73 | 2.57 | 2.46 | 2.37 | 2.31 | 2.25 | 2.20 | 2.17 | 2.13 | 2.08 | 2.04 | 1.97 | 1.93 | 1.88 | 1.84 | 1.81 | 1.76 | 1.74 | 1.71 | 1.69 | 1.67 | | | | | | | | |
| 44 | 7.68 | 5.49 | 4.60 | 4.11 | 3.78 | 3.56 | 3.39 | 3.26 | 3.15 | 3.06 | 2.99 | 2.93 | 2.82 | 2.75 | 2.63 | 2.55 | 2.47 | 2.38 | 2.33 | 2.26 | 2.22 | 2.16 | 2.12 | 2.10 | | | | | | | | |
| 45 | 4.20 | 3.34 | 2.95 | 2.71 | 2.56 | 2.45 | 2.36 | 2.29 | 2.24 | 2.19 | 2.15 | 2.12 | 2.06 | 2.02 | 1.96 | 1.91 | 1.87 | 1.82 | 1.79 | 1.75 | 1.73 | 1.69 | 1.67 | 1.65 | | | | | | | | |
| 46 | 7.64 | 5.45 | 4.57 | 4.07 | 3.75 | 3.53 | 3.36 | 3.23 | 3.12 | 3.03 | 2.96 | 2.90 | 2.79 | 2.72 | 2.60 | 2.52 | 2.44 | 2.35 | 2.30 | 2.23 | 2.19 | 2.13 | 2.09 | 2.06 | | | | | | | | |
| 47 | 4.18 | 3.33 | 2.93 | 2.70 | 2.55 | 2.43 | 2.35 | 2.28 | 2.22 | 2.18 | 2.14 | 2.10 | 2.05 | 2.01 | 1.94 | 1.90 | 1.85 | 1.81 | 1.77 | 1.73 | 1.71 | 1.67 | 1.65 | 1.64 | | | | | | | | |
| 48 | 7.60 | 5.42 | 4.54 | 4.04 | 3.73 | 3.50 | 3.33 | 3.20 | 3.09 | 3.00 | 2.93 | 2.87 | 2.77 | 2.69 | 2.57 | 2.49 | 2.41 | 2.33 | 2.27 | 2.20 | 2.16 | 2.10 | 2.06 | 2.03 | | | | | | | | |
| 49 | 4.17 | 3.32 | 2.92 | 2.69 | 2.53 | 2.42 | 2.33 | 2.27 | 2.21 | 2.16 | 2.13 | 2.09 | 2.04 | 1.99 | 1.93 | 1.89 | 1.84 | 1.79 | 1.76 | 1.72 | 1.70 | 1.66 | 1.64 | 1.62 | | | | | | | | |
| 50 | 7.56 | 5.39 | 4.51 | 4.02 | 3.70 | 3.47 | 3.30 | 3.17 | 3.07 | 2.98 | 2.91 | 2.84 | 2.74 | 2.66 | 2.54 | 2.46 | 2.39 | 2.30 | 2.25 | 2.17 | 2.13 | 2.07 | 2.03 | 2.01 | | | | | | | | |
| 51 | 4.15 | 3.29 | 2.90 | 2.67 | 2.51 | 2.40 | 2.31 | 2.24 | 2.19 | 2.14 | 2.10 | 2.07 | 2.01 | 1.97 | 1.91 | 1.86 | 1.82 | 1.77 | 1.74 | 1.69 | 1.67 | 1.63 | 1.61 | 1.59 | | | | | | | | |
| 52 | 7.50 | 5.34 | 4.46 | 3.97 | 3.65 | 3.43 | 3.26 | 3.13 | 3.02 | 2.93 | 2.86 | 2.80 | 2.70 | 2.62 | 2.50 | 2.42 | 2.34 | 2.25 | 2.20 | 2.12 | 2.08 | 2.02 | 1.98 | 1.96 | | | | | | | | |



ANEXO B



| n ₂ | 5% (normal) y 1% (negritas) puntos para la distribución de F ni grados de libertad (para el mayor cuadrado medio) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | n ₁ |
|----------------|--|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|----------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 14 | 16 | 20 | 24 | 30 | 40 | 50 | 75 | 100 | 200 | 500 | ∞ | | | | | | | | | | | |
| 34 | 4.13 | 3.28 | 2.88 | 2.65 | 2.49 | 2.38 | 2.29 | 2.23 | 2.17 | 2.12 | 2.08 | 2.05 | 1.99 | 1.95 | 1.89 | 1.84 | 1.80 | 1.75 | 1.71 | 1.67 | 1.65 | 1.61 | 1.59 | 1.57 | 34 | | | | | | | | | | |
| 36 | 7.44 | 5.29 | 4.42 | 3.93 | 3.61 | 3.39 | 3.22 | 3.09 | 2.98 | 2.89 | 2.82 | 2.76 | 2.66 | 2.58 | 2.46 | 2.38 | 2.30 | 2.21 | 2.16 | 2.08 | 2.04 | 1.98 | 1.94 | 1.91 | 36 | | | | | | | | | | |
| 38 | 4.11 | 3.26 | 2.87 | 2.63 | 2.48 | 2.36 | 2.28 | 2.21 | 2.15 | 2.11 | 2.07 | 2.03 | 1.98 | 1.93 | 1.87 | 1.82 | 1.78 | 1.73 | 1.69 | 1.65 | 1.62 | 1.59 | 1.56 | 1.55 | 38 | | | | | | | | | | |
| 40 | 7.40 | 5.25 | 4.38 | 3.89 | 3.57 | 3.35 | 3.18 | 3.05 | 2.95 | 2.86 | 2.79 | 2.72 | 2.62 | 2.54 | 2.43 | 2.35 | 2.26 | 2.18 | 2.12 | 2.04 | 2.00 | 1.94 | 1.90 | 1.87 | 40 | | | | | | | | | | |
| 42 | 4.10 | 3.24 | 2.85 | 2.62 | 2.46 | 2.35 | 2.26 | 2.19 | 2.14 | 2.09 | 2.05 | 2.02 | 1.96 | 1.92 | 1.85 | 1.81 | 1.76 | 1.71 | 1.68 | 1.63 | 1.61 | 1.57 | 1.54 | 1.53 | 42 | | | | | | | | | | |
| 44 | 7.35 | 5.21 | 4.34 | 3.86 | 3.54 | 3.32 | 3.15 | 3.02 | 2.92 | 2.83 | 2.76 | 2.69 | 2.59 | 2.51 | 2.40 | 2.32 | 2.23 | 2.14 | 2.09 | 2.01 | 1.97 | 1.90 | 1.86 | 1.84 | 44 | | | | | | | | | | |
| 46 | 4.08 | 3.23 | 2.84 | 2.61 | 2.45 | 2.34 | 2.25 | 2.18 | 2.12 | 2.08 | 2.04 | 2.00 | 1.95 | 1.90 | 1.84 | 1.79 | 1.74 | 1.69 | 1.66 | 1.61 | 1.59 | 1.55 | 1.53 | 1.51 | 46 | | | | | | | | | | |
| 48 | 7.31 | 5.18 | 4.31 | 3.83 | 3.51 | 3.29 | 3.12 | 2.99 | 2.89 | 2.80 | 2.73 | 2.66 | 2.56 | 2.48 | 2.37 | 2.29 | 2.20 | 2.11 | 2.06 | 1.98 | 1.94 | 1.87 | 1.83 | 1.81 | 48 | | | | | | | | | | |
| 50 | 4.07 | 3.22 | 2.83 | 2.59 | 2.44 | 2.32 | 2.24 | 2.17 | 2.11 | 2.06 | 2.03 | 1.99 | 1.94 | 1.89 | 1.83 | 1.78 | 1.73 | 1.68 | 1.65 | 1.60 | 1.57 | 1.53 | 1.51 | 1.49 | 50 | | | | | | | | | | |
| 55 | 7.28 | 5.15 | 4.29 | 3.80 | 3.49 | 3.27 | 3.10 | 2.97 | 2.86 | 2.78 | 2.70 | 2.64 | 2.54 | 2.46 | 2.34 | 2.25 | 2.18 | 2.09 | 2.03 | 1.95 | 1.91 | 1.85 | 1.80 | 1.78 | 55 | | | | | | | | | | |
| 60 | 4.06 | 3.21 | 2.82 | 2.58 | 2.43 | 2.31 | 2.23 | 2.16 | 2.10 | 2.05 | 2.01 | 1.98 | 1.92 | 1.88 | 1.81 | 1.77 | 1.72 | 1.67 | 1.63 | 1.59 | 1.56 | 1.52 | 1.49 | 1.48 | 60 | | | | | | | | | | |
| 65 | 7.25 | 5.12 | 4.26 | 3.78 | 3.47 | 3.24 | 3.08 | 2.95 | 2.84 | 2.75 | 2.68 | 2.62 | 2.52 | 2.44 | 2.32 | 2.24 | 2.15 | 2.07 | 2.01 | 1.93 | 1.89 | 1.82 | 1.78 | 1.75 | 65 | | | | | | | | | | |
| 70 | 4.05 | 3.20 | 2.81 | 2.57 | 2.42 | 2.30 | 2.22 | 2.15 | 2.09 | 2.04 | 2.00 | 1.97 | 1.91 | 1.87 | 1.80 | 1.75 | 1.71 | 1.65 | 1.62 | 1.57 | 1.55 | 1.51 | 1.48 | 1.46 | 70 | | | | | | | | | | |
| 75 | 7.22 | 5.10 | 4.24 | 3.76 | 3.44 | 3.22 | 3.06 | 2.93 | 2.82 | 2.73 | 2.66 | 2.60 | 2.50 | 2.42 | 2.30 | 2.22 | 2.13 | 2.04 | 1.99 | 1.91 | 1.86 | 1.80 | 1.76 | 1.73 | 75 | | | | | | | | | | |
| 80 | 4.04 | 3.19 | 2.80 | 2.57 | 2.41 | 2.29 | 2.21 | 2.14 | 2.08 | 2.03 | 1.99 | 1.96 | 1.90 | 1.86 | 1.79 | 1.75 | 1.70 | 1.64 | 1.61 | 1.56 | 1.54 | 1.49 | 1.47 | 1.45 | 80 | | | | | | | | | | |
| 85 | 7.19 | 5.08 | 4.22 | 3.74 | 3.43 | 3.20 | 3.04 | 2.91 | 2.80 | 2.71 | 2.64 | 2.58 | 2.48 | 2.40 | 2.28 | 2.20 | 2.12 | 2.02 | 1.97 | 1.89 | 1.84 | 1.78 | 1.73 | 1.70 | 85 | | | | | | | | | | |
| 90 | 4.03 | 3.18 | 2.79 | 2.56 | 2.40 | 2.29 | 2.20 | 2.13 | 2.07 | 2.03 | 1.99 | 1.95 | 1.89 | 1.85 | 1.78 | 1.74 | 1.69 | 1.63 | 1.58 | 1.54 | 1.49 | 1.46 | 1.44 | 1.44 | 90 | | | | | | | | | | |
| 95 | 7.17 | 5.06 | 4.20 | 3.72 | 3.41 | 3.19 | 3.02 | 2.89 | 2.78 | 2.70 | 2.63 | 2.56 | 2.46 | 2.38 | 2.27 | 2.18 | 2.10 | 2.01 | 1.96 | 1.87 | 1.82 | 1.76 | 1.71 | 1.68 | 95 | | | | | | | | | | |
| 100 | 4.02 | 3.16 | 2.77 | 2.54 | 2.38 | 2.27 | 2.18 | 2.11 | 2.06 | 2.01 | 1.97 | 1.93 | 1.88 | 1.83 | 1.76 | 1.72 | 1.67 | 1.61 | 1.58 | 1.53 | 1.50 | 1.46 | 1.43 | 1.41 | 100 | | | | | | | | | | |
| 125 | 7.12 | 5.01 | 4.16 | 3.68 | 3.37 | 3.15 | 2.98 | 2.85 | 2.75 | 2.66 | 2.59 | 2.53 | 2.42 | 2.34 | 2.23 | 2.15 | 2.06 | 1.97 | 1.91 | 1.83 | 1.78 | 1.71 | 1.67 | 1.64 | 125 | | | | | | | | | | |
| 150 | 4.00 | 3.15 | 2.76 | 2.53 | 2.37 | 2.25 | 2.17 | 2.10 | 2.04 | 1.99 | 1.95 | 1.92 | 1.86 | 1.82 | 1.75 | 1.70 | 1.65 | 1.59 | 1.56 | 1.51 | 1.48 | 1.44 | 1.41 | 1.39 | 150 | | | | | | | | | | |
| 175 | 7.08 | 4.98 | 4.13 | 3.65 | 3.34 | 3.12 | 2.95 | 2.82 | 2.72 | 2.63 | 2.56 | 2.50 | 2.39 | 2.31 | 2.20 | 2.12 | 2.03 | 1.94 | 1.88 | 1.79 | 1.75 | 1.68 | 1.63 | 1.60 | 175 | | | | | | | | | | |
| 200 | 3.99 | 3.14 | 2.75 | 2.51 | 2.36 | 2.24 | 2.15 | 2.08 | 2.03 | 1.98 | 1.94 | 1.90 | 1.85 | 1.80 | 1.73 | 1.69 | 1.63 | 1.58 | 1.54 | 1.49 | 1.46 | 1.42 | 1.39 | 1.37 | 200 | | | | | | | | | | |
| 250 | 7.04 | 4.95 | 4.10 | 3.62 | 3.31 | 3.09 | 2.93 | 2.80 | 2.69 | 2.61 | 2.53 | 2.47 | 2.37 | 2.29 | 2.17 | 2.09 | 2.00 | 1.91 | 1.85 | 1.77 | 1.72 | 1.65 | 1.60 | 1.57 | 250 | | | | | | | | | | |
| 300 | 3.98 | 3.13 | 2.74 | 2.50 | 2.35 | 2.23 | 2.14 | 2.07 | 2.02 | 1.97 | 1.93 | 1.89 | 1.84 | 1.79 | 1.72 | 1.67 | 1.62 | 1.57 | 1.53 | 1.48 | 1.45 | 1.40 | 1.37 | 1.35 | 300 | | | | | | | | | | |
| 350 | 7.01 | 4.92 | 4.07 | 3.60 | 3.29 | 3.07 | 2.91 | 2.78 | 2.67 | 2.59 | 2.51 | 2.45 | 2.35 | 2.27 | 2.15 | 2.07 | 1.98 | 1.89 | 1.83 | 1.74 | 1.70 | 1.62 | 1.57 | 1.54 | 350 | | | | | | | | | | |
| 400 | 3.96 | 3.11 | 2.72 | 2.49 | 2.33 | 2.21 | 2.13 | 2.06 | 2.00 | 1.95 | 1.91 | 1.88 | 1.82 | 1.77 | 1.70 | 1.65 | 1.60 | 1.54 | 1.51 | 1.45 | 1.43 | 1.38 | 1.35 | 1.33 | 400 | | | | | | | | | | |
| 450 | 6.96 | 4.88 | 4.04 | 3.56 | 3.25 | 3.04 | 2.87 | 2.74 | 2.64 | 2.55 | 2.48 | 2.42 | 2.31 | 2.23 | 2.12 | 2.03 | 1.94 | 1.85 | 1.79 | 1.70 | 1.65 | 1.58 | 1.53 | 1.50 | 450 | | | | | | | | | | |
| 500 | 3.94 | 3.09 | 2.70 | 2.46 | 2.31 | 2.19 | 2.10 | 2.03 | 1.97 | 1.93 | 1.89 | 1.85 | 1.79 | 1.75 | 1.68 | 1.63 | 1.57 | 1.52 | 1.48 | 1.42 | 1.39 | 1.34 | 1.31 | 1.29 | 500 | | | | | | | | | | |
| 600 | 6.90 | 4.82 | 3.98 | 3.51 | 3.21 | 2.99 | 2.82 | 2.69 | 2.59 | 2.50 | 2.43 | 2.37 | 2.27 | 2.19 | 2.07 | 1.98 | 1.89 | 1.80 | 1.74 | 1.65 | 1.60 | 1.52 | 1.47 | 1.43 | 600 | | | | | | | | | | |
| 700 | 3.92 | 3.07 | 2.68 | 2.44 | 2.29 | 2.17 | 2.08 | 2.01 | 1.96 | 1.91 | 1.87 | 1.83 | 1.77 | 1.73 | 1.66 | 1.60 | 1.55 | 1.49 | 1.45 | 1.40 | 1.36 | 1.31 | 1.27 | 1.25 | 700 | | | | | | | | | | |
| 800 | 6.84 | 4.78 | 3.94 | 3.47 | 3.17 | 2.95 | 2.79 | 2.66 | 2.55 | 2.47 | 2.39 | 2.33 | 2.23 | 2.15 | 2.03 | 1.94 | 1.85 | 1.76 | 1.69 | 1.60 | 1.55 | 1.47 | 1.41 | 1.37 | 800 | | | | | | | | | | |
| 900 | 3.90 | 3.06 | 2.66 | 2.43 | 2.27 | 2.16 | 2.07 | 2.00 | 1.94 | 1.89 | 1.85 | 1.82 | 1.76 | 1.71 | 1.64 | 1.59 | 1.54 | 1.48 | 1.44 | 1.38 | 1.34 | 1.29 | 1.25 | 1.22 | 900 | | | | | | | | | | |
| 1000 | 6.81 | 4.75 | 3.91 | 3.45 | 3.14 | 2.92 | 2.76 | 2.63 | 2.53 | 2.44 | 2.37 | 2.31 | 2.20 | 2.12 | 2.00 | 1.92 | 1.83 | 1.73 | 1.66 | 1.57 | 1.52 | 1.43 | 1.38 | 1.33 | 1000 | | | | | | | | | | |
| ∞ | 3.99 | 3.04 | 2.65 | 2.42 | 2.26 | 2.14 | 2.06 | 1.98 | 1.93 | 1.88 | 1.84 | 1.80 | 1.74 | 1.69 | 1.62 | 1.57 | 1.52 | 1.46 | 1.41 | 1.35 | 1.32 | 1.26 | 1.22 | 1.19 | 200 | | | | | | | | | | |
| ∞ | 6.76 | 4.71 | 3.88 | 3.41 | 3.11 | 2.89 | 2.73 | 2.60 | 2.50 | 2.41 | 2.34 | 2.27 | 2.17 | 2.09 | 1.97 | 1.89 | 1.79 | 1.69 | 1.63 | 1.53 | 1.48 | 1.39 | 1.33 | 1.28 | 400 | | | | | | | | | | |
| ∞ | 3.96 | 3.02 | 2.63 | 2.39 | 2.24 | 2.12 | 2.03 | 1.96 | 1.90 | 1.85 | 1.81 | 1.78 | 1.72 | 1.67 | 1.60 | 1.54 | 1.49 | 1.42 | 1.38 | 1.32 | 1.28 | 1.22 | 1.17 | 1.13 | 400 | | | | | | | | | | |
| ∞ | 6.70 | 4.66 | 3.83 | 3.37 | 3.06 | 2.85 | 2.68 | 2.56 | 2.45 | 2.37 | 2.29 | 2.23 | 2.13 | 2.05 | 1.92 | 1.84 | 1.75 | 1.64 | 1.58 | 1.48 | 1.42 | 1.32 | 1.25 | 1.19 | 1000 | | | | | | | | | | |
| ∞ | 3.95 | 3.00 | 2.61 | 2.38 | 2.22 | 2.11 | 2.02 | 1.95 | 1.89 | 1.84 | 1.80 | 1.76 | 1.70 | 1.65 | 1.58 | 1.53 | 1.47 | 1.41 | 1.36 | 1.30 | 1.26 | 1.19 | 1.13 | 1.08 | 1000 | | | | | | | | | | |
| ∞ | 6.56 | 4.63 | 3.80 | 3.34 | 3.04 | 2.82 | 2.66 | 2.53 | 2.43 | 2.34 | 2.27 | 2.20 | 2.10 | 2.02 | 1.90 | 1.81 | 1.72 | 1.61 | 1.54 | 1.44 | 1.38 | 1.28 | 1.19 | 1.14 | 1000 | | | | | | | | | | |
| ∞ | 3.94 | 3.00 | 2.60 | 2.37 | 2.21 | 2.10 | 2.01 | 1.94 | 1.88 | 1.83 | 1.79 | 1.75 | 1.69 | 1.64 | 1.57 | 1.52 | 1.46 | 1.39 | 1.35 | 1.28 | 1.24 | 1.17 | 1.11 | 1.00 | ∞ | | | | | | | | | | |
| ∞ | 6.53 | 4.61 | 3.78 | 3.32 | 3.02 | 2.80 | 2.64 | 2.51 | 2.41 | 2.32 | 2.25 | 2.18 | 2.08 | 2.00 | 1.88 | 1.79 | 1.70 | 1.59 | 1.52 | 1.42 | 1.36 | 1.25 | 1.15 | 1.00 | ∞ | | | | | | | | | | |