

11
29.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO PARA MEDIR
EL CONTENIDO DE ALCALOIDES EN LUPINOS
POR CROMATOGRAFIA DE GASES

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

LILIANA DELGADO MARTINEZ

MEXICO, D.F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

257327



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 está 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	Prof. Sotelo López Angela
Vocal	Prof. Cervera Flores Ernestina
Secretario	Prof. Lucas Florentino Bernardo
1er. Suplente	Prof. Cornejo Barrera Lucía
2o. Suplente	Prof. Sousa Riojano Hugo

El tema fue desarrollado en el laboratorio 111 del Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química, Ciudad Universitaria.

M. en C. Angela Sotelo López



Liliana Delgado Martínez



INDICE

I. Introducción	6
II. Antecedentes	8
Lupinos	8
Alcaloides	11
Cromatografía de gases	19
Validación del método	35
III. Metodología	38
IV. Resultados y discusión	45
V. Conclusiones	68
VI. Apéndice	69
VII. Bibliografía	70

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química porque es un orgullo pertenecer a ellas.

A la M. en C. Angela Sotelo L. por su asesoría y apoyo para la realización de este trabajo.

A la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA) por la ayuda brindada para la elaboración del proyecto.

Al M. en C. Bernardo Lucas, a Hugo y a Lety por la ayuda recibida en el laboratorio.

A mis padres Jorge y Filo por su gran ejemplo, amor, comprensión y la formación que me han dado.

A mis hermanos Raquel, Abraham y Marco por su ejemplo y cariño.

A Mauricio y a Lichin por su afecto.

A todos mis amigos por el apoyo que siempre me han dado.

I. INTRODUCCIÓN.

La planta de lupino pertenece a las leguminosas, sus semillas tienen un alto contenido de proteína y grasa, en algunas especies por arriba del 40 y 20% respectivamente, por lo que en nuestro país, representan una nueva fuente de nutrimentos para consumo humano y animal. Estas plantas presentan las ventajas de crecer en suelos de calidad pobre y de adaptarse a diversas temperaturas (Cuadra, *et al*, 1994). Sin embargo, la utilización de esta leguminosa se ha limitado por la presencia de alcaloides tóxicos.

Los alcaloides quinolizidínicos son el factor tóxico más importante encontrado en los lupinos. En referencia al contenido de otros factores antinutricionales se consideran no tóxicos (Greirson, *et al*, 1991). Además de su toxicidad los alcaloides proporcionan a la planta un sabor amargo que disminuye su palatabilidad.

Los lupinos se encuentran distribuidos principalmente en América en donde se conocen aproximadamente 300 especies en comparación con las 12 especies que se han encontrado en Europa (Wink, *et al*, 1995). En nuestro país se han encontrado diferentes especies en diversas zonas pero para su utilización primero se debe realizar un estudio que demuestre su inocuidad.

Para consumir la planta es necesario que el contenido de alcaloides sea bajo, para el caso de variedades amargas primero deben ser eliminados los alcaloides; en el proceso de detoxificación es importante conocer la composición de alcaloides ya que cada uno presenta diferentes toxicidades y amargor (Hatzold, *et al*, 1983), al reducir la cantidad de alcaloides se debe poner mayor atención a aquellos que son más tóxicos. Por esta razón es necesario el desarrollo de una metodología que nos permita cuantificarlos individualmente.

Se han desarrollado diferentes metodologías para la cuantificación de los alcaloides de lupinos siendo la más común y aceptada la cromatografía de gases, sin embargo, existen muy pocos datos reportados sobre la validación de algún método que utilice este instrumento. Al tener una metodología validada se pueden analizar diferentes especies de lupinos con la seguridad de obtener datos confiables. Una vez obtenidos estos resultados se puede continuar con el estudio de aquellas especies que, por su bajo contenido de alcaloides, presenten ventajas sobre otras para ser utilizadas en la alimentación.

El objetivo de esta tesis es desarrollar una metodología validada que permita estudiar las semillas de las especies de lupinos encontradas en nuestro país en relación a su contenido de alcaloides para poder aprovecharlas como fuente de nutrimentos en la alimentación.

II. ANTECEDENTES.

Lupinos.

Los lupinos son leguminosas con altos contenidos de proteína (más de 40%) y grasa (más de 20%), incluso mayores a los de la soya, con 34% de proteína y 18% de grasa (Wink, *et al*, 1995). Por esto resultan importantes como una fuente alternativa de proteína y grasa en la alimentación. Se clasifican en variedades dulces con un bajo contenido de alcaloides y variedades amargas con un contenido entre 1-2%, aunque en algunos casos se ha encontrado hasta un 4% de alcaloides. (Chango, *et al*, 1993). El género *Lupinus* forma una subtribu dentro de la Genisteeae que pertenece a la familia Fabaceae. (Wink, 1995)

La producción de semillas de lupinos corresponde aproximadamente al 1% de la producción total de granos de leguminosas en todo el mundo. Se ha usado principalmente para alimentación animal aunque en algunos países asiáticos está aumentado su aceptación como alimento para consumo humano con alto contenido de proteína. Los lupinos son cultivados principalmente en Australia ya que estos pueden crecer en suelos arenosos semiáridos, en climas fríos y son tolerantes a las heladas; cuando rotan los cultivos con trigo la producción de trigo aumenta debido a los efectos de enriquecimiento del suelo. Algunos juegan un papel importante en el mantenimiento de los niveles de nitrógeno en el suelo, aunque pueden tolerar la falta de agua mejor que la soya o los frijoles pero no son tolerantes a las sequías. Usan el fósforo existente en el suelo que algunos otros cultivos no pueden utilizar.

Concentraciones elevadas de alcaloides (>0.02%) imparten un sabor amargo al paladar. (Brooke, 1996). Entre el 0.02 y 0.01% es el contenido de alcaloides considerado aceptable en cuanto amargor por lo habitantes andinos, a estas concentraciones los humanos no presentan toxicosis por ingestión de lupinos pero

la variación en toxicidad de los diferentes lupinos hace difícil aplicar generalidades (Keeler, 1980). El rechazo a la alimentación ocurre en niveles tan bajos como 0.03% por lo que en Australia se ha aprobado el uso de la harina de lupino para la fabricación de pan mientras el contenido de alcaloides no exceda el 0.02%. (Priddis, 1983)

Otros de los factores que afectan la utilización de los lupinos son: 1) su contenido de galactanos, carbohidratos pobremente digeridos que se acumulan en el intestino y estimulan la fermentación bacteriana; y 2) una alta fracción de sus proteínas son proteínas de almacenamiento, globulinas, las cuales son deficientes en aminoácidos azufrados, por lo que es importante suplementar con una cantidad adecuada de metionina cuando se encuentren los lupinos como principal fuente de proteína en la alimentación. (Cheeke, 1989, Chango, 1993)

Casi todas las leguminosas contienen sustancias tóxicas o antinutricionales por las cuales requieren un tratamiento especial antes de ser consumidas. Los productos del lupino para consumo animal o humano, tales como los lupinos detoxificados con agua o alcohol, muestran concentraciones de ácido cianhídrico tóxica, nutricional y fisiológicamente sin importancia. En cuanto a hemaglutininas las bajas cantidades que se han encontrado no resultan importantes ya que para su consumo los lupinos son preparados y durante su preparación estos componentes son destruidos. El contenido de alcaloides parece ser el único componente antinutricional significativo ya que los niveles de otros factores antinutricionales como fitatos, α -galactósidos, taninos e inhibidores de tripsina son menores a los que se encuentran en otras leguminosas y comparables con los de algunos cereales. (Greirson, et al, 1991)

A fin de cultivarlos se han seleccionado variedades de lupinos dulces para evitar los alcaloides, sin embargo, estas variedades son menos resistentes a las enfermedades y al ataque de los herbívoros por lo que no es conveniente eliminar estos factores de resistencia natural. Una alternativa que se ha practicado es el cultivo de las plantas ricas en alcaloides y ya cosechadas se eliminan los alcaloides de las semillas por extracción, de otra forma la producción de lupinos dependería de plaguicidas que representan un problema económico y ambiental. (Cuadra, et al, 1994). Se debe alcanzar un balance entre las necesidades agronómicas y la calidad del producto final ya que para la persona que lo cultiva

será importante que sea resistente a los ataques de las plagas mientras que para el que desarrolla los alimentos es preferible que esté libre de alcaloides, sea palatable y digerible. Los lupinos con alto contenido de alcaloides pocas veces sufren el ataque de los herbívoros y a menudo son plantas dominantes en asociaciones de plantas en zonas de clima templado. La única diferencia entre los lupinos dulces y los amargos es la acumulación de alcaloides así otros aleloquímicos están presentes en las dos formas por lo que aún presentan cierta resistencia aún en ausencia de los alcaloides, especialmente en raíces donde se encuentra una fuente rica de isoflavonas antifúngicas. Una opción para evitar los alcaloides es producir extractos de proteínas, grasas, aminoácidos y fibras dietarias puros a partir de las semillas amargas.

En algunos estudios hechos con ganado porcino se ha encontrado disminución de la ingesta cuando la dieta se ha adicionado de lupinos observando rechazo a la alimentación, bajo consumo y vómito. Se cree que el consumo es disminuido por el sabor amargo que presenta la dieta. Después de haber tratado térmicamente las semillas de lupino no hubo cambio en la velocidad de crecimiento de los puercos alimentados con lupinos por lo que se concluyó que no existen factores termolábiles en las semillas de lupinos que afecten el crecimiento. También observaron baja disponibilidad de la lisina siendo este un factor importante que afecta el crecimiento. Otro factor que se encontró que afecta el crecimiento en este tipo de ganado es la cantidad de manganeso que acumula la planta sobre todo cuando crece en suelos ácidos, se encontró que el hierro puede disminuir el efecto adverso del manganeso, ya que el exceso de este último provoca la inhibición de la formación de hemoglobina a través de la inhibición de la absorción de hierro. En cuanto a los estudios encontrados en aves también se observó una depresión del crecimiento debida a una depresión del apetito causada por los alcaloides. (Cheeke, 1989)

Las semillas de lupino pueden ser usadas directamente en la alimentación de ganado, ya sea enteras, fraccionadas o molidas. En el caso del ganado vacuno el lupino puede reemplazar hasta el 65% del consumo de soya en la dieta de una vaca que da leche y se usa como un suplemento de proteína satisfactorio en el ganado para carne. En el caso de las ovejas el lupino entero puede reemplazar el 100% del consumo de soya. Para el ganado porcino puede reemplazar hasta el

20% de la dieta total, en este caso y en el de las aves es necesario suplementar con metionina. Las cascarillas de los lupinos y la harina se han incorporado a pastas y panes para consumo humano; el lupino también se ha empleado en la elaboración de cereales crujientes, botanas, sopas, fórmulas infantiles y ensaladas.

Alcaloides.

Una de las estrategias de defensa en contra de los herbívoros, microorganismos y plantas competidoras es la producción de metabolitos secundarios con propiedades tóxicas o repelentes, entre estos metabolitos se encuentran los alcaloides. Estos compuestos pueden ser expresados constitutivamente, activados mediante un daño o su síntesis *de novo* puede ser inducida por elicitores. La principal actividad de los alcaloides en la planta es ser una defensa química en contra de los herbívoros, al ser compuestos amargos actúan como un factor de anti-palatabilidad hacia los mamíferos herbívoros. (Cheeke y Kelly, 1989). La sensibilidad al sabor amargo de los lupinos aumenta de ovejas y conejos a ratones y cerdos. Esto indica que los mamíferos son capaces de detectar y evitar niveles peligrosos de alcaloides quinolizidínicos en la dieta. Además los alcaloides tienen otras funciones como transportadores de nitrógeno a través del floema y almacenamiento de nitrógeno en la semilla.

Químicamente los alcaloides son un grupo de compuestos diferentes que tienen como características comunes el presentar propiedades alcalinas, estar constituidos de un anillo heterocíclico que contiene nitrógeno, derivarse biosintéticamente de varios aminoácidos, dar reacciones características de color con varios reactivos y mostrar efectos farmacológicos en varios tejidos y órganos humanos y de otras especies animales.

Los lupinos contienen alcaloides quinolizidínicos que contienen como parte fundamental una base quinolizidínica; los más simples presentan una estructura bicíclica como la lupinina, existen tricíclicos como la angustifolina y citisina mientras que la mayoría son tetracíclicos entre los que se encuentran esparteina,

lupanina y anagirina. Esta última es de mayor importancia ya que se ha encontrado que es teratogénica en algunas especies. Existen varios isómeros para cada uno de los principales alcaloides. Se han encontrado más de 170 estructuras de alcaloides quinolizidínicos. En la figura 1 se pueden observar las estructuras de los alcaloides utilizados así como de la cafeína que se usó como estándar interno.

El sitio principal de síntesis de estos alcaloides en los lupinos son las hojas en crecimiento, estos son transportados a otras partes de la planta vía el floema, especialmente a las semillas y son almacenados en las vacuolas. Es por esta razón que los perfiles de alcaloides son más variados en las hojas que en las semillas. También son almacenados en partes importantes para la supervivencia y reproducción como flores, frutos, semillas y raíces. La localización de los alcaloides en tejidos epidérmicos puede ser interpretada como una adaptación estratégicamente importante ya que este tipo de tejido es el primer contacto con los herbívoros y patógenos. Aunque un gran número de plantas silvestres presentan alcaloides sólo se encuentran en pocas plantas cultivadas. Estos alcaloides se encuentran principalmente distribuidos dentro de la familia Leguminosae.

La esparteína, lupanina y otros alcaloides quinolizidínicos tienen propiedades antiarrítmicas, de los cuales únicamente la esparteína se encuentra disponible comercialmente, sin embargo aproximadamente 10% de los pacientes son incapaces de metabolizarla y sufren una intoxicación por esparteína. Debido a estos efectos secundarios y a la disponibilidad de nuevos fármacos sintéticos se ha restringido el uso de la esparteína en la medicina. La esparteína también ha sido utilizada en obstetricia ya que induce la contracción del útero y acelera el parto por favorecer la síntesis de prostaglandina F (Hatzold, 1983). La esparteína, lupanina y 13-hidroxilupanina tienen propiedades hipotensivas y depresoras del sistema nervioso central además de ser hipoglicémicas. La matrina y la citisina son amebicidas.

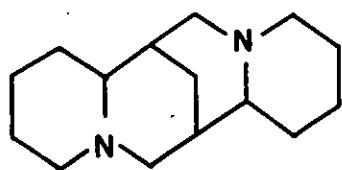
Algunas de estas propiedades farmacológicas pueden ser explicadas a través de la modulación del receptor de la acetilcolina y de los canales de K^+/Na^+ (Cheeke, 1989). Schmeller (1994) estudió el enlace de los alcaloides quinolizidínicos a los receptores nicotínico y muscarínico de acetilcolina encontrando que la N-

metilcitisina y la citisina son los que muestran mayor afinidad al receptor nicotínico de todos los alcaloides estudiados; la lupanina, que se encuentra ampliamente distribuida en estas plantas, fue 100 veces más activa que las lupaninas hidroxiladas, por otra parte la esparteína y la 3 β -hidroxilupanina mostraron gran afinidad por el receptor muscarínico. Además la inhibición de los canales de Na⁺ y K⁺ que se ha encontrado, por parte de la esparteína y lupanina, puede potenciar la toxicidad causada por el enlace a los receptores de acetilcolina. Debido a que la transducción de la señal sináptica es un proceso vulnerable e importante los alcaloides tienen propiedades tóxicas sobre un gran número de organismos, aunque su toxicidad se ha demostrado principalmente en insectos.

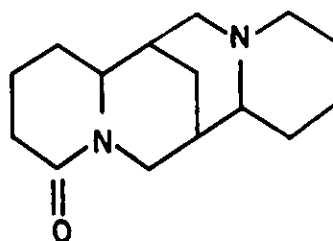
Se ha demostrado que el consumo de lupinos que contienen anagirina produce deformidades en los fetos de bovinos a lo que se ha denominado como enfermedad de deformación del becerro. La deformidad ocurre en los fetos cuando la vaca consume lupinos tóxicos entre los 40 y 70 días de gestación. Esta deformidad congénita se caracteriza por miembros torcidos o encorvados, curvatura de la columna, cuello torcido y/o paladar dividido. Los efectos tóxicos de los alcaloides del lupino no son acumulativos y los alcaloides son rápidamente excretados del cuerpo por el riñón, por lo que se pueden comer grandes cantidades de semilla de lupino siempre que la cantidad de alcaloides no pase de un cierto nivel. (Meeker 1987, Cheeke y Kelly 1989; Papadoyannis y von Baer 1993, Múzquiz 1993)

Los efectos neurológicos como nerviosismo, ataxia y convulsiones son los signos principales de toxicidad por alcaloides quinolizidínicos. (Smolenski, *et al*, 1981). En animales de laboratorio se han notado temblores, convulsiones y paro respiratorio. El ganado muestra síntomas similares como depresión, dificultad de respirar, temblor, convulsiones y parálisis respiratoria. Los signos son los encontrados en parálisis respiratoria y no son específicos para este tipo de alcaloides. Los alcaloides quinolizidínicos en humanos pueden producir malestar, náusea, midriasis y paro respiratorio también produce ataxia, diaforesis, debilidad progresiva y coma (Keeler, 1980). El grado de envenenamiento y la variación en los síntomas dependerá de la especie de lupino que sea consumida, del estado de madurez fisiológica de la planta y de la especie del animal.

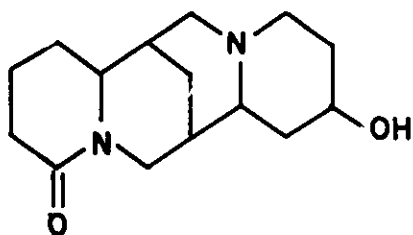
Esparteína



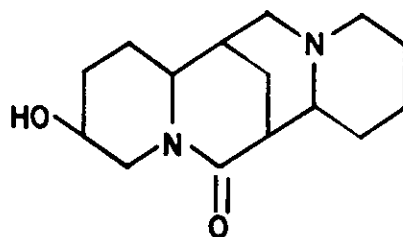
Lupanina



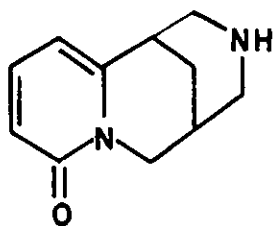
13-Hidroxilupanina



3-Hidroxilupanina



Citisina



Cafeína

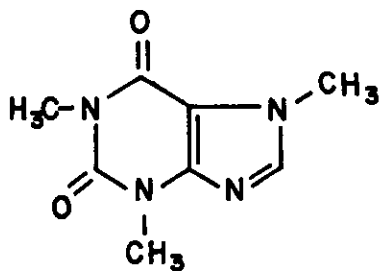


Figura 1. Estructuras de algunos alcaloides quinolizidínicos y de la cafeína

El metabolismo de los alcaloides quinolizidínicos en animales se lleva a cabo vía oxidación por el citocromo P-450, las reacciones se llevan a cabo en el hígado dando lugar a metabolitos reducidos vía oxidación del nitrógeno terciario. En esparteína el metabolito más importante que se produce es la 2-dehidroesparteína. El metabolismo de la esparteína en humanos exhibe polimorfismo genético: los metabolizadores extensivos y los pobres. Los metabolizadores pobres excretan el alcaloide sin cambios en la orina; en el otro grupo la esparteína es metabolizada a 2-dehidroesparteína. La lupanina es excretada sin ningún cambio en orina de rata y caballo. La hidroxilupanina también es excretada por ratas. (Cheeke, 1989)

Debido a que la mayoría son básicos se pueden disociar en soluciones acuosas. Es importante considerar que un alcaloide se encontrará disociado o no dependiendo del pH en el que se encuentre (por arriba o por debajo de su pKa) y que el pKa puede desplazarse si se trata de una solución no acuosa.

La tabla 1 que se presenta a continuación muestra algunas de las propiedades de la citisina, lupanina y esparteína, alcaloides que han sido más estudiados por su mayor toxicidad y que fueron utilizados en el desarrollo de este trabajo.

Tabla 1. Propiedades de la citisina, lupanina y esparteína

Propiedad	Citisina	Lupanina	Esparteína
Pto. ebullición	218°C	185-195°C	173°C
pKa1	6.11		2.24
pKa2	13.08		9.46
Soluble en:	agua, acetona, alcohol, benceno, etilacetato, cloroformo	agua, alcohol, éter, cloroformo	agua, alcohol, cloroformo o éter
Insoluble en:	éter de petróleo	éter de petróleo	
LD ₅₀ oral en ratón	101 mg/kg	410 mg/kg.	220 mg/kg.

(Merck Index)

La dosis letal de citisina en ratón es de 1.73 mg/kg por aplicación intravenosa, 9.4 intraperitoneal y para gatos es de 3mg/kg de peso corporal, en comparación con la de lupanina que se encuentra en un rango de 75 a 110 mg/kg de peso corporal para diferentes especies animales, para esparteina 51-100 mg/kg y la 13-hidroxilupanina presenta menor toxicidad con 456 mg/kg que se han reportado para el cerdo guinea; estos últimos datos están referidos a aplicación subcutánea. (Hatzold, 1983)

Existen diferentes métodos para extraer los alcaloides, algunos rústicos usados por diferentes poblaciones y otros empleados en el laboratorio. En los Andes "desamargaban" los lupinos hirviéndolos en agua por 30 minutos y después colocándolos en corrientes de agua durante tres días; técnica que además de tardada presenta la desventaja de que se pierden carbohidratos solubles y otros nutrimentos ya que entre el 25 y 60% de materia seca y proteína se pierde durante este proceso. (Keeler 1980, Cheeke y Kelly 1989)

De los métodos utilizados en el laboratorio, una vez que se ha obtenido el extracto de alcaloides estos pueden ser purificados y usados en farmacia o como plaguicidas. Así al eliminar los alcaloides se obtiene por un lado un material comestible y por el otro un residuo utilizable. Se podrían utilizar como plaguicidas debido a que son biodegradables, no se acumulan en el suelo y pueden ser rápidamente metabolizados por plantas. Serían un plaguicida relativamente barato considerando que son el subproducto del cultivo de una planta que proporciona proteínas, lípidos y fibra. El cultivo de lupinos resulta una buena alternativa considerando la necesidad de proteína e insecticidas inocuos principalmente en el tercer mundo.

Métodos empleados en la determinación de alcaloides en lupinos.

Los métodos reportados en la bibliografía se pueden clasificar en tres métodos generales de extracción de los alcaloides, que se fundamentan en su carácter básico, las diferencias que existen entre los métodos sólo están dadas por los disolventes hidrofóbicos y las soluciones acuosas ácidas utilizadas, en algunos casos usan cloroformo y en otros diclorometano y las soluciones pueden ser de ácido sulfúrico, clorhídrico o tricloroacético.

1. Extracción con un disolvente no acuoso: el polvo es humedecido con solución alcalina y se añade el disolvente. La mezcla se agita vigorosamente y luego se filtra o centrifuga para eliminar las partículas sólidas. Una alícuota de la capa orgánica clara se inyecta o se hace otra extracción para purificar, en este caso se aplica un ácido mineral diluido (por ejemplo HCl 0.1M) y entonces los compuestos básicos, incluyendo los alcaloides, pasan a la fase acuosa. Se separan las fases y la acuosa se extrae con un disolvente hidrofóbico. El disolvente se evapora y el residuo se redissuelve. Una modificación es que el material húmedo alcalino se coloca en el recipiente de Soxhlet y se extrae con el disolvente adecuado. Una desventaja que presenta esta técnica es el manejo de la muestra después de basificar ya que se humedece la harina, formando grumos, la cual debe agitarse para alcalinizarla homogéneamente.

2. Usando un disolvente hidrofílico fuertemente polar, a menudo con un poco de ácido (ácido acético por ejemplo). Se agita y se filtra o centrifuga. el sobrenadante claro se hace alcalino y se extrae con un cloroalcano o mezcla de cloroalcano-alcohol. Si es necesario se elimina el agua disuelta en la capa orgánica separada antes de la evaporación. Se puede secar con sulfato de sodio anhidro. Después se evapora el disolvente en atmósfera de nitrógeno o a presión reducida. El residuo se reconstituye, se puede inyectar o hacer otra extracción.

3. En este caso se hace la extracción con una mezcla de etanol-agua, se evapora el etanol quedando una fase acuosa que es purificada a pH ácido con éter y diclorometano, eliminando grasas y ésteres de alcaloides. Se alcaliniza y se extrae con cloroalcano. La fase orgánica puede ser inyectada.

Greirson y colaboradores probaron metanol al 70%, buffer de citratos (pH 2) y 5% de ac. tricloroacético como disolventes para la extracción de los alcaloides encontrando la última solución como la más conveniente.

Considerando que los alcaloides poseen diversas estructuras, para su detección es necesario hacer reaccionar un extracto con 7 diferentes reactivos para alcaloides, que dan reacciones de precipitación, la presencia de alcaloides se comprueba si todos dan reacción positiva. En los casos de los reactivos de Mayer (cloruro de mercurio y yoduro de potasio) y reactivo de Dragendorff (nitrato de bismuto y yoduro de potasio) se forman productos de adición con el nitrógeno. El

reactivo de Wagner (triyoduro de potasio) forma complejos con los alcaloides. Los reactivos de Sonnenschein (ácido fosfomolibdénico), Scheibler (ácido fosfotúngstico) y de ácido silicotungsténico forman sales insolubles. Por último con el reactivo de Hager (ácido picrico) existe atracción entre este ácido orgánico y los alcaloides dando lugar a una sal insoluble. Se pueden obtener reacciones falsas positivas debido a la presencia de proteínas, purinas, cumarinas y polifenoles.

Dentro de los métodos para cuantificar alcaloides la titulación nos permite conocer la cantidad de alcaloides totales, se basa en el carácter básico de estos y presenta las desventajas de una titulación como son los errores que se asocian al usar indicadores coloridos, en donde el fin de la titulación no siempre es claramente visible. Se ha utilizado el éster de etil-tetrabromofenoltaleina ya que presenta las ventajas de ser un indicador sensible que no es afectado por cantidades pequeñas de humedad en la muestra. Puede usarse como un método rápido que permite estimar la cantidad de alcaloides totales (Ruiz, 1976). Este método puede ser mejorado con la utilización de un potenciómetro.

También se ha reportado un método gravimétrico que permite calcular la cantidad de alcaloides totales y que se basa en la precipitación de un extracto de los alcaloides con ácido tungstosilícico, el precipitado se incinera y se pesa. Al igual que el anterior es un método rápido para determinar alcaloides totales. Se ha encontrado que con este método no se obtiene el 100% de los alcaloides. (Chango, et al, 1993, Muzquiz, 1982)

Debido a que generalmente los alcaloides se encuentran combinados es necesario usar técnicas de alta resolución para un análisis completo como lo son las cromatográficas.

Se ha usado cromatografía de capa fina (TLC) por su velocidad y resolución; sin embargo, para cuantificarlos se usa espectrofotometría y no todos los alcaloides presentan un grupo cromóforo, por lo que no todos son identificados.

La cromatografía de gases (GC) permite separar mezclas de alcaloides, tiene alta resolución, alta precisión y eficiencia, pero tiene la desventaja de usar altas temperaturas por lo que algunos alcaloides se pueden descomponer. La GC permite separar casi todos los alcaloides presentes incluyendo algunos

enantiómeros y si se combina con espectrometría de masas resulta más fácil identificar los compuestos presentes. Al usar un detector de nitrógeno y fósforo (NPD) aumenta su sensibilidad. Se han usado tanto columnas capilares como empacadas. Otra ventaja de esta técnica es que no se necesitan derivatizar los alcaloides.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) opera a baja temperatura pero tiene menor resolución que la cromatografía de gases. Se aplica al análisis de alcaloides no volátiles, altamente polares y sensibles a la temperatura. (Papadoyannis y von Baer, 1993; Popl, 1990)

Últimamente se han desarrollado ensayos inmunológicos con enzimas (ELISA) que son específicos para un tipo de alcaloides. Esta técnica se basa en las reacciones entre antígenos y anticuerpos, resulta una técnica laboriosa y cara debido a que para los alcaloides encontrados en lupinos no existen comercialmente los reactivos necesarios. Presentan la ventaja de que el extracto no debe estar tan puro como lo requieren los métodos cromatográficos. Al hacer una comparación entre los resultados obtenidos por ELISA y por GC se obtuvo una correlación cercana a uno (0.94 con $p < 0.001$). Es un método altamente específico. Se utiliza principalmente para detectar un solo alcaloide al hacer análisis de rutina en un gran número de muestras. (Greirson, *et al*, 1991)

Es importante mencionar que la cantidad y el tipo de alcaloides presentes dependerá de la porción analizada de la planta, de la latitud donde haya sido cultivada y de su estado de maduración. Los constituyentes de un lupino en particular pueden variar cualitativamente con factores como el tiempo o lugar de colección, en algunos casos se ha observado hasta un 1% de variación entre dos líneas de cultivo similares cultivadas bajo diferentes condiciones ambientales. (Hatzold 1983, Kinghorn 1982, Papadoyannis y von Baer 1993)

Cromatografía de gases.

Según la IUPAC "La cromatografía es un método usado para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras que la otra se mueve".

La cromatografía de gases proporciona separaciones rápidas con alta resolución en una amplia variedad de compuestos, la única restricción es que tengan la volatilidad suficiente. Desde que fueron construidos los primeros cromatógrafos mantienen prácticamente las mismas características a controlar para obtener una buena eficiencia en la separación como son el flujo del gas acarreador, la temperatura de la columna y la selección de un detector sensible. La cromatografía de gases hace posible la separación de compuestos con puntos de ebullición o propiedades químicas similares, como en el caso de los alcaloides.

El gas acarreador fluye a través de la columna de modo continuo, en un momento dado se inyecta la muestra, llega la muestra en forma líquida a una zona de calentamiento donde la muestra es introducida, evaporada y arrastrada por el gas acarreador hasta la entrada a la columna, es entonces que la mezcla se pone en contacto con la fase líquida de la columna. La separación resulta de la diferencia entre las fuerzas por las cuales son retenidas las sustancias. Al emerger de la columna, la fase gaseosa entra a un detector en donde los componentes individuales son registrados dando lugar al cromatograma que es la representación gráfica de una serie de señales que aparecen como una sucesión de picos arriba de la línea base, cada pico corresponde a la elución de un soluto después de pasar a través de la columna. La columna regresa a su condición original después de cada análisis. (Bartle, 1993)

En la cromatografía de gases el proceso responsable de la separación es la partición, es un proceso selectivo basado en la combinación de propiedades como punto de ebullición, similitud de estructura y solubilidad. Los compuestos se mueven individualmente a diferentes velocidades dependiendo de su solubilidad en la fase líquida estacionaria, entre mayor sea la solubilidad de los componentes en la fase líquida su presión de vapor será menor, por lo tanto los componentes serán retenidos más tiempo en la columna, por el contrario entre menor sea su solubilidad aumentará su presión de vapor y serán menos retenidos.

El reparto de los componentes en las dos fases deberá ser reversible para que los procesos de absorción y desorción sean rápidos y completos. Esto implica que no deben existir reacciones químicas entre los componentes a separar y la fase líquida estacionaria.

Existen diferentes interacciones entre las moléculas de los solutos y las fases como son:

1. Fuerzas de orientación o de Keeson debidas a la presencia de dipolos permanentes en las dos moléculas, se encuentran aquí los puentes de hidrógeno. La importancia de este tipo de fuerzas disminuye al aumentar la temperatura.
2. Fuerzas de inducción o de Debye resultantes de la interacción entre un dipolo permanente y otro inducido en la otra molécula, son más débiles que las de orientación.
3. Fuerzas de dispersión o de London originadas en los campos eléctricos producidos por las variaciones de los dipolos formados entre núcleos y electrones, dichos campos eléctricos inducen polos en otras moléculas. (Dabrio, 1971. Nuño, 1978)

Partes de un cromatógrafo. (Fig.2)

■ Fuente de gas.

Los gases deben ser lo más puros posible ya que la contaminación puede causar señales de ruido o interferir en el proceso cromatográfico. Los ductos deben ser de cobre porque los de polímeros son permeables al oxígeno y este puede dañar la columna.

■ Regulador de presión.

Controla la velocidad de flujo del gas portador. Los reguladores que mantienen una presión constante ajustable son adecuados para el gas acarreador en columnas capilares y empacadas pero no para los gases de combustión ni de operación del detector.

■ Gas portador.

Este gas deberá ser químicamente inerte no debe interferir con los componentes de la fase estacionaria o los de la muestra. El helio es aconsejable porque da mayor sensibilidad.

■ Sistema de inyección.

El dispositivo para la introducción de mezclas líquidas es un bloque de acero con un cartucho de calentamiento atravesado por medio de un conducto en forma de cruz, la parte horizontal de la cruz es por donde pasa el gas portador, el lado vertical de la cruz tiene en el extremo un tapón de hule de silicon (septum) comprimido por una tuerca reforzada que lo separa del exterior y que se perfora fácilmente con la jeringa y se cierra cuando esta se saca. Su calentamiento es independiente del de la columna.

En el inyector *split/splitless* la muestra se introduce en un tubo de vidrio el cual está conectado a la entrada de la columna. Una ventana que puede ser abierta o cerrada se encuentra al final del tubo para permitir los modos de inyección *split* o *splitless*. El tubo de vidrio es empacado en su parte superior con una pequeña porción de lana de vidrio que permite la mezcla del gas portador con la muestra y además sirve para limpiar la aguja.

En la inyección tipo *split* la ventana permanece abierta durante la inyección y el análisis, acelera el paso del vapor de la muestra a través del tubo y cruza la entrada de la columna reduciendo el ancho de la banda de la muestra que entra a la columna, aumentando la resolución del pico. Debido a que la mayor parte de la muestra es eliminada por la ventana, la cantidad que entra a la columna es pequeña por lo tanto se usa para soluciones concentradas.

La inyección *splitless* se usa en análisis de trazas, aquí la ventana permanece cerrada durante la inyección con el propósito de que la muestra total sea transferida a la columna, la ventana es abierta después de la inyección para purgar las trazas residuales de solvente en el tubo de vidrio ya que causaría una cola en el pico del solvente solapando a los picos que eluyen al inicio. El ancho de la banda de la muestra que entra a la columna dependerá del tipo de solvente, de la cantidad de muestra inyectada, de la presión del gas portador y de la temperatura del inyector.

■ Horno.

Es una caja que contiene un elemento de calentamiento eléctrico en el cual está montada la columna, el calor es distribuido en todo el horno por medio de un

ventilador circulatorio, la buena circulación del aire es necesaria para mantener una temperatura uniforme en todo lo largo de la columna. Un sensor de temperatura está localizado en una zona seleccionada del horno, la salida del sensor está conectada a un sistema de control de la temperatura donde es comparada con la temperatura esperada y se hacen los ajustes necesarios (por lo general con un microprocesador) al elemento de calentamiento para dar la temperatura apropiada. Debido a que el control de la temperatura en la columna es absolutamente importante, la temperatura debe ser sensitiva a 0.01°C y mantenida dentro de $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$.

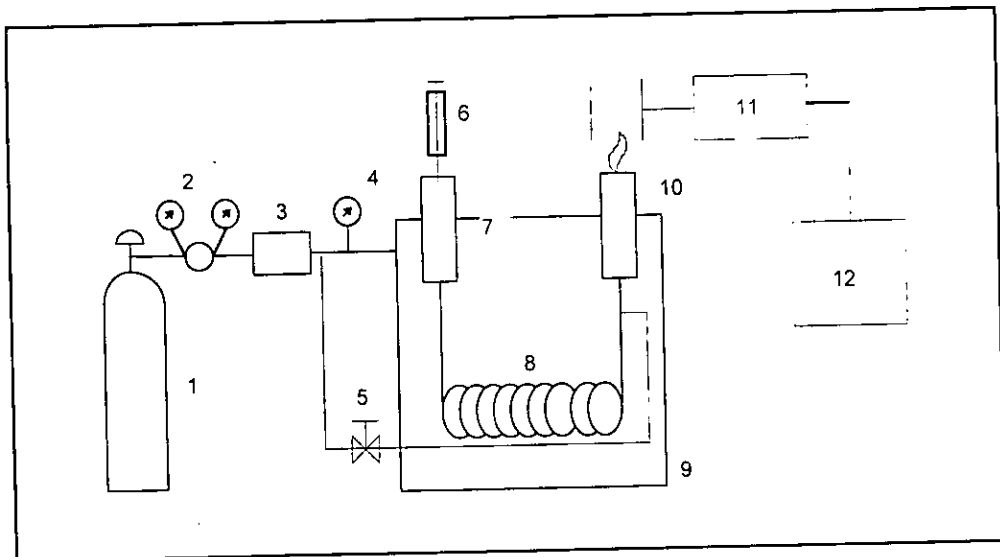
■ Columna.

Es en esta donde se realiza la separación. Existen dos tipos de columnas, las capilares y las empacadas. Las columnas capilares pueden ser más largas sin usar mayores presiones de gas, con mayor eficiencia y mejor resolución porque el grosor de la película es menor y el coeficiente de resistencia a la transferencia de masa disminuye.

Se han encontrado diferentes ventajas de las columnas capilares sobre las empacadas como son: el aumento de la relación señal-ruido debido a que la cantidad de sangrado de la columna es menor y también porque el flujo del gas es más uniforme; los picos están mejor definidos haciendo más fácil la detección de compuestos traza esto lleva a un gran poder de resolución, alta velocidad de análisis, alta sensibilidad, capacidad de eluir a un gran número de componentes y reproducibilidad entre columnas.

Los requisitos para una buena fase líquida son: 1) Ser selectivas, ser buen disolvente para los componentes, con gran poder de fraccionamiento parcial de los mismos. 2) Poseer estabilidad térmica, la fase estacionaria debe ser estable a la temperatura de trabajo y a esa temperatura no se deben producir reacciones irreversibles en la columna. 3) Tener estabilidad física que además facilite su manejo. 4) Ser inertes químicamente. 5) A la temperatura de trabajo la viscosidad de la fase estacionaria no deberá ser muy alta y la volatilidad deberá ser mínima. Un descenso en la temperatura de la columna aumenta el tiempo de retención de los solutos y en ocasiones puede mejorar las separaciones pero cuando la viscosidad es demasiado alta la eficacia de la columna baja. 6) La tensión de

vapor deberá ser mínima para evitar que la fase estacionaria pase a la fase móvil.
 7) La polaridad de la fase estacionaria es importante ya que los solutos polares aumentan su tiempo de retención al aumentar la polaridad de la fase estacionaria.



1. Fuente del gas
2. Control de la presión de los gases (tanque)
3. Filtro
4. Control de la presión del gas portador(cromatógrafo)
5. Control de la presión de los gases del detector (cromatógrafo)
6. Jeringa
7. Inyector
8. Columna
9. Horno
10. Detector
11. Amplificador del detector
12. Integrador

Figura 2. Partes fundamentales de un cromatógrafo

■ Detector.

Es un dispositivo que permite medir de una manera continua una propiedad física del gas portador, que se modifica ampliamente con la presencia de muy pequeñas concentraciones de la sustancia a analizar. Está situado a la salida de la columna.

Se pueden clasificar en:

1. Detectores dependientes de la concentración, los cuales producen una señal relativa a la concentración de soluto en el gas portador en un punto en el tiempo, generalmente no son destructivos y su respuesta es expresada en unidades de señal por concentración de analito.
2. Detectores dependientes de la masa, producen una señal relativa a la velocidad a la cual las moléculas de soluto entran al detector, normalmente generan la señal como resultado de un proceso destructivo que les ocurre a las moléculas de soluto, la respuesta es expresada en unidades de señal por flujo de masa del analito.

En un detector se debe considerar sensibilidad, linealidad, estabilidad, ruido eléctrico y límite de sensibilidad.

Deben tener alta sensibilidad, esta característica indica la intensidad de la respuesta del detector ante un cambio de la propiedad física o química que se mide, ese cambio estará en función de la cantidad de componente que incida sobre él.

La respuesta del detector debe seguir rápidamente el cambio real, debe poseer buena linealidad es decir, debe dar una señal proporcional a la cantidad de compuesto en un amplio intervalo. Debe tener baja sensibilidad a las condiciones de operación como flujo del gas acarreador, presión y temperatura.

Un detector nos dará la señal útil más una señal de fondo, en algunos casos es posible reducir a cero la señal de fondo. La señal de fondo es la que produce cuando sólo pasa gas acarreador a través del mismo, esta señal debería ser constante pero no es así debido a las fallas en la estabilidad del detector originadas por el ruido de fondo o sea a las fluctuaciones instantáneas de la estabilidad del detector. El ruido eléctrico fluctúa aleatoriamente en función del

tiempo alrededor de un valor medio determinado. El nivel de ruido de un detector puede aumentar por envejecimiento de sus componentes o funcionamiento inadecuado.

Para el límite de sensibilidad se debe considerar que el detector es lineal hasta ese margen y que a medida que aumenta la sensibilidad (amplificación de la señal), aumenta el ruido, por lo que se puede confundir la mínima señal con el ruido.

Detector de ionización de flama

Es un detector sensible a la masa y se usa en análisis de compuestos orgánicos destructivos. Al entrar la muestra al detector se mezcla con hidrógeno y entonces es quemada en presencia de aire generando iones. Estos son colectados y medidos por el detector, la concentración es proporcional a la cantidad de compuesto presente. La colección de los iones se incrementa por un campo eléctrico polarizado creado al aplicar un voltaje negativo (-200V). La sensibilidad esta afectada principalmente por el flujo del H. Es insensible para gases inertes y vapor de agua.

La operación de los detectores de ionización se basa en la conductancia eléctrica de los gases. A temperaturas y presiones normales los gases son aislantes pero cuando sus átomos son cargados eléctricamente se producen electrones libres en el gas, la partícula cargada puede ser desplazada bajo la acción de un campo eléctrico externo y entonces el gas se vuelve conductivo. Este efecto aparece sobre muy poca cantidad de compuesto ionizable a menudo no más de unos cuantos iones, lo cual explica la alta sensibilidad de estos detectores.

La llama de aire e hidrógeno da lugar a una corriente de ionización débil que puede variar en presencia de sustancias extrañas. La corriente de ionización hidrógeno-aire se debe a la presencia de iones H_3O^+ , acompañados de trazas de iones NO^+ y NH_4^+ esta corriente de fondo se establece al someter la llama a una diferencia de potencial. Al aparecer una sustancia extraña la señal de fondo cambia por la presencia de nuevas especies iónicas o por modificación de las que había.

■ Integrador.

Es un dispositivo que transforma las señales eléctricas en datos, es posible mediante este mejorar la exactitud y velocidad de los análisis. En el caso del integrador electrónico, bajo el control de un método seleccionado los datos son colectados, almacenados, procesados y organizados en un reporte según los datos especificados en cada punto del método. El ciclo de procesamiento de datos inicia con la detección del pico, usando los valores de sensibilidades de área y base, el sistema los aplica a los datos en el archivo y determina el inicio del pico, cresta, término y su correspondiente área. Usando la información topográfica el sistema construye la línea base del cromatograma de acuerdo el tratamiento de línea base seleccionado en el método. La información de la línea base es utilizada para mostrar gráficamente cómo fueron integrados los picos. Una vez que se han colectado e identificado los picos el siguiente paso es usar el área o la altura para cuantificar la concentración de los componentes en la muestra. (Dabrio, 1971. Dawes, 1993. Nuño, 1978. Tipler, 1993. Operators manual, 1993).

Parámetros fundamentales.

El soluto se reparte entre las dos fases con un coeficiente de partición K , que corresponde a la relación de concentraciones entre las dos fases. Es una propiedad termodinámica del sistema soluto - fase estacionaria - fase móvil que depende de las fuerzas intermoleculares y la presión de vapor del soluto.

El factor de capacidad, k' , es la relación entre las masas del soluto en la fase estacionaria y la fase móvil. No solo depende de las propiedades termodinámicas del sistema sino que es función también de las características de la columna en particular. Se puede definir como el cociente entre las probabilidades de encontrar una molécula determinada de soluto en la fase estacionaria o en la fase móvil que

es equivalente al cociente entre el tiempo de permanencia de dicha molécula en la fase estacionaria y en la fase móvil.

$$k' = K \frac{V_s}{V_g} = \frac{t_s}{t_m}$$

Donde:

V_s = Volumen en la fase estacionaria

V_g = Volumen en la fase móvil

Se define a la relación de fases como β

$$\beta = \frac{V_g}{V_s}$$

entonces

$$k' = K/\beta$$

La fracción del tiempo total que el soluto permanece en la fase estacionaria es

$$\frac{k'}{1+k'}$$

y la fracción en el gas es:

$$\frac{1}{1+k'}$$

Si el promedio de la velocidad lineal del gas a través de la columna es \bar{u} la velocidad lineal, \bar{v} , del soluto está dada por

$$\bar{v} = \frac{\bar{u}}{1+k'}$$

y el tiempo que tardan las moléculas de soluto en recorrer la columna de un extremo a otro, tiempo de retención (t_R) es:

$$t_R = \frac{L}{\bar{v}} (1+k')$$

en donde L es la longitud de la columna.

El volumen de retención es el volumen de gas requerido para eluir el soluto. Si no hay retención cromatográfica sólo tarda el tiempo en pasar por la columna al que se le conoce como tiempo muerto (t_m): Es el tiempo de retención de una sustancia no retenida en la fase estacionaria:

$$t_m = \frac{L}{U}$$

La parte del tiempo de retención durante la cual el soluto es mantenido en la fase estacionaria es:

$$t_R' = t_R - t_m$$

A partir de las ecuaciones del tiempo muerto y de retención:

$$k' = \frac{t_R'}{t_m}$$

k' es el parámetro más sencillo de modificar, varía ajustando la fuerza de la fase móvil. Un rango apropiado que se ha encontrado es $2 < k' < 10$ para mezclas sencillas.

La concentración de un soluto cuando este emerge de la columna corresponde a un pico gaussiano el cual está caracterizado por el ancho al nivel de la base (w_b), es decir la distancia entre las tangentes del punto de inflexión a la línea base; o a la mitad de la altura ($w_{1/2}$).

El objetivo primario de la cromatografía es la separación de los componentes de una mezcla y la resolución nos dice que tan bien se han separado dos picos:

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{0.5(w_{b1} + w_{b2})}$$

Entre mayor sea la diferencia entre los tiempos de retención significa que la fase líquida es más selectiva y es mayor la resolución; entre menor sea W significa que la columna tiene más platos teóricos, los picos son más angostos y la resolución es mayor. Para mejorar la resolución los picos deben alejarse tanto como sea posible y sus anchos de base deberán ser pequeños. El ancho del pico y por lo tanto la resolución están relacionados al ancho de la banda del soluto conforme

este pasa por la columna. Esto está medido por el número de platos teóricos, N, por analogía con la teoría de la destilación, la cual dice que el número de platos teóricos es el número de equilibrios o particiones del soluto entre las dos fases. N puede incrementarse disminuyendo el caudal, empleando columnas más largas o aumentando la temperatura.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$

Debido a que N depende de la longitud de la columna se introduce H que es la altura equivalente a un plato teórico (HEPT).

$$H = \frac{L}{N}$$

La eficacia de una columna puede expresarse en función del número de platos teóricos, una columna será más eficaz cuanto mayor número de platos posea. La altura equivalente a un plato teórico se define como la longitud de la columna en la cual se produce un equilibrio de reparto del soluto entre las dos fases. Para dos columnas con igual N será mejor aquella que sea más corta, por lo tanto es H el que se considera. N y H varían con las condiciones de trabajo, con la naturaleza del soluto y la fase estacionaria.

La resolución depende también de la retención relativa, α , para dos solutos. La selectividad se calcula como el cociente de los factores de capacidad de un par de picos determinados, depende de la naturaleza de cada uno de sus componentes fase móvil, columna y muestra. Este parámetro sólo se puede modificar variando la fase líquida.

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'} = \frac{t_{R2}'}{t_{R1}'} = \frac{K_2}{K_1}$$

R está relacionada a N y al promedio de k' para dos picos en cuestión por medio de:

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \cdot \frac{k'}{(1 + k')} = \frac{1}{4} \sqrt{\frac{L}{H}} \cdot \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \cdot \frac{k'}{1 + k'}$$

Debido a que R depende de la raíz cuadrada de la longitud de la columna al duplicar su longitud sólo aumenta R en un factor de $\sqrt{2} = 1.414$.

El término involucra la retención relativa por lo que para alcanzar la misma resolución entre picos iniciales y picos que eluyen después se requieren más platos. Para que exista una separación completa R debe ser mayor a la unidad. A un valor de 1.5 la resolución es efectivamente completa.

Debido a que el proceso de partición está en función directa de las proporciones de fase móvil y estacionaria, también la velocidad de flujo del gas acarreador ejerce influencia sobre el número de platos teóricos y por lo tanto en la eficiencia y la resolución.

Van Demteer (para columnas empacadas) y Golay (para columnas capilares) demostraron que la HEPT depende del promedio de la velocidad del gas según la siguiente ecuación:

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C_G \cdot \bar{u} + C_S \cdot \bar{u}$$

Donde:

A es el coeficiente que relaciona el efecto de las múltiples vías por las cuales puede pasar el gas.

$$A = 2\lambda \cdot d_p$$

λ = uniformidad del empaque

d_p = diámetro de la partícula

Para columnas capilares $A=0$.

B proporciona la difusión longitudinal en la fase gas el cual es proporcional a D_G que es el coeficiente de difusión del soluto en el gas.

El término C expresa el efecto de la resistencia a la transferencia de masa en las fases gas (C_G) y en el líquido (C_S). Los efectos que explican esta resistencia a la transferencia de masa son:

- Efecto transcanal: Se produce debido a la formación de pequeños canales en el seno de la columna los cuales se deben a la disposición de las partículas de soporte. La existencia de estos canales provoca que la velocidad del gas acarreador sea diferente en el centro y en las proximidades de la pared del canal.

- Efecto transpelícula: En los poros que se forman por irregularidades de los gránulos de soporte existen pequeños canales en los cuales la fase móvil se encuentra prácticamente estacionaria pues se mueve a velocidades muy inferiores a la velocidad media existente en la columna.
- Efecto intercanales vecinos: A causa de las irregularidades del soporte existen canales que presentan diámetros mayores que otros lo cual conduce a que las velocidades medias sean diferentes en ellos.
- Efecto intercanales distantes: Los canales angostos y anchos no se encuentran siempre alternos sino que forman zonas de mayor o menor permeabilidad originando diferentes velocidades en el flujo gaseoso.
- Efecto transcolumna: En el centro de la columna cromatográfica el gas posee una velocidad diferente a la que presenta en la proximidad a la pared.

A partir de esta ecuación se obtiene una curva que demuestra que existe una velocidad óptima del gas portador por debajo y arriba de la cual disminuye la eficiencia.

Factores que influyen en la eficacia de una columna.

1. El efecto de la longitud de la columna sobre la resolución no es tan fuerte por lo que no conviene usar columnas muy largas, que dan lugar a tiempos de análisis mayores.
2. El diámetro de la columna es importante sobre todo en columnas capilares en donde la causa más importante del ensanchamiento de las zonas es la resistencia que opone la fase móvil a la transferencia de masas debida principalmente al efecto transcanal. La disminución del diámetro de la columna lleva consigo un aumento en la eficacia.
3. La naturaleza de las fases influye debido a que la viscosidad de la fase dependerá de su grado de polimerización y de su naturaleza química, siendo también dependiente de la temperatura. Si la fase es muy viscosa a temperaturas bajas la eficacia bajará. En cuanto a la viscosidad del gas portador si esta es menor será necesario un gradiente de presión menor para alcanzar el mismo flujo en la columna. Su coeficiente de difusión también influye ya que las moléculas de soluto se difundirán mejor en un gas que posea un tamaño pequeño de moléculas.

4. Debido a que la fase estacionaria se opone a la transferencia de masa, cuanto más pequeña sea la cantidad de fase estacionaria su eficacia será mayor a igualdad de soporte inerte.
5. Al aumentar la temperatura de la columna disminuye k' a través del coeficiente de reparto por lo tanto disminuye la eficacia.
6. En cuanto a la velocidad del gas portador, existe una velocidad óptima del gas portador en relación con H .
7. Cantidad de muestra inyectada: la capacidad de carga está relacionada con la cantidad de fase estacionaria por unidad de longitud que posee la columna y se refiere a la cantidad de muestra que es capaz de admitir sin que se modifique el valor del coeficiente de reparto.

Cromatografía de gases con temperatura programada.

La temperatura puede ser programada linealmente, es decir, que la temperatura aumente gradualmente durante todo el análisis o combinar la programación de la temperatura con periodos isotérmicos. Esta técnica se aplica cuando los compuestos poseen puntos de ebullición distantes entre sí basándose en el hecho de que la presión de vapor aumenta al aumentar la temperatura y por lo tanto su tiempo de retención disminuye.

Las ventajas de la temperatura programada es que se puede trabajar comenzando a una temperatura baja y utilizando el programa se puede llegar a temperaturas de trabajo y finales altas, se pueden separar mezclas complejas en un intervalo amplio de puntos de ebullición, los picos obtenidos son más uniformes disminuyendo los errores por el estrechamiento del pico, se pueden detectar trazas y disminuyen los tiempos de análisis. (Bartle, 1993. Dabrio, 1971. Nuño, 1978)

Aplicaciones de la cromatografía de gases.

Análisis cualitativo:

Consiste en la identificación de cada pico en el cromatograma, depende de una buena separación y de que cada pico corresponda a un solo compuesto. Se utiliza

el tiempo de retención ya que este es un valor constante para cada componente en determinadas condiciones

Análisis cuantitativo.

Se basa en la medida de la altura o área de los picos, fundamentalmente el área porque la altura es sensible a la temperatura. Existen cuatro métodos para cuantificar los picos:

■ Normalización.

Es el método más simple en donde el área de cada pico está expresada como un porcentaje del área total de todos los picos en la corrida. No se usan factores de respuesta. Cualquier cambio cromatográfico que altere el área total de los picos modificará la concentración expresada de cada uno. El cálculo asume que la concentración de un pico en una corrida con n número de picos es equivalente a la relación del área del pico contra el total de las áreas de todos los picos.

■ Normalización con factor de respuesta.

En este caso se aplican factores de respuesta a las áreas de los picos para compensar los cambios que ocurren en el detector para los diferentes componentes. Dividiendo el área del pico entre el factor de respuesta cambia el cálculo de porcentaje a normalización. Al igual que el porcentaje si existe un cambio en el área total de los picos éste modificará la concentración correspondiente a cada uno.

■ Estándar interno.

Consiste en agregar cantidades exactamente medidas de una sustancia así denominada, tanto a la muestra como a un estándar que contiene al analito. Para determinar la concentración del analito en la muestra se calcula la relación de las áreas de analito a estándar interno tanto en la muestra como en el estándar, efectuando el cociente entre ambas. Es la técnica preferida debido a que sólo dos factores afectan la concentración reportada: 1) la cantidad de cada componente individual y 2) la cantidad del componente estándar agregado a la muestra. Se incluyen los factores de respuesta para compensar las diferencias en la sensibilidad del detector para cada componente en la muestra. El estándar interno no debe estar presente en la muestra, debe presentar un área similar al analito,

debe eluir a un valor de k' cercano al analito, debe resolverse completamente ($R \geq 1.5$) debe ser estable y químicamente inerte, debe responder en forma similar al analito con el detector seleccionado. Al usar relaciones de áreas no es sensible a errores de inyección, en algunos casos se pueden compensar errores debidos a la preparación de la muestra.

■ Estándar externo.

Al igual que el estándar interno este calcula la concentración de cada componente por separado. Sin embargo aquí no se añade el estándar a la muestra. Aquí se inyectan cantidades conocidas de los compuestos de interés en una corrida aparte, las áreas de los picos resultantes son usadas para obtener los factores de respuesta calibrados que son utilizados en las corridas posteriores. La concentración del analito en la mezcla se determina comparando el área del pico en cuestión con el área correspondiente al estándar de referencia. Es muy sensible a los errores de inyección. (Operators manual, 1993. Quattrocchi, 1992)

Validación del método.

El objetivo principal de validar un método es proporcionar evidencias de que el método hace aquello para lo cual fue diseñado. Un proceso de validación debe incluir todo lo que se requiere para demostrar que un método puede cuantificar la concentración de un analito (o series de analitos) en una matriz biológica particular con confiabilidad. Debido a que el método debe dar resultados confiables, la validación de un método debe considerar: selectividad, linealidad, precisión, exactitud y sensibilidad. Un método está validado cuando se ha demostrado que su realización proporciona el grado de precisión requerido y su exactitud es satisfactoria.

Selectividad y especificidad.

El método debe producir una señal que se puede medir debido a la presencia del analito libre de la interferencia de otros componentes. Especificidad es la capacidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de compuestos endógenos. La selectividad incluye la capacidad para separar el analito de otros metabolitos y productos de degradación. La prueba más simple sugerida en el análisis cromatográfico es demostrar la falta de respuesta en un blanco de la matriz biológica. Una forma de checar la selectividad del método sería usando un detector más específico, así como un espectrómetro de masas.

Linealidad

Se refiere a la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta, es necesario si se va a trabajar con un sólo estándar en las determinaciones de rutina, aunque pueden aceptarse métodos no lineales si se opera con estándares múltiples. Conjuntamente se determina el rango lineal, intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima del analito para el cual el método ha sido probado y en el cual se puede hacer la cuantificación por una curva estándar. La curva de calibración debe construirse con soluciones entre cinco a ocho valores (excluyendo el blanco) de acuerdo al rango esperado de concentraciones. Generalmente se usa un modelo lineal con el método de mínimos cuadrados para estimar los parámetros, donde la variable independiente es la concentración y la variable dependiente es la respuesta. Este proceso asume implícitamente que la medida del error es la misma y está normalmente distribuida para cada muestra.

Precisión.

Esta relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea. Se expresa matemáticamente como la desviación estándar estimada analíticamente por s o más comúnmente por la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (CV).

La precisión de un método analítico deberá estudiarse sobre

- el sistema, y
- el método,

En general se acepta una RSD del sistema de no más de 2%, inyectando 5 veces una solución estándar, aunque en condiciones apropiadas pueden obtenerse valores inferiores al 1%.

Exactitud.

También conocida como error sistemático o tendencia, corresponde a la diferencia entre el valor obtenido y el valor real. Para el cálculo de este parámetro la recuperación es la más utilizada. El valor medido debe aproximarse lo más posible al valor de referencia, la recuperación del analito debe acercarse al 100%.

Sensibilidad.

Corresponde a la mínima cantidad del analito que puede producir un resultado significativo.

Los parámetros a definir son los límites de detección y de cuantificación:

- Límite de detección. Corresponde a la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, en las condiciones establecidas y se expresa en unidades de concentración.
- Límite de cuantificación. Es la menor concentración del analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonables en las condiciones establecidas y se expresa también en unidades de concentración.

(Bressolle, 1996. Quattrocchi, 1992. Braggio, 1996)

III. METODOLOGÍA:

Muestras.

Semillas de *Lupinus exaltatus* y *L. albus* recolectadas en Jalisco. Se molieron hasta atravesar una malla de 0.5mm.

Detección.

A 2g de muestra se le adicionaron 40ml de metanol y se dejó una noche, a continuación se calentó durante 4h a 50°C agitando intermitentemente. La mezcla se filtró y el residuo fue lavado con 20ml de metanol el cual se combina con el extracto y se evaporó a sequedad en un rotavapor. El residuo se resuspendió en 2ml de metanol y 12ml de HCl al 1%, la mezcla se agitó y filtró. el residuo se lavó con 8ml de HCl al 1%, se combinaron los extractos filtrados y la solución se alcalinizó con amoníaco concentrado hasta pH 14. Se extrajo con tres porciones de 20ml de cloroformo cada una, dando la fracción "A". La solución acuosa residual se extrajo tres veces con 20ml de una mezcla cloroformo-etanol (3:2) obteniéndose la fracción "B". Ambas fracciones fueron secadas con sulfato de sodio anhidro, se evaporaron a sequedad, por separado, en un rotavapor y se resuspendieron con 1.5ml de HCl al 1% y 1.5ml de cloroformo, se agitaron vigorosamente y la fase acuosa de cada fracción fue pipeteada y filtrada a través de algodón dividiéndose en 7 porciones. Cada porción fue ensayada con los siguientes reactivos:

- 1) Reactivo de Mayer. La solución no debe contener ácido acético o etanol porque disuelve el precipitado. Sólo se añadieron unas gotas de reactivo ya que los alcaloides son solubles en exceso de este.
- 2) Reactivo de Wagner. Se formaron precipitados floculentos color marrón.

- 3) Reactivo de Dragendorff: Dieron precipitados anaranjado-marrón
- 4) Reactivo de Sonnenchein. Los alcaloides y sales de amonio dan precipitados amarillos.
- 5) Reactivo de Hager. Formaron precipitados amarillos
- 6) Reactivo de Scheibler. El precipitado formado es de color blanco-grisáceo.
- 7) Reactivo de ácido silicotungsténico. Precipitado color blanco-grisáceo.

Cuando cualquiera de las dos fracciones (A ó B) dio reacción positiva con los siete reactivos se consideró que los alcaloides estaban presentes. Si solamente el reactivo de Hager dio reacción negativa se consideraron presentes ya que este reactivo es de baja sensibilidad.

Como patrón positivo se utilizó una muestra de colorin (*Erythrina americana*).

Extracción de alcaloides (método 1).

Se dejó 1g de la harina de la semilla durante una noche en 40ml de una mezcla de etanol-agua (70:30). Se centrifugó y se lavó tres veces con 10ml de la mezcla etanol:agua (70:30). Los extractos se evaporaron en un rotavapor a 55°C para eliminar el etanol. El residuo acuoso se acidificó con ácido clorhídrico 0.3M hasta pH 2, se eliminó el material lipídico por extracción con éter de petróleo (2 porciones de 30ml) y los ésteres de alcaloides con diclorometano (2 porciones de 20ml). Se alcalinizó el extracto hasta pH 14 con hidróxido de sodio 10M y se extrajo con diclorometano (3 veces con 20ml cada una). El residuo se evaporó a sequedad a 25°C en un rotavapor y se disolvió en 1ml de metanol grado HPLC. (Priddis, 1983)

Extracción de alcaloides (método 2).

0.5g de harina se homogeneizaron en un vortex con 5ml de ácido tricloroacético al 5% durante 1min a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó durante 5min a 3430 rpm en una centrifuga DYNAC y se decantó el sobrenadante. La extracción se repitió dos veces más y al sobrenadante se añadió 1ml de NaOH 10M. Se extrajo con cloruro de metileno (3 porciones de 5ml) y los extractos se evaporaron a sequedad en un rotavapor a 25°C. Se redisolvió en metanol grado HPLC. (Múzquiz, et al, 1993)

Cromatografía de capa fina.

Debido a los resultados obtenidos en la precisión de cada método se eligió el método 2; después de evaporar los extractos a sequedad se redisolviéron en 1ml de metanol y se aplicaron alícuotas de 2, 4, 6, 8, 10 y 12 μ l en placas de sílica gel 60 F254 (20x20cm, 250 μ m, Merck) usándose como fase móvil cloroformo:ciclohexano:dietilamina (6:4:1). Para el desarrollo de las placas se utilizó luz ultravioleta.

Cromatografía de gases.

Para la validación del método se utilizó la extracción según el método 2 debido a los resultados obtenidos. Los extractos evaporados a sequedad se redisolviéron en 5ml de metanol y se filtró por Millipore con membrana FH 0.5 μ m.

Condiciones del cromatógrafo de gases.

Inyector a 240°C.

Detector a 300°C.

Sensibilidad del detector (rango) = 1

Programa de temperatura del horno:

150°C(0.5min) - 20°C/min - 200°C(15min) - 5°C/min - 240°C(15min)

Inyección tipo splitless.

Presión del gas acarreador (helio) = 5psi.

Flujo del aire = 450 ml/min

Flujo del hidrógeno = 45 ml/min

Validación del método.

Selectividad o especificidad.

Se verificó con la muestra y la inyección de los estándares, observando que no existieran picos sobrepuestos. Además se hizo la inyección de un extracto de soya para observar la falta de respuesta en el cromatograma.

Linealidad

Para su determinación se preparó una serie de diluciones de esparteína, alcaloide disponible comercialmente, divididas en dos curvas patrón. La primera con un rango de 75 a 1200 μ g con atenuación de 8 y la segunda de 3000 a 27000 μ g con atenuación 16 por lo que, considerando los límites de trabajo de 0.02% (permitido en harinas para consumo humano) a 2% (encontrado en especies amargas), se comprendió el rango estimado de trabajo con un exceso de 35% sobre el límite superior y un déficit de 62.5% debajo del límite inferior. Se inyectó cada dilución por triplicado y se determinó la curva de regresión sobre los puntos individuales sin promediar.

La calidad del ajuste de la correspondencia se evaluó comparando los puntos calculados contra los nominales, una regresión lineal de las concentraciones calculadas contra las nominales deben dar una pendiente unitaria y una ordenada al origen igual a cero.

La linealidad también se demostró mediante una t de student probando que la pendiente es diferente de cero, según las siguientes hipótesis:

$$H_0: \beta_1=0$$

$$H_1: \beta_1\neq 0$$

La t se calculó a partir del error estándar de la estimación (S_{b_1}) que es una medida de la variabilidad de cada observación en torno a su media y de la pendiente (b_1) según:

$$t_{n-2} = \frac{b_1}{S_{b_1}}$$

Donde:

$$Sb_1 = \frac{S_{xy}}{\sqrt{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n}}}$$

$$S_{xy} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

y = Valor real de Y para cada observación i

\hat{y} = Valor estimado de Y para la observación i

El intervalo de confianza para la pendiente está dado por:

$$b_1 \pm Sb_1 \cdot t$$

y para la ordenada al origen:

$$b_0 \pm Sb_0 \cdot t$$

$$Sb_0 = \sqrt{S^2 b_1 \frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n}}$$

Precisión.

- Precisión del sistema: Se evaluó la dispersión de 7 inyecciones del estándar.
- Precisión del método: Para el primer método de extracción se determinó en 8 preparaciones y el segundo método se verificó evaluando la dispersión de 10 preparaciones de la muestra. La evaluación corresponde a todo el

procedimiento desde la preparación de la muestra hasta la medición del analito por parte del instrumento.

Exactitud.

Se realizó todo el método desde la extracción a una serie de muestras a las cuales se les agregó una cantidad conocida de estándar. Debido a la disponibilidad de esparteína y lupanina estos dos fueron los alcaloides que se añadieron en concentraciones de 30, 60, 500 y 1000 μ g de lupanina y 30.3, 60.6, 7569 y 15138 μ g de esparteína. Estos valores se determinaron por las concentraciones de las soluciones de estos alcaloides que se encontraban disponibles, considerando además el rango de linealidad. Se comprueba estadísticamente mediante una t de student:

$$t_{n-1} = \frac{[100 - \% \text{Recuperación}]}{\frac{C.V.}{\sqrt{n}}}$$

Si t_{ob} es menor que t_{tab} no existe diferencia significativa con el 100% de la recuperación y la exactitud es apropiada. Además se verifica con la regresión de la masa hallada vs la masa agregada considerando una buena exactitud cuando los intervalos de confianza para la pendiente y la ordenada al origen contienen al 1 y al 0 respectivamente.

Sensibilidad.

- Límite de detección. Se considera cuando la señal supere la relación señal/ruido en un factor de 2 ó 3. A partir de la solución de más baja concentración de la curva patrón (7.5 μ g/ml) se prepararon diluciones 1:10 y se inyectaron obteniendo la relación señal-ruido.
- Límite de cuantificación. Debido a que en la curva de regresión se consideraron bajas concentraciones se utiliza la concentración más baja a la cual los resultados obtenidos siguen siendo confiables.

Muestra.

Se hizo la extracción por triplicado, siguiendo el método 2, de una muestra de *L. exaltatus* (especie silvestre) para probar el método.

Cuantificación.

Se utilizó el método de estándar interno agregando a cada solución 200µg de cafeína. Las muestras fueron inyectadas en un cromatógrafo de gases Autosystem GC (Perkin Elmer) acoplado a un integrador electrónico Personal Integrator modelo 1022 (Perkin Elmer).

En el caso de los extractos a partir de las muestras la adición de cafeína se hizo después de redissolver y antes de filtrar, con lo cual fue posible corregir también los errores durante el proceso de filtración.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

Detección de alcaloides con 7 reactivos diferentes.(Hultin, 1965)

Tabla 2. Detección de alcaloides en diferentes muestras

Muestra	Colorín		<i>L. albus</i>		<i>L. exaltatus</i>	
	Fracción		Fracción		Fracción	
Reactivo	A	B	A	B	A	B
Mayer	++	+	+	-	++	++
Wagner	++	++	++	-	++	+
Dragendorff	++	++	++	-	++	++
Sonnenchein	+	++	++	-	++	++
Hager	+	-	-	-	-	-
Scheibler	+	++	++	-	++	++
Ac. tungstosilícico	++	++	++	-	++	++

Fracción A: Extracto de cloroformo

Fracción B: Extracto de la mezcla cloroformo-etanol

+ Reacción positiva: solución turbia

++ Reacción positiva: clara formación del precipitado

- Reacción negativa

Antes de trabajar con las muestras fue necesario hacer la detección de alcaloides y probar que estos se encontraban presentes. Para el colorín, el cual fue usado como patrón positivo porque se sabe que contiene alcaloides, se obtuvieron reacciones positivas en ambas fracciones A y B excepto con el reactivo de Hager que, como se mencionó, no se considera debido a su baja sensibilidad. Las dos muestras de lupinos presentaron alcaloides sin embargo se puede notar que en el caso de la especie silvestre, *Lupinus exaltatus*, las dos fracciones dan reacciones positivas mientras que la especie cultivada, *Lupinus albus*, sólo da reacciones positivas en la fracción A por lo que todos los alcaloides fueron extraídos con el cloroformo.

Cromatografía de capa fina:

En la placa que corresponde a *L. albus* no se observó ninguna mancha. Mientras que en *L. exaltatus* se lograron separar 3 alcaloides. Se observó la misma separación para las diferentes concentraciones a las cuales fueron aplicados y sólo se notó diferencia en el tamaño de las manchas.

Tabla 3. Valores de Rf en *L. exaltatus*

Mancha	Rf
1	0.23
2	0.40
3	0.70

Una vez que se comprobó la presencia de alcaloides se hizo la cromatografía de capa fina para observar la separación de los alcaloides a partir del extracto. Para *L. exaltatus* se lograron separar los alcaloides pero no fue posible identificarlos debido a la falta de patrones. En el caso de *L. albus* el hecho de que no se haya observado nada en la placa puede deberse a su bajo contenido de alcaloides.

A pesar de que los alcaloides no pudieron ser identificados, el desarrollo de esta técnica permite tener una idea tanto de la concentración como de la variedad de alcaloides en cada muestra.

Validación del método.

Debido a que se trabajó en el mismo cromatógrafo para probar los dos métodos de extracción señalados en la metodología, los datos de validación del sistema no cambian y sólo se presentan las diferencias en cuanto a la reproducibilidad entre ambos métodos.

Selectividad.

Con las condiciones establecidas se lograron separar todos los estándares de los alcaloides que se tenían y además al probar con la variedad silvestre se encontraron picos completamente separados.

A continuación se encuentran los tiempos de retención así como los parámetros cromatográficos para cada alcaloide.

Tabla 4. Parámetros cromatográficos de los estándares

Alcaloide	t_R (min)	t_R' (min)	k'	N	H(mm)
Esparteína	7.6	6.2	4.4	6751	3.70
Cafeína (estándar interno)	8.2	6.8	4.9	29802	0.84
Citisina	14.9	13.5	9.6	11743	2.10
Lupanina	21.8	20.4	14.6	35935	0.70
3-Hidroxilupanina	24.9	23.5	16.8	126533	0.20
13-Hidroxilupanina	30.0	28.6	20.4	105186	0.24

t_R =Tiempo de retención absoluto
 t_R' =Tiempo de retención relativo
 k' =Factor de capacidad

N =Número de platos teóricos
H =Altura equivalente de un plato teórico

Como muestra la tabla 4 la mayor eficiencia, dada principalmente por la altura equivalente de un plato teórico, se encuentra en los últimos picos y se explica por los tiempos de retención mayores.

Tabla 5. Parámetros cromatográficos por pares de alcaloides*

Pares de alcaloides	Resolución (R)	Selectividad (α)
Esparteína vs Cafeína	2.1	1.1
Cafeína vs Citisina	18.1	2.0
Citisina vs Lupanina	13.6	1.5
Lupanina vs 3-hidroxilupanina	8.4	1.2
3-hidroxilupanina vs 13-hidroxilupanina	15.7	1.2

*Pares establecidos por la localización contigua de sus picos en el cromatograma.

En el cromatograma de los estándares de alcaloides (Fig. 3) se puede observar la selectividad de la columna y en consecuencia del método para cada uno de los alcaloides estudiados. Según la tabla 5 todas las resoluciones son mayores a 1.5 por lo que cada pico se separa completamente del siguiente. En algunos casos la separación entre un pico y otro es grande y el tiempo de análisis es largo pero se debe considerar que los alcaloides generalmente se encuentran en mezclas y que estos tienen propiedades semejantes por lo que es posible que en las muestras sean detectados otros alcaloides diferentes cuyas señales se encuentren entre los picos de los estándares utilizados.

En el cromatograma del extracto de soya únicamente se registró el pico correspondiente al metanol. La falta de respuesta ante el extracto de soya, leguminosa que no contiene alcaloides, comprueba que el método es específico para el análisis de alcaloides.

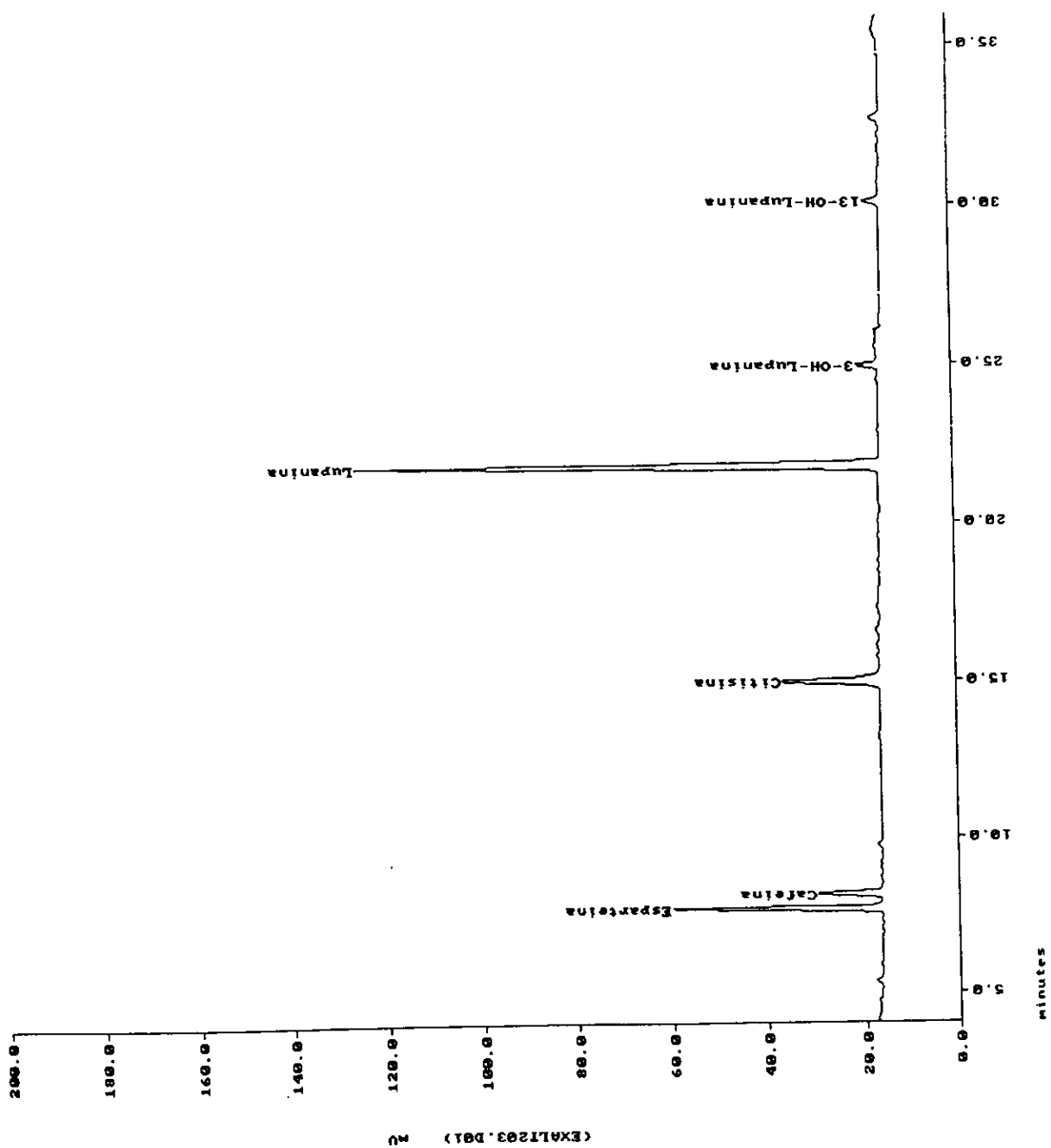


Figura 3. Cromatograma de los estándares de alcaloides

Linealidad

Debido a que se utilizó un estándar interno para la cuantificación de las muestras, la regresión se hace considerando la variable dependiente como la respuesta del sistema que es igual a la relación del área del pico de la esparteína sobre el área del pico de la cafeína y la variable independiente como la relación de la concentración de esparteína sobre la concentración de cafeína.

Tabla 6. Resultados obtenidos de la inyección por triplicado de 75.7 a 1211.2 µg de esparteína (Curva 1)

µg esparteína	[esparteína] / [cafeína]	Areas		Relación de áreas	FR
		Esparteína	Cafeína		
75.7	0.379	269786	479646	0.5625	1.4860
		299567	521383	0.5746	1.5180
		266483	477850	0.5577	1.4734
151.4	0.757	472619	408117	1.1580	1.5298
		468882	396926	1.1813	1.5605
		486977	405160	1.2019	1.5878
302.8	1.514	1194999	503283	2.3744	1.5683
		1157812	486294	2.3809	1.5726
		1040825	444646	2.3408	1.5461
757.0	3.785	2990535	461188	6.4844	1.7132
		3022203	458113	6.5971	1.7430
		2921969	445268	6.5623	1.7338
908.4	4.542	5160760	629943	8.1924	1.8037
		4876261	597122	8.1663	1.7979
		5001239	614208	8.1426	1.7927
1211.2	6.056	5014267	487894	10.2774	1.6971
		4200849	413321	10.1636	1.6783
		5091677	493210	10.3235	1.7047

*Todas las soluciones contenían 200µg de cafeína

FR = factor de respuesta = Relación de áreas / Relación de concentraciones

Tabla 7. Variabilidad de las inyecciones de la Curva 1

µg esparteína	Promedio FR	σ	C.V.
75.7	1.4925	0.0230	1.54
151.4	1.5593	0.0290	1.86
302.8	1.5623	0.0142	0.91
757.0	1.7300	0.0152	0.88
908.4	1.7981	0.0055	0.31
1211.2	1.6933	0.0136	0.80

C.V. = coeficiente de variación = $\sigma / \text{promedio} \times 100$

Tabla 8. Resultados obtenidos de la inyección por triplicado de 3000 a 27000 µg de esparteína (Curva 2)

µg esparteína	[esparteína] / [cafeína]	Áreas		Relación de áreas	FR
		Esparteína	Cafeína		
3027.6	15.138	8330710	273342	30.4772	2.0133
		8348895	274225	30.4454	2.0112
		8926662	290962	30.6798	2.0267
6055.2	30.276	15355540	295309	51.9982	1.7175
		15359632	292784	52.4606	1.7327
		14970200	290843	51.4718	1.7001
9082.8	45.414	23442488	206327	113.6181	2.5018
		23700898	207289	114.3375	2.5177
		22577436	201339	112.1364	2.4692
12110.4	60.552	30542914	209408	145.8536	2.4087
		30658248	204518	149.9049	2.4756
		28555076	191629	149.0123	2.4609
15138.0	75.69	35966328	201615	178.3911	2.3569
		38261856	215624	177.4471	2.3444
		36951956	208119	177.5521	2.3458
18165.6	90.828	48445484	219011	221.2011	2.4354
		49479692	223261	221.6226	2.4400
		55857888	251355	222.2271	2.4467
21193.2	105.966	56732392	226241	250.7609	2.3664
		55091408	214754	256.5326	2.4209
		53527564	210090	254.7840	2.4044
27248.4	136.242	60820044	194075	313.3842	2.3002
		68414648	216572	315.8979	2.3187
		70168400	219210	320.0967	2.3495

*Todas las soluciones contenían 200µg de cafeína

FR = factor de respuesta = Relación de áreas / Relación de concentraciones

Tabla 9. Variabilidad de las inyecciones de la Curva 2

µg esparteína	Promedio FR	σ	C.V.
3027.6	2.0171	0.0084	0.42
6055.2	1.7168	0.0163	0.95
9082.8	2.4962	0.0247	0.99
12110.4	2.4484	0.0352	1.44
15138.0	2.3490	0.0068	0.29
18165.6	2.4407	0.0057	0.23
21193.2	2.3972	0.0279	1.17
27248.4	2.3228	0.0249	1.07

C.V. = coeficiente de variación = $\sigma / \text{promedio} \times 100$

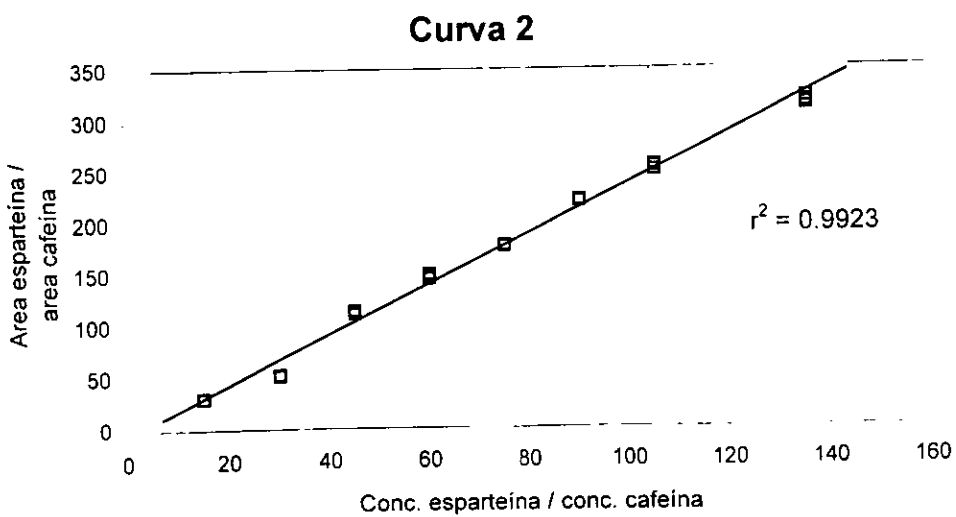
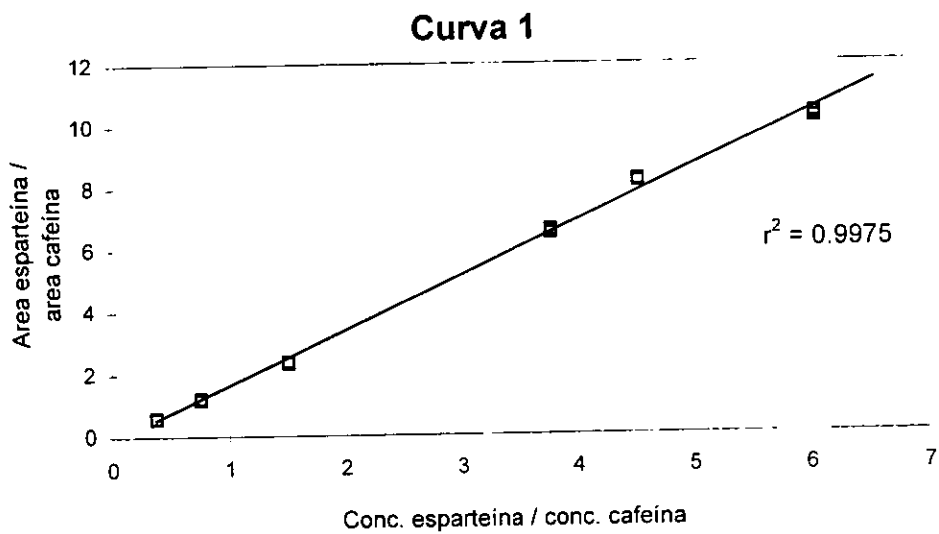


Figura 4. Gráficas de la regresión que prueban linealidad.

Los coeficientes de variación son pequeños en su mayoría menores o cercanos a la unidad por lo que se dice que la inyección es reproducible.

Tabla 10. Datos para las curvas de regresión respuesta vs concentración

Estadístico	Curva 1	Curva 2
b_0 (pendiente)	-0.1333	-5.9293
b_1 (ordenada)	1.7543	2.4308
n	18	24
$\Sigma(y_i - \hat{y}_i)$	0.605	1565.630
Σx_i^2	223.92	151932.45
$(\Sigma x_i)^2$	2610.95	2823468.58
S_{xy}	0.1945	8.44
S_{b_1}	0.0220	0.0456
t_{exp}	79.74	53.31
t_{tab}	1.7459	1.7171

Debido a que el coeficiente de correlación (r) fue mayor de 0.99 y a que el valor de t experimental fue mayor al de t de tablas se rechaza la hipótesis nula y se establece que existe una correlación lineal entre la señal obtenida y la concentración.

Tabla 11. Datos estadísticos para probar el ajuste de la linealidad con la regresión de los valores calculados vs los nominales

Estadístico	Curva 1	Curva 2
b_0 (pendiente)	0.012	1.2594
b_1 (ordenada)	0.9975	0.9923
n	18	24
$\Sigma(y_i - \hat{y}_i)$	0.6038	1553.57
Σx_i^2	666.16	851743.42
$(\Sigma x_i)^2$	7611.11	15541677.3
S_{xy}	0.1943	8.4034
S_{b_1}	0.0125	0.0186
S_{b_0}	0.076	3.5
t_{tab}	1.7459	1.7171

Los intervalos de confianza son:

Curva 1

Pendiente (b_1): (0.965, 1.030)

Ordenada al origen (b_0): (-0.184, 0.208)

Curva 2

Pendiente (b_1): (0.946, 1.039)

Ordenada al origen (b_0): (-7.52 , 10.04)

A partir de los resultados de las tablas 10 y 11 y siguiendo las fórmulas presentadas en la metodología se calcularon los intervalos de confianza para ambas curvas y se obtuvo que los intervalos de confianza para la pendiente contienen al uno y los de la ordenada al origen contienen al cero comprobando así la calidad del ajuste a la linealidad.

El método resultó lineal para esparteina desde 7.5 hasta 120 y de 300 a 2700 $\mu\text{g/ml}$, con los factores de respuesta de 1.75 y 2.43 para cada rango de concentraciones respectivamente.

Precisión.

Precisión del sistema

Tabla 12. Areas de los estándares

Inyección	Esparteína	Cafeína	Citisina	Lupanina	3-Hidroxi lupanina	13-Hidroxi lupanina
1	690515	244120	619612	2948813	138221	162242
2	584481	207082	599045	2527575	123711	146096
3	587884	209090	569910	2516182	121251	142558
4	639693	210807	581730	2567613	121277	141936
5	673282	237018	714942	2965783	134531	157333
6	646906	231716	685341	2830284	139470	165885
7	698262	243270	633076	2970652	140683	179241

Tabla 13. Relación de áreas (área alcaloide / área cafeína)

Inyección	Esparteína	Cafeína	Citisina	Lupanina	3-Hidroxi lupanina	13-Hidroxi lupanina
1	2.8286	1.0000	2.5381	12.0794	0.5662	0.6646
2	2.8225	1.0000	2.8928	12.2057	0.5974	0.7055
3	2.8116	1.0000	2.7257	12.0340	0.5799	0.6818
4	3.0345	1.0000	2.7595	12.1799	0.5753	0.6733
5	2.8406	1.0000	3.0164	12.5129	0.5676	0.6638
6	2.7918	1.0000	2.9577	12.2145	0.6019	0.7159
7	2.8703	1.0000	2.6024	12.2113	0.5783	0.7368

Tabla 14. Datos estadísticos de la reproducibilidad de las inyecciones

	Esparteína	Citisina	Lupanina	3-Hidroxi lupanina	13-Hidroxi lupanina
σ	0.0819	0.1796	0.1531	0.0138	0.0282
Promedio	2.8571	2.7847	12.2054	0.5809	0.6917
C.V.	2.87	6.45	1.25	2.38	4.07
Concentración (mg)	0.1514	0.1000	0.6840	0.0424	0.0430
Concentración relativa*	1.4990	0.9901	6.7723	0.4198	0.4257
Factor de respuesta	1.9060	2.8125	1.8023	1.3838	1.6246

*Concentración relativa = Concentración del estándar / Concentración de cafeína
 Concentración de cafeína = 0.1010mg

En la tabla 14 se encuentran los coeficientes de variación (C.V.) para cada alcaloide en la mezcla, los cuales son menores de 4% a excepción de la citisina, las diferencias que se presentan son debidas a la sensibilidad del detector distinta ante cada uno de los estándares, así se obtiene una alta reproducibilidad para lupanina con un coeficiente de variación de 1.25 y la más baja reproducibilidad para citisina con 6.45, para la cual se observa desde los parámetros cromatográficos una baja eficiencia en comparación con los demás estándares.

Precisión del método.

Tabla 15. Cantidad de lupanina encontrada en 8 extractos de *L. albus* según el método 1

No.	Peso muestra	µg por inyección			µg promedio	µg / g muestra	µg / g MS*
		1	2	3			
1	1.0012	2.76	2.80	2.69	2.75	2.747	2.923
2	1.0376	29.79	30.15	31.35	30.43	29.327	31.206
3	1.0259	27.46	24.14	23.41	25.00	24.372	25.933
4	1.0044	34.86	30.99	30.79	32.21	32.072	34.127
5	0.5006	0.00	0.00	0.00	0.00	0.000	0.000
6	0.4999	14.13	13.35	15.44	14.31	28.619	30.452
7	0.4652	9.40	9.63	9.51	9.51	20.450	21.760
8	0.4726	9.20	9.82	8.95	9.32	19.728	20.991

*MS = muestra seca, considerando que la semilla contiene 6.02% de humedad.

De todas las extracciones se obtiene:

Promedio = 20.924

σ = 12.090

C.V. = 57.78

Tabla 16. Cantidad de lupanina encontrada en 10 extractos de *L. albus* según el método 2

No.	Peso muestra	µg por inyección			µg promedio	µg / g muestra	µg / g MS*
		1	2	3			
1	0.5038	36.241	36.661	36.066	36.323	72.097	76.716
2	0.5008	35.882	35.575	35.826	35.761	71.408	75.982
3	0.5089	36.605	36.103	36.410	36.373	71.473	76.051
4	0.5059	33.694	34.053	34.249	33.999	67.204	71.509
5	0.5045	33.406	34.052	33.766	33.741	66.881	71.165
6	0.5035	34.516	34.748	34.471	34.578	68.676	73.075
7	0.5003	35.076	35.024	34.174	34.758	69.474	73.925
8	0.5059	32.376	32.516	32.174	32.355	63.956	68.053
9	0.5076	35.687	35.392	36.073	35.717	70.365	74.872
10	0.5066	35.593	36.142	35.313	35.683	70.436	74.947

*MS = muestra seca, considerando que la semilla contiene 6.02% de humedad.

De todas las extracciones se obtiene:

Promedio = 73.630

σ = 2.550

C.V. = 3.46

El método uno resulto no reproducible con un coeficiente de variación muy alto mientras que el segundo método resultó reproducible con un coeficiente de variación aceptable menor del 5%. Las posibles causas que hacen más variable al primer método es el mayor manejo de la muestra a través de las diferentes extracciones y su disolución final a 1ml. El segundo método presenta las ventajas de ser más sencillo, utilizar menor cantidad de disolventes y menor cantidad de muestra, además debido a que la extracción se hace con la solución acuosa del ácido tricloroacético no se extraen otros compuestos como los que pueden ser extraídos con la mezcla etanol-agua, como es el caso de los lípidos.

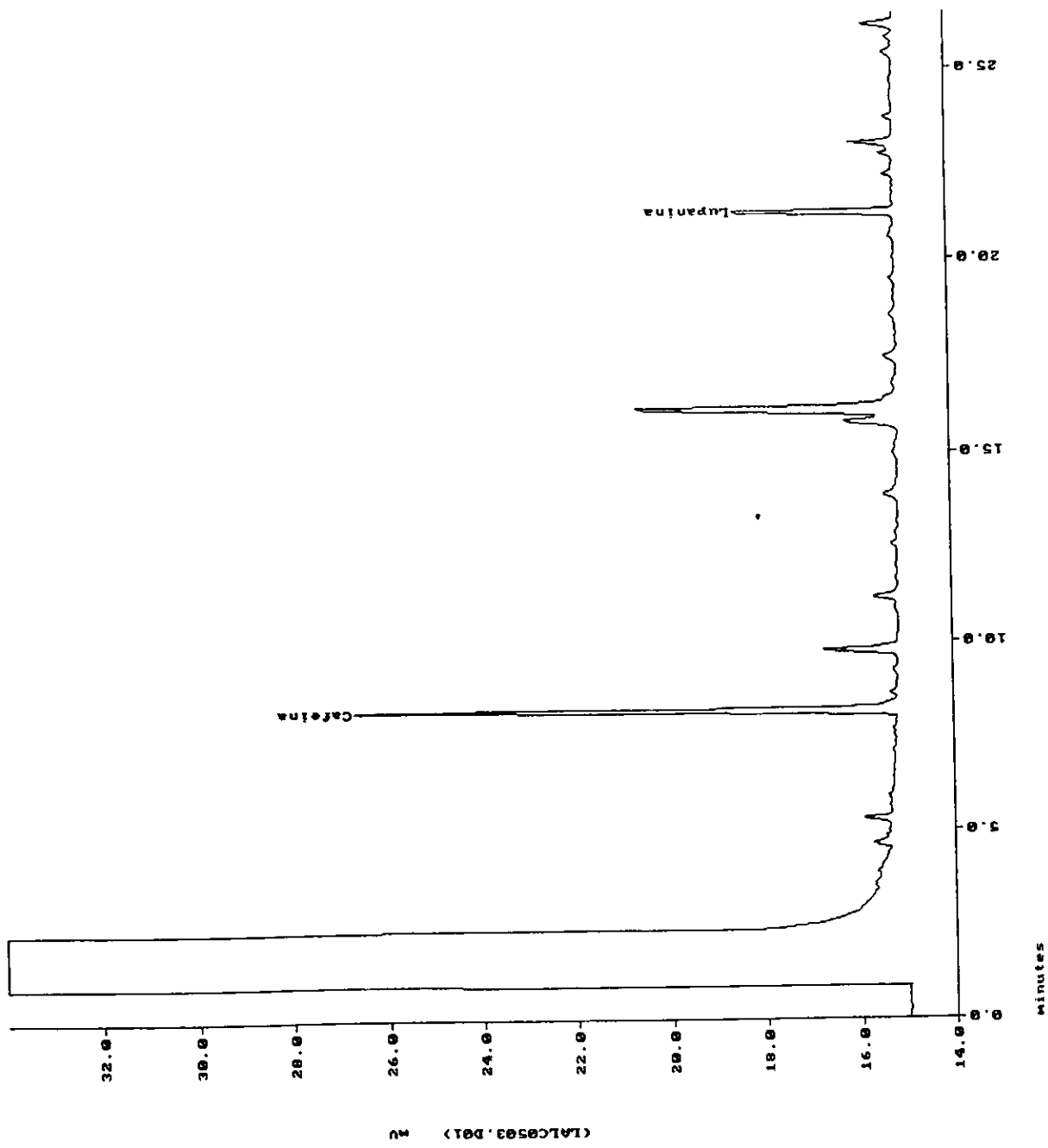


Figura 5. Cromatograma del extracto de *L. albus* según el método 2.

Exactitud.

Tabla 17. Recuperación de la lupanina adicionada a una muestra de *L. albus*.

µg agregados.	Peso muestra	µg en muestra	µg totales	µg hallados*	% recuperado	Promedio
30	0.5050	34.944	64.944	69.885	107.61	96.30
	0.5029	34.799	64.799	58.437	90.18	
	0.5054	34.972	64.972	59.199	91.11	
60	0.5001	34.605	94.605	102.625	108.48	101.30
	0.5010	34.668	94.668	88.948	93.96	
	0.5016	34.709	94.709	96.093	101.46	
500	0.5069	35.076	535.076	549.096	102.62	100.41
	0.5009	34.661	534.661	494.713	92.53	
	0.5071	35.090	535.090	567.593	106.07	
1000	0.5022	34.751	1034.751	988.319	95.51	100.47
	0.5012	34.682	1034.682	1070.292	103.44	
	0.5045	34.910	1034.910	1060.448	102.47	

*Promedio de la inyección por triplicado

De los extractos recuperados a las diferentes concentraciones:

Promedio = 99.62

C.V. = 2.26

Tabla 18. Recuperación de la esparteina adicionada a una muestra de *L. albus*.

µg agregados.	µg hallados*	% Recuperación	Promedio
30.3	29.156	96.22	90.07
	26.275	86.72	
	26.445	87.28	
60.6	66.382	109.54	98.94
	56.991	94.04	
	56.505	93.24	
7569	6734.235	88.97	93.07
	7334.085	96.90	
	7066.212	93.36	
15138	12982.230	85.76	84.14
	12535.446	82.81	
	12692.862	83.85	

De los extractos recuperados a las diferentes concentraciones:

Promedio = 91.56

C.V. = 6.73

Para la lupanina como para la esparteina se obtuvo una recuperación mayor del 90%, sin embargo la variación durante el proceso fue mayor para la esparteina, al igual que en el caso de la reproducibilidad de estándares esto se debe al comportamiento de cada alcaloide ya que los resultados obtenidos para lupanina fueron más precisos y a la muestra se habían agregado los dos alcaloides, por lo que el proceso de recuperación fue el mismo para ambos.

Tabla 19. Datos para la comprobación estadística de la exactitud

	Lupanina	Esparteina
Promedio	99.62	91.555
C.V.	2.26	6.73
n	4	4
t_{ob}	0.336	2.51

$$t_{0.05,3} = 2.3534$$

$$t_{0.01,3} = 4.5407$$

En el caso de la prueba de la t de student se obtuvo que para la lupanina no existe diferencia con el 100% de la recuperación a un nivel de significancia de 0.05 mientras que para la esparteina la exactitud es apropiada si se considera un 0.01 como nivel de significancia, niveles a los cuales la t calculada es menor que la t de tablas.

Tabla 20. Datos para el análisis de la regresión masa hallada vs masa agregada

	Lupanina	Esparteina
b_0 (pendiente)	-1.051	127.962
b_1 (ordenada)	1.0059	0.8491
n	4	4
$\Sigma(y_i - \hat{y}_i)$	4916.2	330312.96
Σx_i^2	1370107.6	286453395
$(\Sigma x_i)^2$	2990440.0	519744244
S_{xy}	49.58	406.39
S_{b_1}	0.063	0.0325
S_{b_0}	36.87	274.89
t_{tab}	2.9200	6.9646

Intervalos de confianza

Lupanina

Pendiente: (0.822, 1.190)

Ordenada al origen: (-108.7, 106.6)

Esparteina

Pendiente: (0.623, 1.075)

Ordenada al origen: (-1786.5, 2042.5)

Al hacer la regresión de la masa hallada vs la masa agregada se comprueba que el método es exacto de 30 a 1000 μg para lupanina (con un nivel de significancia de 0.05) y de 30.3 a 15138 μg para esparteina (con un nivel de significancia del 0.01) al obtener que los intervalos de confianza de la pendiente y de la ordenada al origen contienen al 1 y al 0 respectivamente.

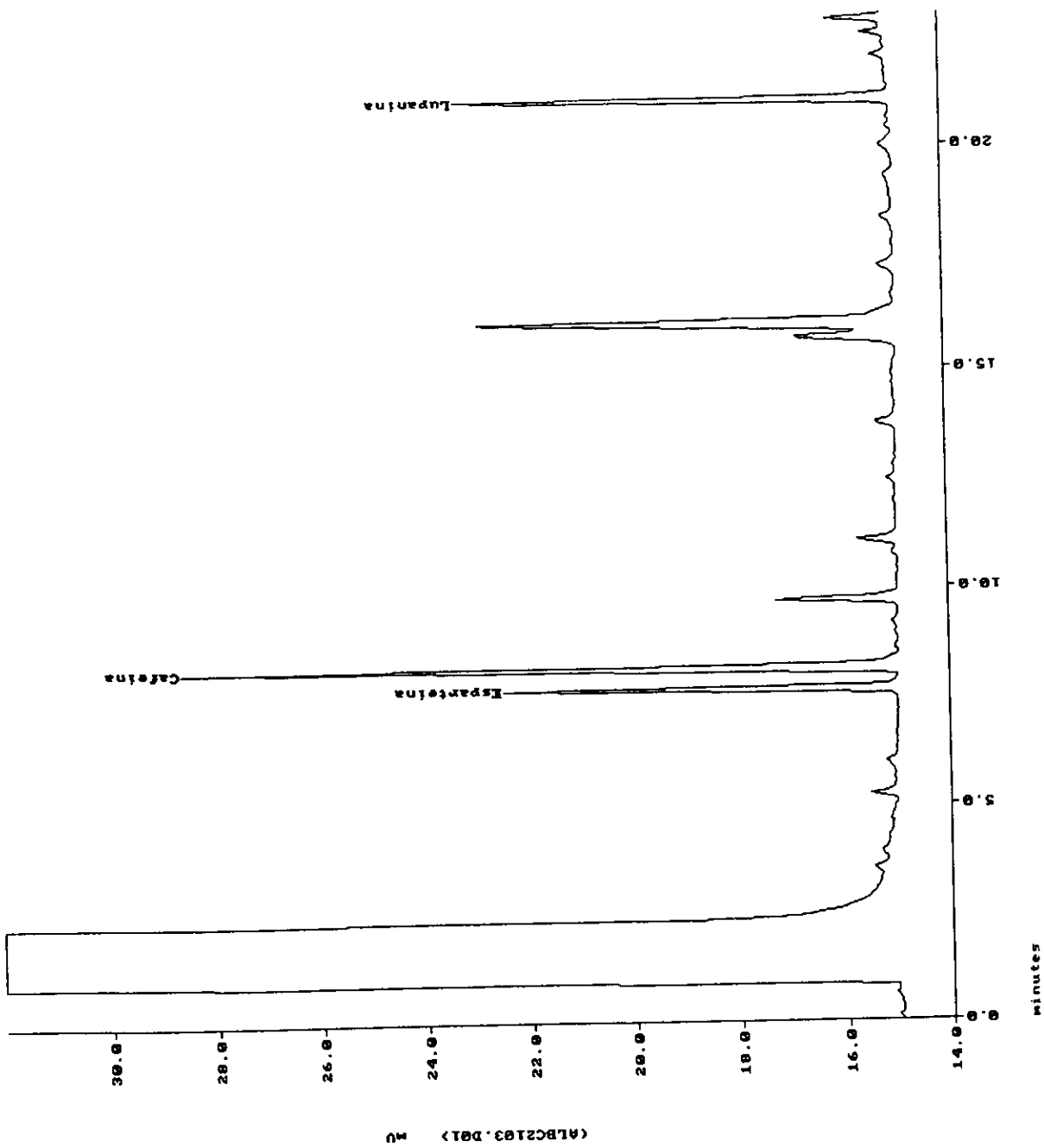


Figura 6. Cromatograma del extracto de *L. albus* adicionado de esparteina y lupanina.

Sensibilidad.

Límite de detección:

En la figura 7 se muestran los picos de esparteína (1) y cafeína (2) amplificados, junto con la señal de fondo o ruido (pico 3) la cual presenta una altura máxima de 0.07mV.

Tabla 21. Límites de detección

	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Altura (mV)	Relación señal/ruido
Esparteína	0.075	0.14	2.0
Cafeína	0.200	0.20	2.9

Por lo tanto se considera **0.2 $\mu\text{g/ml}$** como la concentración mínima a la cual puede ser detectado un compuesto, en las condiciones establecidas, sin poder cuantificarlo.

El límite de detección establecido (0.2 $\mu\text{g/ml}$) se encuentra dentro del rango aceptado generalmente: relación señal/ruido de 2 a 3, se consideró la concentración de cafeína debido a que con la esparteína la relación señal/ruido se encuentra en el límite inferior del rango y usando la concentración mayor se asegura que la señal corresponde al analito y no es una señal de ruido.

Límite de cuantificación:

El límite de cuantificación tomando esparteína como referencia es igual a **7.6 $\mu\text{g/ml}$** , concentración a la cual los resultados son reproducibles y se encuentran dentro del rango de linealidad para el sistema.

Debido a que para la linealidad la concentración más diluida (7.6 $\mu\text{g/ml}$) se encuentra por debajo del rango de trabajo esperado y los resultados obtenidos fueron precisos se consideró este el límite de cuantificación.

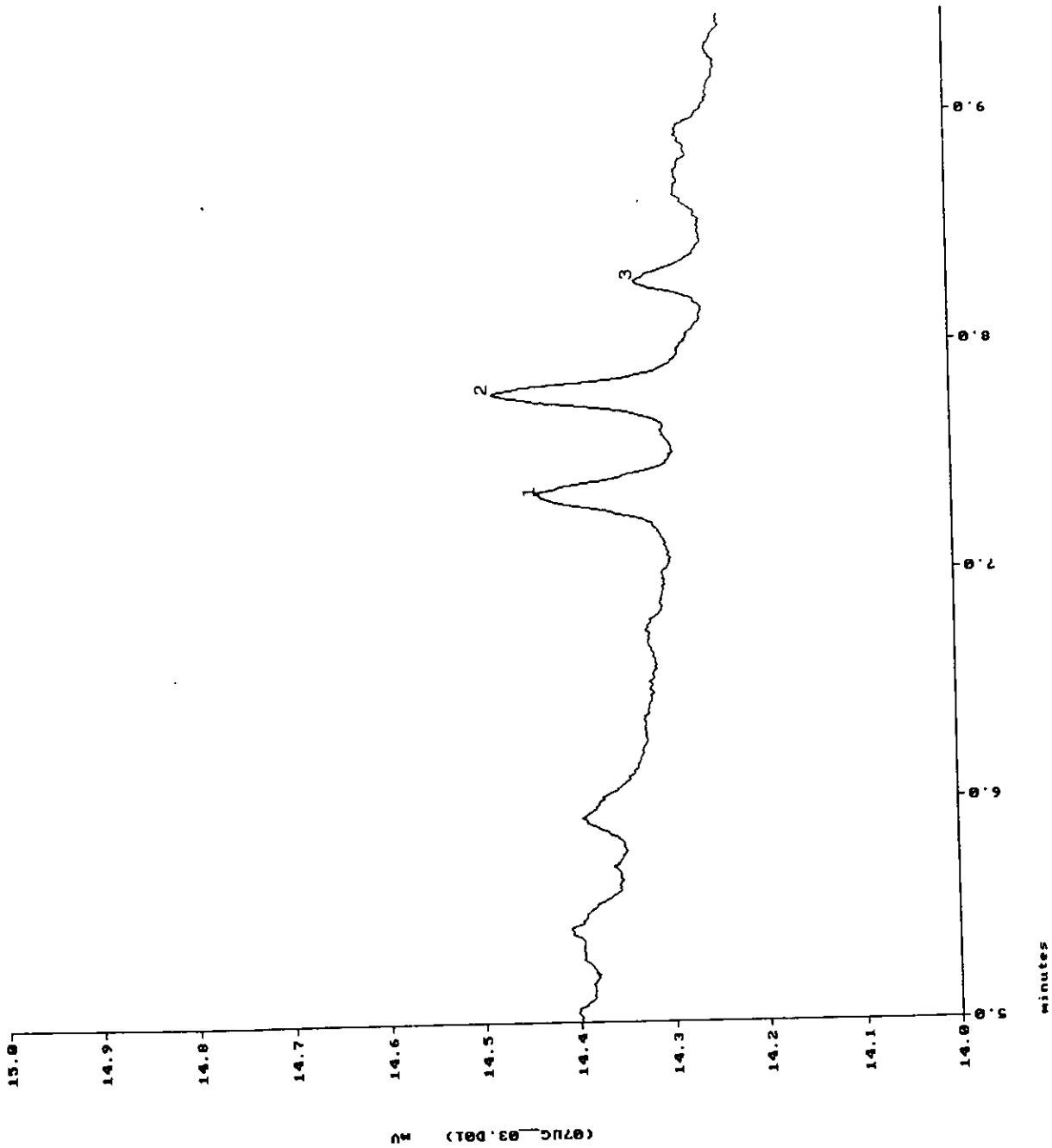


Figura 7. Cromatograma que muestra el límite de detección.

Muestra.

Tabla 22. Microgramos obtenidos para los alcaloides desconocidos de *L. exaltatus* considerando un factor de respuesta igual a 1

Extracto	Tiempos de retención de los picos desconocidos				
	17.2	19.4	19.8	22.4	24
1	3892.176	779.105	687.374	533.506	830.713
	3994.896	798.679	760.889	546.782	906.156
	3908.046	780.647	678.534	534.151	817.619
2	4149.274	841.829	767.019	570.872	847.998
	4296.202	848.949	817.832	577.957	954.607
	4217.501	828.797	759.651	565.615	860.936
3	4097.143	812.988	734.242	554.579	846.203
	4116.637	813.750	710.896	554.401	843.776
	4023.971	792.032	730.533	540.165	862.434

Tabla 23. Microgramos de esparteína, lupanina y 3-hidroxilupanina en *L. exaltatus*

Extracto	Esparteína	Lupanina	3-Hidroxilupanina
1	31.542	2248.613	710.677
	34.504	2309.534	687.226
	33.764	2257.781	791.119
2	21.487	2331.795	808.830
	18.787	2429.739	652.611
	19.241	2383.216	657.026
3	19.562	2347.360	818.513
	20.144	2347.998	808.497
	19.429	2287.270	704.812

Tabla 24. Microgramos por gramo de muestra para los desconocidos

Extracto	Peso muestra	17.2	19.4	19.8	22.4	24
1	0.5004	7857.126	1571.031	1416.731	1075.432	1701.631
2	0.5081	8307.405	1652.939	1538.084	1124.742	1747.386
3	0.5006	8148.722	1610.581	1448.709	1098.112	1699.569
Promedio	-	8104.418	1611.517	1467.842	1099.429	1716.195
Por gramo de muestra seca*						
Promedio		8526.478	1695.441	1544.284	1156.685	1805.571

**L. exaltatus* contiene 4.95% de humedad

Tabla 25. Microgramos de esparteína, lupanina y 3-hidroxilupanina por gramo de muestra

Extracto	Peso muestra	Esparteína	Lupanina	3-Hidroxilupanina
1	0.5004	66.487	4540.320	1458.181
2	0.5081	39.044	4687.233	1389.797
3	0.5006	39.376	4649.506	1552.685
Promedio	-	48.302	4625.686	1466.888
Por gramo de muestra seca				
Promedio		50.818	4866.582	1543.280

La suma de los supuestos alcaloides desconocidos y de los conocidos es igual a 21,189 μg , de manera que el contenido de alcaloides es de 2.12%.

Con el cromatograma del extracto de la muestra silvestre, el cual presenta picos bien definidos, se prueba que el método es útil también para especies que por su origen se puede predecir que son amargas, es decir, que tienen un alto contenido de alcaloides. Aunque en esta muestra se encontraron cantidades apreciables de lupanina y 3-hidroxilupanina la cuantificación de los otros compuestos sólo puede ser estimada a partir de la suposición de que sus factores de respuesta son iguales a 1, teniendo en cuenta que además estos picos deberán ser identificados ya que se tiene que comprobar que todos sean alcaloides. Con base en las consideraciones anteriores se obtiene un 2% de alcaloides en la muestra, valor que coincide con los valores encontrados generalmente en especies silvestres: entre el 1 y el 2%.

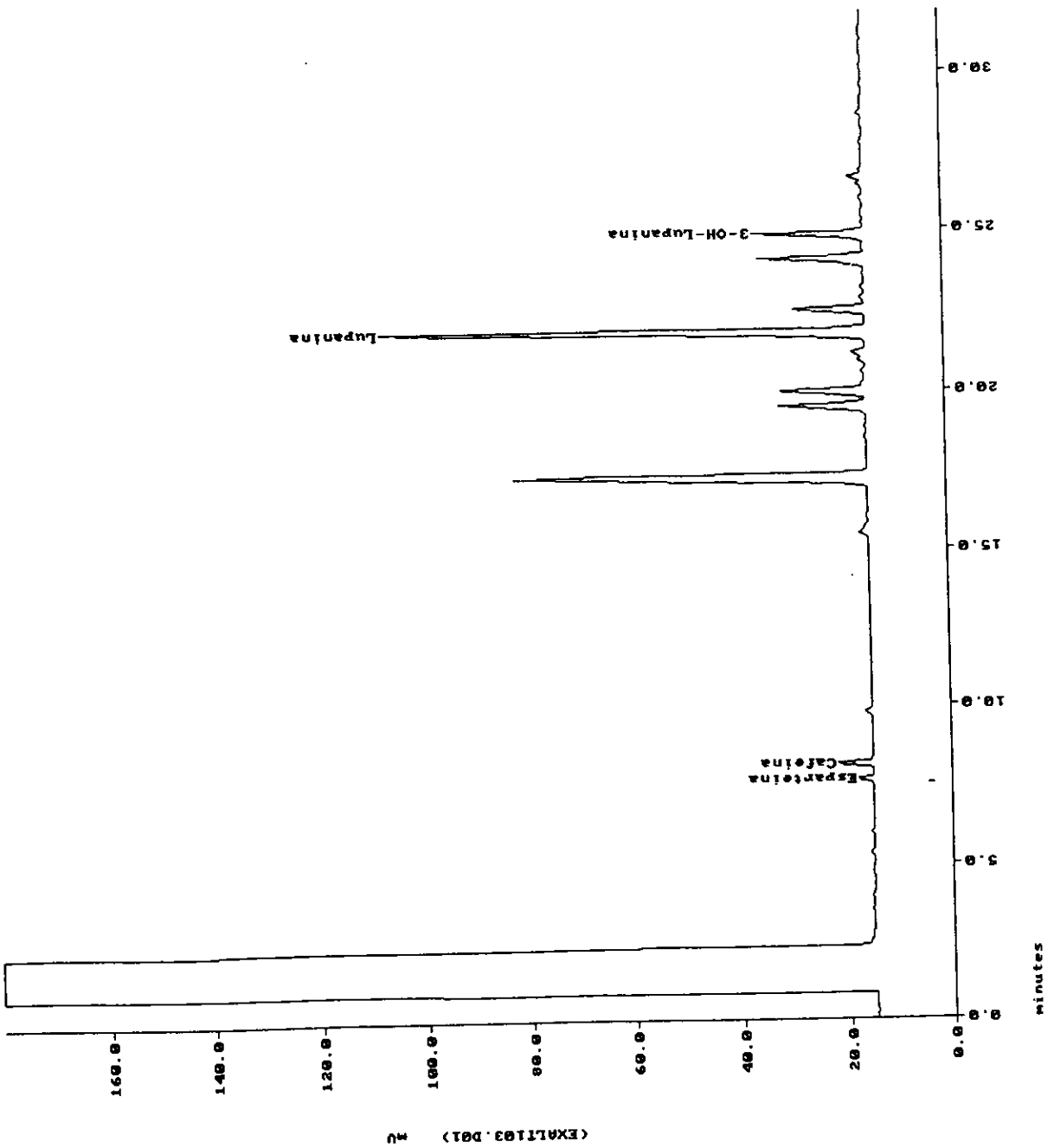


Figura 8. Cromatograma de la muestra de *L. exaltatus*.

V. CONCLUSIONES.

- El método desarrollado es lineal para concentraciones de 7.5 hasta 2700 $\mu\text{g/ml}$.
- Es reproducible tanto para el sistema cromatográfico como para el método de extracción de los alcaloides.
- Es exacto para lupanina de 30 a 1000 μg y para esparteina de 30.3 a 15138 μg .
- Con este método pueden ser detectadas concentraciones de alcaloides individuales de 0.2 $\mu\text{g/ml}$ y pueden cuantificarse confiablemente concentraciones de alcaloides individuales de 7.6 $\mu\text{g/ml}$.
- El método es lineal, reproducible y exacto para las concentraciones esperadas de trabajo al analizar alcaloides en lupinos.
- Puede ser utilizado este método para analizar tanto especies de lupinos dulces con bajos contenidos de alcaloides como especies amargas con concentraciones elevadas de alcaloides.

VI. APÉNDICE.

Para la detección de alcaloides se siguió el método de Hultin (1965) que se basa en la precipitación de los alcaloides con siete reactivos.

El extracto de alcaloides se obtuvo como se explicó en la metodología y fue ensayado con los siete reactivos, preparados de la siguiente forma:

- 1) Reactivo de Mayer: Se disolvieron 1.36g de HgCl_2 en 60ml de agua y 5g de KI en 10ml de agua, se juntaron las dos soluciones y se aforaron a 100ml. Sólo se añadieron unas gotas ya que los alcaloides son solubles en exceso de reactivo.
- 2) Reactivo de Wagner: 1.27g de yodo (resublimado) y 2g de KI se disolvieron en 20ml de agua y se aforaron a 100ml.
- 3) Reactivo de Dragendorff: Se disolvieron 8g de Nitrato de bismuto pentahidratado en 20ml de HNO_3 al 30% y 27.2g de KI en 50ml de agua, se mezclaron las dos soluciones y se dejó reposar 24h, se decantó la solución y aforó a 100ml.
- 4) Reactivo de Sonnenchein: Se disolvieron 43g de molibdato de amonio en 100ml de agua y 10g de fosfato de sodio dibásico anhidro en 100ml de agua, ambas soluciones se calentaron y se mezclaron, después se añadieron 10ml de HNO_3 conc. Después de reposar 1h se desechó el sobrenadante y el precipitado se suspendió en 50ml de agua y se calentó, a la suspensión caliente se adicionó 100ml de la solución de carbonato de sodio anhidro caliente (28g/100ml), se evaporó esta solución clara en una cápsula a sequedad, se flameó la superficie del polvo con un mechero hasta que se encendió con el fin de evaporar las sales de amonio. Se pesaron 30g del polvo y se disolvieron en 200ml de agua caliente, fue calentada y adicionada de 50ml de HNO_3 conc. Se aforó a 300ml.
- 5) Reactivo de Hager: Se disolvieron 2g de ácido pícrico en 100ml de agua.
- 6) Reactivo de Scheibler: En 50ml de agua fueron disueltos 10g de tungstato de sodio y 7g de fosfato disódico, esta solución se aciduló con HNO_3 .
- 7) Reactivo de ácido silicotungsténico: Se disolvieron 5g del ac. silicotungsténico en el H_2SO_4 6N necesario para formar 100ml de solución.

VII. BIBLIOGRAFÍA:

- Bartle, K. Introduction to the theory of chromatographic separations with reference to gas chromatography. en Gas Chromatography. Baugh, P.J. IRL Press. E.U. 1993.
- Berenson, M.L. Levine, D.M. Estadística para administración y economía. Ed. McGraw-Hill. México. 1994. 470-494.
- Braggio, S. Barnaby, R.J. Grossi, P. Cugola, M. A strategy for validation of bioanalytical methods. J. Pharmaceutical and biomedical analysis. 14. 1996. 375-388.
- Bressolle, F. Bromet-Petit, M. Audran, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. J. Chromatography. 686. 1996. 3-10.
- Cuadra, C. de la. Múzquiz, M. Burbano, C. Ayet, G. Calvo, R. Osagie, A. Cuadrado, C. Alkaloid, α -galactoside and phytic acid changes in germinating lupin seeds. J. Sci. Food Agric. 66 (3). 1994. 357-364.
- Chango, A. Villaume, C. Bau, H.M. Nicolas, J. P. Mejean, L. Debittering of lupin (*Lupinus luteus* L) protein by calcium alginate and nutritional evaluation. J. Sci. Food Agric. 63. 1993. 195-200.
- Cheeke, P. R., Kelly, J.D. Metabolism, toxicity and nutritional implications of quinolizidine (lupin) alkaloids. Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds. Wageningen. Holanda. 1989. 189-201.
- Dabrio, M.V. Cromatografía de gases. Ed. Alhambra. España. 1971.
- Dawes, P. Development, technology and utilization of capillary columns for gas chromatography. en Gas Chromatography. Baugh, P.J. IRL Press. E.U. 1993.
- Greirson, B. Allen, D. Gare, N. Watson, I. Development and application of an enzyme-linked immunosorbent assay for lupin alkaloids. J. Agric. Food Chem. 39. 1991. 2327-2331.
- Hatzold, T. Elmadfa, I. Gross, R. Wink, M. Hartmann, T. Witte, L. Quinolizidine alkaloids in seeds of *Lupinus mutabilis*. J. Agric. Food Chem. 31. 1983. 934-938.
- Hultin, E. Torssell, K. Alkaloid-screening of Swedish plants. Phytochemistry. 4. 1965. 425-433.
- Keeler, R.F. Gross, R. The total alkaloid and anagrine contents of some bitter and sweet selections of lupin species used as food. J. Environmental Pathology and Toxicology. 3. 1980. 333-340.
- Kinghorn, D. Balandrin, M. Kim, I. Reinvestigation of the alkaloids of *Lupinus sericeus* Pursh. Identification of a new natural product, 10,17-Dioxo-b-isosparteína. J. Agric. Food. Chem. 30. 1982. 796-798.

- Meeker, J. Kilgore, W. Identification and quantitation of the alkaloids of *Lupinus latifolius*. J. Agric. Food Chem. 35. 1987. 431-433.
- Múzquiz, M. Burbano, C. Cuadrado, C. De la Cuadra, C. Determinación de factores antinutritivos termorresistentes en leguminosas. I: Alcaloides. Investigación agraria. Producción y protección de vegetales. 8 (3). 1993. 351-361.
- Múzquiz, M. Cabanyes, J. Rodenas, Y. Ballesteros, C. Burbano, C. Alcaloides del *Lupinus mutabilis*. INIA. Ser. Agric. 17. 1982.
- Nuño, M. Cromatografía de gases. Internacional científica S.A. México. 1978.
- Papadoyannis, I. N. von Baer, D. Analytical techniques used for alkaloid analysis in legume seeds. Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds. wageningen. Holanda. 1993. 131-144.
- Perkin Elmer. Gas Chromatography Autosystem GC. Operators manual.
- Perkin Elmer. Personal Integrator Model 1022. Operator's Guide. 1993.
- Popl, M. Chromatographic analysis of alkaloids. Marcel Dekker. E.U. 1990.
- Priddis, C. R. Capillary gas chromatography of lupin alkaloids. J of Chromatography. 261. 1983. 95-101.
- Quattrocchi, O.A., Abelaira, S. Laba, R. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Argentina, 1992. 3, 205, 262-263, 279-283, 301-327.
- Rossell, J.B. Pritchard, J. Analysis of oilseeds, fats and fatty foods. Ed. Elsevier Applied Science. E.U. 1991.
- Ruiz, L. P. A rapid screening test for lupin alkaloids. J. Agric. Res. 20, 1976. 51-52.
- Schmeller, T. Sauerwein, M. Sporer, F. Wink, M. Müller, W. Binding of quinolizidine alkaloids to nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors. J. Natural Products. 57 (9). 1994. 1316-1319.
- Smolenski, S. J. Kinghorn, D. Balandrin, M. F. Toxic constituents of legume forage plants. Econ. Bot. 35. 1981. 322-327.
- The Merck Index. 12a. edición. E.U. 1996.
- Tipler, A. Gas chromatography instrumentation, operation and experimental considerations. en Gas Chromatography. Baugh, P.J. IRL Press. E.U. 1993.
- Wink, M. Weibner, C. Witte, L. Patterns of quinolizidine alkaloids in 56 species of the genus *Lupinus*. Phytochemistry. 38 (1). 1995. 139-153.
- Wink, M. Biological activities and potencial application of lupin alkaloids. Advances in lupin research.