



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE 5-B-D-GALACTOPIRANOSIL-7-METOXI-3'-4'-
DIHIDROXI-4-FENILCUMARINA Y SU AGLICONA POR CROMATOGRAFÍA DE
LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA LA APLICACIÓN EN UN ESTUDIO
PRECLÍNICO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ANGÉLICA SOLEDAD DÍAZ JUÁREZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: INES FUENTES NORIEGA**

VOCAL: **Profesor: ELIA BROSLA NARANJO RODRÍGUEZ**

SECRETARIO: **Profesor: MARÍA DE LOURDES BEATRIZ MAYET CRUZ**

1er. SUPLENTE: **Profesor: HECTOR ARIEL RICO MORALES**

2° SUPLENTE: **Profesor: KENNETH RUBIO CARRASCO**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 113, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Inés Fuentes Noriega

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Kenneth Rubio Carrasco

SUSTENTANTE (S):

Angélica Soledad Díaz Juárez

A mis padres Silvia Juárez y Tereso Díaz

Por ser partícipes en este sueño

AGRADECIMIENTOS

A Conacyt-Silanes, Proyectos INNOVA, No 198833 (2013) y 198757 (2013).

A la Facultad de Química PAIP 5000-9134.

A la Dra. Rachel Mata y Dr. Sol Cristians por permitirnos poder colaborar en el proyecto de este fitofármaco.

A la Dra. Inés Fuentes por darme la oportunidad de participar en sus proyectos, por su paciencia, interés y enseñanza.

A la M en C. Kenneth Rubio por su apoyo incondicional y su manera muy peculiar de motivarme.

A la Dra. Elia Brosla Naranjo, M en C. María de Lourdes Mayet y el profesor Héctor Ariel Rico por su disposición en la revisión a este trabajo.

A mis amigos del laboratorio 113 el poco tiempo que conviví con ustedes fueron muy especiales Lulucita, Pau, Marisol.

Un agradecimiento muy especial a la auditora QFB. Gabriela Franco por sus palabras que se tatuaron en mi corazón permitiéndome poder concluir este trabajo.

A mis grandes amigos de la Facultad de Química Mariana Cabrera, Alan Herrera, Luz Franco, Titina, gracias por los momentos vividos con ustedes.

A Nancy Sánchez por ser mi hermana que la vida me dio por estar conmigo, por entenderme, por escucharme, por tener una palabra tan acertada a todo lo que vivimos, por las risas, por los llantos, por las desveladas, por todo y más gracias por estar en mi vida.

A mis amigas de Danza Arabe Regi, Adri, San, Diamantina y por supuesto nuestra Miss Terpsícore porque con ustedes conviví aquello que hace vibrar el corazón la DANZA, por los ensayos, vestuarios y estrés pero sobre todo diversión.

A mi hermana y mi amiga Clara Arellano gracias por haber estado conmigo en todo momento desde que te conocí, gracias por dejarme entrar a tu familia y conocer esa pequeña persona que me alegra el corazón. Gracias por tu comprensión por tu apoyo incondicional porque de ti aprendí que se puede perdonar.

A mi amiga Natilla gracias por los momentos vividos por las enseñanzas y sobre todo por las locuras que hizo mucho más ameno este pasaje de mi vida.

A mi Psicóloga favorita y mejor aún mi amiga Monserrat García Almela gracias por las bellas conversaciones, por tu amistad, por tu cariño.

A la QFB. María Concepción Mancilla González por su confianza, por permitirme colaborar en el área de Aseguramiento de la Calidad y por trasmitirme sus conocimientos.

A los chicos de mi vida Omar Díaz y Emmanuel Díaz porque ustedes fueron mi motivación más grande para soñar, los amo hermanos.

I.- ÍNDICE GENERAL	
1.- JUSTIFICACIÓN	10
2.- ANTECEDENTES	12
2.1 Validación de métodos analíticos	12
2.2 Diabetes Mellitus (DM)	15
2.2.1 Tratamiento	16
2.2.1.1 Tratamiento no farmacológico:	16
2.2.1.2 Tratamiento farmacológico:	16
2.3 Plantas medicinales y su regulación como agentes terapéuticos.....	17
2.4 Generalidades sobre Hintonia latiflora e Hintonia standleyana.	18
2.4.1 Antecedentes químicos y farmacológicos.	21
2.4.2 Mecanismo de acción.....	22
3.- OBJETIVO	24
4.- METODOLOGÍA	25
4.1 Método de cuantificación	25
4.1.1 Equipos e instrumentos	25
4.1.2 Material	26
4.1.3 Reactivos.....	26
4.1.4 Estándares	26
4.1.5 Preparación de soluciones	27
5. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO	28
6.- RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	33
6.1 Verificación del sistema	33
6.1.1 Adecuabilidad.....	33
6.1.2 Linealidad del sistema.....	33
6.2 Validación del método analítico	36
6.2.1 Selectividad	36
6.2.2 Linealidad del método	38
6.2.3 Límite de cuantificación.....	42
6.2.4 Recuperación absoluta.....	42
6.2.5 Repetibilidad y Exactitud	43
6.2.6 Reproducibilidad y Exactitud	44

6.2.7 Estabilidad.....	45
6.2.8 Tolerancia.....	48
6.3.- Aplicación del método analítico validado.....	51
7.- CONCLUSIONES.....	52
8.- BIBLIOGRAFÍA.....	53

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock. Huetamo, Michoacán. Julio de 2010. (S. Cristians, 2010). 19

Figura 2.- *Hintonia standleyana* Bullock. Tuzantlan, Guerrero. Julio de 2010. (S. Cristians, 2010)..... 20

Figura 3.- Estructura desarrollada del compuesto 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3´4´-dihidroxi-4-fenilcumarina (Tesis de licenciatura, María de Lourdes Julián de la Cruz). 22

Figura 4.- Transporte de glucosa en el epitelio intestinal. Las células de borde en cepillo de las cuales se forman vellosidades, concentran la molécula glucosa desde la luz intestinal. b) vellosidades del intestino delgado ubicación de las enzimas α-glucosidasas (Modificado de Fundamentos de bioquímica, 2006). 23

Figura 5.- Método de extracción. 30
(Desarrollado por la Dra. Inés Fuente y cols). 30

Figura 6.- Gráfica de linealidad del sistema del compuesto 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3´-4´-dihidroxi-4-fenilcumarina 34

Figura 7.- Gráfica de linealidad del sistema del compuesto Aglicona 35

Figura 8.- Cromatograma del parámetro de selectividad del blanco de la fase móvil (ACN: agua acidificada 0.1%), sin 4-FC y su aglicona, condiciones cromatográficas utilizadas reportadas en la tabla 3. 36

Figura 9.- Cromatograma del parámetro de selectividad del blanco de la matriz biológica, sin 4-FC y su aglicona, condiciones cromatográficas utilizadas reportadas en la tabla 3. 37

Figura 10.- Cromatograma del parámetro de selectividad del sistema a una concentración de 3µg/ml para ambos analitos, condiciones cromatográficas utilizadas reportadas en la tabla 3. 37

Figura 11.- Cromatograma del parámetro de selectividad del método a una concentración de 0.09 µg/mg de heces para ambos analitos, condiciones cromatográficas utilizadas reportadas en la tabla 3. 38

Figura 12.- Ejemplo de cálculo para obtener la concentración de los analitos de interés en la matriz biológica..... 39

Figura 13.- Gráfica de linealidad del método en la que se ilustra la relación directamente proporcional entre las variables, usando el compuesto 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3´-4´-dihidroxi-4-fenilcumarina 40

Figura 14.- Gráfica de linealidad del método en la que se ilustra la relación directamente proporcional entre las variables, usando el compuesto Aglicona 41

Figura 15.- Cromatograma en condiciones originales en porcentaje de fase móvil [76:24 (ACN:agua acidificada 0.1%)] de ambos analitos a la concentración de 1.5 µg/mg de heces. 48

Figura 16.- Cromatograma en cambio 1 en porcentaje de fase móvil [73:27 (ACN:agua acidificada 0.1%)] de ambos analitos a la concentración de 1.5 µg/mg de heces.49

Figura 17.- Cromatograma en cambio 2 en porcentaje de fase móvil [79:21 (ACN:agua acidificada 0.1%)], de ambos analitos a la concentración de 1.5 µg/mg de heces.49

Figura 18.- Ejemplo de Cromatograma del análisis de muestras biológicas correspondiente a; Grupo 4, rata 4, t=18.051

III.- ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Parámetros de validación de acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998. 12

Tabla 2.- Condiciones cromatográficas iniciales utilizadas para la cuantificación de los compuestos 5-*O*- β -*D*-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina y su Aglicona (R. Mata et al., 2008). 28

Tabla 3.- Condiciones cromatográficas finales utilizadas para la cuantificación de los compuestos 5-*O*- β -*D*-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina y su Aglicona. 29

Tabla 4.- Requisitos para la validación en muestras biológicas de acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998. 31

Tabla 5.- Resultados de adecuabilidad para los compuestos 5-*O*- β -*D*-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina y su Aglicona. 33

Tabla 6.- Preparación de curva de calibración en el sistema para ambos analitos de interés (5-*O*- β -*D*-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina y su Aglicona). 33

Tabla 7.- Resultados experimentales de linealidad del sistema del compuesto 5-*O*- β -*D*-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina. 34

Tabla 8.- Resultados experimentales de linealidad del sistema del compuesto aglicona. 35

Tabla 9.- Preparación de la curva de calibración en el método. 38

Tabla 10.- Resultados experimentales para evaluar la linealidad del método para cuantificar al compuesto 5-*O*- β -*D*-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina. 39

Tabla 11.- Resultados experimentales de la concentración calculada del compuesto 5-*O*- β -*D*-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina. 39

Tabla 12.- Resultados experimentales para evaluar la linealidad del método para cuantificar el compuesto Aglicona. 40

Tabla 13.- Resultados experimentales de la concentración calculada del compuesto Aglicona 41

Tabla 14.- Muestra la concentración calculada para el Límite de Cuantificación. 42

Tabla 15.- Resultados obtenidos del porcentaje de recobro de los compuestos 5-*O*- β -*D*-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina y su Aglicona. 42

Tabla 16.- Resultados de Repetibilidad de los compuestos 5-*O*- β -*D*-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina y su Aglicona en un solo día de análisis. Se muestran los resultados de exactitud del método para la determinación de ambos compuestos. 43

Tabla 17.- Resultados de reproducibilidad de los compuestos 5-*O*- β -*D*-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina y su Aglicona en tres días diferentes de análisis. 44
Se muestran los resultados de exactitud del método para la determinación de ambos compuestos. 44

Tabla 18.- Resultados de estabilidad de la muestra a temperatura ambiente en un periodo de 24 h. 45

Tabla 19.- Resultados de estabilidad de la muestra a temperatura de refrigeración en un periodo de 24 h. 46

Tabla 20.- Resultados de estabilidad a largo plazo en condiciones de -70°C durante 15 días. 46

Tabla 21.- Resultados de la estabilidad de la muestra, considerando ciclos de congelación y descongelación.....47

Tabla 22.- Resultados de la evaluación de la tolerancia del método para 4-FC y su Aglicona.
.....48

Tabla 23.- Resultados de la validación del método analítico para la cuantificación de 4-FC y su Aglicona en matriz biológica.50

IV.- ABREVIATURAS

DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DG	Diabetes gestacional
DPP-IV	Dipeptidil-peptidasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
m	metro
cm	centímetro
g	gramo
MeOH	Metanol
°C	Grado Celcius
mm	Milímetro
µm	Micrómetro
mL	Mililitro
µL	Microlitro
TFA	Ácido trifluoroacético
ACN	Acetonitrilo
4-FC	5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3'4-dihidroxi-4-fenilcumarina.
µg	Microgramo
nm	Nanómetro
min	minuto
H₂O	Agua
mg	Miligramo
NOM	Norma Oficial Mexicana
t₀	Tiempo cero
h	Horas
DE	Desviación estándar
CV	Coefficiente de variación
CNQFB	Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos
r	Coefficiente de correlación

DEA	Desviación estándar absoluta
DEA-est	Desviación estándar absoluta de estabilidad
%	Porcentaje
rpm	Revoluciones por minuto
FID	Federación Internacional de la Diabetes
ADA	American Diabetes Association (Asociación Americana de Diabetes)
ColS	Colaboradores

INTRODUCCION

El objetivo principal de este trabajo fue validar un método para la cuantificación de 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (4-FC) y su aglicona en heces de ratas. Las muestras de heces se liofilizaron y en el momento del análisis se extrajeron mediante un proceso de hidratación y empleando la fase móvil como disolvente de extracción. La separación de los compuestos se alcanzó en una columna Agilent Eclipse XDB-C8 (4.6 x 150 mm, 5 μ m) y la determinación se realizó en un sistema HPLC/UV con arreglo de diodos, empleando como fase móvil una mezcla de agua acidificada 0.1 % y acetonitrilo (76:24, v/v) a una velocidad de flujo de 1.2 ml/min, con un volumen de inyección de 20 μ L y a una longitud de onda de 328 nm, el tiempo de corrida fue de 10 min. El rango de trabajo se estableció de 0.09 μ g/mg a 4.5 μ g/mg de heces para ambos compuestos. Los analitos mostraron una buena linealidad en el rango de trabajo siendo para 4-FC ($R^2= 0.9998$) y para la aglicona ($R^2= 0.9998$), con un porcentaje de recobro para la 4-FC de 91.7 % y para la aglicona de 80.7 %. El método fue preciso ya que se obtuvieron coeficientes de variación para repetibilidad de 5.7 % para 4-FC y 5.4 % para la aglicona, y para reproducibilidad de 4.6 % en ambos compuestos. El método fue exacto al obtener un porcentaje de desviación absoluta (% DEA) menor al 1 % para ambos compuestos en cuestiones de repetibilidad. La concentración más pequeña del intervalo de trabajo puede ser cuantificada al obtener un porcentaje de desviación absoluta para 4-FC de 16.4 % y para la aglicona de 9.7 %. Los estudios de estabilidad mostraron que ambos compuestos son estables a temperatura de refrigeración ($5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) al obtener porcentaje de desviación absoluta para 4-FC menor del 4.0 % y para la aglicona menor del 2.0 %, a temperatura ambiente el único compuesto que mostró estabilidad es 4-FC con un porcentaje de desviación absoluta menor de 8.0 %, la muestra mostró ser estable para un ciclo de congelación al obtener un porcentaje de desviación absoluta para 4-FC menor de 4.0 % y para la aglicona menor de 4.0 %. El ensayo se aplicó con la determinación de 4-FC y aglicona en heces de ratas. El método demostró ser lineal, selectivo, exacto, preciso, estable a temperatura de refrigeración, estable a un ciclo de congelación y solo es estable para 4-FC a temperatura ambiente.

1.- JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus (DM) es un problema de salud a nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Federación Internacional de la Diabetes (FID) reporta cada año 3.2 millones de muerte atribuibles a dicha enfermedad, esto tiene mayor impacto en países en desarrollo (Burke JP, 1999-2003 y Kecskemeti V, 2002).

La epidemiología menciona que en la población Mexicana; 4 millones de personas han sido diagnosticadas con diabetes y al ser una enfermedad que se encuentra entre las primeras causas de muerte en México, es de gran importancia considerar alternativas terapéuticas. El uso y la comercialización de fitofármacos y productos naturales con fines medicinales, muestra un crecimiento acelerado en los últimos años debido a su fácil acceso y su bajo costo en comparación con la medicina alopática, lo que se reconoce en el aumento significativo de la demanda mundial para este tipo de productos.

Es preocupante el hecho de que, en muchos casos, estos productos no cuentan con los estándares mínimos de calidad necesarios para garantizar su seguridad y eficacia, lo que representa un riesgo para la salud de sus consumidores.

La proliferación de productos de esta naturaleza y de su publicidad, ha sido poco controlada, por lo que es necesario legislar al respecto, no sólo para acabar con la especulación y el fraude, sino también para promover e incentivar los estudios científicos de los productos con fines medicinales derivados de plantas, garantizar la calidad y proteger la salud de la población.

En México un segmento de la población se beneficia de la medicina herbolaria, existen más de 3500 especies de plantas medicinales usadas para el tratamiento de enfermedades comunes. El incremento de industrias y comercialización de productos naturales tanto nacionales como internacionales se han incrementado notablemente en los recientes años, aumentando las ventas y crecimiento de materias crudas y medicamento herbolario.

En la actualidad la regulación sanitaria y normatividad mexicana se encuentra deficiente en cuestión a productos herbolarios, lo que denota una falta de interés en la calidad del producto por algunos fabricantes y las autoridades sanitarias, en el contexto la autoridad sanitaria y el mercado mundial, es de suma importancia que establezcan procedimientos de control de

calidad de los medicamentos herbolarios que son comercializados en México (R. Mata *et al.*, 2008).

Un ejemplo de un fitofármaco para la atención de DM2 es el compuesto 5-*O*- β -*D*-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (4-FC), extraído de las plantas medicinales *H. latiflora* e *H. standleyana*.

El presente trabajo permitió ser empleado en la etapa preclínica para la cuantificación del fitofármaco 5-*O*- β -*D*-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (4-FC) en matriz biológica (heces de rata), y su aplicación en estudios de farmacocinética.

2.- ANTECEDENTES

2.1 Validación de métodos analíticos

La validación de un método analítico es la evidencia documentada de un procedimiento analítico que permite la obtención de resultados exactos y precisos dentro de las especificaciones y atributos de calidad establecidos previamente (NOM-177-SSA1-1998).

La validación de métodos analíticos se define como el proceso mediante el cual queda establecido, con estudios de laboratorio, que las características del método satisfacen los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas, es decir, cumple con el propósito establecido (Guía de validación por Cofepris CCAYAC-P-058, 2011).

La validación de métodos analíticos es una parte fundamental en el desarrollo de las técnicas para el control de calidad, durante la secuencia de pruebas y análisis que se realizan, el analista puede establecer si el estudio cumple con los propósitos para los cuales fue diseñado.

En general las características de desempeño habituales del método que deben considerarse en la validación del método analítico son de acuerdo a la tabla 1.

Tabla 1.- Parámetros de validación de acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998.

Parámetro	Definición	Criterio de aceptación
Linealidad	A la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra	a) El método es lineal si el coeficiente de correlación (r) de cada una de las curvas y de todos los datos es igual o mayor que el 0.98 para la relación respuesta contra concentración. Basado en la guía de validación del CNQFB. b) Para los datos de concentración adicionada contra respuesta, el experimento se considera válido si los valores de desviación absoluta obtenidos en cada nivel de concentración son menores o iguales al 15%, excepto para el nivel de concentración más bajo, ya que el valor para este punto puede ser menor o igual al 20%.

Parámetro	Definición	Criterio de aceptación
Selectividad	A la capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.	No debe presentarse interferencias en el tiempo de retención del analito de interés, ni en el estándar interno. En caso de que se presente alguna señal ésta debe ser menor que el 20% de la respuesta de la concentración más baja de la curva de calibración.
Límite de cuantificación	A la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método	El coeficiente de variación de las 5 determinaciones no debe ser mayor al 20% y el % desviación absoluta del promedio de las 5 determinaciones no debe ser mayor al 20%
Recuperación absoluta	A la eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica.	a) El porcentaje de recobro absoluto no necesariamente será del 100% pero el recobro debe ser preciso a cada concentración b) La diferencia en el recobro entre los tres niveles de concentración no debe ser mayor al 15%.
Repetibilidad	A la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.	El método es repetible si el coeficiente de variación para cada una de las concentraciones no es mayor que el 15%.
Reproducibilidad	A la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, columnas o analistas	El método es reproducible si el coeficiente de variación para cada nivel de concentración no es mayor que el 15%.
Exactitud	A la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia	El método es exacto si el % desviación absoluta es menor o igual al 15%.

Parámetro	Definición	Criterio de aceptación
Estabilidad de la muestra	A la capacidad de un fármaco, de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas, en el envase que lo contiene durante su periodo de vida útil. Se puede considerar condiciones a temperatura ambiente, refrigeración, ciclos de congelación descongelación.	El porcentaje de desviación absoluta con respecto a los preparados el día del análisis y/o las muestras a to, no debe ser mayor al 15% en cada nivel de concentración.
Estabilidad a largo plazo	A la propiedad del compuesto por analizar en un a matriz biológica, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta el análisis de todas las muestras.	El porcentaje de desviación absoluta con respecto a los preparados el día del análisis y/o las muestras a to, no debe ser mayor al 15% en cada nivel de concentración.
Tolerancia	A la capacidad del método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo y que proporciona una indicación de su confiabilidad durante el uso normal.	El tiempo de retención y la respuesta del analito, no deben desviarse más del 15% del valor nominal.

2.2 Diabetes Mellitus (DM)

De las enfermedades endócrinas la DM es la más común, es un trastorno metabólico causado por una combinación variable de deficiencia de insulina e insulinoresistencia, lo cual resulta en un incremento de la glucemia con una alteración en el metabolismo de carbohidratos, de los lípidos y de las proteínas (Saioa Gómez-Zorita *et al.*, 2012). Está definida por concentraciones elevadas de glucosa en sangre asociada con la secreción de insulina pancreática ausente o inadecuada, que puede ocurrir con o sin la alteración de la señalización de la insulina (Andrade-Cetto *et al.*, 2015).

Los tres principales tipos de diabetes; diabetes mellitus tipo 1 (DM1), diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y diabetes gestacional (DG) ocurren cuando el cuerpo no puede producir suficiente cantidad de la hormona insulina o no puede usar la insulina eficazmente. La insulina actúa como una llave que permite a las células del cuerpo absorber la glucosa y utilizarla como energía. Las personas con DM1, que es el resultado de un proceso autoinmune con un inicio muy repentino, necesitan terapia de insulina para sobrevivir. La DM2, por su parte, puede pasar inadvertida y sin diagnosticar durante años. En tales casos, los afectados no son conscientes del daño a largo plazo causado por su enfermedad. La DG, que aparece durante el embarazo, puede conducir a graves riesgos para la salud de la madre y su bebé además de aumentar el riesgo de desarrollar DM2 más tarde en la vida.

La DM2 es un trastorno metabólico complejo, de patogenia multifactorial y poligénica, que se asocia frecuentemente con obesidad y otros componentes del síndrome metabólico. Hay un componente hereditario muy claro sobre el que probablemente influyen diversos factores ambientales, como la alimentación, el sedentarismo, el tabaco, el alcohol, etc. La DM2 se caracteriza, fisiopatológicamente, por dos hechos: la resistencia a la insulina y el deterioro de la función de las células beta pancreáticas (E. González, 2005).

La insulina es una hormona, que actúa como mensajero químico, y se produce en el páncreas ejerciendo muchas funciones en el cuerpo, una de las más importantes y conocidas es el control de la glucosa, el uso de la insulina para persona con diabetes es debido a que su cuerpo no produce insulina (DM1) o no usa la insulina debidamente (DM2).

Los pacientes que presentan diabetes no absorben en su totalidad la glucosa, de tal modo que se queda circulando por la sangre causando hiperglicemia, lo cual al paso del tiempo daña a

los órganos del cuerpo, los órganos más afectados son: ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (J. Ríos *et al.*, 2015). Entre los síntomas de hiperglicemia se encuentra la poliuria, polidipsia, pérdida de peso, en ocasiones polifagia y visión nublada. (ADA, 2007).

La DM es considerada como un síndrome metabólico crónico de base genética que al no ser tratado genera complicaciones en la calidad de vida y a su vez afecta la economía del paciente (J. Ríos *et al.*, 2015). Las estimaciones indican que para el año 2030 la prevalencia de la DM2 alcanzará proporciones epidémicas y afectará a 366 millones de personas en todo el mundo (Saioa Gómez-Zorita *et al.*, 2012).

2.2.1 Tratamiento

2.2.1.1 Tratamiento no farmacológico:

La modificación del estilo de vida, la combinación del control del peso y el incremento del ejercicio físico, junto con la eliminación de hábitos tóxicos como el tabaco y el alcohol, puede retrasar hasta varios años el desarrollo de DM2 en pacientes en situación de prediabetes, lo cual es más eficaz que algunas medidas farmacológicas (E. González, 2005).

2.2.1.2 Tratamiento farmacológico:

Aunque el ejercicio y la pérdida de peso pueden retrasar y hasta prevenir el desarrollo de la DM2, en la mayoría de los casos es necesario realizar un tratamiento con medicamentos orientado, unas veces, a la reducción de la resistencia a la insulina, y otras, al control estricto de la glucemia pre-prandial y pos-prandial. Los fármacos más utilizados en el primer caso son los sensibilizadores a la insulina (metformina y tiazolidina) y los inhibidores de las α -glucosidasas. En segundo lugar y en fases de diabetes más avanzadas, las sulfonilureas (E. González, 2005).

2.2.1.2.1 Grupos Terapéuticos:

- Sulfonilureas
- Biguanidas
- Inhibidores de las α -glucosidasas
- Meglitinidas

- Glitazonas
- Inhibidores de la DPP-IV (Incretinas)

En México, cerca del 10 % de la población mexicana presenta como enfermedad crónica DM2 como en otras partes del mundo se emplea medicina herbolaria para el tratamiento de esta enfermedades (Subash-Babu, Mainzen-Prince, 2004). Una gran parte de la población aún se encuentra muy arraigada en su cultura y la creencia de que el tratamiento de la medicina herbolaria es mucho más barato y seguro que la medicina alopática dejando este tratamiento para continuar con el de medicina herbolaria (R. Mata *et al.* 2012). Es por ello la importancia de establecer parámetros de calidad en las plantas medicinales.

2.3 Plantas medicinales y su regulación como agentes terapéuticos.

México es el segundo país a nivel mundial en número de especies botánicas con uso medicinal, aproximadamente 3352 especies, antecedido por China que cuenta con unas 5000 especies de plantas medicinales (R. Bye *et al.*, 1991). Es importante mencionar que el vasto conocimiento en el uso de plantas medicinales en nuestro país es el reflejo del desarrollo que tuvieron las distintas culturas que habitaron en el territorio mesoamericano. Un factor que facilitó contar con el conocimiento de las plantas medicinales es el trabajo de recopilación que se llevó a cabo a través de los “*códices*” en los cuales describían métodos curativos a través del uso de las plantas e ilustraciones de los componentes utilizados, lo cual al paso de los años existieron diversas publicaciones que aterrizaron todo este conocimiento y haciendo obras mucho más completas ya que reportan todos los estudios botánicos, químicos, pre-clínicos llevados, constituyendo a los últimos pilares en el estudio de la herbolaria mexicana.

El uso de las plantas medicinales en el cuidado primario de la salud, para el tratamiento de diversos padecimientos en las prácticas médicas alopáticas y/o tradicionales, o como fuentes potenciales para la búsqueda de medicamentos novedosos, es un hecho bien documentado (Plotkin, 2001; Phillipson, 2011). De acuerdo, con la Organización Mundial de la Salud (OMS) el auge en el consumo de estos recursos, por parte de grandes sectores de la población a nivel mundial se ha incrementado notablemente debido, entre otras causas, a su fácil acceso.

El comercio de las plantas medicinales y sus preparados ha dado paso al incremento de un mercado carente de regulación, y la mayoría de los productos que se expenden en distintos

lugares, no cuentan con un registro para su venta, fabricación, o comercialización y mucho menos de los criterios que garanticen su calidad. Aún más frecuentemente la eficacia y la seguridad de esos productos se desconoce (Thimothy et al., 2004).

Por tal motivo, la OMS a partir del año 1991 inició la publicación de una serie de normas con la finalidad de facilitar el trabajo de los organismos regulatorios y científicos de cada país miembro, y así lograr el reconocimiento de la medicina a base de plantas y con ello promover su uso racional, bajo la premisa de que la calidad es la base de la eficiencia y seguridad tanto de las materias primas vegetales como de sus productos terminados. Es así, como después de un arduo trabajo realizado por la misma OMS, basándose en estas normas, se documentó parte de la información científica disponible sobre la inocuidad, la eficacia y el control de calidad de plantas medicinales de amplio uso a nivel global, mediante monografías que en su primera parte describen; definición de la droga, descripción de las características botánicas, distribución geográfica, pruebas de identidad, pureza y composición, y un listado de los principales constituyentes químicos y. En segunda parte de la monografía se incorpora información para profesionales de la salud como: usos medicinales, lista de posibles contraindicaciones, riesgos y precauciones, interacción con otros fármacos o plantas, etc.

La calidad es un requisito básico de los medicamentos, no sólo por su significado intrínseco, sino porque constituye la base sobre la que reposa la reproducibilidad de los parámetros de seguridad y eficacia (Bauer y Tittel, 1996; Bauer, 1998; Busse, 2000.). Este aspecto resulta aún más importante en los medicamentos a base de plantas medicinales en los que la problemática es mucho más compleja que en los fármacos de síntesis. Los fitofármacos generalmente son sistemas complejos, mucho más difíciles de caracterizar que un compuesto puro, sea sintético o natural. El control de calidad de las drogas vegetales y derivados pretende garantizar su identidad, pureza y contenido en principios activos o marcadores. Las exigencias concernientes al control de calidad de las drogas vegetales, así como los métodos a utilizar, se recopilan principalmente en las farmacopeas.

2.4 Generalidades sobre *Hintonia latiflora* e *Hintonia standleyana*.

H. latiflora (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock, *H. standleyana* Bullock, son las especies principales que conforman el grupo de rubiáceas de un complejo de plantas medicinales conocido como complejo copalchi. Un complejo de plantas medicinales se define como un

grupo de plantas que reciben el mismo nombre común, comparten características morfológicas y/o aromáticas y les son atribuidas propiedades curativas similares (Linares y Bye, 1987). Generalmente sobresale una planta que le da el nombre al complejo y sale de su área de distribución geográfica debido a su amplia comercialización; siendo *H. latiflora* la que sobresale en este complejo. El complejo copalchi, se caracteriza por tener cortezas amargas y emplearse como sustitutos de las quinas, usadas en el tratamiento de las fiebres palúdicas.

Hintonia latiflora es un arbusto o árbol de hasta 5 m de alto, con hojas ovaladas de 3.5 a 12 cm de largo; las flores acampanadas, son blancas de 5 a 7 cm y aromáticas; el fruto es capsulado con semillas pequeñas (figura 1). La planta florece en los meses de febrero y marzo, llegando a presentar una floración extemporánea en el mes de junio, las hojas están presentes entre los meses de febrero y octubre (Cristians, 2009). Recibe otros nombres como: campanilla, camapanillo, cáscara sagrada, chichicpatli, copalchi, copalchile, corteza de jojutla, huetiyo, palo amargo, palo copalche, palo de bolsa, quina, tacusisha.



Figura 1.- *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock. Huetamo, Michoacán. Julio de 2010. (S. Cristians, 2010).

Hintonia standleyana es un árbol o arbusto de hasta 6 m de alto tronco cubierto, con hojas ovaladas 4 a 12 cm de largo, ramas densamente corto-peludas cuando jóvenes; flores de olor dulce, corola blanca y frutos en cápsula obovada (figura 2). Esta especie se distribuye en Guerrero, Oaxaca y Veracruz, así como en Guatemala en el bosque tropical. Recibe otros nombres como: Copalchi, copalchi de jojutla, falsa quina, quina amarilla.



Figura 2.- *Hintonia standleyana* Bullock. Tuzantlan, Guerrero. Julio de 2010. (S. Cristians, 2010).

La importancia que tiene este complejo copalchi es debido a sus propiedades curativas que se les han atribuido y las cuales han sido objeto de mucha investigación. Ya que la infusión preparada de la corteza del tallo de estas especies se usan indistintamente para el tratamiento para la DM2 y malaria, sin embargo, se tienen otras actividades terapéuticas reportadas como antimicrobiano, antiplasmodial, antinociceptivo (R. Mata *et al.* 2008), así como problemas gastrointestinales como dispepsias, úlceras gástricas y dolores estomacales (S. Cristians *et al.* 2013).

En los últimos 50 años la comercialización y explotación de la corteza del tallo (recurso no renovable) de ambas especies de *Hintonia* debido a sus propiedades terapéuticas y a la falta de regulación en la comercialización han provocado un daño irreversible a estos recursos provocando que ambas especies se encuentran en peligro de extinción, por tal motivo es de suma importancia proteger y salvaguardar estos recursos naturales controlando su comercialización y encontrando otras alternativas terapéuticas (S. Cristians *et al.* 2009). Como objetivo de S. Cristians y cols., es promover la conservación de estas plantas Mexicanas su investigación se orienta en comparar la composición química de los extractos de las hojas y la corteza del tallo de *H. latiflora* y *H. standleyana*, encontrándose que las hojas también tienen propiedades antidiabéticas igual que la corteza del tallo, esto contribuirá al conservación de ambas especies (S. Cristians *et al.* 2009), presentando tanto propiedad antihiper glucémico

como hipoglucemiante, para determinar las propiedades hipoglucemiante de los extractos se realizó un estudio donde los sujetos de investigación presentan niveles de glucosa en sangre normales lo cual al administrar los extractos crudos de las hojas y la corteza del tallo de las especies *Hintonia* se ve el decremento de los niveles de glucosa en sangre el mismo efecto ocurre con la propiedad antihiper glucémico pero a diferencia del efecto hipoglucemiante se utiliza sujetos de investigación con DM inducida que se caracteriza por niveles altos de azúcar en sangre, como sujetos de investigación se refiere a ratas Wistar del género masculino (J. Guerrero-Analco *et al.* 2005).

El efecto antihiper glucémico de las hojas está relacionado con su contenido de metabolitos secundarios con propiedades antidiabéticas principalmente las 4-fenilcumarinas (Guerrero-Analco *et al.*, 2005 y Guerrero, 2007), el ácido ursólico (compuesto triper ténico pentacíclico) y el ácido clorogénico (compuesto éster de ácido cafeico y (-) - ácido quínico) (S. Cristians, 2013).

2.4.1 Antecedentes químicos y farmacológicos.

De la corteza y hojas de *H. latiflora* y *H. standleyana* se han aislado algunos derivados de 4-fenilcumarinas, estos compuestos son de interés, ya que han sido identificados como los principales responsables de la actividad antidiabética de los extractos de la planta (Guerrero-Analco *et al.* 2007; S. Cristians *et al.*, 2009). Del grupo de 4-fenilcumarinas destaca el compuesto 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3',4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (figura 3), es considerado para el estudio farmacocinético por la presencia en las dos especies más importantes del complejo copalchi. Su aspecto físico es un sólido amorfo de color beige o amarillo de peso molecular (C₂₂H₂₂O₁₁) de 462 g/mol, punto de fusión de 228-231°C y coeficiente de partición de 3.35 (datos aún no publicados); aislado mediante la cristalización con metanol del concentrado obtenido a partir de la maceración de las hojas y la corteza del tallo de *H. latiflora* y *H. standleyana* con una mezcla de CH₂Cl₂-MeOH (1:1) (Guerrero-Analco, *et al.*, 2007; S. Cristians *et al.*, 2013).

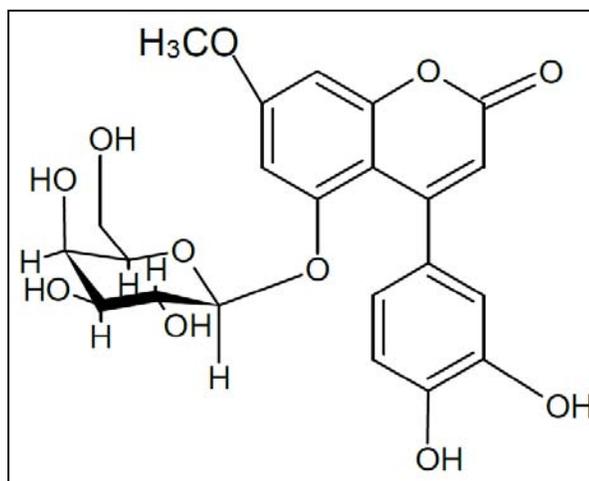


Figura 3.- Estructura desarrollada del compuesto 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3'4'-dihidroxi-4-fenilcumarina (Tesis de licenciatura, María de Lourdes Julián de la Cruz).

2.4.2 Mecanismo de acción

De acuerdo a los estudios realizados los extractos del complejo copalchi actúan como inhibidor de las enzimas α -glucosidasas, igual que la acarbosa y miglitol, en los últimos años se han realizados múltiples esfuerzos para identificar inhibidores naturales de estas enzimas para el desarrollo de nuevos medicamentos o preparados a bases de plantas medicinales, útiles para el tratamiento de DM2 (R. Mata et al., 2013).

Su mecanismo de acción es inhibiendo las α -glucosidasas intestinales (maltasas, sacarasas, dextrinasas, glucoamilasas) presentes en las vellosidades intestinales, el resultado es una demora en la digestión de los carbohidratos con reducción de los picos glucémicos postprandiales. También actúan disminuyendo la secreción de polipéptidos intestinales (G. Llave, 2008).

Las α -glucosidasas, son enzimas unidas a la membrana que logran estos efectos a través del bloqueo de la digestión de los carbohidratos, al parecer por inhibición selectiva de las disacaridasas en el borde del cepillo intestinal y en consecuencia, enlentecen la absorción de la glucosa. Esta acción reduce efectivamente los picos prandiales de la glucosa plasmática y también la concentración de insulina (R. Mata et al., 2012).

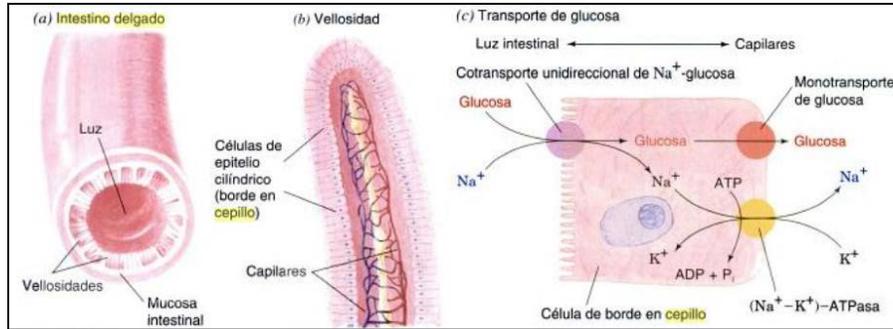


Figura 4.- Transporte de glucosa en el epitelio intestinal. Las células de borde en cepillo de las cuales se forman vellosidades, concentran la molécula glucosa desde la luz intestinal. b) vellosidades del intestino delgado ubicación de las enzimas α -glucosidasas (Modificado de Fundamentos de bioquímica, 2006).

3.- OBJETIVO

Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación 5-*O*- β -*D*-galactopiranosil-7-metoxi-3'4'-dihidroxi-4-fenilcumarina y su aglicona en heces de rata por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, para la aplicación en un estudio preclínico.

4.- METODOLOGÍA

4.1 Método de cuantificación

4.1.1 Equipos e instrumentos

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent Technologies 1100
- ✓ Detector UV-Vis de arreglo de diodos
- ✓ Sistema de desgasificación en línea
- ✓ Bomba cuaternaria/isocrática
- ✓ Automuestreador
- ✓ Sistema de recolección de datos HP-Chemstation para sistemas Agilent LC y LC/MS
- Columna Eclipse XDB-C8, 5µm; 4.6x150mm Agilent®
- Pre-columna Eclipse XDB-C8, 5 µm; 4.6 x 12.5 mm
- Balanza analítica Sartorius A9
- Equipo de purificación de agua Milli-Q
- Sistema de filtración para disolventes (Equipo de filtración Millipore, membranas Millipore tipo HVLP 0.45 µm para filtrar solventes orgánicos y tipo HAWP 0.45 µm para filtrar solventes acuosos)
- Sonicador BRASON
- Vortex
- Vortex Heidolph
- Centrifuga Micromase RF
- Repetidora Eppendorf
- Liofilizador LABCONCO®
- Micropipeta Brand de 100 – 1000 µL
- Micropipeta Biohit de 10 – 100 µL

4.1.2 Material

- Matraz volumétrico de 10 mL
- Frascos para fase móvil y/o soluciones de 1000 mL y 2000 mL.
- Viales Agilent 1.5 mL
- Tubos Eppendorf de 2 mL
- Vasos de precipitado de 50 mL
- Nave de pesado
- Mortero y pistilos
- Espátula Cromo-níquel
- Gradillas
- Tubo de vidrio de 13 x 100 mm
- Papel de aluminio
- Puntas para micropipetas

4.1.3 Reactivos

- Agua desionizada
- Acetonitrilo grado HPLC Tecnolab®
- Ácido trifluoroacético (TFA) ALDRICH

4.1.4 Estándares

- 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3´4-dihidroxi-4-fenilcumarina
- Aglicona

4.1.5 Preparación de soluciones

- **Agua acidificada al 0.1%**

Medir un mililitro de ácido trifluoroacético, transferir a un matraz aforado de 1000 mL mezclar y llevar al aforo con agua desionizada. Filtrar a través de membrana Millipore tipo HAWP de 0.45 μm mediante vacío, posteriormente sonicar durante 15 min.

- **Acetonitrilo grado HPLC**

Filtrar el ACN al vacío por una membrana de Millipore tipo HVLP de 0.45 μm , posteriormente sonicar durante 15 min.

- **Solución stock de 4-FC y Aglicona en solución (1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)**

Pesar con exactitud 0.015 g de 4-FC y Aglicona por separado transferir a un mismo matraz aforado de 10 mL con 2.4 mL de agua acidificada y mezclar, posteriormente agregar 2.4 mL de ACN, sonicar por 1 min y llevar al aforo con agua acidificada.

- **Solución de Fase Móvil (Agua acidificada 0.1 % : ACN (76:24 v/v))
(Medio de extracción)**

Preparar 1000 mL, medir 240 mL de ACN grado HPLC, medir 760 mL de agua acidificada al 0.1 % y mezclar.

5. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO

El desarrollo y la optimización del método se inicia de manera empírica para condiciones de solubilidad de ambos compuestos y para las condiciones cromatográficas se recurre a lo publicación de R. Mata *et al.*, 2008.

Tabla 2.- Condiciones cromatográficas iniciales utilizadas para la cuantificación de los compuestos 5-*O*- β -*D*-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina y su Aglicona (R. Mata *et al.*, 2008).

Parámetros cromatográficos	Condiciones Iniciales
Columna	Fase reversa Symetry-C8, tamaño de partícula de 5 μ m: 3.9x150 mm
Fase Móvil	Acetonitrilo (ACN) y agua acidificada (ácido trifluoroacético, TFA, 0.1 %) 19:81
Flujo	0.4 mL/min
Temperatura de columna	25 °C
Volumen de inyección	20 μ L
Longitud de onda	327 nm
Tiempo de corrida	Para el compuesto de 4-FC 15 min. Del compuesto Aglicona no se cuenta con información.

Las columnas utilizadas fueron:

- Symetry C-18, 4.6X150 mm, tamaño de partícula 5 μ m
- Synergi Phenomenex[®], 4.6X150 mm, tamaño de partícula 4 μ m
- Zorbax Agilent C-18, 4.6X150 mm, tamaño de partícula 3.5 μ m
- Eclipse Agilent C-8, 4.6X150 mm, tamaño de partícula 5 μ m

Se probaron diferentes proporciones de fase móvil ACN y agua acidificada 0.1 % (TFA):

- 50:50
- 20:80
- 15:85

d) 10:90

e) 75:25

Los diferentes flujos de fase móvil que se utilizaron fueron:

a) 1.0 mL/min

b) 1.5 mL/min

c) 1.2 mL/min

Con las pruebas realizadas se llega a las condiciones más óptimas para la cuantificación de los analitos de interés.

Tabla 3.- Condiciones cromatográficas finales utilizadas para la cuantificación de los compuestos 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina y su Aglicona.

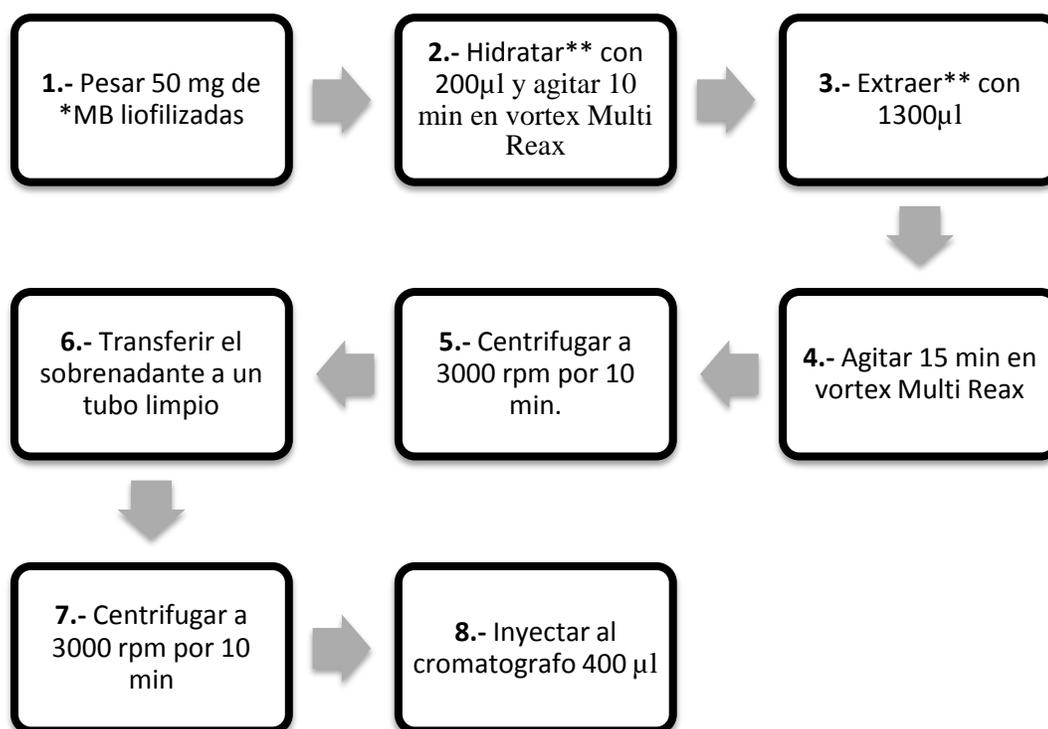
Parámetros cromatográficos	Condiciones Finales
Columna	Fase reversa Agilent Eclipse XDB-C8, tamaño de partícula de 5 μ m; 4.6x150 mm. Precolumna Eclipse XDB-C8, tamaño de partícula de 5 μ m; 4.6x12.5 mm
Fase Móvil	Acetonitrilo y agua acidificada al 0.1 %) 24:76
Flujo	1.2 mL/min
Temperatura de columna	25 °C
Volumen de inyección	20 μ L
Longitud de onda	328 nm
Tiempo de corrida	10 min Para cada analito es: tr 4-FC= 2.4 min tr Aglicona=7.6 min

Para poder cuantificar los analitos de interés en la matriz biológica (heces de rata) se requiere de una metodología de extracción en la cual se debe considerar el recobro de los analitos y esto dependerá de la solubilidad en el medio de extracción.

En base a la referencia (R. Mata *et al.*, 2008) se menciona que el compuesto 4-FC es soluble en agua lo cual se requiere hacer pruebas de solubilidad para ambos compuestos (4-FC y su Aglicona) los diferentes disolventes probados fueron: acetonitrilo, 9:1 (H₂O acidificada 0.1%: ACN), etanol y agua acidificada 0.1%, los cuales mostraron cromatografías deficientes, problemas en solubilizar a ambos compuestos. Por último se probó el porcentaje de fase móvil 76:24 (H₂O acidificada 0.1%: ACN) en estas condiciones ambos analitos se solubilizaron en su totalidad y la cromatografía es óptima.

Para obtener una muestra limpia y poder ser inyectada en el cromatógrafo se considera el paso de filtrar la muestra, se utilizaron filtros de diferente material y tamaño de poro, se calculó el porcentaje de recuperación que va 95-98 % en muestras filtradas y sin filtrar por lo tanto se optimizo el proceso en no filtrar la muestra.

Figura 5.- Método de extracción.
(Desarrollado por la Dra. Inés Fuente y cols).



* Muestra biológica.

** Se utiliza medio de extracción (Agua acidificada 0.1 % : ACN (76:24 v/v))

Se consideró para el estudio de validación en preclínica la NOM-177-SSA1-1998 y Guía de FDA.

Tabla 4.- Requisitos para la validación en muestras biológicas de acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998.

Parámetro	Requisitos para la validación
Selectividad	Analizar en las condiciones establecidas para la prueba 1. Un blanco de fase móvil 2. Un blanco de pool de heces 3. Muestras en solución de 4-FC y Aglicona a una concentración de 3 µg/ml. 4. Muestra cargada en heces de 4-FC y Aglicona a una concentración de 0.09 µg/mg de heces de rata.
Linealidad del método	Se preparó tres curvas de calibración con 5 niveles de concentración en un intervalo de trabajo de 0.09, 0.45, 0.9, 2.25, 4.5 µg/mg en heces de rata.
Límite de cuantificación	Se evaluó el límite de cuantificación al preparar por quintuplicado la concentración más baja en el intervalo de trabajo que es de 0.09 µg/mg en heces de rata.
Recuperación absoluta	Se evaluó el porcentaje de recobro al preparar por triplicado puntos control 0.3 µg/mg, 1.5 µg/mg, 3 µg/mg (bajo, medio y alto) en: A) Matriz biológica (heces de rata) B) En solución
Precisión en condiciones de repetibilidad	Se preparó puntos control por quintuplicado a las siguientes concentraciones 0.3 µg/mg, 1.5 µg/mg, 3 µg/mg en heces de rata (bajo, medio y alto).
Precisión en condiciones de reproducibilidad	Se preparó por duplicado durante tres días puntos control 0.3 µg/mg, 1.5 µg/mg, 3 µg/mg en heces de rata (bajo, medio y alto).
Exactitud	Con los resultados de repetibilidad y reproducibilidad, se determinó este parámetro calculando el por ciento de la desviación absoluta.
Estabilidad a largo plazo	Se preparó por duplicado una serie de puntos control a la concentración de 0.3 µg/mg, 1.5 µg/mg, 3 µg/mg en heces de rata (bajo, medio y alto). a) A los 15 días, se descongeló los puntos control a temperatura ambiente, una vez descongeladas se analizaron las muestras. Condiciones de almacenamiento a -70°C
Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente	Se preparó por duplicado una serie de puntos control a la concentración de 0.3 µg/mg, 1.5 µg/mg, 3 µg/mg en heces de rata (bajo, medio y alto), se dejó durante 24 h las

Parámetro	Requisitos para la validación
	muestras a temperatura ambiente, una vez pasado el tiempo aplicar el método analítico, y analizar.
Estabilidad de la muestras en refrigeración	Se preparó por duplicado una serie de puntos control 0.3 µg/mg, 1.5 µg/mg, 3 µg/mg en heces de rata (bajo, medio y alto), se dejó durante 24 h las muestras en refrigeración, una vez pasado el tiempo aplicar el método analítico y analizar. Condiciones de almacenamiento de 2 a 8°C.
Ciclos de congelación-descongelación	Se preparó por duplicado 3 series de muestras punto control de 4-FC y Aglicona (0.3 µg/mg de heces, 1.5 µg/mg de heces, 3 µg/mg de heces) en la matriz biológica y congelarlo. a) A las 12 h, descongela los puntos control a temperatura ambiente. Una vez des congeladas, se procesan las muestras y se re congelan. b) A las 24 h, descongela los puntos control a temperatura ambiente. Una vez des congeladas, se procesan las muestras y se re congelan. c) A las 36 h, descongela los puntos control a temperatura ambiente. Una vez des congeladas, se procesan las muestras y se re congelan.
Tolerancia	Este parámetro se evaluó modificando el porcentaje normal del agua acidificada en un ± 4%. Para cada cambio de porcentaje de fase móvil, se procesa curva de calibración. Fase normal (76:24) Fase -4 % (73:27) Fase +4 % (79:21)

Nota: Las muestras control deben ser diferentes a las de la curva de calibración y deben estar incluidas en el intervalo de trabajo.

6.- RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1 Verificación del sistema

6.1.1 Adecuabilidad

Tabla 5.- Resultados de adecuabilidad para los compuestos 5-*O*- β -*D*-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina y su Aglicona.

Número inyección	Área 4-FC	Área Aglicona
1	500.7	687.4
2	500.9	687.5
3	500.6	686.7
4	500.5	686.4
5	499.7	686.8
6	500.9	687.6
Promedio	500.55	687.06
DE	0.4460	0.4966
%CV	0.1 %	0.1 %

La guía del CNQFB menciona que el criterio de aceptación de adecuabilidad deber ser $CV \leq 2.0 \%$, como se observa en la tabla 5 para ambos compuestos cumple con el criterio especificado, por lo tanto son confiables y se procede a evaluar los parámetros de la validación.

6.1.2 Linealidad del sistema

Tabla 6.- Preparación de curva de calibración en el sistema para ambos analitos de interés (5-*O*- β -*D*-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina y su Aglicona).

Concentración stock ($\mu\text{g/mL}$)	Alícuota (μL)	Aforo (μL)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Alícuota (μL)	Aforo (μL)	Concentración final ($\mu\text{g/mL}$)
1500	15	1000	22.5	200	1500	3
	75		112.5	200		15
	150		225	200		30
	375		562.5	200		75
	750		1125	200		150

Nota: Los aforos se realizan con disolvente de extracción.

Tabla 7.- Resultados experimentales de linealidad del sistema del compuesto 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina.

	Curva 1	Curva 2	Promedio
Concentración µg/mL	Área 4-FC	Área 4-FC	Área 4-FC
3	50.2	45.9	48.05
15	249.4	296.6	273
30	484.7	508.1	496.4
75	1281.4	1312.5	1296.95
150	2628.8	2636.9	2632.85
Pendiente	17.59	17.54	17.57
Ordenada al origen	-21.76	2.44	-9.66
r	0.9999	0.9998	0.9999

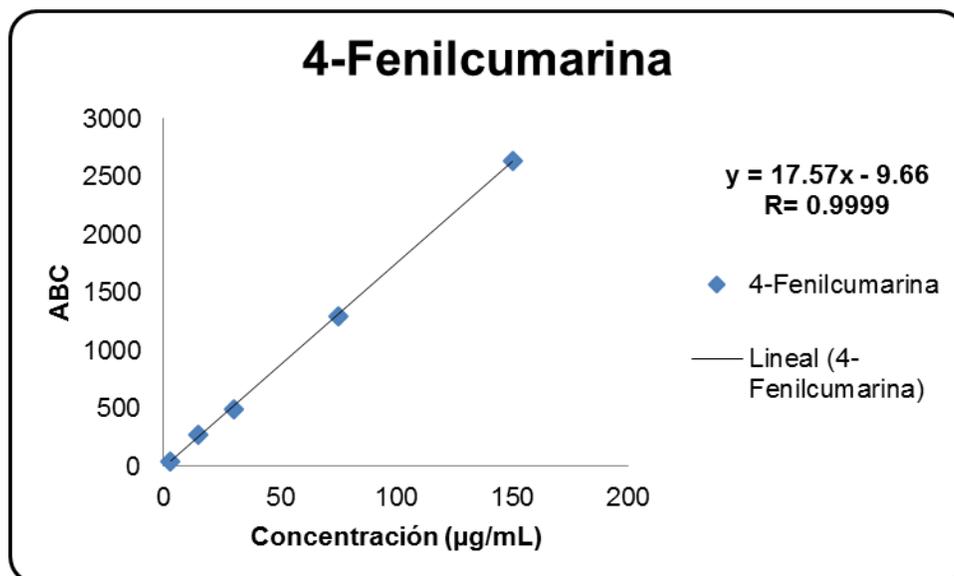


Figura 6.- Gráfica de linealidad del sistema del compuesto 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina

Tabla 8.- Resultados experimentales de linealidad del sistema del compuesto aglicona.

	Curva 1	Curva 2	Promedio
Concentración µg/mL	Área Aglicona	Área Aglicona	Área Aglicona
3	66.8	61.2	64
15	333.5	400.9	367.2
30	658.2	671.1	664.65
75	1754.4	1791.5	1772.95
150	3585.1	3597.5	3591.3
Pendiente	24.03	23.98	24.01
Ordenada al origen	-32.65	-4.93	-18.79
r	0.9999	0.9998	0.9999

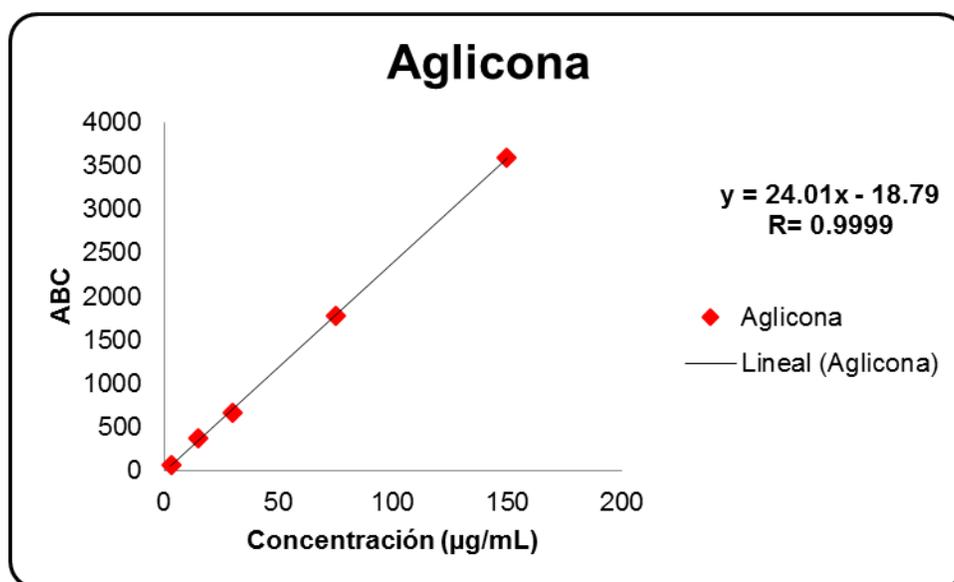


Figura 7.- Gráfica de linealidad del sistema del compuesto Aglicona

La curva de calibración realizada entre la concentración como variable independiente (X) y el área respuesta del pico cromatográfico como variable dependiente (Y) resultó ser lineal en el intervalo de concentraciones comprendidas entre 3 y 150µg/mL. Al aplicar la regresión lineal a

los datos se obtuvo la ecuación de la recta para el compuesto 5-*O*- β -*D*-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina $y = 17.57x - 9.66$ y coeficiente de correlación de $r = 0.9999$ y para el compuesto Aglicona $y = 24.01x - 18.79$ y coeficiente de correlación de $r = 0.9999$. La regresión lineal obtenida es el diseño del modelo matemático representado como una ecuación, que permite establecer o simular el comportamiento de la variable dependiente con respecto a la variable independiente. El coeficiente de correlación obtenido para ambos compuestos mide la relación de los dos variables su valor es cercano a 1, lo que nos indica que hay una relación directamente proporcional y si una variable aumenta la otra también.

6.2 Validación del método analítico

6.2.1 Selectividad

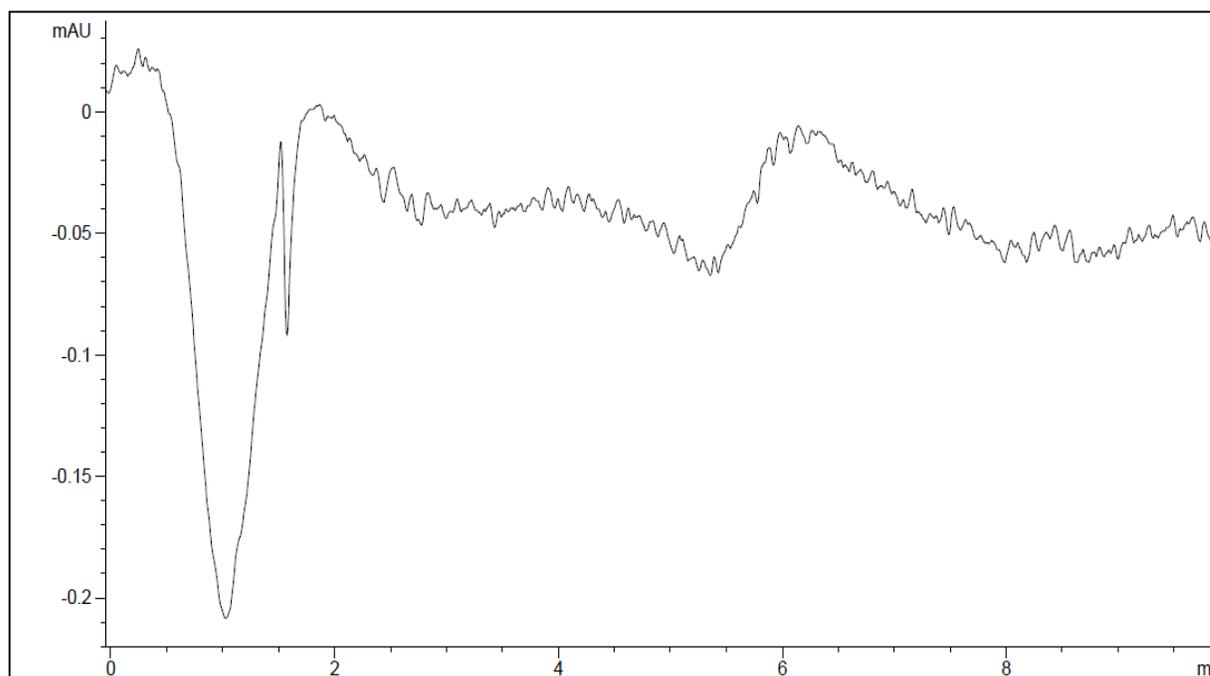


Figura 8.- Cromatograma del parámetro de selectividad del blanco de la fase móvil (ACN: agua acidificada 0.1%), sin 4-FC y su aglicona, condiciones cromatográficas utilizadas reportadas en la tabla 3.

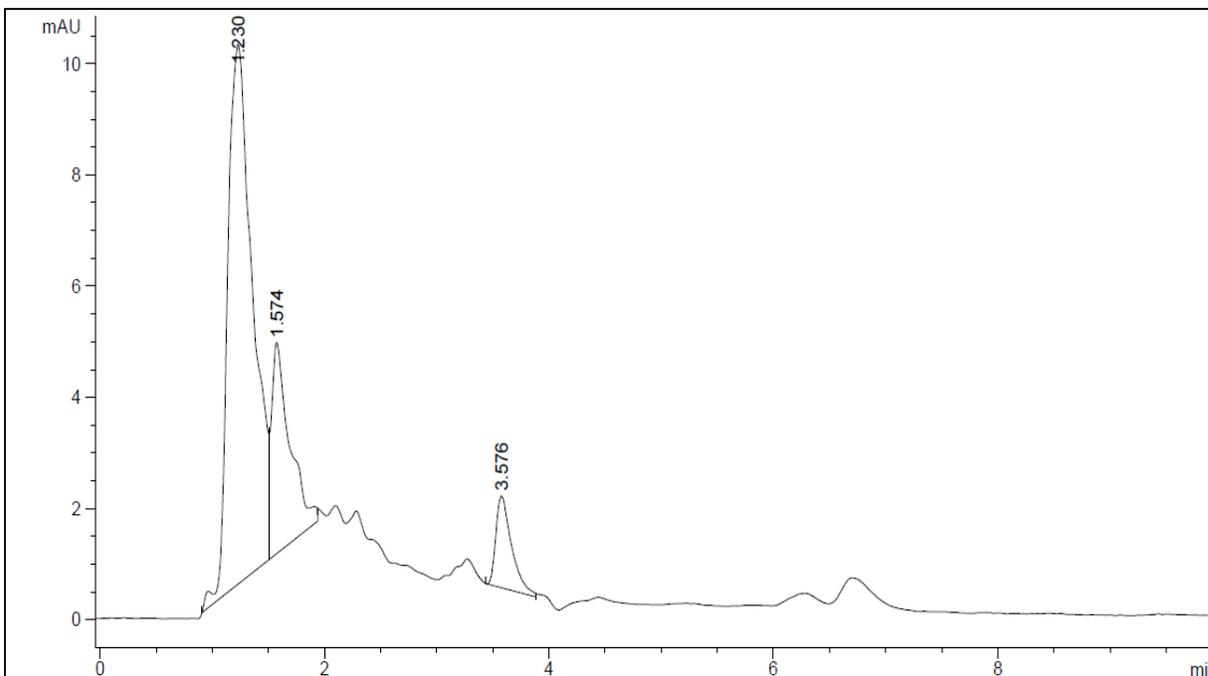


Figura 9.- Cromatograma del parámetro de selectividad del blanco de la matriz biológica, sin 4-FC y su aglicona, condiciones cromatográficas utilizadas reportadas en la tabla 3.

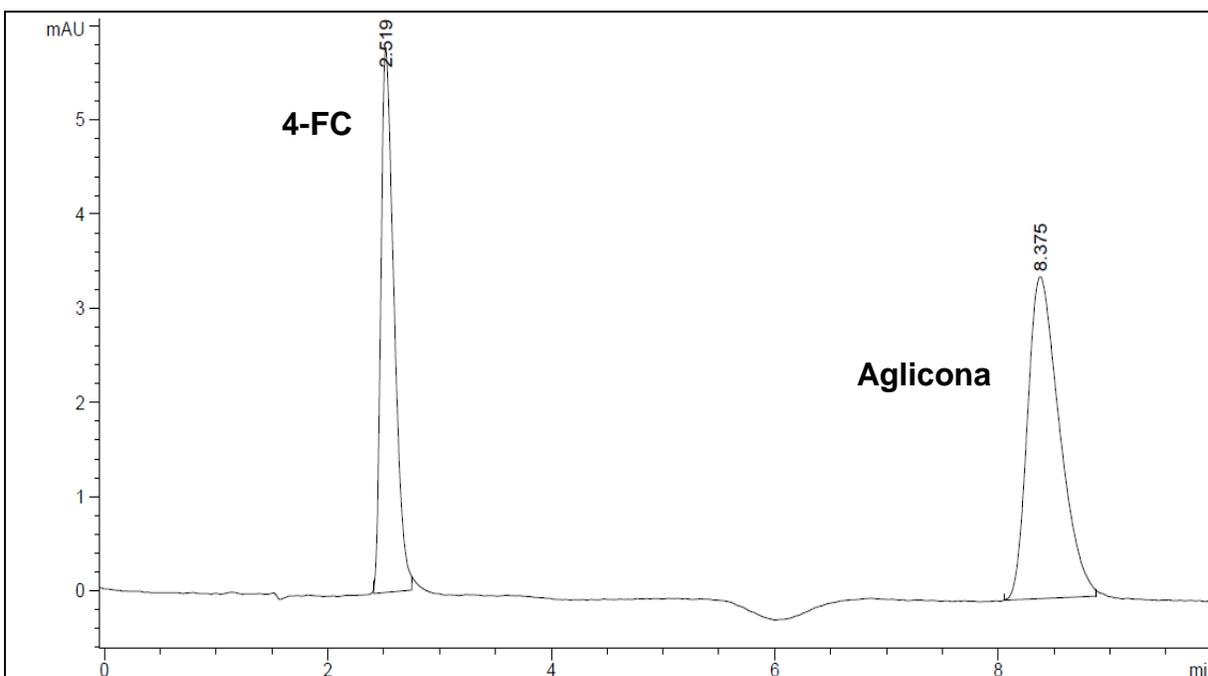


Figura 10.- Cromatograma del parámetro de selectividad del sistema a una concentración de 3µg/ml para ambos analitos, condiciones cromatográficas utilizadas reportadas en la tabla 3.

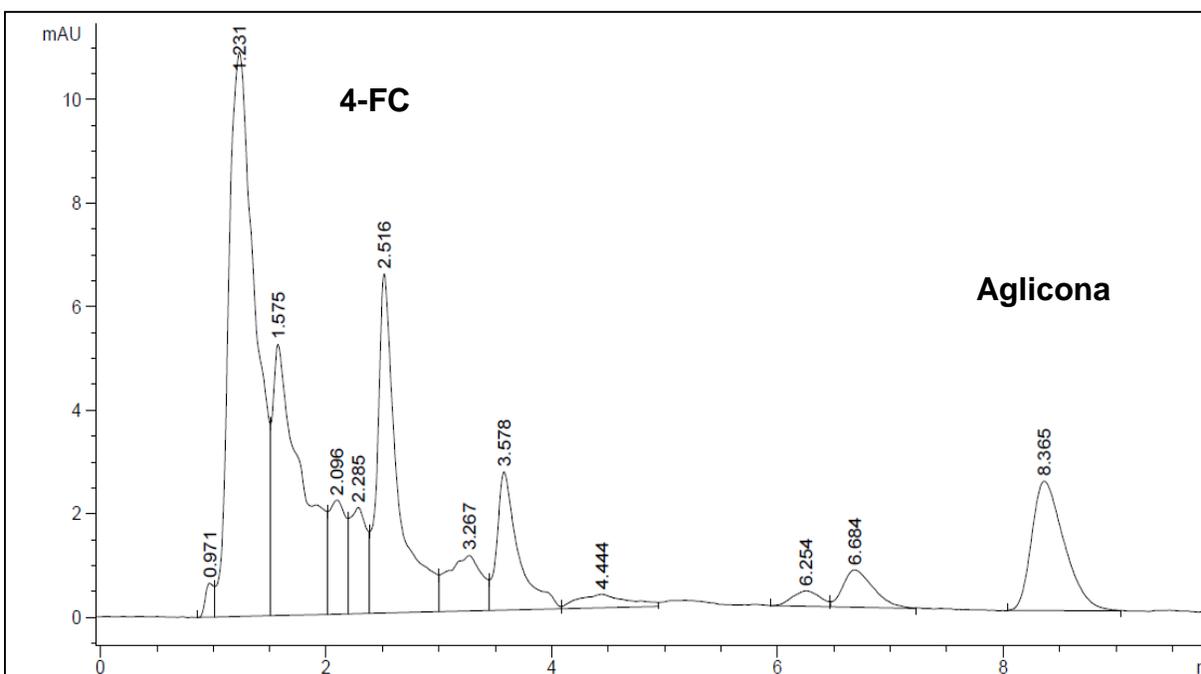


Figura 11.- Cromatograma del parámetro de selectividad del método a una concentración de 0.09 µg/mg de heces para ambos analitos, condiciones cromatográficas utilizadas reportadas en la tabla 3.

De acuerdo a los cromatogramas de selectividad nos permite saber que el equipo usado (CLAR) será capaz de cuantificar los analitos de interés sin afectar otros compuestos que se encuentren en la muestra.

6.2.2 Linealidad del método

Tabla 9.- Preparación de la curva de calibración en el método.

Concentración stock (µg/mL)	Alícuota (µL)	Aforo (µL)	Concentración (µg/mL)	Alícuota (µL)	mg de heces	Concentración final (µg/mg de heces)
1500	15	1000	22.5	200	50	0.09
	75		112.5	200	50	0.45
	150		225	200	50	0.9
	375		562.5	200	50	2.25
	750		1125	200	50	4.5

$$0.2 \text{ mL} \left(\frac{22.5 \mu\text{g}}{1 \text{ mL}} \right) \left(\frac{1}{50 \text{ mg de heces}} \right) = \frac{0.09 \mu\text{g}}{\text{mg de heces}}$$

$$0.2 \cancel{\text{ mL}} \left(\frac{22.5 \mu\text{g}}{1 \cancel{\text{ mL}}} \right) \left(\frac{1}{50 \text{ mg de heces}} \right) = \frac{\mathbf{0.09 \mu\text{g}}}{\mathbf{\text{mg de heces}}}$$

Figura 12.- Ejemplo de cálculo para obtener la concentración de los analitos de interés en la matriz biológica.

Tabla 10.- Resultados experimentales para evaluar la linealidad del método para cuantificar al compuesto 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina.

	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio
Concentración μg/mg de heces	Área 4-FC	Área 4-FC	Área 4-FC	Área 4-FC
0.09	62.4	57.0	54.9	58.10
0.45	232.2	231.4	224.5	229.37
0.9	472.6	471.3	497.9	480.60
2.25	1203.6	1224.2	1198	1208.60
4.5	2367	2376.9	2377	2373.63
Pendiente	525.61	529.57	527.72	527.63
Ordenada al origen	6.62	4.72	6.06	5.80
r	0.9999	0.9998	0.9999	0.9999

Tabla 11.- Resultados experimentales de la concentración calculada del compuesto 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina.

Concentración (μg/mg de heces)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	DE	CV	%DEA
0.09	0.11	0.10	0.09	0.10	0.01	6.86	10.15
0.45	0.43	0.43	0.41	0.42	0.01	2.00	5.84
0.9	0.89	0.88	0.93	0.90	0.03	3.11	0.01
2.25	2.28	2.30	2.26	2.28	0.02	0.97	1.32
4.5	4.49	4.48	4.49	4.49	0.01	0.16	0.27

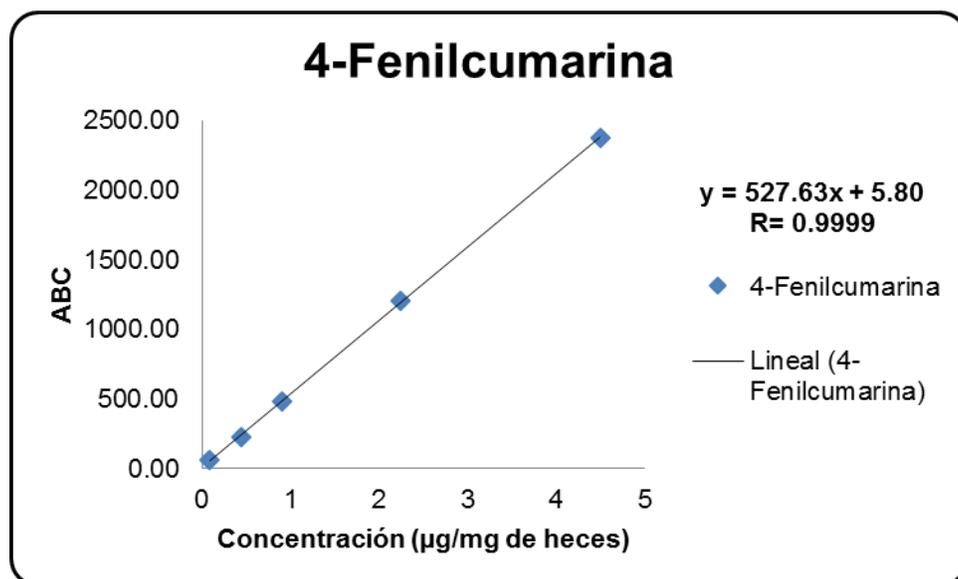


Figura 13.- Gráfica de linealidad del método en la que se ilustra la relación directamente proporcional entre las variables, usando el compuesto 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina

Tabla 12.- Resultados experimentales para evaluar la linealidad del método para cuantificar el compuesto Aglicona.

	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio
Concentración µg/mg de heces	Área Aglicona	Área Aglicona	Área Aglicona	Área Aglicona
0.09	51.90	50.90	48.00	50.27
0.45	262.90	267.40	251.10	260.47
0.9	534.40	542.10	544.90	540.47
2.25	1397.50	1431.30	1356.40	1395.07
4.5	2785.00	2748.30	2732.30	2755.20
Pendiente	622.31	615.04	609.64	615.66
Ordenada al origen	-13.00	0.56	-12.04	-8.16
r	1.0000	0.9997	1.0000	0.9999

Tabla 13.- Resultados experimentales de la concentración calculada del compuesto Aglicona

Concentración ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de heces)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	DE	CV	%DEA
0.09	0.10	0.08	0.10	0.09	0.01	12.28	5.42
0.45	0.44	0.43	0.43	0.44	0.01	1.43	3.05
0.9	0.88	0.88	0.91	0.89	0.02	2.17	0.97
2.25	2.27	2.33	2.24	2.28	0.04	1.85	1.30
4.5	4.50	4.47	4.50	4.49	0.02	0.41	0.26

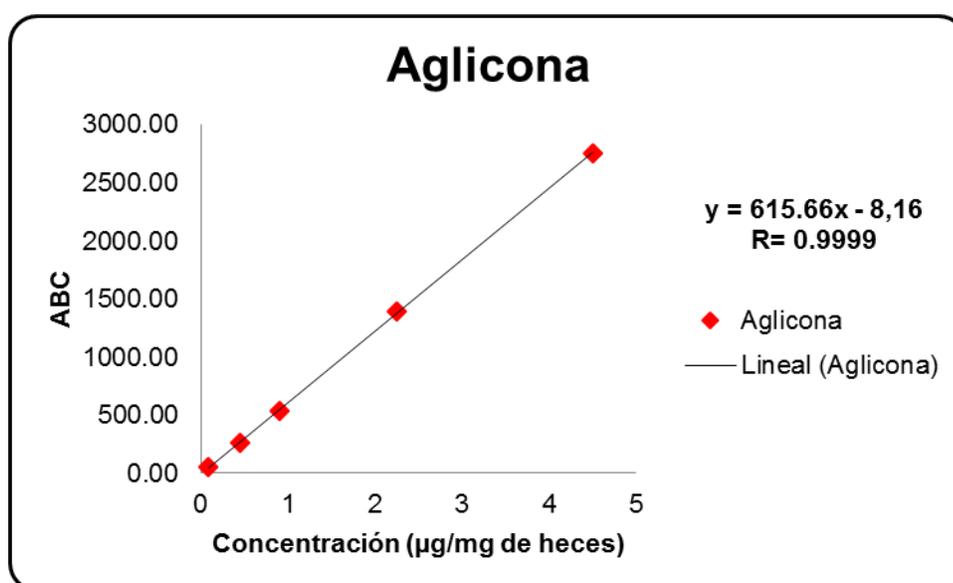


Figura 14.- Gráfica de linealidad del método en la que se ilustra la relación directamente proporcional entre las variables, usando el compuesto Aglicona.

La curva de calibración realizada entre la concentración como variable independiente (X) y el área respuesta del pico cromatográfico como variable dependiente (Y) resultó ser lineal en la matriz biológica en un intervalo de concentraciones comprendidas 0.09, 0.45, 0.9, 2.25 y 4.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de heces. Al aplicar la regresión lineal a los datos se obtuvo la ecuación de la recta para el compuesto 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina de $y = 527.63x + 5.8$ y coeficiente de correlación de $r = 0.9999$ y para el compuesto Aglicona de $y = 615.66x - 8.16$ y coeficiente de correlación de $r = 0.9999$.

6.2.3 Límite de cuantificación

Tabla 14.- Muestra la concentración calculada para el Límite de Cuantificación.

Replicas	4-FC ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de heces)	Aglicona ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de heces)
1	0.1106	0.1005
2	0.1063	0.1011
3	0.1004	0.0960
4	0.1022	0.0968
5	0.1043	0.0991
Promedio	0.1047	0.0987
DE	0.0039	0.0022
CV	3.8	2.3
%DEA	16.4	9.7

Los resultados de límite de cuantificación son precisos y exactos al obtener un CV% de 3.8 y %DEA de 16.4 para el compuesto 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina y para el compuesto Aglicona un CV% de 2.3 y %DEA de 9.7, de esta forma se determina que el método es capaz de cuantificar cantidades iguales o mayores a 0.09 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de heces de una forma precisa y exacta.

6.2.4 Recuperación absoluta

Tabla 15.- Resultados obtenidos del porcentaje de recobro de los compuestos 5-O- β -D-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina y su Aglicona.

Muestras	4-FC			Aglicona		
	Áreas en heces	Áreas en solución	% de Recobro	Áreas en heces	Áreas en solución	% de Recobro
Bajo (0.3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de heces)	151.9	159.9	91.0	200.4	240.1	87.8
	138.7	157.5		190	236.2	
	143.6	159.7		198.1	194.3	
Promedio	144.7	159.0		196.2	223.5	
DE	6.7	1.3		5.5	25.4	
CV%	4.6	0.8		2.8	11.4	
Medio (1.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de heces)	791.6	841.1	94.3	1007.8	1261.5	79.9
	789.3	834.8		1003.2	1252.1	
	791.8	839.1		1004.2	1258.6	
Promedio	790.9	838.3		1005.1	1257.4	
DE	1.4	3.2		2.4	4.8	
CV%	0.2	0.4		0.2	0.4	

4-FC			Aglicona			
Muestras	Áreas en heces	Áreas en solución	% de Recobro	Áreas en heces	Áreas en solución	% de Recobro
Alto (3 µg/mg de heces)	1624.8	1716.1	89.8	2015.5	2570.4	74.4
	1614.6	2010.8		2002.8	3009.9	
	1640.5	1706.6		2030.4	2547.1	
Promedio	1626.6	1811.2		2016.2	2709.1	
DE	13.0	173.0		13.8	260.7	
CV%	0.8	9.5		0.7	9.6	
Promedio Final			91.7	Promedio Final		80.7
DE			2.3	DE		6.7
%CV			2.6	%CV		8.3

El porcentaje de recobro obtenido para el compuesto 5-*O*-β-*D*-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina fue de 91.7 % y para el compuesto Aglicona fue de 80.7 %, al analizar los resultados se puede observar que el proceso de preparación de la muestra e interferencias del método analítico no afectan en la recuperación del analito y el proceso de extracción es eficiente.

6.2.5 Repetibilidad y Exactitud

Tabla 16.- Resultados de Repetibilidad de los compuestos 5-*O*-β-*D*-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina y su Aglicona en un solo día de análisis. Se muestran los resultados de exactitud del método para la determinación de ambos compuestos.

Replicas	4-FC			Aglicona		
	Bajo (0.3 µg/mg de heces)	Medio (1.5 µg/mg de heces)	Alto (3 µg/mg de heces)	Bajo (0.3 µg/mg de heces)	Medio (1.5 µg/mg de heces)	Alto (3 µg/mg de heces)
1	0.3224	1.7006	3.1026	0.3175	1.7047	3.0376
2	0.3185	1.5244	3.2267	0.3087	1.5555	3.1719
3	0.3306	1.4622	3.7210	0.3213	1.4923	3.5765
4	0.2993	1.4943	3.2995	0.2865	1.5256	3.2290
5	0.3092	1.5203	3.1935	0.3012	1.5350	3.1357
Promedio	0.3160	1.5404	3.3087	0.3071	1.5626	3.2301
DE	0.0121	0.0929	0.2411	0.0139	0.0826	0.2058
%CV	3.83	6.03	7.29	4.53	5.29	6.37
%DEA	0.05	0.03	0.10	0.02	0.04	0.08

Como se puede evaluar en la tabla los valores de CV% y DEA% están por debajo de 15% lo que nos indica que el grado de concordancia entre los resultados por un solo analista son precisos y exactos bajo las mismas condiciones de trabajo y esto nos da pauta a que el analista obtendrá resultados confiables, para poder continuar con la validación y posteriormente ser empleado en el análisis de muestras biológicas para la cuantificación de los compuestos de interés.

6.2.6 Reproducibilidad y Exactitud

Tabla 17.- Resultados de reproducibilidad de los compuestos 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina y su Aglicona en tres días diferentes de análisis. Se muestran los resultados de exactitud del método para la determinación de ambos compuestos.

	4-FC			Aglicona		
	Bajo (0.3 µg/mg de heces)	Medio (1.5 µg/mg de heces)	Alto (3 µg/mg de heces)	Bajo (0.3 µg/mg de heces)	Medio (1.5 µg/mg de heces)	Alto (3 µg/mg de heces)
DÍA 1	0.2961	1.4745	3.0750	0.2969	1.4936	3.0561
	0.3056	1.4655	2.9575	0.3075	1.4551	2.8875
DÍA 2	0.3233	1.4984	3.1816	0.3328	1.5091	3.0666
	0.3454	1.4761	3.1718	0.3545	1.4903	3.0582
DÍA 3	0.3148	1.4040	2.8512	0.3148	1.4040	2.8512
	0.3193	1.3524	2.8697	0.3193	1.3524	2.8697
Promedio	0.3174	1.4451	3.0178	0.3210	1.4507	2.9649
DE	0.0168	0.0554	0.1464	0.0203	0.0611	0.1052
%CV	5.3	3.8	4.9	6.3	4.2	3.5
%DEA	5.8	3.7	0.6	7.0	3.3	1.2

Como se puede evaluar en la tabla los valores de CV% y DEA% están por debajo de 15% lo que nos indica que el grado de concordancia entre los días por un solo analista son precisos y exactos bajo diferentes condiciones de trabajo y esto nos da pauta a que el analista obtendrá resultados confiables, para poder continuar con la validación y posteriormente ser empleado en el análisis de muestras biológicas para la cuantificación de los compuestos 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina y su Aglicona.

6.2.7 Estabilidad

6.2.7.1 Estabilidad a Temperatura ambiente

Tabla 18.- Resultados de estabilidad de la muestra a temperatura ambiente en un periodo de 24 h.

Tiempo	4-FC			Aglicona		
	Bajo (0.3 µg/mg de heces)	Medio (1.5 µg/mg de heces)	Alto (3 µg/mg de heces)	Bajo (0.3 µg/mg de heces)	Medio (1.5 µg/mg de heces)	Alto (3 µg/mg de heces)
0	0.2961	1.4745	3.0750	0.2969	1.4936	3.0561
	0.3056	1.4655	2.9575	0.3075	1.4551	2.8875
Promedio	0.3008	1.4700	3.0163	0.3022	1.4743	2.9718
DS	0.0067	0.0063	0.0831	0.0075	0.0272	0.1193
CV	2.2	0.4	2.8	2.5	1.8	4.0
%DEA	0.003	-0.020	0.005	0.007	-0.017	-0.009
24	0.2673	1.3105	2.7984	0.1637	0.8460	1.9055
	0.3038	1.2637	2.9634	0.1657	0.8638	1.9363
Promedio	0.2856	1.2871	2.8809	0.1647	0.8549	1.9209
DS	0.0258	0.0331	0.1167	0.0014	0.0126	0.0218
CV	9.0	2.6	4.0	0.9	1.5	1.1
%DEA	0.048	0.142	0.040	0.451	0.430	0.360
%DEA-est	5.1	12.4	4.5	45.5	42.0	35.4

En la tabla se puede observar que el compuesto 5-O-β-D-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina es estable por 24h a temperatura ambiente al obtener un DEA% y CV% menor al 15, el compuesto aglicona no es estable al obtener un DEA% mayor al 15, se concluye que no cumple con el criterio de aceptación como lo indica la normatividad, lo que nos indica que al momento de emplear el método analítico en el análisis de muestras biológicas no podemos dejar las muestras a temperatura ambiente en un intervalo mayor de 24h.

6.2.7.2 Estabilidad a Temperatura de refrigeración (5°C ± 3°C)

Tabla 19.- Resultados de estabilidad de la muestra a temperatura de refrigeración en un periodo de 24 h.

Tiempo	4-FC			Aglicona		
	Bajo (0.3 µg/mg de heces)	Medio (1.5 µg/mg de heces)	Alto (3 µg/mg de heces)	Bajo (0.3 µg/mg de heces)	Medio (1.5 µg/mg de heces)	Alto (3 µg/mg de heces)
0	0.2961	1.4745	3.0750	0.2969	1.4936	3.0561
	0.3056	1.4655	2.9575	0.3075	1.4551	2.8875
Promedio	0.3008	1.4700	3.0163	0.3022	1.4743	2.9718
DS	0.0067	0.0063	0.0831	0.0075	0.0272	0.1193
CV	2.2	0.4	2.8	2.5	1.8	4.0
%DEA	0.003	0.020	0.005	0.007	0.017	0.009
24	0.3170	1.4244	3.0088	0.2965	1.4613	2.9404
	0.3244	1.4618	2.9558	0.3055	1.4265	2.8682
Promedio	0.3207	1.4431	2.9823	0.3010	1.4439	2.9043
DS	0.0052	0.0264	0.0375	0.0064	0.0246	0.0511
CV	1.6	1.8	1.3	2.1	1.7	1.8
%DEA	0.069	0.038	0.006	0.003	0.037	0.032
%DEA-est	6.6	1.8	1.1	0.4	2.1	2.3

En la tabla se puede observar que los compuestos 5-*O*-β-*D*-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina y su Aglicona son estables a temperatura de refrigeración (2 a 8°C) en 24 h.

6.2.7.3 Estabilidad a Largo plazo

Tabla 20.- Resultados de estabilidad a largo plazo en condiciones de -70°C durante 15 días.

Día	4-FC			Aglicona		
	Bajo (0.3 µg/mg de heces)	Medio (1.5 µg/mg de heces)	Alto (3 µg/mg de heces)	Bajo (0.3 µg/mg de heces)	Medio (1.5 µg/mg de heces)	Alto (3 µg/mg de heces)
0	0.3437	1.6078	3.3249	0.3581	1.5907	3.2004
	0.3538	1.5983	3.1989	0.3690	1.5511	3.0266
Promedio	0.3488	1.6030	3.2619	0.3635	1.5709	3.1135
DE	0.0072	0.0068	0.0891	0.0077	0.0280	0.1229
CV	2.05	0.42	2.73	2.12	1.78	3.95
%DEA	0.16	0.07	0.09	0.21	0.05	0.04

Día	4-FC			Aglicona		
	Bajo (0.3 µg/mg de heces)	Medio (1.5 µg/mg de heces)	Alto (3 µg/mg de heces)	Bajo (0.3 µg/mg de heces)	Medio (1.5 µg/mg de heces)	Alto (3 µg/mg de heces)
15	0.3362	1.2814	2.7106	0.3005	1.3024	2.4992
	0.3428	1.4538	2.9680	0.3194	1.3519	2.8298
Promedio	0.3395	1.3676	2.8393	0.3099	1.3272	2.6645
DE	0.0047	0.1219	0.1820	0.0133	0.0350	0.2338
CV	1.38	8.91	6.41	4.30	2.64	8.77
%DEA	0.13	0.09	0.05	0.03	0.12	0.11
%DEA-est	2.66	14.68	12.96	14.75	15.52	14.42

Al realizar el análisis del parámetro de estabilidad se puede concluir que la muestra no es estable en condiciones de almacenamiento a -70°C durante un periodo de 15 días, lo que permite conocer que durante el análisis de muestra no se deben guardar por ese lapso.

6.2.7.4 Ciclos de congelación-descongelación

Tabla 21.- Resultados de la estabilidad de la muestra, considerando ciclos de congelación y descongelación.

	4-FC			Aglicona		
	Bajo (0.3 µg/mg de heces)	Medio (1.5 µg/mg de heces)	Alto (3 µg/mg de heces)	Bajo (0.3 µg/mg de heces)	Medio (1.5 µg/mg de heces)	Alto (3 µg/mg de heces)
CCD-0	0.2744	1.3480	2.8451	0.2312	1.2763	2.7234
	0.2734	1.3047	2.7687	0.2349	1.3452	2.6422
Promedio	0.2739	1.3264	2.8069	0.2331	1.3107	2.6828
DE	0.0007	0.0306	0.0540	0.0026	0.0487	0.0574
%CV	0.25	2.31	1.92	1.13	3.71	2.14
%DEA	0.09	0.12	0.06	0.22	0.13	0.11
CCD-1	0.2891	1.2953	2.8167	0.2425	1.3734	2.7241
	0.2814	1.3024	2.5983	0.2275	1.4331	2.4240
Promedio	0.2852	1.2989	2.7075	0.2350	1.4032	2.5741
DE	0.0054	0.0050	0.1544	0.0106	0.0422	0.2122
%CV	1.89	0.38	5.70	4.52	3.01	8.24
%DEA	0.05	0.13	0.10	0.22	0.06	0.14
%DEA-est	4.15	2.07	3.54	0.83	7.06	4.05

De acuerdo a los resultados analizados las muestras biológicas solo pueden ser estables durante un ciclo de congelación en condiciones de -70°C.

6.2.8 Tolerancia

Tabla 22.- Resultados de la evaluación de la tolerancia del método para 4-FC y su Aglicona.

Replicas	Condiciones Originales		Cambio 1	
	4-FC	Aglicona	4-FC	Aglicona
	Medio (1.5 µg/mg de heces)		Medio (1.5 µg/mg de heces)	
1	1.4667	1.4683	1.5271	1.4781
2	1.4656	1.4674	1.5255	1.4787
3	1.4656	1.4668	1.5307	1.4790
Promedio	1.4660	1.4675	1.5278	1.4786
DE	0.0007	0.0008	0.0027	0.0005
CV	0.0444	0.0524	0.1745	0.0314

El análisis de la tolerancia del método a cambios cromatográficos tiene como finalidad garantizar que al realizar un análisis de muestras, sí se llegara a presentar algún cambio evaluado durante la validación, nos garantiza que no afecta dicho análisis y no se detendrá la corrida analítica, garantizando que los resultados son confiables.

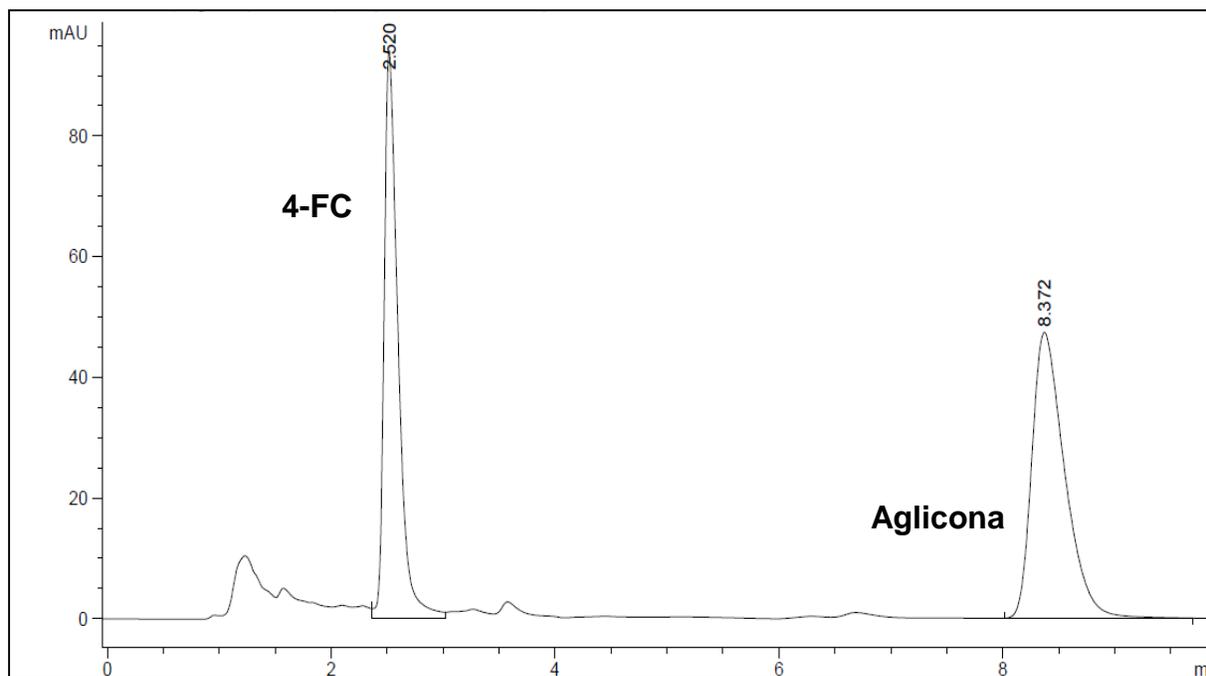


Figura 15.- Cromatograma en condiciones originales en porcentaje de fase móvil [76:24 (ACN:agua acidificada 0.1%)] de ambos analitos a la concentración de 1.5 µg/mg de heces.

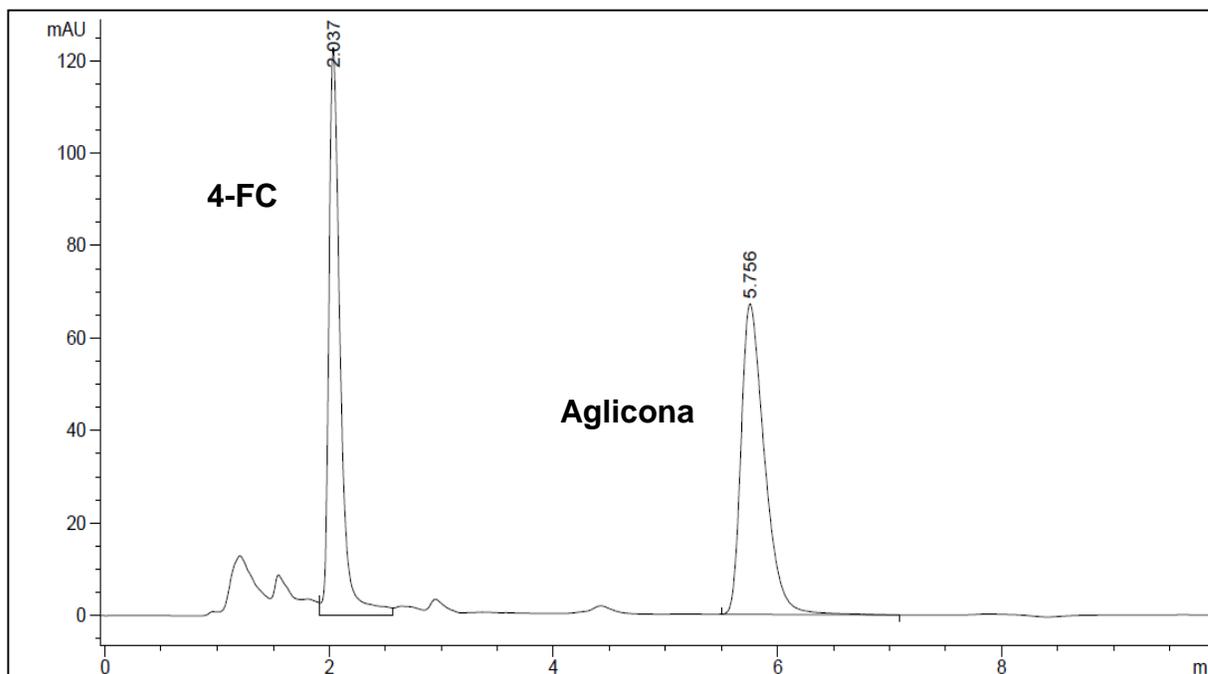


Figura 16.- Cromatograma en cambio 1 en porcentaje de fase móvil [73:27 (ACN:agua acidificada 0.1%)] de ambos analitos a la concentración de 1.5 µg/mg de heces.

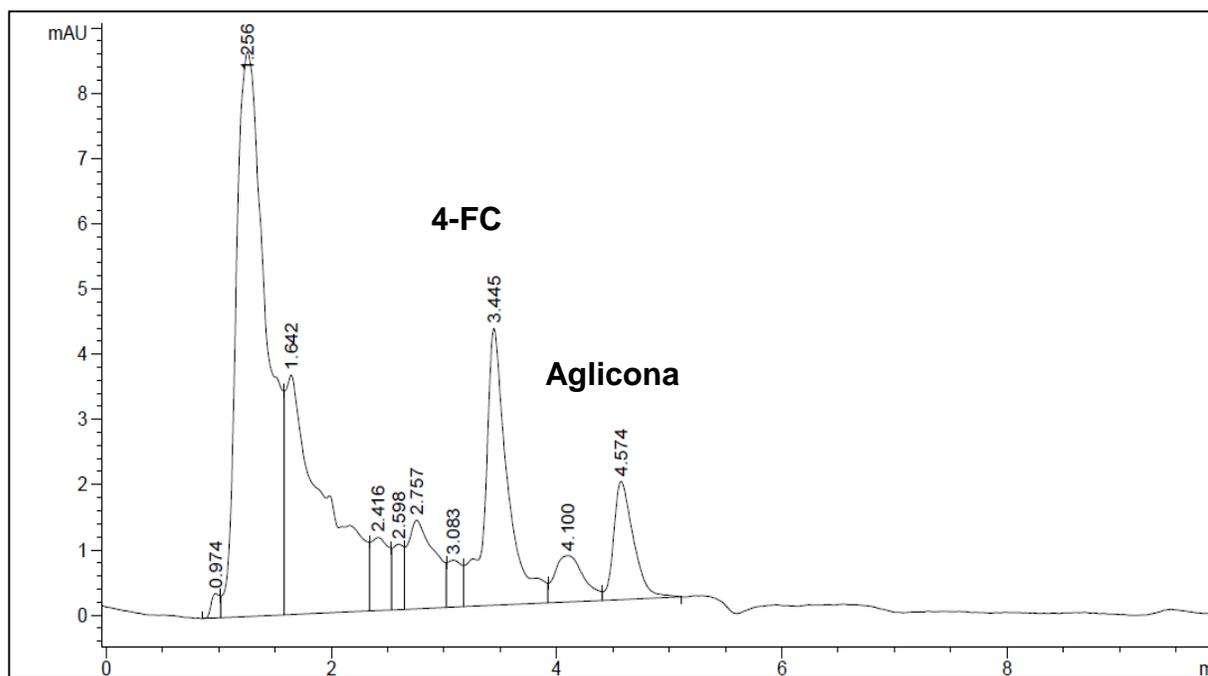


Figura 17.- Cromatograma en cambio 2 en porcentaje de fase móvil [79:21 (ACN:agua acidificada 0.1%)], de ambos analitos a la concentración de 1.5 µg/mg de heces.

De acuerdo a los resultados de la tabla 22 y las figuras 15, 16 y 17 se concluye que el método solo es tolerante al cambio de porcentaje de fase de móvil de 73:27 [ACN:agua acidificada 0.1%].

Tabla 23.- Resultados de la validación del método analítico para la cuantificación de 4-FC y su Aglicona en matriz biológica.

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado final
Selectividad	Señal no mayor al 20% de la concentración más baja.	Cumple
Linealidad	$r \geq 0.98$	Cumple
Límite de cuantificación	%CV < 20% %DEA < 20%	Cumple
Recuperación absoluta	El recobro no debe ser necesariamente del 100%, pero sí reproducible en cada nivel de concentración	Cumple
Precisión y exactitud repetibilidad y reproducibilidad	% CV < 15% %DEA ≤ 15%	Cumple
Estabilidad a temperatura ambiente	%CV ≤ 15% %DEA ≤ 15%	No cumple
Estabilidad en temperatura de refrigeración	%CV ≤ 15% %DEA ≤ 15%	Cumple
Estabilidad a largo plazo 15 días.	%CV ≤ 15% %DEA ≤ 15%	No cumple
Ciclos de congelación-descongelación	%CV ≤ 15% %DEA ≤ 15%	Cumple para el primer ciclo de congelación-descongelación
Tolerancia	%CV ≤ 15% %DEA ≤ 15%	Cumple para el cambio 1.

DEA: desviación estándar absoluta; **CV:** coeficiente de variación; **r:** coeficiente de correlación.

6.3.- Aplicación del método analítico validado

Debido a la importancia farmacológica de las 4-fenilcumarinas obliga a la determinación de parámetros farmacocinéticos; la absorción y la eliminación ya que proporcionan un panorama de la manera en la cual ejercen su actividad biológica y como son metabolizados por el organismo.

Se realizó un estudio preclínico en la cual las ratas tratadas recibieron una dosis única de 90 mg/kg de 4-FC disuelto en solución salina mediante sonda oral. Se recogieron las heces de sus jaulas metabólicas a 0.00, 12.0, 18.0, 24.0, 36.0, 48.0, 60.0 y 72.0 h, las muestras de heces se pesaron y liofilizaron, los compuestos 4-FC y su aglicona se extrajeron en 50 mg de heces liofilizadas con 200 μ L de solvente de extracción, agua acidificada 0.1% TFA: ACN (76:24) se homogeniza durante 10 min utilizando como equipo Multireax Heildolp. Se adiciona 1300 μ l de solvente de extracción se agita por 15 minutos y se centrifuga durante 10 min a 3000 rpm, el sobrenadante se transfiere a un microtubo limpio y se realiza una centrifugación más durante 10 min a 3000 rpm.

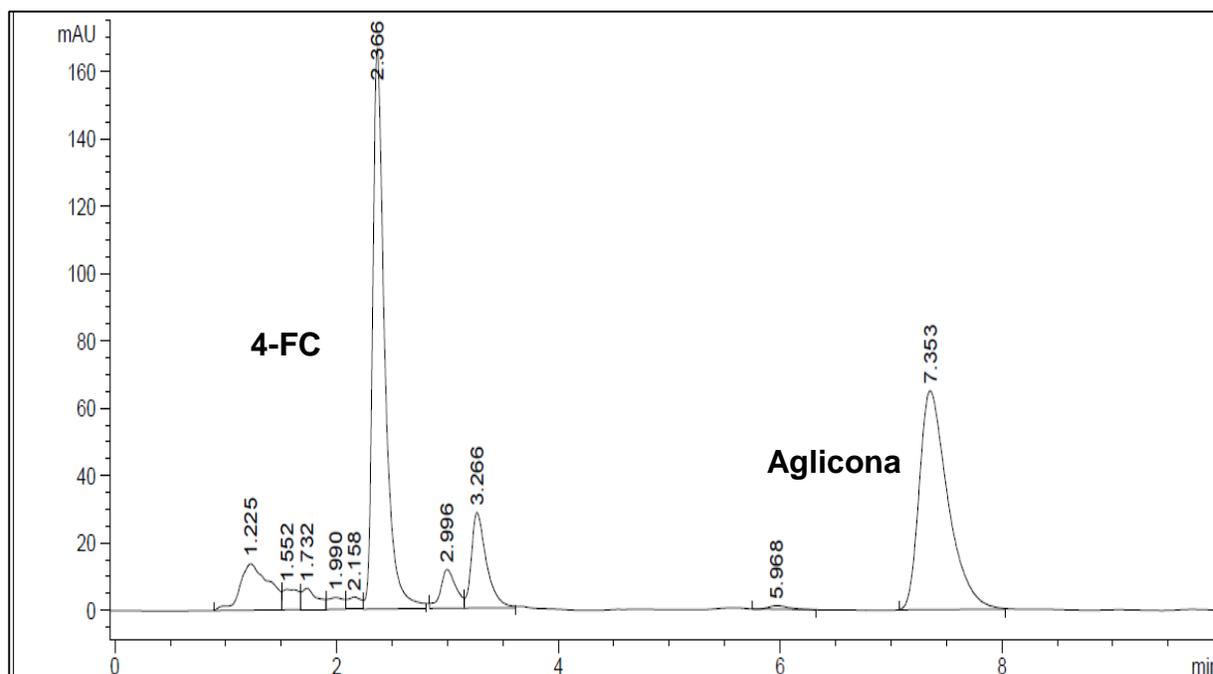


Figura 18.- Ejemplo de Cromatograma del análisis de muestras biológicas correspondiente a; Grupo 4, rata 4, t=18.0

7.- CONCLUSIONES

- Se desarrolló un método analítico para la cuantificación de 5-*O*- β -*D*-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina en un intervalo de trabajo de 0.09 μ g/mg de heces a 4.5 μ g/mg en heces de rata.
- Se optimizó un método analítico para determinar 5-*O*- β -*D*-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina por CLAR y detección UV.
- Se validó y se desarrolló el método analítico en base a los criterios de la normatividad NOM-177-SSA1-1998, CNQFB y FDA.
- El método desarrollado para la cuantificación de 5-*O*- β -*D*-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina en heces de rata demostró ser lineal, exacto, preciso y confiable. Sin embargo existe área de oportunidad para ampliar el rango de la curva, y establecer un método que permita obtener una muestra más clarificada.
- La validación del método se empleará para la cuantificación de 5-*O*- β -*D*-galactopiranosil-7-metoxi-3'-4'-dihidroxi-4-fenilcumarina en heces de rata en un estudio preclínico.
- La validación del método analítico para la cuantificación del fitofármaco permitió establecer estándares de calidad al proceso.

8.- BIBLIOGRAFÍA

- ✓ S. Cristians, R. Bye, A. Navarrete, R. Mata. (2012). Gastroprotective effect of *Hintonia latiflora* and *Hintonia standleyana* aqueous extracts and compounds. J. Ethnopharmacology, 145, 530-535.
- ✓ S. Cristians, J. Guerrero-Analco, A. Pérez, F. Palacios-Espinosa, C. Ciangherotti, R. Bye, and R. Mata. (2009). Hypoglycemic activity of extracts and compounds from the Leaves of *Hintonia standleyana* and *H. latiflora*: Potential alternatives to the use of the stem bark of these species. Journal of Nat. Prod, 72, 408-413.
- ✓ R. Mata, L. Acevedo, D. Méndez, J. Guerrero-Analco, B. Rivero and J. Rodríguez. (2008). Development and validation of liquid chromatography method for quantification of the active markers of *Hintonia standleyana* and *Hintonia latiflora* crude drugs. Pharmaceutical Biology, 46, 105-110.
- ✓ R. Mata, S. Cristians, S. Escandón, K. Juárez, and I. Rivero. (2013). Mexican Antidiabetic Herbs: Valuable Sources of Inhibitors of α - Glucosidases. Journal of Natural Products, 76, 468-483.
- ✓ J. Guerrero-Analco, O. Medina, F. Brindis, R. Bye, J. Pedraza, A. Navarrete, R. Mata. (2007). Antidiabetic properties of selected Mexican copalchis of the Rubiaceae family. Phytochemistry, 68, 2087-2095.
- ✓ J. Guerrero-Analco, P. Hersch, J. Pedraza, A. Navarrete, R. Mata. (2005). Antihyperglycemic effect of constituents from *Hintonia standleyana* in Streptozotocin-induced diabetic rats. Planta Med, 71, 1099-1105.
- ✓ JP. Burke, K. Williams, KMV. Narayan, C. Leibson, SM. Haffner, MP. Stern. A population perspective on diabetes prevention: whom should we target for preventing weight?. Diabetes care 2003; 26: 1999-2004.
- ✓ V. Kecskemeti, Z. Bagi, P. Pacher, I. Posa, Kocsis, MZ. Koltai. New trends in the development of oral antidiabetic drugs. Curr Med Chem 2002; 9: 53-71.

- ✓ S. Gómez-Zorita, A. Urdampilleta. El GLUT4: Efectos de la actividad física y aspectos nutricionales en los mecanismos de captación de glucosa y sus aplicaciones en la diabetes tipo 2. *Av. Diabetol.* 2012, 19-26.
- ✓ E. González, I. Pascual, M. Laclaustra, J. Casasnovas. Síndrome metabólico y diabetes mellitus. *Rev. Esp. Cardiol Supl.* 2005: 30D-37D.
- ✓ J. Ríos, F. Francini, G. Schinella. (2015). Natural Products for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Planta Med*, 81, 975-994.
- ✓ A. Andrade-Cetto y M. Heinrich (2005). Mexican Plants with Hypoglycaemic Effect Used in the Treatment of Diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 99: 325- 348.
- ✓ M. Korecova and M. Hladikova. (2014). Treatment of mild and moderate type-2 diabetes: open prospective trial with *Hintonia latiflora* extract. *European Journal Of Medical Research*, 19, 1-6.
- ✓ P. Subash-Babu, PS. Mainzen-Prince. Antihyperglycaemic and antioxidant effect of hyponidd, an ayurvedic herbomineral formulation in streptozotocin-induced diabetics rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 2004; 1435-1442.
- ✓ R. Bye. Medicinal plants of the Sierra Madre: comparative study of the Tarahumara and Mexican market plants. *Economic Botany.* 1986; 103-124.
- ✓ J. Phillipson. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry.* 2001; 237-242.
- ✓ M. Plotkin. Global Phytochemistry: the ethnobotanist view. *Phytochemistry.* 2001; 117-120.
- ✓ F. Timothy, M. Chaomei, D. Mohsen. Medicinal plants and herbs of Newfoundland and part 1. Chemical constituents of aerial part of pineapple weed. *DARU.* 2004; 131-135.
- ✓ R. Bauer, G. Tittel. Quality assessment of herbal preparations as precondition of pharmacological and clinical studies. *Phytomedicine.* 1996; 193-198.

- ✓ R. Bauer. Quality criteria and standardization of phytopharmaceuticals: can acceptable drug standards be achieved? Drug Information Journal. 1998; 101-110.
- ✓ W. Busse. The significance of quality for efficacy and safety of herbal medicinal products. Drug Information Journal. 2000; 15-23
- ✓ NOM-177-SSA1-1998 Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
- ✓ NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad.
- ✓ F. Llave (2008). Actualización en el manejo de los antidiabéticos orales en Atención Primaria. Medicina de Familia, 8, 42-55.
- ✓ Food and Drug Administration. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, Abril, 2013.
- ✓ Food and Drug Administration. Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics, Abril, 2013.
- ✓ World Health Organization 2000, General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. Junio 2013.
- ✓ European Medicines Agency, Guideline on specifications: test procedures and acceptance criteria for herbal substances, herbal preparations and herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products. Junio 2013.

- ✓ Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos, CCAYAC-P-058, 2011
- ✓ S. Cristians, (2009). Investigación farmacológica y química de las hojas de *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock (Rubiaceae): Una contribución para la elaboración de su monografía tipo OMS. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
- ✓ S. Cristians, (2013). Parámetros de calidad, seguridad y eficacia de las infusiones de hojas y corteza de *Hintonia latiflora* (Sessé et Mociño ex DC.) Bullock y *H. standleyana* Bullock (Rubiaceae): un enfoque al desarrollo de preparados fititerapéuticos. Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias Biológicas. UNAM.
- ✓ M. Julián de la Cruz. "Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para la valoración del 5-O-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-metoxi-3'4'-dihidroxi-4-fenilcumarina en la infusión de *Hintonia latiflora* (Rubiaceae)". Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).