



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Desarrollo y validación de un método analítico por
cromatografía de líquidos de alta eficiencia para
cuantificar a los principios activos de la droga cruda de
Hydrangea seemanii”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

DANIEL PEÑA GARCÍA



MÉXICO, D.F.

AÑO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Vocal: Dra. Rachel Mata Essayag

Secretario: Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz

1er. Suplente: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

2do. Suplente: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 124, Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor del tema:

Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz

Sustentante:

C. Daniel Peña García

Índice

<i>Lista de tablas</i>	<i>iv</i>
<i>Lista de figuras</i>	<i>iv</i>
<i>Lista de cuadros</i>	<i>v</i>
<i>Lista de gráficas</i>	<i>v</i>
<i>Lista de abreviaturas</i>	<i>vi</i>
1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
2.1 Antecedentes del género <i>Hydrangea</i> (Hydrangeaceae)	4
2.2 Antecedentes botánicos de <i>Hydrangea seemanii</i>	7
2.3 Control de calidad de insumos herbolarios	9
3. Objetivos	14
4. Parte experimental	15
4.1 Material vegetal	15
4.2 Preparación del extracto acuoso y fraccionamiento preliminar	15
4.3 Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de la juglalina (1)	16
4.3.1 Identificación de los marcadores por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE)	16
4.3.2 Desarrollo del método analítico por CLAE	16
4.3.3 Validación del método analítico por CLAE	17
4.3.3.1 Preparación de la matriz de trabajo	17
4.3.3.2 Evaluación de los parámetros de calidad del método analítico	17
4.4.3.2.1 Adecuabilidad del sistema	17
4.4.3.2.2 Linealidad del sistema	18
4.4.3.2.3 Límites de detección (LD) y cuantificación (LC)	19
4.4.3.2.4 Linealidad y exactitud del método	19

Índice –*continuación*–

4.3.3.2.5	Precisión	20
4.3.3.2.6	Análisis del contenido de juglalina (1) en diferentes muestras	20
5.	Resultados y discusión	21
5.1	Identificación por CLAE de los principios activos y/o marcadores	21
5.2	Desarrollo del método analítico	22
5.2.1	Establecimiento de las pruebas químicas de composición	23
5.2.2	Validación del método analítico para la cuantificación de la juglalina (1)	23
5.2.2.1	Linealidad del sistema	24
5.2.2.2	Límites de detección y cuantificación	26
5.2.2.3	Linealidad y exactitud del método	26
5.2.2.4	Precisión	27
5.2.2.5	Cuantificación del contenido de juglalina (1) en diferentes muestras	29
6.	Conclusiones	30
7.	Referencias bibliográficas	31

Lista de tablas

Tabla 1. Resultados experimentales de las curvas de calibración de la juglalina (1) para evaluar la linealidad del sistema.	25
Tabla 2. Resultados experimentales de las curvas de calibración de la juglalina (1) para evaluar la linealidad y exactitud del método.	27
Tabla 3. Resultados experimentales para evaluar la precisión del método.	29

Lista de figuras

Figura 1. Ejemplos de metabolitos secundarios selectos aislados a partir del género <i>Hydrangea</i> .	5
Figura 2. <i>Hydrangea seemannii</i> L. Riley (Hydrangeaceae).	7
Figura 3. Principales metabolitos aislados a partir de la infusión de <i>H. seemannii</i> (Aguilar, 2013).	8
Figura 4. Cromatograma de la fracción de AcOEt de <i>H. seemannii</i> obtenido por CLAE. Fase móvil: sistema isocrático binario constituido por CH ₃ CN–H ₂ O (0.1% ácido fórmico; FA); velocidad de flujo 1.2 mL min ⁻¹ ; fase estacionaria: columna Symmetry C-8 [5 µm, 3.9 × 150 mm]; detección UV: 285 nm.	22
Figura 5. Cromatogramas de la matriz enriquecida con 1 [a) 0.25, b) 0.5 y c) 0.75 mg mL ⁻¹] obtenidos por CLAE para la evaluación de la exactitud. Fase móvil: sistema isocrático binario constituido por CH ₃ CN–H ₂ O (0.1% ácido fórmico; FA); velocidad de flujo 1.2 mL min ⁻¹ ; fase estacionaria: columna Symmetry C-8 [5 µm, 3.9 × 150 mm]; detección UV: 285 nm.	28

Lista de cuadros

Cuadro 1. Condiciones cromatográficas para el desarrollo del método analítico por CLAE.	17
Cuadro 2. Diluciones empleadas para evaluar la linealidad del sistema del método analítico por CLAE.	18
Cuadro 3. Preparación de las curvas para evaluar la linealidad y exactitud del método.	20
Cuadro 4. Resumen del análisis de regresión lineal simple de la evaluación de la linealidad del sistema de 1 .	26

Lista de gráficas

Gráfica 1. Linealidad del sistema para cuantificar a la juglalina (1).	25
--	-----------

Lista de abreviaturas

ABC	área bajo la curva
AcOEt	acetato de etilo
CH₃CN	acetonitrilo
°C	grado Celsius
CCF	cromatografía en capa fina
CCA	cromatografía en columna abierta
CG	cromatografía de gases
CLAE	cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CH₂Cl₂	diclorometano
DL₅₀	dosis letal media
EM	espectrometría de masas
EtOH	etanol
FA	ácido fórmico
g	gramo
ICH	guías de la Conferencia Internacional de Armonización
L	litro
λ	longitud de onda
MeOH	metanol
μm	micra
mg	miligramo
min	minuto
mL	mililitro
nm	nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
t_R	tiempo de retención

Agradecimientos

- A la Dra. Rachel Mata por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de investigación.
- Al financiamiento otorgado a través de los proyectos CONACyT (219765) y DGAPA (IN-217516) a cargo de la Dra. Rachel Mata, para el desarrollo de esta investigación.
- Al Sistema Nacional de Investigadores (SNI-CONACyT), por la beca de ayudante de investigador otorgada.
- Un especial agradecimiento a mi asesora, la Dra. Isabel Rivero Cruz por su tiempo, ayuda, paciencia, y dedicación brindada para la realización de este trabajo de investigación.
- Al Dr. Abraham Madariaga Mazón y a la Dra. Araceli Pérez Vásquez, por el apoyo técnico proporcionado.
- Al Dr. Robert Bye por proporcionar e identificar el material vegetal utilizado en el presente estudio.
- A los miembros del Jurado, en especial a la Dra. Rachel Mata Essayag, por sus valiosos comentarios que indudablemente enriquecieron el contenido de este manuscrito.
- A todos mis compañeros del laboratorio 124.

1. Introducción

Los medicamentos y/o preparados derivados de plantas medicinales han sido ampliamente utilizados durante las últimas décadas en diversas partes del mundo, debido a que las plantas son ampliamente valoradas en la prácticas médicas alternativas. El renacimiento de este tipo de terapias ha sido el resultado de la preferencia de los consumidores por los productos de origen natural debido a la preocupación del público por los efectos secundarios de la medicina alopática, y a la continua búsqueda de opciones terapéuticas alternativas para tratar enfermedades crónicas (OMS, 2011).

En este contexto, en los países en desarrollo, la medicina herbolaria tiene una amplia tradición y representa en muchas ocasiones la única alternativa para el cuidado primario de la salud de la población con escasos recursos. Por este motivo es necesario asistir a las autoridades sanitarias a nivel mundial con información actualizada y autorizada sobre las propiedades benéficas y los posibles efectos de los remedios herbolarios. Esto es importante, debido a que cada país cuenta con su propio conjunto de directrices para evaluar la calidad, la eficacia y la seguridad de estos productos. Por otra parte, es relevante unificar estas directrices para formular los criterios básicos para la evaluación de la calidad, la seguridad y la eficacia de los medicamentos herbolarios y, en consecuencia, ayudar a los organismos nacionales e internacionales de reglamentación, a las organizaciones científicas y a los fabricantes, para evaluar la documentación, los informes y los expedientes que se presenten respecto de dichos productos. Así, con la finalidad de orientar a sus países miembros en la tarea de integrar las monografías de plantas medicinales, la OMS estableció la información científica que debe incluir cada documento (OMS, 1999). La más relevante se indica a continuación:

- a) Definición de la droga, especificando los nombres vernáculos y sinonimias de la planta.
- b) Descripción botánica detallada, de interés para asegurar la calidad de las drogas crudas en las etapas de recolección, fabricación y/o comercio.
- c) Pruebas generales de control de calidad, que permitan establecer la identidad, pureza y composición de cada planta medicinal.

d) Finalmente, debe de incluirse toda la información necesaria para establecer los parámetros de eficacia y seguridad, incluyendo formas de dosificación, contraindicaciones tales como sensibilidad o alergias, advertencias, carcinogenicidad, teratogenicidad, reacciones adversas y posología (OMS, 1999).

Con respecto a los parámetros de control de calidad, deberá ajustarse la preparación a cierta concentración de constituyentes químicos (principios activos y/o compuestos marcadores) con la finalidad de garantizar y validar su eficacia terapéutica, además de contener, las especificaciones del producto terminado, el método de identificación y cuantificación del principio activo y sus perfiles cromatográficos para garantizar la calidad constante del producto.

Con la elaboración de las monografías científicas de plantas medicinales no se plantea sustituir a los compendios oficiales (farmacopeas y formularios), sino contribuir al establecimiento de los mismos, al ofrecer a las autoridades pertinentes información veraz y actualizada sobre los más diversos aspectos de las drogas vegetales. También, éstas monografías pueden auxiliar en el proceso de regulación de los productos herbolarios. Tradicionalmente, éstos se han consumido sin ser sujetos a una regulación apropiada, y en muchos casos, su registro como medicamentos se ve impedida por la carencia de parámetros de inocuidad, eficacia y calidad apropiados. Por otro lado, la existencia de las monografías permitiría regular a nivel global los criterios para el expendio, la fabricación, la comercialización y para evaluar la calidad, la seguridad y la eficacia de las drogas crudas y sus derivados, mismos que varían sorprendentemente en las distintas regiones del mundo (OMS, 1993).

En México, a pesar de la gran tradición en el uso de plantas medicinales existe una carencia notable de estándares para realizar el control de calidad de los recursos naturales y sus preparados. De tal manera que, la importancia del control de calidad y de la estandarización de los productos botánicos es la principal preocupación para la aceptación global de éstos en cualquier sistema moderno de la medicina.

En este marco de referencia el objetivo principal de este trabajo fue desarrollar y validar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) para cuantificar a la juglalina en la infusión de *Hydrangea seemannii* L. Riley (Hydrangeaceae). La información generada permitirá asistir a las autoridades regulatorias y a los productores con

los criterios de calidad básicos para estandarizar los productos elaborados con esta planta.

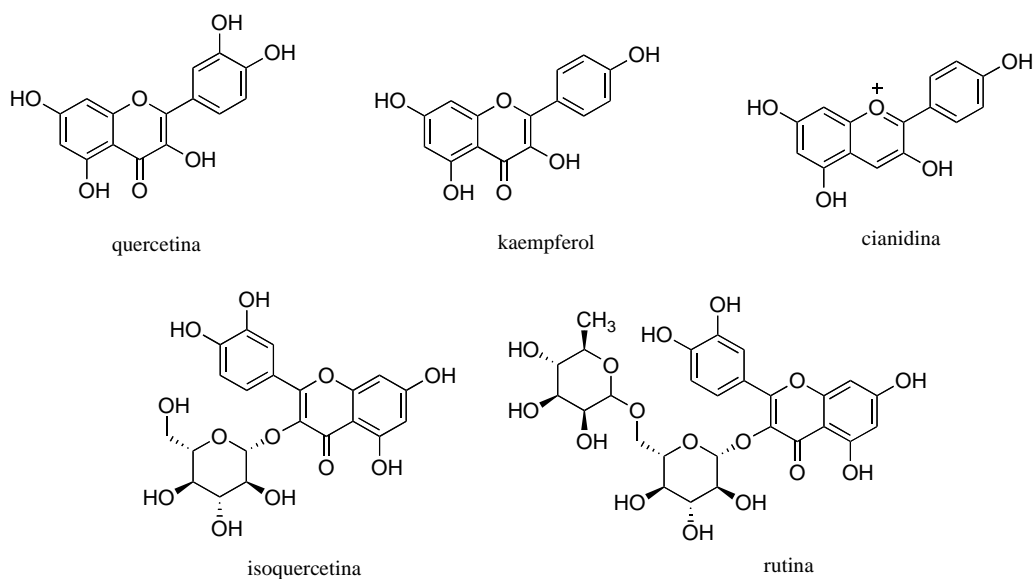
2. Antecedentes

2.1 Antecedentes del género *Hydrangea* (Hydrangeaceae)

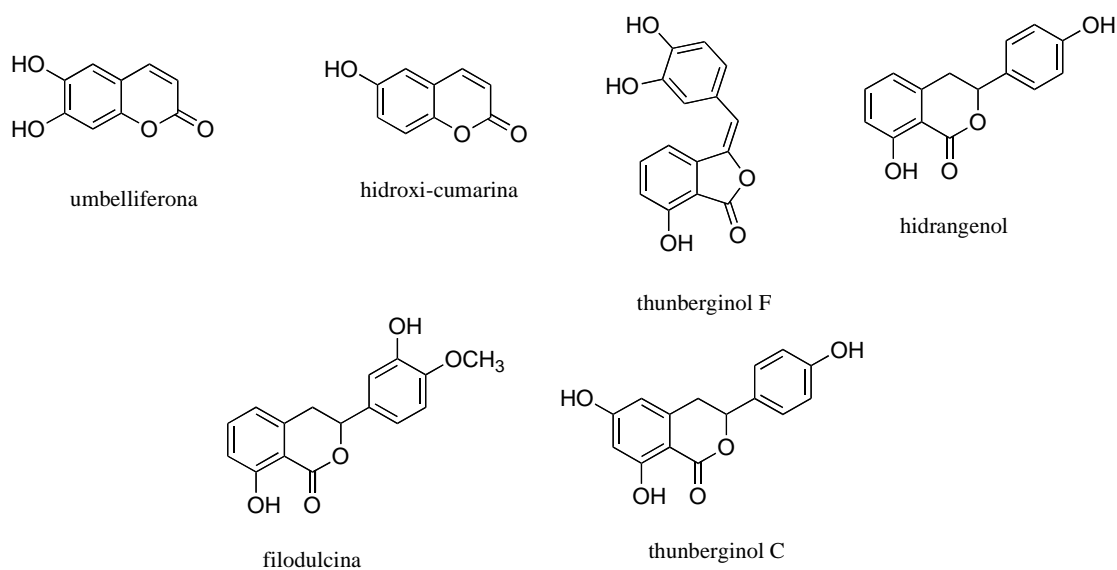
El género *Hydrangea* comprende alrededor de 70-75 especies, e incluye plantas ornamentales, comúnmente conocidas como hortensias. Las especies representativas del género son nativas del sur y el este de Asia y de América, encontrándose la mayor diversidad en el continente asiático principalmente en la República Popular de China. La mayoría son arbustos de entre uno a tres metros de altura, algunas son árboles pequeños y otras son lianas que pueden alcanzar hasta los 30 metros trepando por los árboles. Pueden presentar hojas caducas o perennes, no obstante las más ampliamente cultivadas son de hojas caducas, éstas son especies de climas templados.

De todas las especies del género, *Hydrangea macrophylla*, es la más representativa debido a sus usos en la medicina tradicional para el tratamiento de la malaria, además de sus propiedades como agente antialérgico, hipocolesterolemiante, antidiabético, antifúngico y hepatoprotector (Feng *et al.*, 2010).

Desde el punto de vista químico, pocas especies del género han sido objeto de estudio. Los principales metabolitos identificados pertenecen a las categorías de los flavonoides, estilbenoides, cumarinas y derivados, ftálicas, glucósidos cianogénicos, secoiridoides, alcaloides del tipo de las quinazolininas, ácidos grasos y esteroides (**Figura 1**; Yagi *et al.*, 1977; Bate-Smith, 1978; Yoshikawa *et al.*, 1992; Yamahara *et al.*, 1995; Matsuda *et al.*, 1999; 2008; Ashraf Taha *et al.*, 2003; Fang-Rong *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007; 2009; Feng *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

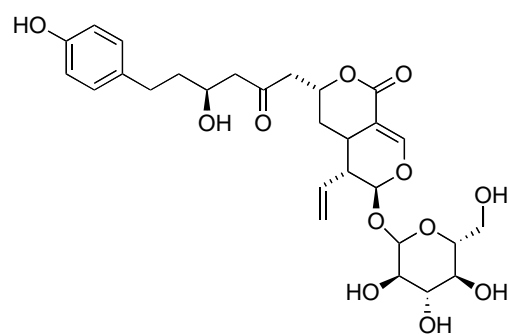


Flavonoides

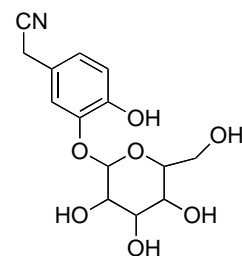


Cumarinas y derivados

Figura 1. Ejemplos de metabolitos secundarios selectos aislados a partir del género *Hydrangea*.

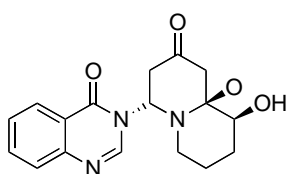


hidramacrósido A

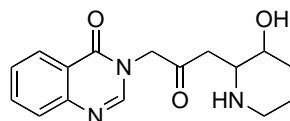


hidranitrilósido A₁

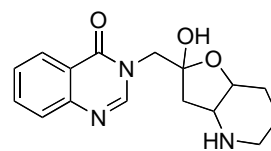
Secoiridoides y glucósidos cianogénicos



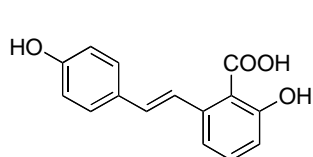
hidraquina A



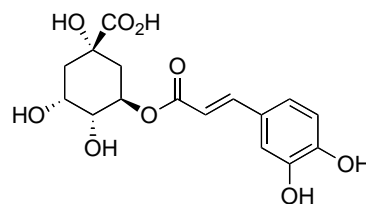
(+)-febrifugina



isofebrifugina

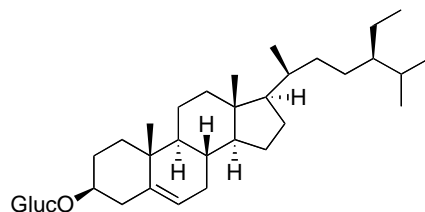


ácido hydrángico



ácido clorogénico

Alcaloides y compuestos aromáticos



3-O-β-glucósido del sitosterol

Esteroides

Figura 1. Ejemplos selectos de metabolitos secundarios aislados a partir del género *Hydrangea* – continuación–.

2.2 Antecedentes botánicos de *Hydrangea seemannii*

Hydrangea seemannii L. Riley (Hydrangeaceae) (**Figura 2**), es una planta nativa de la Sierra madre de Durango; crece a una altitud de 1800 a 2300 metros en las barrancas y laderas de dicha Sierra. La especie es una enredadera o pequeño arbusto de hojas verde oscuro, perennes, grandes y dentadas; con flores brillantes blanco crema y perfumadas en verano. En el estado de Chihuahua se usa la infusión de la planta para tratar la diabetes (Bye, 2009). Sin embargo, no existen reportes en la literatura sobre estudios farmacológicos o químicos de la planta.



Figura 2. *Hydrangea seemannii* L. Riley (Hydrangeaceae).

Recientemente, en nuestro grupo de trabajo, se iniciaron los estudios farmacológicos conducentes a determinar la inocuidad preclínica y el potencial antidiabético de la planta, encontrándose que tanto el extracto orgánico como la infusión, administradas por vía oral, en ratones sanos e hiperglucémicos, presentan un efecto hipoglucemiante y antihiperglucemiante significativo, este último efecto se relacionó con una inhibición sobre las enzimas α -glucosidasas (Brindis, 2011; Aguilar, 2013).

El estudio de la toxicidad aguda en ratones para el extracto orgánico [CH_2Cl_2 -MeOH (1:1)] y la infusión, evidenciaron que ambos extractos no provocan efectos tóxicos agudos importantes en roedores ($\text{DL}_{50} > 5 \text{ g/kg}$). Estos resultados permitieron establecer que ambos preparados no son tóxicos.

Por otra parte, el estudio químico de la infusión mediante diversos métodos cromatográficos permitió el aislamiento y la caracterización de seis metabolitos secundarios pertenecientes a la categoría de los flavonoides [juglalina, hiperósido, astragalina, isoquercetina, trifolina, guajaverina] y tres derivados de ácido aromáticos [ácidos clorogénico, 3,5-di-*O*-cafeoilquinico y 4,5-di-*O*-cafeoilquinico] como los principios activos responsables de las propiedades hipoglucemiantes y antihiperoglucémicas demostradas (**Figura 3**; Aguilar, 2013).

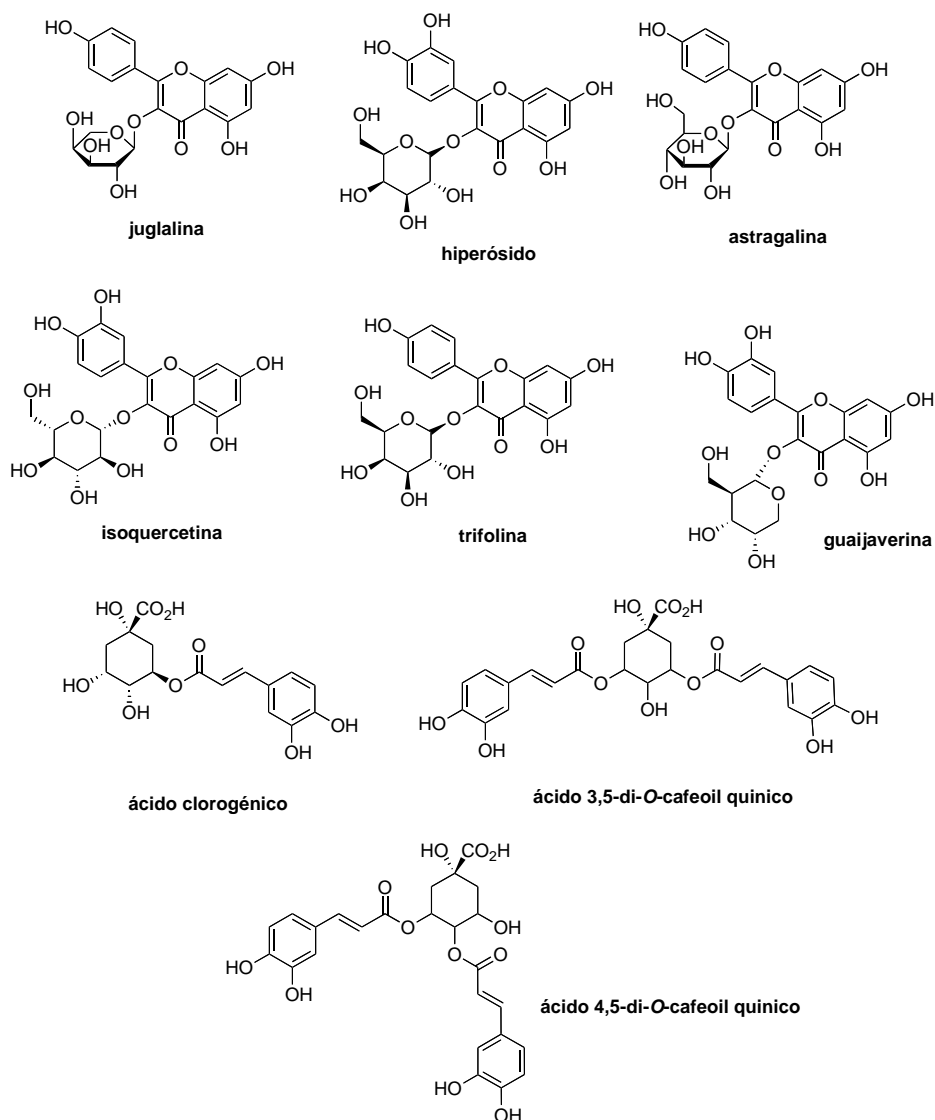


Figura 3. Principales metabolitos aislados a partir de la infusión de *H. seemannii* (Aguilar, 2013).

2.3 Control de calidad de insumos herbolarios

Los insumos de origen vegetal que se utilizan para la fabricación de medicamentos y/o suplementos alimenticios deben identificarse mediante el análisis de sus características morfológicas, histológicas y químicas. Para realizar una identificación adecuada de la planta o de las partes de la misma (artículo de prueba), las características botánicas y químicas obtenidas durante su examen se comparan con las características de materiales de referencia autenticados (ARM) o bien estándares de referencia. En este sentido, los materiales de referencia autenticados, por la USP, son habitualmente órganos o tejidos vegetales secos y pulverizados que han sido identificados por taxónomos u otros especialistas en plantas. Durante el análisis de las materias primas, los ARM, también se someten a las mismas pruebas de diagnóstico botánico y químico que procedan. Algunas de las características anatómicas diagnósticas que se especifican en una monografía pueden incluir, entre otras, la presencia de un tejido particular en un órgano; la disposición y el tipo de células de un tejido; la presencia y el tipo de canal secretor; la presencia de aceites, resinas o conductos laticíferos dentro de un órgano; el número de células epiteliales que rodean un canal secretor; y la presencia y tipo de sustancias ergásticas como son el almidón, la inulina, los glóbulos de grasa, los aceites esenciales, los cristales de oxalato de calcio, los cristolitos, los compuestos de tipo polifenol, los líquidos u otros materiales que se producen en el citoplasma, organelos, vacuolas, cavidades o pared celular (Li *et al.*, 2008; Upton, 2009; Knoss, 2015).

Una vez realizada la identificación botánica se lleva a cabo la identificación química para confirmar la autenticidad del insumo herbolario. De manera general, en la identificación química se emplean procedimientos espectroscópicos y/o cromatográficos para detectar la presencia de compuestos indicadores o marcadores específicos de la especie. Para ello, se pueden emplear perfiles espectroscópicos (UV, IR) o cromatográficos (CLAE, TLC, CG) que permitan realizar la identificación química mediante la comparación de las huellas digitales o de sus propiedades físicas y químicas con un estándar de referencia. Los métodos analíticos seleccionados para detectar huellas digitales deben ser capaces de detectar el mayor número de componentes posibles. En ocasiones, resulta

favorable el empleo de una combinación de métodos analíticos con diferentes principios de separación y condiciones de análisis (Li *et al.*, 2008; Upton, 2009; Knoss, 2015).

Con la finalidad de identificar los principios activos o los compuestos marcadores en las especies de interés se preparan extractos (líquidos, sólidos, semisólidos o tinturas) utilizando agua, etanol y mezclas entre etanol y agua, entre otros disolventes. En su preparación es posible agregar sustancias inertes como vehículos o diluyentes para mejorar sus características físicas, o bien, adicionar agentes antimicrobianos o conservadores para preservar su integridad. Cuando se conocen los principios activos y/o marcadores de la especie, las monografías oficiales, incluyen procedimientos de ensayo cuantitativos para determinar su contenido. Sin embargo, en la mayoría de los casos se desconocen los componentes responsables del efecto farmacológico validado. Actualmente, los compendios farmacopéicos incluyen diferentes categorías de marcadores que pueden identificarse en las materias primas:

a) *Principios activos*, son los componentes responsables de la actividad farmacológica.

b) *Marcadores activos*, compuestos con actividad farmacológica conocida que contribuyen, en cierto grado, con la eficacia terapéutica. Para estas dos categorías las monografías establecen un intervalo o un contenido mínimo.

c) *Marcadores analíticos*, cuando no se conocen los principios o los marcadores activos se seleccionan otros componentes presentes en el extracto orgánico susceptibles de determinarse cuantitativamente. Estos marcadores ayudan a la identificación de la especie, y,

d) *Marcadores negativos*, son componentes con propiedades tóxicas o alérgicas cuya presencia en el extracto es indeseable. Un ejemplo de estos marcadores son los ácidos ginkgólidos presentes en el ginkgo (*Ginkgo biloba*). Para este tipo de productos, las monografías oficiales establecen límites muy estrictos (Li *et al.*, 2008; Upton, 2009; Knoss, 2015).

Es importante mencionar, que durante la identificación química se emplean estándares de referencia trazables; dichas sustancias pueden ser una entidad química única, una mezcla de entidades químicas purificadas o, un extracto estandarizado preparado a partir de un material vegetal autenticado. En todos los casos se compara la respuesta de la preparación

de prueba con los artículos de referencia para determinar la presencia de los indicadores de calidad en el material de prueba.

Una vez establecida la autenticidad botánica y química del material vegetal, el insumo herbolario, puede emplearse para elaborar preparaciones botánicas. Uno de los tipos de preparados botánicos más comercializados son los extractos. Los requisitos mínimos de calidad para estas preparaciones implican los siguientes requisitos farmacopéicos:

1.- *Envasado y almacenamiento*: los extractos botánicos deben almacenarse en envases impermeables y resistentes a la luz,

2.- *Etiquetado*: la etiqueta de estos insumos debe indicar el nombre de la parte de la planta utilizada; el nombre del disolvente empleado para su preparación; el contenido, en porcentaje, de los principios activos o marcadores identificados; el nombre y la concentración de los agentes antimicrobianos o conservadores y la relación entre el material inicial y el producto final. En el caso de los extractos semisólidos o en polvo debe indicarse la cantidad e identidad de los excipientes agregados,

3.- *Residuo de evaporación*: para los extractos en polvo no menos del 95% de la muestra permanece como residuo y para extractos semisólidos no menos del 70% de la muestra permanece como residuo,

4.- *Disolventes residuales*: si se emplean disolventes diferentes al agua y alcohol deberá determinarse el contenido de disolvente residual de acuerdo con las pautas farmacopéicas establecidas,

5.- *Residuo de plaguicidas*: los materiales vegetales deben analizarse y cumplir con los requisitos establecidos,

6.- *Metales pesados*: no debe rebasar el límite de 20 μg por gramo de extracto, y

7.- *Contenido de alcohol*: el límite establecido es entre 90.0 y 110.0% de la cantidad declarada en la etiqueta.

Por otro lado, los ingredientes botánicos empleados para la fabricación de preparados farmacéuticos no estériles deben cumplir con atributos de calidad adicionales. Es fundamental que durante la fabricación de estos productos se empleen las Buenas Prácticas de Fabricación para reducir al mínimo la contaminación microbiológica (Li *et al.*, 2008).

Desde el punto de vista microbiológico el desarrollo de una formulación incluye la evaluación de las materias primas y la contribución de cada ingrediente en la calidad final

del producto. La caracterización de estos elementos permitirá comprobar si el proceso de fabricación es adecuado. Todos los tratamientos previos al proceso de manufactura como secado, extracción, tratamiento térmico, irradiación o tratamiento de esterilización gaseosa deben evaluarse para garantizar que no causan cambios que afectan la seguridad y eficacia de los materiales vegetales.

Si bien, las normas y monografías oficiales consignan métodos y especificaciones de calidad para materiales vegetales, extractos y preparaciones herbolarias se requiere desarrollar además, la información que describa las condiciones previas a la cosecha para lograr un crecimiento adecuado y, la manipulación posterior a la cosecha para obtener una calidad uniforme con variaciones mínimas en la composición química.

En este sentido, se recomienda que los productores involucrados en la manipulación y distribución de productos botánicos se capaciten y cumplan con las guías emitidas por la OMS sobre buenas prácticas de agricultura y recolección de plantas medicinales. Considerando que el intercambio comercial de productos naturales se realiza en un mercado global, los materiales deben producirse y transportarse conforme a las leyes del país de origen y a los tratados internacionales pertinentes.

También, debe considerarse información complementaria de calidad como la historia farmacopéica, la procedencia, la recolección y el cultivo, los adulterantes comunes, el secado, el almacenamiento y el transporte.

La historia farmacopéica reúne la información relacionada con el uso tradicional de la especie y sustenta la seguridad y sus beneficios. El rubro de procedencia debe incluir el origen del material botánico, los lugares de cultivo (agrícola) y de recolección de plantas y, un listado de las principales áreas geográficas de producción. La recolección y el cultivo es información referente a la conservación de especies restringidas o escasas y, a la tendencia del cultivo como alternativa ecológica para preservar la integridad de las especies.

Con base en estas consideraciones, en el presente trabajo, se hará un particular énfasis en las pruebas de identidad y valoración como herramientas para evaluar la calidad de la droga cruda y los preparados elaborados a partir de *Hydrangea seemannii*, mediante la generación de perfiles cromatográficos y la cuantificación de los constituyentes mayoritarios presentes. A pesar de que existen varias técnicas analíticas empleadas para evaluar de forma cuantitativa los compuestos marcadores y/o principios activos, la cromatografía es la

técnica de separación más versátil y más utilizada para propósitos de control de calidad. Así, la generación de los perfiles cromatográficos representativos permitirá la identificación del mayor número de principios activos y/o de los compuestos marcadores (Liang *et al.*, 2004).

Las técnicas cromatográficas más empleadas incluyen a la cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) y cromatografía de gases (CG). También se usan otras técnicas de vanguardia como la espectrometría de masas (EM) y resonancia magnética nuclear (RMN), y finalmente las técnicas combinadas que involucran el uso acoplado de dos o más de las técnicas de análisis antes mencionadas. Existen pocos reportes en la literatura sobre el uso de la electroforesis capilar para el análisis de drogas crudas vegetales, no obstante, que ésta técnica de separación tiene la ventaja de ser rápida y de tener una buena eficiencia en la separación de analitos presentes en muestras complejas, sin embargo solo es de utilidad en la separación de analitos de naturaleza iónica (Liang *et al.*, 2004).

Así, la CLAE representa la técnica analítica más usada y confiable para la caracterización e identificación de constituyentes presentes en los extractos debido a las numerosas ventajas que presenta. Las razones de su versatilidad son su sensibilidad, su fácil implementación para la determinación cuantitativa precisa y exacta de los componentes presentes en mezclas complejas, como lo son las matrices herbolarias, su utilidad para la separación de componentes no volátiles y termolábiles y su aplicación en el análisis cualitativo y cuantitativo de compuestos presentes en matrices con multicomponentes, tales como los extractos vegetales y los preparados herbolarios.

Finalmente, es importante destacar, que el control de calidad es un importante medio para asegurar la eficacia y la seguridad de los preparados utilizados en la medicina herbolaria, y en éste proceso usualmente se monitorea la concentración los constituyentes activos presentes en estos preparados. Sin embargo, la composición de los productos herbolarios es compleja y en la mayoría de los casos la identificación de todos los compuestos activos es muy laboriosa.

3. Objetivos

El objetivo primordial del presente trabajo consiste en establecer las pruebas de identidad química y composición de la droga cruda de *Hydrangea seemannii* L. Riley, con la finalidad de establecer los criterios para su control de calidad, todo ello para generar parte de la información científica necesaria para elaborar las monografías farmacopéica y/o tipo Organización Mundial de la Salud (OMS) de la especie.

Para el cumplimiento del objetivo principal, se formularon los siguientes objetivos específicos:

- a) Establecer los parámetros de identidad química de la infusión obtenida a partir de la droga cruda mediante el establecimiento de los marcadores analíticos y perfiles cromatográficos.

- b) Desarrollar y validar un método analítico apropiado para cuantificar los marcadores analíticos del extracto acuoso aplicando la técnica de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE).

4. Parte experimental

4.1 Material vegetal

Las hojas de la especie medicinal *Hydrangea seemanii* L. Riley (Hydrangeaceae) fueron recolectadas en el municipio de San Rafael, estado de Chihuahua, México, en Noviembre del 2006 [Lote 1, voucher (Bye 33925)] y en Mayo del 2008 [Lote 2, voucher (Bye 35130)]. La identidad y la clasificación botánica de la especie fue establecida por el Dr. Robert Bye (Instituto de Biología, UNAM).

4.2 Preparación del extracto acuoso y fraccionamiento preliminar

La preparación del extracto acuoso de la especie objeto de estudio se realizó a partir de las hojas secas y molidas (9 g), mediante la técnica de infusión, utilizando 250 mL de agua hirviendo y dejando reposar el infuso durante 20 minutos. El extracto acuoso resultante se filtró y se sometió a un fraccionamiento preliminar mediante un proceso de reparto utilizando AcOEt como disolvente. Posteriormente, la fracción de AcOEt se concentró a sequedad en un evaporador rotatorio para generar 122.4 mg de muestra. La resolución de la fracción de AcOEt mediante cromatografía en columna abierta (cca) sobre Sephadex LH20 utilizando metanol como fase móvil, permitió el aislamiento de seis metabolitos secundarios pertenecientes a las categorías de los flavonoides [la isoquercetina, el hiperósido, la trifolina, la guajaverina, la astragalina y la juglalina] y tres derivados de ácidos aromáticos [ácidos clorogénico, 3,5-*di-O*-cafeoilquínico y 4,5-*di-O*-cafeoilquínico]. Todos los productos aislados fueron caracterizados mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales y mediante la comparación de sus constantes espectroscópicas con las reportadas en la literatura [**Figura 3**; Aguilar, 2013].

4.3 Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de la juglalina (1)

4.3.1 Identificación de los marcadores por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE)

La identificación de los productos naturales presentes en la infusión de *H. seemannii* se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención y la coelución de las referencias de isoquercetina, hiperósido, trifolina, guajaverina, astragalina y juglalina (1) mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE). Para ello, se prepararon las soluciones de la fracción de AcOEt y de las referencias a una concentración de 0.5 mg mL⁻¹, utilizando como disolvente una mezcla binaria entre EtOH-H₂O (2:8). Todos los perfiles cromatográficos se registraron utilizando una columna empacada con gel de sílice Symmetry C-8 (Waters®) [5 µm, 3.9 i.d. × 150 mm, 1.2 mL min⁻¹]; como sistema de elución, se utilizó un gradiente lineal de CH₃CN-H₂O (0.1% ácido fórmico; FA) (5:95→50:50) en 55 minutos. Las longitudes de onda (λ) utilizadas para la detección fueron 285 y 327 nm; todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente.

4.3.2 Desarrollo del método analítico por CLAE

Los análisis por CLAE se realizaron en un cromatógrafo de líquidos Marca Waters® (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, USA), equipado con un inyector de tipo manual (Rheodyne i7725), una bomba cuaternaria con un sistema de entrega de disolventes cuaternario (modelo 600) y un detector de UV Dual (modelo 2487). El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y la manipulación de la información se efectuaron utilizando el programa Empower® versión 2.0 (Waters). El método analítico se desarrollo empleando diferentes fases estacionarias C-8 y C-18 y diferentes mezclas de elución entre CH₃CN y H₂O acidificada con diversos agentes modificadores (ácidos acético, fórmico, tricloroacético y trifluoroacético, entre otros). La respuesta a evaluar durante el desarrollo del método analítico fue el registro del área bajo la curva (ABC). En síntesis, las mejores condiciones cromatográficas para validar la

metodología analítica conducente a realizar la cuantificación de la juglalina (**1**); componente mayoritario presente en la muestra analizada, se enlistan en el **Cuadro 1**. Los tiempos de retención (t_R) de los productos isoquercetina, hiperósido, trifolina, guajaverina, astragalina y juglalina (**1**) bajo estas condiciones, fueron de 21.8, 22.6, 25.9, 28.1 y 30.6 minutos, respectivamente.

Cuadro 1. Condiciones cromatográficas para el desarrollo del método analítico por CLAE.

juglalina (1)	
Fase móvil	CH ₃ CN–H ₂ O (0.1% ácido fórmico; FA)
Fase estacionaria	Symmetry C-8 [5 µm, 3.9 i.d. × 150 mm]
Velocidad de flujo (mL min ⁻¹)	1.2
Volumen de inyección (µL)	20
Longitud de onda de detección (nm)	285, 327

4.3.3 Validación del método analítico por CLAE

4.3.3.1 Preparación de la matriz de trabajo

La fracción de AcOEt (1 mg) de *H. seemannii* preparada como se describió en el inciso **4.2** de esta sección experimental, se disolvió en 1 mL de una mezcla de CH₃CN–H₂O (7:3). La solución resultante se filtró a través de membranas de nylon Acrodisc[®] de 0.45 µm y 13 mm de diámetro y se analizaron por cromatografía de líquidos.

4.3.3.2 Evaluación de los parámetros de calidad del método analítico

4.3.3.2.1 Adecuabilidad del sistema

El ajuste del sistema cromatográfico se determinó mediante el análisis de cinco réplicas de una solución de referencia de juglalina (**1**) con una concentración de 0.25 mg mL⁻¹. Los resultados obtenidos bajo estas condiciones experimentales se expresan en términos del factor de coe (T) y el número de platos teóricos (N). El criterio de aceptación

establecido en los protocolos de validación establece que el CV obtenido para la respuesta del analito debe de ser menor al 2.0%.

4.3.3.2.2 Linealidad del sistema

La linealidad del sistema se determinó mediante la preparación de cuatro curvas de calibración para la juglalina (**1**), con cinco niveles de concentración y preparadas por pesadas independientes, de acuerdo con el siguiente procedimiento: 10.0 mg de **1** se disolvieron en 10 mL de una mezcla de EtOH-H₂O (2:8) (1.0 mg mL⁻¹). A partir de la solución anterior, se prepararon las diluciones necesarias para que 1 mL de las mismas contengan entre 0.125 y 1.0 mg de juglalina (**1**). El esquema empleado para las diluciones de trabajo se resume en el **Cuadro 2**. El área bajo la curva (ABC) correspondiente al pico del analito, se graficó con respecto a la concentración de cada solución. El cálculo de la ordenada al origen (b₀), la pendiente de la recta (b₁), el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r²), se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple. Los parámetros obtenidos se compararon con los siguientes criterios: b₀= 0; b₁≠ 0; r ≥ 0.99; r² ≥ 0.98 e IC (b₁; que no incluye el cero). Se analizaron 4 réplicas por nivel de concentración.

Cuadro 2. Diluciones empleadas para evaluar la linealidad del sistema del método analítico por CLAE.

Nivel de concentración	Volumen de la alícuota (mL)	Aforo H ₂ O (mL)	Concentración final (mg mL ⁻¹)
1	0.625	4.375	0.125
2	1.25	3.75	0.25
3	2.5	2.5	0.50
4	3.75	1.25	0.75
5	0	0	1.0

4.3.3.2.3 Límites de detección (LD) y cuantificación (LC)

La evaluación de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se realizó mediante la construcción de una curva de calibración con una serie de diluciones preparadas a partir de una solución estándar con una concentración de 5.0 mg mL⁻¹ y cinco muestras blanco. Las diluciones contenían 0.625, 1.25 y 2.5 mg mL⁻¹ de la referencia a cuantificar. Se evaluaron tres réplicas por concentración y el área bajo la curva (ABC) del pico de interés se graficó con respecto a la concentración de la referencia en cada solución. Para el cálculo b_0 , b_1 , r y r^2 , se realizó un análisis de regresión lineal simple. Así, los LD y LC fueron determinados de acuerdo a las expresiones matemáticas que se indican a continuación:

$$LD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1} \qquad LC = \frac{10 \times S_{y/x}}{b_1}$$

4.3.3.2.4 Linealidad y exactitud del método

La evaluación de la linealidad y exactitud del método se estableció mediante la adición de tres diferentes concentraciones de una solución de referencia de **1** (1.5 mg mL⁻¹) comprendidas en el intervalo entre 0.25 y 0.75 mg mL⁻¹ a la matriz de trabajo (2.5 mg mL⁻¹) (**Cuadro 3**). Se evaluaron tres réplicas por concentración para así obtener los valores correspondientes del ABC. Estos valores se interpolaron en la curva de calibración desarrollada en el inciso **4.3.3.2.2** de esta sección experimental. La exactitud del método se calculó mediante el % de recobro, por otro lado, la linealidad del método se evaluó mediante un análisis de regresión lineal entre la cantidad adicionada (x) y la cantidad recuperada (y) y se calcularon los siguientes parámetros estadísticos: b_0 , b_1 , r y r^2 . Asimismo para cada nivel de concentración se determinó el promedio aritmético (\bar{y}) y el coeficiente de variación (CV). La exactitud se confirma si se cumplen los siguientes requisitos: el porcentaje de recuperación debe de encontrarse en un rango entre el 98.0–102.0% y el coeficiente de variación entre las réplicas no debe de ser mayor al 2.0%.

Cuadro 3. Preparación de las curvas para evaluar la linealidad y exactitud del método.

Nivel de concentración	Volumen de la solución de referencia (mL)	Volumen de la matriz de trabajo (mL)	Aforo H ₂ O (mL)
1	0.83	2.5	1.67
2	1.67	2.5	0.83
3	2.5	2.5	0

4.3.3.2.5 Precisión

La precisión del sistema o repetibilidad se estableció mediante el análisis de seis réplicas de una solución de referencia, preparadas por diluciones independientes a partir de una solución stock. Por otra parte, la precisión del método o precisión intermedia se evaluó mediante el análisis de seis réplicas de una muestra que contenía a la matriz de trabajo a una concentración de 2.5 mg mL⁻¹ enriquecida con 0.5 mg mL⁻¹ de **1**. El análisis se efectuó en dos días diferentes. Los resultados obtenidos bajo estas condiciones experimentales permitieron calcular la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV).

4.3.3.2.6 Análisis del contenido de juglalina (1) en diferentes muestras

Una vez validado el método analítico, diez miligramos de las muestras a analizar disueltos en 1 mL de una mezcla de CH₃CN–H₂O (7:3) se filtraron a través de membranas de nylon Acrodisc[®] de 0.45 µm y 13 mm de diámetro. La juglalina (**1**) presente en cada muestra se cuantificó registrando su perfil cromatográfico utilizando las condiciones analíticas indicadas en el inciso **4.4.2**. Para determinar el área bajo la curva (ABC) se utilizó el software del equipo. La cantidad en miligramos de cada muestra se calculó por medio de la interpolación en la ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración previamente diseñada.

5. Resultados y discusión

La estrategia metodológica general utilizada para la realización de este trabajo involucra el desarrollo y la validación de un método analítico por CLAE para identificar y evaluar el contenido de los compuestos marcadores en el extracto acuoso derivado de *H. seemannii*. Indudablemente, toda la metodología analítica desarrollada será de gran valor para el control de calidad de la planta sea cual fuere su utilidad comercial.

5.1 Identificación por CLAE de los principios activos y/o marcadores

La preparación de la matriz de trabajo se realizó a partir de las infusiones del material vegetal de acuerdo con la metodología que se describe en la parte experimental inciso 4.2, obteniéndose un porcentaje de rendimiento del 1.3% por cada gramo de material vegetal seco y molido.

La identificación de los compuestos activos presentes en la fracción de AcOEt (matriz de trabajo), se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención que presentaron cada uno de los compuestos empleados como referencias aislados en estudios químicos previos (Aguilar, 2013). De manera adicional, se realizó la co-elución de cada una de las referencias con la matriz de trabajo. Los tiempos de retención (t_R ; min) obtenidos para cada compuesto, bajo las condiciones de análisis, fueron los siguientes: isoquercetina (21.8), hiperósido (22.6), trifolina (25.9), guajaverina (25.9), astragalina (28.1) y juglalina (1, 30.6). Las longitudes de onda utilizadas para su detección permitieron establecer que todos los metabolitos absorben mejor a la longitud de onda de 285 nm. En la **Figura 4** se ilustra el perfil cromatográfico de la muestra utilizada como matriz de trabajo; como se observa la juglalina (1) es el compuesto mayoritario en la matriz. También, se observa que con estas condiciones cromatográficas no es posible determinar el contenido de trifolina y guajaverina debido a la sobre posición de sus señales o baja resolución entre éstas.

5.2 Desarrollo del método analítico

Para el desarrollo del método analítico se revisó, en primer lugar, los métodos publicados para determinar la presencia de flavonoides en diferentes matrices vegetales. Las condiciones cromatográficas descritas señalan el uso de columnas tipo C₈ o C₁₈ y sistemas binarios de disolventes (agua y acetonitrilo o MeOH) utilizando en la mayoría de los casos modificadores de pH [ácidos acético, fórmico, tricloroacético, trifluoroacético, etc.] (Liang *et al.*, 2004). Con base en estas consideraciones en el presente trabajo se evaluaron varias columnas C₈ y C₁₈, así como diversos sistemas de elución y flujo, hasta encontrar las mejores condiciones de separación de los compuestos presentes en la fracción de AcOEt.

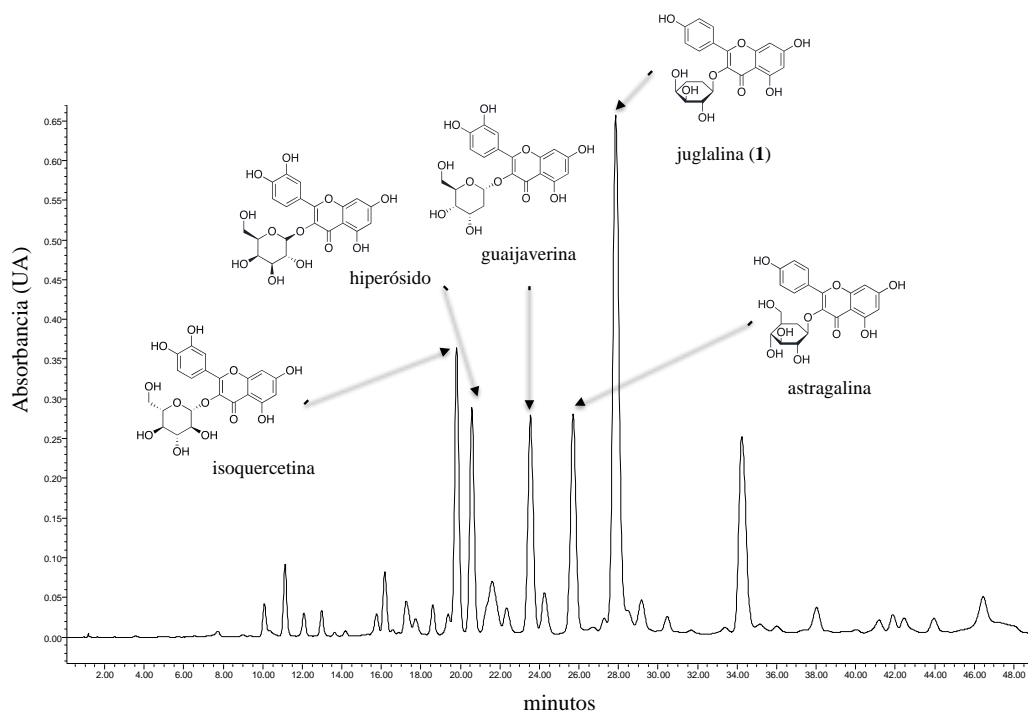


Figura 4. Cromatograma de la fracción de AcOEt obtenido por CLAE de *H. seemannii*. Fase móvil: sistema isocrático binario constituido por CH₃CN–H₂O (0.1% ácido fórmico; FA); flujo 1.2 mL min⁻¹; fase estacionaria: columna Symmetry C-8 [5 µm, 3.9 × 150 mm]; detección UV: 285 nm.

5.2.1 Establecimiento de las pruebas químicas de composición

Una vez que se desarrollan los métodos analíticos apropiados es necesario validar que estos cumplan con el propósito para lo cual fueron desarrollados mediante la elaboración de protocolos de validación (ICHQ2B, 2005 y documentos ahí citados).

En este contexto, con el objetivo de desarrollar una metodología que permita la identificación química de la especie y la valoración de uno de los marcadores analíticos en la especie *H. seemanii* (**Figura 4**) se desarrolló un método analítico utilizando la técnica de CLAE. La normalización de las áreas en el cromatograma permitió calcular que el 36.4, 19.0, 36.4, 19.0 y 15.3% corresponden a la isoquercetina, hiperósido, trifolina, guajaverina, astragalina y juglalina (**1**). La selección de la juglalina (**1**) como marcador para validar la metodología analítica se realizó con base en la cantidad disponible de este metabolito secundario aislado en un estudio fitoquímico previo (Aguilar, 2013).

5.2.2 Validación del método analítico para la cuantificación de la juglalina (**1**)

La valoración de la juglalina (**1**) se realizó siguiendo el protocolo descrito en el inciso **5.2.1** de esta sección.

Una vez desarrolladas las condiciones cromatográficas del método se ajustó experimentalmente la concentración de la matriz de análisis para obtener una respuesta analítica (área bajo la curva) del detector en un rango menor a 0.1 unidades de absorbancia. Posteriormente, se identificó la señal correspondiente a la juglalina (**1**) comparando su tiempo de retención con el compuesto empleado como referencia. Los resultados derivados de este análisis permitieron establecer una concentración para la solución de referencia del compuesto **1** de 1.5 mg mL⁻¹.

Por otra parte, se evaluó la adecuabilidad del sistema con la finalidad de establecer si el equipo, las operaciones analíticas y las muestras constituyen un sistema integro susceptible a evaluarse. Para ello, se realizaron una serie de inyecciones en el cromatógrafo de una solución de juglalina (**1**) a una concentración de 500 µg mL⁻¹. Los resultados obtenidos permitieron estimar que el valor del CV cumple con las especificaciones requeridas: coeficiente de variación (CV = 0.3%), por otro lado los valores de K', R, T y N cumplen

con los requisitos establecidos para métodos cromatográficos; factor de capacidad (K' ; 5.2), resolución (R ; 0.5), factor de coeio (T ; 0.5) y número de platos teóricos (N ; 650). Estos resultados nos permiten establecer que la columna Symmetry C-8 [5 μm , 3.9 i.d. \times 150 mm] separa de manera adecuada al analito de interés y la respuesta analítica observada es apropiada para cuantificar el contenido de juglalina (**1**) (FEUM, 2007).

A continuación se desarrolló el protocolo para validar el método analítico para cuantificar el compuesto marcador seleccionado, y así poder completar parte de la información científica necesaria para establecer la identidad y valorar el marcador presente en la droga cruda y preparados herbolarios comerciales de *H. seemannii*.

Los parámetros de calidad evaluados de acuerdo con las normas internacionales establecidas por la International Committee of Harmonization (ICH) y Eurachem incluyen: linealidad del método y sistema, precisión y exactitud (ICHQ2B, 2005).

5.2.2.1 Linealidad del sistema

La linealidad es la capacidad de un método analítico para obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, en un intervalo de concentraciones pertinentes con la aplicación analítica (ICHQ2B, 2005).

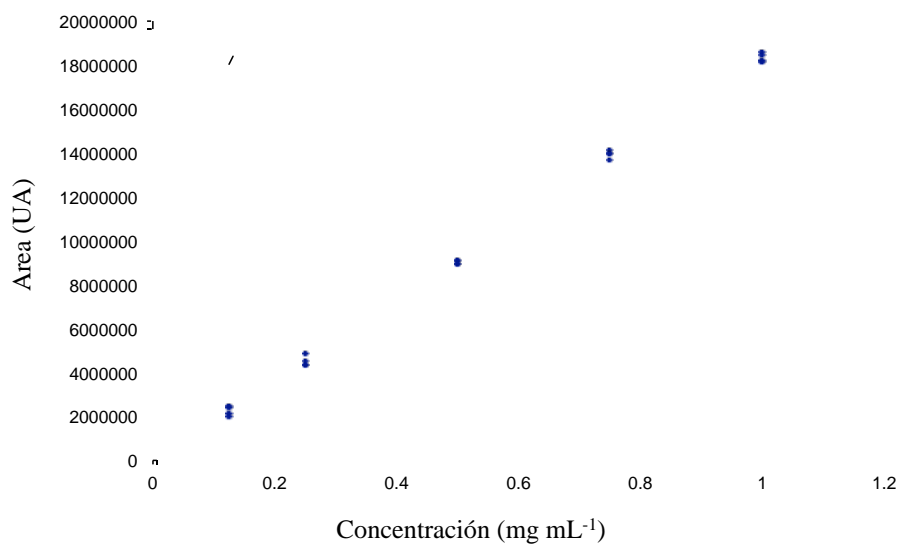
Este parámetro de calidad se evaluó de manera independiente para la juglalina (**1**) en un intervalo de concentraciones entre 0.125 y 1.0 mg mL⁻¹. Los datos obtenidos para la linealidad del sistema utilizando al producto **1** permitieron estimar el siguiente modelo lineal ajustado: $y = 2 \times 10^7 (\text{concentración}) - 101931.8$ (**1**).

Los resultados generados para evaluar este parámetro de desempeño se resumen en la **Tabla 1**. El ajuste de los datos se realizó mediante un análisis de regresión lineal simple y permitió establecer que el sistema es lineal en el intervalo de concentraciones analizadas [$r = 0.9989$]; este valor sugiere una relación lineal entre las variables de área y concentración (**Gráfica 1**). Considerando las cifras significativas y el criterio de aceptación establecido para este parámetro de calidad se concluye que el sistema se ajusta a un modelo de regresión lineal entre las variables. Por otro lado, el coeficiente de determinación (r^2) permite establecer que el 99.8% de la variabilidad en la respuesta se encuentra explicada por dicho modelo.

Finalmente, en el **Cuadro 4** se observa que el intervalo obtenido para la ordenada al origen incluye el cero mientras que, para la pendiente no incluye dicho valor, por lo tanto, el modelo cumple con las especificaciones establecidas para la linealidad del sistema. Un método es lineal cuando las respuestas analíticas que se derivan del mismo son directamente proporcionales a la cantidad de analito en la muestra objeto de análisis.

Tabla 1. Resultados experimentales de las curvas de calibración de la juglalina (**1**) para evaluar la linealidad del sistema.

réplica	1 (mg mL ⁻¹)	Área (UA)
1	0.125	2007536
2	0.125	2128536
3	0.125	2372422
4	0.125	2467296
1	0.25	4303629
2	0.25	4330108
3	0.25	4513557
4	0.25	4884050
1	0.5	9091451
2	0.5	8951404
3	0.5	8931895
4	0.5	9160762
1	0.75	14104416
2	0.75	14013083
3	0.75	13678921
4	0.75	13919085
1	1.0	18441605
2	1.0	18600569
3	1.0	18123944
4	1.0	18181943



Gráfica 1. Linealidad del sistema para cuantificar a la juglalina (**1**).

Cuadro 4. Resumen del análisis de regresión lineal simple: linealidad del sistema de **1**.

Estadístico	1
pendiente (b_1)	18499509.37
ordenada al origen (b_0)	-101931.8171
coeficiente de correlación (r)	0.9989
coeficiente de determinación (r^2)	0.998
IC (β_0)	$1.8 \times 10^7 - 1.9 \times 10^7$

5.2.2.2 Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección (LD) de un método se refiere a la concentración mínima de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada. El límite de cuantificación (LC) es la concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables. En el desarrollo del protocolo de validación ambos parámetros se determinaron a partir de una curva de calibración utilizando una serie de diluciones preparadas a partir de una solución estándar con una concentración de 5.0 mg mL^{-1} y cinco muestras blanco. Los valores de LD y LC calculados fueron 0.09 y 0.27 mg mL^{-1} , respectivamente.

5.2.2.3 Linealidad y exactitud del método

La linealidad del método se evaluó a partir de las curvas de calibración construidas utilizando tres diferentes concentraciones de la jugalina (**1**) adicionada a la matriz de trabajo. El rango de concentraciones empleadas fue en el intervalo entre 0.25 y 0.75 mg mL^{-1} ; que representan el 50–150% de los analitos ensayados (**Figura 5**).

En la **Tabla 2** se muestran los resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método. El modelo estimado para la curva de regresión ajustada fue $y = 0.9830 (\text{concentración}) + 0.0060$. Estos resultados indican que el método desarrollado es lineal y cumple con los

criterios de aceptación ($b_0=0$, $b_1=0$, $r \geq 0.99$, $r^2 \geq 0.98$ y $CV_{y/x} \leq 2.0\%$) establecidos en la norma internacional ICHQ2B (2005).

La exactitud del método se define como la concordancia entre el valor de concentración del analito en la matriz enriquecida obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Este parámetro de calidad se determinó mediante el análisis de los porcentajes de recobro indicados en las **Tabla 2**. Estos resultados se encuentran dentro de los límites establecidos por las guías de la ICH para métodos cromatográficos (98.0-102.0%). Por lo tanto, el método es exacto. Por otra parte, el ANADEVA del modelo permitió establecer que la pendiente calculada es igual a uno y el coeficiente de determinación indica que el 99.5% de los datos, respectivamente, se encuentran explicados por el modelo de regresión lineal.

Tabla 2. Resultados experimentales de la curva de calibración de la juglalina (**1**) para evaluar la linealidad y exactitud del método.

réplica	nivel	Concentración adicionada (mg mL ⁻¹)	Área (UA)	Concentración recuperada (mg mL ⁻¹)	recobro(%)
1	150	0.75	14036517.5	0.764	101.9
2	150	0.75	13555844.6	0.738	98.4
3	150	0.75	13345214.5	0.737	96.9
Promedio (% recobro)					99.1
1	100	0.5	9047390.5	0.495	98.9
2	100	0.5	9085001.5	0.497	99.3
3	100	0.5	9339828.5	0.510	102.1
Promedio (% recobro)					99.5
1	50	0.25	4472641.5	0.247	98.9
2	50	0.25	4500922.5	0.249	99.5
3	50	0.25	4568400.5	0.252	100.9
Promedio (% recobro)					100.7

5.2.2.4 Precisión

La precisión del método fue evaluada a través de la repetibilidad y la precisión intermedia. En la **Tabla 3** se resumen los valores de los coeficientes de variación calculados para el análisis de las muestras analizadas. En todos los casos, el coeficiente de variación obtenido fue menor al 2.0%. Por consiguiente, la variación obtenida está dentro del límite establecido por la FEUM, el cual debe ser menor o igual al 2.0%. Asimismo, la variación obtenida en diferentes días y con diferentes analistas (precisión intermedia), es menor que el límite especificado. Por lo tanto, el conjunto de resultados descritos nos permiten concluir que el método desarrollado es preciso.

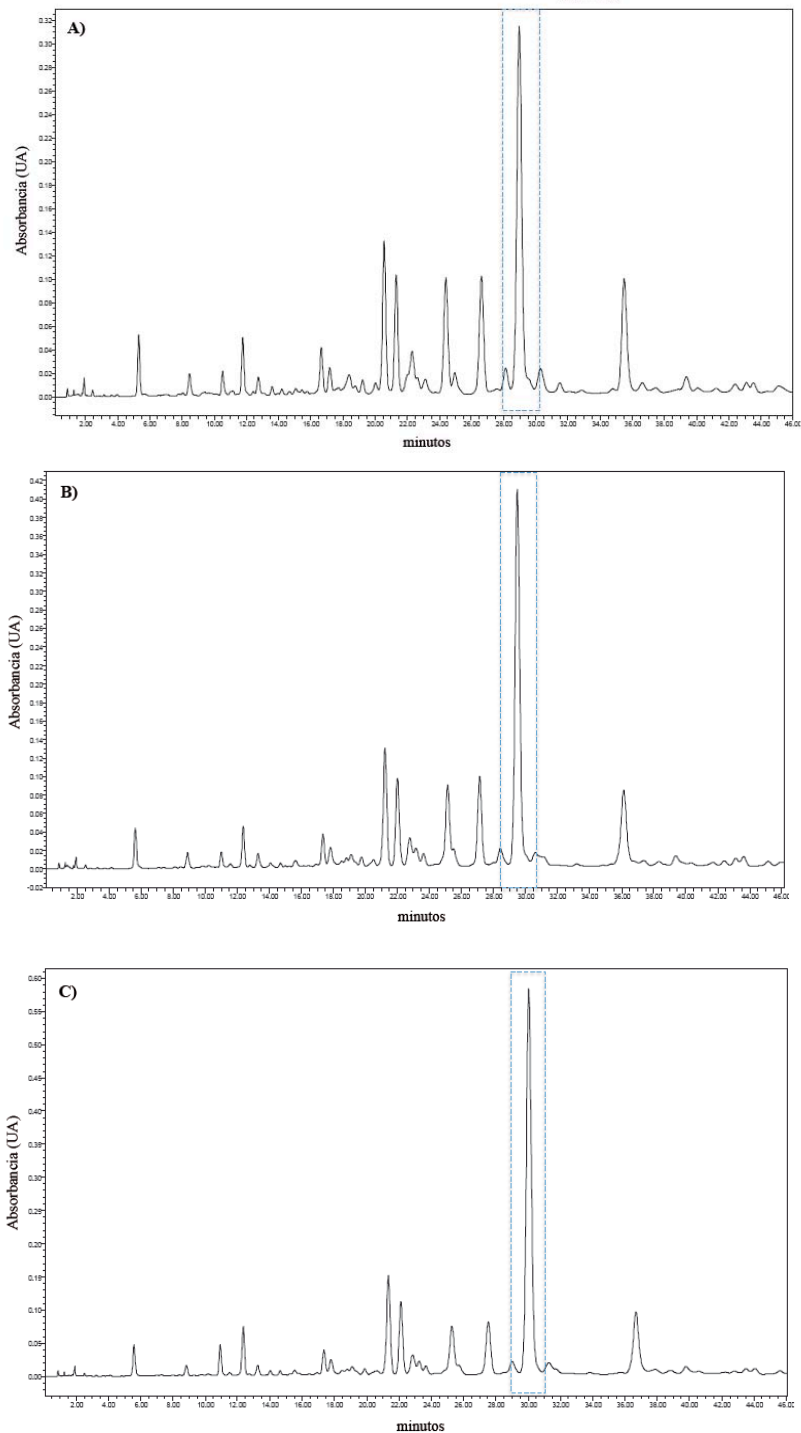
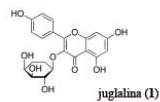


Figura 5. Cromatogramas de la matriz enriquecida con **1** [a) 0.25, b) 0.5 y c) 0.75 mg mL⁻¹] obtenidos por CLAE para la evaluación de la exactitud. Fase móvil: sistema isocrático binario constituido por CH₃CN–H₂O (0.1% ácido fórmico; FA); velocidad de flujo 1.2 mL min⁻¹; fase estacionaria: columna Symmetry C-8 [5 μm, 3.9 i.d. × 150 mm]; detección UV: 285 nm.

Tabla 3. Resultados experimentales para evaluar la precisión del método.

Réplicas	juglalina (1)^a	matriz enriquecida con 1 (2.5/0.5 mg mL⁻¹)^a
1	8489419	9884156
2	8630169	9809135
3	8489494	9951785
4	8659871	9889269
5	8543616	9481668
6	8488520	9779397
Promedio	8550181.5	9799235
S	77006.60621	167289.9014
CV (%)	0.9	1.7

^aEstos valores representan el promedio de los análisis efectuados por duplicado en dos días diferente

5.2.2.6 Cuantificación del contenido de juglalina (1) en diferentes muestras

Una vez validado el método analítico, se analizaron las concentraciones de juglalina (1) presente en las infusiones preparadas a partir de dos diferentes lotes de material vegetal. Las cantidades del componente marcador cuantificadas fueron: 220.8 mg/g y 159.2 mg/g para los lotes 1 y 2, respectivamente.

De tal manera, que con el presente trabajo, se establecieron las pruebas de composición de la infusión preparada a partir de las partes aéreas de *H. seemannii*. Esta información en conjunto servirá para la elaboración de la monografía farmacopéica que garantice el uso racional de la especie, cumpliendo así con el objetivo primordial del presente proyecto de tesis. Por otra parte, los flavonoides identificados fueron caracterizados como los marcadores activos responsables de las propiedades antidiabéticas demostradas previamente para este preparado en nuestro grupo de trabajo, ya que estos metabolitos actúan en conjunto sobre varios blancos moleculares específicos en contra de serias complicaciones de la diabetes o en la prevención de las mismas.

6. Conclusiones

a) Se desarrollo y valido un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para cuantificar a la juglalina (**1**) en la especie *H. seemannii*. El método validado es lineal, preciso y exacto en el rango de concentraciones ensayadas.

b) El método desarrollado permitió cuantificar a la juglalina (**1**) en dos diferentes lotes (1 y 2) de la droga cruda [220.8 y 159.2 mg por cada gramo de droga cruda, respectivamente] provenientes del estado de Chihuahua, México. Estos resultados nos permiten establecer que existen diferencias en el contenido del marcador en los lotes analizados, y en ambas muestras se cuantificaron cantidades importantes de **1**.

c) Finalmente, el presente trabajo constituye una aportación original para el control de calidad de *H. seemannii* y preparados mediante el desarrollo de las pruebas de identidad y composición de la infusión preparada a partir de las partes aéreas de la droga cruda.

7. Referencias bibliográficas

- Aguilar-Cruz María del Rocío. (2013) Principios hipoglucemiantes de *Hydrangea seemannii* (Hydrangeaceae). Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, Facultad de Química, UNAM.
- Ashraf Taha K., Fang-Rong C., Yue-Han L., Chung-Yi C., Chi-Chuang L., Patnam R. (2003) Chemical Constituents from the *Hydrangea chinensis*. *Archives of Pharmacal Research*, 26, 15-20.
- Bate-Smith EC. (1978) Astringent tannins of viburnum and *Hydrangea* species. *Phytochemistry*, 17, 267-270.
- Brindis-Hernández Fernando. (2011) Evaluación de la eficacia antihiper glucémica de *Ligusticum porteri* Coult., *Hydrangea seemannii* L. Riley y *Anoda cristata* (L.) Schltld. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas, Facultad de Química, UNAM.
- Bye R. (2009) Comunicación personal.
- Fang-Rong, C., Yue-Han L., Yu-Liang Y., Pei-Wen H., Ashraf T., K., Chung-Yi C. (2003). Secoiridoid glycoside and alkaloid constituents of *Hydrangea chinensis*. *Journal of Natural Products*, 66, 1245-1248.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). SSA, México, 2007.
- Feng WS., Zhang YL., Zheng XK., Zhu B., Yang LG., Li Z. (2010) A new flavonol glycoside from *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Seringe. *Chinese Chemical Letters*, 21, 690-692.
- International Conference on Harmonization (ICH Harmonized Tripartite Guideline) (2005) Validation of analytical procedures: Text and Metodology. Q2A y Q2B, Q2(R1).
- Knoss W. (2015) Harmonization of regulatory requirements in Europe to ensure quality, safety and efficacy of herbal medicinal products. En: Evidence-based validation of Herbal Medicine. Mukherjee, P. K. Edits; Elsevier.
- Li S., Han Q., Qiao C., Song J., Cheng C. L., Xu H. (2008) Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. *Chinese medicine*, 3, 7.

- Liang YZ., Xie P., Chan K. (2004) Quality control of herbal medicines. *Journal of chromatography B*, 812, 53-70.
- Matsuda H., Shimoda H., Uemura T., Ueda T., Yamahara J. (1999) Chemical constituents from the leaves of *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii* (III): Absolute stereostructures of hydramacrosides A and B, secoiridoid glucoside complexes with inhibitory activity on histamine release. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1753-1758.
- Matsuda H., Wang Q., Matsuhira K., Nakamura S., Yuan D., Yoshikawa M. (2008) Inhibitory effects of thunberginols A and B isolated from *Hydrangeae dulcis* folium on mRNA expression of cytokines and on activation of activator Protein-1 in RBL-2H3 cells. *Phytomedicine*, 15, 177–184.
- Upton R. (2009) Authentication and quality assessment of botanicals and botanical products used in clinical research. En: Evaluation of herbal medicinal products. Perspectives on quality, safety and efficacy. Houghton, P. and Mukherjee, P. K. Edits; Pharmaceutical Press, London-Chicago.
- Wang ZB., Gao HY., Yang CJ., Sun Z., Wu LJ. (2011) Novel cyanoglucosides from the leaves of *Hydrangea macrophylla*. *Helvetica Chimica Acta*, 94, 847-852.
- World Health Organization. (1993) WHO Research Guidelines for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines. Regional Office for the Western Pacific, Manila.
- World Health Organization. (1999) WHO Monographs on selected medicinal plants. Vol. 1. World Health Organization, Geneva.
- World Health Organization. (2011) The world medicines situation 2011. Traditional Medicines: global situation, issues and challenges. World Health Organization, Geneva.
- Yagi A., Ogata Y., Yamauchi T., Nishioka I. (1977) Metabolism of phenylpropanoids in *Hydrangea serrata* var. *thunbergii* and the biosynthesis of phyllo dulcin. *Phytochemistry*, 16, 1098-1100.
- Yamahara J., Matsuda H., Shimoda H., Wariishi N., Yagi N., Murakami N. (1995) Effects of thunberginol a contained in *Hydrangeae dulcis* folium on types I-IV allergies. *Folia Pharmacologica Japonica*, 105, 365–379.
- Yoshikawa M., Uchida E., Chatani N., Kobayashi H., Naitoh Y., Okuno Y. (1992). Thunberginols C, D, and E, new antiallergic and antimicrobial dihydroisocoumarins, and Thunberginol G 3'-O-glucoside and (-)-Hydrangenol 4'-O-Glucoside, new

dihydroisocoumarin glycosides, from *Hydrangeae dulcis* folium. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 40, 3352–3354.

- Zhang H., Matsuda H., Kumahara A., Ito Y., Nakamura S., Yoshikawa M. (2007) New type of anti-diabetic compounds from the processed leaves of *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii* (*Hydrangeae Dulcis Folium*). *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 17, 4972–4976.

- Zhang H., Matsuda H., Yamashita C., Nakamura S., Yoshikawa M. (2009) Hydrangeic acid from the processed leaves of *Hydrangea macrophylla* var. *thunbergii* as a new type of anti-diabetic compound. *European Journal of Pharmacology*, 606, 255–261.