

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



OPTIMIZACION Y VALIDACION DE UN METODO
ANALITICO POR CLAR FASE REVERSA PARA EL
ANALISIS DE PEROXISOMICINAS A₂ A₃ E
ISOPEROXISOMICINAS A₁ Y A₂

POR

I.B.Q. AMADOR OSORIO PEREZ

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
Química Analítica Biomédica

Marzo, 1998

TM

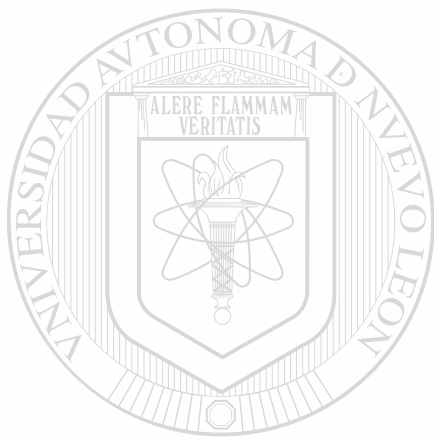
QP981

.K37

O7

1998

c.1



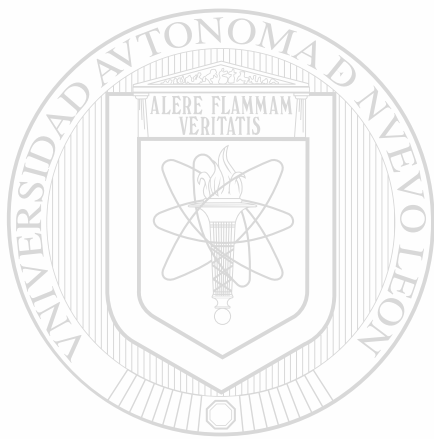
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

0089-02460
Retenido



UANL

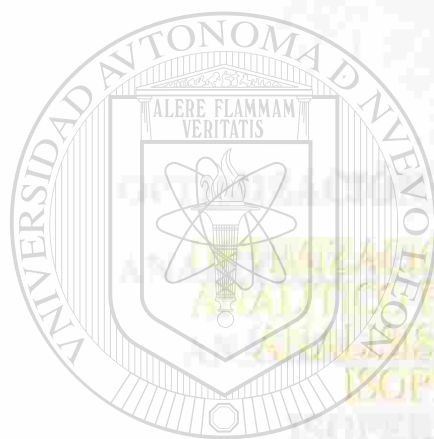
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA
FACULTAD DE MEDICINA



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
POR

LB.Q. AMADOR OSORIO FÉREZ

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en
Química Analítica Biomédica

Marzo, 1998

Marzo, 1998

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO
ANALÍTICO POR CLAR FASE REVERSA PARA EL
ANÁLISIS DE PEROXISOMICINAS A2, A3 E
ISOPEROXISOMICINAS A1 Y A2.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

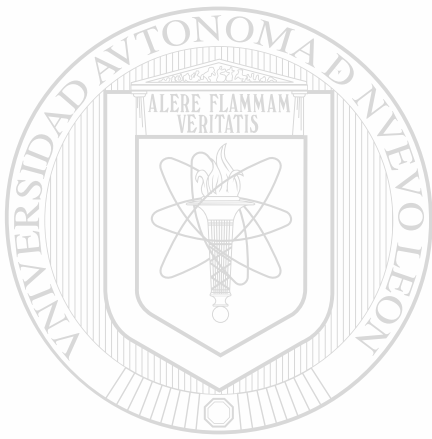
Por DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

I.B.Q. AMADOR OSORIO PÉREZ

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Especialidad en
Química Analítica Biomédica

Marzo, 1998

TM
QP981
.K37
07
1998

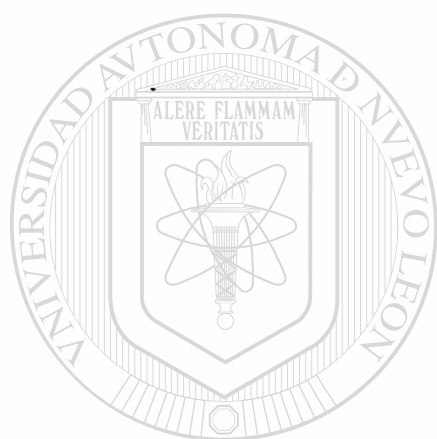


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



"Todo se mueve"

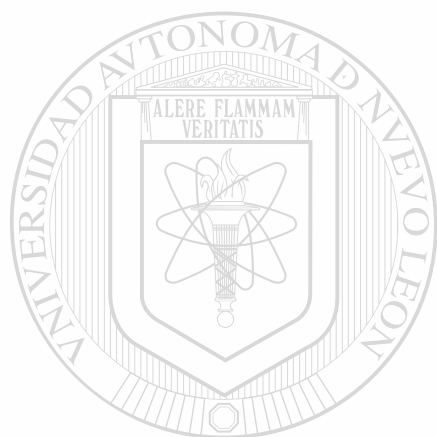
Ley de la Dialéctica

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN




DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



(77198)

**OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR CLAR
FASE REVERSA PARA EL ANÁLISIS DE PEROXISOMICINAS A1, A2 E
ISOPEROXISOMICINAS A1 Y A2**

Aprobación de la Tesis:



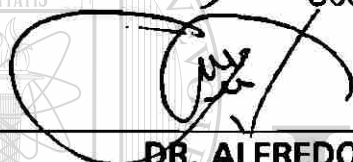
DRA. NOEMÍ WAKSMAN DE TORRES

Presidente



M.C. LIDIA RUNIA NACCHA TORRES

Secretario



DR. ALFREDO PIÑEYRO LÓPEZ

1er. Vocal



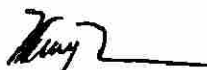
M.C. MA. DE LA LUZ SALAZAR CAVAZOS

2do. Vocal



M.C. VERÓNICA MAYELA RIVAS GALINDO

3er. Vocal



Dr. med. MA. ESTHELA MORALES PEREZ

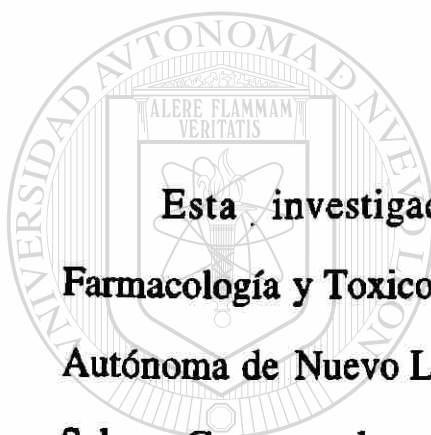
Secretario Académico del Área Básica

Subdirección de Investigación y Estudios de Posgrado

**Optimización y Validación de un Método Analítico por CLAR Fase
Reversa para el Análisis de Peroxisomicinas A1, A2 e
Isoperoxisomicinas A1 y A2**

Presentado por IBQ Amador Osorio Pérez

**Esta investigación fue realizada en el Departamento de
Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad
Autónoma de Nuevo León bajo la asesoría de la M. C. María de la Luz
Salazar Cavazos y la coasesoría de la Dra. Noemí Waksman Minski.**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**M. C. María de la Luz Salazar Cavazos
Asesor de Tesis**

**Dra. Noemí Waksman Minski
Co-Asesor de Tesis**

Agradecimientos

A Dios

Por acompañarme siempre

A mi madre

Por su generoso amor sincero

A Adriana, Adridel y Bohr

Pacientes y amorosos esperan día con día mi retorno a casa

A la M. C. María de la Luz Salazar Cavazos

Sus enseñanzas y consejos como asesora y maestra permitieron que mis estudios de maestría se ubicaran en una dimensión más profunda

A la Dra. Noemí Waksman de Torres

La valiosa oportunidad que me dio de estudiar en este postgrado, su desinteresado apoyo y sus enseñanzas la hacen aparecer ante mis ojos como un gigante

Al Dr. Alfredo Piñeyro López

A quien guardo un profundo respeto

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

Su ayuda económica hizo posible el desarrollo de mis estudios de posgrado

A mis Hermanos: Francisca, Paola, Delfina, Jesús, Alberto, Sabino, Guadalupe, Rosario, Diego, Hilario, José Juan, y sus respectivas Familias

Bastión y apoyo de mis valores culturales y morales

A la Universidad Autónoma de Sinaloa,

Escuela de Biología y al SUNTUAS-Académicos

Mi deber ser académico y profesional

A Santiago Elenes Buelna

Por su invaluable ayuda y apoyo

A Bañuelos, Moreno, Bertha, Fong, Ayala, Héctor, Mario, Sicaños, Esthela, Edith y todos mis demás compañeros de la Escuela de Biología

Por distinguirme con su amistad

A la Universidad Autónoma de Nuevo León,

a la Facultad de Medicina y al Departamento de Farmacología

Por albergarme en su seno

A la M. C. Verónica Rivas Galindo

Además de brindarme su amistad sincera, sus aportaciones y explicaciones permitieron mejorar de manera importante mi trabajo

A la M. C. Lidia Runia Naccha
Por sus valiosos comentarios, sugerencias y enseñanzas

A la Dra. Mirthala Moreno
y a todos mis Maestros
Por todas sus enseñanzas

Dra. Esthela Morales Pérez
Por todas sus consideraciones

Dra. Herminia Martínez
Con todo mi respeto

A la Profra. Juana María Castillo
Siempre atenta y gentil

A Adolfo Caballero, Rosalba Ramírez, Gloria Benavides,
José Cabriales y Efraín Gómez
Amigos entre los amigos y como amigos son amigos

A Lucy Ceniceros e Ivonne Carrera
Su ayuda permitió sobrepasar escollos en la
realización de mi trabajo experimental

A Marco Antonio Flores y Rigoberto Vargas
Por su valiosa ayuda, especialmente en lo que tuvo que ver con el uso
de la computadora

Magdalena Gómez, Adriana Ibarra, Laura Escobar,
Marco Bernal y Arturo Longoria

Las consideraciones que me otorgaron cuando trabajé en sus laboratorios
hablan de su excelente calidad de Universitarios

Biol. Guillermo Flores Briseño
Sus orientaciones tienen para mí un alto significado

Ricardo Salazar, Victor Tamez, Rosario Torres,
Martha Salazar, René García, Mayté y Rubén Luján
Siempre atentos, siempre amigos

Dr. Lorenzo Heyer
Por sus comentarios, sugerencias y recomendaciones

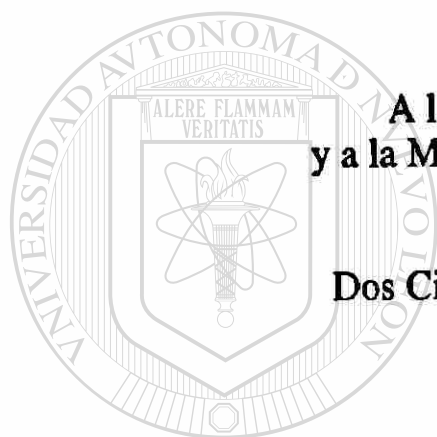
Blanca González y Norma Sánchez
Solo trato amable y cordial el que siempre me dispensaron

Jaime Castañeda, Jaime Alonso, Roberto Villarreal
y a todos los Trabajadores Administrativos y de Intendencia
del Departamento de Farmacología
Día con día el trato que me han conferido
ha sido el de verdaderos compañeros

Dedicada

**A la Dra. Noemí Waksman Minski
y a la M.C. María de la Luz Salazar Cavazos**

Dos Científicos Universitarios Ejemplares



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA DE CONTENIDO

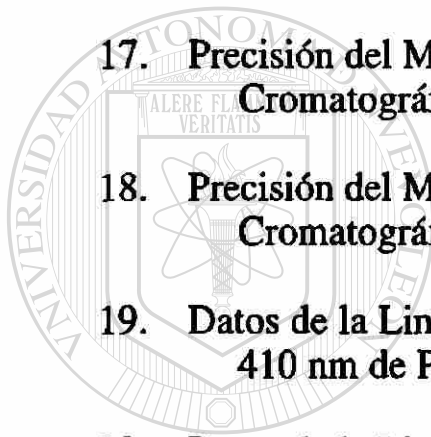
Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Métodos para la Determinación de Antracenas Diméricas.	10
1.2 Perspectivas	11
Objetivo General	14
Objetivos Específicos	15
2. MATERIAL Y MÉTODOS	16
2.1 Material y Equipo	16
2.2 Métodos	17
2.2.1 Extracción y Purificación de Peroxisomicinas	17
2.2.2 Optimización de las Condiciones de Separación	17
2.2.3 Determinación de la Precisión	19
2.2.4 Determinación de la Linealidad	21
2.2.5 Determinación de los Límites de Detección y Cuantificación	21
2.2.6 Determinación de la Selectividad de las Señales	23
2.2.7 Determinación de la Robustez del Método	24
3. RESULTADOS	27
3.1 Extracción y Purificación de las Peroxisomicinas de Interés	27

3.2	Optimización de la Separación Analítica	27
3.3	Precisión del Sistema y del Método	33
3.4	Linealidad	35
3.5	Límites de detección y Cuantificación	56
3.5.1	Por el Método Propuesto por la IUPAC	56
3.5.2	Utilizando el Error Estándar	57
3.5.3	Por el Método Recomendado por la USP XXII	58
3.6	Selectividad de las Señales	59
3.7	Robustez del Método	66
4.	DISCUSIÓN	71
4.1	Optimización de la Separación	71
4.2	Precisión del Sistema y del Método	73
4.2.1	Precisión del Sistema	73
4.2.2	Precisión del Método	74
4.3	Linealidad	75
4.4	Límites de Detección y Cuantificación	75
4.5	Selectividad de las Señales	77
4.6	Robustez	77
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	79
5.1	Conclusiones	79
5.2	Recomendaciones	80
	REFERENCIAS GENERAL DE BIBLIOTECAS	82

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Porcentaje de Toxinas en Diferentes Especies del Género <i>Karwinskia</i> que Existen en el País	4
2.	Cuantificación del Porcentaje por CLAR de T 514 y T 496 en <i>K. humboldtiana</i> y <i>parvifolia</i>	4
3.	Correlación del Proceso de Descomposición de P A1 con el pH, Temperatura y Luz	9
4.	Tiempos de Retención por CLAR de Antracenas Diméricas de Extractos de <i>K. parvifolia</i>	11
5.	Diseño Experimental Elaborado a Partir de la Propuesta de Placket y Burman para Determinar la Robustez del Método Optimizado	24
6.	Diseño Utilizado para el Cálculo de la Influencia de los Cambios Efectuados en las Variables Sobre los Tiempos de Retención	25
7.	Condiciones Cromatográficas Optimizadas, Columna C18 de 5 μm	28
8.	Parámetros de Retención, Separación y Resolución Obtenidos con el Método Preestablecido	28
9.	Condiciones Cromatográficas Optimizadas, Columna C18 de 5 μm	29
10.	Condiciones Cromatográficas Optimizadas, Columna C18 de 3 μm	30
11.	Parámetros de Retención, Separación y Resolución Obtenidos con las condiciones optimizadas en C18, 5 μm	31

12.	Parámetros de Retención, Separación y Resolución Obtenidos con las Condiciones Optimizadas en C18, 3 μm	31
13.	Coeficientes de Deseabilidad	31
14.	Precisión del Sistema, Tiempos de Retención de las Señales Cromatográficas	33
15.	Precisión del Sistema, Áreas de las Señales Cromatográficas	33
16.	Precisión del Sistema, Alturas de las Señales Cromatográficas	34
17.	Precisión del Método, Áreas de las Señales Cromatográficas	34
18.	Precisión del Método, Alturas de las Señales Cromatográficas	34
19.	Datos de la Linealidad por Áreas a 269, 310 y 410 nm de PA2, P A1 y P A3	36
20.	Datos de la Linealidad por Áreas a 269, 310 y 410 nm de Isop A1 y A2	40
21.	Datos de la Linealidad por Alturas a 269, 310 y 410 nm de PA2, PA1 y PA3	46
22.	Datos de la Linealidad por Alturas a 269, 310 y 410 nm de Isop A1 y A2	50
23.	Desviación Estándar del Ruido a diferentes Longitudes de Onda	56
24.	Límites de Detección y Cuantificación por Áreas Utilizando el Método de la IUPAC	56
25.	Límites de Detección y Cuantificación por Alturas Utilizando el Método de la IUPAC	56
26.	Límites de Detección y Cuantificación por Áreas Utilizando Valores de Error Estándar	57



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

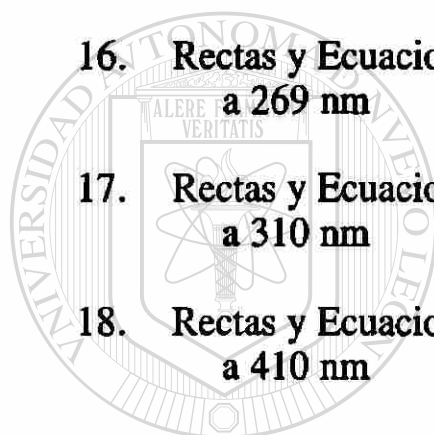
®

27.	Límites de Detección y Cuantificación por Alturas Utilizando Valores de Error Estándar	57
28.	Límites de Detección y Cuantificación por Áreas por el Método Propuesto por la USP XXII	58
29.	Límites de Detección y Cuantificación por Alturas por el Método Propuesto por la USP XXII	58
30.	Resolución Obtenida en los Experimentos de Robustez	66
31.	Tiempos de Retención (min) Obtenidos en los Experimentos de Robustez	66
32.	Orden de Elución de las Diferentes Peroxisomicinas Obtenido en el Ensayo de Robustez	67
33.	Valores de las Diferencias de los Promedios de los Tiempos de Retención Cuando se Aumentó y Cuando se Disminuyó el Valor de las Variables Experimentales	67
34.	Diferencias de los Promedios de los Tiempos de Retención Cuando se Aumentó el Valor de las Variables y los del Método Optimizado	68
35.	Diferencias Obtenidas con los Promedios de los Tiempos de Retención Cuando se Disminuyó el Valor de las Variables y los del Método Optimizado	68
36.	Promedio, Desviación Estándar y Coeficiente de Variación de los Tiempos de Retención en la Elución de las Antracenonas con el Método Optimizado	69
37.	Diseño Experimental para el Estudio del Impacto de la Temperatura y el % de Acetonitrilo Sobre la Separación Analítica	69
38.	Tiempos de Retención en el Estudio de la Temperatura y el % de Acetonitrilo sobre la Robustez	70

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructuras de Compuestos Antracénicos Descritas por Dreyer y cols. en 1974	2
2. Antracenas Caracterizadas por Waksman y Cols. de Extractos <i>K. parvifolia</i>	6
3. Antracenas Caracterizadas por Rivas, V. de Extractos de <i>K. parvifolia</i>	6
4. Proceso de Degradación de un Compuesto Derivado de Peroxisomicina A1, Estudiado por Arai y cols.	8
5. Diagrama del Procedimiento Utilizado por Rivas, V., para la Obtención de las Peroxiso- micinas A1, A2, A3 e Isop A1 y A2	18
6. Gráficas para el Cálculo del Coeficiente de Deseabilidad	20
7. Cromatograma de la Mezcla de Estándares de Peroxisomicinas Obtenido con las Condiciones del Método Preestablecido	28
8. Cromatograma Obtenido con las Condiciones de Elución Optimizadas en Columna de 5 μm	29
9. Cromatograma Obtenido con las Condiciones de Elución Optimizadas en Columna de 3 μm	30
10. Cromatogramas Obtenidos con las Condiciones: Preestablecidas, Optimizadas en Columna de 5 y de 3 μm	32

11.	Rectas y Ecuaciones de Regresión por Áreas de P A2	37
12.	Rectas y Ecuaciones de Regresión por Áreas de P A1	38
13.	Rectas y Ecuaciones de Regresión por Áreas de P A3	39
14.	Rectas y Ecuaciones de Regresión por Áreas de Isop A1	41
15.	Rectas y Ecuaciones de Regresión por Áreas de Isop A2	42
16.	Rectas y Ecuaciones de Regresión por Áreas a 269 nm	43
17.	Rectas y Ecuaciones de Regresión por Áreas a 310 nm	44
18.	Rectas y Ecuaciones de Regresión por Áreas a 410 nm	45
19.	Rectas y Ecuaciones de Regresión por Alturas de P A2	47
20.	Rectas y Ecuaciones de Regresión por Alturas de P A1	48
21.	Rectas y Ecuaciones de Regresión por Alturas de P A3	49
22.	Rectas y Ecuaciones de Regresión por Alturas de Isop A1	51
23.	Rectas y Ecuaciones de Regresión por Alturas de Isop A2	52
24.	Rectas y Ecuaciones de Regresión por Alturas a 269 nm	53
25.	Rectas y Ecuaciones de Regresión por Alturas a 310 nm	54



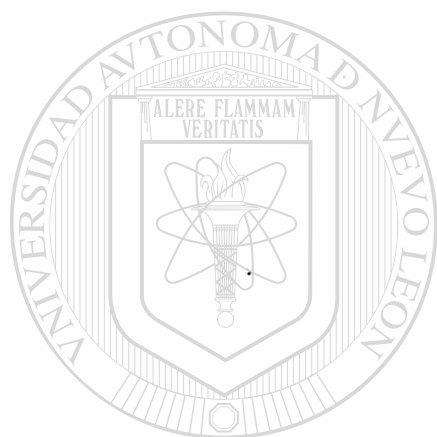
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS.

®

26.	Rectas y Ecuaciones de Regresión por Alturas a 410 nm	55
27.	Espectros UV-Vis de P A1, P A3 e Isop A1	60
28.	Análisis de Pureza de P A2	61
29.	Análisis de Pureza de P A1	62
30.	Análisis de Pureza de P A3	63
31.	Análisis de Pureza de Isop A1	64
32.	Análisis de Pureza de Isop A2	65



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

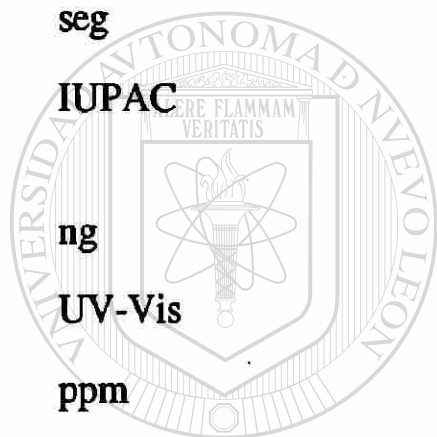


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
cols.	Colaboradores
K.	<i>Karwinskia</i>
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
Diast T 514	Diastereoisómero T514
P A1	Peroxisomicina A1
P A2	Peroxisomicina A2
P A3	Peroxisomicina A3
Isop A1	Isoperoxisomicina A1
Isop A2	Isoperoxisomicina A2
Com. per.	Comunicación Personal
nm	Nanómetro
C8	Fase Estacionaria con 8 Carbonos
C18	Fase Estacionaria con 18 Carbonos
R	Resolución
k'	Factor de Capacidad
α	Factor de Selectividad
mL	Mililitro
USP XXII	The United States Pharmacopea

t_R	Tiempo de Retención
W_{\tan}	Ancho de Banda por el Método de las Tangentes
min	Minuto
μm	Micrómetro
dst	Desviación Estándar
CV	Coefficiente de Variación
mAU	Miliabsorbancia
seg	Segundo
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
ng	Nanogramo
UV-Vis	Ultravioleta Visible
ppm	Parte por Millón
DMSO	Dimetilsulfóxido



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

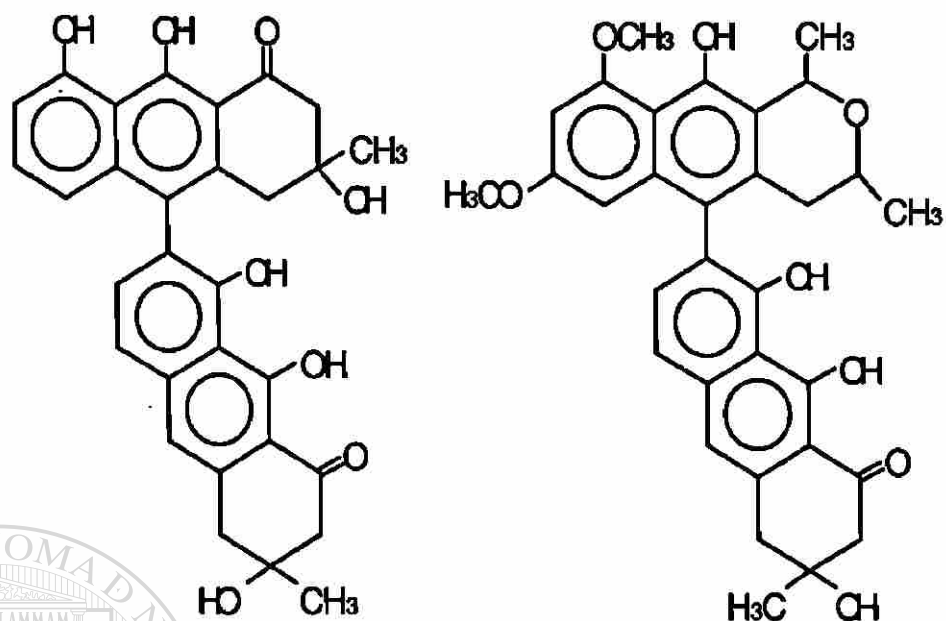


CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

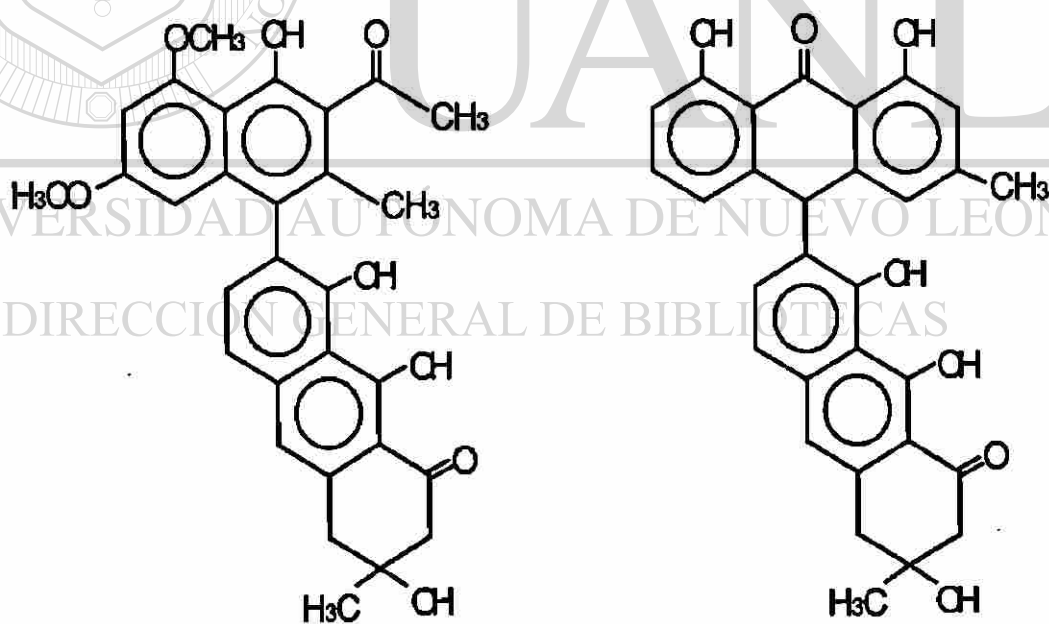
La Química de los Productos Naturales ha venido a constituir un soporte importante, entre otras actividades, para la búsqueda de compuestos cuya función química les permita actuar como fármacos en el combate de enfermedades que de alguna manera afectan al ser humano.

En esta área del conocimiento se realizan estudios en los frutos de las plantas de diversas especies del género *Karwinskia*, cuya toxicidad es conocida en nuestro país desde el siglo XVIII⁽¹⁾ ya que éstos contienen componentes que producen neurotoxicidad y lesiones como: necrosis del hígado⁽²⁾ y hemorragia pulmonar⁽³⁾. El género *Karwinskia* taxonómicamente se encuentra clasificado dentro del orden de las Rhamnaceas e incluye 15 especies, 12 de las cuales se han encontrado en México. Del fruto de *Karwinskia humboldtiana* Dreyer y cols. en 1974 aislaron y caracterizaron cuatro antracenas diméricas que denominaron por su peso molecular como T 514, T 544, T 516 y T 496 ⁽⁴⁾(Figura 1).



T 514

T 544



T 516

T 496

Figura 1. Estructuras de Compuestos Antracénicos Caracterizados por Dreyer y cols. en 1974.

De estos compuestos Bermudez, M.V. encontró^(5,6) que T 544 es la responsable de la neurotoxicidad del fruto y Piñeyro López, A. en 1994 demostró que la T 514 posee actividad citotóxica selectiva *in vitro* ⁽⁷⁾ . Su potencial uso como agente antineoplásico está en investigación en fase clínica I.

En este contexto se realizan en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, los estudios pertinentes para purificar y optimizar la obtención de T 514.

En estudios químicos realizados en extractos clorofórmicos de las especies del género *Karwinskia* que existen en el país se demostró, por medio de cromatografía de capa fina cuantificando con espectrofotometría por reflectancia, que *Karwinskia parvifolia* es una de las especies que contiene mayor cantidad de T 514 (Tabla 1). Se observó, también, que *K. parvifolia* tiene un porcentaje menos variable de T 514, siendo esto independiente de la región y época de recolección, y además que no contiene T 544, que es uno de los compuestos que interfiere en el proceso de purificación⁽⁸⁾.

La cuantificación posterior de T 514 realizada en frutos de *K. humboldtiana* y *K. parvifolia*, por CLAR⁽⁹⁾, confirmaron que la *K.*

parvifolia constituye entre estas dos especies la mejor matriz para la obtención de T 514 (Tabla 2).

TABLA 1

Porcentaje de Toxinas en Diferentes Especies del Género *Karwinskia* que Existen en el País

<i>Karwinskia</i>	Porcentaje		
	T 514	T 544	T 496
<i>subcordata</i>	1,07	1,51	0,98
<i>parvifolia</i>	1,02	-	1,58
<i>mollis</i>	0,95	1,33	1,08
<i>humboldtiana</i>	0,70	1,60	0,80
<i>calderonii</i>	0,70	0,75	2,00
<i>latifolia</i>	0,50	-	1,10
<i>tehuacana</i>	0,33	0,83	0,40
<i>umbellata</i>	0,05	0,75	0,50
<i>johnstonii</i>	-	2,10	0,70
<i>rzendowskii</i>	-	-	1,60
<i>venturae</i>	-	-	0,11

- No detectado.

Waksman y cols. *Rev. Latinoam. Quím.*, 20, 1989.

TABLA 2

Cuantificación del Porcentaje de T 514 y T 496 por CLAR en *K. humboldtiana* y *parvifolia*.

Especie	% T 514	% T 496
<i>K. humboldtiana</i>	0,12	0,50
<i>K. parvifolia</i>	0,43	2,00

Ramírez Durón, R., XXXII Congreso Mexicano de Química. 1996.

De extractos semipolares de frutos de *K. parvifolia* fueron obtenidas y caracterizadas por Waksman y cols.⁽¹⁰⁾ en 1992 tres antracenas diméricas: T 514, T 496 y Diastereoisómero T 514 (Figura 2). En 1995, Rivas G. V. aisló, purificó y caracterizó de extractos del fruto de la misma especie el compuesto descrito por Dreyer como T 516, así como otros dos compuestos no reportados en la literatura a los cuales denominó compuestos Y y X (Figura 3)⁽¹¹⁾; éstos se caracterizaron, el primero como otro diastereoisómero de T 514, y el último como isómero de posición de la T 514. Recientemente Rivas y cols. aislaron de la misma fuente otra antracena a la que denominó X': los estudios realizados con ésta indican que se trata también de un isómero de posición de T 514 (Rivas, V., com. pers.).

La T 514 fue renombrada como Peroxisomicina A1 en un esfuerzo por sistematizar la nomenclatura de estas sustancias, ya que se ha demostrado en estudios sobre peroxisomas de levadura de *Candida boidinii* y *Hansenula polymorpha*, que produce daño selectivo e irreversible⁽¹²⁾ sobre estos organelos celulares.

Estos compuestos presentan dos patrones definidos de espectros de dicroísmo circular: el primero de ellos con un efecto Cotton positivo a longitud de onda corta (270 nm) y un efecto Cotton negativo a longitudes de onda largas, en el segundo se observa el efecto Cotton

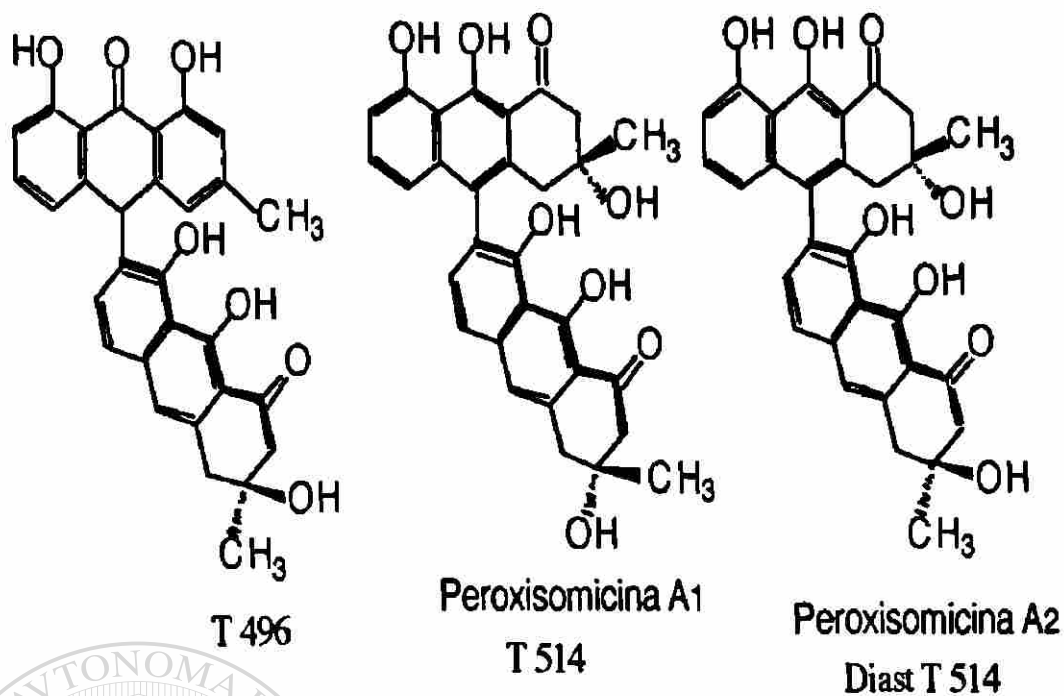


Figura 2. Antracenas caracterizadas por Waksman y cols. de extractos de fruto de *K. parvifolia*.

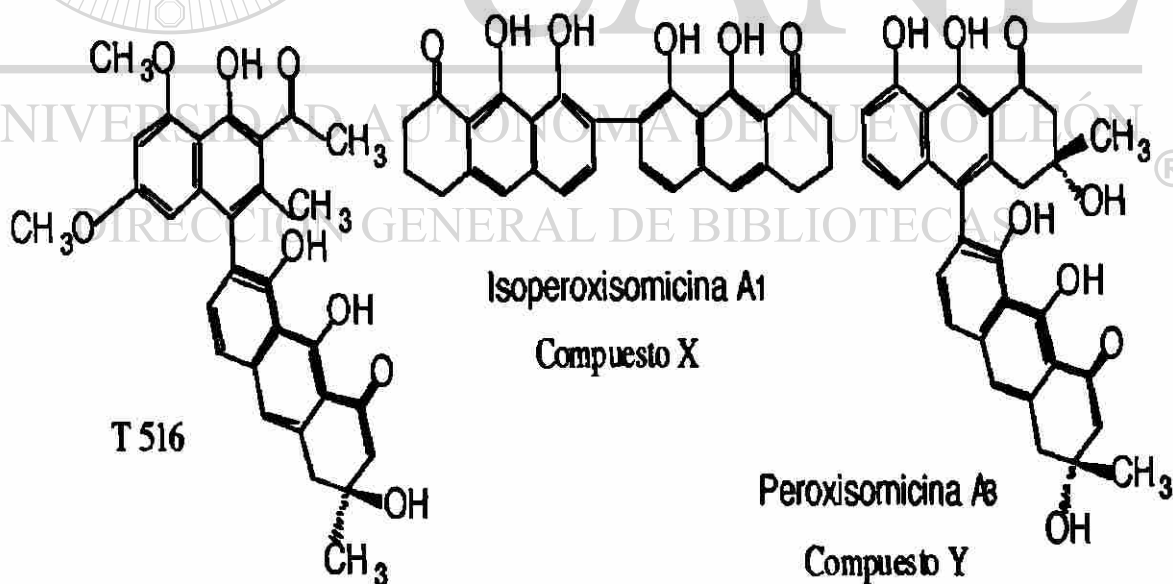


Figura 3. Antracenas Caracterizadas por Rivas, V. de Extractos de Fruto de *K. parvifolia*.

positivo a longitudes de onda largas y el efecto Cotton negativo a longitudes de onda corta. A las antracenonas que presentan el primero de los comportamientos espectrales se les clasifica como de tipo A y las que siguen el segundo de los patrones como del tipo B⁽¹³⁾. T 514, Diast T 514, compuesto Y, compuesto X y X' se clasifican de esta manera como del tipo A, denominándose en la actualidad como Peroxisomicinas A1 (P A1), Peroxisomicina A2 (P A2), Peroxisomicina A3 (P A3), Isoperoxisomicina A1 (Isop A1) e Isoperoxisomicina A2 (Isop A2) respectivamente, donde los números indican la secuencia en que han sido caracterizadas (Waksman, N., com. pers.)

La T 516 y la T 496 son las mismas antracenonas aisladas por Dreyer de *K. humboldtiana* y se les sigue llamando del mismo modo.

En lo que se refiere a la optimización del proceso de obtención de P A1, un problema fundamental lo constituye la descomposición que esta antracenona sufre durante su extracción y almacenaje. Las consecuencias de este fenómeno pueden considerarse importantes, ya que debido a éste la vida de anaquel y la pureza del compuesto mencionado disminuyen.

Uno de los estudios acerca de los productos de degradación de compuestos antracénicos, es la investigación realizada por Arai y cols. en 1977⁽¹⁴⁾. En la Figura 4 se pueden observar los resultados de este

trabajo, en donde se ve que se obtienen dos productos de oxidación (4 A y 4 B) a partir de una antracenona dimérica, T 544 (compuesto 1 en la Figura 4), que es obtenida de semillas de *K. humboldtiana*. El compuesto 2 es un derivado que se obtiene por deshidratación de la antracenona numerada como 1. Cuando una solución acuosa de metanol del compuesto 2 se colocó a temperatura de laboratorio en contacto con el aire por varios meses se formaron los productos 4 A y 4 B. Éstos son isómeros con una parte antraquinónica formada por la oxidación del sistema ABC y la formación de un nuevo centro quiral en el C 5'.

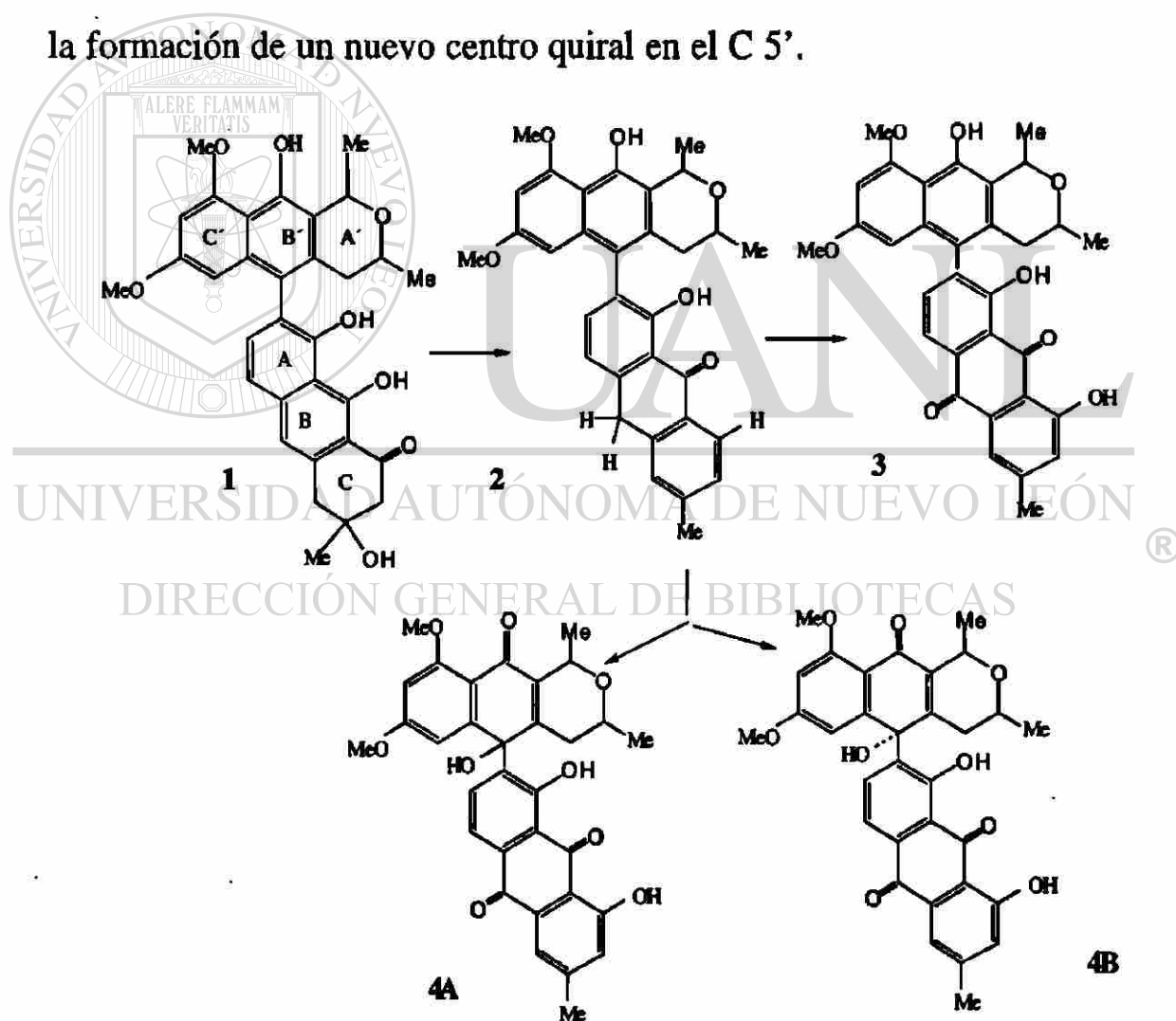


Figura 4. Proceso de Degradación, de una Antracenona Dimérica, T 544 Estudiado por Arai y cols.

En el Departamento de Farmacología y Toxicología, Martínez Villarreal, L., en 1990 demostró que P A1 es termolábil, sensible a la luz y al pH alcalino (Tabla 3)(15).

TABLA 3

Tiempo de Vida Media de P A1 en Relación al pH, Temperatura y Luz (Horas)

Condiciones Buffer	T 5 1 4					
	25 °C		37 °C		70 °C	
	Luz	Oscuridad	Luz	Oscuridad	Luz	Oscuridad
2.5	123	213	148	158	59	59
6.0	85	169	60	70	24	23
9.0	61	129	25	45	6.2	6.5
12.0	-	-	-	-	-	-

- No determinado

Martínez Villarreal, L., Tesis de Maestría, U.A.N.L., 1990.

La degradación de P A1 parece estar relacionada también con la cantidad de impurezas coextraídas del mismo proceso de separación en que se obtiene esta antracenona (Waksman, N., com. per.), ya que se ha observado que la degradación que ésta sufre es mayor en los lotes con más impurezas, lo cual sugiere que algún o algunos de los compuestos presentes al obtener P A1 participan en el proceso de degradación. Por otra parte, los estudios farmacocinéticos y toxicológicos derivados del interés de conocer el mecanismo de acción de P A1, han hecho necesario el contar con la metodología adecuada para cuantificarla.

1.1 Métodos Para la Determinación de Antracenonas Diméricas

Han sido reportados varios métodos para la determinación de compuestos antracenónicos.

Un método por cromatografía en capa fina utilizando densitometría por reflectancia fue desarrollado por Waksman y cols. en 1986⁽¹⁶⁾, para la cuantificación de algunas antracenonas. El límite de detección encontrado para P A1 fue de 0.1 mg. El método aunque preciso, puede considerarse que presenta algunas dificultades para cumplir con los requerimientos de sensibilidad, que en la actualidad se exigen en las investigaciones que se realizan de esta antracenona en el campo de la farmacocinética. La particular dificultad en la aplicación de la muestra de la técnica, hace que los resultados sean menos reproducibles en comparación con técnicas como la cromatografía de líquidos de alta resolución, con la que se obtiene un límite de detección del orden de los nanogramos.

La cromatografía de líquidos de alta resolución constituye una técnica apropiada para desarrollar los estudios en esa dirección debido a que los beneficios de su sensibilidad y capacidad para reproducir las condiciones experimentales son altas. En 1996, María de la Luz Salazar reportó un método por CLAR fase reversa para la separación, identificación y cuantificación de P A1⁽¹⁷⁾. En dicho trabajo se realizó la

separación de los principales componentes de tipo antracénicos presentes en extractos de frutos de *K. parvifolia* tanto en columna C8 como C18. En la tabla 4 se encuentran los tiempos de retención obtenidos para ellos. El orden de elución en ambas columnas fue diferente. En la columna C8 la Isop A1 tiene un tiempo de retención menor que la P A1 mientras que en la C18 la Isop A1 sale con un tiempo de retención posterior que P A1. Se ha observado además, en C18, que conforme la columna va envejeciendo la resolución entre Isop A1 y P A1 cambia de tal manera que llega un momento que se pierde, llegándose incluso a invertirse el orden de elución de estos dos compuestos.

TABLA 4
Tiempos de Retención por CLAR de Antracenas Diméricas
de Extractos de *K. parvifolia*.
(min)

Compuesto	Columna C 8	Columna C18
Peroxisomicina A2	1,66	1,64
Peroxisomicina A1	2,65	2,43
T 516	2,85	2,42
Isoperoxisomicina A1	2,55	2,85
Peroxisomicina A3	3,00	3,17
T 496	6,92	6,99

Salazar Cavazos, M. L.. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*,
 19 (9), 1391-1403 (1996)

1.2 Perspectivas

El análisis de pureza espectral, precisión, linealidad y sensibilidad

con CLAR con fase reversa C18 fueron establecidos para P A1, en el trabajo previamente mencionado⁽¹⁷⁾, por lo que la determinación de los mismos parámetros para las P A2, P A3, Isop A1 e Isop A2 son algunos de los objetivos de la presente investigación.

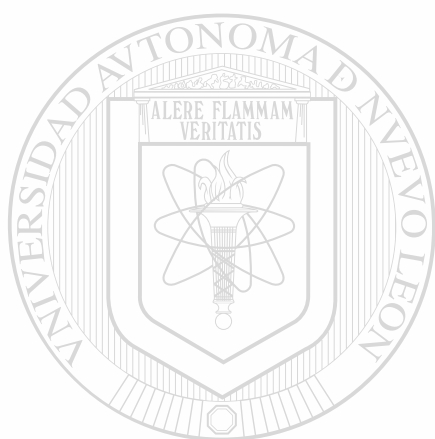
Los resultados obtenidos en la presente investigación se emplearán en el estudio, por CLAR, del proceso de descomposición que P A1 sufre durante su extracción y almacenaje, debido a que la posible aparición de productos secundarios puede complicar sus perspectivas como agente antineoplásico.

La correlación de P A2, P A3, Isop A1 e Isop A2 en este proceso se hará a partir de los resultados obtenidos en la investigación desarrollada.

Adicionalmente, el uso de los resultados de esta investigación tendrá aplicación en las actividades de otros Investigadores del Departamento de Farmacología que estudian las variables que afectan la producción *in vivo* de P A1 y en donde se incluye la cuantificación de las antracenas descritas en la presente investigación.

En el presente estudio trabajamos en el mejoramiento de los parámetros de separación y resolución logrados por CLAR fase reversa, y se determinó también la selectividad, linealidad, precisión, exactitud,

sensibilidad y robustez para el análisis de P A2, P A3, Isop A1 e Isop A2 que servirán como punto de partida para estudiar la relación de estos compuestos con el proceso de descomposición señalado de P A1.



UANL

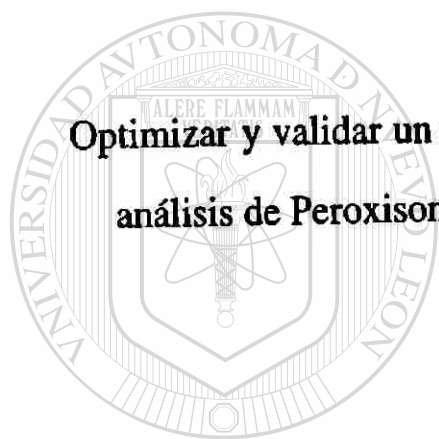
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

OBJETIVO GENERAL

Optimizar y validar un método analítico por CLAR fase reversa para el análisis de Peroxisomicinas A2, A3 e Isoperoxisomicinas A1 y A2.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Extraer y purificar P A1, P A2, P A3, Isop A1 e Isop A2 a partir de extractos semipolares de *Karwinskia parvifolia* .
 - 2.- Mejorar los parámetros de retención, separación y resolución, obtenidos del método preestablecido.
 - 3.- Determinar la precisión del sistema y del método de la cuantificación por CLAR de P A1, P A2, P A3 e Isop A1.
 - 4.- Determinar la linealidad de las respuestas de las P A1, P A2, P A3, Isop A1 e Isop A2 separadas por CLAR.
 - 5.- Determinar los límites de detección y cuantificación del método para cada una de las antracenas diméricas anteriores.
-
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
- 6.- Determinar la selectividad de la señal obtenida para las P A1, P A2, P A3, Isop A1 e Isop A2 por CLAR fase reversa por medio de caracterización espectral y relaciones de absorbancia al utilizar el detector de arreglo de diodos.
 - 7.- Determinar la robustez del método variando condiciones de separación cromatográficas.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material y Equipo

Rotavapor Buchi protegido de la luz.

Cromatofolios AL de sílica gel 60 F 254.

Cromatoplasmas TLC sílica gel RP-18 Merck.

Columnas cromatográficas sílica gel 60.

Columnas Lobar Lichroprep RP-18.

Cromatógrafo HP 1090 con detector de arreglo de fotodiodos.

Columnas C 18, 100 X 2.1 mm, de 5 y 3 μm .

Aparato para puntos de fusión Electrothermal.

Baño de agua termostatzado.

Espectrómetro Beckman DU 7500 con arreglo de diodos.

Benceno, grado analítico.

Acetona, grado analítico.

Metanol grado CLAR.

Agua grado CLAR.

Acetonitrilo grado CLAR.

Ácido acético.

2.2 Métodos

2.2.1 Extracción y Purificación de Peroxisomicinas

Para la extracción y purificación de los compuestos antracénicos: P A1, P A2, P A3 e Isop A1 y A2 se siguió el método propuesto por Rivas Galindo, V. M.⁽¹¹⁾ (Figura 5). Para el control del proceso de purificación, las Peroxisomicinas obtenidas se sometieron a análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución.

2.2.2 Optimización de las Condiciones de Separación Analítica

Para la optimización de las condiciones de separación de PA1, PA2, PA3, Isop A1 e Isop A2 se partió del método ya preestablecido⁽¹⁷⁾ para la determinación de la peroxisomicina A1, en donde la separación se desarrolla en una columna C18 de 5 μm (100 x 2.1 mm) y se emplea un gradiente de elución por 10 min con un flujo de 0.4 mL/min utilizándose como eluentes: A = metanol ; B = acetonitrilo - agua - ácido acético (30:70:1.6).

Se probaron distintas condiciones de elución y se calcularon los valores de los parámetros de retención, separación y resolución, k' , α y R.

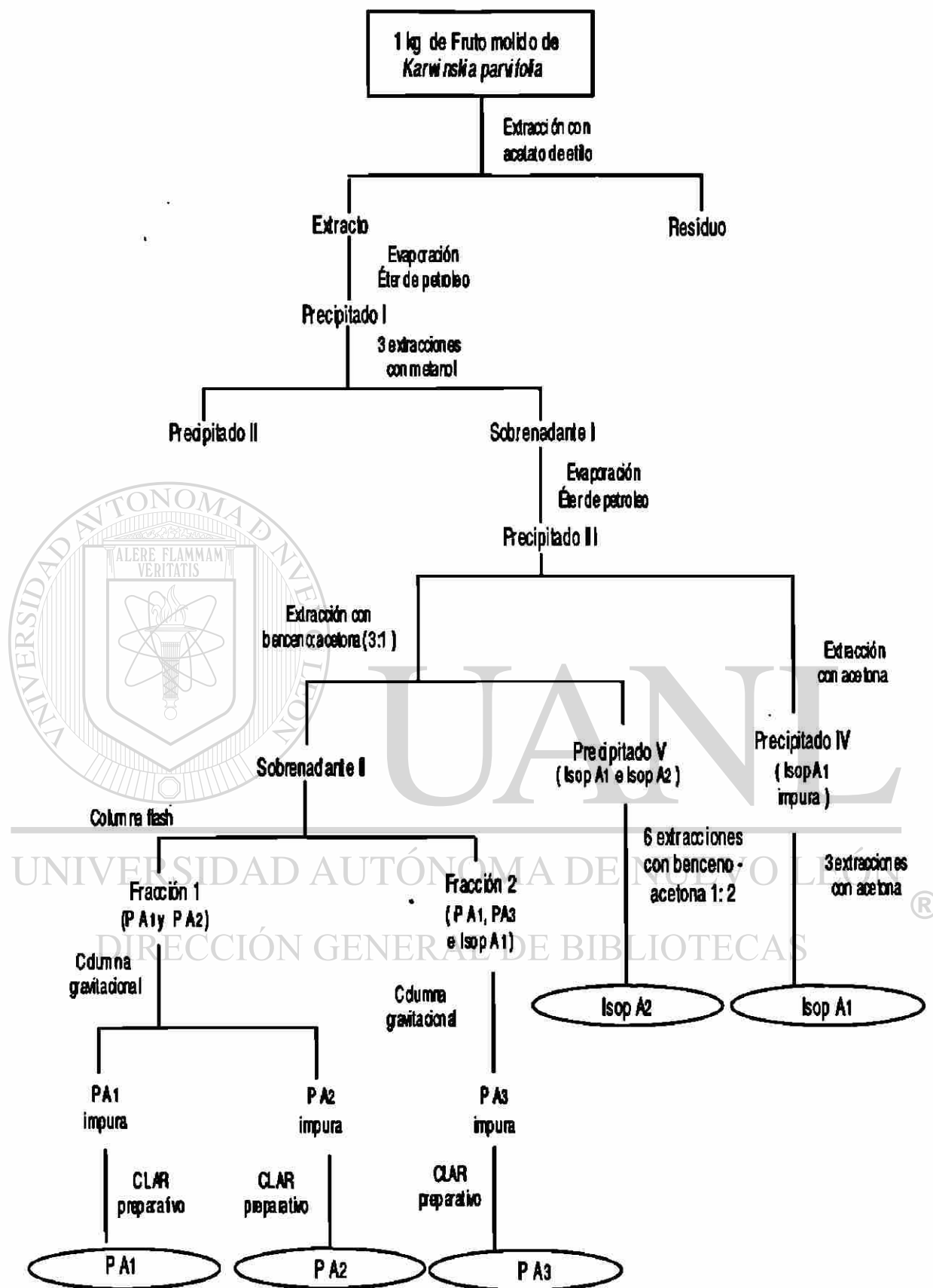


Figura 5. Diagrama del Procedimiento Utilizado por Rivas G., V. para la Obtención de P A1, P A2, P A3, Isop A1 e Isop A2.

Los cromatogramas obtenidos con las distintas pruebas se analizaron utilizando la metodología descrita por Hendrix⁽¹⁸⁾ para la optimización de sistemas con multirespuestas. A cada cromatograma se le calculó un coeficiente de deseabilidad con la sumatoria de los valores estandarizados, en una escala común de resolución y selectividad de todos los picos de interés, así como el factor de capacidad del primer pico de ellos. Para estandarizar los valores de los parámetros señalados se utilizaron las gráficas localizadas en la Figura 6, elaboradas tomando en cuenta los valores propuestos como óptimos para cada uno de los parámetros en la bibliografía respectiva⁽¹⁹⁾. Los valores de R , k' y α tomados de esta manera fueron 1.7, 2.0 y un intervalo de 1.3 a 2.0 respectivamente.

2.2.3 Determinación de la Precisión⁽¹⁹⁾

Para determinar la precisión del sistema, se evaluó el coeficiente de variación (CV) de seis inyecciones de una mezcla de estándares de P A1, P A2, P A3 e Isop A1. La precisión para Isop A2 no se determinó porque hasta este momento de la investigación no se disponía de su estándar completamente puro. Para determinar la precisión del método se evaluó la dispersión de las áreas y las alturas de los picos de interés desde el proceso de extracción, de cuatro muestras de *Karwinskia parvifolia*, utilizando acetato de etilo como solvente. Los extractos obtenidos de esta forma se resuspendieron en 1 mL de metanol, y se preparó a partir de esta solución

una dilución 1:100 para su inyección al cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

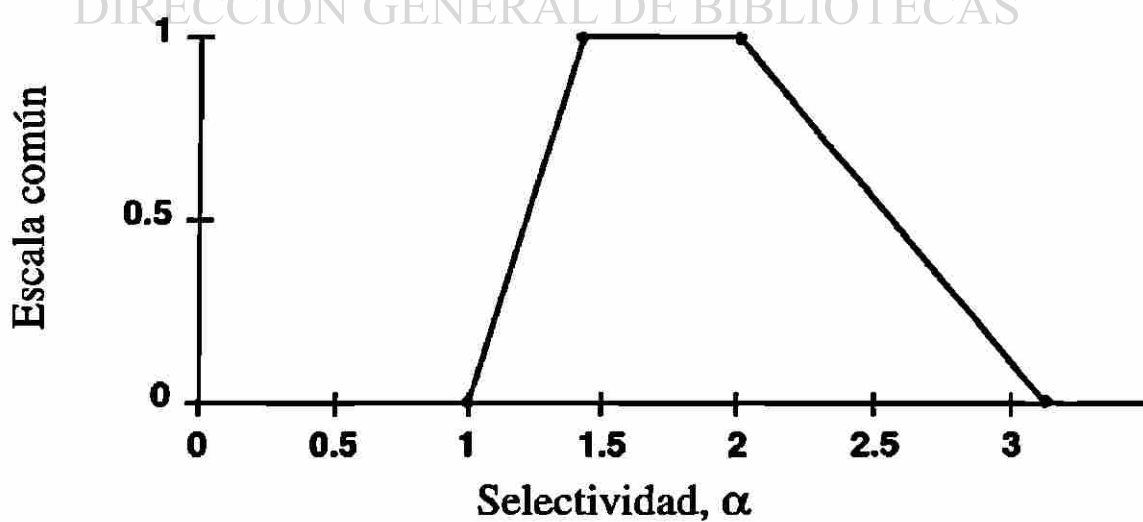
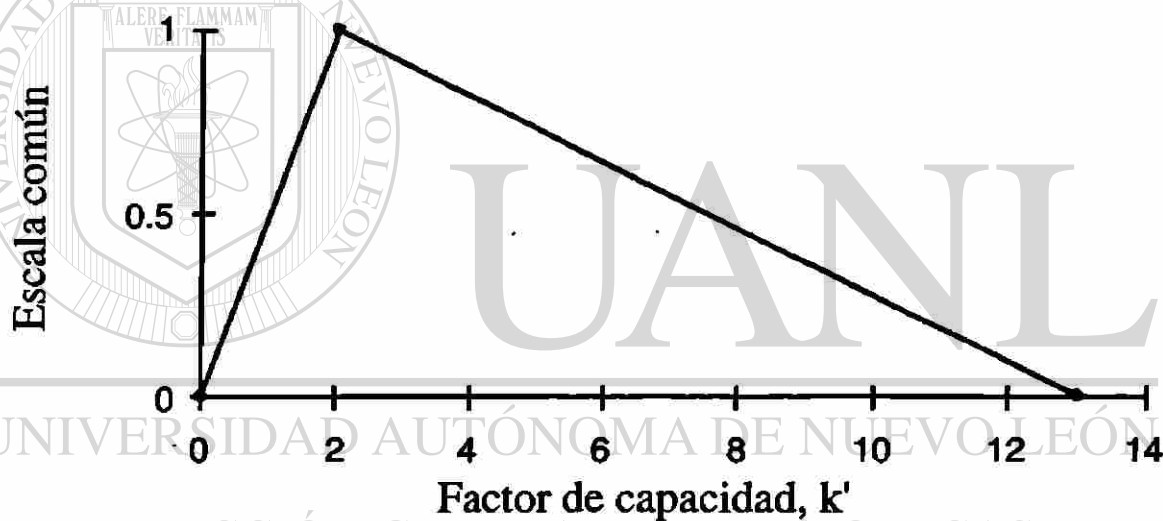
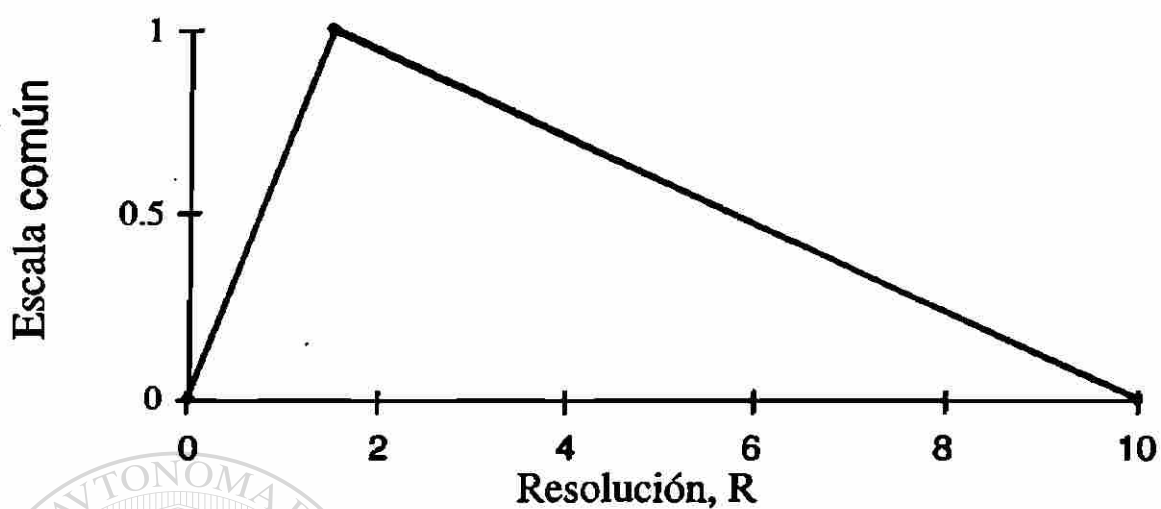


Figura 6. Gráficas para el Cálculo del Coeficiente de Deseabilidad.

2.2.4 Determinación de la Linealidad⁽¹⁹⁾

Se determinó la linealidad de la respuesta de estándares de P A1, A2, A3, Isop A1 y A2 tanto por áreas como por alturas a tres longitudes de onda: 269, 310 y 410 nm. El análisis de regresión de los valores de las respuestas obtenidas y el ajuste de las rectas se realizó con el programa Cricket Graph. El cálculo del error estándar de las señales de las respuestas obtenidas se determinaron con el programa Excel. Los estándares de P A1, A2, A3, Isop A1 y A2 se inyectaron en un intervalo de masa de 5 a 200 ng.

2.2.5 Determinación de los Límites de Detección y Cuantificación

Se determinaron los límites de detección y cuantificación, con el método optimizado, para P A1, A2, A3, Isop A1 y A2 a las longitudes de onda de 269, 310 y 410 nm por áreas y por alturas utilizando tres modelos. En el primero de ellos, propuesto por la IUPAC⁽²⁰⁾, la señal que puede ser adjudicable a la respuesta del analito se establece, con un nivel de confianza estadística deseado, utilizando las siguientes ecuaciones:

$$x_L = x'_B + ks_B$$

$$c_L = (x_L - x'_B) / m$$

Combinando ambas ecuaciones:

$$c_L = ks_B / m$$

Donde:

x_L = Respuesta de la señal del límite de detección o cuantificación en unidades de absorbancia.

c_L = Límite de detección o cuantificación en unidades de masa inyectada.

k = Estadístico. En este trabajo fue de 3 para el cálculo de los límites de detección, ya que este valor permite un nivel de confianza de 99.98 % de que x_L corresponda a la señal del analito para una medida basada sobre el error de la señal del blanco que sigue una distribución normal. Para el cálculo del límite de cuantificación el valor de k fue de 10.

s_B = Distribución estándar de la señal del blanco.

m = Pendiente de la recta obtenida en el análisis de regresión correspondiente.

En el segundo, se determinaron los límites de detección y cuantificación utilizando el error estándar⁽²¹⁾, calculado de los datos de linealidad con el programa Excel de Macintosh. La siguiente relación se aplicó para ello.

$$x_L = x_B + ks_B$$

Donde:

x_B y s_B = Intercepto y error estándar en el intercepto, con "y" de la recta de regresión.

$k = 3$ y 10 , para el límite de detección y cuantificación.

x_L = Respuesta de los límites de detección y cuantificación.

Los límites de detección y cuantificación, de acuerdo a este método se obtiene en unidades de masa inyectada con la ecuación de regresión respectiva.

El tercer modelo es el reportado por la USP XXII⁽¹⁹⁾. Utiliza para el cálculo de los límites de detección y cuantificación las siguientes relaciones matemáticas:

$$c_L = ((Y_{bl} + 3 S_{bl}) / b) (1/ n^{1/2})$$

$$c_L = ((Y_{bl} + 10 S_{bl}) / b) (1/ n^{1/2})$$

Donde:

Y_{bl} = Intercepto de la recta de regresión.

S_{bl} = Error estándar.

n = Medidas individuales para la recta de regresión.

c_L = Límites de detección en unidades de masa inyectada

b = Pendiente de la linealidad de la respuesta.

2.2.6 Determinación de la Selectividad de las Señales

Para la determinación de la selectividad de las señales⁽¹⁹⁾ se utilizó el análisis espectral mediante el empleo de un detector de arreglo de diodos. Se obtuvieron los espectros y se hizo también análisis de pureza espectral para cada una de las señales de las Peroxisomicinas estudiadas.

2.2.7 Determinación de la Robustez del Método

Para la determinación de la robustez del método se utilizó un diseño experimental para siete variables propuesto por Plackett y Burman⁽¹⁹⁾. Las variables estudiadas fueron: cantidad de ácido acético, flujo, tiempo de preparación-inyección, diámetro de partícula, temperatura, contenido de acetonitrilo y el ancho de banda espectral. El diseño experimental utilizado se encuentra en la Tabla 5; en todos los casos, se probaron valores de las variables que estuvieran por arriba y por abajo de los establecidos en el método optimizado.

TABLA 5

Diseño Experimental Elaborado a Partir de la Propuesta de Plackett y Burman para Determinar la Robustez del Método Optimizado

Variables	EXPERIMENTOS								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Partes de HAc	1,6	3,2	3,2	3,2	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0
Caudal (ml/min)	0,4	0,5	0,5	0,3	0,3	0,5	0,5	0,3	0,3
Horas de prep.-iny.	0,5	18	18	0	0	0	0	18	18
Diam. de part. (μm)	3,0	5	3	5	3	3	5	3	5
Temperatura (° C)	Amb.	35	25	25	35	35	25	25	35
% ACN	30	32	28	28	32	32	28	28	32
Ancho de banda	8	12	4	4	12	4	12	12	4

0 = Variables Establecidas en el Método Optimizado.

Se valoró el efecto de las variables sobre los tiempos de retención de cada antraceno estudiada⁽¹⁹⁾, se calcularon las diferencias de los

promedios de los tiempos de retención para cada parámetro en forma individual, como se observa en la Tabla 6.

TABLA 6

Diseño Utilizado para el Cálculo de la Influencia de los Cambios en las Variables Experimentales

Variables	TIEMPOS DE RETENCIÓN - tiempos de retención
Ácido acético	$1/4 (tr1+tr2+tr3+tr4) - 1/4 (tr5+tr6+tr7+tr8)$
Flujo (ml/min)	$1/4 (tr1+tr2+tr5+tr6) - 1/4 (tr3+tr4+tr7+tr8)$
Horas de prep.-iny.	$1/4 (tr1+tr2+tr7+tr8) - 1/4 (tr3+tr4+tr5+tr6)$
Diam. de part. (μm)	$1/4 (tr1+tr3+tr6+tr8) - 1/4 (tr2+tr4+tr5+tr7)$
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	
% ACN	$1/4 (tr1+tr4+tr5+tr8) - 1/4 (tr2+tr3+tr6+tr7)$
Ancho de banda de la radiación de entrada al monocromador	$1/4 (tr1+tr4+tr6+tr7) - 1/4 (tr2+tr3+tr5+tr8)$

TIEMPOS DE RETENCIÓN: Corresponden a los tR Obtenidos en Experimentos Donde el Valor de la Variable fue Superior que el del Método Optimizado

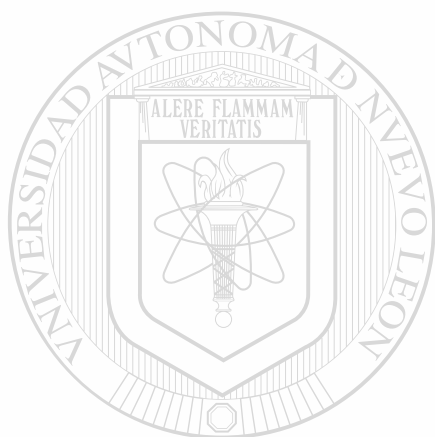
tiempos de retención: Corresponde a los tR Obtenidos en Experimentos Donde el Valor de la Variable fue Inferior al del Método Optimizado

Para decidir si un parámetro presentó influencia significativa sobre los tiempos de retención se compararon cada uno de los valores obtenidos como se indica en la Tabla 6 con el producto de la desviación estándar del estudio de precisión del método por la raíz cuadrada de 2.

Si I TIEMPO DE RETENCION -Tiempos de retención $I > S(2)^{1/2}$

la diferencia es significativa.

La influencia de las variables estudiadas se compararon también, siguiendo el método descrito, con los tiempos de retención obtenidos con el método optimizado.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Extracción y Purificación de Peroxisomicinas de Interés

Las antracenonas P A1, P A2, P A3, Isop A1 e Isop A2 obtenidas como parte del objetivo uno de esta investigación, se sometieron a análisis cromatográfico por cromatografía de líquidos de alta resolución para verificar su pureza y asegurar de esta manera su apropiada utilización como estándares en la investigación desarrollada.

3.2 Optimización de la Separación Analítica

Con las condiciones del método preestablecido, cuyos valores se encuentran en la Tabla 7, se obtuvo el cromatograma de la Figura 7 a partir de una mezcla de estándares de las Peroxisomicinas de interés. El orden de elución observado fue: P A2 - P A1 - Isop A1 - P A3. Los parámetros de retención, separación y resolución, k' , α , y R que se encontraron con estas condiciones aparecen en la Tabla 8.

TABLA 7

Condiciones Cromatográficas Prestablecidas, Columna C18 de 5 μm

Tiempo (min)	% A	% B	Flujo (ml/min)
4	65	35	0.4
6	100	0	0.4
8	100	0	0.4
10	65	35	0.4

A = Metanol ; B = Acetonitrilo:agua:ácido acético (30:70:1.6).

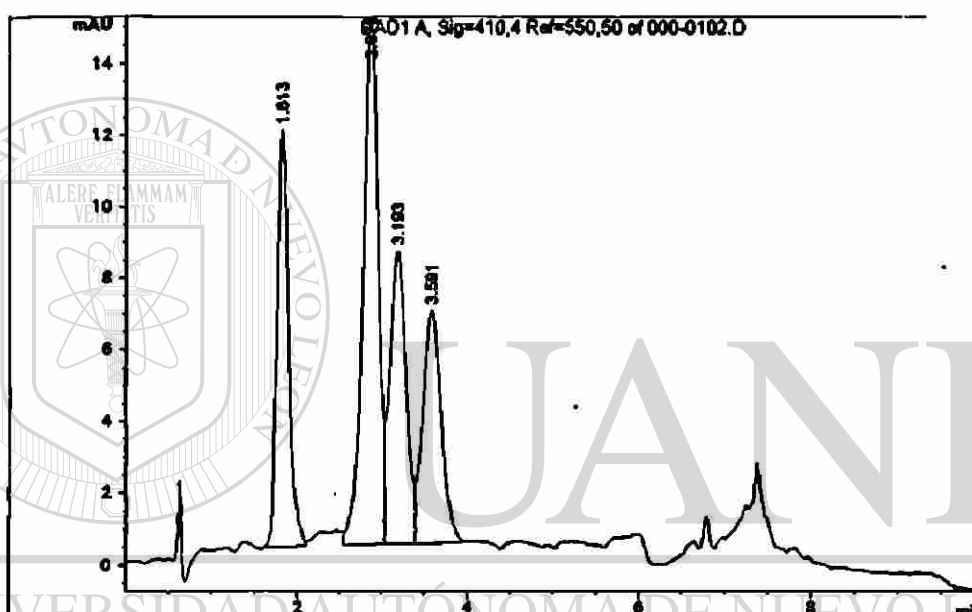


Figura 7. Cromatograma de la Mezcla de Estándares de Peroxisomicinas Obtenido con las Condiciones del Método Prestablecido.

TABLA 8

Parámetros de Retención, Separación y Resolución Obtenidos con el Método Prestablecido

Peroxisomicina	T_R (min)	W_{tan} (min)	k'	α	R
PA2	1,81	0,39			
PA1	2,87	1,01	1,20	3,08	1,04
Isop A1	3,19	0,72	1,45	1,21	0,37
PA3	3,60	1,16	1,75	1,21	0,42

Después del análisis de los distintos cromatogramas de prueba, se determinó que el cromatograma que aparece en la Figura 8 corresponde a la mejor separación analítica lograda con columna de 5 μm . Las condiciones de elución respectivas se encuentran en la Tabla 9. Los parámetros de retención, separación y resolución se encuentran en la Tabla 11.

TABLA 9

Condiciones Cromatográficas Optimizadas, Columna C18 de 5 μm

Tiempo (min)	% A	% B	Flujo (ml/min)
6	60	40	0.4
9	100	0	0.4
11	100	0	0.4
13	60	40	0.4

A = Metanol ; B = Acetonitrilo:agua:ácido acético (30:70:1.6)

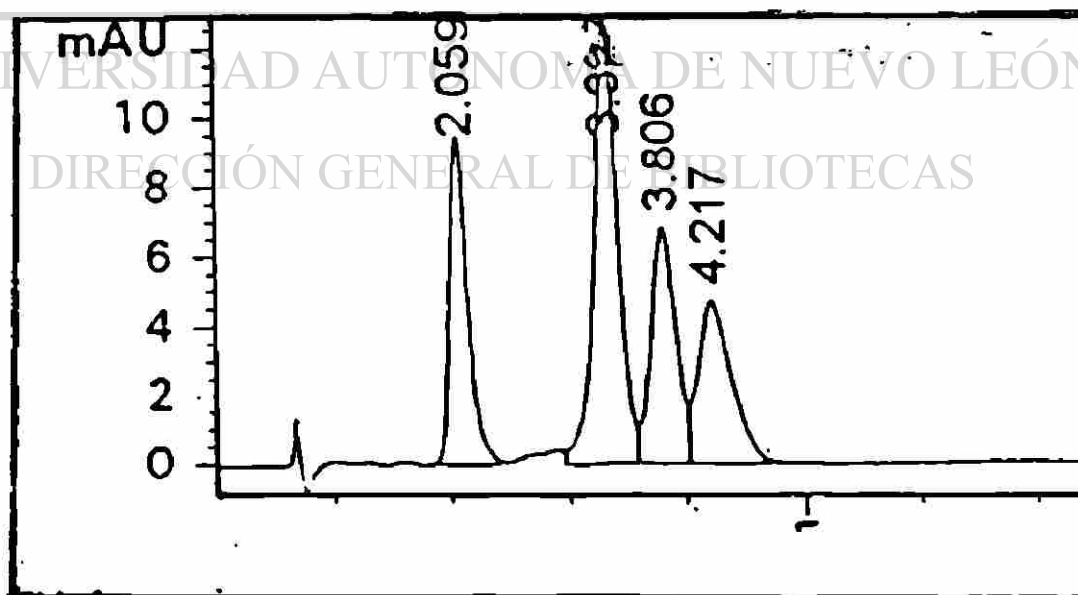


Figura 8. Cromatograma Obtenido con la Condiciones de Elución Optimizadas en Columna de 5 μm . 2,059 Corresponde a P A2; 3,327 a P A1; 3,806 a Isop A1; 4,217 a P A3.

Estas condiciones se probaron en columna de 3 μm y se obtuvo el cromatograma de la Figura 9; en la Tabla 10 se pueden observar las condiciones de elución utilizadas en esta separación analítica y los parámetros de retención, separación y resolución se pueden ver en la Tabla 12.

TABLA 10
Condiciones Optimizadas, Columna C18 de 3 μm

Tiempo (min)	% A	% B	Flujo (ml/min)
6	60	40	0.4
9	100	0	0.4
11	100	0	0.4
13	60	40	0.4

A = Metanol ; B = Acetonitrilo:agua:ácido acético (30:70:1.6).

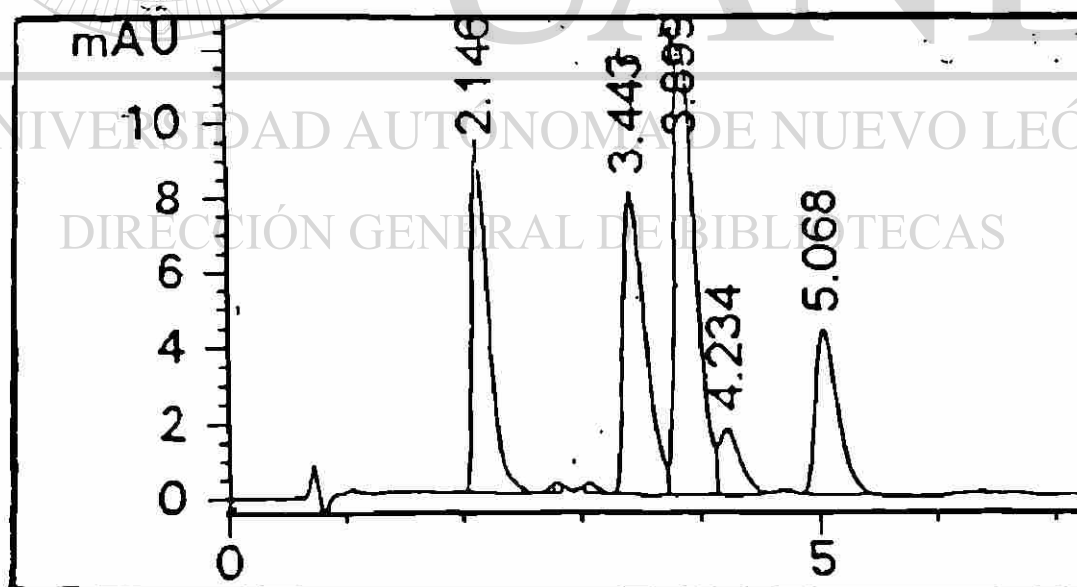


Figura 9. Cromatograma Obtenido con las Condiciones de Elución Optimizadas en Columna de 3 μm . El Tiempo de Retención de 2,146 Corresponde a P A2; 3,443 a Isop A1; 3,899 a P A1; 4,234 a Isop A2; 5,068 a P A3.

Los coeficientes de deseabilidad obtenidos de esta manera para las condiciones del método preestablecido, optimizado en columna de 5 y 3 μm se encuentran resumidos en la Tabla 13.

TABLA 11

Parámetros de Retención, Separación y Resolución Obtenidos con las Condiciones Optimizadas con Columna C18 de 5 μm

Compuesto	T_R (min)	W_{tan} (min)	k'	α	R
PA 2	2,059	0,33	2,07		
PA 1	3,327	0,47	3,96	1,91	3,17
Isop A1	3,806	0,53	4,68	1,18	0,96
PA 3	4,217	0,67	5,29	1,13	0,68

TABLA 12

Parámetros de Retención, Separación y Resolución Obtenidos con las Condiciones Optimizadas con Columna C18 de 3 μm

Peroxisomidina	T_R (min)	W_{tan} (min)	k'	α	R
PA 2	2,146	0,34	1,86		
Isop A1	3,443	0,48	3,60	1,93	3,16
PA 1	3,899	0,48	4,18	1,16	0,95
Isop A2	4,234	0,48	4,64	1,11	0,70
PA 3	5,068	0,41	5,76	1,24	1,86

TABLA 13

Coefficientes de Deseabilidad

Método	Coefficiente de deseabilidad
Preestablecido	2,56
Optimizado: C18, 5mm	4,59
Optimizado: C18, 3 mm	6,12

El coeficiente de deseabilidad teórico más alto, según el método utilizado en este estudio, es de 7.0

En la Figura 10 se presentan juntos los cromatogramas obtenidos con las condiciones iniciales, en la parte superior y las condiciones optimizadas en columnas de 5 y 3 μm en la parte central e inferior respectivamente.

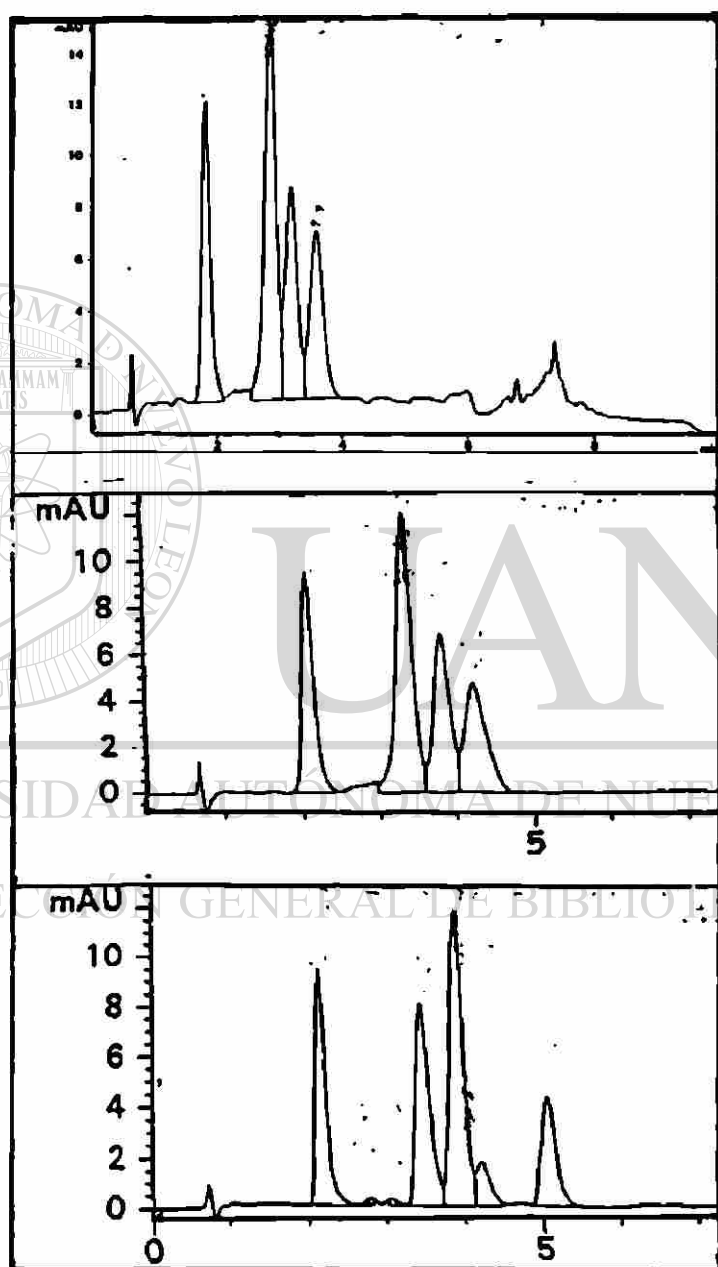


Figura 10. Cromatogramas Obtenidos con las Condiciones de Elución Prestablecidas, en la Parte Superior, con las Condiciones Optimizadas en Columna de 5 y 3 μm en el Centro y en la Parte Inferior Respectivamente.

3.3 Precisión del sistema y del método

En las Tablas 14, 15 y 16 se encuentran los datos de la precisión de los tiempos de retención, de las áreas y de las alturas respectivamente para evaluar este parámetro en el sistema. De la misma manera en las Tablas 17 y 18 se encuentran los valores de precisión de las áreas y de las alturas del método optimizado en columna de 3 μm .

TABLA 14

Precisión del Sistema, Tiempos de Retención de las Señales Cromatográficas

Compuesto	Intervalos de los tiempos de retención (min)	Promedio	dst	CV
PA2	1,91 - 2,29	2,11	0,21	10,20
Isop A1	3,20 - 3,93	3,60	0,32	9,00
PA1	3,53 - 4,26	3,88	0,36	9,24
PA3	4,68 - 5,56	5,13	0,41	8,08

n = 6

TABLA 15

Precisión del Sistema, Áreas de las Señales Cromatográficas

Compuesto	Intervalos de las áreas (mAU*seg)	Promedio	dst	CV
PA2	93,75 - 88,67	90,72	0,69	0,76
Isop A1	105,72 - 97,74	103,02	1,05	1,02
PA1	154,94 - 150,96	152,60	1,54	1,01
PA3	62,74 - 58,17	59,23	0,63	1,06

n = 6

TABLA 16

Precisión del Sistema, Alturas de las Señales Cromatográficas

Compuesto	Intervalos de las alturas (mAU)	Promedio	dst	CV
PA2	9,64 - 9,46	9,55	0,06	0,07
Isop A1	8,35 - 8,12	8,23	0,08	0,97
PA1.	13,12 - 12,79	12,98	0,12	0,95
PA3	4,60 - 4,40	4,48	0,07	1,47

n = 6

TABLA 17

Precisión del Método, Áreas de las Señales Cromatográficas

Compuesto	Intervalos de las alturas (mAU)	Promedio	dst	CV
PA2	65,57 - 58,09	63,40	5,80	9,15
PA1	102,61 - 84,91	91,62	8,34	9,10
Isop A1	53,87 - 47,31	50,17	2,86	5,70
PA3	32,16 - 26,91	29,12	2,20	7,55

n = 4

TABLA 18

Precisión del Método, Alturas de las Señales Cromatográficas

Compuesto	Intervalos de las alturas (mAU)	Promedio	dst	CV
PA2	6,54 - 5,22	5,72	0,60	10,48
PA1	7,78 - 6,21	6,87	0,74	10,78
Isop A1	3,94 - 3,45	3,68	0,22	5,98
PA3	1,84 - 1,65	1,74	0,08	4,58

n = 4

3.4 Linealidad

Se determinó la linealidad de las respuestas tanto por áreas como por alturas a las tres longitudes de onda seleccionadas. Se utilizó para ello el método optimizado en columna C18, 3 μm .

En las Tablas 19 y 20 se encuentran los valores de los promedios, desviación estándar y coeficientes de variación por áreas, en un intervalo de masa inyectada de 5 a 200 ng.

Las Figuras 11, 12, 13, 14 y 15 muestran la comparación de las respuestas de cada una de las Peroxisomicinas a las tres longitudes de onda.

En la Figura 16 se presenta una gráfica comparativa de la respuesta de todas las peroxisomicinas a la longitud de onda 269 nm y en las Figuras 17 y 18 se presentan las gráficas correspondientes, a las longitudes de onda de 310 y 410 nm.

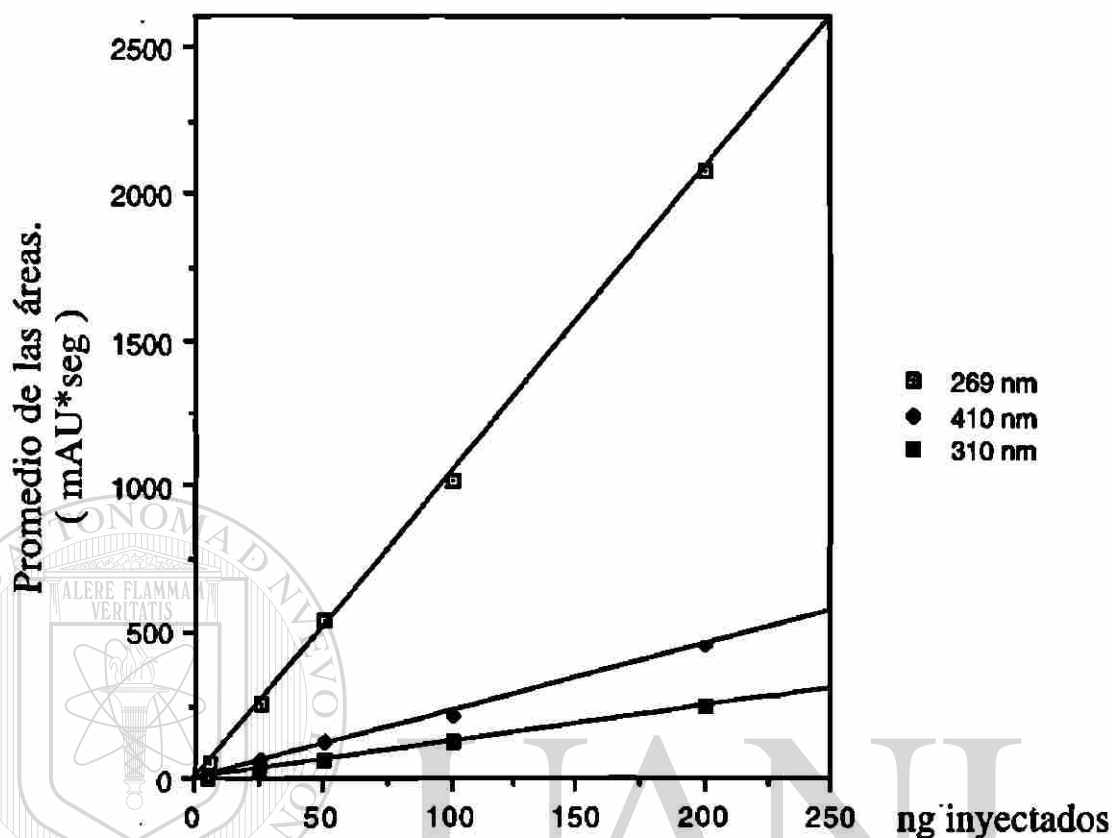
En las Tablas 21 y 22 y en las Figuras 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26 se presentan los resultados de linealidad correspondiente, por alturas.

TABLA 19

Promedio, Desviación Estándar y Coeficiente de Variación de las Áreas para las Peroxisomincinas A1, A2 y A3 a 269, 310 y 410 nm .
C18, 3 μm .

	ng	269 nm		310 nm		410 nm				
		Promedios ^a	dst	CV	Promedios ^a	dst	CV	Promedios ^a	dst	CV
P A2	5	46,6	7,7	16,5	4,4	0,4	9,6	9,3	0,7	8,0
	25	258,6	10,7	4,1	28,9	1,6	5,6	57,4	3,8	6,6
	50	543,6	18,0	3,3	59,5	7,5	12,7	113,9	7,5	6,6
	100	1011,0	10,9	1,1	118,3	3,8	3,2	216,6	1,1	0,5
	200	2081,0	39,7	1,9	246,7	1,3	0,5	457,2	1,0	0,2
P A1	5	45,1	0,6	1,4	6,5	0,6	9,8	9,8	1,2	11,9
	25	243,2	27,7	11,4	29,4	2,5	8,6	53,4	2,3	4,3
	50	524,9	26,2	5,0	67,4	1,0	1,5	121,8	4,6	3,8
	100	978,2	5,9	0,6	118,3	1,4	1,2	215,4	0,8	0,1
	200	2072,8	1,1	0,1	253,5	6,5	2,6	454,8	1,1	0,1
P A3	5	39,8	10,0	25,0	3,4	0,4	1,2	5,9	0,9	16,0
	25	211,0	2,3	1,1	21,0	2,5	12,0	44,7	5,1	11,5
	50	457,1	15,1	3,3	46,1	3,0	6,5	96,1	3,5	3,6
	100	828,0	2,8	0,1	89,5	5,4	6,1	173,5	3,9	2,3
	200	1784,2	5,5	0,1	184,5	1,0	0,1	381,4	0,9	0,1

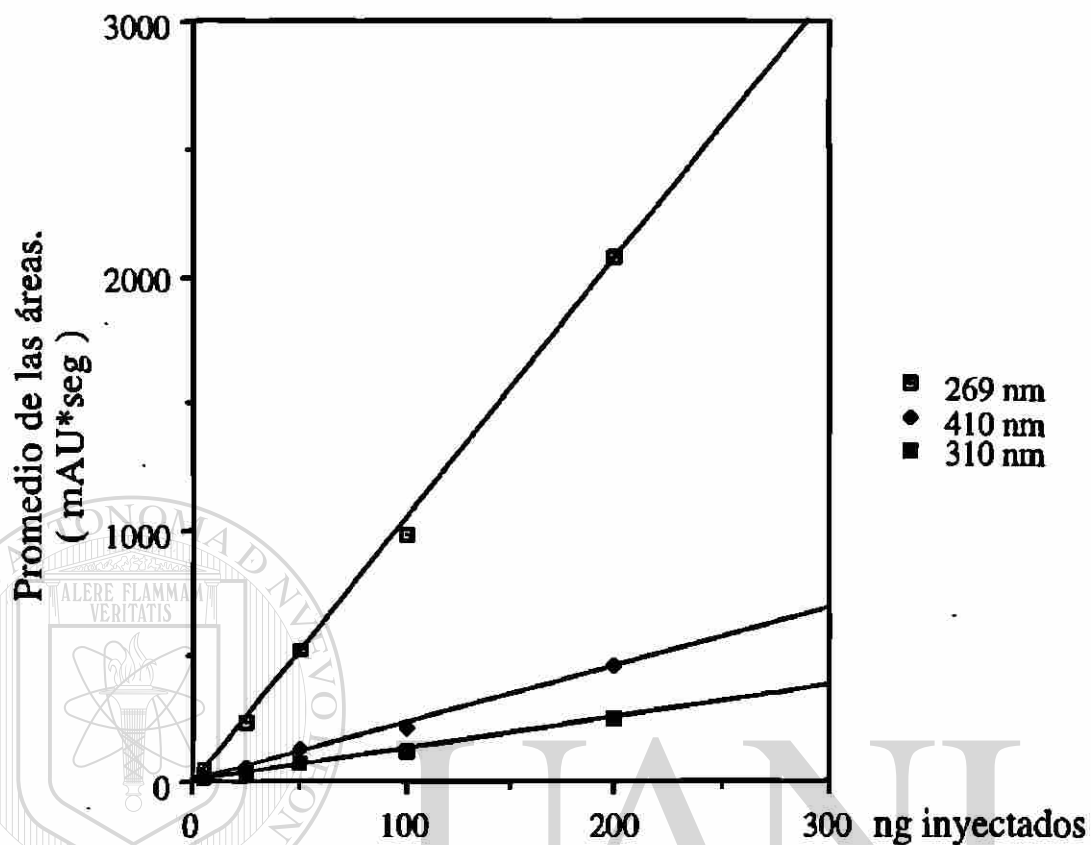
a = mAU*seg



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

nm	Ecuaciones de regresión	R ²
269	$Y = 0,1 + 10,37 X$	0,999
410	$Y = -2,4 + 2,28 X$	0,999
310	$Y = -2,7 + 1,24 X$	1,000

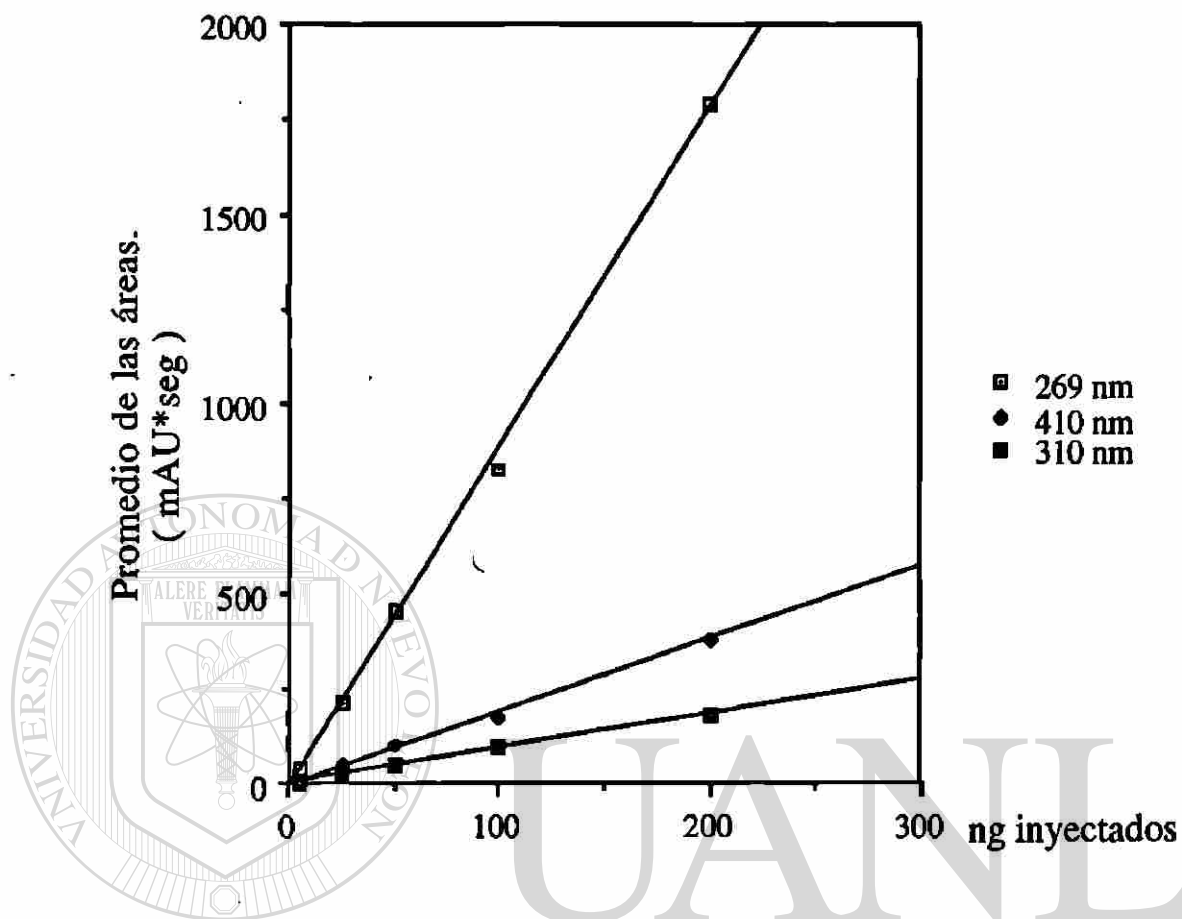
Figura 11. Linealidad y Ecuaciones de Regresión Obtenidas por Áreas de las Señales Cromatográficas de P A2 a las Diferentes Longitudes de Onda.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

nm	Ecuaciones de regresión	R ²
269	$Y = -14,0 + 10,35 X$	0,999
410	$Y = -1,1 + 2,28 X$	0,998
310	$Y = -0,7 + 1,24 X$	0,998

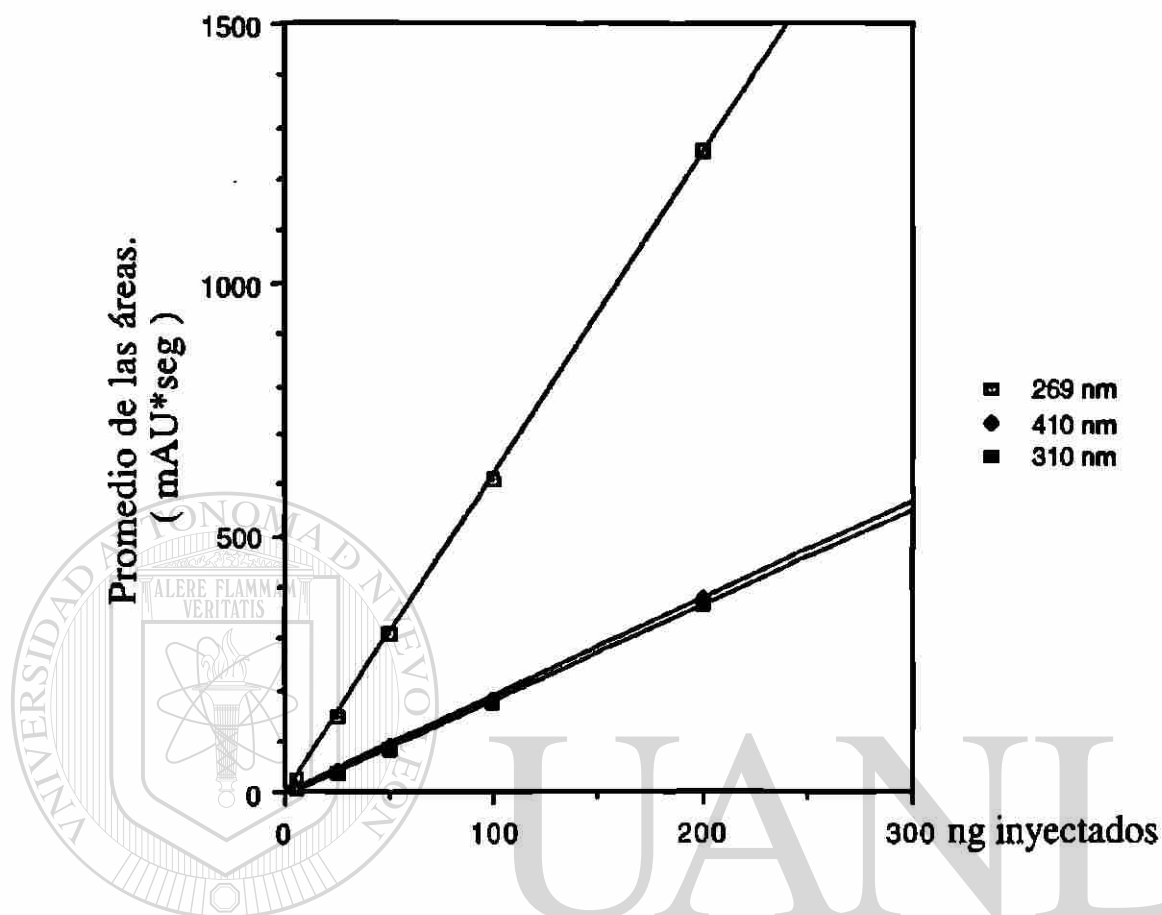
Figura 12. Linealidad y Ecuaciones de Regresión Obtenidas por Áreas de las Señales Cromatográficas de P A1 a las Diferentes Longitudes de Onda.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

nm	Ecuaciones de regresión	R ²
269	$Y = -11,3 + 8,88 X$	0,998
310	$Y = -4,5 + 1,91 X$	0,998
410	$Y = -1,6 + 0,93 X$	1,000

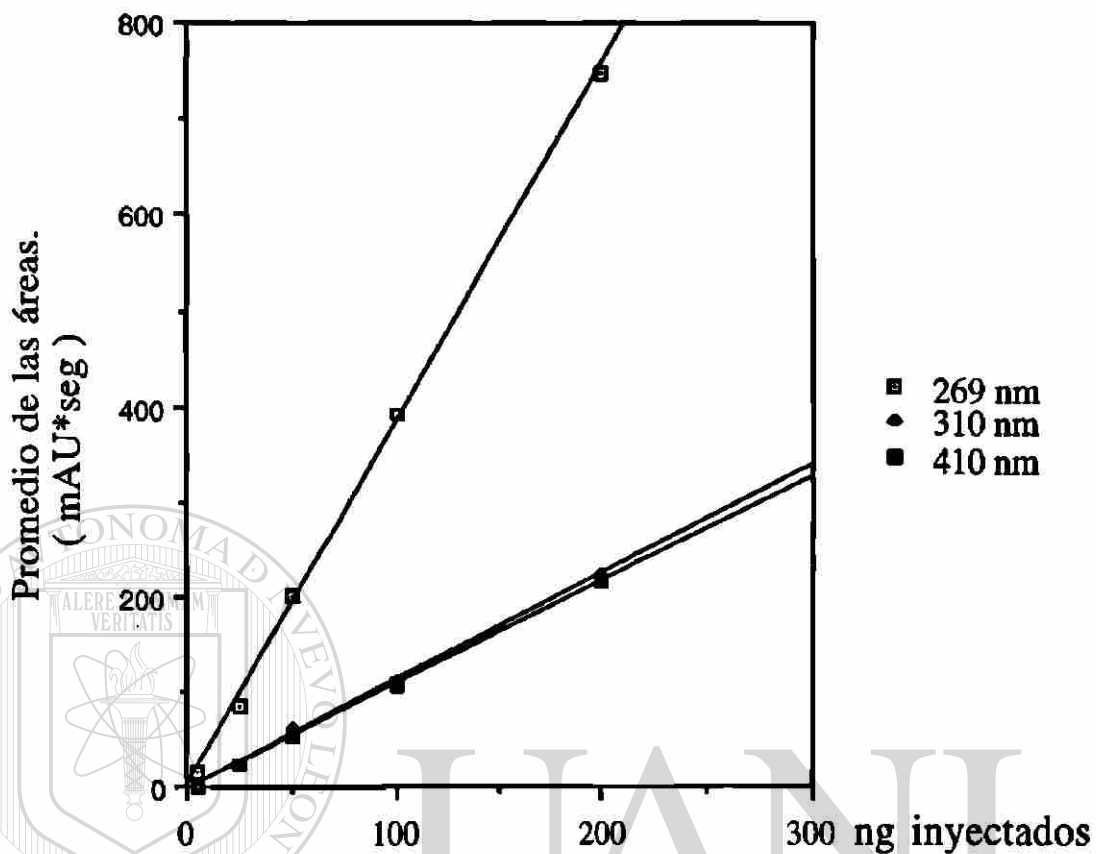
Figura 13. Linealidad y Ecuaciones de Regresión Obtenidas por Áreas de las Señales Cromatográficas de P A3 a las Diferentes Longitudes de Onda.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

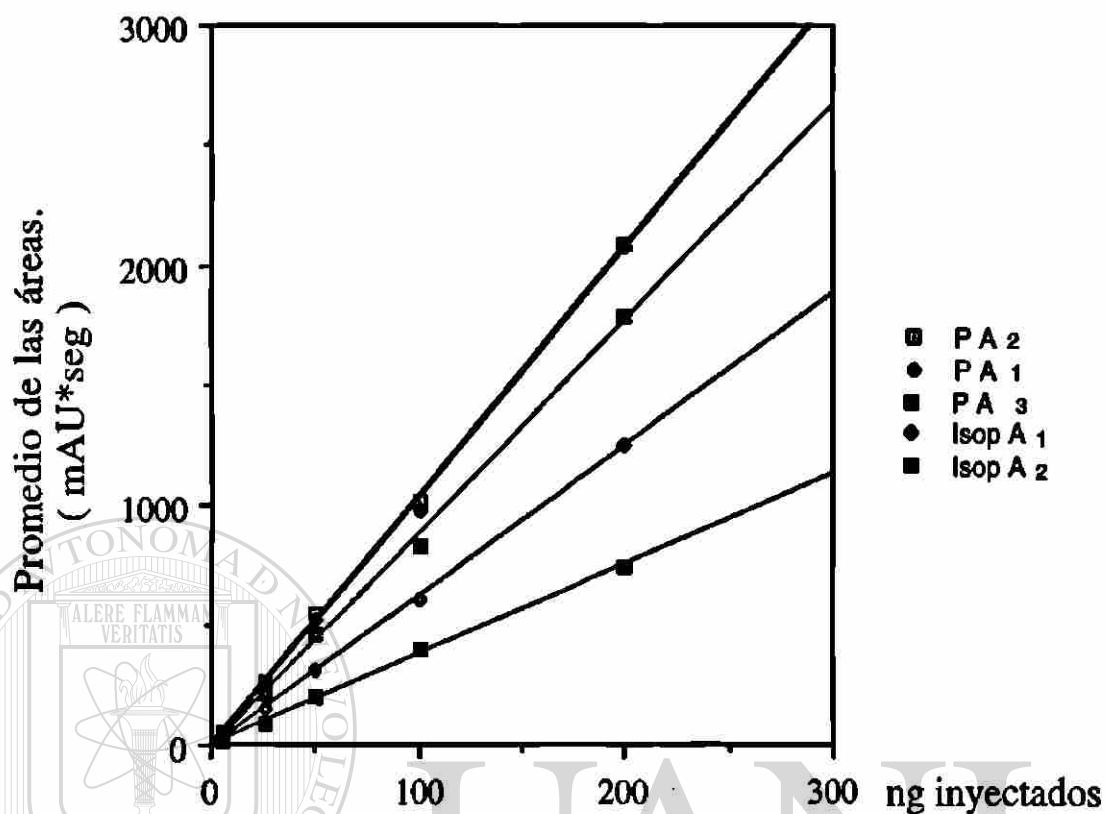
nm	Ecuaciones de regresión	R ²
269	$Y = -9,7 + 6,27 X$	1,000
310	$Y = -4,2 + 1,90 X$	1,000
410	$Y = -5,7 + 1,86 X$	1,000

Figura 14. Linealidad y Ecuaciones de Regresión Obtenidas por Áreas de las Señales Cromatográficas de Isop A1 a las Diferentes Longitudes de Onda.



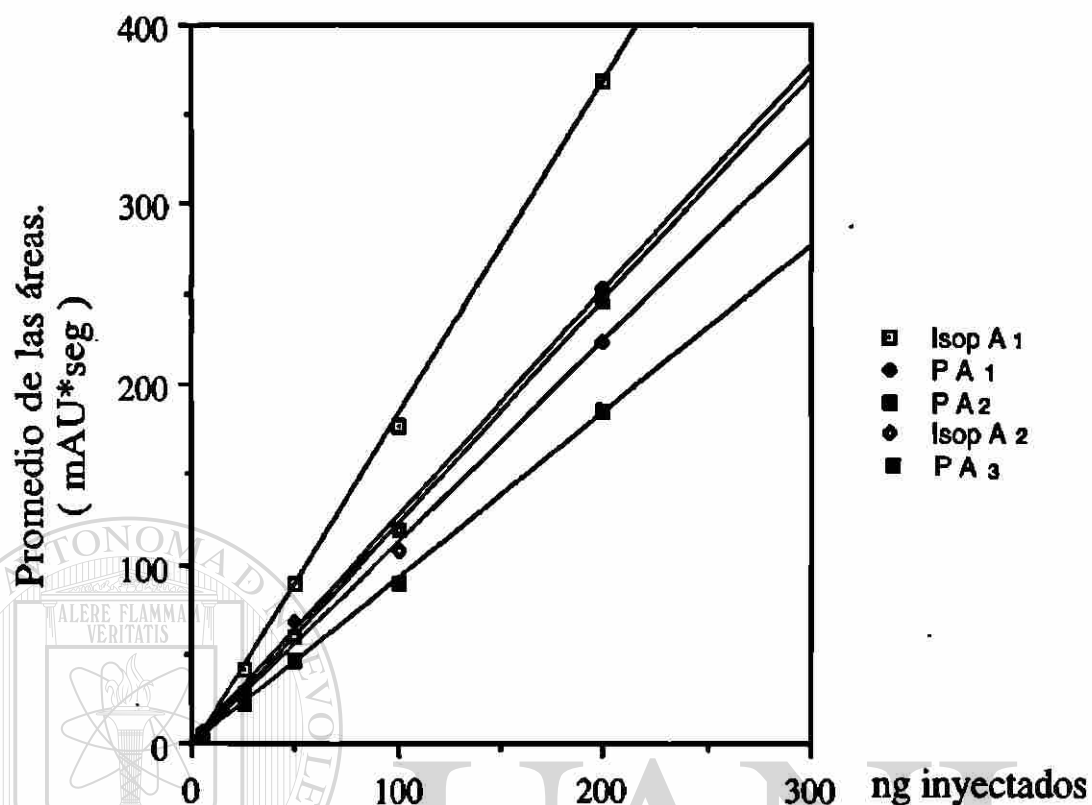
nm	Ecuaciones de regresión	R ²
269	$Y = 0,4 + 3,77 X$	0,999
310	$Y = -1,6 + 1,12 X$	0,999
410	$Y = -3,5 + 1,10 X$	1,000

Figura 15. Linealidad y Ecuaciones de Regresión Obtenidas por Áreas de las Señales Cromatográficas de Isop A2 a las Diferentes Longitudes de Onda.



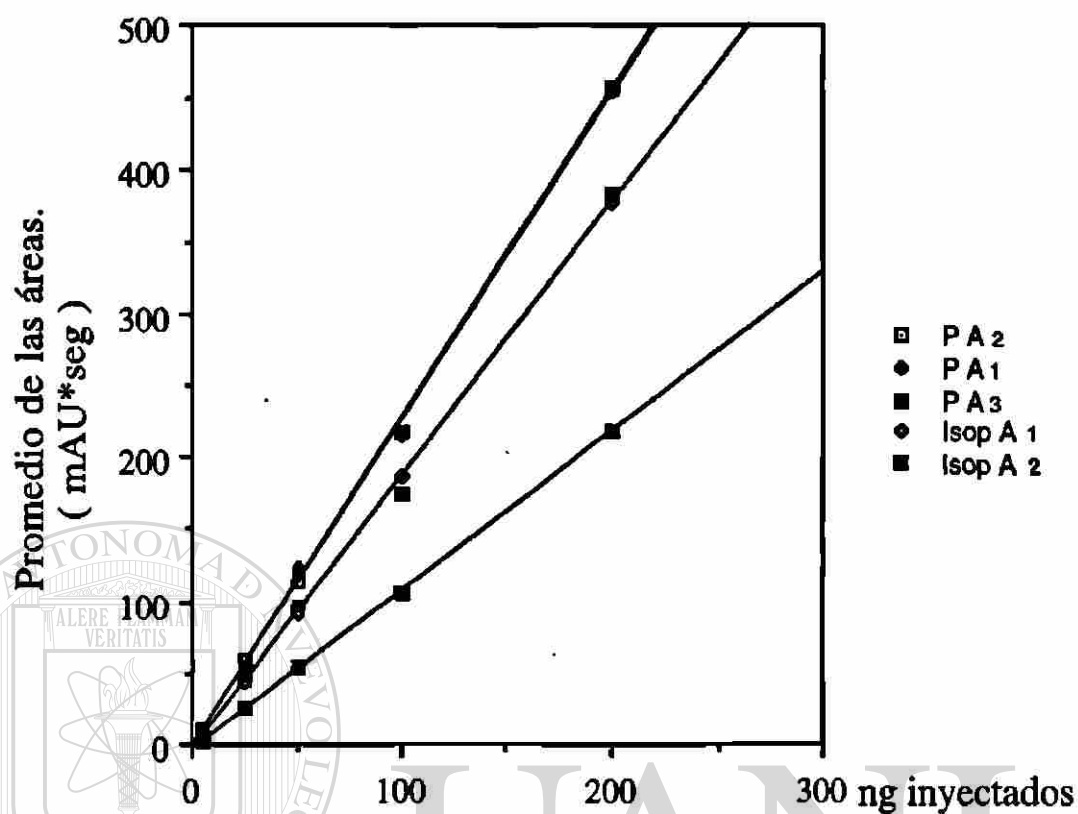
Compuesto	Ecuaciones de regresión	R ²
PA ₂	$Y = -0.1 + 1037 X$	0.999
PA ₁	$Y = -14.0 + 1035 X$	0.999
PA ₃	$Y = -11.2 + 888 X$	0.998
IsopA ₁	$Y = -9.7 + 627 X$	1.000
IsopA ₂	$Y = 0.5 + 3.77 X$	0.999

Figura 16. Linealidad y Ecuaciones de Regresión Obtenidas por Áreas de las Señales Cromatográficas a 269 nm de las Diferentes Peroxisomicinas.



Compuesto	Ecuaciones de regresión	R ²
Isop A1	$Y = - 5.7 + 1.86 X$	1.000
PA1	$Y = - 0.7 + 1.26 X$	0.998
PA2	$Y = - 2.7 + 1.24 X$	1.000
Isop A2	$Y = - 1.6 + 1.12 X$	0.999
PA3	$Y = - 1.6 + 0.93 X$	1.000

Figura 17. Linealidad y Ecuaciones de Regresión Obtenidas por Áreas de las Señales Cromatográficas a 310 nm de las Diferentes Peroxisomicinas.



Compuesto	Ecuaciones de regresión	R ²
PA2	$Y = -24 + 228 X$	0.999
PA1	$Y = -1.1 + 226 X$	0.998
PA3	$Y = -4.6 + 191 X$	0.998
IsopA1	$Y = -4.2 + 190 X$	1.000
IsopA2	$Y = -35 + 1.10 X$	1.000

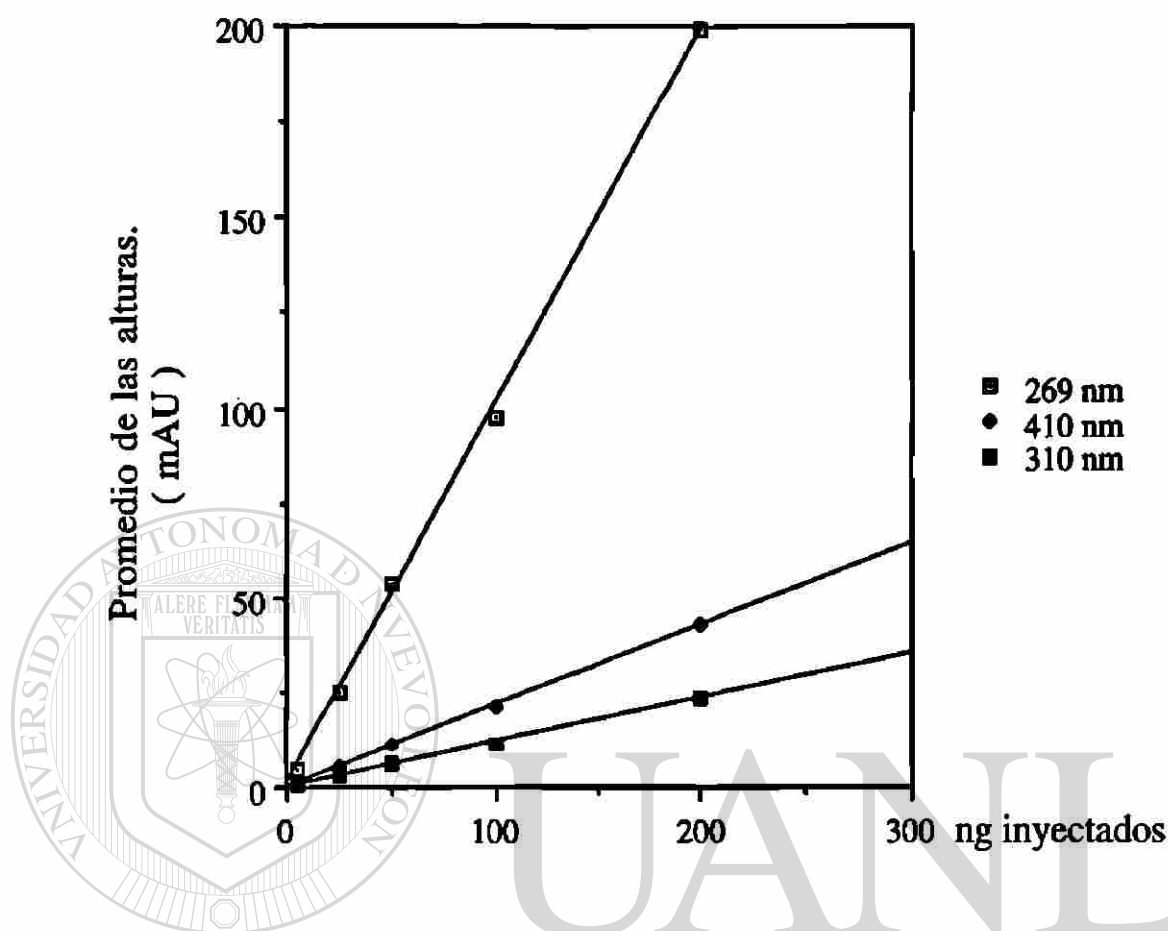
Figura 18. Linealidad y Ecuaciones de Regresión Obtenidas por Áreas de las Señales Cromatográficas a 410 nm de las Diferentes Peroxisomicinas.

TABLA 21

Promedio, Desviación Estándar y Coeficiente de Variación de las Alturas
Para las Peroxisomicinas A1, A2 y A3 a 269, 310 y 410 nm.
C18, 3 μm .

	ng	269 nm			310 nm			410 nm		
		Promedios ^a	dst	CV	Promedios ^a	dst	CV	Promedios ^a	dst	CV
P A2	5	4,6	0,9	19,9	0,5	0,1	8,1	1,0	0,1	13,1
	25	25,2	0,5	2,2	2,9	0,1	3,7	5,4	0,3	5,9
	50	53,3	1,8	3,4	6,0	0,1	2,3	11,3	0,2	1,8
	100	97,1	8,4	8,7	11,2	0,5	4,6	20,8	1,3	6,3
	200	199,5	4,6	8,7	23,1	0,5	2,2	42,8	0,9	2,1
P A1	5	4,0	0,7	18,5	0,5	0,1	13,9	0,7	0,1	12,6
	25	18,9	0,4	2,0	2,5	0,2	8,0	4,1	0,1	3,4
	50	40,6	1,4	3,5	5,2	0,3	5,6	9,1	0,6	6,8
	100	73,2	3,1	4,2	9,0	0,3	3,8	16,0	0,4	2,6
	200	150,0	3,4	2,3	19,5	0,3	1,3	32,9	1,1	3,3
P A3	5	2,7	0,2	6,3	0,3	0,1	3,4	0,6	0,1	14,0
	25	14,2	0,4	3,1	1,6	0,1	3,8	3,0	0,1	3,0
	50	30,1	0,7	2,4	3,3	0,1	3,0	6,6	0,2	3,3
	100	54,0	2,8	5,2	6,2	0,1	2,4	11,8	0,1	0,8
	200	119,0	1,8	1,5	13,2	0,4	3,2	25,6	0,4	1,6

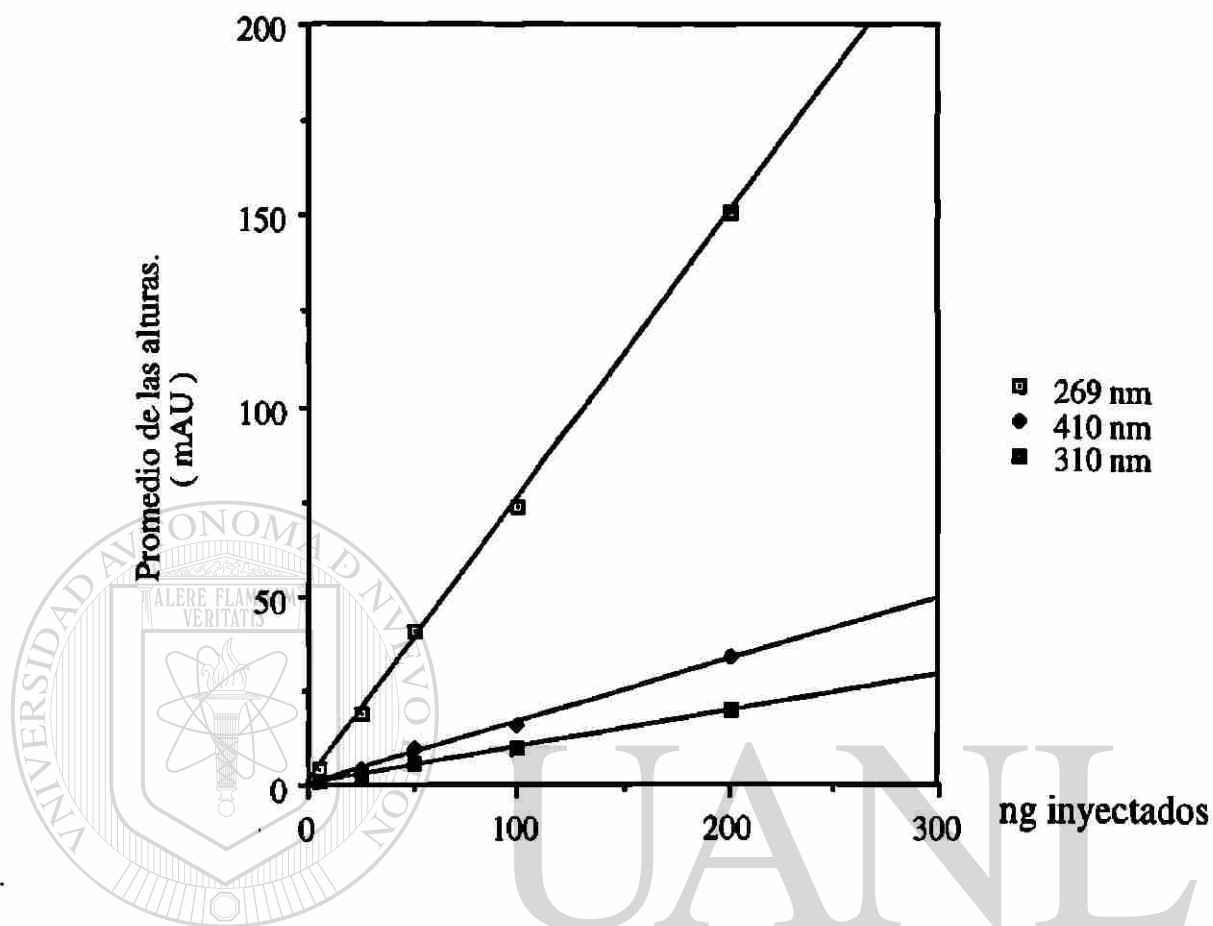
^a = mAU*seg



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

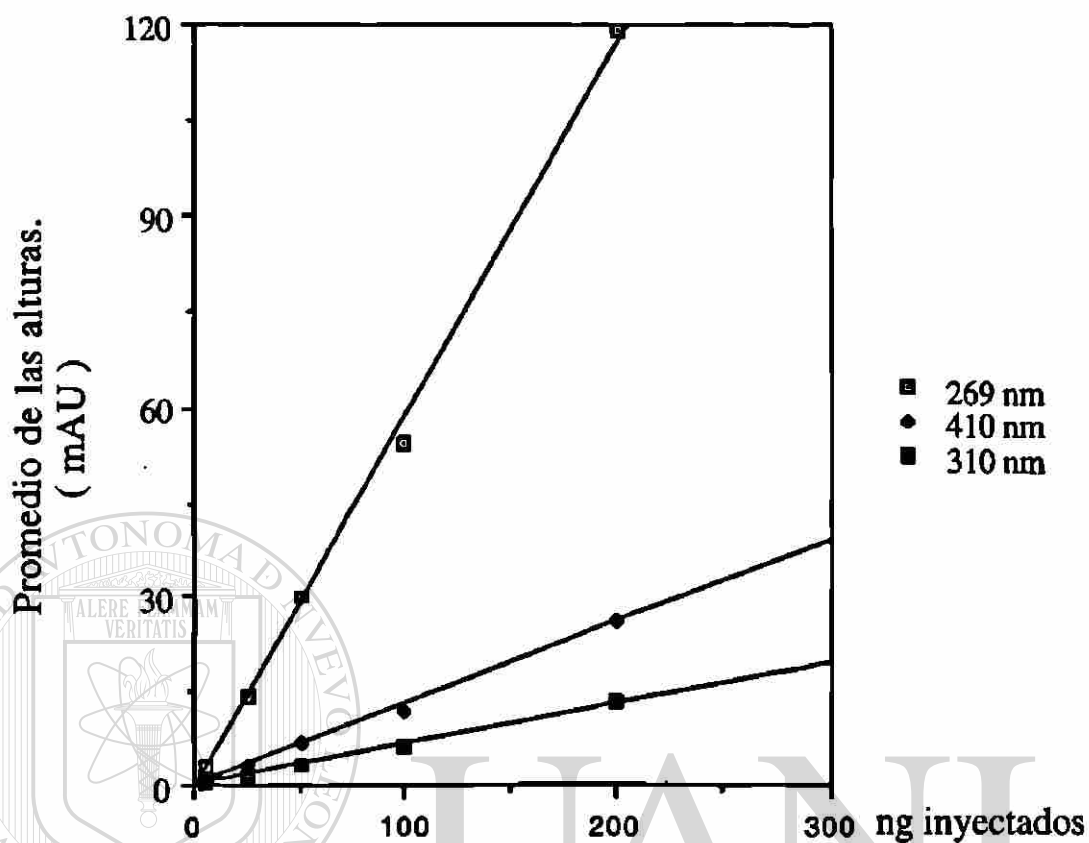
Figura 19. Linealidad y Ecuaciones de Regresión Obtenidas por Alturas de las Señales Cromatográficas de P A2 a las Diferentes Longitudes de Onda.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

nm	Ecuaciones de regresión	R ²
269	$Y = 0,8 + 0,74 X$	0,999
410	$Y = 0,1 + 0,16 X$	0,999
310	$Y = 0,0 + 0,10 X$	0,997

Figura 20. Linealidad y Ecuaciones de Regresión Obtenidas por Alturas de las Señales Cromatográficas de P A1 a las Diferentes Longitudes de Onda.



nm	Ecuaciones de regresión	R ²
269	$Y = -0,9 + 0,59 X$	0,993
410	$Y = -0,2 + 0,13 X$	0,998
310	$Y = -0,1 + 0,07 X$	0,999

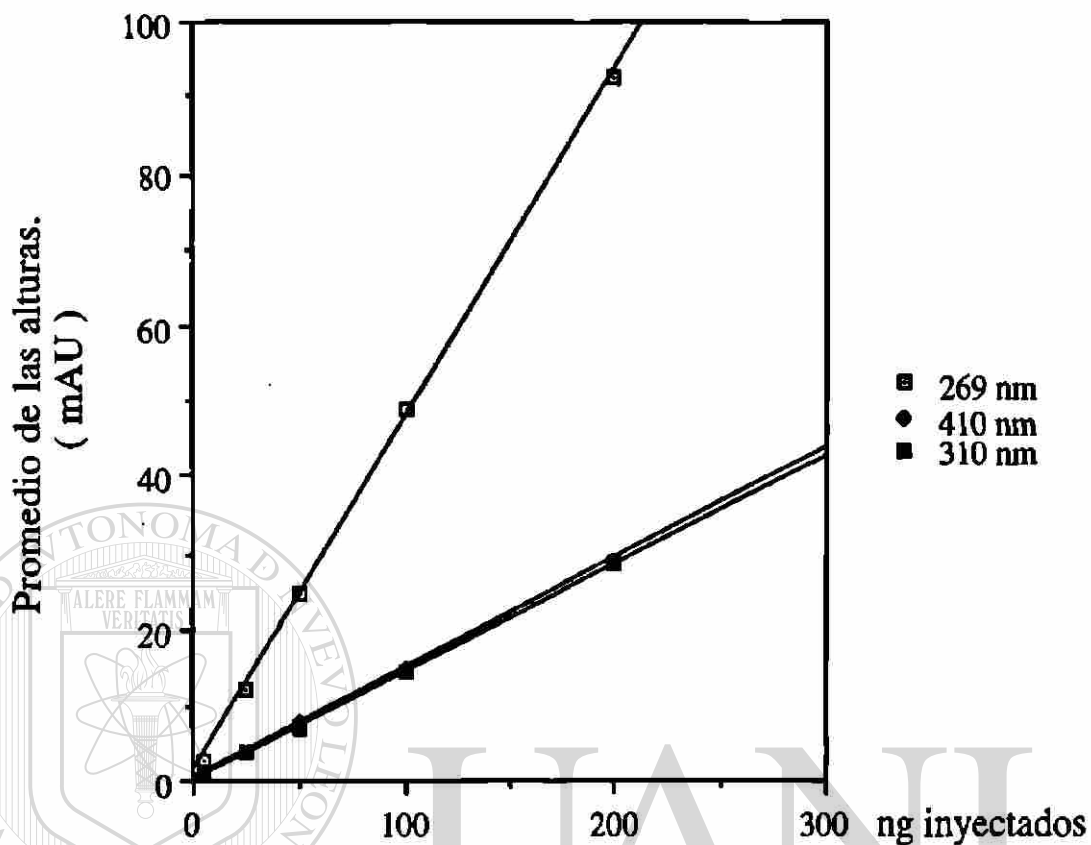
Figura 21. Linealidad y Ecuaciones de Regresión Obtenidas por Alturas de las Señales Cromatográficas de P A3 a las Diferentes Longitudes de Onda.

TABLA 22

Promedio, Desviación Estándar y Coeficiente de Variación de las Alturas
Para las Isoperoxisomicinas A1 y A2 a 269, 310 y 410 nm.
C18, 3 μm .

	ng	269 nm		310 nm		410 nm			
		Promedios ^a	dst	Promedios ^a	dst	Promedios ^a	dst	CV	
Isop A1	5	2,5	0,2	6,7	0,1	13,1	0,2	0,6	3,1
	25	12,1	0,3	2,5	0,1	1,7	0,2	3,8	6,1
	50	24,7	0,3	1,3	0,1	1,2	0,8	8,0	9,4
	100	48,8	1,0	2,1	0,2	1,4	0,3	14,9	2,1
	200	92,8	4,5	4,8	0,6	2,1	0,7	29,1	2,4
Isop A2	5	1,2	0,1	7,7	0,1	28,6	0,1	0,3	7,7
	25	6,8	1,1	16,7	0,2	8,6	0,2	2,1	10,4
	50	14,4	1,9	12,9	0,6	12,7	0,1	4,5	1,8
	100	29,9	1,2	4,2	0,4	4,8	0,3	8,8	3,5
	200	59,0	1,1	1,8	0,4	2,3	0,7	17,4	3,9

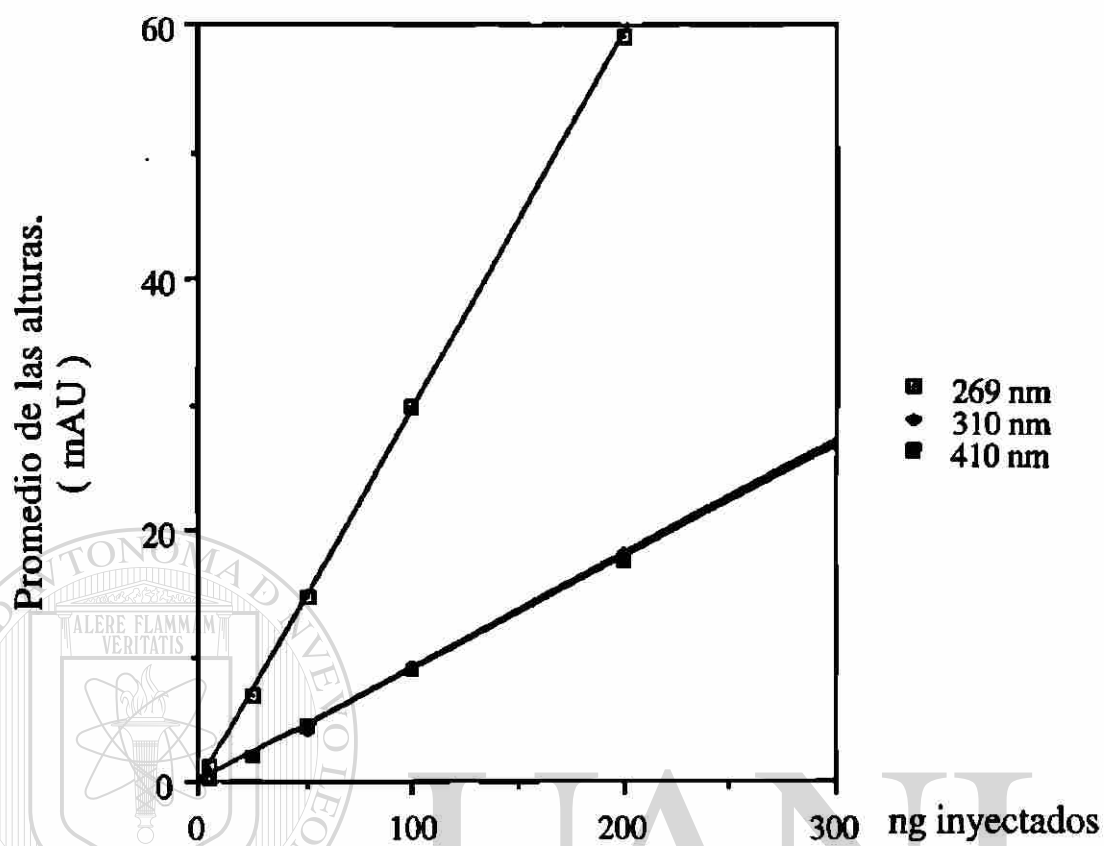
a = mAU*seg



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

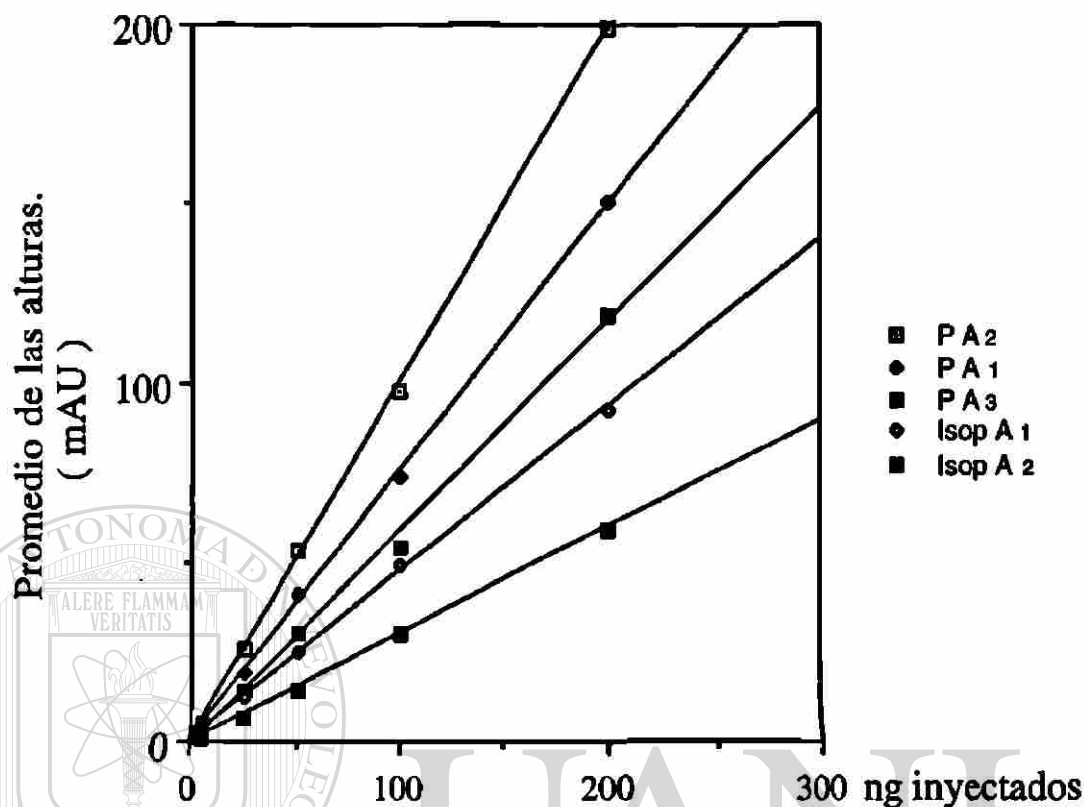
nm	Ecuaciones de regresión	R ²
269	$Y = 1,0 + 0,46 X$	0,999
410	$Y = 0,2 + 0,14 X$	0,999
310	$Y = 0,1 + 0,13 X$	1,000

Figura 22. Linealidad y Ecuaciones de Regresión Obtenidas por Alturas de las Señales Cromatográficas de Isop A1 a las Diferentes Longitudes de Onda.



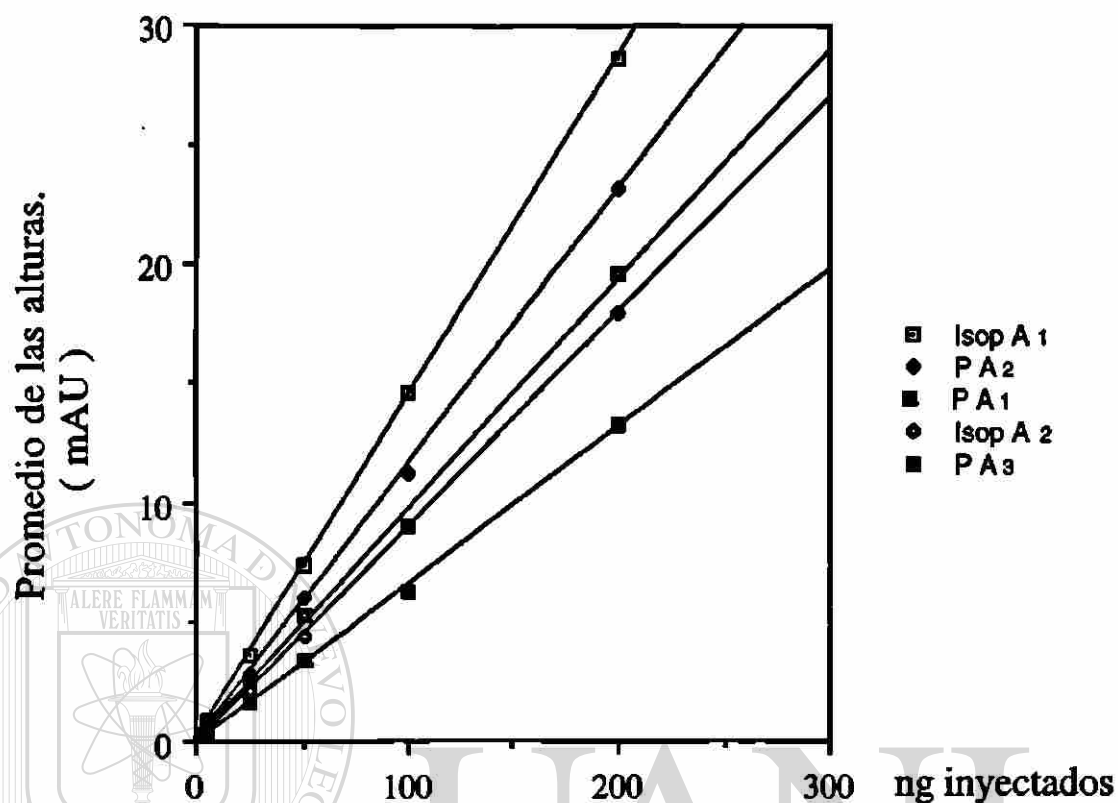
nm	Ecuaciones de regresión	R ²
269	$Y = -0,4 + 0,30 X$	1,000
310	$Y = -0,1 + 0,10 X$	1,000
410	$Y = 0,0 + 0,09 X$	1,000

Figura 23. Linealidad y Ecuaciones de Regresión Obtenidas por Alturas de las Señales Cromatográficas de Isop A2 a las Diferentes Longitudes de Onda.



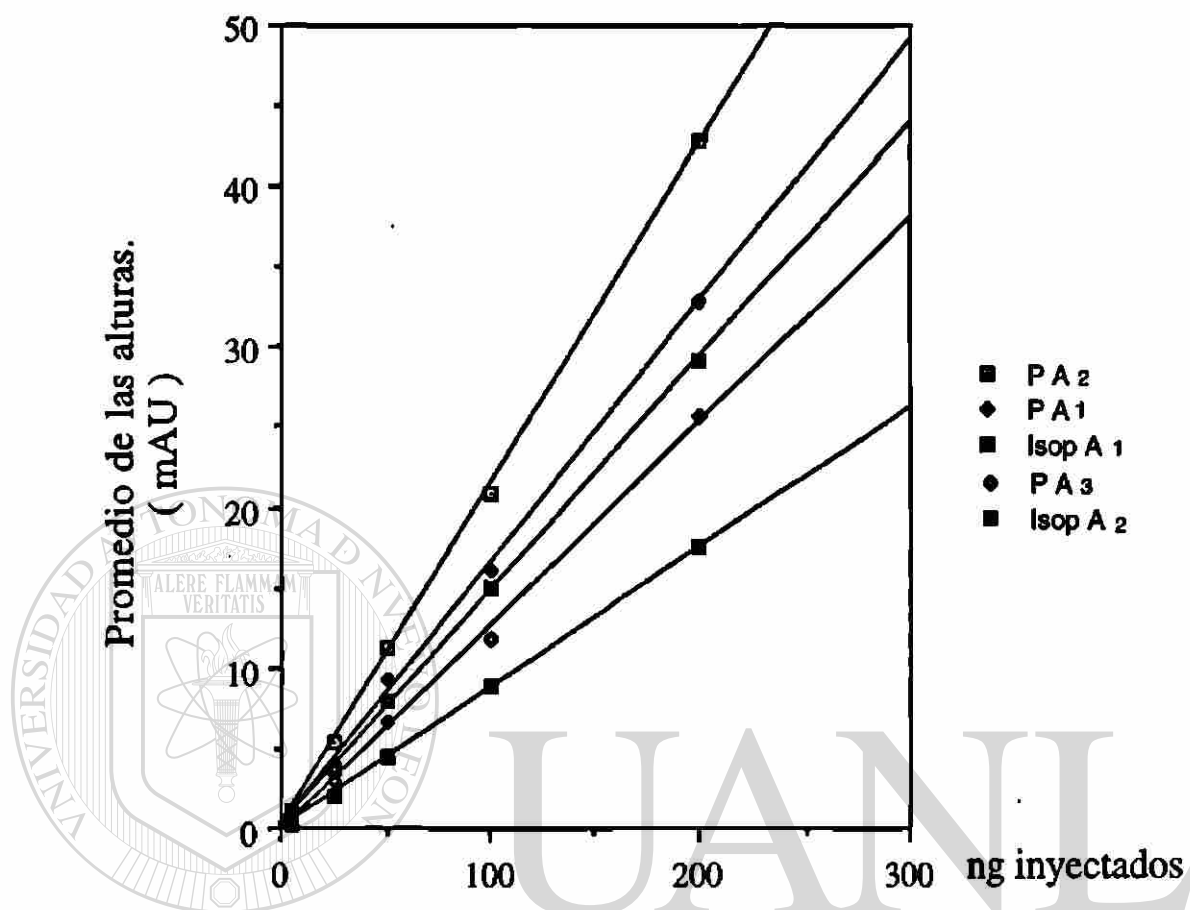
Compuesto	Ecuaciones de regresión	R ²
PA2	$Y = 0,6 + 0,99 X$	0,999
PA1	$Y = 0,8 + 0,74 X$	0,999
PA3	$Y = -0,9 + 0,59 X$	0,993
IsopA1	$Y = 1,0 + 0,46 X$	0,999
IsopA2	$Y = -0,4 + 0,30 X$	1,000

Figura 24. Linealidad y Ecuaciones de Regresión Obtenidas por Alturas de las Señales Cromatográficas a 269 nm de las Diferentes Peroxisomicinas.



Compuesto	Ecuaciones de regresión	R ²
Isop A1	$Y = 0,1 + 0,14 X$	1,000
PA2	$Y = 0,0 + 0,11 X$	0,999
PA1	$Y = 0,0 + 0,10 X$	0,997
Isop A2	$Y = -0,1 + 0,09 X$	1,000
PA3	$Y = -0,1 + 0,07 X$	0,999

Figura 25. Linealidad y Ecuaciones de Regresión Obtenidas por Alturas de las Señales Cromatográficas a 310 nm de las Diferentes Peroxisomicinas.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Compuesto	Ecuaciones de regresión	R ²
PA2	$Y = 0,1 + 0,21 X$	0,999
PA1	$Y = 0,1 + 0,16 X$	0,999
Isop A1	$Y = 0,2 + 0,14 X$	0,999
PA3	$Y = -0,1 + 0,13 X$	0,998
Isop A2	$Y = -0,0 + 0,09 X$	1,000

Figura 26. Linealidad y Ecuaciones de Regresión Obtenidas por Alturas de las Señales Cromatográficas a 410 nm de las Diferentes Peroxisomicinas.

3.5 Límites de Detección y Cuantificación

3.5.1 Método Propuesto por IUPAC

En la Tabla 23 se encuentran las distribuciones estándar del ruido, en la Tablas 24 y 25 se encuentran los límites de detección y cuantificación por áreas y por alturas calculados por este método.

TABLA 23
Distribución Estándar del Ruido

nm	Áreas (mAU ² seg)	Alturas (mAU)
269	0,37	0,01
310	0,02	0,01
410	0,07	0,02

TABLA 24
Límites de Detección y Cuantificación por Áreas, Utilizando el Método de la IUPAC

Compuesto	Límites de detección (ng)			Límites de cuantificación (ng)		
	269 nm	310 nm	410 nm	269 nm	310 nm	410 nm
PA 2	0,11	0,05	0,09	0,36	0,16	0,31
PA 1	0,11	0,05	0,09	0,36	0,16	0,31
PA 3	0,12	0,06	0,11	0,42	0,21	0,37
Isop A 1	0,18	0,03	0,11	0,59	0,11	0,37
Isop A 2	0,29	0,05	0,19	0,98	0,18	0,64

TABLA 25
Límites de Detección y Cuantificación por Alturas, Utilizando el Método de la IUPAC

Compuesto	Límites de detección (ng)			Límites de cuantificación (ng)		
	269 nm	310 nm	410 nm	269 nm	310 nm	410 nm
PA 2	0,03	0,27	0,29	0,10	0,91	0,95
PA 1	0,04	0,30	0,37	0,13	1,00	1,25
PA 3	0,05	0,43	0,46	0,17	1,43	1,54
Isop A 1	0,06	0,23	0,43	0,22	0,77	1,43
Isop A 2	0,10	0,33	0,67	0,33	1,11	2,22

3.5.2 Utilizando el Error Estándar

La tabulación de los límites de detección y cuantificación considerando las áreas como respuesta de las señales analíticas se encuentra en la Tabla 26 y en la Tabla 27 se encuentran estos mismos parámetros por alturas.

TABLA 26

Límites de Detección y Cuantificación por Áreas, Utilizando Valores de Error Estándar

Compuesto	Límites de detección (ng)			Límites de cuantificación (ng)		
	269 nm	310 nm	410 nm	269 nm	310 nm	410 nm
PA 2	6,2	4,9	7,9	20,7	16,2	26,2
PA 1	8,5	12,5	11,0	28,4	41,7	36,7
PA 3	11,4	4,3	13,2	37,9	14,3	44,0
Isop A 1	3,6	4,6	1,9	8,9	15,3	6,3
Isop A 2	9,5	10,0	4,0	31,6	33,5	13,4

TABLA 27

Límites de Detección y Cuantificación por Alturas Utilizando Valores de Error Estándar

Compuesto	Límites de detección (ng)			Límites de cuantificación (ng)		
	269 nm	310 nm	410 nm	269 nm	310 nm	410 nm
PA 2	7,4	6,5	6,9	24,9	21,8	22,9
PA 1	7,9	13,5	10,5	26,3	45,0	35,0
PA 3	14,1	8,6	12,2	47,1	28,6	40,8
Isop A 1	7,6	2,8	1,3	25,4	9,2	27,1
Isop A 2	3,5	2,3	4,3	11,7	7,8	14,4

3.5.3 Método Propuesto Según la USP XXII

En las tablas 28 y 29 se encuentran los límites de detección y cuantificación calculados por el método propuesto por la USP XXII, por áreas y por alturas respectivamente.

TABLA 28

**Límites de Detección y Cuantificación por Áreas.
Método Propuesto por la USP XXII**

Compuesto	Límites de detección (ng)			Límites de cuantificación (ng)		
	269 nm	310 nm	410 nm	269 nm	310 nm	410 nm
PA 2	2,8	1,2	3,0	9,2	6,3	11,3
PA 1	3,2	5,3	4,7	12,1	18,4	16,2
PA 3	4,5	1,1	4,8	16,4	5,6	18,6
Isop A 1	0,9	0,7	1,8	10,5	5,5	3,8
Isop A 2	4,2	3,8	0,4	14,2	14,3	10,2

TABLA 29

**Límites de Detección y Cuantificación por Alturas.
Método Propuesto por la USP XXII**

Compuesto	Límites de detección (ng)			Límites de cuantificación (ng)		
	269 nm	310 nm	410 nm	269 nm	310 nm	410 nm
PA 2	3,6	2,9	3,3	11,4	9,8	10,4
PA 1	9,0	6,0	5,0	12,3	20,1	15,9
PA 3	5,6	3,2	4,8	20,4	12,1	17,5
Isop A 1	4,3	1,6	4,3	12,3	4,5	12,8
Isop A 2	1,0	0,5	2,0	4,6	3,0	6,5

3.6 Selectividad de las Señales

Los espectros UV-Vis realizados en la salida de la columna, con detector de arreglo de diodos y la pureza espectral para P A1, P A3 y el de la Isop A1 se encuentran en la Figura 27.

En el estudio de la selectividad de las señales se observó que se presentan dos patrones característicos en las antracenas estudiadas que de manera general coinciden con los espectros obtenidos en la Figura 27. Todas las Peroxisomicinas en estudio presentan dos máximos de absorción importante, uno alrededor de los 269 nm y el otro cerca de los 410 nm. En el caso de las Isoperoxisomicinas, aunque sus espectros son semejantes a los de las Peroxisomicinas, presentan diferencias de absorción a 263 y 310 nm y un corrimiento de los máximos de 269 nm y 410 nm hacia longitudes de onda mayores.

En las Figuras 28 a la 32 se encuentran los análisis de pureza efectuados mediante la sobreposición de espectros y el cociente de absorbancias a diferentes longitudes de onda.

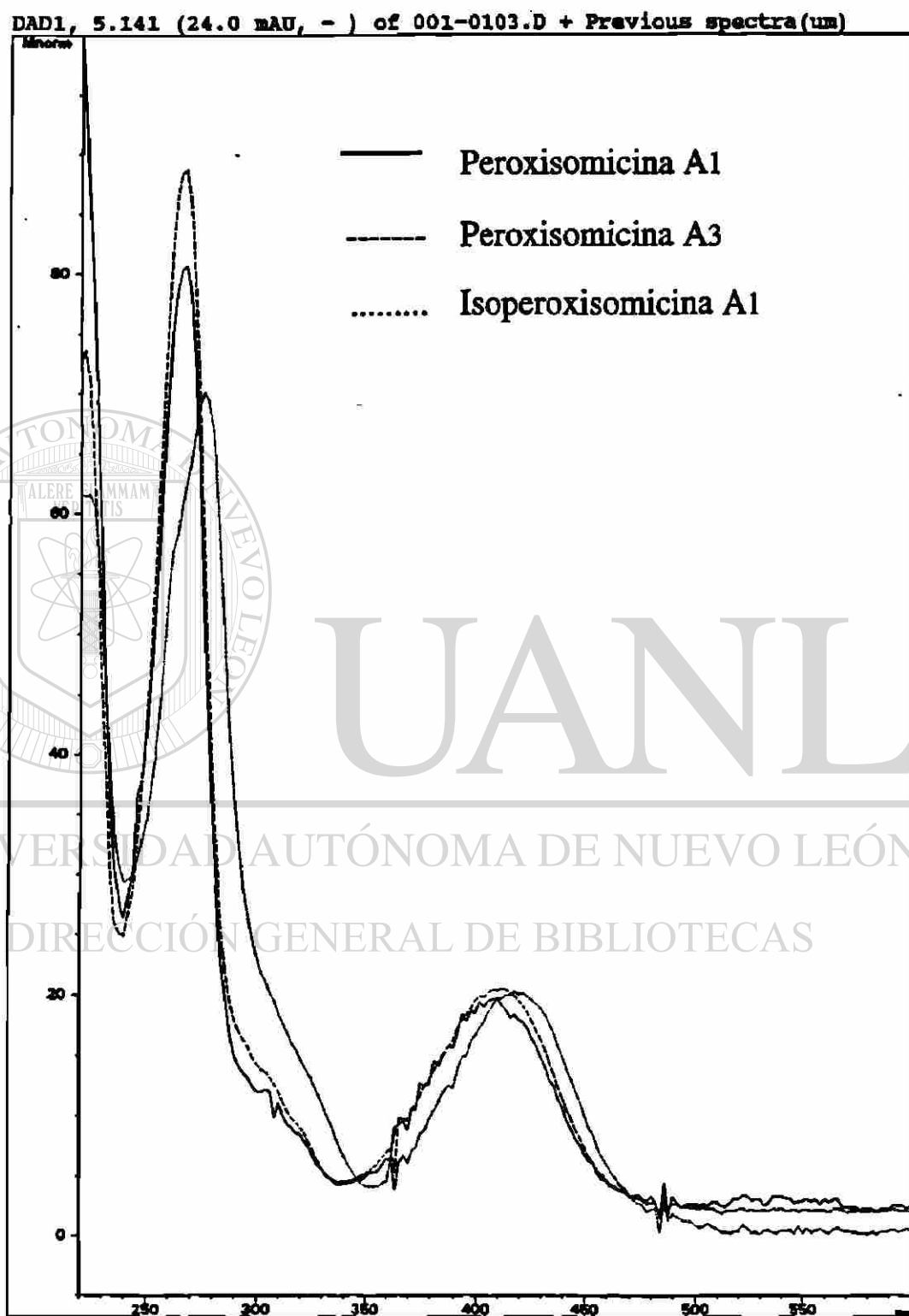
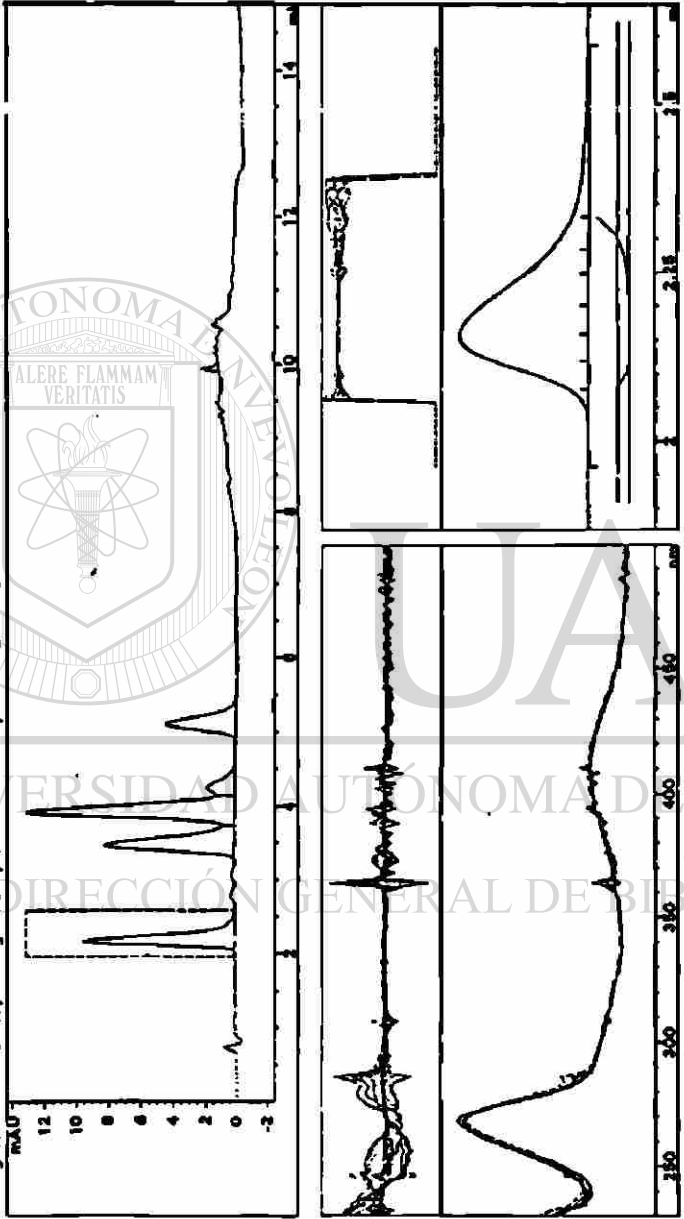


Figura 27. Espectros UV-Vis de P A1, P A3 e Isop A1.

Purity results peak 1 at 2.159 min.

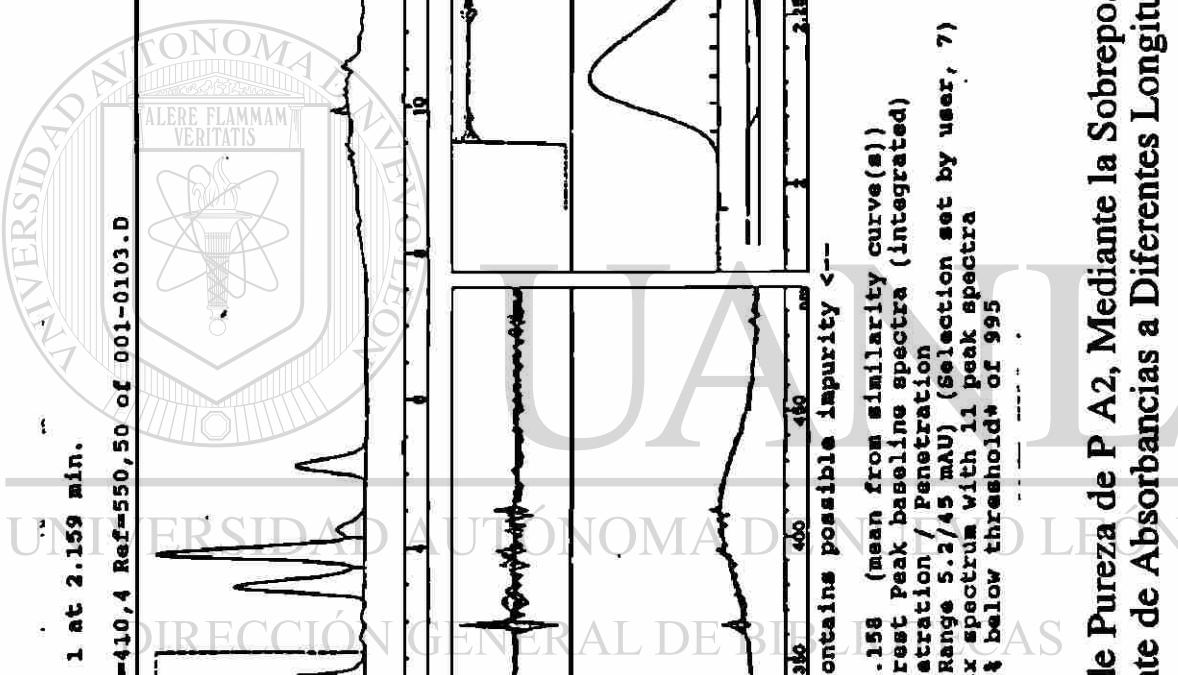
Signal DAD1 A, Sig=410,4 Ref=550,50 of 001-0103.D



--> Spectral data contains possible impurity <--

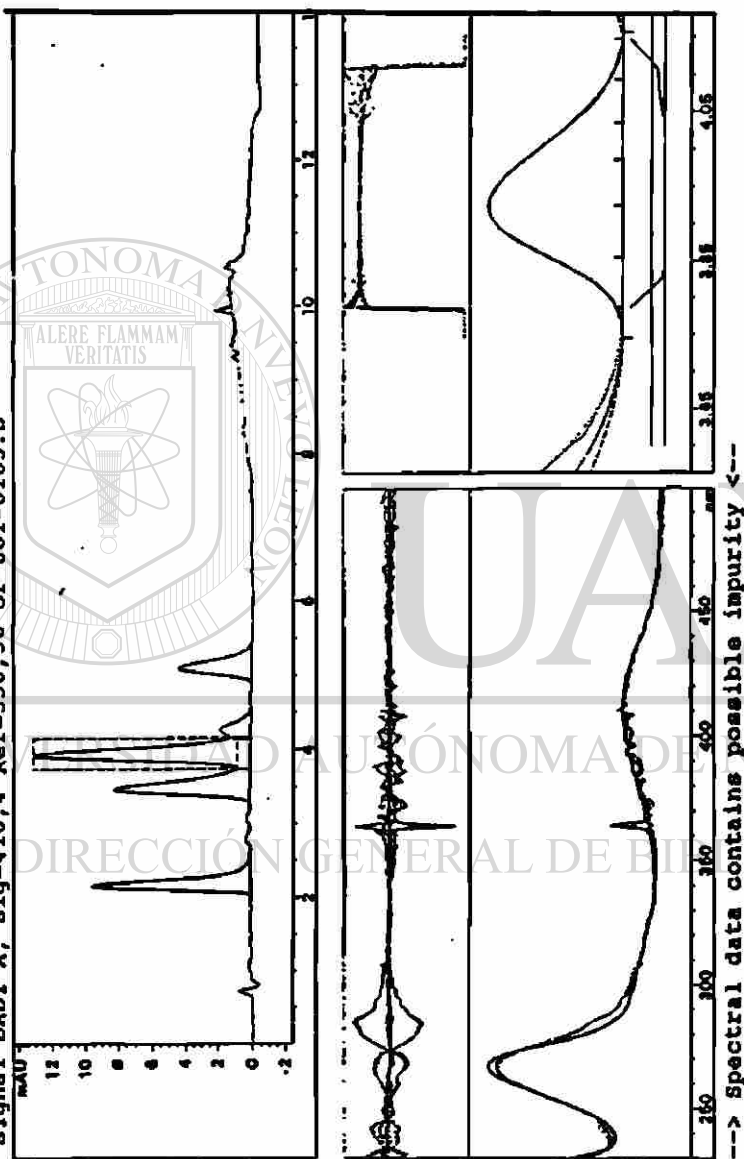
Purity level : 994.158 (mean from similarity curve(s))
 Reference : Nearest Peak baseline spectra (integrated)
 PeakStart/End : Penetration / Penetration
 Spectra : 7 (Range 5.2/45 MAU) (Selection set by user, 7)
 Simlirt curve : Apex spectrum with 11 peak spectra
 Simlirt curve : 55 % below threshold* of 995

Figura 28. Análisis de Pureza de P A2, Mediante la Sobreposición de Espectros y el Cociente de Absorbancias a Diferentes Longitudes de Onda.



Purity results peak 3 at 3.924 min.

Signal DAD1 A, Sig=410,4 Ref=550,50 of 001-0103.D



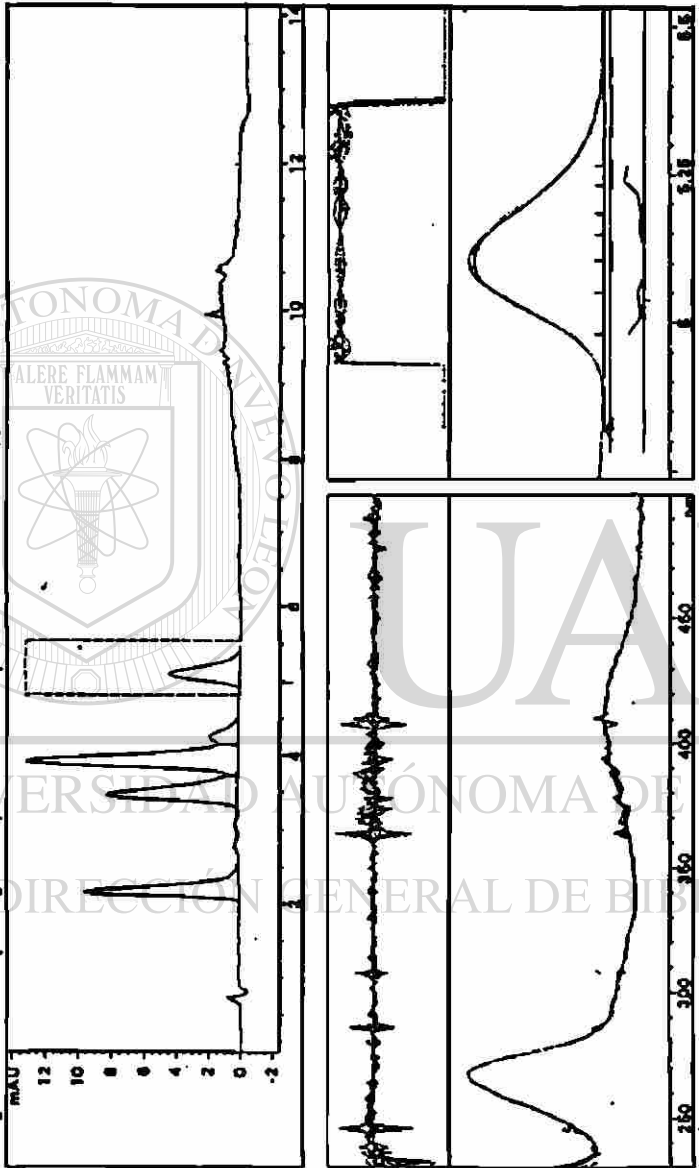
--> Spectral data contains possible impurity <--

Purity level : 993.58 (mean from similarity curve(s))
 Reference : Nearest Peak baseline spectra (integrated)
 PeakStart/End : Valley / Valley
 Spectra : 7 (Range 5.2/61.4 MAU) (Selection set by user, 7)
 Simlrt curve : Apex spectrum with 11 peak spectra
 Simlrt curve : 55 % below threshold* of 995

Figura 29. Análisis de Pureza de P A1, Mediante la Sobreposición de Espectros y el Cociente de Absorbancias a Diferentes Longitudes de Onda.

Purity results peak 5 at 5.106 min.

Signal DAD1 A, Sig=410, 4 Ref=550, 50 of 001-0103.D

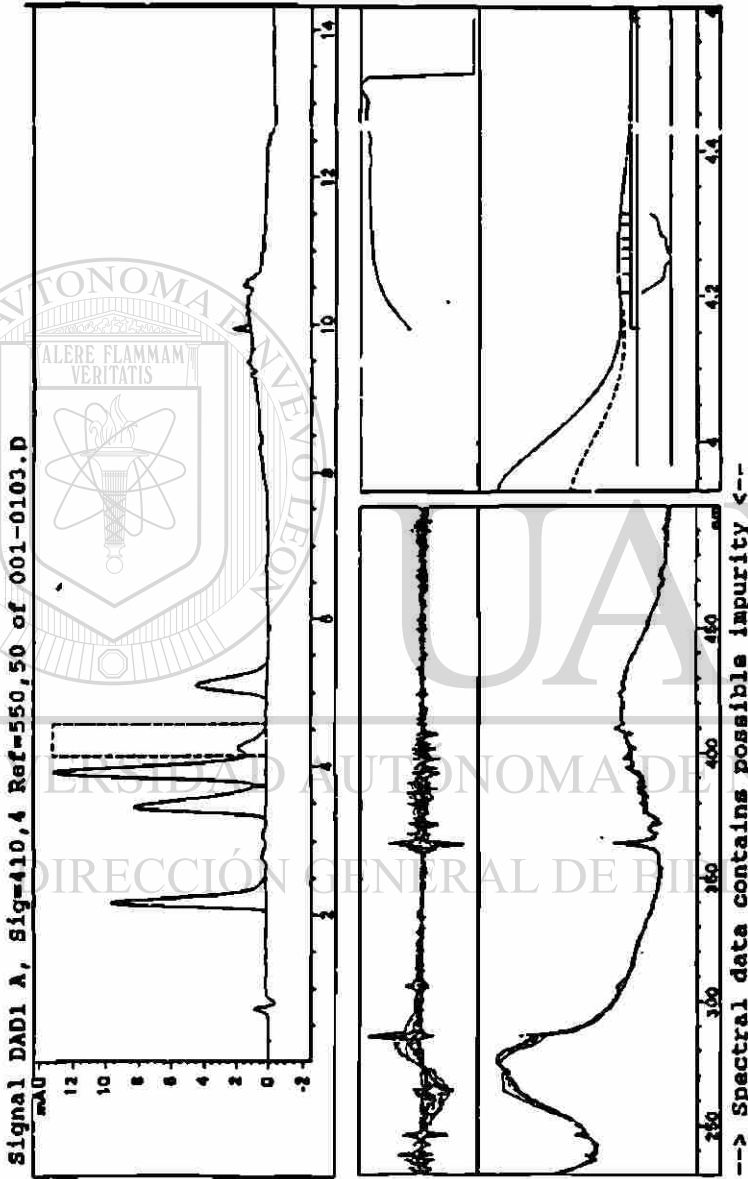


--> Spectral data contains possible impurity <--

Purity level : 997.838 (mean from similarity curve(s))
Reference : Nearest Peak baseline spectra (integrated)
PeakStart/End : BaseLine / BaseLine
Spectra : 7 (Range 5.1/20.5 MAU) (Selection set by user, 7)
Simlirt curve : Apex spectrum with 11 peak spectra
Simlirt curve : 36 & below threshold* of 995

Figura 30. Análisis de Pureza de P A3, Mediante la Sobreposición de Espectros y el Cociente de Absorbancias a Diferentes Longitudes de Onda.

Purity results peak 4 at 4.258 min.

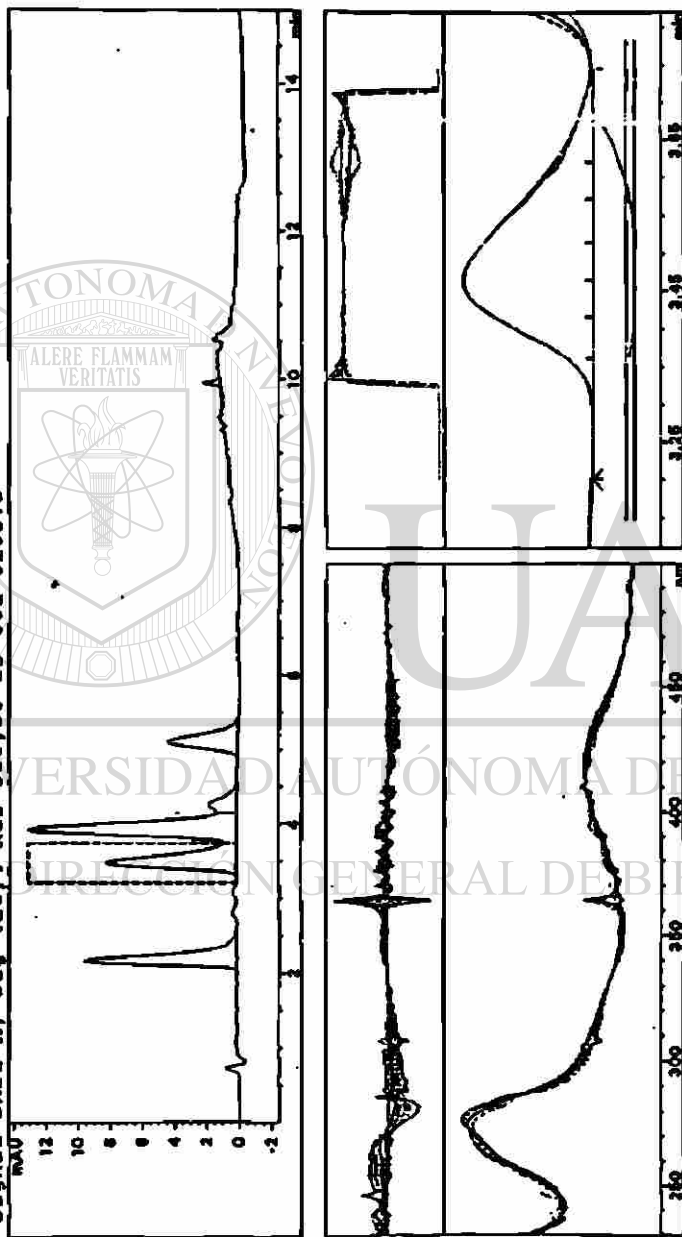


Purity level : 997.036 (mean from similarity curve(s))
 Reference : Nearest Peak baseline spectra (integrated)
 PeakStart/End : Valley / Valley
 Spectra : 7 (Range 5/6.1 mAU) (Selection set by user, 7)
 Simlirt curve : Apex spectrum with 11 peak spectra
 Simlirt curve : 36 % below threshold* of 995

Figura 31. Análisis de Pureza de Isop A1, Mediante la Sobreposición de Espectros y el Cociente de Absorbancias a Diferentes Longitudes de Onda.

Purity results peak 2 at 3.465 min.

Signal DAD1 A, Sig=410,4 Ref=550,50 of 001-0103.D



--> Spectral data contains possible impurity <--

Purity level : 990.4 (mean from similarity curve(s))
 Reference : Nearest Peak baseline spectra (integrated)
 PeakStart/End : Baseline / Baseline
 Spectra : 7 (Range 5.4/29.8 mAU) (Selection set by user, 7)
 Simlrt curve : Apex spectrum with 11 peak spectra
 Simlrt curve : 91 & below threshold of 995

Figura 32. Análisis de Pureza de Isop A2, Mediante la Sobreposición de Espectros y el Cociente de Absorbancias a Diferentes Longitudes de Onda.

3.7 Robustez del Método

En la Tabla 30 se tabulan los valores de resolución, en la 31 los tiempos de retención y en la Tabla 32 el orden de elución de los experimentos efectuados para determinar la robustez del método.

TABLA 30

Resolución Obtenida en los Experimentos de Robustez

Señales	Experimentos								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
1 y 2	3,16	1,16	3,31	2,89	1,78	2,82	1,95	4,50	5,39
2 y 3	0,95	0,49	0,17	1,22	1,16	0,00	0,90	0,65	0,74
3 y 4	0,70	0,26	1,48	0,26	1,00	1,38	0,37	1,44	1,61
4 y 5	1,87	0,07	1,26	0,88	2,69	1,10	0,50	2,22	1,82

0 = Valores Obtenidos con el Método Optimizado, C18 (3 μ m)

TABLA 31

Tiempos de Retención (min) Obtenidos en los Experimentos de Robustez

Señales	Experimentos								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
PA2	2,146	1,315	2,136	2,830	2,434	1,438	1,921	3,249	2,326
Isop A1	3,443	2,141	3,163	5,418	3,092	2,203	3,768	5,434	3,997
PA1	3,889	1,895	3,225	4,521	3,891	2,200	3,118	5,769	4,039
Isop A2	4,234	2,357	3,750	6,257	3,520	2,521	4,382	6,565	4,732
PA3	5,068	2,310	4,166	5,629	4,885	2,795	4,016	7,946	5,270

0 = Valores Obtenidos con el Método Optimizado, C18 (3 μ m)

TABLA 32
Orden de Elución de las Diferentes Peroxisomicinas
Obtenidas en el Ensayo de Robustez

Experimentos								
0	1	2	3	4	5	6	7	8
PA2	PA2	P A2	P A2	P A2	P A2	PA2	P A2	PA2
IsopA1	PA1	Isop A1	P A1	Isop A1	P A1	PA1	Isop A1	IsopA1
PA1	IsopA1	P A1	Isop A1	Isop A2	Isop A1	IsopA1	P A1	PA1
Isop A2	PA3	Isop A2	P A3	P A1	Isop A2	PA3	Isop A2	IsopA2
PA3	IsopA2	P A3	Isop A2	P A3	P A3	IsopA2	P A3	PA3

0 = Orden de Elución Obtenido con el Método Optimizado, C18 (3 μ m)

En las Tablas 33, 34 y 35 se encuentran las diferencias de los promedios, obtenidos de la Tabla 30 de acuerdo con el método descrito previamente en el capítulo 2 para decidir si una variable tiene influencia significativa en el método. En este caso, se consideraron los tiempos de retención como parámetro de medición.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

TABLA 33

Diferencias* de los Promedios de los Tiempos de Retención Obtenidos
al Aumentar y al Disminuir los Valores de las Variables.
C18, 3 μ m.

Orden de elución	V'a - V'b						
	HAc	Flujo	H prep-iny	Diámetro	Temp y % ACN	Ancho de banda	S(2) ^{1/2}
PA2	0,055	1,008	0,100	0,216	0,656	0,093	0,236
Isop A1	0,392	1,661	0,060	0,352	1,588	0,081	0,478
PA1	0,398	1,945	0,300	0,378	1,152	0,172	0,529
Isop A2	0,830	2,020	0,181	0,343	1,956	0,109	0,563
PA3	0,760	2,610	0,579	0,638	2,942	0,337	0,703

* En Valores Absolutos

TABLA 34

Diferencias* de los Promedios de los Tiempos de Retención Obtenidos al Aumentar el Valor de las Variables y los del Método Optimizado en C18, 3 μm .

Orden de elución	V' a - V' opt						
	HAc	Flujo	H prep-iny	Diámetro	Temp y % ACN	Ancho de banda	S(2)1/2
P A2	0,017	0,493	0,060	0,100	0,320	0,077	0,236
Isop A1	0,191	0,825	0,035	0,182	0,786	0,035	0,478
P A1	0,454	1,227	0,105	0,444	0,831	0,169	0,529
Isop A2	0,420	1,139	0,040	0,041	1,109	0,185	0,563
P A3	0,735	0,660	0,072	0,672	2,485	0,193	0,703

*En Valores Absolutos

TABLA 35

Diferencias* de los Promedios de los Tiempos de Retención Obtenidos al Disminuir el Valor de las Variables y los del Método Optimizado en C18, 3 μm .

Orden de elución	V' b - V' opt						
	HAc	Flujo	H prep-iny	Diámetro	Temp y % ACN	Ancho de banda	S(2)1/2
P A2	0,035	0,512	0,042	0,116	0,336	0,093	0,236
Isop A1	0,201	0,836	0,025	0,171	0,802	0,046	0,478
P A1	0,055	0,718	0,403	0,066	0,321	0,341	0,529
Isop A2	0,410	0,877	0,221	0,302	0,847	0,076	0,563
P A3	0,025	0,950	0,651	0,034	0,457	0,144	0,703

*En Valores Absolutos

La desviación estándar de los tiempos de retención obtenidos con el método optimizado se encuentran en la Tabla 36. El producto de este parámetro por⁽¹⁹⁾ la raíz cuadrada de dos se tabuló en las Tablas 33, 34 y 35 para facilitar su contrastación como se establece en la parte de métodos.

TABLA 36

Promedio, Desviación Estándar y Coeficiente de Variación de los Tiempos de Retención Obtenidos con el Método Optimizado. C18, 3 μ m

Orden de elución	Promedio	dst	CV	n
P A2	2,198	0,167	7,59	36
Isop A1	3,644	0,338	9,27	36
P A1	3,837	0,337	9,75	36
Isop A2	4,391	0,398	9,06	36
P A3	4,982	0,497	9,98	36

Temperatura y % de acetonitrilo se estudiaron por separado ya que en el estudio inicial se analizaron como una sola variable. El diseño experimental es el que se encuentra en la Tabla 37. Los resultados se pueden observar en las Tabla 38.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

TABLA 37

Diseño Experimental Para el Estudio de la Temperatura y el % de Acetonitrilo Sobre la Robustez.

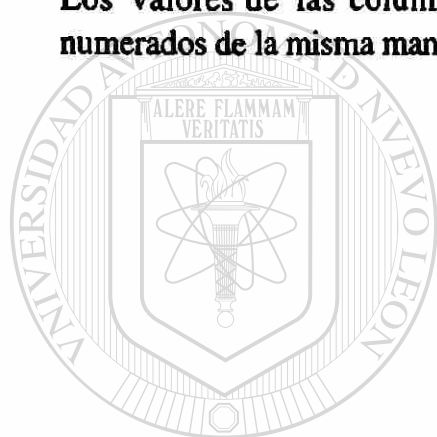
Variable	Experimentos			
	1	2	3	4
Temperatura (°C)	25	35	Temp amb	Temp amb
% acetonitrilo	30	30	28	32

Las Demás Variables Permanecieron Igual que en el Método Optimizado

TABLA 38
Tiempos de Retención en el Estudio de la Temperatura y
el % de Acetonitrilo Sobre la Robustez

Compuestos	Tiempos de retención (min)			
	1	2	3	4
P A2	2,031	1,875	1,769	1,552
Isop A1	3,352	2,539	2,950	2,579
P A1	3,356	2,994	2,772	2,295
Isop A2	3,920	2,942	3,391	2,917
P A3	4,224	3,738	3,449	2,810

Los valores de las columnas: 1, 2, 3 y 4 son los resultados de los experimentos numerados de la misma manera en la Tabla 37



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO 4

DISCUSIÓN

4.1 Optimización de la Separación

En el presente trabajo se optimizó la separación analítica por CLAR fase reversa a partir de un método preestablecido para la determinación de P A1. Se probaron distintas condiciones de elución como gradiente, composición y flujo del eluyente para la purificación de cinco antracenonas diméricas: Peroxisomicinas A2, A1 y A3 e Isoperoxisomicinas A1 y A2 obtenidas en el Laboratorio de Extracción y Síntesis del Departamento de Farmacología y Toxicología como se describe en el diagrama de la Figura

6. La separación analítica obtenida con el método preestablecido para la determinación de P A1 se observa en el cromatograma de la Figura 7. De éste se calcularon los valores de los parámetros de retención, separación y resolución: k' , α , R , encontrándose que si bien existe separación de los compuestos, ya que se obtienen valores aceptables de α , las resoluciones no son tan buenas principalmente entre los compuestos P A1-Isop A1 e Isop A1-P A3. Después de efectuar la revisión de todos los cromatogramas obtenidos con las diferentes condiciones de elución de prueba, se concluyó que las condiciones que aparecen en la Tabla 9, utilizando columna C18 de

5 μm con las que se obtiene el cromatograma de la Figura 8 fueron las mejores de todos los experimentos efectuados. El coeficiente de deseabilidad obtenido fue de 4,59 que comparado con el obtenido con las condiciones iniciales, de 2,56 indica que los parámetros en estudio de manera conjunta se optimizaron en un 79%. Las condiciones de elución optimizadas de esta manera en columna C18 de 5 μm se probaron también en columna C18 de 3 μm . El coeficiente de deseabilidad aumentó hasta 6,12 lo que representa una optimización de 140 % de los parámetros analizados con respecto a los de las condiciones iniciales. El cromatograma con estas últimas condiciones aparece en la Figura 9. Se observa mejoría en la resolución, apreciándose además, una señal que se encuentra entre las señales de P A1 y P A3 con tiempo de retención de 4,23 minutos, que corresponde a Isop A2, compuesto actualmente en estudio en el Laboratorio de Extracción y Síntesis del Departamento de Farmacología y Toxicología. Este compuesto no se detectaba porque quedaba oculto con P A3 en la separación analítica con el método anterior. La obtención del estándar de este compuesto requirió la repurificación de la Isop A1 ya que estos compuestos se extraen en la misma fracción en el proceso de purificación.

Los valores de resolución que se obtuvieron en este último cromatograma fueron 2,83 para el par P A2-Isop A1, 1,00 para las señales de Isop A1-P A1 y 2,44 entre P A1-P A3. Estos valores junto con el

coeficiente de deseabilidad los consideramos apropiados para decir que nuestro objetivo de optimizar la separación analítica se había cumplido.

Los resultados obtenidos durante la optimización del método se sometieron a un proceso de validación, determinándose en éste: la precisión del sistema y del método, la linealidad de la respuesta, los límites de detección y cuantificación del método, la selectividad de las señales y la robustez del método.

4.2 Precisión del sistema y del método

4.2.1 Precisión del sistema

Para evaluar la precisión del sistema se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los tiempos de retención, las áreas y las alturas de las señales analíticas de P A1, P A2, P A3 e Isop A1. Se encontró que los coeficientes de variación para los tiempos de retención fueron todos menores de 1,17. Para las áreas, este parámetro osciló entre 0,76 a 1,06. Los coeficientes de variación de las alturas fueron menores de 1,47. Estos valores de los coeficientes de variación obtenidos establecen que el sistema tiene una precisión aceptable en la determinación de las señales analíticas estudiadas.

4.2.2 Precisión del método

En la evaluación de la precisión del método se encontró que los coeficientes de variación de las áreas oscilaron entre 5,70 a 9,15 y de las alturas estuvieron entre 4,60 y 10,48 para las señales de los compuestos estudiados.

El coeficiente de variación en pruebas interlaboratorios, para la concentración usada en este experimento, según estudios efectuados por Horwitz⁽²²⁾, es recomendable que no exceda de un valor de 11,3.

Para estudios intralaboratorio, el coeficiente de variación permitido, según la misma referencia, debe ser hasta la mitad o la tercera parte del valor de este parámetro interlaboratorio lo que arroja un coeficiente de variación para estudios intralaboratorio de 8,5.

En nuestro caso, los coeficientes de variación obtenidos fueron de 4,58 a 10,78. Siendo los coeficientes de variación de las Peroxisomicinas A1 y A2 las que exceden del valor recomendado ya que estos son 9,15 y 9,10 para la precisión de las áreas y para las alturas 10,48 y 10,78 respectivamente. De acuerdo a esto podemos observar que se tienen coeficientes de variación experimentales cercanos a los límites teóricos recomendados.

4.3 Linealidad

La linealidad de las respuestas tanto por áreas como por alturas se determinó a 269, 310 y 410 nm para P A1, P A2, P A3, Isop A1 e Isop A2. Isop A2 se incluyó en la investigación a partir de esta etapa, cuando ya se había logrado purificar. En todos los casos se trabajó con concentraciones correspondientes a un intervalo de 5 a 200 ng de masa inyectada. Se encontró que en este intervalo de masa inyectada existe correlación para todos los compuestos tanto por áreas como por alturas y a todas las longitudes de onda estudiadas.

Se puede observar que a 269 nm, la respuesta por áreas de P A1 y P A2 son prácticamente iguales y que es a esta longitud de onda donde se tienen los valores más altos de la pendiente. Para la linealidad a 410 nm aunque con menor respuesta, se aprecia el mismo comportamiento que el descrito a 269 nm. A 310 se ve mayor respuesta para la Isop A1. El mismo comportamiento se observa para la linealidad descrita por áreas y en donde la mayor respuesta se observa a 269 nm.

4.4 Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación se calcularon utilizando

tres métodos distintos. Los resultados que se obtuvieron con el método propuesto por la IUPAC se presentan tanto por áreas como por alturas en las Tablas 23 y 24. Las que se obtuvieron con el segundo método, en el que se utilizó el error estándar se encuentran en las Tablas 25 y 26, y los valores obtenidos según el método de la USP XXII en las Tablas 27 y 28.

Los resultados obtenidos con el método propuesto por la IUPAC, son cantidades pequeñas con las que difícilmente se podrán realizar trabajos experimentales precisos. Se puede observar que en la determinación de los límites de detección y cuantificación no se contempla la precisión del método, sólo la capacidad del aparato para producir ruido instrumental y como el CLAR utilizado en este estudio tiene un nivel bajo de ruido, la señal que se encuentra 3 o 10 desviaciones estándar por arriba del promedio del ruido instrumental, adjudicables al límite de detección y cuantificación respectivamente, son señales pequeñas.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Los límites de detección obtenidos por los otros dos métodos fueron mayor a los esperados y reportados, dado que en estos dos casos se toma en cuenta la precisión del método desde la preparación de la muestra, consideramos que estos valores pueden ser mejorados si se optimizan las condiciones de preparación y mediante el empleo de volúmenes mayores durante la preparación de las muestras.

4.5 Selectividad de las señales

Los espectros de los compuestos estudiados nos muestran básicamente dos patrones semejantes de absorción.

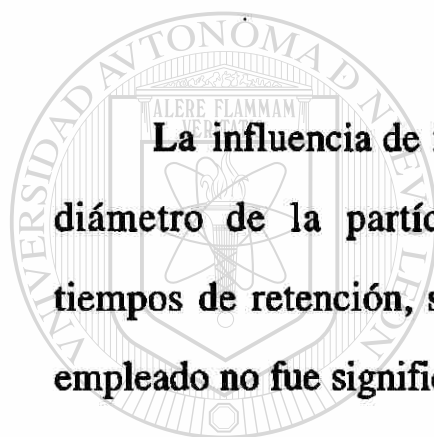
P A1, P A2 y P A3 presentan una región de absorción intensa entre 220 a 270 nm con un máximo de absorción débil en la región 410 a 420 nm; pero Isop A1 e Isop A2 presentan además del comportamiento explicado para las Peroxisomicinas anteriores una absorción máxima intensa en 263 nm. A 310 nm se percibe que Isop A1 e Isop A2 presentan mayor absorbancia que las Peroxisomicinas descritas, por lo que esta longitud de onda se usa para darle mayor especificidad a la determinación de estas antracenonas. El nivel de pureza de todos los picos estudiados establecido por medio del cociente de absorbancias y sobreposición de espectros fue mayor del 99 % lo cual indica que los estándares utilizados en esta investigación fueron lo suficientemente puros para que los resultados obtenidos fueran confiables.

4.6 Robustez

El parámetro que se seleccionó para estudiar el efecto de las variables en el ensayo de robustez fue el tiempo de retención, por estar involucrado con los parámetros de separación y resolución.

Al aplicar el criterio de selección propuestos en el diseño de Placket y Burman⁽¹⁹⁾, se llega a la conclusión de que las variables que tienen influencia significativa en el análisis son básicamente el flujo, la proporción de acetonitrilo y temperatura; produciendo estos dos últimos parámetros, alteración en el orden de elución. En el caso de la temperatura, cuando se trabajó a 35 °C se observó un ensanchamiento de las señales cromatográficas, lo que trae como consecuencia una disminución de la resolución.

La influencia de factores como la concentración de ácido acético y diámetro de la partícula, aunque produjeron modificaciones en los tiempos de retención, su efecto sobre el método, de acuerdo al criterio empleado no fue significativo.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

1.- Se logró optimizar el método para la determinación de las Peroxisomicinas estudiadas, ya que las condiciones de elución encontradas mejoraron el coeficiente de deseabilidad descrito de 2.60 para las condiciones preestablecidas a 4,59 y 6,12 para columnas de 5 y 3 μm lo cual representa un 79 % y un 140 % respectivamente.

2.- La evaluación de la precisión del sistema nos informa de que éste tiene una buena precisión en la determinación de las antracenonas descritas. Mientras que los valores obtenidos de los coeficientes de variación del método, aunque relativamente altos, se encuentran dentro de los recomendados por la bibliografía respectiva.

3.- Se determinó la linealidad de las respuestas de las antracenonas estudiadas de manera gráfica y las ecuaciones de regresión. Se encontró correlación lineal en el intervalo de masa inyectada de 5 a 200 ng a 269, 310 y 410 nm por áreas y alturas.

4.- Los límites de detección y cuantificación encontrados por tres métodos distintos establecen la necesidad de aumentar la precisión del método hasta lograr valores más bajos de error estándar en las lecturas de cada muestra estudiada.

5.- Del ensayo de robustez, se concluye que el flujo, el % de acetonitrilo y la temperatura tienen influencia significativa sobre el tiempo de retención.

5.2 Recomendaciones

Todos los estándares de los compuestos estudiados se preparan de manera habitual en metanol, sin embargo estudios de solubilidad de Isop A1 e Isop A2 revelan que soluciones más homogéneas de estos compuestos se consiguen si Isop A1 se disuelve primero en el volumen mínimo de una mezcla etanol:DMSO (2:1) e Isop A2 en DMSO aforándose luego de la manera habitual con metanol. La preparación de un volumen total de la solución madre de los estándares utilizados de 10 mL en vez de una solución de 1 mL contribuirá también a mejorar los valores de correlación lineal y de precisión para cada punto determinado en las determinaciones que se hagan de estos compuestos.

El mejoramiento en la precisión del método proporcionará mejores elementos para la determinación de los límites de detección y cuantificación ya que el comportamiento del error estándar del método

ubicará estos valores dentro de los límites aceptable esperados.

En el estudio de robustez se aprecia que el orden de elución de los compuestos estudiados es sensible al cambio de variables experimentales; tales como el flujo, % acetonitrilo y la temperatura. Es pertinente profundizar más en esta parte de los resultados para establecer el mecanismo de inversión en el orden de elución de los compuestos estudiados. Al conocer la forma en que se produzcan estos cambios en la elución se podrá aumentar la reproductibilidad de los resultados



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

REFERENCIAS.

1. Clavijero, F. J. *Historia de la Antigua o Baja California* . 3 ed., México. Ed. Porrúa, 1982 (c 1982) 31.
2. Weller, Roy O., Mitchell, John and Daves, G. Doyle. Jr. *Experimental and Clinical Neurotoxicology: Buckthorn (Karwinskia humboldtiana) toxins*.. Baltimore, Ed. Williams and Wilkins, (c 1980) 336-355.
3. Bustamante-Sarabia, J., Olvera-Rabiela, J. y Nieto-Cañedo, L. "Intoxicación fatal por tullidora (*Karwinskia humboldtiana*), comunicación de un caso". *Gaceta médica* . 114, México, 1978: 241.
4. Dreyer, D., Arai, I., Bashman, C., Anderson, W., Smith, R. and Daves, D. "Toxins causing non inflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation". *J. Am. Chem. Soc.* 97, 1975: 4985.
5. Bermudez, M. V., González Spencer, D., Guerrero, M., Waksman, N. and Piñeyro, A. "Experimental intoxication with fruit and purified toxins of Buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*)". *Toxicon*. 25, 1987: 565-568.
6. Bermudez, M., Martínez, F., Salazar, M., Waksman, N. and Piñeyro, A. "Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora) in rat, guinea-pig, hamster and dog". *Toxicon* . 30, 1992: 1493.
7. Piñeyro, A., Martínez de Villarreal, L. and González, R. "In vitro selective toxicity of toxin T514 from *K. humboldtiana* (Buckthorn) plant on various human tumor cell lines". *Toxicology*. 92, 1994: 217-227.

8. Waksman, N., Martínez, L. y Fernandez, R. "Chemical and toxicological screening in genus *Karwinskia* (México)". *Rev.Latinoam. Quim.* 20 / 1, 1989: 27-29.
9. Ramírez Durón, R., Martínez, F.J. Fernandez, R., Waksman, N., Piñeyro, A. "Estudios preliminares en una nueva especie de *Karwinskia*". XXXII Congreso Mexicano de Química. Guanajuato, México, 1996.
10. Waksman, N., Ramírez, R. "Isolation of a new dimeric anthracenone from *Karwinskia parvifolia*". *Rev. Latinoamer. Quím.* 23 / 1 and 22 / 4, 1992: 25.
11. Rivas Galindo, V. M. "*Estudio Químico de los Extractos Semipolares de Frutos de K. parvifolia y K. johnstonii*". Monterrey, 1995: 89 .Tesis (Maestría en Ciencias con Especialidad en Química Analítica Biomédica) Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina, U.A.N.L.
12. Sepulveda, J., Van der Klei, I. Keizer, I., Piñeyro, A., Harder W.and Veenhuis, M. "Studies on the effect of toxin T- 514 on the Integrity of Peroxisomes in Methylotrophic Yeast". *FEMS Microbiology Letter*. 91,(1992): 207-212.
13. Gill, M., Steglisch, W. "Pigments of fungi" *Progress Chemistry of Organic Natural Products*. Springer verlag, Nueva York, 1987: 151-163
14. Arai, I., D reyer, D. L., Anderson, W. R., and Daves, D. "Neurotoxins of *Karwinskia humboldtiana*. atropisomerism and diastereoisomeric oxidation products". *Journal of the American Chemical Society* . 97, 1975: 4985-4990.
15. Martinez Villarreal, L. "Estudio de las Propiedades Fisicoquímicas de Toxinas Aisladas de *K. humboldtiana*" Monterrey, 1990. 77 p. Tesis (Maestría en Ciencias con Especialidad en Química Analítica Biomédica) Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, U.A.N.L.

16. Guerrero, M., Piñeyro, A. and Waksman, N. "Extraction and Quantification of Toxins from *Karwinskia humboldiana* (Buckthorn)". *Toxicon*. n. 5, v. 25, 1987: 565-568.
17. Salazar, M.de la L., Piñeyro, A., Waksman, N. "A Reverse Phase HPLC Method for Quantification of Peroxisomicine and other Anthracenonic Compounds". *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 19 (9), 1996: 1391-1403.
18. Hendrix, C. D. "Empirical Optimization in Research and Development". Union Carbide Corporation, South Charleston, West Virginia, 1970: 1-28.
19. Quattrocchi, O. A., De Andrizzi, S. A., Laba, R.F. "Introducción a la HPLC, Aplicación y práctica ". Argentina, Ed. Artes Gráficas Farro, 1992: 39-63, 279-283.
20. Long, Gary L., Winefordner, James D. "Limit of Detection. A Closer Look at the IUPAC Definition". *Analytical Chemistry*. 7 (55), 1983: 712A-723A.
21. Bonate, Peter L. "Chromatographic Calibration Revisited". *Journal of Chromatographic Science* . 12 (28) 1990: 559-562.
22. Horwitz, William. "Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drug". *Analytical Chemistry*. 1 (54) 1982: 67A-76A.

