



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Desarrollo y Validación de un Método por Cromatografía
de Líquidos para el Análisis de Santina como Compuesto
Marcador de *Tanacetum parthenium*.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A:
SERRANO MEDRANO NANCY GRACIELA**

**DIRECTOR:
Dr. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO**

**ASEROR:
M. en C. MA. MARTHA UGALDE HERNÁNDEZ**



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO.

Presidente: Dr. Andrés Navarrete Castro
Vocal: M. en C. Ma. Martha Ugalde Hernández
Secretario: Q.F.B. A. Guillermina Rojas Fernández
Suplente: M. en C. José Luis Trejo Miranda
Suplente: M. en C. Leticia Huerta Flores

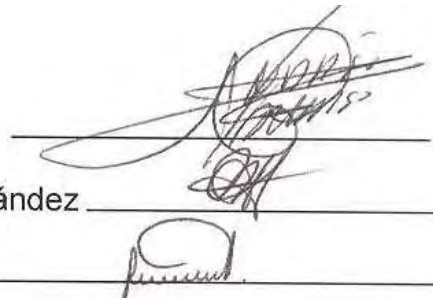
Sitio de elaboración de la tesis:

Laboratorio 126. Departamento de Farmacia. Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México y FES Zaragoza UNAM.

Director: Dr. Andrés Navarrete Castro

Asesor: M. en C. Ma. Martha Ugalde Hernández

Sustentante: Nancy Graciela Serrano Medrano



Handwritten signatures of the jury members, including the Director, Asesor, and Sustentante, positioned above horizontal lines.

Agradecimientos.

Este proyecto fue financiado por la Dirección General de asuntos del personal Académico a través del proyecto DGAPA IN 201506 y del proyecto CONACYT C01-18.

Agradecimientos.

Al QFB Alejandro Martínez González por el apoyo y conocimientos brindados en la realización de este proyecto.

Al Dr. Andrés Navarrete Castro por haberme dado la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, por su apoyo y por haber creído en mí.

A la M. en C. María Martha Ugalde Hernández por su apoyo.

Al Q.F.B. Javier Benitez Yañez por los conocimientos aportados en la realización de este proyecto

Dedicatoria.

A Dios, por ser la guía de mi camino.

A mis padres, Felipe Serrano Ortiz y Ofelia Teresa Medrano Martínez, por darme la vida, por el apoyo que me han brindado durante toda mi formación académica, por sus consejos y su amor, por ser una razón más para vivir y salir adelante, gracias por ayudarme a lograr una de mis metas, los amo.

A mis hermanas, Elisa, Lizeth y Jesica Naelli, por compartir conmigo momentos de alegría y por ser mis mejores amigas.

A mis sobrinas Mariana, Daniela Itzel y al bebé que viene en camino por ser la alegría de la familia y por darle un toque de luz a cada una de nuestras vidas.

ÍNDICE.

I. INTRODUCCIÓN	1
II. FUNDAMENTO TEÓRICO	2
2.1 CROMATOGRAFÍA.	2
2.1.1 Definición	2
2.1.2 Clasificación.	2
2.1.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Presión.	3
2.1.3.1 Aparato.	4
2.2 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.	7
2.2.1 Definición.	7
2.2.2 Clasificación de Métodos Analíticos.	7
2.2.2.1 En función de su estado regulatorio.	7
2.2.2.2 En función de su aplicación (NOM-059 SSA1 y NOM-073SSA1).	7
2.2.2.3 En función de la naturaleza de la respuesta analítica.	8
2.2.2.4 En función de su propósito analítico.	8
2.2.2.5 En función de la naturaleza del sistema de medición.	8
2.2.3 Parámetros de desempeño.	9
2.2.4 Datos requeridos para la validación.	11
2.3 PRUEBA DE HOMOSCEDASTICIDAD.	12
2.4 TANACETUM PARTHENIUM.	14
2.4.1 Generalidades	14
2.4.2 Composición química.	16
2.4.3 Métodos de cuantificación de partenólida.	28
2.4.4 Santina.	28
2.4.4.1 Propiedades.	28
2.4.4.2 Actividad biológica.	28
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	29
IV. HIPÓTESIS.	31
V. OBJETIVO.	32
VI. METODOLOGÍA.	33
6.1 APARATOS.	34
6.2 MATERIAL VEGETAL.	34
6.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE DICLOROMETANO.	35
6.4 AISLAMIENTO DE LA SANTINA DEL TANACETUM PARTHENIUM.	35
6.5 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA CUANTIFICAR SANTINA.	37
6.5.1 Preparación de la solución estándar de santina.	38
6.5.2 Preparación y análisis de una muestra de T. parthenium.	38
6.5.3 Determinación de la concentración de santina en la muestra de T. parthenium.	38
6.6 VALIDACIÓN DEL SISTEMA.	39
6.6.1 Linealidad del sistema.	39
6.6.2 Precisión del sistema.	40
6.6.3 Aptitud del sistema.	40
6.7 VALIDACIÓN DEL MÉTODO.	40
6.7.1 Preparación del placebo analítico.	40
6.7.2 Linealidad del método.	41
6.7.3 Prueba de homoscedasticidad.	42
6.7.4 Exactitud y repetibilidad del método.	43
6.7.5 Precisión del método (Precisión intermedia).	43
6.7.6 Robustez.	44
6.7.7 Tolerancia.	44
6.7.8 Límite de Detección (LD).	45
6.7.9 Límite de Cuantificación (LC).	45
6.7.10 Análisis de muestras.	46
VII. RESULTADOS	47
7.1 LINEALIDAD DEL SISTEMA.	48
7.2 PRECISIÓN DEL SISTEMA.	49
7.3 APTITUD DEL SISTEMA.	50

7.4 LINEALIDAD DEL MÉTODO.	50
7.5 PRUEBA DE HOMOSCEDASTICIDAD.	52
7.6 EXACTITUD Y REPETIBILIDAD.	54
7.7 PRECISIÓN INTERMEDIA.	54
7.8 ROBUSTEZ.	55
7.9 TOLERANCIA.	57
7.10 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.	58
7.11 LÍMITE DE DETECCIÓN.	59
7.12 ANÁLISIS DE MUESTRAS.	60
VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS.	62
VII. CONCLUSIONES.	66
VIII. BIBLIOGRAFÍA.	67
IX. ANEXO.	71

I. INTRODUCCIÓN.

El *Tanacetum parthenium* es una planta que se utiliza en la medicina herbolaria para el tratamiento de la migraña (Knigh, 1995); esta actividad terapéutica le ha sido atribuida a la partenólida, que es una lactona sesquiterpética (Heptinstall *et al.*, 1992) la cual se ha utilizado como compuesto marcador en esta planta. Se ha demostrado que el contenido de partenólida en *Tanacetum parthenium* tiene amplias variaciones dependiendo del sitio en el que crece, reportándose que el compuesto no se encuentra en todas las muestras de la especie, principalmente en muestras que crecen en México (Romo de Vivar y Jiménez, 1965), o que las concentraciones en las que está presente no son cuantificables (Avula *et al.*, 2006).

Para fines de análisis cuantitativo, el utilizar la partenólida como compuesto de referencia queda limitado. Sin embargo en la planta están presentes otros compuestos como la santina la cual se encuentra en muestras de la planta contengan o no partenólida, y que además, podría funcionar como compuesto marcador de la especie, requiriéndose a la par desarrollar métodos de análisis para su cuantificación.

En el presente trabajo se llevó a cabo el aislamiento de la santina, de una muestra de la planta adquirida en el Mercado de Sonora (MS₁), así como también se desarrolló y se llevó a cabo la validación de un método por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión para cuantificar a la santina en diferentes muestras de *Tanacetum parthenium*, dos del Mercado de Sonora (MS₁ y MS₂), dos colectadas en Tulyehualco (T₁ y T₂) y dos extractos comerciales uno del proveedor Amax NutraSource (EC₁) y otro de los Laboratorios Mixim (EC₂).

II. FUNDAMENTO TEÓRICO.

2.1 CROMATOGRAFÍA.

2.1.1 Definición

La cromatografía se define como una técnica mediante la cual se separan solutos a través de un proceso dinámico de migración diferencial en un sistema que consta de dos o más fases, una de las cuales se mueve continuamente en una dirección dada y en la que las sustancias individuales presentan diferentes movibilidades a causa de diferencias de adsorción, partición, solubilidad, presión de vapor, tamaño molecular o densidad de carga iónica. Las sustancias así separadas se pueden identificar o determinar mediante procedimientos analíticos (USP, 2007).

La técnica cromatográfica en general requiere que un soluto se distribuya entre dos fases, una fija (fase estacionaria) y otra móvil (fase móvil), la fase móvil transfiere el soluto a través del medio, hasta que éste finalmente emerge separado de otros solutos que eluyen antes o después. La fase estacionaria puede actuar mediante adsorción, o por disolución del soluto (USP, 2007).

2.1.2 Clasificación.

De acuerdo a la naturaleza de las fases involucradas y a los mecanismos de separación, la cromatografía se divide en:

a) Cromatografía de gases. En este tipo de cromatografía la fase móvil es un gas y la estacionaria es un sólido (Cromatografía gas-sólido) o un líquido (Cromatografía gas-líquido) (USP, 2007).

b) Cromatografía de líquidos. Dentro de la cromatografía líquida existe otra clasificación como se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación de la Cromatografía Líquida.

Cromatografía plana	Cromatografía en columna
Cromatografía en capa delgada (adsorción)	Cromatografía Líquido –Sólido (adsorción)
Cromatografía en papel (partición)	Cromatografía Líquido-Sólido (partición)
	Cromatografía de intercambio iónico
	Cromatografía de exclusión

2.1.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Presión.

La cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC, por sus siglas en inglés), a veces llamada cromatografía de líquidos de alta resolución, es una técnica de separación basada en una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. Las separaciones se logran por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada. La HPLC tiene ventajas características sobre la cromatografía de gases para el análisis de compuestos orgánicos. Los compuestos que se van a analizar se disuelven en un disolvente

adecuado y la mayoría de las separaciones tienen lugar a temperatura ambiente. Por lo tanto, la mayoría de los fármacos, aún siendo compuestos no volátiles o térmicamente inestables, pueden cromatografiarse sin descomposición o sin necesidad de hacer derivados volátiles (USP, 2007).

2.1.3.1 Aparato.

Un cromatógrafo de líquidos consta de un recipiente que contiene la fase móvil, una bomba para forzar el paso de la fase móvil a través del sistema a alta presión, un inyector para introducir la muestra en la fase móvil, una columna cromatográfica, un detector y un dispositivo de recolección de datos (USP, 2007).

SISTEMAS DE BOMBEO. Los sistemas de bombeo de HPLC administran cantidades exactas de fase móvil desde los recipientes hasta la columna mediante una tubería y uniones adecuadas para altas presiones. Los sistemas modernos constan de una o varias bombas reguladoras controladas por computadora que pueden programarse para variar la relación entre los componentes de la fase móvil según se requiera para la cromatografía en gradiente, o para mezclar la fase móvil en corridas isocráticas. Las presiones operativas son típicamente de hasta 5000 psi o más, con velocidades de flujo de hasta 10 mL por minuto (USP, 2007).

INYECTORES. Después de ser disueltos en la fase móvil u otra solución apropiada, los compuestos que se van a cromatografiar se inyectan en la fase móvil, ya sea manualmente usando jeringas o inyectores de espiral o bien automáticamente mediante el uso de inyectores automáticos. Estos pueden

programarse para controlar el volumen de muestreo, el número de inyecciones y los ciclos de enjuague del espiral, el intervalo entre las inyecciones y otras variables operativas (USP, 2007).

COLUMNAS. Para la mayoría de los análisis farmacéuticos, la separación se logra por la partición de los compuestos presentes en la solución de prueba entre la fase móvil y la fase estacionaria. Los sistemas que constan de fases estacionarias polares y fases móviles no polares se describen como de fase normal, mientras que por el contrario cuando se emplean fases móviles polares y fases estacionarias no polares se denomina cromatografía en fase reversa. La cromatografía de partición casi siempre se emplea para compuestos solubles en hidrocarburos de peso molecular menor de 1000 (USP, 2007).

Las fases estacionarias para la cromatografía de líquidos moderna en fase reversa constan normalmente de una fase orgánica químicamente unida a sílice u otros materiales. Las partículas son generalmente de 3 µm a 10 µm de diámetro, pero los tamaños pueden llegar hasta 50 µm o más para las columnas preparativas (USP, 2007).

Por lo general, las columnas empleadas para las separaciones analíticas tienen diámetros internos de 2 mm a 5 mm; para la cromatografía preparativa se emplean diámetros más grandes. Las columnas pueden calentarse para proporcionar separaciones más eficaces, pero rara vez se utilizan temperaturas por encima de los 60°C, debido a la potencial degradación de la fase estacionaria o la volatilidad de la fase móvil. A menos que se especifique algo

diferente en la monografía individual, las columnas se emplean a temperatura ambiente (USP, 2007).

DETECTORES. El tipo de detector de UV consta de una celda de flujo colocada en el extremo de la columna. Un haz de radiación UV pasa a través de la celda de flujo y se introduce en el detector. A medida que los compuestos eluyen de la columna, pasan a través de la celda y absorben la radiación, lo que da lugar a cambios cuantificables en el nivel de energía (USP, 2007).

Pueden obtenerse con facilidad detectores de longitud de onda fija, variable y múltiple. Los detectores de longitud de onda fija operan a una sola longitud de onda, habitualmente a 254 nm, emitida por una lámpara de mercurio de baja dispersión. Los detectores de longitud de onda variable contienen una fuente de luz continua, como una lámpara de deuterio o de xenón de alta presión y un monocromador o un filtro de interferencia para generar radiación monocromática a una longitud de onda seleccionada por el operador. Los detectores de longitud de onda múltiple miden la absorbancia a dos o más longitudes de onda simultáneamente. Estos detectores adquieren los datos de absorbancia a lo largo del intervalo total UV-visible y, por lo tanto, proporcionan al analista cromatogramas a múltiples longitudes de onda seleccionadas y espectros de ultravioleta de los picos eluidos (USP, 2007).

DISPOSITIVOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS. Las unidades procesadoras de datos modernas, reciben y almacenan la señal de los detectores e

imprimen el cromatograma completo con las alturas y áreas de los picos, la identificación de la muestra y las variables del método (USP, 2007).

2.2 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

2.2.1 Definición.

Un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra.

La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada (CNQFB, 2000).

2.2.2 Clasificación de Métodos Analíticos.

2.2.2.1 En función de su estado regulatorio.

a) Métodos farmacopeicos. Todos aquellos métodos que aparecen en cualquier farmacopea (FEUM, USP, BP, Europea, etc.) (CNQFB, 2000).

b) Métodos no farmacopeicos. Aquellos métodos no compendiados en una farmacopea (CNQFB, 2000).

2.2.2.2 En función de su aplicación (NOM-059 SSA1 y NOM-073SSA1).

a) Métodos para producto a granel

b) Métodos para producto terminado.

c) Métodos para materia prima.

d) Métodos indicadores de estabilidad (CNQFB, 2000).

2.2.2.3 En función de la naturaleza de la respuesta analítica.

a) Métodos físico-químicos: Cuando la respuesta es de carácter físico (absorción de luz, emisión de luz, voltaje, etc.) o químico (consumo de iones – OH, consumo de un acomplejante, etc.) (CNQFB, 2000).

b) Métodos biológicos. Cuando la respuesta es de carácter biológico (crecimiento de un microorganismo, protección, muerte, etc.) (CNQFB, 2000).

2.2.2.4 En función de su propósito analítico.

a) Métodos para cuantificar el analito (contenido o potencia).

b) Métodos para establecer la presencia del analito a un límite.

c) Métodos para identificar el analito (CNQFB, 2000).

2.2.2.5 En función de la naturaleza del sistema de medición.

a) Métodos en los cuales el instrumento de medición de la respuesta analítica, permite medir una señal de ruido (cromatógrafo de líquidos, cromatógrafo de gases, espectrofotómetro, etc.) (CNQFB, 2000).

b) Métodos en los cuales el instrumento de medición no permite medir una señal de ruido (buretas, medidor de halos, potenciómetros, etc.) (CNQFB, 2000).

Cualquier método analítico puede estar constituido por técnicas de separación, extracción, etc., y por técnicas de medición (espectrofotometría, volumetría, colorimetría, potenciometría, etc.) que permiten medir la respuesta del analito en la muestra (CNQFB, 2000).

2.2.3 Parámetros de desempeño.

Un parámetro de desempeño es un parámetro específico a estudiar en un protocolo de validación (CNQFB, 2000).

a) Linealidad. Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo determinado (CNQFB, 2000).

b) Precisión. Grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia (CNQFB, 2000).

De esta se derivan los siguientes parámetros:

- Precisión intermedia. Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en diferentes días (CNQFB, 2000).

- Repetibilidad. Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método.

- Reproducibilidad. Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios (CNQFB, 2000).

c) Exactitud. Concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia (CNQFB, 2000).

d) Límite de cuantificación. Concentración mínima del analito, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas (CNQFB, 2000).

e) Límite de detección. Concentración mínima del analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas (CNQFB, 2000).

f) Robustez. Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método. Se refiere a la influencia de factores internos del método (CNQFB, 2000).

g) Tolerancia. Reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos, por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación como pueden ser equipos, columnas. Se refiere a la influencia de factores externos del método (CNQFB, 2000).

h) Aptitud del sistema. Verificación de que el sistema (instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia, entre otros) opera con base a criterios preestablecidos, que determinan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico (CNQFB, 2000).

La evaluación de la aptitud del sistema se recomienda para todos los métodos analíticos, ya que permite verificar que el sistema de medición funciona apropiadamente, independientemente de las condiciones ambientales (CNQFB, 2000).

2.2.4 Datos requeridos para la validación.

Los requisitos de las pruebas farmacopeicas varían desde valoraciones analíticas muy rigurosas hasta evaluaciones de atributos subjetivos. Considerando esta amplia variedad, es lógico que diferentes procedimientos de prueba requieran diferentes esquemas de validación (Cuadro 3), (USP, 2007). Estas categorías se indican a continuación:

Categoría I: Los procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos en productos farmacéuticos (USP, 2007).

Categoría II: Los procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos procedimientos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite (USP, 2007).

Categoría III: Los procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño (por ejemplo, disolución, liberación del fármaco) (USP, 2007).

Categoría IV: Pruebas de identificación (USP, 2007).

Desarrollo y Validación de un Método por Cromatografía de Líquidos para el Análisis de Santina como Compuesto Marcador de *Tanacetum parthenium*.

El Cuadro 2 muestra los datos requeridos para la validación para cada una de las categorías antes mencionadas.

Cuadro 2. Datos requeridos para la validación

Características de Desempeño Analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Prueba de Límite Cuantitativa	Prueba de Límite Cualitativa		
Exactitud	Sí	Sí	*	*	No
Precisión	Sí	Sí	No	Sí	No
Especificidad	Sí	Sí	Sí	*	Sí
Límite de detección	No	No	Sí	*	No
Límite de cuantificación	No	Sí	No	*	No
Linealidad	Sí	Sí	No	*	No
Intervalo	Sí	Sí	*	*	No

* Pueden requerirse, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

2.3 Prueba de homoscedasticidad.

Una curva de calibración bien diseñada e interpretada es fundamental en cualquier metodología de análisis. La calidad de los datos bioanalíticos depende en gran medida de la calidad de la curva estándar utilizada para generarlos. Las concentraciones de analito en muestras desconocidas, típicamente son evaluadas utilizando los resultados de regresión obtenidos para las curvas de calibración y aunque algunos procedimientos analíticos requieren de una calibración no lineal, la regresión lineal es el modelo más comúnmente que se utilizado (Almeida *et al.*, 2002).

Sin embargo, la condición de varianzas iguales, denominada homoscedasticidad, frecuentemente no se cumple para los datos analíticos (Almeida *et al.*, 2002).

La prueba de homoscedasticidad debe ser aplicada en cualquier análisis de regresión lineal. Se puede realizar construyendo una grafica de residuales vs concentración y mediante la aplicación de una prueba F con las siguientes estadísticas:

$$F_{\text{exp}} = \frac{s_2^2}{s_1^2}$$

$F_{\text{tab}} (f_1, f_2; 0.99)$, donde el valor de F experimental es expresado como el cociente entre las varianzas obtenidas para el nivel de concentración más bajo (s_1^2) y el nivel de concentración más alto (s_2^2), del rango trabajado, y el valor de F de tablas es obtenido para la F de tablas con un nivel de confianza de 99% para $f_1 = f_2 = (n-1)$ grados de libertad (Almeida *et al.*, 2002).

Si la varianza es constante en el rango de calibración, los residuales deben distribuirse por arriba y por abajo del eje de las "x" y F_{exp} debe ser menor que F_{tab} (Almeida *et al.*, 2002).

Si no se cumple la prueba de homoscedasticidad, el siguiente paso es la elección del factor de ponderación, W_i . Como no es adecuado calcular el inverso de la varianza, teniendo en cuenta que se requieren varias determinaciones para cada punto de calibración y debe realizarse una línea de calibración cada vez que se utiliza el método, se deben estudiar los pesos empíricos $1/x^{1/2}$, $1/x$, $1/x^2$, $1/y^{1/2}$, $1/y$ y $1/y^2$ para encontrar la mejor modelo de calibración (Almeida *et al.*, 2002).

El mejor factor de ponderación se elige de acuerdo al porcentaje de error relativo (% RE, por sus siglas en ingles), que compara la concentración obtenida a partir de la ecuación de regresión obtenida para cada W_i con la concentración estándar nominal (Almeida *et al.*, 2002).

$$\% RE = \frac{\text{Concentración}_{obtenida} - \text{Concentración}_{no\ min\ al}}{\text{Concentración}_{no\ min\ al}} \times 100$$

El %RE puede ser evaluado calculando la suma de %RE, que está definido como la sumatoria de los valores absolutos de %RE. El modelo adecuado es el que tenga el menor valor de %RE (Almeida *et al.*, 2002).

2.4 *Tanacetum parthenium*.

2.4.1 Generalidades

Pertenece a la familia Compositae o Asteraceae. Algunos de sus sinónimos son: *Chrysanthemum parthenium*, *Leucanthemum parthenium*, *Pyretrum parthenium*, *Matricaria parthenium*. Se considera originaria de Irán, Irak y de Europa, adaptada a climas cálido, semicálido, semiseco y templado. Se cultiva en huertos familiares, crece a orillas de caminos o en terrenos de cultivo.

En Estados Unidos y en Europa se conoce como Feverfew (Foster, 1991) y en México como Altamiza, Hierba de Santa María, Hierba Santa, Manzanilla Grande, Manzanilla Romana, Mastranzo, Matlali. En otomí *dhata manzanilla*,

en náhuatl *caltemasha* (Foster, 1991; Argueta, 1994) o simplemente Santa María.

Tanacetum parthenium es una planta arbustiva, erecta, aromática, de 30 cm a 1 m de altura, escasamente velluda, puede tener el tallo simple o ramificado, desde la base. Sus hojas son simples, de color verde, alternas, con graba de cara superior, y pubescente en la cara inferior, pinatífida, con lóbulos obovados y dentados. Las flores que aparecen de julio a Octubre, están dispuestas en corimbos de hasta 30 piezas, con algunas florecillas blancas alargadas, y otras amarillas en forma de disco con brácteas involucras cubiertas de pelusa (Martínez, 1992; Argueta, 1994; Linares, 1996).

En estados como Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Morelos, México, Tlaxcala y Veracruz se utiliza para diversos tipos de cefalea, como analgésico, para la artritis, para aliviar trastornos de la menstruación y para provocar el aborto. Se toma el cocimiento de las ramas o de las flores (Lawrence, 1990; Argueta, 1994). También se utiliza como “chiquiador”.

En la medicina tradicional del Reino Unido y Europa ha sido utilizada para aliviar el dolor de cabeza, los dolores menstruales, el asma, la artritis y como antipirético. Las hojas son ingeridas frescas, en una dosis diaria de 2 a 3 hojas (Foster, 1991).

También ha tenido uso como planta de jardín, ya que aromatiza el aire debido a su fuerte olor. Funciona además como repelente de insectos (Foster, 1991).

2.4.2 Composición química.

La lactona sesquiterpénica más importante presente en *Tanacetum parthenium* es la partenólida, la cual se ha tomado como compuesto marcador, para la actividad biológica y para el control de calidad de preparaciones farmacéuticas y análisis de materia prima (Bohlman y Zdero, 1982).

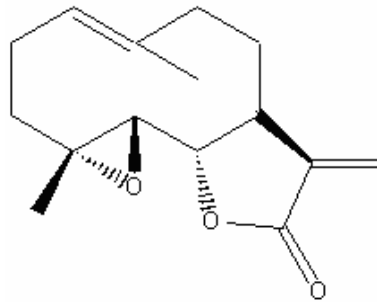


Figura 1. Partenólida

Existen varios procedimientos de extracción, los cuales incluyen la cromatografía en columna abierta, cromatografía de gases y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) (Brown, et al, 1996). Recientemente se ha aplicado la Extracción de Fluido Supercrítico para su obtención (Cretnik *et al.*, 2005)

La partenólida fue identificada en 1982, en un extracto de éter de petróleo:dietil éter (2:1) de las partes aéreas provenientes de Alemania. Además este extracto también contenía alcanfor, y acetato de crisantenilo (Bohlman y Zdero, 1982). Ambos son compuestos mayoritarios del aceite esencial de muestras provenientes de Bélgica y Egipto (Pooter *et al.*, 1989) y México (Hendriks, et al., 1996).

El contenido de partenólida, varía en función del ciclo vegetativo y es máxima en el momento de la floración (Hendriks *et al.*, 1997). En muestras originarias del Reino Unido su contenido en flores es del 1.38% y en las hojas del 0.95%, es poco abundante en los tallos (0.08%) y casi ausente en raíces (0.01%) (Heptinstall *et al.*, 1992; Cretnik *et al.*, 2005).

Las plantas que crecen en el valle de México (Romo de Vivar y Jiménez, 1965) y en Yugoslavia (Stefanovic *et al.*, 1985) carecen de partenólida. Sin embargo, en un estudio donde se compara el contenido de este compuesto entre las plantas de origen estadounidense y mexicana, se reporta que en los ejemplares de los Estados de Oaxaca y Puebla en México, contienen este metabolito en un 0.28% y 0.25% respectivamente y para las muestras del Valle de México se encuentran en muy bajas concentraciones que no se pueden cuantificar, pero que se detectan por cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas (Avula *et al.*, 2006).

Existe gran controversia al proponer a la partenólida como el único compuesto marcador de *T. parthenium*. Béjar (1996), propone que no sólo la partenólida le confiere la actividad biológica a esta planta, sino que existen otros compuestos que pueden ser los responsables de la profilaxis de la migraña.

El resto de las lactonas sesquiterpénicas presentes están en pequeñas cantidades <10mg/Kg. Otros germacranólidos representativos son una serie de metabolitos los cuales probablemente se obtienen por epoxidación y/o oxidación alílica, con o sin arreglo alílico de la partenólida (Knight, 1995). Estos

incluyen la custunólida, la 3 β -hidroxicustunólida, la 3 β -hidroxipartenólida, la armemorina, la 3 β -hidroxianhidroverlоторina, la epoxiartemorina y el peróxido correspondiente. Están presentes dos eudesmanos el metil éster del ácido cóstico y la reinosina, ambos se encuentran en pequeñas cantidades (Knight, 1995).

El resto de las lactonas sesquiterpénicas son del tipo guayenólida (Knight, 1995; Boholman y Zdero, 1982). Se encuentran trazas de 8 α -hidroxiestafiatina, acompañada por los correspondientes ésteres isobutilato y angelato. Se encuentran también dos series de guayenólidas, la serie α , representadas por la tanapartina- α -peróxido, la canina y pequeñas trazas de 10-epi-canina y seco-tanapartolida A. La serie β corresponde a la tanapartina- β -peróxido, la artecanina y finalmente la seco -tanapartolida B (Knight, 1995).

En estudios realizados a *T. parthenium* mexicana se encontraron la crisantemina A, crisantemina B y la santamarina., no así la partenólida (Romo *et al.*, 1965; Romo *et al.*, 1970).

Las partes aéreas de la planta contienen una mezcla compleja de diferentes tipos de constituyentes. Se encuentran entre ellos el germacreno D, el β -farneseno y el alcanfor, pequeñas cantidades (<10 mg/Kg) de crisantenil acetato y el epímero cis-crisantenol junto con los ésteres acetato, angelato e isovalerato. También se encuentran presentes el cisbervenol, la 4 β -acetoxicrisantenona, así como el bornil acetato y bornil angelato (Boholmann y Zdero, 1982).

También se encuentran una serie no terpenoide de ésteres espirocetálicos, los cuales también están presentes en pequeñas cantidades. Estos mismos han sido encontrados en las raíces de la planta en niveles relativamente altos, lo cual quizá indicaría el rol de defensa de este compuesto (Boholmman y Zdero, 1982).

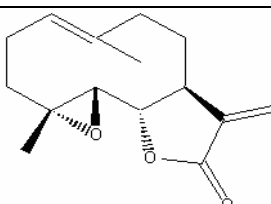
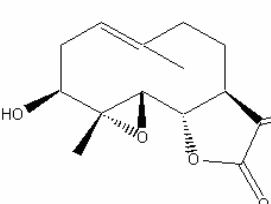
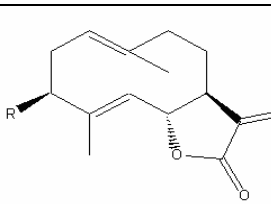
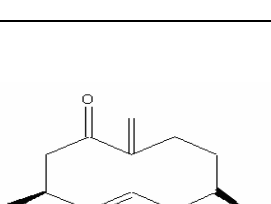
Los principales componentes que constituyen el aceite esencial de *T. parthenium* de especies inglesas y holandesas son el alcanfor y el crisantenil acetato en un 28-48% y un 30-22% respectivamente. Otros terpenos que contiene son el α -pineno, el camfeno, el β -pineno, el α -terpineno, el p-cimeno, el γ -terpineno, el crisantenol, el bornil acetato, el β -cariofileno, el β -farneseno, el D-germacreno, el epóxido del β -cariofileno (Hendriks, *et al.*, 1996).

También se han identificado los siguientes flavonoides: la santina (Williams *et al.*, 1999), el 3,6-dimetil éter y el 3,6,4'-trimetil éter del hidroxikaempferol; el 3,6-dimetil éter y el 3,6,4'-trimetil éter de la quercetagetina. Las siguientes flavonas: la apigenina, la luteolina, el crisoeriol, la apigenina 7-glucósido, la luteolina 7-glucósido. (Williams *et al.*, 1999).

Desde el punto de vista fitoquímico, *Tanacetum parthenium* contiene una gran variedad de constituyentes, entre los que destacan flavonoides, terpenoides, lactonas sesquiterpénicas, entre otros. Algunos de estos compuestos se ilustran en el Cuadro 3.

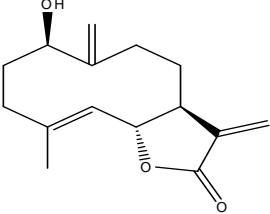
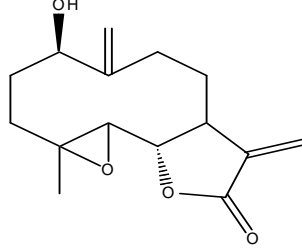
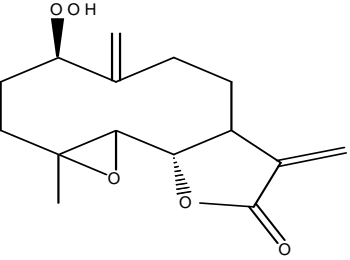
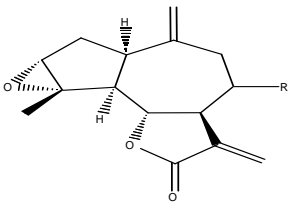
Desarrollo y Validación de un Método por Cromatografía de Líquidos para el Análisis de Santina como Compuesto Marcador de *Tanacetum parthenium*.

Cuadro 3. Principales compuestos de *Tanacetum parthenium*.

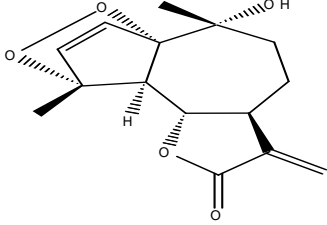
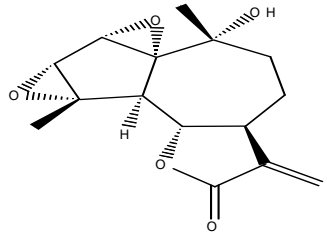
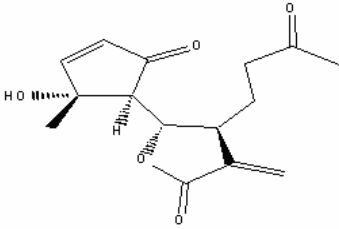
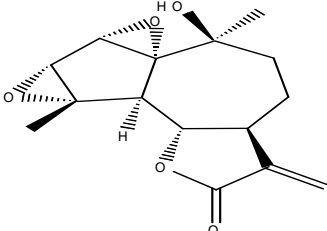
Nombre y Estructura	Parte estudiada	Origen de la muestra	Referencia
 <p>Parthenólida</p>	<p>Partes aéreas</p> <p>Flores, hojas, tallos y raíces</p> <p>Hojas y flores</p> <p>Hojas y semillas</p> <p>Partes aéreas</p>	<p>Alemania</p> <p>Reino Unido</p> <p>EUA</p> <p>EUA</p> <p>EUA</p>	<p>Boholman y Zdero, 1982.</p> <p>Heptinstall <i>et al.</i>, 1992.</p> <p>Cretnik <i>et al.</i>, 2005.</p> <p>Heptinstall <i>et al.</i>, 1992.</p> <p>Awang <i>et al.</i>, 1991.</p> <p>Avula <i>et al.</i>, 2006.</p>
 <p>3β-hidroxi parthenólida</p>	<p>Partes aéreas</p> <p>Partes aéreas</p>	<p>Alemania</p> <p>Reino Unido</p>	<p>Boholman y Zdero, 1982.</p> <p>Groenewegen <i>et al.</i>, 1986</p> <p>Cretnik <i>et al.</i>, 2005.</p>
 <p>R= H Costunólida R= OH 3β-hidroxicostunólida</p>	<p>Partes aéreas y semillas.</p> <p>Hojas y semillas</p>	<p>Alemania</p> <p>Reino Unido</p>	<p>Boholman y Zdero, 1982.</p> <p>Milbrodt <i>et al.</i>, 1996.</p>
 <p>3β-hidroxi anhydroverlotorina</p>	<p>Semillas</p>	<p>Alemania</p>	<p>Bohlman y Zdero, 1982.</p> <p>Milbrodt <i>et al.</i>, 1996.</p>

Desarrollo y Validación de un Método por Cromatografía de Líquidos para el Análisis de Santina como Compuesto Marcador de *Tanacetum parthenium*.

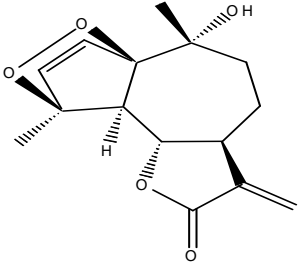
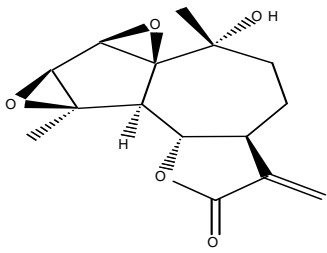
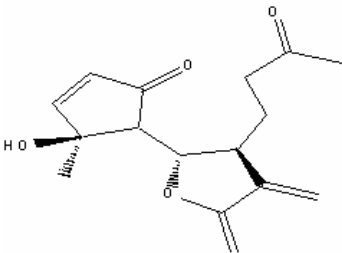
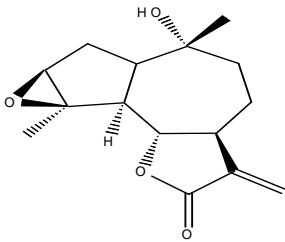
Cuadro 3. Principales compuestos de *Tanacetum parthenium* (Continuación).

Nombre y Estructura	Parte estudiada	Origen de la muestra	Referencia
 <p>Artemorina</p>	Partes aéreas	Alemania	Bohlman y Zdero, 1982.
 <p>Epoxiartemorina</p>	Partes aéreas	Alemania	Bohlman y Zdero, 1982.
 <p>Peróxido de epoxiartemorina</p>	Partes aéreas	Alemania	Bohlman y Zdero, 1982.
 <p>R= OH 8α-hidroxiestafiatina R= OBui 8α-isobutiloxiestafiatina R= OAng 8α-angeloiloxiestafiatina</p>	Partes aéreas	Alemania	Bohlman y Zdero, 1982. Milbrodt <i>et al.</i> , 1996.

Cuadro 3. Principales compuestos de *Tanacetum parthenium* (Continuación).

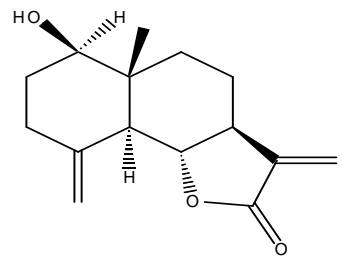
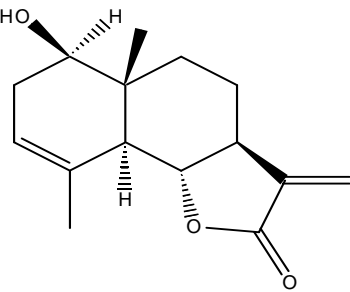
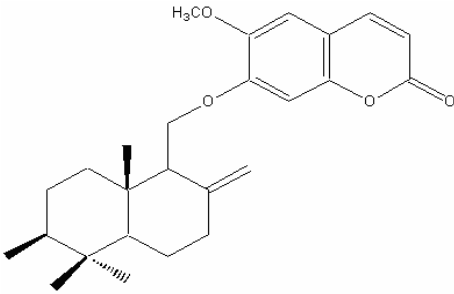
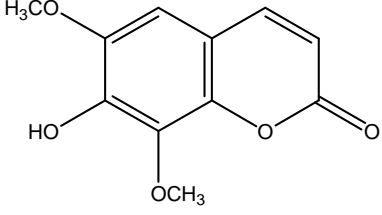
Nombre y Estructura	Parte estudiada	Origen de la muestra	Referencia
 <p>Tanapartina-α-peróxido</p>	Partes aéreas Hojas	Alemania Reino Unido	Bohlman y Zdero, 1982. Begley <i>et al.</i> , 1989.
 <p>Canina</p>	Partes aéreas Hojas Partes aéreas	Alemania Reino Unido México	Bohlman y Zdero, 1982. Goenewegen. <i>et al.</i> , 1986. Begley <i>et al.</i> , 1989. Romo <i>et al.</i> , 1970 Milbrodt <i>et al.</i> , 1996.
 <p>Seco-tanapartólida A</p>	Partes aéreas Hojas	Alemania Reino unido	Bohlman y Zdero, 1982 Groenewegen <i>et al.</i> , 1986 Milbrodt <i>et al.</i> , 1996.
 <p>10-epi-canina</p>	Partes aéreas	Alemania	Bohlman y Zdero, 1982.

Cuadro 3. Principales compuestos de *Tanacetum parthenium* (Continuación).

Nombre y Estructura	Parte estudiada	Origen de la muestra	Referencia
 <p>Tanapartina-β-peróxido</p>	Partes aéreas	Alemania	Bohlman y Zdero, 1982. Milbrodt <i>et al.</i> , 1996.
 <p>Artecánina</p>	Partes aéreas Hojas Hojas y semillas Partes aéreas	Alemania Reino Unido EUA México	Bohlman y Zdero, 1982. Groenewegen <i>et al.</i> , 1986. Begley <i>et al.</i> , 1989. Awang <i>et al.</i> , 1991. Romo <i>et al.</i> , 1965
 <p>Seco-tanapartólida B</p>	Partes aéreas Hojas	Alemania Reino Unido	Bohlman y Zdero, 1982. Begley <i>et al.</i> , 1989.
 <p>3,5-epoxi-8-desoxicumambrina B</p>	Raíces	Sudamerica	Milbrodt <i>et al.</i> , 1996.

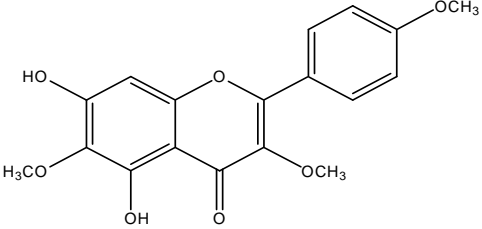
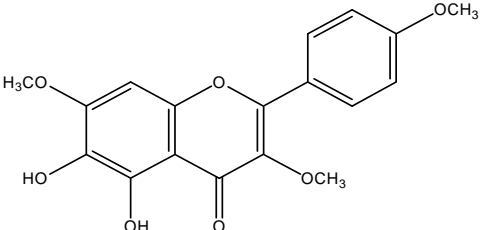
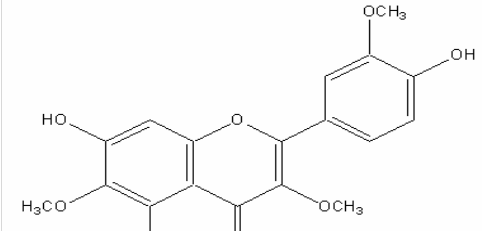
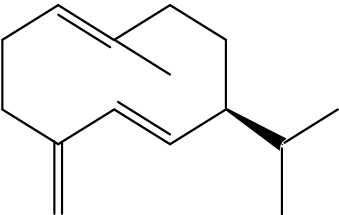
Desarrollo y Validación de un Método por Cromatografía de Líquidos para el Análisis de Santina como Compuesto Marcador de *Tanacetum parthenium*.

Cuadro 3. Principales compuestos de *Tanacetum parthenium* (Continuación).

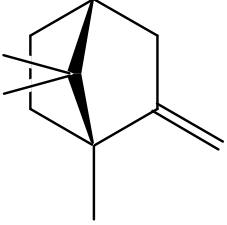
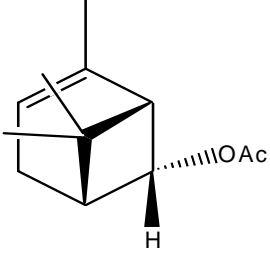
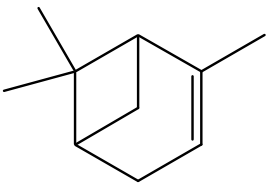
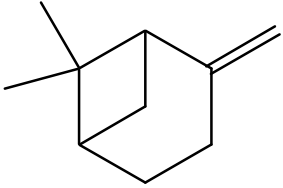
Nombre y Estructura	Parte estudiada	Origen de la muestra	Referencia
 <p>Reinosina</p>	<p>Partes aéreas</p> <p>Partes aéreas</p> <p>Hojas y semillas</p>	<p>México</p> <p>Alemania</p> <p>EUA</p>	<p>Romo <i>et al.</i>, 1970</p> <p>Boholman y Zdero, 1982.</p> <p>Awang <i>et al.</i>, 1991.</p>
 <p>Santamarina</p>	<p>Partes aéreas</p> <p>Hojas y semillas</p>	<p>México</p> <p>EUA</p>	<p>Romo <i>et al.</i>, 1965</p> <p>Awang <i>et al.</i>, 1991.</p>
 <p>9-epipectacol B</p>	<p>Raíces</p>	<p>Polonia</p>	<p>Kisel y Stojakowska, 1997.</p>
 <p>Isofraxidina</p>	<p>Raíces</p>	<p>Polonia</p>	<p>Kisel y Stojakowska, 1997.</p>

Desarrollo y Validación de un Método por Cromatografía de Líquidos para el Análisis de Santina como Compuesto Marcador de *Tanacetum parthenium*.

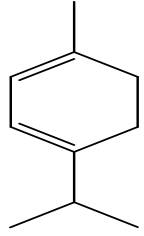
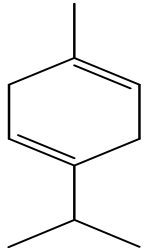
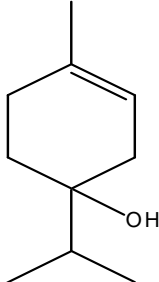
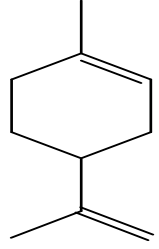
Cuadro 3. Principales compuestos de *Tanacetum parthenium* (Continuación).

Nombre y Estructura	Parte estudiada	Origen de la muestra	Referencia
 <p style="text-align: center;">Santina</p>	<p>Partes aéreas</p> <p>Partes aéreas</p>	<p>México</p> <p>Francia</p>	<p>Rodríguez <i>et al.</i>, 1973.</p> <p>Long <i>et al.</i>, 2003.</p>
 <p style="text-align: center;">Tanetina</p>	<p>Hojas, flores y semillas</p>	<p>Alemania</p>	<p>Williams <i>et al.</i>, 1999.</p>
 <p style="text-align: center;">Jaceidina</p>	<p>Partes aéreas</p>	<p>Francia</p>	<p>Long <i>et al.</i>, 2003.</p>
 <p style="text-align: center;">Germacreno D</p>	<p>Partes aéreas</p>	<p>Alemania Bélgica Egipto Reino Unido Holanda México Turquía</p>	<p>Boholman y Zdero, 1982. Hamidi y Nady, 1989. Hamidi y Nady, 1989. Hendriks <i>et al.</i>, 1996. Hendriks, et al., 1996. Akpulat <i>et al.</i>, 2005.</p>

Cuadro 3. Principales compuestos de *Tanacetum parthenium* (Continuación).

Nombre y Estructura	Parte estudiada	Origen de la muestra	Referencia
 <p>Alcanfor</p>	Partes aéreas	Alemania Bélgica Egipto Reino Unido Holanda Croacia México Turquía	Boholman y Zdero, 1982. Hamidi y Nady, 1989. Hamidi y Nady, 1989. Hendriks <i>et al.</i> , 1996. Kalodera <i>et al.</i> , 1997. Hendriks, <i>et al.</i> , 1996. Akpulat <i>et al.</i> , 2005.
 <p>Acetato de crisantenilo</p>	Partes aéreas	Alemania Bélgica Egipto Reino Unido Holanda Croacia México Turquía	Boholman y Zdero, 1982. Hamidi y Nady, 1989. Hamidi y Nady, 1989. Hendriks <i>et al.</i> , 1996. Kalodera <i>et al.</i> , 1997. Hendriks, <i>et al.</i> , 1996. Akpulat <i>et al.</i> , 2005.
 <p>α-pineno</p>	Partes aéreas	Alemania Bélgica Egipto Reino Unido Holanda Croacia México Turquía	Boholman y Zdero, 1982. Hamidi y Nady, 1989. Hamidi y Nady, 1989. Hendriks <i>et al.</i> , 1996. Kalodera <i>et al.</i> , 1997. Hendriks, <i>et al.</i> , 1996. Akpulat <i>et al.</i> , 2005.
 <p>β-pineno</p>	Partes aéreas	Alemania Bélgica Egipto Reino Unido Holanda México Turquía	Boholman y Zdero, 1982. Hamidi y Nady, 1989. Hamidi y Nady, 1989. Hendriks <i>et al.</i> , 1996. Hendriks, <i>et al.</i> , 1996. Akpulat <i>et al.</i> , 2005.

Cuadro 3. Principales compuestos de *Tanacetum parthenium* (Continuación).

Nombre y Estructura	Parte estudiada	Origen de la muestra	Referencia
 <p>α-terpineno</p>	Partes aéreas	Alemania Bélgica Egipto Reino Unido Holanda México Turquía	Boholman y Zdero, 1982. Hamidi y Nady, 1989. Hamidi y Nady, 1989. Hendriks <i>et al.</i> , 1996. Hendriks, et al., 1996. Akpulat <i>et al.</i> , 2005.
 <p>γ-terpineno</p>	Partes aéreas	Alemania Bélgica Egipto Reino Unido Holanda México Turquía	Boholman y Zdero, 1982. Hamidi y Nady, 1989. Hamidi y Nady, 1989. Hendriks <i>et al.</i> , 1996. Hendriks, et al., 1996. Akpulat <i>et al.</i> , 2005.
 <p>4-terpineol</p>	Partes aéreas	Alemania Bélgica Egipto Reino Unido Holanda México Turquía	Boholman y Zdero, 1982. Hamidi y Nady, 1989. Hamidi y Nady, 1989. Hendriks <i>et al.</i> , 1996. Hendriks, et al., 1996. Akpulat <i>et al.</i> , 2005.
 <p>Limoneno</p>	Partes aéreas	Alemania Bélgica Egipto Reino Unido Holanda México Turquía	Boholman y Zdero, 1982. Hamidi y Nady, 1989. Hamidi y Nady, 1989. Hendriks <i>et al.</i> , 1996. Hendriks, et al., 1996. Akpulat <i>et al.</i> , 2005.

2.4.3 Métodos de cuantificación de partenólida.

Actualmente existen métodos para la cuantificación de partenólida, todos ellos basados en la Cromatografía de Líquidos de Alta Presión algunos de ellos acoplados a espectroscopia de masas o a un detector de UV (ZiQi Zhou *et al.*, 1999; Avula *et al.*, 2006).

2.4.4 Santina.

2.4.4.1 Propiedades.

Nombre index: 3,6,4' trimetil eter.

Nombre trivial: santina

Formula condensada: C₁₈ H₁₆ O₇

Peso molecular: 344.32 g/mol

Estructura:

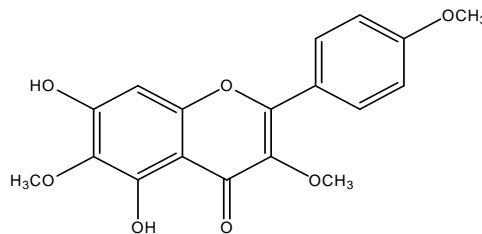


Figura 2. Estructura de la santina

2.4.4.2 Actividad biológica.

Se ha encontrado que los flavonoides de *Tanacetum parthenium*, entre ellos la santina, poseen una actividad antiinflamatoria (Williams *et al.*, 1999); también se ha reportado que este flavonoide tiene una actividad antimicótica (Long *et al.*, 2003).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Hasta ahora sólo se ha considerado a la partenólida como compuesto marcador de la especie *Tanacetum parthenium*, compuesto al que se le ha atribuido la actividad terapéutica contra la migraña. Estudios realizados recientemente han demostrado que este compuesto no está presente en todas las muestras de *T. parthenium* o simplemente se encuentra en pequeñas cantidades no cuantificables (Avula *et al.*, 2006). Se sabe también que hay grandes variaciones en el contenido de Partenólida tanto en materia prima como en productos comerciales que contienen *T. parthenium* (Awang *et al.*, 1991), y que la cantidad de partenólida varía en función del ciclo vegetativo, alcanzando su concentración máxima en el momento de la floración (Hendriks, 1997).

Existe gran controversia al proponer a la partenólida como el único compuesto activo de *T. parthenium*. Béjar (1996) propone que no sólo la partenólida le confiere la actividad biológica a esta planta, sino que existen otros compuestos que pueden ser los responsables de la profilaxis de la migraña. Por otro lado, independientemente de que contenga o no partenólida, la planta se utiliza para elaborar fitomedicamentos, sin embargo no se puede realizar la cuantificación de partenólida para aquellas muestras en las que este compuesto se encuentra en cantidades no cuantificables o está ausente.

Por lo anterior, se llevó a cabo el aislamiento de santina de una muestra de *Tanacetum parthenium*, con la finalidad de proponerlo como compuesto marcador de esta especie, así como también se realizó el desarrollo y la

Desarrollo y Validación de un Método por Cromatografía de Líquidos para el Análisis de Santina como Compuesto Marcador de *Tanacetum parthenium*.

validación de un método por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión para el análisis del contenido de este metabolito en diferentes tipos de muestras de *Tanacetum parthenium* y productos comerciales que contengan esta planta.

IV. HIPÓTESIS.

La santina es un compuesto que se encuentra en la planta de *Tanacetum parthenium* de diferentes orígenes por lo que será un buen compuesto marcador para dicha especie que a diferencia de la partenólida se encuentra en concentraciones suficientes para cuantificarse por cromatografía de líquidos en las diferentes muestras provenientes de plantas cultivadas y colectadas en diferentes lugares y épocas del año.

V. OBJETIVO.

Desarrollar y validar un método por HPLC para el análisis de santina en muestras de *Tanacetum parthenium* de diferentes orígenes.

VI. METODOLOGÍA.

En el Diagrama 1 se representa el esquema general de la metodología utilizada en este trabajo.

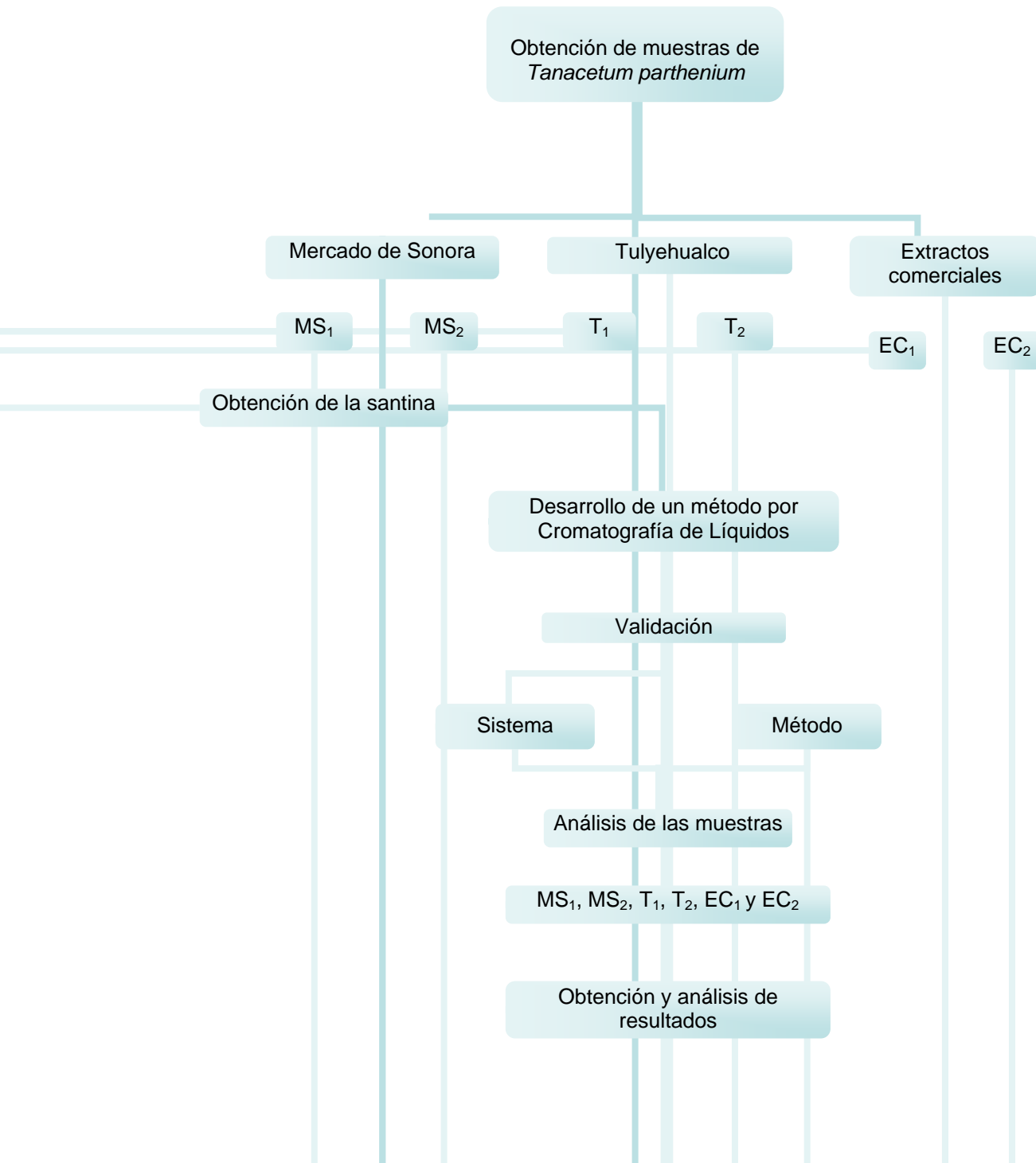


Diagrama 1. Diagrama de Flujo de la Metodología

Desarrollo y Validación de un Método por Cromatografía de Líquidos para el Análisis de Santina como Compuesto Marcador de *Tanacetum parthenium*.

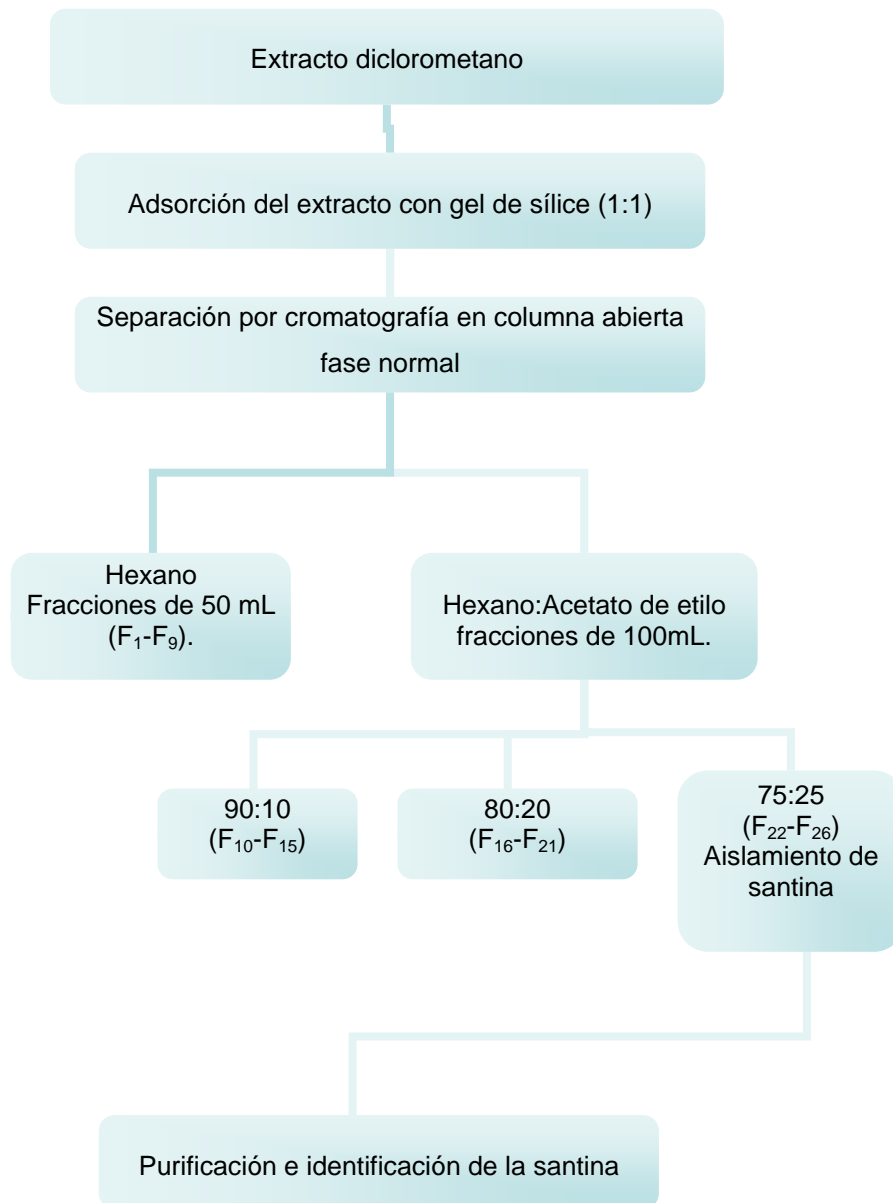


Diagrama 2. Aislamiento de santina de *T. parthenium*.

6.1 Aparatos.

El punto de fusión se determinó en un aparato Electrothermal Digital IA9100. El espectro de infrarrojo (IR) se registró en espectrómetro Perkin Elmer modelo 599 y los espectros de Resonancia Magnética Nuclear RMN-¹H y RMN-¹³C se obtuvieron en un espectrómetro Varian Modelo Unity INOVA 300 o 400MHz.

Para el desarrollo y validación del método para cuantificar a la santina se utilizó un cromatógrafo de líquidos marca Waters con un detector con arreglo de diodos 2696, un inyector 717 plus y una bomba 600. Para el procesamiento de los datos se utilizó como software Epower.

6.2 Material vegetal.

La santina se aisló de una muestra de *Tanacetum parthenium* que fue adquirida en el Mercado de Sonora (MS₁) el 29 de Enero de 2007, el mercado se encuentra ubicado en Av. Fray Servando Teresa de Mier # 419 Col. Merced Balbuena, Delegación Venustiano Carranza, México, D.F.

Se analizaron 6 muestras de *Tanacetum parthenium* por cromatografía de líquidos, dos del Mercado de Sonora (MS₁ y MS₂), la primera adquirida el 29 de Enero y la otra el 10 de Febrero de 2007; dos muestras colectadas en Tulyehualco (T₁ y T₂) la primera el 3 de Febrero y la segunda el 23 de Febrero de 2006 y dos extractos comerciales uno del proveedor Amax NutraSource (EC₁) y otro de los Laboratorios Mixim (EC₂).

6.3 Obtención del Extracto de Diclorometano.

La planta que fue adquirida en el Mercado de Sonora (MS1) el 29 de Enero de 2007, se dejó secar a la sombra durante una semana. La planta seca y molida (952 g) fue macerada con diclorometano durante 72 horas, el extracto se filtró y se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio. Este procedimiento se realizó por triplicado. Después de eliminar el disolvente se obtuvo una pasta verde oscuro (68 g).

6.4 Aislamiento de la santina del *Tanacetum parthenium*.

El extracto de diclorometano (65 g) se adsorbió en proporción 1:1 con gel de sílice 60 (0.063-0.2mm), inmediatamente después se realizó una separación por cromatografía en columna abierta fase normal, utilizando como eluyentes hexano y acetato de etilo en diferentes proporciones (Diagrama 2).

La fase móvil utilizada inicialmente para eluir la columna fue Hexano (100%), colectando 9 fracciones de 50mL (F_1 - F_9). Posteriormente se cambió la polaridad de la fase móvil a Hexano:Acetato de etilo en una proporción 90:10 colectándose 6 fracciones de 100mL (F_{10} - F_{15}). Se hizo nuevamente un cambio en la polaridad de la fase móvil, Hexano:Acetato de etilo (80:20), se colectaron 5 fracciones (F_{16} - F_{21}) de 100mL cada una. Para el aislamiento de la santina, la columna se eluyó con una fase móvil Hexano: Acetato de etilo (75:25). De la fracción 22 a la fracción 26(F_{22} - F_{26}) se identificó que estaba presente la santina; esto se obtuvo realizando cromatografía en capa fina a cada una de las fracciones, utilizando sulfato cérico amoniacal como revelador, y comparando cada fracción con un compuesto estándar de santina. Se juntaron

Desarrollo y Validación de un Método por Cromatografía de Líquidos para el Análisis de Santina como Compuesto Marcador de *Tanacetum parthenium*.

todas las fracciones donde estaba presente la santina, se concentró el volumen resultante a presión reducida y se observó la formación de un precipitado amarillo (Diagrama 2).

6.5 Desarrollo y validación del método para cuantificar santina.

Para el análisis de la santina y de las muestras de *Tanacetum parthenium* se utilizó inicialmente un método por HPLC que fue nombrado como FEVERFEW con las siguientes condiciones:

Velocidad de flujo: 1 mL/minuto

Temperatura: 30°C

Tiempo de corrida: 40 minutos

Longitud de onda: 210 nm

Tipo de columna: Luna C₁₈, Phenomenex 150x4.6 mm, tamaño de partícula de 5µm .

Para la preparación de la solución estándar de santina y de las muestras de *Tanacetum parthenium* se utilizó como disolvente metanol (MeOH) grado HPLC.

Se utilizó un sistema de gradientes para la fase móvil como se muestra en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Esquema de gradiente de la fase móvil.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% Acetonitrilo (ACN)	% ACN:MeOH (9:1)	% Agua
0.01	1.00	0.0	20.0	80.0
20.00	1.00	0.0	90.0	10.0
20.10	1.00	100.0	0.0	0.0
25.00	1.00	100.0	0.0	0.0
25.10	1.00	0.0	20.0	80.0
40.00	1.00	0.0	20.0	80.0

A dicho método se le hicieron algunas modificaciones con la finalidad de obtener las condiciones adecuadas para el análisis de santina, las modificaciones realizadas consistieron en utilizar diferentes velocidades de flujo, modificar el tiempo de corrida así como también modificar el esquema de gradientes de la fase móvil que se muestra en el Cuadro 4. Después de realizar las pruebas anteriores se obtuvo un método adecuado para el análisis de santina, dicho método fue nombrado FEVERFEW_1.

6.5.1 Preparación de la solución estándar de santina.

Se preparó una solución de santina a una concentración de 100 µg/mL, la cual se inyectó en el cromatógrafo utilizando el método de FEVERFEW_1, método que se obtuvo para el análisis de este compuesto.

6.5.2 Preparación y análisis de una muestra de *T. parthenium*.

A 300 mg de la planta seca y molida se le adicionó 2.5 mL de metanol, se puso a sonicar durante 15 minutos y posteriormente se centrifugó a 5500 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se colocó a un matraz volumétrico de 10 mL. Este procedimiento se realizó por triplicado y se aforó con metanol. Esta muestra fue inyectada en el cromatógrafo con el método de FEVERFEW_1.

6.5.3 Determinación de la concentración de santina en la muestra de *T. parthenium*.

En el cromatograma obtenido para la muestra de *Tanacetum parthenium* se identificó el pico que correspondía a la santina esto se hizo con respecto al cromatograma obtenido para la solución estándar de santina que se inyectó. Se compararon las áreas de los picos para determinar la concentración de santina

presente en la muestra. Dicha concentración se tomó como el 100% de la curva para la validación. Los niveles de la curva corresponden al 20, 60, 100, 140 y 200 % los cuales corresponden a las siguientes concentraciones: 16, 48, 80, 112 y 160 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

6.6 Validación del sistema.

6.6.1 Linealidad del sistema.

Se preparó una solución stock de santina a una concentración de 800 $\mu\text{g/mL}$, de esta solución se hicieron las diluciones respectivas para obtener soluciones con las siguientes concentraciones: 160 $\mu\text{g/mL}$, 480 $\mu\text{g/mL}$ y 560 $\mu\text{g/mL}$. Con estas soluciones se prepararon por dilución los 5 niveles de concentración para la curva de la siguiente manera: de las soluciones de 160, 480 y 800 $\mu\text{g/mL}$ se tomaron alícuotas de 1 mL las cuales fueron transferidas a matraces volumétricos de 10 mL cada una y aforando con metanol cada matraz, obteniéndose así la soluciones de 16, 48 y 80 $\mu\text{g/mL}$ que corresponden al 20, 60 y 100% en la curva. De las soluciones de 560 y 800 $\mu\text{g/mL}$ se traspasaron alícuotas de 2 mL a matraces volumétricos de 10 mL, se aforó cada matraz con metanol para obtener soluciones con concentraciones de 112 y 160 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. 1 mL de cada una de las soluciones obtenidas se colocó en un vial y se inyectó por triplicado en el cromatógrafo con el método de FEVERFEW_1.

Con los resultados obtenidos se construyó la gráfica de concentración vs área y se determinaron los siguientes parámetros: pendiente (b_1), ordenada al origen

(b_0), coeficiente de determinación (r^2), promedio (\bar{y}), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV) de acuerdo a la siguiente expresión:

$$CV = \frac{S}{\bar{y}} \times 100$$

6.6.2 Precisión del sistema.

Se preparó por dilución una solución de 80 $\mu\text{g/mL}$, que corresponde al 100% de la curva, 1 mL de la solución se colocó en un vial y se inyectó por sextuplicado. Posteriormente se determinó el promedio (\bar{y}), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV).

6.6.3 Aptitud del sistema.

Se inyectó por quintuplicado una solución de santina con una concentración de 80 $\mu\text{g/mL}$, preparada por dilución. Se determinó el coeficiente de variación (CV) y para cada inyección se determinó el factor de retención (T) y el factor de capacidad (k') obteniendo los valores directamente del software del equipo utilizado (Empower).

6.7 Validación del método.

6.7.1 Preparación del placebo analítico.

A 15 g de la planta seca y molida se le adicionaron 100 mL de metanol se sonicó durante 20 minutos y se dejó sedimentar. Posteriormente el metanol se

separó por decantación de la planta. Este procedimiento se realizó cuatro veces y el residuo vegetal obtenido (placebo) se dejó secar.

6.7.2 Linealidad del método.

Para realizar éste parámetro se prepararon los mismos niveles de concentración que se utilizaron para la linealidad del sistema.

Se prepararon tres placebos adicionados por cada nivel de la curva de la siguiente manera: se pesaron 300 mg del placebo analítico en tubos de 15 mL, se les adicionó, a partir de una solución stock de santina, el volumen correspondiente para obtener concentraciones de 16, 48, 80, 112, 160 µg/mL respectivamente, dichas concentraciones corresponden a cada uno de los niveles de la curva. Cada uno de los placebos adicionados se extrajo con 2.5 mL de metanol sonicándolos 15 minutos y centrifugándolos a 5500 rpm durante 15 minutos. Este procedimiento se realizó por triplicado. El sobrenadante se colocó en matraces volumétricos de 10mL y posteriormente se aforó con metanol. Estas muestras se analizaron en el cromatógrafo de líquidos utilizando el método obtenido para el análisis de santina (FEVERFEW_1).

Se construyó la gráfica de cantidad adicionada vs cantidad recuperada, y se calculó el valor de la pendiente (b_1), la ordenada al origen (b_0) y el coeficiente de determinación (r^2). Se calculó el % de recobro para cada placebo adicionado, el promedio aritmético (\bar{y}), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV), el intervalo de confianza para la media poblacional (IC μ) del porcentaje de recobro a partir de la siguiente relación:

$$\% \text{ de recobro} = \frac{\text{cantidad recuperada}}{\text{cantidad recuperada}} \times 100$$

6.7.3 Prueba de homoscedasticidad.

Se realizó la prueba de homoscedasticidad para obtener la curva de calibración adecuada.

Para realizar la prueba se calculó la varianza del nivel de concentración menor (s_1^2) y la varianza del nivel de concentración mayor (s_2^2) de la curva. Posteriormente se determinó el valor de F por medio de la siguiente expresión:

$$F_{\text{exp}} = \frac{s_2^2}{s_1^2}$$

La F experimental (F_{exp}) obtenida se comparó con la F de tablas con un nivel de confianza del 99%.

Se calculó el valor de los residuales por medio de la siguiente expresión:

$$\text{Residual} = (y_{\text{observada}} - y_{\text{predicta}})$$

Se construyó la gráfica de residuales vs concentración para determinar si la distribución de los valores obtenidos está por arriba y por debajo de la media.

Para obtener la ecuación adecuada se calculó la sumatoria del por ciento de error relativo (% RE) de los modelos de calibración propuestos por Almeida y colaboradores (2002), utilizando la siguiente expresión:

$$\% RE = \frac{\text{Concentración}_{obtenida} - \text{Concentración}_{no\ min\ al}}{\text{Concentración}_{no\ min\ al}} \times 100$$

6.7.4 Exactitud y repetibilidad del método.

Se prepararon seis placebos adicionados a una concentración de 80 µg/mL, realizando el mismo procedimiento de extracción que se utilizó en la linealidad del método. Las muestras obtenidas se analizaron en el cromatógrafo de líquidos.

Se determinaron los siguientes parámetros: el % de recobro para cada placebo adicionado, el promedio aritmético (\bar{y}), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media poblacional (IC μ) del % de recobro.

6.7.5 Precisión del método (Precisión intermedia).

Para la determinación de éste parámetro, dos analistas prepararon tres placebos adicionados, por analista, a una concentración de 80 µg/mL, en dos días diferentes. Los placebos se prepararon siguiendo el mismo procedimiento para determinar los parámetros anteriores y posteriormente las muestras obtenidas fueron analizadas.

Se calculó la media aritmética (\bar{y}), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV).

6.7.6 Robustez.

Se preparó un placebo adicionado que representaba el 100 % de la curva (80 μ g/mL). La muestra obtenida se analizó por triplicado utilizando las condiciones normales del método para el análisis de santina.

La misma muestra se analizó por triplicado utilizando un flujo a 0.8 mL/min y posteriormente se analizó con un flujo de 1.2 mL/min. La misma muestra fue analizada modificando en el método la temperatura a 25 °C y después modificándola a 35 °C.

Se determinó la media aritmética de la muestra analizada con las condiciones normales (\bar{y}_0) y de cada condición diferente a la condición normal (\bar{y}_i). Se calculó la diferencia de la media aritmética de cada condición con respecto a la condición normal (d_i).

6.7.7 Tolerancia.

Se preparó un placebo adicionado a una concentración de 80 μ g/mL. La muestra obtenida se analizó por triplicada utilizando una columna de 10 cm de longitud. Posteriormente la misma muestra fue analizada utilizando una columna de 25 cm de longitud.

Se calculó la media aritmética (\bar{y}), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV).

6.7.8 Límite de Detección (LD).

El LD se determinó con base a la señal de ruido del aparato, que consiste en inyectar en el cromatógrafo una muestra del placebo analítico utilizando el método de análisis y medir la respuesta que se presenta en el tiempo de retención de la santina (señal de ruido). La concentración que corresponde al límite de detección debe presentar una respuesta tres veces mayor a la señal de ruido.

Se analizaron muestras que tenían las siguientes concentraciones: 0.8, 1.6, 3.2 y 4.8 µg/mL. Se eligió la concentración que presentó una respuesta con respecto a la muestra blanco en una proporción 3 a 1, lo que corresponde a la concentración asociada al límite de detección. Posteriormente se prepararon 3 placebos adicionados a la concentración que corresponde al límite de detección, las muestras obtenidas fueron analizadas. Con los resultados obtenidos se determinó el CV.

6.7.9 Límite de Cuantificación (LC).

Para determinar el LC se analizó una muestra de placebo de analítico y se midió la respuesta que se presenta en el tiempo de retención de la santina (señal de ruido). La concentración que corresponde al límite de cuantificación es 10 veces mayor a la señal de ruido.

Se analizó una muestra blanco y muestras a concentraciones de 4.8, 6.4 y 8.0 µg/mL. Se eligió la concentración que presentó una señal similar o mayor a la muestra blanco en una proporción 10 a 1 lo que corresponde a la

concentración asociada al límite de cuantificación. Se determinó la exactitud y la repetibilidad de los resultados obtenidos.

6.7.10 Análisis de muestras.

Se analizaron dos muestras adquiridas en el Mercado de Sonora (MS₁ y MS₂), dos muestras provenientes de Tulyehualco (T₁ y T₂) y dos extractos comerciales (EC₁ y EC₂).

Para la preparación de las muestras, se pesaron 300 mg de cada muestra, se extrajeron con 2.5 mL de metanol, sonicándolas 15 minutos y centrifugándolas a 5500 rpm durante 15 minutos, este procedimiento se realizó tres veces. El sobrenadante obtenido en cada extracción se colocó en matraces volumétricos de 10 mL, y llevó al aforo con el mismo disolvente. Las muestras obtenidas se analizaron en el cromatógrafo para determinar el contenido de santina.

VII. RESULTADOS

La santina obtenida se identificó como un polvo fino de color amarillo con un punto de fusión de 160-161 °C. Al inyectar el compuesto en el cromatógrafo de líquidos, el tiempo de retención fue de 19.2 minutos. También se identificó a la santina mediante los espectros de espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN-¹H y RMN-¹³C) y el espectro de infrarrojo (Anexo Figuras 1-3).

El método obtenido para el análisis de santina tiene las siguientes condiciones:

Velocidad de flujo: 1 mL/minuto, temperatura de 30°C, un tiempo de corrida de 30 minutos, la longitud de onda es de 210 nm, una columna luna C₁₈ Phenomenex de 150mm de largo y 4.6 mm de diámetro con un tamaño de partícula de 5µm y el disolvente para la extracción de santina en las muestras es metanol grado HPLC.

Se utilizó un sistema de gradientes para la fase móvil de acuerdo al siguiente cuadro:

Cuadro 5. Esquema de gradientes de la fase móvil.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% ACN	% ACN:MeOH (9:1)	% AGUA
0.01	1.00	0.0	20.0	80.0
20.00	1.00	0.0	90.0	10.0
20.10	1.00	100.0	0.0	0.0
25.00	1.00	100.0	0.0	0.0
25.10	1.00	0.0	20.0	80.0
30.00	1.00	0.0	20.0	80.0

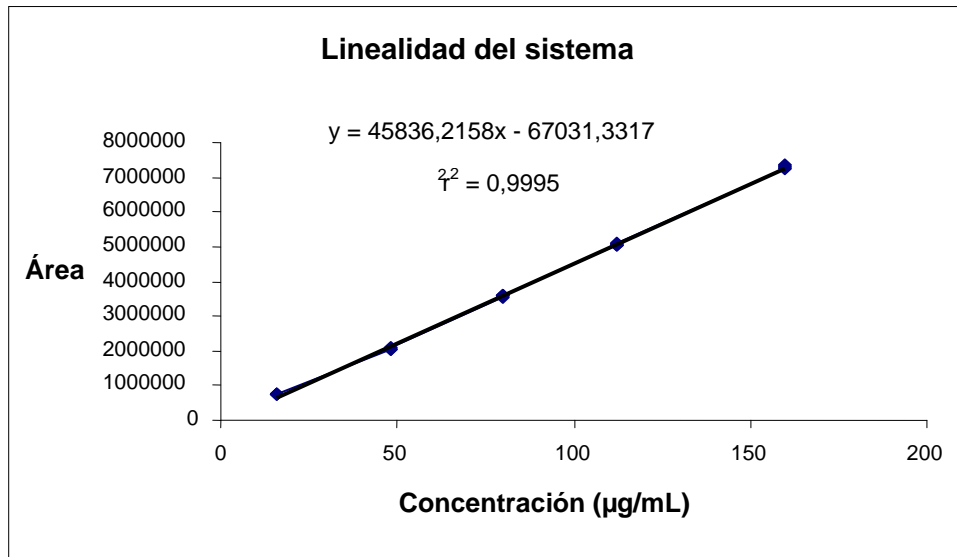
7.1 Linealidad del sistema.

En el Cuadro 6 se presentan los valores de Área, promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para cada una de las concentraciones de santina utilizadas para determinar la linealidad del sistema. El coeficiente de variación entre cada nivel es menor del 2%.

Cuadro 6. Áreas obtenidas, en los tres puntos, por cada nivel de concentración y C.V. de cada nivel para determinar la linealidad del sistema.

Concentración (µg/mL)	Área	Promedio	S	C.V.
16	731816.8817	739151.9020	6905.9170	0.9343
16	740110.2060			
16	74528.6182			
48	2047250.6217	2058021.0660	12895.3783	0.6266
48	2054501.8550			
48	2072310.7212			
80	3566142.8893	3574543.5581	9778.7944	0.2736
80	3585278.1402			
80	3572209.6448			
112	5058257.0105	5065618.0467	2085.,9804	0.4116
112	5049444.9392			
112	5089152.1903			
160	7265475.9310	7295374.5616	38143.0403	0.5228
160	7282315.9237			
160	7338331.8300			

En la Gráfica 1 se muestra la curva de calibración obtenida para la linealidad del sistema, se reporta además la ecuación y el coeficiente de determinación (r^2), este último parámetro determina si el sistema es lineal o no.



Grafica 1. Curva estándar para determinar la linealidad del sistema.

7.2 Precisión del sistema.

En el Cuadro 7 se muestran los valores de área, a una concentración de santina de 80 µg/mL, obtenidos, así como también se presentan los valores de promedio, desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV) que al ser menor a 2% indica que hay precisión en el sistema.

Cuadro 7. Precisión del sistema.

Concentración (µg/mL)	Área
80	3566142.8893
80	3585278.1402
80	3572209.6448
80	3583379.5868
80	3591003.6048
80	3600052.2730
Promedio	3583011.0232
S	12335.0309
C.V.	0.3443 %

7.3 Aptitud del sistema.

El Cuadro 8 representa los valores de factor de coe (T) y factor de capacidad (k') obtenidos directamente del software, dichos parámetros al estar dentro de las especificaciones indican que el sistema cumple con la prueba de aptitud, además se reportan los valores de promedio, desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV) para cada uno de los parámetros obtenidos. El coeficiente de variación debe ser menor al 2%.

Cuadro 8. Aptitud del sistema.

No. De inyección	Concentración (µg/mL)	Área	Resultado		Especificación	
			k'	T	k'	T
1	80	3585278.1402	18.1530	1.1814	> 2	< 2
2	80	3572209.6448	18.1290	1.1779		
3	80	3583379.5868	18.1200	1.1869		
4	80	3591003.6048	18.1180	1.1773		
5	80	3600052.2730	18.1340	1.2010		
	Promedio	3586384.6499	18.1308	1.1849		
	S	10238.7036	0.0140	0.0098		
	C.V.	0.2855	0.0774	0.8250		

7.4 Linealidad del método.

Los valores de porcentaje de recobro, promedio, desviación estándar(S) y coeficiente de variación (CV) para determinar la linealidad del método se presentan en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Porcentajes de recobro, promedio y CV, obtenidos para la linealidad del método, por cada nivel de concentración

Concentración (µg/mL)	Área	Concentración recuperada (µg/mL)	% de recobro	Promedio	S	CV
16	682626.4170	16.3551	102.2196	101.7120	0.6584	0.6473
16	680636.4910	16.3117	101.9483			
16	673447.8745	16.1549	100.9681			
48	2106055.5693	47.4098	98.7705	99.0421	0.4123	0.4163
48	2122470.5862	47.7679	99.5166			
48	2107569.2047	47.4428	98.8393			
80	3513421.7138	78.1141	97.6426	97.0982	0.6660	0.6859
80	3500727.2828	77.8371	97.2964			
80	3466229.6341	77.0845	96.3556			
112	4987820.4483	110.2807	98.4649	99.1484	0.5919	0.5970
112	5040504.5585	111.4301	99.4912			
112	5040392.9281	111.4277	99.4890			
160	7139144.6830	157.2158	98.2599	98.6047	0.3730	0.3783
160	7160682.6191	157.6857	98.5535			
160	7193474.0221	158.4011	99.0007			

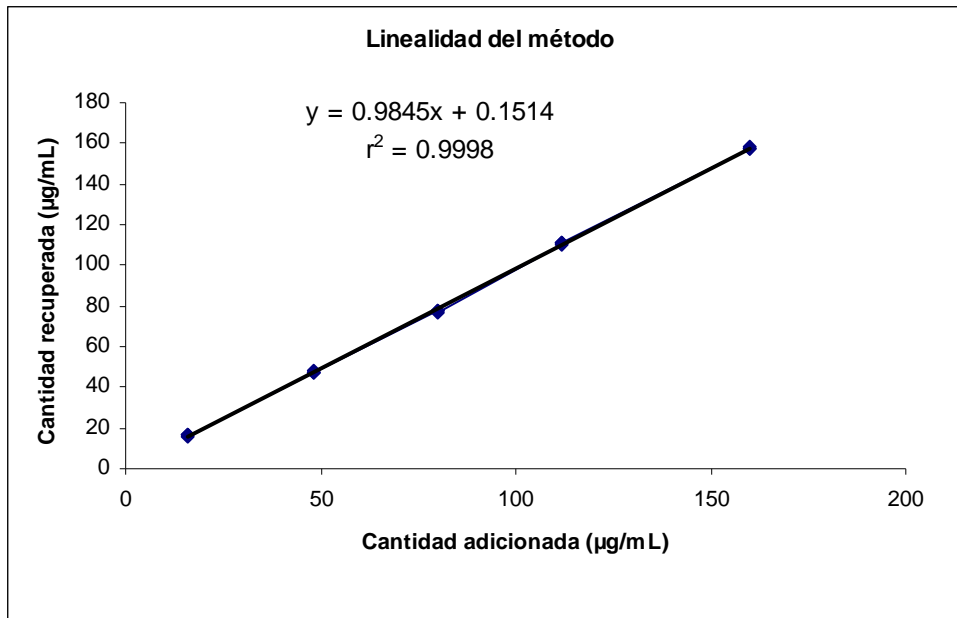
Los parámetros requeridos y especificaciones para la linealidad del método se muestran en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Parámetros requeridos en la linealidad del método.

Parámetro	Resultado	Especificación
r^2	0.9998	≥ 0.98
Promedio	99.12 %	98-102%
CV	1.62 %	$\leq 2\%$
IC (μ)	(98.22, 100.01)	El intervalo incluye el valor de 100% o el promedio aritmético del % de recobro se incluya en el intervalo 98-102%

Desarrollo y Validación de un Método por Cromatografía de Líquidos para el Análisis de Santina como Compuesto Marcador de *Tanacetum parthenium*.

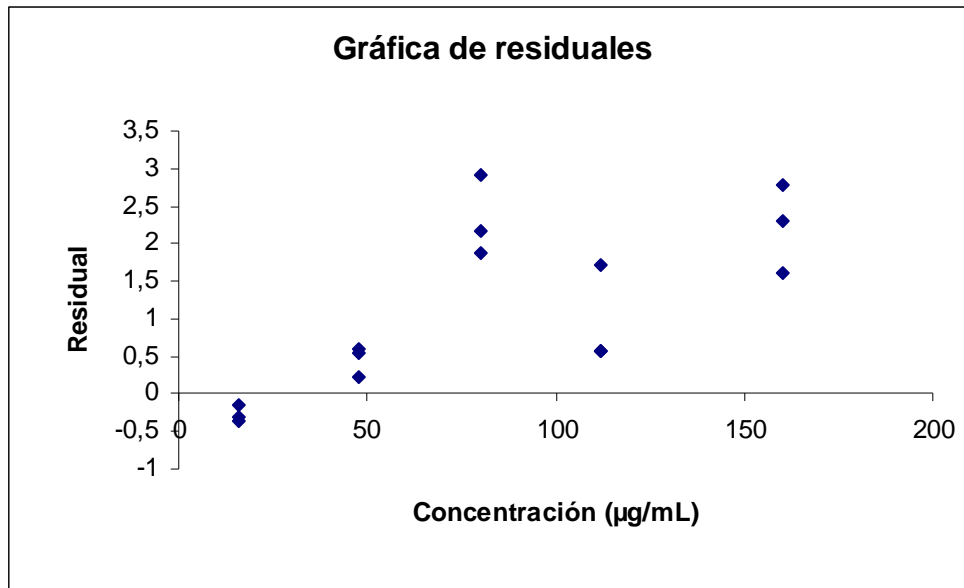
La Gráfica 2 muestra la linealidad del método obtenida, así como también se reporta el coeficiente de determinación (r^2).



Gráfica 2. Cantidad adicionada vs Cantidad recuperada.

7.5 Prueba de homoscedasticidad.

Se realizó la prueba de homoscedasticidad comparando el valor obtenido de la F experimental (30.51) con F de tablas (99), y obteniendo la gráfica de residuales vs concentración (Gráfica 3).



Gráfica 3. Residuales vs Concentración.

Se obtuvo la sumatoria por ciento de error relativo (% RE) de los modelos de calibración de regresión que se muestran en el Cuadro 11 para determinar cual es el más adecuado.

Cuadro 11. %RE obtenido por cada modelo de calibración de regresión.

W_i	Ordenada al origen	Pendiente	r^2	$\Sigma\%RE$
x^0	-67031.3317	45836.2158	0.9997	23.4559
$1/y^{1/2}$	-37186.8478	45508.7365	0.9997	37.4145
$1/y$	-12760.1889	45166.5416	0.9996	32.3064
$1/y^2$	19135.5945	44436.6032	0.9993	28.8469
$1/x^{1/2}$	-36042.1269	45502.9767	0.9997	37.1618
$1/x$	-11267.6964	45165.9798	0.9996	31.8709
$1/x^2$	19383.9502	44485.4403	0.9994	28.1781

El modelo en el que se obtuvo el menor valor de por ciento de error relativo es en el que W_i es igual a x^0 , por lo tanto la ecuación obtenida fue:

$$y = 45836.2158x - 67031.3317$$

7.6 Exactitud y repetibilidad.

Para determinar la exactitud y la repetibilidad del método se calculó el porcentaje de recobro, estos resultados se presentan en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Porcentajes de recobro para la exactitud y repetibilidad del método.

Concentración (µg/mL)	Área	Concentración recuperada (µg/mL)	% de recobro
80	3533422	78.5504	98.1880
80	3550727	78.9280	98.6599
80	3523937	78.3435	97.9293
80	3539152	78.6754	98.3443
80	3538125	78.6530	98.3163
80	3542930	78.7578	98.4473

Los parámetros requeridos para la exactitud y la repetibilidad del método se muestran en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Parámetros requeridos para exactitud y repetibilidad del método.

Parámetro	Resultado	Especificación
Promedio del % de recobro	98.3141 %	El promedio aritmético se incluye en el intervalo 98-102%
C.V	0.2501 %	No es mayor al 2%

7.7 Precisión intermedia.

Para la precisión intermedia se calculó el promedio, la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV), los valores de estos parámetros se presentan en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Relación de las concentraciones obtenidas en dos días diferentes por dos analistas diferentes.

		Concentración obtenida (µg/mL)	
		Analista	
		1	2
Día	1	78.1141	78.6754
		77.8371	78.2167
		78.3435	78.7578
	2	77.0845	77.6915
		76.8322	77.5656
		77.3974	77.4985
Promedio		77.8345	
S		0.6035	
CV		0.7754 %	

Los parámetros requeridos para la precisión intermedia se muestran en el Cuadro 15.

Cuadro 15. Parámetros requeridos para la precisión intermedia.

Parámetro	Resultado	Especificación
C.V	0.7754 %	No es mayor al 2%

7.8 Robustez.

En el Cuadro 16 se presentan los valores del porcentaje de santina obtenidos por cada una de las temperaturas utilizadas para determinar la robustez.

Cuadro 16. Valoración (%) del analito modificando en el método la temperatura.

Muestra	Condición		
	Temperatura (°C)		
	25	30	35
	Baja(y_1)	Normal (y_0)	Alta (y_2)
1	104.3757	98.9188	105.5013
2	104.7875	100.0558	105.5920
3	104.7292	101.0253	106.1857
\bar{y} (%)	104.6308 %	100 %	105.7596 %

El Cuadro 17 presenta los parámetros requeridos para determinar la robustez modificando en el método la temperatura.

Cuadro 17. Parámetros requeridos para la robustez (temperatura).

Parámetro	Resultado	Especificación
d1	4.63 %	< 2%
d2	5.76 %	< 2%

El Cuadro 18 muestra los valores de porcentaje de santina obtenidos utilizando diferentes velocidades de flujo.

Cuadro 18. Valoración (%) del analito modificando en el método el flujo.

Muestra	Condición		
	Flujo (mL/min)		
	0.8	1.0	1.2
	Baja (y_1)	Normal (y_0)	Alta (y_2)
1	-----	98.91884994	87.4888309
2	-----	100.0558162	87.2796094
3	-----	101.0253338	86.9839657
\bar{y} (%)	-----	100.00 %	87.2508 %

En el Cuadro 19 se muestran los parámetros requeridos para la robustez modificando en el método la velocidad de flujo.

Cuadro 19. Parámetros requeridos para la robustez (velocidad de flujo)

Parámetro	Resultado	Especificación
d1	-----	< 2%
d2	12.75%	< 2%

7.9 Tolerancia.

Los valores de promedio, desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV) para la determinación de la tolerancia se presentan en el Cuadro 20.

Cuadro 20. Valoración (%) del analito utilizando una columna de 10 cm.

Muestra	Columna (15 cm)	Columna (10 cm)
	%	
1	99.8505	94.9203
2	100.1946	93.3644
3	99.9549	93.0584
Promedio	96.8905	
S	3.4661	
C.V.	3.5773 %	

Desarrollo y Validación de un Método por Cromatografía de Líquidos para el Análisis de Santina como Compuesto Marcador de *Tanacetum parthenium*.

Los parámetros requeridos para determinar la tolerancia se muestran en el Cuadro 21.

Cuadro 21. Parámetros requeridos en la tolerancia.

Parámetro	Resultado	Especificación
C.V	3.5773 %	No es mayor al 2%

7.10 Límite de cuantificación.

En el Cuadro 22 se presentan los valores de concentración de santina, adicionada y recuperada, área, % de recobro, promedio, desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV) para determinar el límite de cuantificación (LC).

Cuadro 22. Determinación del LC con base a la señal de ruido.

Muestra	Área
Blanco o Ruido	16808
10*Ruido	168080

Concentración de adicionada (µg/mL)	Área	Concentración recuperada (µg/mL)	% de recobro
5.2	170814.3	5.1890	99.7891
5.2	174789.4	5.2758	101.4569
5.2	169724.8	5.1653	99.3320
5.2	169116.5	5.1520	99.0768
5.2	172721	5.2306	100.5890
5.2	174814.3	5.2763	101.4673

Promedio	100.2852
S	1.0467
C.V.	1.0437%

El Cuadro 23 presenta los parámetros requeridos para determinar el límite de cuantificación.

Cuadro 23. Parámetros requeridos para el límite de cuantificación.

Parámetro	Resultado	Especificación
Promedio del % de recobro	100.2852 %	El promedio aritmético se incluya en el intervalo 98-102%
C.V	1.0437 %	No es mayor al 2%

7.11 Límite de detección.

Los valores de área, promedio, desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV) para determinar el límite de detección (LD) se presentan en el Cuadro 24.

Cuadro 24. Determinación del LD con base a la señal de ruido.

Muestra	Área
Blanco o Ruido	16808
3*Ruido	50424

Concentración del analito ($\mu\text{g/mL}$)	Área
1.6	52459.71837
1.6	51868.34566
1.6	51852.80697
Promedio	52060.29033
S	346.0021
CV	0.6646 %

El cuadro 25 muestra los parámetros que se requieren para determinar el límite de detección.

Cuadro 25. Parámetros requeridos para el límite de detección.

Parámetro	Resultado	Especificación
C.V	0.6646 %	No es mayor al 2%

7.12 Análisis de muestras.

La Figura 3 muestra los cromatogramas obtenidos para la partenólida y la santina así como también los cromatogramas de diferentes muestras de *Tanacetum parthenium*.

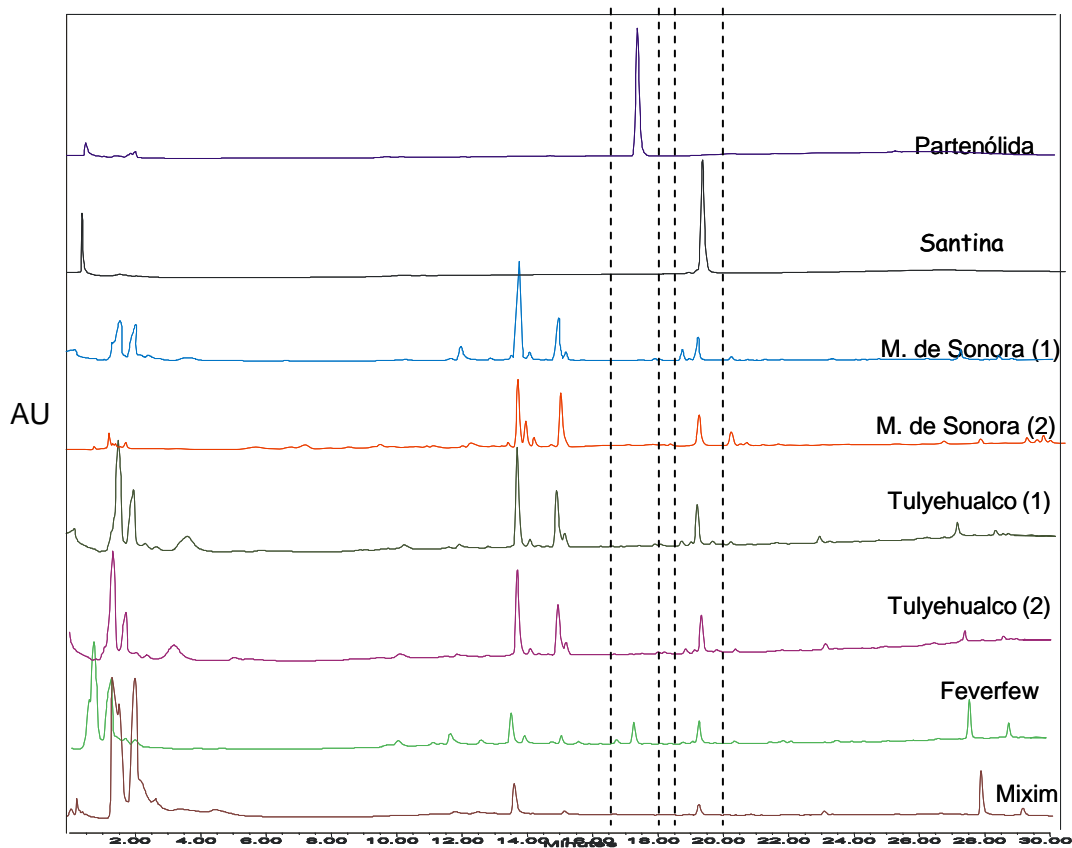


Figura 3. Cromatogramas de la partenólida, la santina y diferentes muestras de *Tanacetum parthenium*.

Desarrollo y Validación de un Método por Cromatografía de Líquidos para el Análisis de Santina como Compuesto Marcador de *Tanacetum parthenium*.

El Cuadro 26 muestra los valores de área y concentración de santina obtenidos para cada una de las muestras de *Tanacetum parthenium* analizadas.

Cuadro 26. Determinación de la cantidad de santina en muestras de *Tanacetum parthenium*.

Muestra	Área	Concentración (µg/mL)
M. de Sonora 1	1327353.644	30.42103
M. de Sonora 2	1149479.504	26.5404
Tulyehualco 1	1748927.663	39.6184
Tulyehualco 2	1061147.121	24.6133
Feverfew	881977.4004	20.7043
Mixim	425383.5955	10.7429

VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

La autenticidad de la santina se verificó comparando los resultados obtenidos en los espectros de IR y RMN con datos reportados en la literatura (Rodríguez *et al.*, 1973).

El método desarrollado para determinar la cantidad de santina contiene las condiciones adecuadas, ya que permite analizar las muestras con este método (Figura 3).

En la linealidad del sistema se obtuvo un r^2 de 0.9995, lo que indica que el equipo utilizado para realizar el análisis de santina, proporciona la respuesta esperada, siendo ésta proporcional a la concentración del analito, es decir conforme aumenta la concentración del analito se obtiene una mayor respuesta analítica. Otro aspecto importante es el CV obtenido por cada nivel de la curva, los cuales al ser menores al 2%, demuestran que la variación obtenida entre los valores de cada nivel es mínima, es decir, hay precisión entre los valores.

La precisión del sistema se determinó calculando el CV, siendo éste menor de 2%, indicando que al inyectar una muestra repetidamente, a una concentración determinada, la variación entre los valores es mínima, demostrando también que el aparato nos proporciona nuevamente la respuesta analítica esperada.

Desarrollo y Validación de un Método por Cromatografía de Líquidos para el Análisis de Santina como Compuesto Marcador de *Tanacetum parthenium*.

Los resultados obtenidos en aptitud del sistema, nos sirven para determinar que el equipo, los componentes electrónicos, las operaciones analíticas y las muestras que deben analizarse constituyen un sistema integral que puede evaluarse como tal (USP, 2007). Para esto se determinó el factor de coe (T), el factor de capacidad (k') y la precisión de las inyecciones repetidas. El valor de T obtenido por cada inyección es menor a 2 indicando que el pico tiene simetría. El valor de T aumenta a medida que la asimetría es más pronunciada. Cuando la asimetría aumenta, la integración y por tanto la precisión son menos confiables (USP 2007). Hay precisión entre las inyecciones ya que el CV es menor del 2% (0.2855).

En la linealidad del método se obtuvo un r^2 de 0.9998 que demuestra que hay proporcionalidad entre lo que se está adicionando del compuesto y lo que se está recuperando, aunque no se obtiene un porcentaje de recobro del 100%, el promedio (99.12%) está dentro de los límites establecidos para métodos cromatográficos (98-102%). El CV obtenido para cada nivel de concentración y para el grupo de datos es menor de 2% lo que nos asegura que los datos son confiables.

Para determinar que la ecuación obtenida en la linealidad del método es la adecuada se realizó la prueba de homoscedasticidad calculando la F experimental y comparándola con la F de tablas. Al ser menor F experimental que F de tablas se cumple la prueba de homoscedasticidad, es decir los valores se distribuyen por arriba y por debajo de la media, para demostrar esto se realizó la gráfica de residuales (Gráfica 2). Sin embargo, se observa que la

distribución de los valores no es homogénea, por lo tanto se determinó la sumatoria de % RE de los modelos de calibración de regresión lineal propuestos en el artículo de Almeida y colaboradores (2002), con la finalidad de demostrar que la ecuación $y = 45836.2158x - 67031.3317$ es la adecuada, logrando esto al obtener, en el modelo en el que W_i es igual a x^0 , la sumatoria de % RE menor (23.4559).

La exactitud es la concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia (CNQFB, 2000), lo ideal sería que el porcentaje de recobro obtenido fuera de 100%, en este caso el porcentaje obtenido fue de 98.31%, valor que está dentro de los límites especificados para este parámetro (98-102%), por lo que se puede decir que la exactitud en el método se cumple.

En la repetibilidad del método se obtuvo un coeficiente de variación de 0.2501, valor que indica que la variación entre la respuesta analítica obtenida por cada muestra analizada es mínima, en donde las muestras fueron realizadas por un solo analista utilizando siempre los mismos instrumentos.

El CV obtenido en la precisión intermedia fue de 0.7754, que es menor del 2%, esto demuestra que no interfiere en los resultados, que las muestras sean preparadas y analizadas por dos analistas diferentes en días diferentes, puesto que los resultados obtenidos por cada uno de ellos son similares.

De acuerdo con los resultados obtenidos para la robustez, demuestran que el flujo y la temperatura, son factores críticos del método debido a que al modificar cualquiera de estos factores, la diferencia entre los resultados

Desarrollo y Validación de un Método por Cromatografía de Líquidos para el Análisis de Santina como Compuesto Marcador de *Tanacetum parthenium*.

obtenidos modificando ciertas condiciones comparados con los resultados obtenidos utilizando el método en condiciones normales es mayor al valor especificado (< 2%). Al utilizar una velocidad de flujo de 0.8 mL/min no se obtuvo respuesta debido a que no se observó separación entre los compuestos.

Aunque en la tolerancia se establecen los factores que son ajenos al método, en este caso el utilizar una columna de menor longitud a la que se utiliza en el método original, interfiere en los resultados ya que el coeficiente de variación obtenido (3.5773) es mayor a lo que se especifica, que debe ser menor al 2%.

El límite de cuantificación es de 5.2µg/mL, ya que a esta concentración el pico presenta un área que es 10 veces la señal de ruido. Además de que cumple con los parámetros de exactitud y repetibilidad.

El límite de detección obtenido (1.6µg/mL) corresponde a una proporción 3 a 1 con respecto a la señal de ruido, existe además precisión entre los resultados obtenidos al obtener un CV de 0.6646.

El método propuesto se utilizó para analizar diferentes muestras de *Tanacetum parthenium* y dos productos comerciales. En este tipo de muestras, se pudo determinar en cuáles de ellas está presente la santina, así como también en qué porcentaje se encuentra. Esto se realizó utilizando la ecuación obtenida para determinar la concentración de santina presente en todas las muestras analizadas.

VII. CONCLUSIONES.

La santina es un compuesto que puede aislarse fácilmente del *Tanacetum parthenium*, y al estar presente en cantidades cuantificables en todas las muestras analizadas, este compuesto puede proponerse como marcador de esta especie.

El método obtenido para el análisis de santina, nos permite determinar el contenido de dicho compuesto en diferentes tipos de muestras.

Se desarrolló y se validó el método para la cuantificación de santina en muestras de *Tanacetum parthenium*.

VIII. BIBLIOGRAFÍA.

Aguirre H. (1993). La herbolaria y la medicina tradicional en torno a la formación de recursos humanos para la salud. La investigación científica de la herbolaria medicinal mexicana. Publicación de la Secretaría de Salud. México. 233-246.

Akpulat A., Tepe B., Sokmen A., Daferera D., Polissiou M. (2005).. Composition of essential oils of *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. (Asteraceae) from Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*. 33:511-516.

Almeida A. M., Castel-Blanco M. M., Falcão A. C. (2002). Linear regresión for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *Journal of Chromatography B*. 774:215-222.

Argueta A. (1994). Atlas de Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Vol. III Instituto Nacional Indigenista, México. 1273-1275.

Avula B., Navarrete A., Joshi V. C., Khan I. A. (2006). Quantification of parthenolide in *Tanacetum parthenium* by LC-UV/LC-MS and microscopic comparison of Mexican/US feverfew samples. *Pharmazie*; 61:590-594.

Awang D. V. C., Dawson B. A., Kindack D. G. (1991). Parthenolide Content of Feverfew (*Tanacetum parthenium*) Assessed by HPLC and ¹H-nmr Spectroscopy. *Journal of Nature Products*. 54:1516-1521.

Béjar E. (1996). Parthenolide inhibits the contractile responses of rat stomach fundus to fenfluramine and dextroamphetamine but not serotonin. *Journal Ethnopharmacology*. 50: 1-12.

Begley M. J., Hewlett M. J., Knight D. W. (1989). Revised structures for guaianolide α -methylenebutyrolactones from feverfew. *Phytochemistry*. 28:940-94.

Desarrollo y Validación de un Método por Cromatografía de Líquidos para el Análisis de Santina como Compuesto Marcador de *Tanacetum parthenium*.

Bohlmann F., Zdero, C. (1982). Sesquiterpene lactones and other constituents from *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry*. 21:2543-2549.

Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos (2000). Guía de validación de métodos analíticos. México.

Cretnik L., Skerget M., Knez Z. (2005). Separation of parthenolide of feverfew; performance of conventional and high-pressure extraction techniques. *Separation and Purification Technology*. 41:13-20.

Foster S. (1991). Feverfew, *Tanacetum parthenium*. Herbal Gram, American Botanical Council. 310:3-7.

Groenewegen W. A., Knigh D. W., Heptinstall S. (1986). Compounds extracted from feverfew that have anti-secretory activity contain an α -methylene butyrolactone unit. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 38:709-712.

Hamidi A. y Nady E. (1989). Abstracts of short lectures and poster presentations, 27th Annual Congreso on Medicinal Plant Research, 5-9 September, Braunschweig, p 57.

Hendriks H., Bos R., Woerdenbag H. J. (1996). The essential oil of *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip. *Flavour and Fragrance Journal*. 11: 367-371.

Hendriks H., Anderson-Wildeboer Y., Engels G., Bos R., Woerdenbag H. (1997). The content of Parthenolide and its yield per plant during the growth of *Tanacetum parthenium*. *Planta Medica*. 63:356-359.

Heptinstall S., Awand D. V., Dawson B. A., Kindack D., Knigh D. W., May J. (1992). Parthenolide content and bioactivity of feverfew (*Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip). Estimation of commercial and authenticated feverfew products. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 44:391-395.

Hewlett J.M. (1996). Sesquiterpene lactones from feverfew, *Tanacetum parthenium*: isolation, structural revision, activity against human blood platelet function and implications for migraine therapy. *Journal of Chemical Society. Perkin Trans. 1*:1979-1986.

Kalodera S., Pepejlnak S., Blazenic N., Petrak T. (1997). Chemical composition and antimicrobial activity of *Tanacetum parthenium*. *Pharmazie*. 52:885-886.

Kisiel W., Stojakowska A. (1997). A sesquiterpene coumarin ether transformed roots of *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry*. 46:515-516.

Knight D. W. (1995). Feverfew: Chemistry and Biological Activity. *Natural Products Reports*. 12:271-275.

Linares M. (1996). Selección de plantas medicinales de México. Noriega editores, México. 84-85.

Long C., Sauleau P., David B., Lavaud C., Cassabois V., Ausseil F., Massiot G. (2003). Bioactive flavonoids of *Tanacetum parthenium* revisited. *Phytochemistry*. 64 :567-569.

Medina C. L. (2002). Estudio biodirigido de *Tanacetum parthenium* mexicana, como inhibidor de contracciones inducidas por serotonina en aorta de rata wistar. Tesis de Licenciatura. UNAM.

Milbrodt M., Schröder F., König A. (1996). 3,4- β -epoxy-8-deoxicumambrin B, A sesquiterpene lactone from *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry*. 44:471-474.

Pharmacopoeia Convention, Inc. United States Pharmacopoeia 30/ National formulary 25. Rockville, MD: U.S Pharmacopeial Convention, Inc. 2007. VERSIÓN EN ESPAÑOL: 2872-2883.

Pooter H. L., Vermeesch J., Schamp N. M. (1989). *Journal Essential Oil Reserch.* 1:367-371.

Rodríguez J., Tello H., Quijano L., Calderón J., Gómez F., Romo J., Ríos T. (1973). Flavonoides de plantas mexicanas y estructura de la santina y de la glucoferida. 41-53.

Romo de Vivar A., Jiménez H. (1965). Structure of Santamarine, a new sesquiterpene lactone. *Tetrahedron.* 21:1741-1745.

Romo J., Romo de Vivar A., Treviño R., Joseph-Nathan J., Díaz E. (1970). Constituents of *Artemisa* and *Chrysanthemum* species-the structures of chrysantemins A and B. *Phytochemistry.* 9:1615-1621.

Stefanovic M., Mladenovic S., Djermanovik M., Ristic N. (1985). Sesquiterpene lactones from the domestic plants species *Tanacetum parthenium* L. (Compositae). *Journal of the Serbian Chemical Society;* 50:435-441.

Williams C. A., Harbone J. B., Geiger H., Hoult J. R. S. (1999). The flavonoides of *Tanacetum parthenium* and *Tanacetum vulgare* and their anti-inflammatory properties. *Phytochemistry.* 51:417-423.

Zi Qi J., Kou X., Stevenson D. (1999). Rapid extraction and High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Parthenolide in Feverfew (*Tanacetum parthenium*). *Journal Agric. Food Chemistry.* 47:1018-1022.

IX. ANEXO.

Las figuras 1, 2 y 3 representan los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN- ^1H y RMN- ^{13}C) y de infrarrojo (IR) obtenidos para la santina.

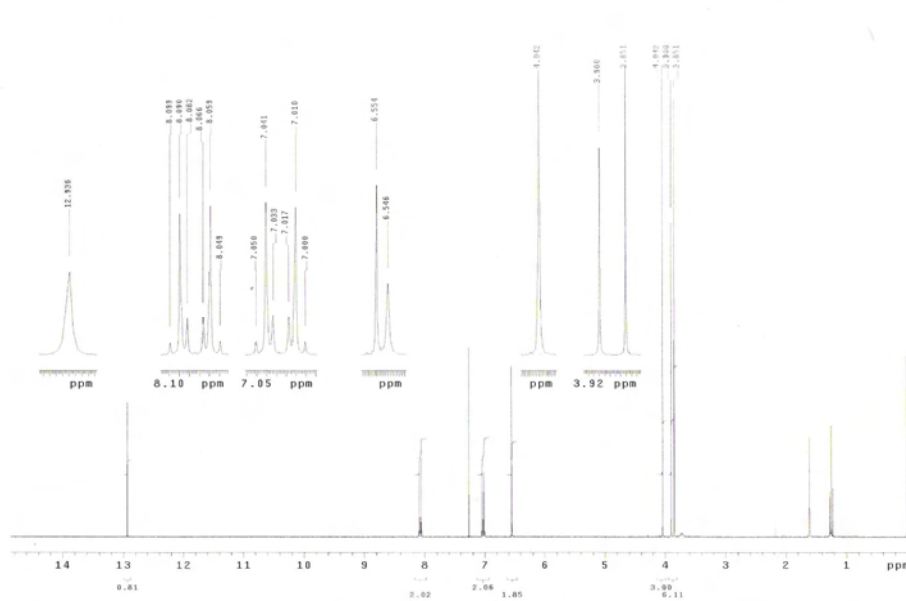


Figura 1. Espectro de RMN- ^1H de la santina.

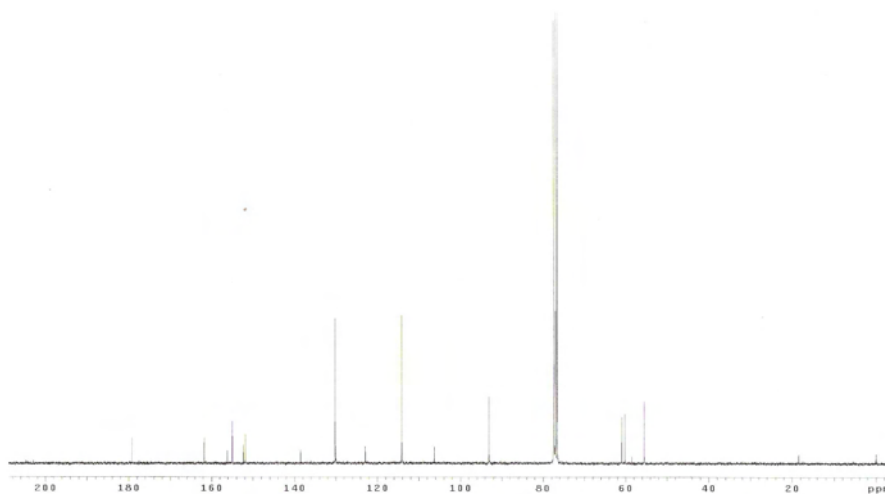


Figura 2. Espectro de RMN- ^{13}C de la santina.

Desarrollo y Validación de un Método por Cromatografía de Líquidos para el Análisis de Santina como Compuesto Marcador de *Tanacetum parthenium*.

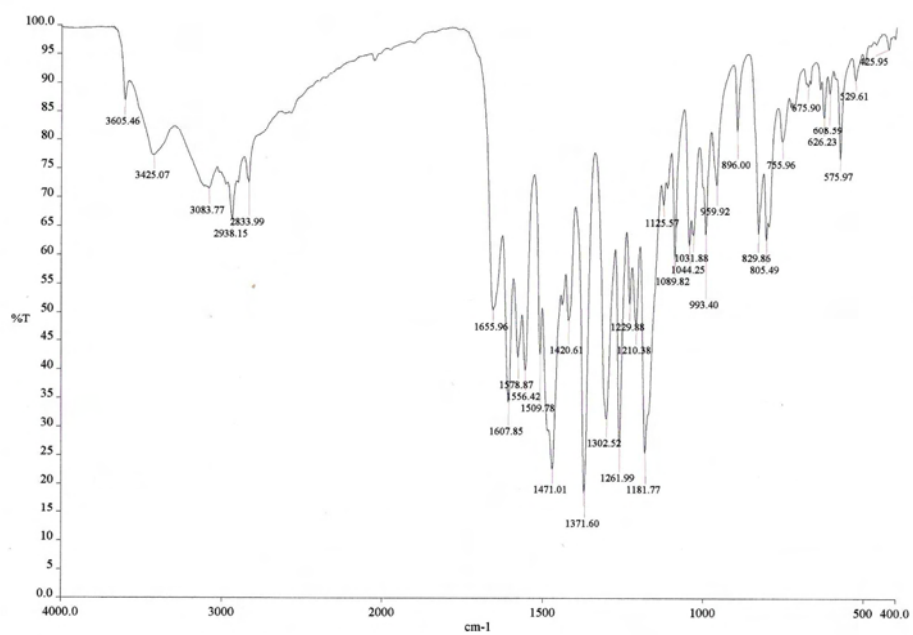


Figura 3. Espectro de IR de la santina.